

[文章编号] 1000-2200(2010)02-0112-03

· 基础医学 ·

大鼠肾下腹主动脉缺血再灌注对心肌肌浆网钙泵活性及其基因表达的影响

于影^{1,2}, 胡杰², 高琴², 汪思应¹

[摘要] **目的:**观察大鼠肾下腹主动脉缺血再灌注对心肌肌浆网钙泵(sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA)的活性及其基因表达的影响。**方法:**复制大鼠肾下腹主动脉缺血再灌注(ischemia and reperfusion, I/R)模型。将SD雄性大鼠随机分为假手术组,缺血30 min分别再灌注2、12、24和48 h(I/R2h组、I/R12h组、I/R24h组、I/R48h组)。采用无机磷比色法检测缺血再灌注不同时间点心肌肌浆网SERCA活性,反转录酶PCR技术测定SERCA基因的表达。**结果:**I/R24h组、I/R48h组SERCA的活性及基因表达均显著低于假手术组($P < 0.01$);I/R12h组SERCA的活性均低于假手术组($P < 0.01$),但基因表达无明显变化($P > 0.05$);I/R2h组SERCA的活性及其基因表达与假手术组差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**肾下腹主动脉缺血再灌注过程严重影响SERCA的活性及其基因的表达。

[关键词] 心脏/生理学;再灌注损伤;大鼠;心肌;肌浆网钙泵;肾下腹主动脉

[中国图书资料分类法分类号] R 331.31 **[文献标识码]** A

Effects of activity and expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in rat heart in infrarenal abdominal aorta occlusion induced ischemia and reperfusion injury

YU Ying^{1,2}, HU Jie², GAO Qin², WANG Si-ying¹

(1. Department of Pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei Anhui 230032;

2. Department of Physiology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) activity and mRNA expression in rat heart in infrarenal abdominal aorta occlusion induced ischemia and reperfusion injury (I/R). **Methods:** Forty male Sprague-Dawley rats were randomized into five groups: pseudo-operation group, I/R2h group, I/R12h group, I/R24h group and I/R48h group. Rats in pseudo-operation group were undergone laparotomy only. Meanwhile, rats in I/R groups were reperfused with different hours (2, 12, 24 and 48 hours) following by 30 minutes infrarenal abdominal aorta occlusion induced ischemia. Then the rat hearts in each group were obtained at the specified time points. The activity of SERCA was determined by inorganic phosphorus colorimetry, and gene expression of SERCA was analyzed by reverse transcriptional-PCR. **Results:** Compared with the pseudo-operation group, the levels of SERCA activity and gene expression in I/R24h group and I/R48h group were down-regulated significantly ($P < 0.01$); but in I/R12h group, SERCA activity was decreased, while gene expression had no statistical difference. And there were no statistical significance about SERCA activity and gene expression in rat heart between the I/R2h group and pseudo-operation group ($P > 0.05$). **Conclusions:** Infrarenal abdominal aorta occlusion may obviously affect the activity and gene expression of SERCA in rat heart.

[Key words] heart/physiology; ischemia and reperfusion injury; rat; heart; sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase; infrarenal abdominal aorta

腹主动脉阻断术因能有效地预防性控制和减少其阻断平面以下的外科术中致命性大出血,保证其阻断平面以下腹部外科、血管外科、器官移植、肿瘤外科、妇产科与骨盆骶尾骨外科各种手术得以在基本无血视野下安全地进行病灶处理,近10年来已被临床外科医生广泛接受^[1]。但腹主动脉阻断后所引起的血流动力学波动往往给患者的心血管系统带

来不利的影响^[2]。本研究通过建立腹主动脉缺血再灌注的动物模型,观察再灌注不同时间段心肌肌浆网钙泵(sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA)的活性及其基因表达变化,探讨SERCA是否参与腹主动脉缺血再灌注诱导的心肌损伤。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组 取雄性SD大鼠40只,体重250~300 g,随机分成5组,每组8只。根据Moneley等^[3]介绍的方法,复制肾下腹主动脉缺血再灌注损伤模型。假处理组:仅游离腹主动脉不结扎;缺血再灌注组:大鼠肾下腹主动脉阻断缺血30 min,分别再灌注2、12、24、48 h组(I/R2h组、I/R12h组、I/R24h组、I/R48h组)。

[收稿日期] 2009-10-14

[基金项目] 安徽省高等学校省级自然科学研究资助项目(KJ2007B018)

