

【基础研究】

通信作者:董化江(1983-),男,山东淄博人,讲师,硕士,主要从事解剖学教学科研临床应用及缺血再灌注损伤的研究;Email: donghualiang830318@163.com。

Bcl-2 in interval exercises group were increased more obviously than those of model group ($P < 0.01$). The myocardial apoptotic index in model group was higher than that in sham operation group, in interval exercises group it was lower than that in model group ($P < 0.01$). The activity level of SOD in the cardiac tissue of model group was significantly lower than that of sham operation group, and the activity level of MDA in the cardiac tissue of the model group was higher than that of sham operation group ($P < 0.01$). The activity level of SOD in the cardiac tissue of interval exercises group was significantly higher than that in model group, and the activity level of MDA in the cardiac tissue of interval exercises group was lower than that of model group ($P < 0.01$). **Conclusion** Interval swimming exercises plays a protective role by decreasing the expression of c-fos, increasing the expression of Bcl-2 and the activity levels of SOD, decreasing the activity levels of MDA.

Key words: interval exercises; ischemia-reperfusion injury; c-fos; Bcl-2

心肌持续性缺血可导致细胞死亡和组织损伤, 尽管早期再灌注对组织非常重要, 但心肌缺血后恢复正常血液灌注可导致缺血心肌的进一步损伤, 即心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MI/RI)^[1]。原癌基因 c-fos 是即刻早期基因 (immediate early genes, IEGs) 的一种, 正常情况下, c-fos 的表达量极低, 在某些因素的刺激下, c-fos 能被诱导快速表达。研究表明, c-fos 不仅在 MI/RI 的病情演变过程中发挥重要作用, 且其表达量与 MI/RI 的严重程度成正相关^[2]。但 c-fos 致心肌组织损伤的确切机制目前尚不清楚。体育运动的形式、强度和持续时间不同对机体产生不同的影响。大量研究均证实, 适宜的运动对机体产生有利的保护作用, 能够增强心肌功能, 减少冠状动脉粥样硬化性心脏病的发生率和病死率^[3]。本研究拟用游泳训练预处理干预大鼠心肌缺血再灌注过程, 通过对 c-fos、Bcl-2、超氧化物歧化酶 (superoxide-dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 指标的检测, 研究运动预处理能否减轻缺血再灌注引起的心肌损伤, 并探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 无特定病原体级成年雄性健康 WKY 大鼠 60 只, 体质量 250 ~ 300 g, 所有动物均由北京阜外医院实验动物研究所提供, 饲以普通饲料, 自由饮水。将动物随机分为间歇运动组、假手术组和模型组, 每组 20 只。

1.1.2 主要试剂 SYBR Green Mix 试剂购自日本 TaKaRa 公司。大鼠 c-fos、Bcl-2 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司。SOD、MDA 测试盒购于南京建成生物工程研究所。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 运动训练方案 采用游泳方式进行训练, 在 150 cm × 60 cm × 70 cm 的塑钢游泳池中进行, 水温保持 33 ~ 36 ℃。间歇性训练, 每日 1 次, 时间依次

为 5、10、15、20、25、30、40 min。第 2 周开始进行运动训练, 大鼠负自身体质量 5% 的重物游泳, 每游 6 min 休息 4 min, 每日连续进行 10 次。连续训练 8 周, 每周 6 d。假手术组和模型组大鼠常规饲养, 不进行运动。

1.2.2 心脏在体心肌缺血再灌注损伤实验 间歇运动组和模型组大鼠进行心脏在体心肌缺血再灌注实验。质量分数 10% 乌拉坦腹腔麻醉 ($1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 大鼠, 四肢皮下插入针形电极, 以标准肢体 II 导联记录大鼠基础心电图。气管插管, 呼吸机支持呼吸, 频率为每分钟 65 次。沿胸骨左缘 2 ~ 4 肋开胸暴露心脏及左心室表面血管, 于左心耳下缘 2 mm 处用 5-0 医用缝线穿过心肌浅层作一结扎线, 在结扎线两端分别套入丝线环作为再灌注拉线, 收紧结扎线造成心肌缺血, 牵拉再灌注拉线即进行再灌注。结扎左冠状动脉前降支, 缺血 30 min, 再灌注 60 min。假手术组大鼠开胸穿线但不结扎, 其他操作同缺血再灌注组大鼠。实验中以结扎左冠状动脉前降支后左心室前壁发绀及心电图 ST 段抬高和 (或) T 波高耸为结扎成功的标志; 再灌注时以左心室前壁紫绀消失及 ST 段、T 波下降 1/2 以上为再灌注成功的标志。

