

异氟烷预处理对缺血再灌注损伤鼠脑组织中 *Bcl-2* 和 *Bax* 的 mRNA 表达的影响

沈洁, 吴兴茂, 陈卫民

(中国医科大学附属盛京医院麻醉科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的:通过观察异氟烷(ISO)预处理对沙士鼠脑缺血再灌注(I/R)凋亡相关基因 *Bcl-2* 和 *Bax* 的 mRNA 在脑组织中的表达,探讨 ISO 预处理的作用机制。方法:50 只沙士鼠随机分 5 组:SHAM 组(假手术组),只分离双侧颈总动脉而未夹闭;I/R 组,夹闭双侧颈总动脉 5 min 后开放;ISO 组,I/R 前 60 min 接受 1.2%~1.5%的 ISO 预处理;5-HD+ISO 组, 线粒体 ATP 敏感性钾通道(mitoK_{ATP})阻滞剂 5-HD 10mg/kg 腹腔内注射 30 min 后同 ISO 组;5-HD 组,5-HD 腹腔内注射 30 min 后行 I/R 损伤。24 h 后取鼠前脑,采用 RT-PCR 检测脑组织中 *Bcl-2*、*Bax* 基因的 mRNA 表达。结果:ISO 组 *Bcl-2* 的 mRNA 表达增高,与 SHAM 组和 5-HD+ISO 组比较差异显著($P < 0.05$);I/R、5-HD+ISO 和 5-HD 组 *Bax* 的 mRNA 表达明显增高,与 SHAM 组比较差异显著($P < 0.05$)。结论:ISO 预处理对沙士鼠脑 I/R 的保护作用可能就是通过激活 mitoK_{ATP} 通道,使 *Bcl-2* 结合到线粒体膜上的量增加,同时阻止 *Bax* 转录到线粒体膜上,稳定了线粒体,发挥细胞保护作用。

[关键词] 异氟烷;预处理;再灌注损伤;线粒体;凋亡

[中图分类号] R322.8

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-4646(2007)02-0138-03

Effect of isoflurane preconditioning on *Bcl-2* and *Bax* mRNA expression after ischemia/reperfusion in gerbil brain

SHEN Jie, WU Xing-mao, CHEN Wei-min

(Department of Anesthesiology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of isoflurane (ISO) preconditioning on *Bcl-2* and *Bax* mRNA expression after ischemia/reperfusion (I/R) in gerbil brain and the mechanism. Methods: Fifty gerbils were randomly divided into 5 groups: sham operation group, I/R group, ISO group, 5-HD+ISO group, and 5-HD group. The bilateral common carotid arteries were isolated but not occluded in the sham operation group and occluded for 5 minutes in I/R group. The animals received isoflurane (1.2%~1.5%) preconditioning 60 minutes before I/R in ISO group, received 5-HD (10 mg/kg), the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel (mitoK_{ATP}) blocker, and ISO before I/R in 5-HD+ISO group, and received 5-HD 30 minutes before I/R in 5-HD group. After 24 hours, the forebrains were sampled, and the total RNA was isolated by trizol reagent. The expression of *Bcl-2* and *Bax* mRNA was determined by reverse transcriptase polymerase chain reaction. Results: *Bcl-2* mRNA expression in ISO group was significantly higher than that in sham operation group and 5-HD+ISO group ($P < 0.05$). *Bax* mRNA expression in groups I/R, 5-HD+ISO, and 5-HD was significantly higher than that in sham operation group ($P < 0.05$). Conclusion: The isoflurane preconditioning has a protective effect on gerbil brain after I/R by promoting the binding of *Bcl-2* to mitochondria and simultaneously preventing *Bax* translocation to mitochondria, which is the result of the activation of mitoK_{ATP}.

[Key words] isoflurane; preconditioning; reperfusion injury; mitochondria; apoptosis

近年来的研究表明线粒体 ATP 敏感性钾通道 (mitochondrial K_{ATP}, mitoK_{ATP}) 是预处理细胞保护作用的靶点^[1], DONG LIU 等人^[2]的研究发现二氮嗪引发 mitoK_{ATP} 的活化增加了 *Bcl-2* 与线粒体的结合,同时防止 *Bax* 转录到线粒体,进而发挥各自的抗凋亡和促凋亡作用。临床常用的异氟烷(isoflurane, ISO) 预处理对沙士鼠脑缺血再灌注 (ischemia reperfusion, I/R) 凋亡相关基因 *Bcl-2* 和 *Bax* 有何改变,国内外尚未见报道。本研究旨在通过观察 ISO 预处理后

Bcl-2 和 *Bax* mRNA 在沙士鼠前脑组织中的表达进一步探讨 ISO 预处理的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

