

[文章编号] 1000 - 4718(2009)01 - 0152 - 04

缺血后处理通过抑制线粒体途径减轻缺血/再灌注诱导的肠黏膜细胞凋亡*

褚薇薇¹, 武步强², 沙焕臣³, 张润岐¹, 闫爱丽¹, 王殿华⁴¹西安医学院基础部病理教研室, 陕西 西安 710021; ²长治医学院附属和平医院普外科, 山西 长治 046000;³西安交通大学医学院第一附属医院肝胆外科, 陕西 西安 710061; ⁴昆明医学院天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650031)

[摘要] 目的: 探讨缺血后处理减轻缺血/再灌注损伤肠黏膜细胞凋亡的机制。方法: SD大鼠随机分为4组($n=8$): 假手术(sham)组、缺血/再灌注(I/R)组、缺血预处理(IPreC)组、缺血后处理(IPostC)组; 应用透射电子显微镜和激光共聚焦扫描显微镜分别观测各组大鼠肠黏膜细胞线粒体形态结构改变和线粒体跨膜电位的变化。应用末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记法(TUNEL)、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法和免疫组织化学方法分别检测各组大鼠肠黏膜细胞凋亡发生情况以及肠黏膜细胞 *bcl-2*、*bax* mRNA及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的变化。结果: 与 I/R 组相比, IPostC 组和 IPreC 组大鼠肠黏膜细胞线粒体形态结构改变明显减轻, 线粒体跨膜电位显著升高(均 $P < 0.05$), 肠黏膜细胞凋亡率明显降低(均 $P < 0.05$), 肠黏膜细胞 *bcl-2* mRNA 和 Bcl-2 蛋白表达水平显著上升, *bax* mRNA 和 Bax 蛋白表达水平明显下降(均 $P < 0.05$), IPostC 组和 IPreC 组相比各项指标差异无显著差异(均 $P > 0.05$)。结论: 缺血后处理可能通过抑制线粒体途径减轻缺血/再灌注诱导肠黏膜细胞的凋亡。

[关键词] 再灌注损伤; 缺血后处理; 缺血预处理; 线粒体; 细胞凋亡; 肠黏膜

[中图分类号] R657.3

[文献标识码] A

Ischemic postconditioning attenuates ischemia/reperfusion - induced intestinal mucosal apoptosis by inhibiting the mitochondrial signaling pathway in rats

CHU Wei - wei¹, WU Bu - qiang², SHA Huan - chen³, ZHANG Run - qi¹, YAN Ai - li¹, WANG Dian - hua⁴

(¹Department of Pathology, Xi'an Medical College, Xi'an 710021, China; ²Department of General Surgery, The Affiliated Heping Hospital of Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China; ³Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; ⁴Yunnan Pharmacological Laboratory of Natural Products, Kunming Medical College, Kunming 650031, China. E - mail: shch_ww@163.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the role of mitochondrial signaling pathway in apoptosis of ischemic postconditioning against ischemia - reperfusion injury in rat intestine. **METHODS:** Using rat model of intestine I/R injury, male Sprague - Dawley rats were divided into 4 groups: sham operation group (sham), I/R group (IR), ischemic preconditioning group (IPreC) and IPostC group, respectively. After reperfusion for 1 h, the changes of intestinal mucosal mitochondrial ultrastructure were observed by using transmission electron microscope (TEM). Intestinal mucosal mitochondrial membrane potential was detected by confocal laser scanning microscope. The changes of apoptosis of intestinal mucosal cells were determined by deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP - biotin nick - end labeling technique (TUNEL). Intestinal tissue samples were taken for detecting *bcl-2* and *bax* mRNA expression by RT - PCR, and for determining protein expression and distribution of Bcl - 2 and Bax by immunohistochemical analysis. **RESULTS:** Compared with I/R group, the injury of mitochondrion in IPostC group and IPreC group began to recover, apoptotic rate decreased significantly ($P < 0.05$). The *bcl-2* mRNA and Bcl - 2 protein expressions in IPostC group and IPreC group were obviously higher than those in IR group ($P < 0.05$). While the *bax* mRNA and Bax protein expressions in IPostC group and IPreC group were obviously higher than those in IR group ($P < 0.05$). No significant difference of all the parameters between IPreC group and IPostC group was observed ($P > 0.05$). **CONCLUSION:** Ischemic postconditioning attenuates ischemia - reperfusion induced mucosal apoptosis partly by inhibiting the mitochondrial signaling pathway in the rat small intestine.