[作者单位] 1. 安徽医科大学病理生理学教研室,安徽合肥230032; 2. 蚌埠医学院生理学教研室,安徽蚌埠233030

[作者简介] 于影(1981-),女,讲师。

[通讯作者] 汪思应,研究生导师,教授。

1.2 主要药品和试剂 钙泵及考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒和 PCR 试剂盒购自 Fermentas 公司;引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 实验方法

1.3.1 取材 按分组要求时间点断头处死 SD 大鼠后即刻取出心脏,冰生理盐水冲洗,剪去心房及大血管,沿室间隔剪开左右心室,迅速放入液氮中速冻,置 -80°C 冰箱保存备用。

1.3.2 SERCA 活性的测定 称取 50 mg 心肌组织,参照文献[4]方法制备心肌肌浆网。用无机磷比色法测定。

1.3.3 心肌组织总 RNA 的提取 取右心室组织 100 mg,采用 Trizol 一步法提取组织总 RNA,并于 260 nm 和 280 nm 处测定其 OD 值,计算 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值,观察总 RNA 的纯度,且在紫外灯下可见 28S、18S 两条明显的 rRNA 区带和一条隐约 5S 条带,说明标本 RNA 完整性较好。

1.3.4 反转录 PCR (RT-PCR) 检测 SERCA mRNA 表达 取总 RNA 3 μl 为模板,用随机引物反转录合成 cDNA,以此 cDNA 1.5 μl 为模板,进行 PCR 扩增。所用 SERCA 引物:上游 5'-AAG CAG TTC ATC CGC TAC CT-3';下游:5'-AGA CCA TCC GTC ACC AGA TT-3',预计扩增产物长 134 bp。以 β -actin 为内参照,引物上游:5-GAG ACC TTC AAC ACC CCA GCC-3';下游:5'-GGC CAT CTC TTG CTC GAA GTC-3',预计扩增产物长 311 bp。PCR 反应终体积为 25 μl ,反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min 后,以 95 $^{\circ}\text{C}$ 50 s 变性,SERCA 退火温度 52.4 $^{\circ}\text{C}$ 50 s; β -actin 退火温度 58.3 $^{\circ}\text{C}$ 50 s;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,32 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 平衡 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。将 4 μl PCR 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭显色。结果在 GIS 凝胶图像处理系统中拍摄记录,并使用图像分析软件对凝胶中每一泳带进行光密度扫描作半定量分析,结果以目的基因与内参对照的积分吸光度比值 (SERCA/ β -actin ratio) 表示 mRNA 相对表达量。

1.4 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 大鼠心肌肌浆网 SERCA 活性和 SERCA mRNA 表达 I/R24h 组、I/R48h 组心肌细胞肌浆网 SERCA 活性及其基因表达均显著低于假手术组 ($P < 0.01$);I/R12h 组 SERCA 的活性低于假手术组 ($P < 0.01$),但基因表达无明显变化 ($P > 0.05$);I/R2h 组 SERCA 的活性及其基因表达无明显变化

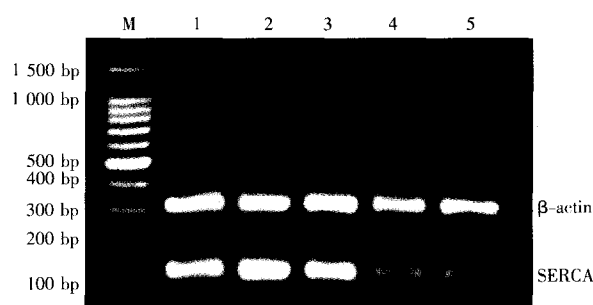
(见表 1)。

表 1 肾下腹主动脉缺血再灌注对 SERCA 活性和 SERCA mRNA 表达的影响 ($n_i = 8; \bar{x} \pm s$)

