

# 解偶联蛋白-2 在肠缺血预适应大鼠心肌中的表达

吕 磊<sup>1</sup>, 江时森<sup>1</sup>, 黄兆琦<sup>1</sup>, 马 捷<sup>2</sup>

南京大学医学院临床学院

( 南京军区南京总医院 )<sup>1. 心脏内科 2. 病理科, 江苏南京 210002</sup>

**摘要：**目的 探讨肠缺血预适应(iIPC)对心肌的保护作用以及心肌线粒体解偶联蛋白-2(UCP2)在iIPC心肌保护中的作用。方法:结扎肠系膜上动脉(SMA)制作iIPC大鼠动物模型,对模型大鼠进行心肌持续缺血-再灌注(IR),评价心肌损伤程度,并采用RT-PCR方法、计算机凝胶成像分析心肌UCP2的相对含量。以未结扎SMA的心肌持续缺血-再灌注大鼠为IR对照组,假手术大鼠为空白对照组。结果:①IR对照组大鼠心肌细胞超微结构损伤程度明显超过空白对照组,而iIPC组在iIPC后的0和24h均轻于IR对照组。②与IR对照组大鼠心肌中UCP2 mRNA水平比较,iIPC 0、6、12、24和48h组均明显升高( $P < 0.01$ )。iIPC后UCP2 mRNA水平呈双相变化,0h心肌UCP2水平最高,6h后下降,24h再次升高,此后逐渐回落。结论:iIPC能对心肌IR产生保护作用,预适应大鼠心肌UCP2的表达明显升高,提示UCP2可能参与iIPC对心肌的保护作用。

**关键词：**解偶联蛋白-2；肠缺血预适应；心肌保护；缺血-再灌注

中图分类号：R542.2 文献标识码：A 文章编号：1008-8199(2006)01-0047-04\*

## The expression of UCP2 in myocardium of rats with intestinal ischemic preconditioning

LÜ Lei<sup>1</sup>, JIANG Shi-sen<sup>1</sup>, HUANG Zhao-qi<sup>1</sup>, MA Jie<sup>2</sup>

( 1. Department of Cardiology 2. Department of Pathology, School of Medicine, Nanjing University, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China )

**Abstract :** *Objective* :To discuss the protective effect of intestinal ischemic preconditioning ( iIPC ) on the myocardium and the role of uncoupling protein 2 ( UCP2 ) in myocardium with iIPC. *Methods* :The animal model was built by superior mesenteric artery ligation of rats. Then they were subjected to a sustained coronary occlusion of 30 min and reperfusion of 180 min. We evaluated the degree of the myocardial damage and used RT-PCR method to check the relative content of UCP2 mRNA. The IR control group underwent the coronary occlusion/ reperfusion with no intestinal ischemia and the blank group was sham-operated. *Results* ①Compared to the blank group , the IR control group showed much heavier damage in the ultramicro structure. And for the iIPC group , the damage in the ultramicro structure 0 h and 24 h after iIPC was lighter than that of the IR control group. ②Compared to the expression of the UCP2 mRNA in the myocardium of rats in the IR control group , the expressions of iIPC 0 h ,6 h ,12 h ,24 h ,48 h groups increased substantially (  $P < 0.01$  ). And the development of the expression level can be divided into two phases. The level of UCP2 0 h after iIPC was the highest and decreased 6 h after iIPC. It increased again 24 h after the intestinal ischemia and dropped gradually after that. *Conclusion* :iIPC

\* 收稿日期：2005-05-09；修订日期：2005-06-17

作者简介：吕磊(1978-)女,安徽黄山人,医师,医学硕士研究生,从事心脏内科专业。

can protect myocardial cells from IR injury. UCP2 is involved in the mechanism of the cardioprotection induced by iIPC.

