

· 基础研究 ·

间歇运动对缺血再灌注损伤大鼠心肌蛋白激酶 C 表达的影响*

彭峰林^{1,2} 张林² 陈德权³ 任绮⁴ 邓树勋⁴

摘要

目的:探讨间歇运动对缺血再灌注(I/R)心肌中蛋白激酶 C(PKC)表达的影响,为运动预处理机制研究提供依据。

方法:将 32 只大鼠随机分成 4 组:间歇运动训练组、一次间歇运动组、对照组和假手术组。I/R 前,间歇运动训练组进行高强度间歇运动训练,一次间歇运动组仅进行一次高强度的间歇运动,对照组不运动。结扎大鼠左冠状动脉方法进行大鼠心肌缺血 30min,松开结扎线再灌注 40min。采用免疫组化方法和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测心肌细胞 PKC 的表达。

结果:间歇运动训练模型组、一次间歇运动模型组心肌 PKC 表达较对照模型组增强。

结论:间歇运动训练和一次间歇运动能激活 PKC,增强 PKC 在 I/R 心肌的表达,间歇运动对 I/R 心脏的保护作用通过 PKC 途径介导,前者的影响更为显著。

关键词 间歇运动;缺血再灌注损伤;蛋白激酶 C;信号转导

中图分类号:R87,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2010)-06-0544-04

The effect of interval exercises on expression of protein kinase C in rat's ischemia-reperfusion cardiac myocyte/PENG Fenglin,ZHANG Lin,CHEN Dequan,et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(6): 544—547

Abstract

Objective:To explore the effect and mechanism of interval exercises in protein kinase C (PKC) mediated cardioprotection against ischemia-reperfusion(I/R) injury in rats.

Method:Thirty-two rats were used and randomly divided into four groups: chronic interval exercises training group (CIE, n=8), acute interval exercises group (AIE, n=8), control group (C, n=8) and sham operated group (S, n=8). The rats in CIE group conducted high intensity interval exercises training for 7 weeks, the rats in AIE group conducted high intensity interval exercises training only one time. The others had no any exercises training. Myocardial I/R injury was induced by the occlusion of left anterior descending branch of coronary artery in vivo. After 30min ischemia and 40min reperfusion, suitable myocardium were taken to examine PKC by immunohistochemical means, examine PKCmRNA expression by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique.

Result:Expressions of PKC in CIE group and AIE group were significant higher than C group.

Conclusion:Chronic interval exercises training and once acute interval exercises can efficiently activate PKC and increase its' expression in I/R rats' myocardium. Cardioprotection against I/R injury induced by chronic interval exercises training and once acute interval exercises may be mediated by PKC signal pathway. The effect of chronic interval exercises training showed more significant effect.

Author's address School of Physical Education, Guangxi Normal University, Guilin, 541004

Key words interval exercises; ischemia reperfusion injury; protein kinase C; signal transduction

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.06.012

* 基金项目:广西教育厅科学研究项目、广西师范大学博士基金

1 广西师范大学体育学院,广西 桂林 541004; 2 苏州大学体育学院; 3 漳州师范学院体育系; 4 华南师范大学体育科学学院
作者简介:彭峰林,男,博士,副教授; 收稿日期:2009-06-12

目前对缺血预处理 (ischemia preconditioning, IPC) 机制的研究主要从下面 3 个基本环节入手: 触发物质、中介物质和效应物质。蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是重要的中介物质, 在缺血预处理中发挥关键的作用^[1]。我们的前期研究已经证实: 长期高强度间歇训练和一次高强度间歇运动都可以产生对缺血再灌注 (ischemic-reperfusion, I/R) 心肌的保护作用^[2]。为了进一步研究这种运动预处理的机制, 本研究采用相同的模型, 通过检测 I/R 心肌细胞中 PKC 表达的变化, 以期探讨 PKC 在间歇运动训练抗心肌 I/R 损伤中的作用, 以及研究运动预适应的信号转导机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验对象与分组

3 月龄清洁级雌性 SD 大鼠 32 只, 体重 180—220g, 由中山大学动物实验中心提供。控制室温和湿度, 动物自由饮食和进水。SD 大鼠被随机分成 4 组: 对照假手术组 (n=8), 对照模型组 (n=8), 间歇运动训练模型组 (n=8) 和一次间歇运动模型组 (n=8)。

