

Cariporide 对热缺血大鼠停跳心脏颈部移植术后 *bcl-2* 和 *bax* 基因表达的影响

罗凡砚, 陈胜喜, 王霖, 胡庆华, 朱国勇

(中南大学湘雅医院心胸外科, 长沙 410008)

[摘要] 目的:对热缺血死亡大鼠停跳心脏异位移植术后的供体进行有关 *bcl-2* 和 *bax* 基因表达的研究,以观察 cariporide 对大鼠停跳心脏供体的保护作用。方法:取清洁级 Sprague-Dawley 雄性大鼠共 112 只,随机分成 7 组,每组 16 只,即正常心脏对照组(C 组);心脏停搏后 10, 30, 45 min 取心组(S_{10} , S_{30} , S_{45} 组);心脏停搏后 10, 30, 45 min 取心并用 cariporide 灌注组(SH_{10} , SH_{30} , SH_{45} 组);对实验组大鼠均采用热缺血死亡处理,再用颈部 Cuff 法进行异位心脏移植。 S_{10} , SH_{10} , S_{30} , SH_{30} 组于移植后 48 h 取供心标本, S_{45} , SH_{45} 组于移植术后取供心标本。然后采用 RT-PCR 法检测标本心肌细胞的 *bcl-2* 和 *bax* 基因的表达。结果:大鼠腹主动脉横断放血后 $9 \sim 11(10.11 \pm 0.59)$ min 死亡;RT-PCR 检测 *bcl-2* 基因的电泳图显示实验 C 组的表达最强,相对光密度 ROD 值最大,*bax* 基因的表达最弱,ROD 值最小; S_{10} 组、 S_{30} 组 *bcl-2* 基因 ROD 值小于 SH_{10} 组、 SH_{30} 组;而 *bax* 基因的 ROD 值正好相反,差异具有统计学意义($P < 0.05$); S_{45} 和 SH_{45} 组比较 ROD 值结果无统计学差异($P > 0.05$)。结论:热缺血死亡大鼠颈部异位心脏移植模型是进行 NHBD 的心肌保护研究的理想模型;cariporide 能抑制热缺血死亡后(30 min 内)大鼠心脏心肌细胞凋亡的发生。

[关键词] cariporide; 热缺血; 停跳心脏供体; 颈部移植; *bcl-2* 基因; *bax* 基因

[中图分类号] R654.2 [文献标识码] A [文章编号] 1672-7347(2008)06-0507-05

Effect of cariporide on the expression of *bcl-2* and *bax* genes after neck heart transplatation from non heart-beating rats caused by warm ischemia

LUO Fan-yan, CHEN Sheng-xi, WANG Lin, HU Qing-hua, ZHU Guo-yong

(Department of Cardiothoracic Surgery, Xiangya Hospital,
Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To detect the expression of *bcl-2* and *bax* genes after heterotopic heart transplantation in rats that died of warm ischemia, and to explore the effect of cariporide on the protection of the rat's non heart-beating donors. **Methods** One hundred and twelve clearing Sprague-Dawley male rats were divided into 7 groups at random (each group contained 16 rats): the control group (Group C), the groups of transplanted hearts after 10, 30, and 45 min of asystolia (Group S_{10} , S_{30} , and S_{45}), and the groups of transplanted hearts after 10, 30, and 45 min of asystolia and infused with cariporide (Group SH_{10} , SH_{30} , and SH_{45}). The experimental groups were sacrificed total-

收稿日期 (Date of reception) 2007-12-25

作者简介 (Biography) 罗凡砚(1973-),男,湖南长沙人,主治医师,主要从事心肌保护的研究。

通讯作者 (Corresponding author) 王霖, E-mail: wanglin79922@163.com

基金项目 (Foundation item) 教育部高等学校博士学科点基金新教师基金(20070533012)。 The work was supported by Young Teacher's Fund for the Doctoral Program of Higher Education of P. R. China (20070533012).