**Key words** : Uncoupling protein 2 ; Intestinal ischemia preconditioning ; Cardioprotection ; Ischemia-reperfusion

### 0 引 言

心肌缺血预适应是最为有效的内源性心肌保护机制。Gho 等<sup>[1]</sup>于 1996 年发现,肠缺血预适应(intestinal ischemia preconditioning, iIPC)也能产生与心肌缺血预适应相似的心肌保护作用,但其确切机制尚不完全明了。近年研究表明,UCP2 与心肌能量代谢和心肌细胞凋亡关系密切,在心肌病理生理过程中有着极其重要的作用。但 UCP2 在 iIPC 心肌中的作用如何,尚未见报道。本研究的目的是探讨心肌线粒体解偶联蛋白-2(uncoupling protein 2, UCP2)在这一保护机制中的作用。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 雄性 SD 大鼠 21 只,体重(380 ± 20)g,购自南京军区南京总医院动物实验中心。实验所用分子生物学试剂均购自美国 Promega 公司。实验仪器主要有 TKR -200C 小动物呼吸机(江西省特力麻醉呼吸设备公司)、JY96 - II 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)、冷冻离心机(德国 fresco)、PCR - 100<sup>TM</sup>programmable thermal controller (MJ research, Inc)、电泳仪双恒定时 DF - C 型(北京东方特力科贸中心)、KODAK ID3.5 DC290 凝胶成像分析仪(南京冷泉港)。

#### 1.2 方法

**1.2.1 实验动物的分组和模型** 大鼠 21 只,随机分为 ①空白对照组:剖腹,不结扎肠系膜上动脉(SMA),不予心肌缺血-再灌注(ischemia reperfusion, IR)。②心肌 IR 对照组:剖腹但不结扎 SMA,无 iIPC 过程,予心肌 IR。③iIPC 组:分为 iIPC 0、6、12、24 和 48 h 组。每组 3 只。术前在标准检疫房间中适应 1 周,标准喂食。实验过程中,大鼠生活及环境温度均控制在(20 ± 2)°C。手术前 12 h 禁食,自由饮水,测体重。氯胺酮(150 mg/kg)腹腔注射麻醉,腹部正中切口,游离 SMA,同时静脉给予 200 U 肝素,SMA 起始部位阻断 20 min,然后再灌注 15 min 关腹。分别观察 0、6、12、24 和 48 h,此后气管插管,接人工呼吸机,经胸骨左缘第四肋间剖胸,纵行切开心包膜,暴露心脏冠状动脉左前降支(LAD),于距根部 3 ~ 4 mm 处结扎 LAD,持续缺血

30 min 后,剪断结扎线再灌注 180 min。实验中左心室前壁紫绀及同步心电图标准 II 导联 J 点上抬,QRS 幅度升高为结扎成功标志,再灌注时紫绀消失。剖胸取出心脏,4°C 等渗盐水冲洗,切取左心室心尖部心肌 100 mg,冰浴匀浆提取总 RNA。同时留取心尖部心肌进行透射电镜检查(电镜型号 JEM - 1200EX)。

**1.2.2 心肌组织总 RNA 提取和纯化** 按 Promega 公司 TriPure 提取试剂盒(Tripure Isolation Reagent)操作步骤,分别从 100 mg 大鼠新鲜心肌组织中提取并纯化总 RNA 约 100 μg。

**1.2.3 RT-PCR 半定量** 大鼠心肌 UCP2 cDNA 引物设计参考文献[2]和 GENE BANK 数据,由上海博亚生物技术有限公司合成,β-actin 引物依据其 cDNA 序列设计(表 1)。逆转录反应以提取的总 RNA 10 μg 为模板,以 Random Primer 为逆转录引物,70°C 水浴 5 min 后迅速冷却,然后每 1 μg mRNA 加入逆转录酶 M-MLV 100 U,总反应体积 25 μl,37°C 水浴 1 h,合成第一条 cDNA 链。PCR 反应以逆转录产物 10 μl 为模板,目的基因引物 300 nmol/L,加入 Taq DNA 聚合酶 2.5 U,总反应体积 25 μl,PCR 条件为 92°C 变性 45 s,58°C 退火 50 s,72°C 延伸 70 s,30 个循环,最后一次循环为 72°C,7 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后,与 PCR Ladder 分子量比较鉴定,并用 KODAK ID3.5 DC290 凝胶成像分析软件检测电泳条带光密度。以 β-actin 基因 RT-PCR 产物条带 A 值为 100%, $A_{UCP2}/A_{\beta-actin}$  比值为 UCP2 的 mRNA 的相对含量。