[收稿日期] 2007 - 12 - 10

[修回日期] 2008 - 06 - 19

* [基金项目] 陕西省科技计划资助项目 (No. SJ08C205)

Tel: 029 - 86177564; E - mail: shch_ww@163.com

[KEY WORDS] Reperfusion injury; Ischemic postconditioning; Ischemic preconditioning; Mitochondria; Apoptosis; Intestinal mucosa

迄今为止,缺血后处理已经成为缺血/再灌注损伤研究领域中的热点,我们先前研究发现,缺血后处理具有抗大鼠肠缺血/再灌注损伤的作用,但其机制不清^[1]。研究表明,肠黏膜细胞凋亡增加与肠缺血/再灌注损伤关系密切^[2]。而线粒体途径在细胞凋亡过程中起着重要的作用^[3]。本研究探讨缺血后处理能否通过抑制线粒体途径减轻缺血/再灌注大鼠肠黏膜细胞的凋亡,旨在为进一步研究缺血后处理的保护机制和寻找抗肠缺血/再灌注损伤作用靶点提供理论依据。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 主要试剂 第一条链合成试剂盒购自 Fermentas, 细胞凋亡原位检测试剂盒由华美生物工程公司提供。Bcl-2 和 Bax 单克隆抗体由福州迈新生物技术开发公司提供。线粒体跨膜电位检测试剂盒(JC-1)由碧云天生物技术研究所提供。

1.2 动物 采用健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 32 只, 体重 230-280 g, 由昆明医学院实验动物中心提供, 术前禁食 12 h, 不禁水。

2 方法

2.1 动物模型 腹腔注射 200 g/L 乌拉坦(1 g/kg) 麻醉后, 仰卧固定于操作板上, 消毒后取腹正中切口长约 3 cm 进腹, 用温盐水纱布将肠管推向左侧腹腔, 暴露右肾内上方的肠系膜根部, 找到肠系膜上动脉(superior mesenteric artery, SMA), 在其根部用无创伤血管夹夹闭阻断 SMA 血运 45 min, 造成肠缺血模型, 然后松夹, 再灌注 6 h 后经颈动脉放血处死。

2.2 动物分组 动物随机分为 4 组($n=8$): ①假手术(sham)组: 仅行开腹, 分离 SMA 不夹闭; ②缺血-再灌注(I/R)组: 方法见模型复制; ③缺血预处理(IPreC)组: 夹闭 SMA 5 min 和松夹 5 min 作为预处理, 2 个循环, 余同缺血-再灌注组; ④缺血后处理(IPostC)组: 缺血 45 min 后即刻行 3 个循环的灌注 30 s/阻断 30 s, 余同 I/R 组。

2.3 标本收集 于再灌注 1 h 后, 将大鼠乌拉坦麻醉后仰卧位固定于鼠台上。迅速取距盲部 2 cm 的小肠组织 90 cm, 分离大鼠肠黏膜细胞的方法参考国外相关文献^[4]。另取 2 cm 肠组织, 经冰盐水漂净, 滤纸吸干, 纵向剪开肠腔, 用载玻片轻轻刮取并收集小肠黏膜, 立即 -70 °C 分装冻存, 用于 RT-PCR 检测。再取 1 cm 小肠组织浸泡于体积分数 3.5% 戊二醛溶液(4 °C 保存)做透射电子显微镜观察。2 cm 肠组织经 10% 中性甲醛固定后做石蜡切