ly by warm ischemia, and heterotopic heart transplantation was processed by the Cuff method. The heart samples of S_{10} , SH_{10} , S_{30} , and SH_{30} groups were taken at 48 hours after the transplantation, and the heart samples of S_{45} , and SH_{45} groups were taken just after transplantation. The expression of *bcl-2* and *bax* genes were detected by RT-PCR. **Results** The death of rats was affirmed when cardiac electric waves vanished after 9 ~ 11 minutes of transection of abdominal aorta. On the RT-PCR test, the expression of *bcl-2* gene was the highest and ROD value was maximum in the control group. The expression of *bax* gene was the lowest and ROD value was minimum in the control group. The ROD value of *bcl-2* genes in S_{10} and S_{30} groups was less than that in SH_{10} and SH_{30} group. The ROD value was just the opposite, and there was statistical difference ($P < 0.05$). There was no statistical difference between Group S_{45} and Group SH_{45} ($P > 0.05$). **Conclusion** The model of heterotopic neck heart transplantation is a convenient animal model for the cardiac muscle protection. Cariporide can suppress the apoptosis of cardiac muscle cells in rats (within 30 min) after death caused by warm ischemia.

Key words: cariporide; warm ischemia; non heart-beating donors; neck heart transplantation; *bcl-2* gene; *bax* gene

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2008, 33(6):0507-05]

Cariporide 是一种新型的、高选择的、特异的钠/氢离子交换 (NHE1) 抑制剂, 具有不良反应少, 生物利用度高的优点^[1], 有研究发现其对细胞凋亡有抑制作用。*bcl-2* 和 *bax* 基因家族是目前公认与凋亡密切相关的基因, 包括抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白, 对心肌细胞凋亡起着重要的调控作用。本实验在建立大鼠颈部异位热缺血停跳心脏移植模型的基础上, 对热缺血死亡的大鼠停跳心脏添加 cariporide (浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$), 并检测移植术后的供体心肌细胞 *bcl-2* 和 *bax* 基因表达情况, 旨在观察 cariporide 的相关作用。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 清洁级 Sprague-Dawley 雄性大鼠 112 只, 月龄 2 ~ 3 月, 体质量 250 ~ 280 g。

1.1.2 实验器材 10 倍 SXP-1 双人双目手术显微镜为上海医用光学仪器厂生产; 显微外科和常规手术器械为上海医疗器械厂生产; RM6000 四导生理记录仪为日本光电厂产品; 西门子恒温冰箱; 输液泵为浙江大学医药有限公司生产; PCR 仪为德国 Biometra 生产; JY-SPC 水平电泳槽为北京君意东方仪器公司生产; DG-III 双稳数显电泳仪北京鼎国生物技术发展中心产品。

1.1.3 实验试剂 10% 水合氯醛; 肝素钠注射液; STH-1 液; Cariporide 为德国 Hoechst 公司产品; Trizol Reagent, Cat. NO. 15596-026 和 Lot NO. 1121069 为美国 Invitrogen 公司产品; ReverTra Ace- α -TM-First Strand cDNA Synthesis Kit 为 TOYOBO 公司产品; Taq DNA Polymerase (recombinant) 为 Fermentas 公司产品; dNTP Mix (2mM each) 为 Fermentas 公司产品; DNA Marker DL2000 为 TaKaRa 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 将全部大鼠随机分成 7 大组, 每组 16 只, 具体如下: 正常心脏对照组 (C 组); 心脏停搏后 10, 30, 45 min 取心组 (S_{10} , S_{30} , S_{45} 组); 心脏停搏后 10, 30, 45 min 取心并用 cariporide 灌注组 (SH_{10} , SH_{30} , SH_{45} 组)。

