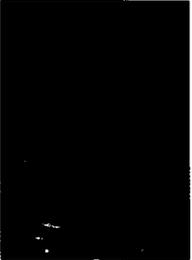


胰岛素样生长因子 I 对大鼠缺血缺氧心肌细胞凋亡的影响



宋华培 颜洪 张东霞 褚志刚 张琼 黄跃生

【摘要】 目的 了解胰岛素样生长因子 I (IGF- I) 对缺血缺氧致心肌细胞凋亡的影响, 探讨其调控机制。 方法 分离培养 SD 乳鼠的心肌细胞。于制备缺血缺氧心肌细胞模型(缺血缺氧组)前 1 h, 用 IGF- I (200 μ g/L) 进行干预(干预组), 以缺血缺氧组致伤前测定结果为正常对照(对照组)。观察不同时相点心肌细胞凋亡的吸光度(A)值、线粒体膜电位变化及磷酸化 Akt 蛋白表达变化。 结果 对照组心肌细胞凋亡 A 值为 0.18 ± 0.03 ; 缺血缺氧后 1、3、6、12 h 分别为 0.33 ± 0.05 、 0.61 ± 0.06 、 1.17 ± 0.08 、 2.25 ± 0.11 , 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 干预组上述时相点的 A 值分别为 0.26 ± 0.04 、 0.49 ± 0.05 、 0.84 ± 0.06 、 1.63 ± 0.09 , 与缺血缺氧组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。缺血缺氧 6、12 h, 心肌细胞线粒体膜电位荧光强度较对照组 40.2 ± 10.1 下降, 分别为 18.7 ± 5.1 、 6.3 ± 1.9 ($P < 0.01$), 干预组较缺血缺氧组相对增高, 分别为 28.8 ± 6.2 、 12.5 ± 3.1 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 其余各组缺血缺氧后 6 h 磷酸化 Akt 蛋白表达量增加。 结论 IGF- I 对缺血缺氧心肌细胞具有抗凋亡作用, 其机制可能与 IGF- I 激活磷脂酰肌醇 3-激酶/Akt、增加磷酸化 Akt 表达、减少细胞色素 c 的释放有关。

【关键词】 肌细胞, 心脏; 胰岛素样生长因子 I; 细胞凋亡; 膜电位; 细胞低氧

The influence of insulin growth factor- I on the apoptosis of cardiomyocytes subjected to ischemia and hypoxia SONG Hua-pei, YAN Hong, ZHANG Dong-xia, CHU Zhi-gang, ZHANG Qiong, HUANG Yue-sheng. Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China
Corresponding author: HUANG Yue-sheng, Email: yshuang@public.cta.cq.cn, Tel: 023-68754173

【Abstract】 Objective To investigate the influence of insulin growth factor- I (IGF- I) on apoptosis of cardiomyocytes subjected to ischemia and hypoxia and its possible mechanism. **Methods** Cardiomyocytes were cultured in vitro, and randomized into hypoxia group, treatment group (T, the cells were treated with IGF-1 before subjected to hypoxia and ischemia) and control group (C, normal cardiomyocytes as controls). Changes in the OD value of cell apoptosis, mitochondrial membrane potential and relative amount of phospho-Akt protein were observed at different time-points by ELISA, laser scanning with TMRE staining and Western blot, respectively. **Results** The OD value of cell apoptosis in control group was 0.18 ± 0.03 , while that in hypoxia group was gradually increased to 0.33 ± 0.05 , 0.61 ± 0.06 , 1.17 ± 0.08 , 2.25 ± 0.11 , respectively at 1, 3, 6, 12 post-hypoxia hours (PHH), showing an increasing tendency ($P < 0.01$). The OD values of cell apoptosis in T group were 0.26 ± 0.04 , 0.49 ± 0.05 , 0.84 ± 0.06 , 1.63 ± 0.09 , respectively, which were obviously lower than those in hypoxia group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The mitochondrial membrane potential (Dymt) values in hypoxia group at 6 and 12 PHH were 18.7 ± 5.1 and 6.3 ± 1.9 , respectively, which were obviously lower than that in control group (40.2 ± 10.1 , $P < 0.01$). The DYmt in T group at 6 and 12 PHH were 28.8 ± 6.2 , 12.5 ± 3.1 , respectively, which were obviously higher compared with those in hypoxia group ($P < 0.05$). The amount of phospho-Akt protein was increased by IGF- I administration. **Conclusion** IGF- I exhibits an anti-apoptotic effect on cardiomyocytes subjected to ischemia and hypoxia, and this may be related to the activation of PI3K/Akt signal pathway and stabilization of mitochondrial membrane potential.