1.2.3 实时定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 测大鼠心肌组织 c-fos 和 Bcl-2 mRNA 表达 用 $1 \mu\text{g}$ 总 RNA 进行 cDNA 合成, 实时定量 PCR 检测 3 组大鼠心肌组织 c-fos 和 Bcl-2 mRNA 表达水平。c-fos (83 bp) 上游引物: 5'-AGCGAGCAACT-GAGAAGCC-3'; 下游引物: 3'-GGTCGAGACGAAGT-GTCGC-5'。Bcl-2 (450 bp) 上游引物: 5'-CAAGCCGG-GAGAACAGGGTA-3'; 下游引物: 3'-CGGAAGAACT-CAAGCCACCC-5'。内参照为 β -actin (169 bp) 上游引物: 5'-GTACCCAGGCATTGCTGACA-3'; 下游引物: 3'-CTCCTGCTTGCTGATCCACATC-5'。使用 Light cycler 仪器进行 PCR 扩增, 反应条件为 95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃ 变性 15 s, (c-fos 60 ℃; Bcl-2 62 ℃; β -actin 59 ℃) 退火 15 s, 72 ℃ 延伸 20 s, 扩增 40 个循环。记录各组循环阈值 (C_t) 值, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算各组大鼠心肌组

织 c-fos 和 Bcl-2 mRNA 的表达水平。

1.2.4 c-fos、Bcl-2 蛋白表达检测 提取 3 组大鼠左心室前壁心肌组织总蛋白,采用双金鸡宁酸(bicinchoninic acid ,BCA)蛋白定量试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术公司)进行蛋白定量。取各组样品与 5 × 十二烷基硫酸钠凝胶加样缓冲液混合,煮沸变性 5 min 备用。取 60 μg 蛋白样品行聚丙烯酰胺凝胶电泳。湿转法转膜至聚偏二氟乙烯膜上,质量分数 5% 脱脂牛奶封闭后将膜置于装有一抗(稀释比例为 1 : 1 000,购自英国 Abcam 公司)的杂交袋中,室温孵育 1 ~ 2 h 后,4 ℃ 过夜。然后将膜置于装有二抗稀释液的杂交袋中,室温下孵育 1 ~ 2 h 后,采用增强化学发光法发光,扫描胶片,凝胶图像处理系统分析目标条带的分子量和净光密度值。同样步骤加入内参 β-actin 抗体,检测样品中 β-actin 蛋白表达作为内参照。

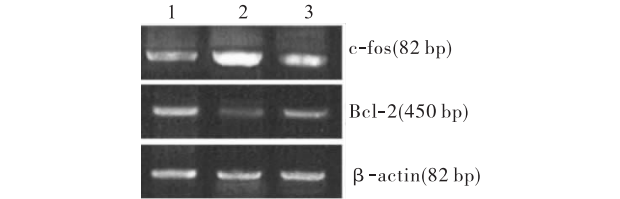
1.2.5 心肌细胞凋亡指数检测 采用 DNA 缺口原位末端标记(TDT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)染色检测心肌细胞凋亡率。石蜡包埋的切片常规脱蜡至水后,加入蛋白酶 K 室温孵育 20 min,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)漂洗 3 次。加入体积分数 3% H₂O₂, 37 ℃ 孵育 10 min,消除内源性过氧化物酶活性。加入 TUNEL 反应液,37 ℃ 湿盒中孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次。加入辣根过氧化物酶抗体,孵育 30 min, PBS 漂洗 3 次。加入 3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)溶液显色 10 min。苏木精复染,常规脱水、透明、中性树胶封片。心肌细胞凋亡指数以凋亡细胞/100 个细胞表示。

1.2.6 心肌组织匀浆 SOD、MDA 检测 心肌组织 10% 匀浆(每克组织加入 9 mL PBS),以 4 000 r · min⁻¹ 离心 30 min,取上清液,按说明书分别进行 SOD、MDA 检测。SOD 活性采用黄嘌呤氧化酶法测定,MDA 含量采用硫代巴比妥酸法测定。

1.2.7 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所有数据均采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心肌组织 c-fos、Bcl-2 mRNA 表达水平比较 结果见图 1 和表 1。与假手术组比较,模型组大鼠 c-fos mRNA 表达显著升高,而 Bcl-2 mRNA 表达显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,间歇运动组大鼠 c-fos mRNA 表达显著降低,而 Bcl-2 mRNA 表达显著升高($P < 0.01$)。



1:假手术组;2:模型组;3:间歇运动组。
图 1 3 组大鼠心肌组织 c-fos、Bcl-2 mRNA 表达
Fig. 1 Expression of c-fos, Bcl-2 mRNA in muscular tissues in the three groups