1.2.2 热缺血死亡大鼠颈部异位心脏移植模型 供体和受体以 10% 水合氯醛 (0.7 ~ 0.8 mL) 腹腔注射麻醉。用多道生物信息分析系统的心电图监测。右颈部前外侧纵形切口, 显露右颈外静脉和右颈总动脉, 于颈外静脉内注射浓度为 500 U/mL 的肝素生理盐水 1 mL, 以达全身肝素化。沿腹正中中线进腹并找到腹主动脉, 横断腹主动脉放血, 待心电图示心脏停搏并达到预定时间时 (10, 30, 45 min), 取心备用。供心取下后置入 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 STH-1 液中, 再放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温冰箱, 在冰

箱内用输液泵连接供心主动脉后 S_{10} , S_{30} , S_{45} 组用 STH-1 液灌注 30 min, SH_{10} , SH_{30} , SH_{45} 组将 cariporide (浓度为 $20 \mu\text{mol/L}$) 加入到 STH-1 液中灌注。移植手术采用颈部 Cuff 法^[2], 即供心升主动脉和肺动脉干分别与受体鼠一侧颈总动脉和颈外静脉采用套管法套扎。术后当天单笼饲养, 喂饲糖盐水, 不用抗菌素。若术后 2 d 内触诊移植心明显变小、搏动无力, 或明显增大、质硬、节律减慢, 则多为动脉血栓形成或静脉吻合口狭窄等并发症, 视为手术失败。

1.2.4 移植心标本的获取 C, S_{10} , SH_{10} , S_{30} , SH_{30} 组于心脏移植术后 48 h 取供心标本; S_{45} , SH_{45} 组因为全部不能正常复跳, 遂于移植术后即进行心肌标本的制取。

1.2.5 心肌标本检测 采用 RT-PCR 法检测心肌细胞 *bcl-2* 和 *bax* 基因的表达。引物序列如下: Control primer F (G3PDH), Control primer R (G3PDH)。*bcl-2* 和 Primer C 序列: 5'-GG-GAGCGTCAACAGGGAGAT-3'。Primer B 序列: 3'-AGACAAACTAAAGAGACCGAC-5', 扩增片段长度为 168 bp。*bax* 的 Primer C 序列: 5'-TTTCATCCAG-GATCGAGCAGA-3'。Primer B 序列: 3'-CCAACGG-GAGAAGATGAAACGA-5', 扩增片段长度为 265 bp。

1.3 统计学处理 所有数据以均数 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS13.0 统计软件自动分析, 比较两组之间的差异采用 Student *t* 检验, 多组间的差异比较采用方差分析; 统计结果以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 失血休克死亡濒死时间观察 大鼠腹主动脉横断放血后 9 ~ 11 (10.11 ± 0.59) min, 心电波消失, 认为死亡。

2.2 RT-PCR 结果 各实验组 *bcl-2* 基因的 ROD 值均比 C 组低, 差异显著; S_{10} , S_{30} 组 *bcl-2* 基因的 ROD 值比 SH_{10} , SH_{30} 组低, 差异显著; *bax* 基因的 ROD 值正好呈相反改变。 S_{45} 组与 SH_{45} 组的 *bcl-2*, *bax* 基因的 ROD 值均无明显差异。电泳泳道图可见 *bcl-2* 基因的表达 C 组最强, 余下各组从强到弱依次为 SH_{10} 组 > S_{10} 组 > SH_{30} 组 > S_{30} 组 > SH_{45} 组 > S_{45} 组。*bax* 基因的表达 C 组最弱, 余下各组从弱到强依次为 SH_{10} 组 < S_{10} 组 < SH_{30} 组 < S_{30} 组 < SH_{45} 组 < S_{45} 组 (表 1, 图 1)。