表 1 试验所用的 UCP2 和内参 β-actin 序列

名称	引物	PCR 产物长度(bp)
UCP2	5'-AACAGTTCTACACCAAGGGC-3' 正义链	472
	5'-AGCATGCTAAGGGCACAGTG-3' 反义链	
β-actin	5'-TTGTAACCAACTGGGACGATATGG-3' 正义链	651
	5'-GATCTTGATCTTCATGGTCTAGG-3' 反义链	

**1.2.4 统计学方法** 实验数据采用 SPSS13.0 for windows 软件包统计学处理。计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,

各组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P \leq 0.05$  为差异有显著性统计学意义,  $P \leq 0.01$  为差异有非常显著性统计学意义。

## 2 结果

**2.1 iIPC 对心肌的保护作用** ①空白对照组:肌节排列整齐,肌丝清晰,细胞核长椭圆形,见轻度核膜皱折,线粒体嵴清楚,排列整齐(图1)。②IR 对照组:细胞核长椭圆形,见轻度核膜皱折,常染色质较丰富,核膜下可见少量异染色质块。线粒体变性,嵴模糊、消失,或呈絮状改变,部分空泡变性或有高电子致密物沉积(图2)。③iIPC 0 h 组:线粒体嵴尚清楚,排列整齐,见散在高电子致密物沉积(图3)。④iIPC 24 h 组:大部分线粒体嵴尚完好,少部分线粒体呈絮状改变,部分有散在高电子致密物沉积(图4)。