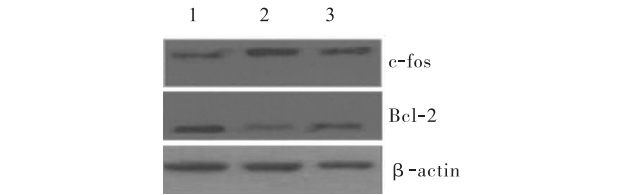
表 1 3 组大鼠心肌组织 c-fos、Bcl-2 mRNA 表达比较

Tab.1 Comparison of expression of c-fos, Bcl-2 mRNA in muscular tissues in the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	c-fos	Bcl-2
假手术组	20	1.00 ± 0.03	1.89 ± 0.09
模型组	20	2.61 ± 0.13 ^a	0.71 ± 0.01 ^a
间歇运动组	20	1.75 ± 0.15 ^b	1.74 ± 0.12 ^b

注:与假手术组比较^a $P < 0.01$;与模型组比较^b $P < 0.01$ 。

2.2 各组大鼠心肌组织 c-fos、Bcl-2 蛋白表达比较 结果见图 2 和表 2。与假手术组比较,模型组大鼠 c-fos 蛋白表达显著升高,而 Bcl-2 蛋白表达显著降低($P < 0.01$);与模型比较,间歇运动组大鼠 c-fos 蛋白表达显著降低,而 Bcl-2 蛋白表达显著升高($P < 0.01$)。



1:假手术组;2:模型组;3:间歇运动组。
图 2 3 组大鼠心肌组织 c-fos、Bcl-2 蛋白表达
Fig. 2 Expression of c-fos, Bcl-2 protein in muscular tissues in the three groups

表 2 3 组大鼠心肌组织 c-fos、Bcl-2 蛋白表达比较

Tab.2 Comparison of expression of c-fos, Bcl-2 protein in muscular tissues in the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	c-fos	Bcl-2
假手术组	20	1.00 ± 0.02	2.00 ± 0.13
模型组	20	2.97 ± 0.16 ^a	0.53 ± 0.01 ^a
间歇运动组	20	1.43 ± 0.09 ^b	1.89 ± 0.11 ^b

注:与假手术组比较^a $P < 0.01$;与模型组比较^b $P < 0.01$ 。

2.3 间歇运动训练对 MI/RI 大鼠心肌细胞凋亡指数的影响 假手术组、模型组、间歇运动组大鼠心肌细胞凋亡指数分别为(8.1 ± 1.2)%、(30.2 ± 3.1)%、(12.3 ± 2.5)%。模型组大鼠心肌细胞凋亡指数与假手术组比较显著增加,差异有统计学意义($P < 0.01$),间歇运动组大鼠心肌细胞凋亡指数与模型组比较显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 各组大鼠心肌组织 SOD、MDA 活性比较 结

果见表 3。与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织总 SOD 活性降低,MDA 活性升高(均 $P < 0.01$);与模型组比较,间歇运动组大鼠心肌总 SOD 活性增高,MDA 活性降低(均 $P < 0.01$)。

表 3 3 组大鼠心肌组织 SOD、MDA 活性比较

Tab.3 Comparison of SOD and MDA activity levels in the cardiac tissue of three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD/(U · mg prot ⁻¹)	MDA/(nmol · mg prot ⁻¹)
假手术组	20	130.6 ± 11.5	2.9 ± 0.5
模型组	20	60.6 ± 5.3 ^a	7.6 ± 1.5 ^a
间歇运动组	20	100.7 ± 9.4 ^b	5.1 ± 1.1 ^b