表 1 各组间 *bcl-2* 和 *bax* 基因 ROD 值的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 16$)
Tab. 1 Comparison of the *bcl-2* and *bax* gene's ROD value between groups ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	<i>bcl-2</i> 基因的 ROD 值	<i>bax</i> 基因的 ROD 值
C 组	45.59 ± 4.83	15.47 ± 2.83
S_{10} 组	$34.39 \pm 4.62^*$	$22.39 \pm 2.62^*$
SH_{10} 组	$39.66 \pm 4.49^{*\Delta}$	$18.66 \pm 2.49^{*\Delta}$
S_{30} 组	$27.54 \pm 3.22^*$	$31.41 \pm 3.22^*$
SH_{30} 组	$30.14 \pm 3.31^{*\Delta}$	$27.22 \pm 3.31^{*\Delta}$
S_{45} 组	$19.88 \pm 2.79^*$	$39.25 \pm 3.79^*$
SH_{45} 组	$21.93 \pm 2.19^*$	$37.10 \pm 3.77^*$

与 C 组比较, $*P < 0.05$; SH_{10} 组与 S_{10} 组, SH_{30} 组与 S_{30} 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

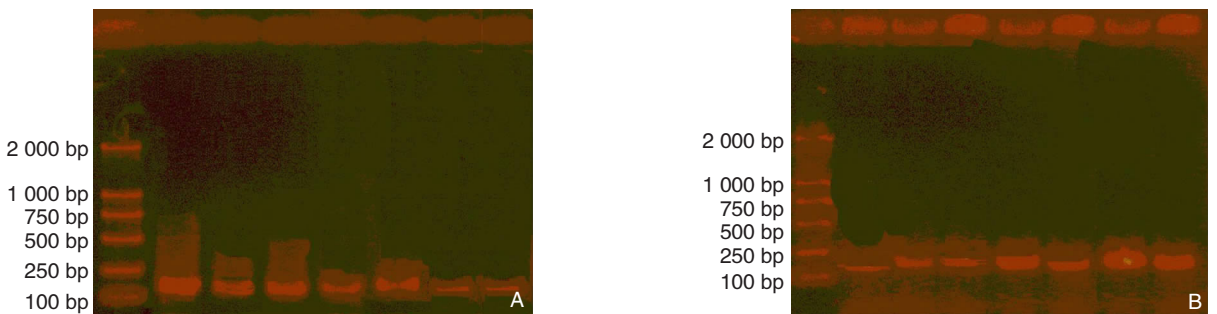


图 1 DNA 凝胶电泳图。A: *bcl-2* 基因; B: *bax* 基因。

Fig. 1 Gel electrophoresis of DNA. A: *bcl-2* gene. B: *bax* gene.

3 讨 论

Cariporide 是一种新型、高效、高选择性的 Na^+/H^+ 离子交换抑制剂(NHEI),具有不良反应少,生物利用度高的优点。能特异性地抑制心肌细胞质膜 NHE1,减轻细胞内 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ 超载,防止心肌缺血/再灌注损伤^[3]。 Na^+/H^+ 交换蛋白是一种位于细胞膜上的一种结构蛋白^[4],NHE 有 6 种亚型(NHE1 ~ NHE6),存在于人类心肌细胞的主要是 NHE1,它在保持心肌细胞内的 pH 值、 Na^+ 和 Ca^{++} 离子的平衡方面起了重要的作用。细胞内 pH 在生理范围时,NHE1 处于失活状态,心肌细胞 pH 值的调节要依靠 Na^+/HCO^- 协同转运。当心肌缺血及再灌注时,细胞内 H^+ 浓度增加,不仅使 NHE1 mRNA 表达明显增高,NHE1 合成增加,而且激活 NHE1 以排出 H^+ 维持细胞内正常 pH^[4,5]。NHEI 通过抑制 Na^+/H^+ 交换,避免过多 Na^+ 进入细胞内,进而使 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ 这一交换减少,防止 Ca^{++} 过度增加引起细胞挛缩,坏死,这是此类药物的最主要作用机制。