片, 行末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL 法)和免疫组织化学方法检测。

2.4 肠黏膜细胞凋亡率检测 应用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL), 严格按照试剂盒说明书进行操作。每组分别随机选取 8 张切片, 每张切片均在高倍镜(400 倍)视野下随机取 5 个视野, 计数凋亡细胞数目及总细胞数。凋亡率 = 凋亡细胞数/总细胞数 × 100%。以 5 个视野的均值代表每只大鼠肠黏膜细胞的凋亡率。

2.5 肠黏膜 bcl-2 和 bax mRNA 表达的检测 采用 RT-PCR 方法, 严格按照试剂盒说明书操作。提取肠黏膜总 RNA, 逆转录合成 cDNA 第一链, PCR 扩增 bcl-2 和 bax。bcl-2 引物序列上游 5' - CTGCTG-GACAACATCGCTCTG - 3', 下游 5' - GGTCTGCT-GACCTCACTTGTG - 3', 产物长度为 228 bp。bax 上游 5' - TCCAGGATCGAGCAGA - 3', 下游 5' - AAG-TAGAAGAGGGCAACC - 3', 产物长度为 256 bp。 β -actin 上游 5' - ATTGTAACCAACTGGGACG - 3', 下游 5' - TTGCCGATAGTGATGACCT - 3', 产物长度为 533 bp。采用终体积为 25 μ L 的反应体系, 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 扩增 35 个循环, 72 °C 继续延伸 10 min。10 μ L PCR 产物加入凝胶加样孔中, 80 V 电压行电泳 40 min 后紫外光下观察和记录结果并照相保存。在 Gel Doc (Bio-Rad) 凝胶成像分析系统上扫描定量。以 β -actin 为内参照, 根据各条带的 A 值分析 bcl-2、bax mRNA 表达水平。

2.6 肠黏膜细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的检测 采用免疫组化 SP 法检测, 严格按照说明书操作。在光学显微镜下 Bcl-2 和 Bax 主要呈胞浆分布, 其阳性细胞呈棕黄或棕褐色。每组分别选取 8 张切片, 每张切片均在高倍镜(400 倍)视野下随机取 5 个视野, 计数细胞总数和阳性细胞数, 计算百分率, 取其均数。

2.7 肠黏膜细胞线粒体形态结构的观测 经固定、取材、脱水、浸泡、包埋、切片、染色, 待样品自然干燥后用透射电子显微镜观察肠黏膜细胞线粒体超微结构。

2.8 肠黏膜细胞线粒体跨膜电位的检测 严格按照试剂盒说明书操作。并记录红、绿荧光值, 计算红绿荧光的比值可以衡量线粒体跨膜电位的变化程度。

3 统计学处理

应用 SPSS12.0 统计软件包进行分析和检验, 组间比较采用方差分析和 q 检验。

结 果

1 大鼠肠黏膜细胞凋亡率的变化

在假手术组大鼠小肠绒毛顶部、固有层和黏膜下层只有少量散在分布的凋亡阳性细胞;缺血/再灌注组大鼠肠黏膜凋亡阳性细胞数量明显增加 ($P < 0.05$),分布范围从绒毛顶部扩大到中、底部,固有层和黏膜下层细胞凋亡亦明显加重;缺血后处理组大鼠肠黏膜细胞凋亡率明显低于缺血/再灌注组 ($P < 0.05$),与缺血预处理组相比,差异无显著 ($P > 0.05$),见图 1。

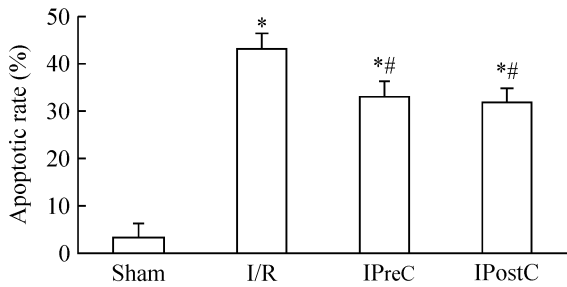


Fig 1 The changes of apoptotic rate of rat intestinal mucosa in each group. $\bar{x} \pm s$. $n = 8$. * $P < 0.05$ vs sham group; # $P < 0.05$ vs I/R group.