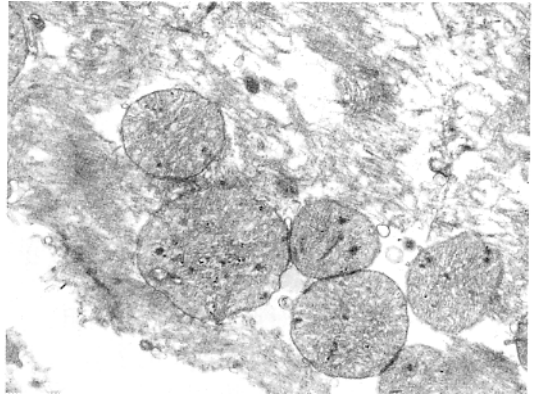


图3 iIPC 0 h 组大鼠心肌电镜图

Figure 3 Electron microscope of rat myocardium from the iIPC 0 h group

线粒体嵴尚清楚,见散在高电子致密物沉积

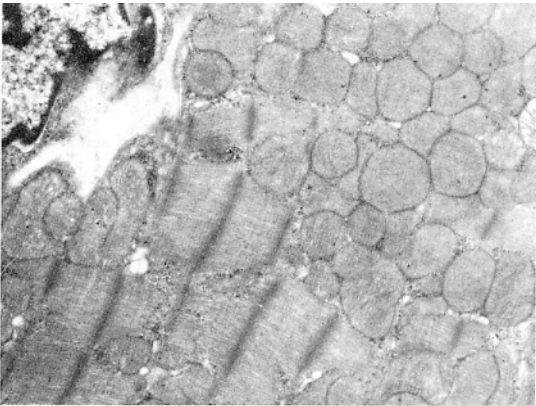


图1 空白对照组大鼠心肌电镜图

Figure 1 Electron microscope of rat myocardium from the blank group

肌节排列整齐,肌丝清晰,线粒体嵴清楚

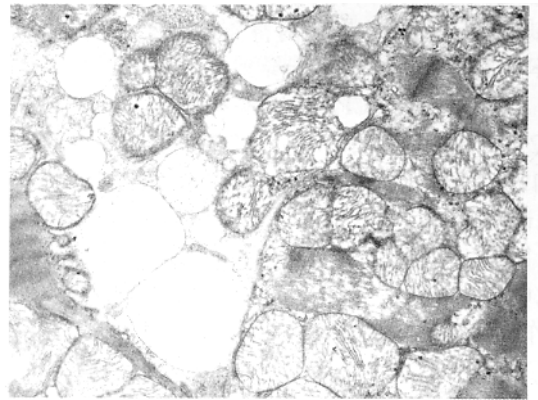


图4 iIPC 24 h 组大鼠心肌电镜图

Figure 4 Electron microscope of rat myocardium from the iIPC 24 h group

大部分线粒体嵴尚完好,少部分呈絮状改变,部分有散在高电子致密物沉积

**2.2 各组大鼠心肌 UCP2 mRNA 相对含量( $A_{UCP2}/A_{\beta\text{-actin}}$ ) 见表2。**

表2 各组大鼠 UCP2 mRNA 相对含量

Table 2 The relative amount of UCP2 mRNA

分组	<i>n</i>	含量( $\bar{x} \pm s$ )
空白对照组	3	0.4231 ± 0.020
IR 对照组	3	0.4743 ± 0.023 *
iIPC 0 h 组	3	0.7730 ± 0.020 <sup>Δ</sup>
iIPC 6 h 组	3	0.6761 ± 0.013 <sup>Δ</sup>
iIPC 12 h 组	3	0.6102 ± 0.023 <sup>Δ</sup>
iIPC 24 h 组	3	0.7108 ± 0.022 <sup>Δ#</sup>
iIPC 48 h 组	3	0.6185 ± 0.017 <sup>Δ</sup>

与空白对照组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 IR 对照组比较,  $\Delta P < 0.05$ ; 与 iIPC 12 h 组比较, # $P < 0.01$

## 3 讨论

大量研究已经证实<sup>[3,4]</sup> 小肠缺血 15 ~ 30 min 后再灌注 5 ~ 15 min 能对随后的心肌持续 IR 产生预适应(保护)作用。iIPC 和心肌缺血预适应一样,分早

图2 IR 对照组大鼠心肌电镜图

Figure 2 Electron microscope of rat myocardium from the IR control group

线粒体变性,嵴模糊,部分呈絮状改变,或有空泡变性

期时相(经典预处理时相,数分钟内发生,持续2h左右)和延迟时相(预适应保护作用的第二窗口,24h后发生,持续72h以上)两个时相来保护心肌。本研究结果表明,iIPC组大鼠心肌线粒体损伤程度明显轻于IR对照组,此保护作用在iIPC后24h再次出现,但较iIPC 0h弱。因此,我们认为iIPC确实能产生心肌保护作用,并有早期和延迟2个时相的双相保护作用,其中早期时相的心肌保护作用较延迟相强。

本实验中,无论IR对照组还是iIPC组,与空白对照组比较,均可见UCP2 mRNA的表达水平明显增高。研究表明<sup>[5]</sup>,儿茶酚胺、甲状腺激素、细菌脂多糖(LPS)和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等均能上调UCP2的表达水平。本实验UCP2表达增高的可能原因是:手术刺激以及肠缺血和随后的心肌缺血-再灌注,导致交感-肾上腺髓质兴奋,内源性儿茶酚胺类浓度大量上升,刺激心肌UCP2水平上调。此外,肠缺血时,肠道细菌和内毒素移位,使细菌LPS和TNF- $\alpha$ 表达增高,也可能导致心肌UCP2水平增高。

iIPC 0h组UCP2表达水平最高,几乎达空白组的2倍,并明显高于IR对照组( $P < 0.01$ )。iIPC 6h和12h组再予心肌IR,心肌UCP2表达水平逐渐下降,iIPC 24h组的心肌UCP2表达水平再次上升( $0.7108 \pm 0.022$  vs iIPC 12h组  $0.6102 \pm 0.023$ ,  $P < 0.01$ )。此后逐渐下降。这与iIPC的双相心肌保护作用基本一致。综上所述,说明UCP2可能与iIPC的心肌保护机制有关。