1.2 运动训练方案

间歇运动训练组: 第 1 周为跑台运动适应阶段, 逐渐增加运动强度和时间, 但至第 1 周末时速度不超过 20m/min。第 2 周开始进行间歇运动训练: 16m/min 和 50m/min 各运动 2min, 坡度为 5°, 重复 10 次, 45min/d (包括 5min 热身运动), 每周训练 5d, 共训练 7 周。一次间歇运动组: 与间歇运动训练组同期饲养, 在间歇运动训练组最后一次训练时同时进行一次运动训练, 运动方案为 16m/min 和 50m/min 各运动 2min, 坡度为 5°, 重复 10 次, 45min (包括 5min 热身运动)。对照假手术组和对照模型常规饲养, 不进行运动。

1.3 在体心脏 I/R 损伤实验

对照模型组、间歇运动训练组和一次间歇运动组均进行心脏在体缺血再灌注实验。乌拉坦 (0.65g/kg) 腹腔麻醉后将动物固定于动物解剖台上, 气管插管, 连接动物呼吸机支持呼吸, 频率 70 次/min, 潮气量 8ml/次, 实时监测标准导联心电图。经胸骨左缘 2—4 肋开胸, 剪开心包, 暴露心脏及左室表面血管, 以左冠状动脉主干为标志, 在左心耳根部下方 2mm

处进针, 5/0 结扎线穿过心肌表层在肺动脉圆锥旁出针, 在结扎线两端分别套入丝线环作为再灌注拉线, 收紧结扎线以造成心肌缺血, 牵拉再灌注拉线使结扎线放松后即行再灌注, 以收紧结扎线后心电图 S-T 段抬高、放松结扎线后 S-T 段下降 1/2 以上为模型成功, 关闭胸腔。缺血 30min, 再灌注 40min。假手术组大鼠开胸穿线但不结扎冠状动脉, 其他操作同缺血再灌注组大鼠。

1.4 主要仪器与试剂

小动物呼吸机 (成都泰盟科技); BL-生物机制实验系统 (成都泰盟科技); 免疫组化实验系统 (Leica Co. Germany); 水平电泳仪 (CBS, Co. USA); PTC-200 智能型热循环仪 (MJ Research, Inc. USA); 超静工作台 (苏净); 全自动凝胶成像及分析系统 (SynGene GeneGenius, USA)。

试剂: Random Primer (PROMEGA Co, USA); MMLV 反转录酶 (PROMEGA Co, USA); RNasin (PROMEGA Co, USA); Taq 酶 (TaKaRa); Primer F 和 Primer R (上海英俊公司); DNA marker (上海申能博彩公司)。PKC 小鼠抗大鼠单克隆抗体 (武汉博士德公司), SABC 试剂盒 (武汉博士德公司), DAB 显色试剂盒 (武汉博士德公司), 其他化学试剂均为国产分析纯级试剂。

1.5 指标检测

1.5.1 免疫组织化学方法测定心肌组织 PKC I/R 实验 实验结束时取大鼠左心室壁, 放入 10% 福尔马林磷酸盐缓冲液中固定 48h, 石蜡包埋, 切片, 免疫组化染色, 染色步骤按 ABC 法常规进行, 第一抗体原液按 1:100 稀释, 光镜下观察免疫组化染色的显色反应, 心肌组织中出现黄染为阳性。阴性对照用 0.1M PBS 代替第一抗体, 结果为阴性。每张切片随机选取 4 个高倍视野 (400×) 的染色区域, 计算阳性细胞数, 用半定量计分。显微镜观察并进行了图像分析, 每张切片取 5 个视野, 每个视野记数 100 个细胞, 根据着色强度和阳性细胞数进行评分, 着色强度评分: 无着色 0 分, 淡棕黄色 1 分, 棕黄色 2 分, 棕褐色 3 分; 阳性细胞率评分: <20% 为 0 分, 20%—40% 为 1 分, 40%—60% 为 2 分, >60% 为 3 分。

1.5.2 RT-PCR 检测心肌细胞 PKC 的表达 提取 RNA 和纯度鉴定; 逆转录 (RT), 反应条件: 37°C

60min →95℃ 5min →-20℃保存;多聚酶链式反应(PCR),反应条件:94℃ 5min →94℃ 50s →58℃ 50s →72℃ 60s,扩增 32 个循环,最后于 72℃反应 10min。

引物:PKC (563bp):上游 5'-CCGCCTC-TACTTTGTGAT-3';下游 5'-CCTTGCGTTC-GAGTTTGT-3'。Beta Actin(207bp):上游 5'-CACC-CGCGAGTACAACCTTC-3';下游 5'-CCCATACC-CACCATCACACC-3'。