图 1 各组大鼠肠黏膜细胞凋亡率的变化

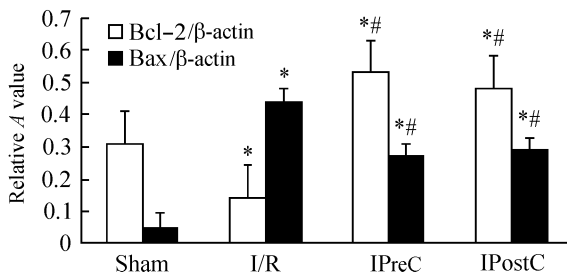


Fig 2 The mRNA expression of *bcl-2* and *bax* of intestinal mucosa in rats. $\bar{x} \pm s$. $n = 8$. * $P < 0.05$ vs sham group; # $P < 0.05$ vs I/R group.

图 2 各组大鼠肠黏膜细胞中 *bcl-2* 和 *bax* mRNA 表达的变化

2 大鼠肠黏膜 *bcl-2*、*bax* mRNA 表达的变化

缺血/再灌注组大鼠肠黏膜细胞 *bcl-2* mRNA 表达水平下降,而缺血后处理组和缺血预处理组大鼠肠黏膜 *bcl-2* mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.05$);缺血/再灌注组大鼠肠黏膜细胞 *bax* mRNA 表达明显增加 ($P < 0.05$),而缺血后处理组和缺血预处理组大鼠肠黏膜细胞内 *bax* mRNA 表达量则明显降低 ($P < 0.05$),见图 2。

3 大鼠肠黏膜细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的变化

缺血/再灌注组大鼠肠黏膜细胞 Bcl-2 蛋白表达减少,缺血后处理组和缺血预处理组大鼠肠黏膜 Bcl-2 蛋白表达显著增多 ($P < 0.05$,与缺血/再灌注组相比);缺血/再灌注组大鼠肠黏膜细胞 Bax 蛋白表达明显升高,而缺血后处理组和缺血预处理大鼠肠黏膜 Bax 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$,与缺血/再灌注组相比),见图 3。

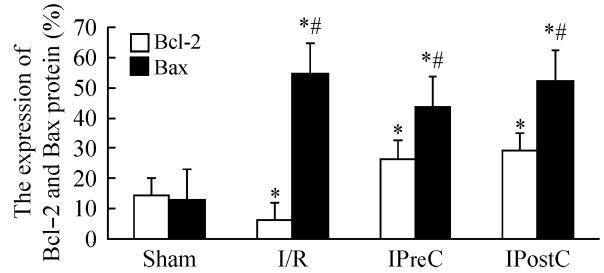


Fig 3 The expression of Bcl-2 and Bax protein in intestinal mucosa in rats. $\bar{x} \pm s$. $n = 8$. * $P < 0.05$ vs sham group; # $P < 0.05$ vs I/R group.

图 3 各组大鼠肠黏膜上皮细胞中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的变化

4 大鼠肠黏膜细胞线粒体形态结构的变化

假手术组大鼠肠黏膜细胞微绒毛排列整齐,细胞连接结构正常,线粒体大小均一,椭圆形,内嵴清晰(图 4A);缺血/再灌注组大鼠多数肠黏膜上皮细胞肿胀,细胞表面微绒毛数量明显减少且排列较乱,微绒毛稀疏、变短、脱落,线粒体大小不一,有的线粒体数目增加,明显肿胀,空泡变性,严重者可见嵴减少或消失(图 4B);缺血后处理组和缺血预处理组大鼠多数肠黏膜上皮细胞肿胀程度减轻,大多数线粒体肿胀减轻或恢复正常状态(图 4C、D)。