【Key words】 Myocyte, cardiac; Insulin-like growth factor I; Apoptosis; Membrane potentials; Cell hypoxia

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(2005CB22601); 国家自然科学基金重点项目(30430680); 全军医学科学技术研究“十一五”计划专项课题(06Z033)

作者单位: 400038 重庆, 第三军医大学西南医院全军烧伤研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通讯作者: 黄跃生, Email: yshuang@public.cta.cq.cn, 电话: 023-68754173

胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF) 是属于胰岛素家族的一类多肽, 包括 IGF-I 和 IGF-II。研究证实, IGF-I 主要促进组织生长和参与机体代谢活动, 但它在严重烧伤后心肌缺血缺氧引发细胞凋亡过程中的作用尚不明确。本研究通过观察 IGF-I 对缺血缺氧大鼠心肌细胞凋亡的影响, 拟探讨其调控机制, 为烧伤后早期心肌细胞缺血缺氧损害的防治提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 主要材料来源

SD 乳鼠 (第三军医大学大坪医院实验动物中心)。DMEM/F12 培养基、DMEM 无糖培养基 (美国 Gibco 公司), 溴脱氧尿苷 (BrdU, 美国 Sigma 公司), IGF-I (美国 Cytolab 公司), 四甲基罗丹明乙酯 (TMRE) 荧光探针 (美国 Biotium 公司), 酶联免疫吸附测定细胞凋亡检测试剂盒 (瑞士 Roche 公司), 兔抗鼠磷酸化 Akt 抗体 (美国 Cell Signal Technology 公司), 兔抗鼠肌动蛋白抗体 (北京中杉金桥生物技术有限公司), 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (美国 Santa Cruz 公司)。Lasersharp 3.2 型激光共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司), Chemidoc HRS 型凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 心肌细胞原代培养

采用组织胰蛋白酶消化法获取乳鼠心肌细胞, 用差速贴壁法和 BrdU 化学抑制法纯化。

1.3 建立缺血缺氧环境

制备混合气体 (体积分数 95% N₂, 5% CO₂, 重庆朝阳气体有限公司), 以 10 L/min 流量充入放置细胞的密闭容器 10 min, 同时关闭进出气口, 容器内氧最终体积分数为 1%。缺氧刺激前更换无糖无血清 DMEM 培养液, 模拟缺血环境。

1.4 实验分组

缺血缺氧组: 乳鼠心肌细胞培养至第 5 天, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 2 次, 加入无糖无血清 DMEM 培养液, 置入密闭盒进行培养。干预组: 提前 1 h 在培养液中加入磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 特异性抑制剂 IGF-I (终浓度 200 μg/L), 其余操作同缺血缺氧组。对照组: 将缺血缺氧组受刺激前检测结果设为正常对照。前 2 组缺血缺氧时相点为 1、3、6、12、24 h。

1.5 检测指标

1.5.1 心肌细胞凋亡 消化收集对照组及其余 2 组各时相点细胞。细胞沉淀加 200 μl 细胞裂解液, 室温下孵育 30 min, 离心半径 6.5 cm, 200 r/min

离心 10 min。取上清液各 20 μl 分别加入酶标板中, 补充 80 μl 免疫反应混合物 (生物素标记抗组蛋白抗体: 过氧化物酶标记抗 DNA 抗体: 孵育缓冲液 = 1:1:18, 临用前配制) 混匀, 封片后室温下振荡 2 h, 用孵育缓冲液洗涤 3 次, 加 100 μl 底物液。另设单底物液孔作为比色空白对照。采用双波长 (主波长 405 nm, 参考波长 490 nm) 比色法测定。组蛋白-DNA 片段含量以吸光度值表示。

1.5.2 心肌细胞线粒体膜电位 将各组细胞的培养液更换为无 Ca²⁺、Mg²⁺ Hank 液, 加入 TMRE (标记线粒体膜电位) 至终浓度 2 μmol/L, 常规培养 30 min, PBS 清洗 2 次。测定条件: 激发波长 488、568 nm, 发射波长 527、675 nm。通过共聚焦系统软件采集线粒体膜电位荧光图像, 以荧光强度代表膜电位。

1.5.3 磷酸化 Akt 蛋白的表达 参照试剂说明书, 用蛋白印迹法检测对照组及其余 2 组细胞缺氧 6 h 时磷酸化 Akt 蛋白表达量。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件进行 *t* 检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 心肌细胞凋亡情况