注:与假手术组比较^a $P < 0.01$;与模型组比较^b $P < 0.01$ 。

3 讨论

近年来的大量研究发现,原癌基因及其蛋白产物不仅参与细胞的正常生长、分化过程,而且作为第 3 信使参与细胞内信号传导^[4]。MI/RI 的病理机制主要与能量代谢障碍、氧自由基作用、钙超载、中性粒细胞作用等有关。其中氧自由基损伤在心肌缺血再灌注损伤中发挥极其重要的作用,心肌细胞在缺血-再灌注时会产生大量氧自由基,氧自由基可诱导 c-fos 的表达,其表达程度与心肌细胞复氧损伤程度密切相关。清除自由基的酶促防御系统包括 SOD、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶等,能有效清除体内活性氧并终止自由基链式反应过程^[5-6]。SOD 的主要功能是催化超氧阴离子的歧化反应,是活性氧防御的第 1 道屏障。MDA 是活性氧终极代谢产物,是衡量自由基水平的敏感指标,其含量能客观反映机体产生的自由基水平^[7]。在评价机体自由基水平时,常联合运用 SOD 和 MDA 指标^[8]。在对缺血性心脏病基础实验研究过程中发现,心肌在经过短暂缺血后能够增加其对缺血的耐受现象,称为缺血预处理(ischemic preconditioning,IPC)现象。随着对 IPC 的深入研究,发现运动有类似 IPC 心脏保护效应,运动预处理(exercise pretreatment,EP)的概念也被正式提出^[9]。关于 EP 的运动负荷尚没有明确,间歇性大强度运动、中等强度的适量运动都能抗心肌缺血再灌注损伤。在国内,有关 EP 的研究尚处于摸索阶段,本研究选择间歇运动作为 EP 方案。间歇训练指对多次练习时的间歇时间有严格规定,使机体处于不完全恢复状态下,反复进行练习的训练方法。间歇运动负荷强度大,对训练间歇时间有严格规定,运动后即刻大鼠体内存在氧负亏,而后随着机体的逐渐恢复,血氧含量也逐渐升高。本实验结果显示:与假手术组比较,模型组大鼠 c-fos mRNA 与蛋白的表达升高,Bcl-2 mRNA 与蛋白的表达

降低,心肌组织 MDA 活性升高,SOD 活性下降。故推测 c-fos 基因引起心肌受损的可能机制是 MI/RI 时,由于炎性细胞因子及氧自由基大量释放入血,使心肌组织 c-fos 基因被诱导而快速表达,c-fos 一方面作为促凋亡基因引起细胞凋亡,另一方面作为核转录基因发挥其信使调节作用,使 Bcl-2 表达降低。Bcl-2 是抑凋亡基因,发挥抑制凋亡作用。与模型组比较,间歇运动组大鼠 c-fos mRNA 与蛋白的表达降低,Bcl-2 mRNA 与蛋白的表达升高,血清 MDA 降低,SOD 升高,差异均具有统计学意义。说明间歇运动训练能够明显减少 c-fos 的表达,提高心肌细胞 SOD 活性,减少 MDA 的生成,有效清除超氧阴离子自由基,保护细胞膜结构完整性,减轻炎症反应,提高心肌对缺血缺氧及再灌注损伤的耐受能力,减少器官及组织损伤程度,从而发挥良好的保护作用。

参考文献:

[1] Tian Z,Zheng H,Li J,et al. Genetically induced moderate inhibition of the proteasome in cardiomyocytes exacerbates myocardial ischemia-reperfusion injury in mice [J]. *Circ Res*,2012,111(5):532-542.

[2] Alfonso Pecchio A R,Cardozo Gizzi A M,Renner M L,et al. c-Fos activates and physically interacts with specific enzymes of the pathway of synthesis of polyphosphoinositides [J]. *Mol Biol Cell*,2011,22(24):4716-4725.

[3] Vogiatzis I,Nanas S,Roussos C. Interval training as an alternative modality to continuous exercise in patients with COPD [J]. *Eur Respir J*,2002,20(1):12-19.

[4] 韩延燕,曹永亮,梁冰,等. BMSC 移植对视网膜缺血-再灌注损伤凋亡相关基因 c-fos/c-jun 表达的影响 [J]. *眼科新进展*,2014,34(3):209-212.

[5] Tamura I,Taketani T,Lee L,et al. Differential effects of progesterone on COX-2 and Mn-SOD expressions are associated with histone acetylation status of the promoter region in human endometrial stromal cells [J]. *J Clin Endocrinol Metab*,2011,96(7):E1073-E1082.

[6] 陈小龙,李晶,齐艳秀,等. 山茱萸多糖对衰老小鼠视网膜中相关因子表达的影响[J]. *眼科新进展*,2013,33(4):324-327.

[7] 段东印. 炎症因子和自由基在诱导缺氧缺血性脑损伤新生大鼠神经细胞凋亡中的作用[J]. *中华实用儿科临床杂志*,2013,28(23):1825-1827.

[8] Hsieh T C,Elangovan S,Wu J M. Differential suppression of proliferation in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells exposed to alpha-,gamma- and delta-tocotrienols is accompanied by altered expression of oxidative stress modulatory enzymes [J]. *Anticancer Res*,2010,30(10):4169-4176.

[9] 张彬,梁静,王坤,等. 缺血预处理对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用及对缺氧诱导因子 1α 蛋白表达的影响 [J]. *新乡医学院学报*,2014,31(6):409-413.

(本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)