健康雄性蒙古沙士鼠 60~80 g, 由本院动物部提供,共 50 只,随机分 5 组($n = 10$)。SHAM 组(假手术组),只分离双侧颈总动脉而未予夹闭;I/R 组,夹闭双侧颈总动脉 5 min 后再开放;ISO 组,行 I/R 损伤前将鼠置于 100 cm × 100 cm × 100 cm 的实验舱里,内放 ISO(雅培公司)和钠石灰,使 ISO 浓度维持在 1.2%~1.5%(Datex 气体监测仪监测),进行 ISO 预处

[作者简介] 沈洁(1963 -),女,副教授,博士。

E-mail: shenjje@163.com

理 30 min, 后在空气中洗脱 30 min; 5-HD+ISO 组, 5-羟基癸酸盐(5-hydroxydecanoate, 5-HD)(sigma 公司) 10 mg/kg 腹腔内注射, 30 min 后同 ISO 组; 5-HD 组, I/R 前 30 min 5-HD 10 mg/kg 腹腔内注射。所有动物手术前夜禁食不禁水, 10% 水合氯醛 0.35 g/kg 腹腔注射麻醉, 颈正中切口, 暴露双侧颈总动脉。脑 I/R 损伤用无创微动脉夹夹闭双侧颈总动脉 5 min 后再开放, 同时监测脑电图, 1 min 内未成等电位的从实验中剔除。整个实验过程利用加热灯泡使鼠肛温保持在 36.7~37.3℃。

1.2 标本采集

实验动物均在手术后 24 h 迅速断头取脑, 用冰生理盐水冲洗, 取前脑组织, 将其置液氮中保存。

1.3 脑组织中 *Bcl-2*、*Bax* 基因的 mRNA 的表达

1.3.1 细胞总 RNA 的提取: 取脑组织 100 mg, 置于冰上平皿中剪碎, 加入 1 ml RNA 提取液研磨成匀浆, 参照动物 RNAOUT 手册方法提取 RNA。

1.3.2 *Bcl-2* 和 *Bax* 的 mRNA 引物设计: 依照 *Bcl-2* 和 *Bax* cDNA 顺序设计引物。*Bcl-2*-F: 5'-GGGATACTG-GAGATGAAGACT-3', *Bcl-2*-R: 5'-CCACCGAAGT-CAAAGAAGG-3', 产物长度 367 bp; *Bax*-F: 5'-GTTGC-CCTCTTCTACTTTGC-3', *Bax*-R: 5'-ATGGTCACT-GTCTGCCATG-3', 产物长度 194 bp; β -actin-F: 5'-CACCTGTGCTGCTCACCGAGGCC-3', β -actin-R: 5'-CCACACAGATGACTTGGCTCAGG-3', 产物长度 690 bp(由上海博亚生物技术有限公司提供)。

1.3.3 RT-PCR 反应: 取 RNA 2 μ l 合成 cDNA, 取逆转录混合物 3 μ l, 并应用 PCR 扩增 *Bcl-2* 和 *Bax*。PCR 循环设置: (*Bax*) 94℃ 3 min \rightarrow 94℃ 45 s \rightarrow 54.6℃ 1 min \rightarrow 72℃ 1 min \rightarrow 72℃ 7 min, 35 个循环; (*Bcl-2*) 94℃ 3 min \rightarrow 94℃ 45 s \rightarrow 57℃ 1 min \rightarrow 72℃ 1 min \rightarrow 72℃ 7 min, 35 个循环; (β -actin) 94℃ 3 min \rightarrow 94℃ 30 s \rightarrow 55℃ 1 min \rightarrow 72℃ 2 min \rightarrow 72℃ 7 min, 35 个循环。 β -actin 为内参照。

1.3.4 PCR 产物分析: PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外观察仪上照相, 在图像分析系统上进行密度扫描定量, 将其与 β -actin 蛋白条带强度的比值作为 *Bcl-2* 和 *Bax* mRNA 表达。

1.4 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 使用 SPSS12.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 各组 *Bcl-2* 和 *Bax* 的 mRNA 电泳结果

Bcl-2 mRNA 的 RT-PCR 电泳结果显示在 367 bp 处 ISO、I/R 和 5-HD+ISO 组可分别观察到特异性条带, ISO 组表达较强, SHAM 组和 5-HD 组没有观察到特异性条带, 见图 1; *Bax* mRNA 的 RT-PCR 电泳结果显示在 194 bp 处 ISO、I/R、5-HD+ISO 和 5-HD 组可分别观察到特异性条带, 但 ISO 组表达较弱, SHAM 组没有观察到特异性条带, 见图 2。