各时相点缺血缺氧组心肌细胞凋亡数量均较对照组明显增加, 干预组心肌细胞凋亡数量显著低于缺血缺氧组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组心肌细胞凋亡情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	缺血缺氧时间 (h)			
		1	3	6	12
缺血缺氧组	40	0.33 ± 0.05 ^a	0.61 ± 0.06 ^a	1.17 ± 0.08 ^a	2.25 ± 0.11 ^a
干预组	40	0.26 ± 0.04 ^b	0.49 ± 0.05 ^c	0.84 ± 0.06 ^c	1.63 ± 0.09 ^c

注: 数据为吸光度值; 对照组为 0.18 ± 0.03; 与对照组比较, a: $P < 0.01$; 与缺血缺氧组比较, b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$

2.2 心肌细胞线粒体膜电位

对照组红色荧光均匀分布于心肌细胞胞质内, 荧光强度为 40.2 ± 10.1。缺血缺氧 6 h, 细胞形态无明显改变, 但荧光强度减弱至对照组的 47% (18.7 ± 5.1, $P < 0.01$); 12 h 时, 细胞形态发生变化, 荧光强度明显减弱至对照组的 16% (6.3 ± 1.9, $P < 0.01$)。干预组上述时相点线粒体膜电位荧光强度分别为对照组的 72% 和 31% (28.8 ± 6.2、12.5 ± 3.1), 较同时相点缺血缺氧组明显改善 ($P < 0.05$)。见图 1。

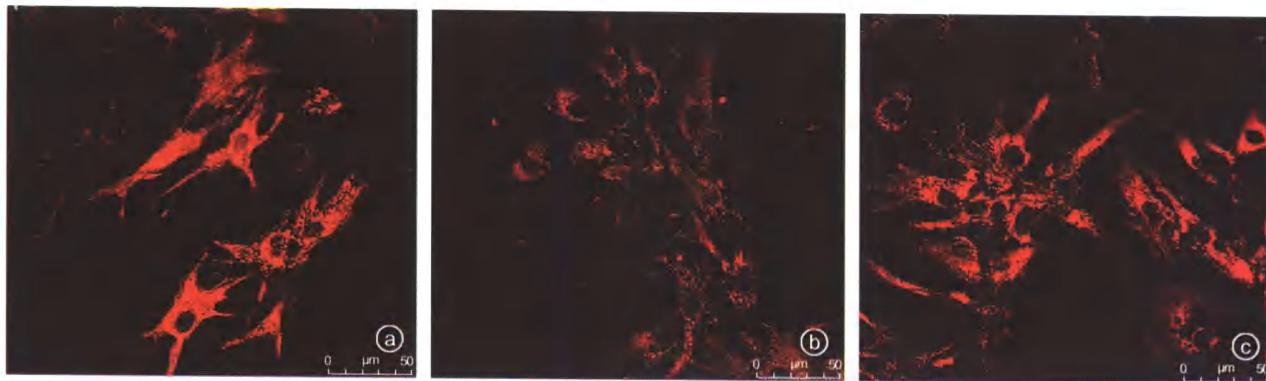


图 1 各组心肌细胞线粒体膜电位的比较 四甲基罗丹明乙酯染色,图中标尺全长 50 μm。a. 对照组乳鼠心肌细胞红色荧光均匀分布于细胞质; b. 缺血缺氧 6 h, 缺血缺氧组细胞荧光强度明显减弱; c. 干预组细胞缺血缺氧 6 h 时荧光强度较缺血缺氧组明显增强

2.3 心肌细胞磷酸化 Akt 蛋白的表达

对照组心肌细胞磷酸化 Akt 蛋白表达极少; 缺血缺氧 6 h, 干预组细胞磷酸化 Akt 蛋白表达量升高达对照组的 28 倍; 缺血缺氧组在相同时相点升高约 9 倍。见图 2。