近年来各国都在努力寻找新的供体来源,即将临床死亡的尸体停搏心脏(non-heart-beating donors, NHBD)作为供心进行移植复苏。NHBD 是指在供心获取以前供体已经发生了呼吸循环停止,目前认为最有利用潜能的 NHBD 是院外遭受严重创伤导致呼吸循环停止的患者^[6-7],而这种情况常见的致死原因之一是急性失血性休克。NHBD 供心与传统供心有质的差别,其根本原因是供心遭受热缺血损伤。所以热缺血模型的建立更加贴近临床。本实验采用大鼠异位心脏移植模型,即在保留受体原有心脏的情况下,将供心移植到受体的体内。这种模型病死率低,供心功能维持良好,当受体心脏急性心功能衰竭后,供心仍能保持正常的血液循环。采用颈部 Cuff 法进行移植手术,具有手术创伤小、暴露好、污染少、并发症少、操作简便等多项优点。另外考虑到自然死亡患者不可能进行药物预处理,所以选在供体缺血死亡后再给药,更加符合现实情况。

bcl-2 基因家族是目前公认与凋亡密切相关的基因,包括抗凋亡蛋白基因和促凋亡蛋白基因,前者如 *bcl-2*, *bcl-xl*, *bcl-w* 等,后者如 *bax*, *bad*, *bak*, *bid*, *bcl-xl* 等。许多研究显示 *bcl-2* 的过度表达不仅可有效阻止包括细胞密度、培养基营养性

成份缺乏、代谢产物积累、激素、pH 变化、自由基、微生物污染等诱发的细胞凋亡,而且能够抑制许多因素(如射线、缺血、缺氧、各种化疗药物和癌基因)介导的细胞凋亡,因而引起人们的极大关注^[8]。*bax* 基因与 *bcl-2* 有一定的同源性,但其功能完全不同,是一类凋亡促进基因,细胞内 *bax* 高表达时,细胞对死亡信号敏感,加速细胞凋亡;当 *bcl-2* 高表达,*bcl-2* 与 *bax* 形成异源性二聚体,抑制细胞凋亡。细胞凋亡又称程序性死亡,是由基因调控的细胞自主的有序死亡,是与细胞分裂不同的一个生理过程,是细胞的主动死亡方式。近年来,大量的基础和临床研究表明,缺血缺氧不仅能导致心肌细胞的坏死,也可以诱导心肌细胞凋亡。心肌细胞从缺血到出现细胞凋亡的时间,报道最短的是 45 min,但多数认为缺血 2 h 就会出现明显的心肌细胞凋亡,主要存在于心肌梗死区及周边区^[9]。进一步研究还发现,缺血心肌早期以心肌细胞凋亡为主,后期以细胞坏死为主,在此过渡期间,心肌细胞凋亡和坏死两种死亡形式同时存在,提示心肌细胞凋亡向坏死的转变。本实验结果显示,RT-PCR 法检测心肌细胞各实验组与正常组比较,*bcl-2* 蛋白表达水平下调,*bax* 蛋白表达增加,并且与热缺血时间长短呈正相关,提示二者与热缺血损伤诱导的心肌细胞凋亡密切相关。另外各实验组 *bcl-2* 基因的 ROD 值均比 C 组低, S_{10} , S_{30} 组 *bcl-2* 基因的 ROD 值比 SH_{10} , SH_{30} 组低,差异显著;*bax* 基因的 ROD 值正好呈相反改变。 S_{45} 组与 SH_{45} 组的 *bcl-2*, *bax* 基因的 ROD 值均无明显差异,以上结果均提示 cariporide 有抑制心肌细胞凋亡的作用。而热缺血 45 min 时,cariporide 对心肌细胞凋亡的抑制作用不明显。但目前其确切机制不太清楚,可能是多因素和多路径的作用结果。有人认为可能是通过抑制 Ca^{++} 细胞内超载实现的,许多证据表明钙离子参与了细胞凋亡,即在细胞凋亡时,细胞内钙离子浓度升高,将游离的细胞核放在添有钙离子的培养基中培养,染色质 DNA 片段化,表现为典型的细胞凋亡特征。反之,如果阻止细胞内钙离子浓度的升高,则减缓或抑制细胞凋亡。细胞核中的钙离子一方面能使染色质 DNA 舒展开来便于核酸内切酶能靠近活动,另一方面钙离子依赖的核酸内切酶参与了将 DNA 降解为 DNA 片段的过程,从而使细胞呈现凋亡的特征^[9];但也有人推