5 大鼠肠黏膜细胞线粒体跨膜电位的变化

与假手术组相比,缺血/再灌注组 1 h 后,大鼠肠黏膜细胞线粒体跨膜电位显著下降 ($P < 0.05$);缺血后处理组则明显高于缺血/再灌注组 ($P < 0.05$),与缺血预处理组相比,差异无显著 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠肠黏膜细胞线粒体膜电位变化

Tab 1 The mitochondrial membrane potential of intestinal mucosa of each group rats ($\bar{x} \pm s$. $n = 8$)

Group	Red fluorescence	Green fluorescence	Red/green fluorescence
Sham	25.54 ± 1.67	6.46 ± 0.92	3.98 ± 0.29
I/R	18.58 ± 0.49*	24.16 ± 3.56*	0.78 ± 0.12*
IPreC	22.68 ± 1.73**	10.48 ± 1.29**	2.20 ± 0.39**
IPostC	22.70 ± 1.31*	11.68 ± 3.18**	2.06 ± 0.59**

* $P < 0.05$ vs sham group; # $P < 0.05$ vs I/R group. I/R: ischemia/reperfusion; IPreC: ischemia preconditioning; IPostC: ischemia postconditioning.

讨 论

研究表明,肠黏膜细胞凋亡增加与肠缺血/再灌注损伤关系密切^[2]。肠缺血/再灌注损伤后出现的细菌毒素移位、氧自由基生成增加等均可使肠黏膜细胞凋亡增加,从而导致肠黏膜屏障功能障碍,其严重程度与凋亡指数呈正相关。细胞凋亡主要通过两条途径,即死亡受体途径和线粒体途径^[3]。其中,线

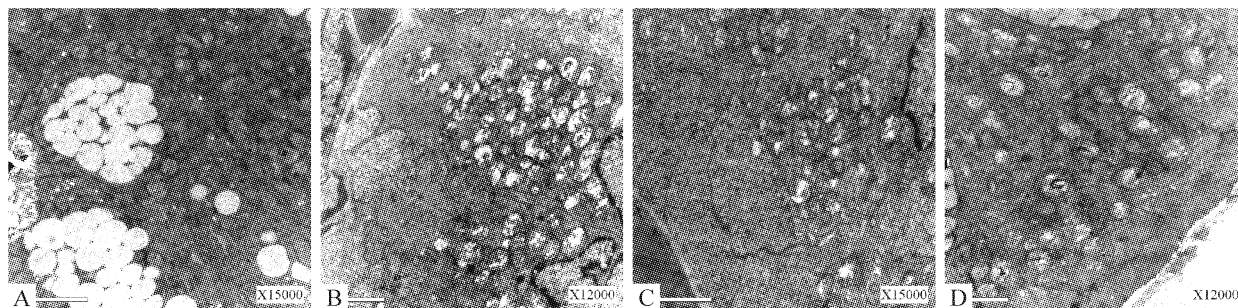


Fig 4 The intestinal mucosa epithelial ultrastructure of rats. A: sham group; B: I/R group; C: IPreC group; D: IPostC group.

图4 大鼠肠黏膜细胞超微结构

粒体结构与功能的改变尤其是线粒体跨膜电位的下降,被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件。抑制细胞凋亡的线粒体途径可能有希望成为治疗缺血/再灌注损伤的有效作用靶点。

缺血后处理是一种应用于再灌注早期的新的机械性干预措施,具有可预知性和可控制性的特点,而且其在临床上应用简单、方便、可行,易为外科医生所接受,但关于缺血后处理的作用机制目前尚未阐明。新近提出线粒体在缺血后处理抗心肌缺血/再灌注损伤过程中起关键作用^[5]。