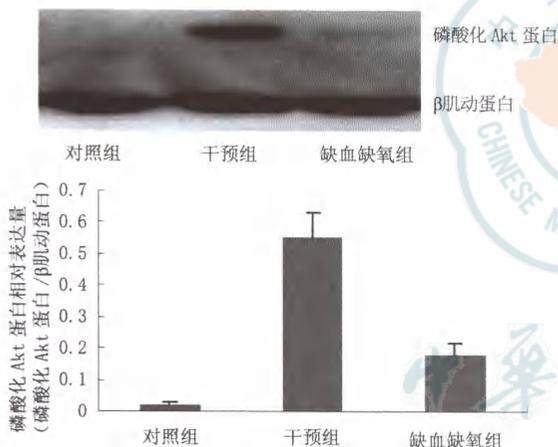


图 2 各组心肌细胞磷酸化 Akt 蛋白的表达。干预组、缺血缺氧组的检测时相点均为缺血缺氧 6 h; 上图为蛋白质印迹法检测结果, 下图为半定量分析结果

3 讨论

IGF- I 是由 70 个氨基酸组成的具有内分泌、自分泌及旁分泌特性的单链多肽, 相对分子质量 7.5×10^3 。IGF- I 主要在肝脏中合成, 对人体多种组织器官如肌肉、骨骼等具有促进生长的作用^[1,2]。研究表明, 心脏本身具有分泌 IGF- I 的能力, 在心肌细胞表面也存在 IGF- I 及 IGF- II 受体。IGF- I 具有促进心脏早期生长、改善心力衰竭、参与心肌肥厚形成等作用。有研究证实, 细胞凋亡参与了烧伤后早期心肌缺血缺氧损害, 其机制主要和线粒体结构与功能损伤、氧自由基及钙平衡失调有关^[3,4]。而 IGF- I 对缺血缺氧引起的心肌细胞凋亡的影响鲜有报道。本

研究结果显示, 应用 IGF- I 提前干预, 能够减少细胞染色质 DNA 的裂解, 减轻凋亡。表明 IGF- I 对烧伤后早期的缺血缺氧心肌细胞具有一定保护作用。

目前认为, 介导细胞凋亡的途径主要有线粒体通路、死亡受体(如 Fas)^[5]通路和内质网通路等。线粒体在细胞凋亡的过程中起着枢纽作用, 多种细胞凋亡刺激因子可诱导不同的细胞发生凋亡, 而线粒体膜电位的下降, 被认为在细胞凋亡级联反应过程中早于细胞核凋亡特征(染色质致密、DNA 断裂)出现^[6], 是线粒体通透性转换孔(MPTP)开放的特征表现。后者直接导致线粒体内的细胞色素 c 释放至胞质, 触发下游半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶级联反应, 引起细胞凋亡^[7,8]。线粒体膜电位的存在, 使一些亲脂性阳离子荧光染料如 TMRE、罗丹明 123 等可结合到线粒体基质, 其荧光的增强或减弱可反映线粒体膜电位的增高或降低^[9,10]。本研究结果提示, 缺血缺氧能使心肌细胞线粒体膜电位明显下降, 而 IGF- I 能够将缺血缺氧条件下的线粒体膜电位维持在较高水平。表明 IGF- I 可能通过减少 MPTP 的开放, 维持线粒体膜电位, 减少细胞色素 c 释放, 发挥抗凋亡作用。

缺氧引起的细胞凋亡与抗凋亡过程中有多条信号通路参与。Hirai 等^[11]报道, PI3K/Akt 信号途径通过减少细胞色素 c 的释放参与了神经细胞抗凋亡作用。其机制可能与磷酸化 Akt 抑制 bcl-2 相关凋亡因子蛋白从胞质转移至线粒体膜上从而避免 MPTP 开放有关^[12]。本研究中 IGF- I 能够使缺血缺氧心肌细胞磷酸化 Akt 蛋白表达量明显升高, 表明其能够激活 PI3K/Akt 信号途径, 通过磷酸化 Akt 的作用抑制线粒体介导的细胞凋亡。

以上结果表明, IGF- I 对缺血缺氧心肌细胞具有抗凋亡作用, 可能与 IGF- I 激活 PI3K/Akt, 增加

磷酸化 Akt 表达,减少细胞色素 c 的释放有关。但这种作用是否有其他信号途径参与,是否与除线粒体以外的凋亡途径有关,有待进一步研究。

参考文献

[1] Goldspink G. Mechanical signals, IGF- I gene splicing, and muscle adaptation. *Physiology*, 2005, 20(10): 232 - 238.

[2] Yang SY, Goldspink G. Different roles of the IGF- I Ec peptide (MGF) and mature IGF- I in myoblast proliferation and differentiation. *FEBS*, 2002, 522(1/2/3): 156 - 160.

[3] 黄跃生. 严重烧伤后早期心肌损害的细胞分子机制与防治策略研究进展. *中华烧伤杂志*, 2006, 22(3): 161 - 163.