测有可能是直接作用于细胞膜的结果^[10]。另外作为另一个因素的细胞内 pH 下降也可能参与了细胞凋亡的诱导抑制^[11]。

参考文献:

- [1] Ten Hove M, Van Emous J G, Van Echteld C J. Na⁺ overload during ischemia and reperfusion in rat hearts: comparison of the Na⁺/H⁺ exchange blockers EIPA, HOE642 and EMD96785 [J]. *Magma*, 2000, 11(1-2): 80-81.
- [2] D' Alessandro A M, Hoffman R M, Knechtle S J. Successful extrarenal transplantation from non-heart-beating donors [J]. *Transplantation*, 1995, 59(7): 977-982.
- [3] Scholz W, Albus U, Counillon L, et al. Protective effects of HOE642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischaemia and reperfusion [J]. *Cardio-vasc Res*, 1995, 29(2): 260-268.
- [4] Gan X T, Chakrabarti S, Karmazyn M. Modulation of Na⁺/H⁺ exchange isoform mRNA expression in isolated rat hearts [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 1999, 277(3): 9973-9981.
- [5] Levitsky J, Gurell D, Frishman W H. Sodiumion/hydrogeni-

on exchange inhibition: a new pharmacologic approach to myocardial ischemia and reperfusion injury [J]. *J Clin Pharmacol*, 1998, 38(10): 887-897.

- [6] Emiroglu R, Tokalak I, Noyan T. Cadaveric transplantation activities in our centers [J]. *Transplant Proc*, 2006, 38(2): 353-355.
- [7] Luckraz H, Charman SC, Parameshwar J. Are non-brain stem-dead cardiac donors acceptable donors? [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2004, 23(3): 330-333.
- [8] Harov V G, Sabbah H N, Shimoyama H, et al. Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure [J]. *American Journal of Pathology*, 1996, 148(1): 141-149.
- [9] Fliss H, Gatinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium [J]. *Circ Res*, 1996, 79(5): 949-956.
- [10] Scholz W, Albus U, Counillon L, et al. Protective effects of HOE642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischemia and reperfusion [J]. *Cardio-vasc Res*, 1995, 29(2): 260-268.
- [11] Read J C. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death [J]. *J Cell Biol*, 1994, 124(1-2): 1-6.

(本文编辑 傅希文)

《国际病理科学与临床杂志》

征 稿 启 事

《国际病理科学与临床杂志》是由教育部、中南大学主办的国家级医学学术期刊。原刊名《国外医学·生理、病理科学与临床分册》，更名后，本刊在保持特色，致力于介绍国外医学研究领域的新动态、新技术、新经验的基础上，加强了对国内研究成果和现状的报道。主要栏目有：研究论著、专家论坛、综述、成果报道等。本刊为“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”，并被美国《化学文摘》(CA)等国内外多家重要数据库和检索系统收录。欢迎投稿，特别欢迎并优先刊发高水平的研究论著。

本刊具有学术水平高、指导性强、信息时效快等特点。本刊已实现“投稿-审稿-编辑”全程网上处理，敬请登陆本刊网站投稿查询。

网址: <http://www.gjbl.net>; <http://gjbl.csu.edu.cn>

来稿请寄: 湖南省长沙市湘雅路 110 号湘雅医学院 50 号信箱《国际病理科学与临床杂志》编辑部收
邮政编码: 410078; 编辑部电话: 0731-4805495, 4805496 转 809; 传真: 0731-4804351

E-mail: gwyxy@vip.163.com; gwyxy@126.com