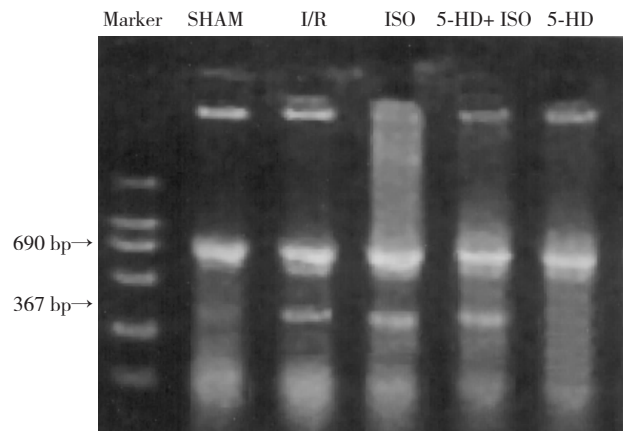


图 1 各组沙士鼠脑组织 *Bcl-2* RT-PCR 产物电泳图

Fig. 1 Expression of *Bcl-2* mRNA in gerbil brain 24 hours after I/R

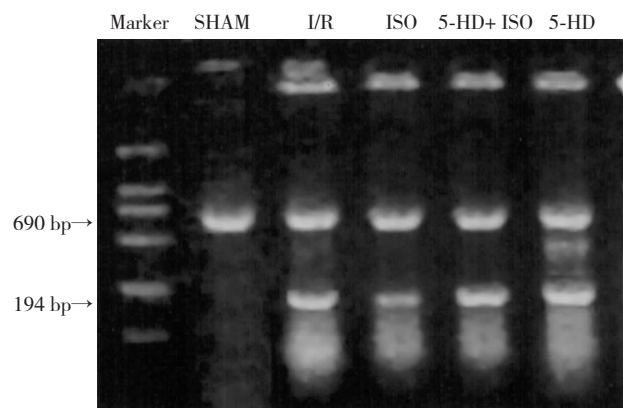


图 2 各组沙士鼠脑组织 *Bax* RT-PCR 产物电泳图

Fig. 2 Expression of *Bax* mRNA in gerbil brain 24 hours after I/R

2.2 各组 *Bcl-2* 和 *Bax* 的 mRNA 表达比较

ISO 组 *Bcl-2* 的 mRNA 表达增高, 与 SHAM 组、I/R 组和 5-HD+ISO 组比较差异显著 ($P < 0.05$); *Bax* 的 mRNA 表达在 I/R、5-HD+ISO 和 5-HD 组明显增高, 与 SHAM 组比较差异显著 ($P < 0.05$), ISO 组与其他各组比较差异无显著性 ($P > 0.05$), 5-HD 组 *Bcl-2* 和 *Bax* 的 mRNA 表达与 I/R 组比较差异均无显著性, 见表 1。

2.3 各组 *Bcl-2*/*Bax* 的比较

在 I/R、5-HD+ISO 和 5-HD 组 *Bcl-2*/*Bax* 的比值明显降低, 与 ISO 组比较差异显著 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 各组 *Bcl-2* 和 *Bax* 的 mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 Comparison of the expressions of *Bcl-2* and *Bax* mRNA in gerbil brain ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	<i>Bcl-2</i>	<i>Bax</i>	<i>Bcl-2/Bax</i>
SHAM	10	0.83 ± 0.36	0.84 ± 0.41	1.43 ± 1.28
I/R	10	0.83 ± 0.51 ²⁾	1.24 ± 0.33 ¹⁾	0.85 ± 0.58 ²⁾
ISO	10	1.22 ± 0.42 ¹⁾	0.92 ± 0.39	1.82 ± 1.58
5-HD+ISO	10	0.82 ± 0.31 ²⁾	1.20 ± 0.40 ¹⁾	0.74 ± 0.30 ²⁾
5-HD	10	0.89 ± 0.41	1.28 ± 0.36 ¹⁾	0.71 ± 0.32 ²⁾

注:1)与 SHAM 组比较 $P < 0.05$; 2)与 ISO 组比较 $P < 0.05$

3 讨论

本研究吸入 ISO 的浓度和时间符合 ISO 预处理所需浓度与时间。沙士鼠由于其大脑基底动脉环缺如,只要阻断双侧颈总动脉就可造成大脑(前脑)完全缺血。因此,本实验阻断沙士鼠双侧颈总动脉 5 min,造成一过性大脑缺血损伤,观察凋亡相关基因表达情况,探讨 ISO 预处理作用。