线粒体在细胞凋亡的发生发展的过程中所起的重要作用主要包括跨膜电位的丧失,线粒体通透性转换孔的开放。一方面线粒体膜间隙的细胞色素C以及其它促凋亡蛋白释放至胞质后触发凋亡蛋白酶级联反应,导致细胞凋亡。本研究结果显示缺血后处理能有效改善缺血/再灌注损伤后大鼠肠黏膜细胞线粒体的结构,提高线粒体跨膜电位,与缺血预处理的作用机制相似。另一方面,Bcl-2家族也可通过调节线粒体膜的通透性,从而影响细胞的凋亡,其机制主要包括:Bcl-2家族蛋白自身在线粒体膜上形成孔道;Bcl-2家族蛋白通过改变线粒体膜上原有的孔道或通道^[6-8]。细胞凋亡的发生取决于促凋亡成员和抑凋亡成员的相对浓度。Bcl-2和Bax是两类典型的抑凋亡和促凋亡蛋白,Bcl-2蛋白定位于线粒体外膜、内质网膜和核周膜,Bax正常情况位于胞浆,在凋亡信号诱导后很快迁移到线粒体。Bcl-2/Bax两蛋白之间比例是决定对细胞凋亡抑制作用强弱的关键因素^[36]。本研究结果表明缺血后处理则明显降低***bax*** mRNA和Bax蛋白的表达,而显著升高***bcl-2*** mRNA表达和Bcl-2蛋白表达,与缺血预处理的作用相似。这提示缺血后处理抗肠缺血-再灌注损伤肠黏膜细胞凋亡作用的机制可能是上调线粒体膜***bcl-2*** mRNA和Bcl-2蛋白的表达,下调***bax*** mRNA和Bax蛋白表达,从而抑制肠黏膜细胞凋亡,减轻肠黏膜损伤,维护肠黏膜功能。

缺血后处理作为一种新的外科干预措施引起了众多学者的关注^[9]。Vinten-Johansen等^[10]发现,缺血后处理可减少再灌注损伤特别是心肌梗死、细胞凋

亡。Dosenko等^[11]证明缺氧后处理不仅能减少心肌再灌注时细胞的坏死也能减少再灌注时的细胞凋亡。本研究证实,与缺血/再灌注组相比,缺血后处理组大鼠肠黏膜细胞凋亡率显著下降,提示缺血后处理能起到抗缺血/再灌注损伤肠黏膜细胞凋亡的作用。

[参 考 文 献]

- [1] 褚薇薇,武步强,沙焕臣,等. 缺血后处理抗缺血-再灌注损伤大鼠肠黏膜屏障的作用[J]. 昆明医学院学报,2007,2(1):6-11.
- [2] Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion [J]. J Invest Surg,2005,18(6):335-350.
- [3] Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death[J]. Toxicol Lett,2004,149(1):19-23.
- [4] Madesh M, Bhaskar L, Balasubramanian KA. Enterocyte viability and mitochondrial function after graded intestinal ischemia and reperfusion in rats[J]. Mol Cell Biochem, 1997, 167(1):81-87.
- [5] Argaud L, Gateau-Roesch O, Raissy O, et al. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition[J]. Circulation, 2005,111(2):194-197.
- [6] Tsujimoto Y. Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria[J]. J Cell Physiol,2003,195(2):158-167.
- [7] Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, et al. Bid, Bax and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane[J]. Cell,2002,111(3):331-342.
- [8] Saito M, Korsmeyer SJ, Schlesinger PH. BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes[J]. Nat Cell Biol,2000,2(8):553-555.
- [9] 李春梅,张兴华,马晓静,等. 肢体缺血后处理对兔急性心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2006,22(12):2332-2335.
- [10] Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Zatta A. Postconditioning - a new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Basic Res Cardiol,2005,100(4):295-310.
- [11] Dosenko VE, Nagibin VS, Tumanovskaya LV, et al. Postconditioning prevents apoptotic necrotic and autophagic cardiomyocyte cell death in culture[J]. Fiziol Zh, 2005, 51(3):12-17.