分组	SERCA 活性 [($\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{prot} \cdot \text{h})$)]	SERCA mRNA
假手术组	4.07 \pm 0.23	1.33 \pm 0.19
I/R2h 组	3.89 \pm 0.24	1.25 \pm 0.09
I/R12h 组	3.36 \pm 0.18 **	1.17 \pm 0.21
I/R24h 组	2.90 \pm 0.15 **	0.93 \pm 0.08 **
I/R48h 组	2.77 \pm 0.17 **	0.85 \pm 0.05 **
<i>F</i>	68.84	17.65
<i>P</i>	<0.01	<0.01
<i>MS</i> 组内	0.0389	0.0194

q 检验:与假手术组比较 * $P < 0.01$

2.2 大鼠心肌组织 SERCA mRNA 表达的变化 每组大鼠心肌组织提取的总 RNA, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 为 1.8 ~ 2.0;使用 SERCA 特异性引物进行 RT-PCR,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,结果显示在 134 bp 处有核苷酸片段的表达。与预计扩增片段大小相符(见图 1)。



M:Marker;1:假处理组;2:I/R2h 组;3:I/R12h 组;4:I/R24h 组;5:I/R48h 组

图 1 再灌注不同时间段大鼠心肌 SERCA mRNA 表达检测结果

3 讨论

近年来,随着腹主动脉阻断术的开展逐年增加,再灌注后的损伤越来越引起人们的关注。Okutan 等^[5-6]通过对大鼠肾下腹主动脉缺血 0.5 h 后使血流恢复,发现再灌注可发生多器官功能损害。当肾下腹主动脉血流恢复后,大量氧分子随血液进入缺血组织,组织供氧和耗氧增加,机体产生大量自由基,引发细胞膜脂质过氧化,膜通透性增加,从而细胞外 Ca^{2+} 大量进入细胞内,造成 Ca^{2+} 稳态失衡^[7]。仓静等^[2]通过肾下腹主动脉阻断比较冠心病和非冠心病患者的血流动力学,发现阻断后两组患者的心率、平均动脉压和外周血管阻力均明显增加,心排量降低。曲度等^[1]指出动物肾下腹主动脉阻断时间在 25 min 为安全时限;在阻断安全时限内,血液动力学指标变化可被代偿和调整;如超出安全时限,则表现为再灌注损伤期的血液动力学变化,实验动物心血管系统、呼吸系统与中枢系统先后出现代

偿性功能不全和(或)衰竭。

本研究通过建立大鼠肾下腹主动脉阻断动物模型,检测再灌注不同时间点心肌 SERCA 的活性及其基因表达的变化,结果说明再灌注损伤与复灌的时间有关,提示随着再灌注时间的延长,大鼠心肌受损, SERCA 活性和 mRNA 表达降低。

Ca²⁺ 在维持心肌正常的舒缩功能中起重要作用。其中 SERCA 在 Ca²⁺ 周期性变化中起着关键性的作用。SERCA 是将 Ca²⁺ 转运并释放到细胞外的一种钙转运蛋白,当其功能发生障碍时,细胞 Ca²⁺ 转运能力下降引起 Ca²⁺ 平衡紊乱^[8]。实验^[9]证明,当心肌损伤时,由于能量代谢障碍导致心肌细胞内钙超载,心功能异常。Ca²⁺ 作为生物信息转导的胞内第二信使,当胞质的 Ca²⁺ 浓度升高时,可通过一系列的钙信号通路导致肌浆网功能受损, Ca²⁺ 调节能力下降^[10-11]。在成熟心肌细胞内 Ca²⁺ 调节中,肌浆网发挥着十分重要的作用。成熟心肌缺血-再灌注后,首先引起细胞内微环境变化,即细胞内酸中毒,这种变化抑制了 SERCA 活性,降低了肌浆网摄钙能力,心肌舒缩功能减退,久之细胞内发生钙超载,导致心肌细胞进一步损伤^[12]。

本研究结果显示,大鼠肾下腹主动脉阻断后再灌注可导致大鼠心肌损伤。SERCA 活性作为游离 Ca²⁺ 清除能力的指标,当 SERCA 功能改变时,其编码基因相应地转录表达;而 SERCA 活性又受其 mRNA 的调控,因此 SERCA mRNA 表达明显下降又将导致 SERCA 活性降低、钙超载,造成心肌损伤。随着血管外科理论及诊疗技术的发展,腹主动脉阻断术被广泛接受,但缺血再灌注引起的损伤将如何有效防治,是否可以在再灌注早期或是在 SERCA 活性未明显降低时给予干预,从而减轻缺血再灌注对心肌的损伤作用,值得进一步深入研究。

[参 考 文 献]

[1] 曲度,曲强,张弦,等.腹主动脉阻断术临床原理及其上中下

段安全时限探讨[J].海南医学,2009,20(1):1-13.