现在认为轻中度暂时性脑缺血损伤所致的神经细胞迟发性死亡也是一种凋亡性死亡,在哺乳动物中 *Bcl-2* 基因家族及其编码的蛋白质在细胞凋亡调控过程中起着重要作用。该家族包括两类功能相反的蛋白质基因: *Bcl-2*、*Bcl-xl* 是脑组织中表达较高的抗凋亡基因, *Bax* 则是促凋亡基因。本实验观察了 ISO 对 I/R 损伤沙士鼠脑组织中的凋亡相关基因 *Bcl-2* 和 *Bax* 的表达,结果表明给沙士鼠进行 ISO 预处理使鼠脑组织中 *Bcl-2* 的 mRNA 表达增高,同时 *Bax* 的 mRNA 表达下降,提高了 *Bcl-2/Bax* 的比例,当 *Bcl-2/Bax* > 1 : 2 时,细胞存活,该比例增高已被证实能阻止凋亡细胞死亡^[3],说明 ISO 预处理能使沙士鼠一过性大脑完全缺血后脑组织抗凋亡基因 *Bcl-2* 表达上调,促凋亡基因 *Bax* 表达下调;而在 ISO 预处理前用特异性 *mitoK_{ATP}* 通道阻滞剂 5-HD 给鼠腹腔注射干预后,取消了 ISO 预处理上调 *Bcl-2* 作用,表明阻断 *mitoK_{ATP}* 的开放阻断了 ISO 预处理对凋亡相关基因 *Bcl-2* 和 *Bax* 的作用。同时我们也设立了 5-HD 组,其结果说明特异性 *mitoK_{ATP}* 通道阻滞剂 5-HD 本身对沙士鼠脑 I/R 损伤没有作用。

MAULIK 等对心肌细胞的研究表明缺血预处理能上调抗凋亡基因 *Bcl-2* 并且使促凋亡基因 *Bax* 在线粒体膜上含量减少,这些基因表达量的变化与细胞是否存活有密切关系,而其发挥作用的前提是定

位于线粒体膜上,通过调节线粒体膜电位的变化,影响线粒体通透性转运通道(mitochondrial permeability transition pore, MPTP),进而改变线粒体蛋白的释放,调控细胞凋亡。许多因素如 Ca^{2+} 、*Bax* 及活性氧自由基改变等都可触发 MPTP 开放^[4],而当 *Bax* 浓度达到 0.25~1.00 mmol/L 时,正常情况下以单体形式存在于细胞质的 *Bax* 构象发生变化,导致 *Bax* 寡聚化形成并整合到线粒体外膜上,形成足够大的孔道使 MPTP 长期开放,线粒体膜间隙的细胞色素 C 及凋亡诱导因子等物质释放出来,从而诱导线粒体基质肿胀造成细胞损伤及细胞凋亡^[5]。抗凋亡基因 *Bcl-2* 等能够中和 *Bax*、*Bak* 等凋亡基因的活性,阻止 *Bax* 和 *Bak* 的寡聚化从而阻断凋亡途径。

吸入麻醉药预处理的细胞保护作用与二氮嗪一样是 *mitoK_{ATP}* 的开放剂,我们的前期研究^[6]表明 ISO 预处理对沙士鼠脑 I/R 损伤的保护作用与促进 *mitoK_{ATP}* 活化和抑制 MPTP 的开放有关。因此,可以推测 ISO 预处理对沙士鼠脑 I/R 损伤的保护作用可能就是通过激活 *mitoK_{ATP}* 通道,使 *Bcl-2* 结合到线粒体膜上的量增加,同时阻止 *Bax* 转录到线粒体膜上,从而抑制了 MPTP 的大量开放,稳定了线粒体,阻止线粒体释放细胞色素 C 等凋亡相关蛋白,进而阻断凋亡途径,发挥细胞保护作用。

参考文献:

[1] MURATA M,AKAO M,O'ROUKE B. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca^{2+} overload during simulated ischemia and reperfusion possible mechanism of cardioprotection [J]. *Circ Res*,2001,89(5): 891-898.

[2] DONG LIU,CHENGBIAO LU,RUIQIAN WAN,et al. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of *bax* translocation and cytochrome c release [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*,2002,22(4):431-443.

[3] SHI YH,TANG XM. Transporting pathway of apoptosis and its regulation [J]. *Chin J Cell Biol*,1999,1(1):49-53.

[4] 常青,王晓良. 细胞色素 C、线粒体与凋亡 [J]. *中国药理学通报*,2003,19(3): 241-244.

[5] PASTORINO JG,TAFANI M,ROTHMAM RJ,et al. Functional consequences of the sustained or transient activation by *Bax* of the mitochondrial permeability transition pore [J]. *J Biol Chem*,1999,274(44):31734-31739.

[6] 沈洁,孙震,刘海军,等. 异氟醚预处理对沙士鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中华麻醉学杂志*,2006,26(3): 242-245.

[收稿日期] 2006-02-28