UCP2位于线粒体内膜上,具有对质子的转运活性,可引起线粒体质子漏,导致氧化与磷酸化解偶联,在调控线粒体ATP的合成和抑制线粒体内活性氧簇(ROS)产生中有重要作用。ROS是IR氧化损伤的重要中介。心肌IR损伤主要是氧自由基和钙超载两个因素所致<sup>[6]</sup>。再灌注时,线粒体呼吸链的还原增强,抗氧化系统下调,ROS生成增加,从而导致线粒体功能障碍,ATP生成减少,自由基产生增多和细胞内钙超载<sup>[7]</sup>。而UCP2能被外源性ROS或线粒体中的ROS激活并与其相互作用,减少线粒体中ROS的产生<sup>[8]</sup>。Echtay等<sup>[9]</sup>认为,UCP2可将超氧阴离子从基质转运至内外膜间隙,再通过歧化酶或辅酶Q(CoQ)等抗氧化物的作用或质子化作用将其清除。此过程中线粒体呼吸产生的大量ROS通过UCP2转运至细胞膜外,这可能是由于通过电子传递链的ROS过度生成而导致的反馈反应。此外,UCP2可以防止线粒体钙超载,降低线粒体内膜电学梯度,减少膜电位丢失,通过减少细胞凋亡从而减少再灌注损伤<sup>[10]</sup>。

已有研究发现<sup>[11]</sup>,在许多神经变性疾病中,UCP2上调是体内及体外对不同细胞应激反应神经保护作用的可能机制之一。离体线粒体耐受IR的可能机制是UCP2上调,激活可诱导的质子漏,从而减少再灌注时ROS损伤<sup>[12]</sup>。因此,我们认为,在体

内,大鼠心肌线粒体UCP2的上调使心肌细胞产生了预适应,通过阻断细胞产能,减少ROS生成,对抗细胞氧化应激,减少此后的缺血-再灌注损伤。

UCP2在核糖体合成后,大多以前体形式存在,其导肽被线粒体膜表面专一受体识别后可引导UCP2向线粒体内膜输送,转变为成熟形式的UCP2。本实验发现,iIPC后心肌UCP2含量增高,但此时UCP2的活性是否相应增高尚不清楚。此外,本研究仅仅观察了再灌注3h后心肌线粒体中UCP2的表达水平,其具体机制、更深入的原因以及影响因素仍有待进一步研究。

iIPC能对心肌缺血-再灌注产生保护作用。iIPC大鼠心肌UCP2的表达明显升高,提示UCP2可能参与了iIPC对心肌的保护作用。

#### 参考文献:

- [1] Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, et al. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue [J]. *Circulation*, 1996, 94(9):2193-2200.
- [2] Shimabukuro M, Zhou YT, Lee Y. Induction of uncoupling protein 2 mRNA by troglitazone in the pancreatic islets of Zucker diabetic fatty rat [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 237(2):359-361.
- [3] Liem DA, Verdouw PD, Ploegh H, et al. Sites of action of adenosine in interorgan preconditioning of the heart [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002, 283(1):H29-37.
- [4] Wang YP, Xu H, Kazuhiro M. Intestinal ischemia induces late preconditioning against myocardial infarction: a role for inducible nitric oxide synthase [J]. *Cardiovascular Research*, 2001, 49(2):391-398.
- [5] Teshima Y, Akao M, Jones SP, et al. Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes [J]. *Circ Res*, 2003, 93(3):192-200.
- [6] 李春杰,曹洪欣,余柏林.缺血预适应对心肌缺血-再灌注损伤保护效应的实验研究 [J]. *医学研究生学报*, 2004, 17(11):983-985.
- [7] Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 282(2):C227-C241.
- [8] Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, et al. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins [J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 37(6):755-767.
- [9] Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, et al. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins [J]. *Nature*, 2002, 415(6867):96-99.
- [10] Teshima Y, Akao M, Jones SP, et al. Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes [J]. *Circ Res*, 2003, 93(3):192-200.
- [11] Diano S, Matthews RT, Patrylo P, et al. Uncoupling protein 2 prevents neuronal death including that occurring during seizures: a mechanism for preconditioning [J]. *Endocrinology*, 2003, 144(11):5014-5021.
- [12] McLeod CJ, Hoyt RF, Sack MN. UCP-2, a functional target in delayed preconditioning induced cardioprotection? [J]. *Cardiovasc J S Afr* 2004, 15(4 Suppl 1):S4.