- [2] 仓静,马骑,薛张纲,等.腹主动脉阻断对冠心病病人血流动力学影响的临床观察[J].中国临床医学,2002,9(3):237-239.
- [3] Moneley D, Barry MC, Melaughlin R, et al. Preoperative treatment with recombinant human growth hormone prevents ischemia reperfusion-induced diaphragmatic dysfunction[J]. J Surg Res, 2001,97(1):81-84.
- [4] Atkinson J, Poitevin P, Chillon JM, et al. Vascular Ca overload produced by vitamin D3 plus nicotine diminishes arterial distensibility in rats[J]. Am J Physiol, 1994,266(2 Pt 2):H540-H547.
- [5] Okutan H, Savas C, Delibas N. The antioxidant effect of melatonin in lung injury after aortic occlusion-reperfusion[J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2004,3(3):519-522.
- [6] Shi E, Kazui T, Jiang X, et al. NS-7, a novel Na⁺/Ca²⁺ channel blocker, prevents neurologic injury after spinal cord ischemia in rabbits[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2005,129(2):364-371.
- [7] Kyriakides C, Austen WG Jr, Wang Y, et al. Neutrophil mediated remote organ injury after lower torso ischemia and reperfusion is selectin and complement dependent[J]. J Trauma, 2000,48(1):32-38.
- [8] Fukui K, Kaneda M, Takahashi E, et al. Protective effects of sulfhydryl compounds on HOCl-induced intracellular Ca²⁺ increase in single rat ventricular myocytes[J]. J Mol Cell Cardiol, 1994,26(4):455-461.
- [9] Temsah RM, Neticadan T, Chapman D, et al. Alterations in sarcoplasmic reticulum function and gene expression in ischemic-reperfused rat heart[J]. Am J Physiol, 1999,277(2 Pt 2):H584-H594.
- [10] 郑霞,孙坚,胡申江,等.缺血/再灌注心肌肌浆网肌钙调控蛋白 mRNA 表达的变化[J].中国应用生理学杂志,2006,22(2):142-146.
- [11] Zhou XY, Fan GC, Ren XP, et al. Over expression of histidine-rich Ca-binding protein protects against ischemia/reperfusion-induced cardiac injury[J]. Cardiovascular Research, 2007,75:487-497.
- [12] Matheme GP, Headriek JP, Ely SW, et al. Changes in work ratio to oxygen consumption ratio during hypoxia and ischemia in immature and mature rabbit hearts[J]. J Mol Cell Cardiol, 1992,24(12):1409-1421.

(上接第 111 页)及中央旁小叶的病变^[8],并且可以模拟手术以选择最佳的手术方案。同时三维重建对于肿瘤三维适形放疗也有很大的帮助,它可以重建出肿瘤区临床靶区危险器官的三维空间轮廓,并且可以任意方向旋转,帮助医生全视角观察靶区及相邻结构,设计最佳放疗计划,最大限度地杀伤肿瘤和保护正常组织^[9]。

[参 考 文 献]

- [1] 沈龙山,王震寰,张磊,等. Rolando 裂的三维重建与可视化[J].蚌埠医学院学报,2008,33(6):719-722.
- [2] 张绍祥,刘正津.数字化可视人体研究[J].第三军医大学学报,2003,25(7):561-562.
- [3] 李祥林.海马结构的磁共振图像分割方法[J].中国医学影像

技术,2002,18(2):189-190.

- [4] 段会龙,谭鸥,贾春光,等.利用图谱匹配分割标注 VHP 数据集[J].中国生物医学工程学报,2001,20(3):248-253.
- [5] 张季,王宜杰.医学图像三维重建方法的比较研究[J].医学信息,2006,19(6):948-950.
- [6] 王嵘,赵继宗,张懋植.神经导航辅助下结合脑沟入路手术治疗大脑中央区病变:附 40 例报告[J].北京医学,2005,27(5):260-262.
- [7] 张天一,廖达光,刘飞.顶叶入路显微手术切除左侧侧脑室三角区脑膜瘤[J].医学临床研究,2005,22(12):1673-1674.
- [8] Mikuni N, Hashimoto N. A minimally invasive transsulcal approach to the paracentral inner lesion[J]. Minim Invasive Neurosurg, 2006,49(5):291-295.
- [9] 王国民.肿瘤三维适形与束流强放射治疗学[M].上海:复旦大学出版社,2005:61-63.