[4] 张家平, 黄跃生, 周新, 等. 严重烧伤大鼠心肌细胞凋亡与心功能损害的关系. *中华烧伤杂志*, 2002, 18(5): 272 - 274.

[5] Wajant H. The fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, 2002, 296(31): 1635 - 1636.

[6] Lugli E, Troiano L, Ferraresi R, et al. Characterization of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis. *Cytometry A*, 2005, 68(2): 28 - 35.

[7] Düßmann H, Rehm M, Donat K, et al. Outer mitochondrial membrane permeabilization during apoptosis triggers caspase-

independent mitochondrial and caspase-dependent plasma membrane potential depolarization: a single-cell analysis. *J Cell Sci*, 2002, 116(11): 525 - 536.

[8] Kazimierz W, Baran J, Zembala M, et al. Caspase-8 activation precedes alterations of mitochondrial membrane potential during monocyte apoptosis induced by phagocytosis and killing of staphylococcus aureus. *Infect Immun*, 2004, 72(5): 2590 - 2597.

[9] Russell C, Scaduto J, Lee W, et al. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamin derivatives. *Biophys J*, 1999, 76(4): 469 - 477.

[10] Gottlieb E, Armour SM, Thompson CB. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death Differ*, 2003, 10(6): 709 - 717.

[11] Hirai K, Hayashi T, Chan PH. PI3K inhibition in neonatal rat brain slices during and after hypoxia reduces phospho-Akt and increases cytosolic cytochrome c and apoptosis. *Brain Res Mol Brain Res*, 2004, 124(1): 51 - 61.

[12] Bergmann A. Survival signaling goes BAD. *Dev Cell*, 2002, 3(1): 607 - 608.

(收稿日期: 2007 - 02 - 13)

(本文编辑: 王旭)

· 病例报告 ·

大网膜加皮片移植修复全层腹壁缺损一例

赵利 王成传 刘昭鑫 付文健 董芳

患者男, 42 岁。不慎被 10 kV 高压电击伤胸腹部、会阴、四肢, 烧伤总面积 60% TBSA, 均为 III 度。患者腹部正中有一 8 cm × 6 cm 的电击伤口, 其基底组织炭化。伤后第 6 天行胸腹部切痂, 术中见电击伤口处腹壁全层坏死, 保留坏死腹膜并用异体皮覆盖, 其余创面行自、异体皮混合移植。伤后 20 d 腹膜坏死穿孔, 出现 4 cm × 3 cm 腹膜缺损, 肠管外露(图 1)。次日行清创植皮术, 未见合并腹腔脏器损伤, 遂将大网膜引出腹腔, 均匀覆盖于腹壁穿孔区, 缝合固定(图 2), 大网膜上直接行自体皮片移植。术后所植皮片全部成活, 全层腹壁缺损得以修复(图 3)。

讨论 对于全层腹壁(包括腹膜)缺损的患者, 应在病

情允许的情况下将腹壁坏死组织彻底清除, 可用阔筋膜、一侧腹直肌前鞘、戊二醛牛腹膜、国产丝绸等修复腹膜缺损, 再应用皮瓣修复腹壁^[1]。本例患者腹壁已毁损, 双大腿深度烧伤, 无法用局部皮瓣转移、腹直肌前鞘翻转或阔筋膜修复腹膜缺损; 即使应用戊二醛牛腹膜、国产丝绸等封闭, 也无健康组织覆盖。笔者应用大网膜修复腹膜缺损, 同时在大网膜上直接行游离植皮修复腹壁, 手术一次完成且较皮瓣修复简单易行, 效果满意。

参考文献

[1] 王伟. 整形外科学. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1999: 491.

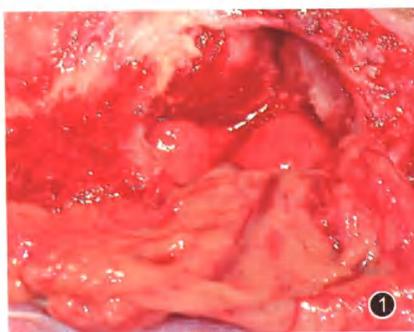


图 1 电击伤后全层腹壁缺损, 肠管膨出

图 2 大网膜均匀覆盖腹壁穿孔区

图 3 术后全层腹壁缺损得以修复

(收稿日期: 2007 - 07 - 12)

(本文编辑: 罗勤)

作者单位: 273500 山东邹城, 兖矿集团总医院烧伤整形科