结果半定量:将电泳后的琼脂糖凝胶放入全自动凝胶成像及分析系统,测出光密度值,用 PKC mRNA 与 Beta Actin mRNA 比值作为半定量结果。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计软件进行统计学分析,计量资料均以平均数±标准差表示。组间比较采用方差分析及多组均数的两两比较。以 $P<0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 间歇运动预处理对 I/R 大鼠心肌组织 PKC 蛋白表达的影响

PKC 在假手术组中主要存在于胞浆,各 I/R 模型组在膜和胞核上也可见,I/R 激活 PKC 发生了转位;I/R 模型组较假手术组表达增强($P<0.01$),间歇运动训练模型组较对照模型组表达增强($P<0.01$),一次间歇运动模型组较对照模型组表达增强($P<0.05$)。见表 1 和图 1。

2.2 间歇运动预处理对 I/R 大鼠心肌组织 PKCmRNA 表达的影响

琼脂糖凝胶电泳结果如图 2,应用全自动凝胶成像及分析仪分析结果如下:各组大鼠心肌中均有 PKCmRNA 的表达,对照 I/R 模型组与假手术组间无明显差异($P>0.05$),间歇运动训练模型组表达明显高于对照 I/R 模型组($P<0.01$),一次间歇运动模型组表达也明显高于对照 I/R 模型组($P<0.05$)。结果显示:间歇运动预处理可促进 I/R 心肌组织 PKCmRNA 的表达。

3 讨论

PKC 广泛分布于多种组织、器官和细胞中。静

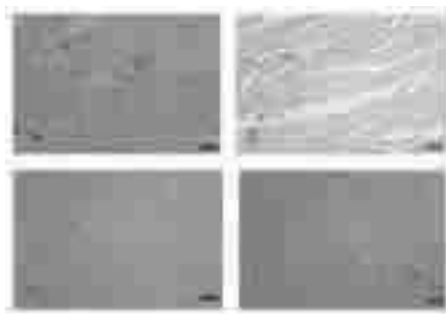
表 1 大鼠心肌组织中 PKC 表达评分值

组别	鼠数	评分值
对照假手术组	8	0.10±0.06
对照模型组	8	0.54±0.24 ^③
间歇训练模型组	8	1.42±0.52 ^②
一次运动模型组	8	1.17±0.49 ^①

与对照模型相比:① $P<0.05$, ② $P<0.01$;对照模型组与假手术组比:③ $P<0.01$ 。

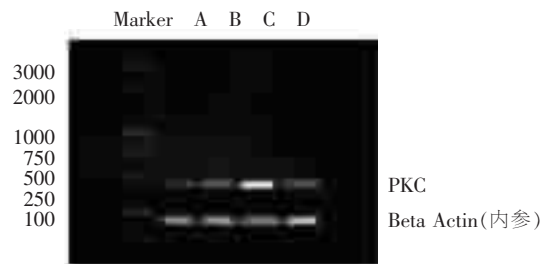
图 1 大鼠心肌 PKC 蛋白表达

(免疫组织化学方法,×400)

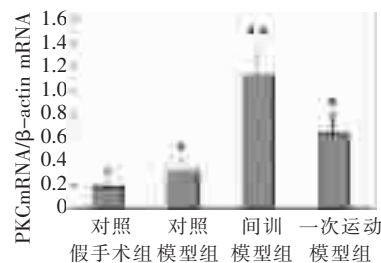


A:对照假手术组,B:对照模型组,C:间歇运动训练模型组,D:一次间歇运动模型组

图 2 大鼠心肌组织中 PKC mRNA 的表达



A:对照假手术组;B:对照模型组;C:间歇运动训练模型组;D:一次间歇运动模型组



与对照模型比较:▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$;与假手术组比较:# $P<0.05$

息细胞中的 PKC 主要存在于胞浆中,通常以钝化形式存在,细胞内的甘油二酯(DAG)浓度不足以活化 PKC。当心肌细胞受外界信号刺激后,通过磷脂酶-C(phospholipase C,PLC)和磷脂酶 D(phospholipase D,PLD)^[3]途径使胞内 DAG 浓度持续升高。另外磷脂酶 A2(phospholipase A2, PLA2)水解磷酸酰胆碱产生脂

肪酸(FFA)和溶血磷脂酸胆碱(Lyso PC),FFA如亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸等能增强 DAG 对 PKC 的激活作用,Lyso PC 也能协同 DAG 与 PKC 相互作用而增强细胞的效应。

研究表明,心肌缺血预处理中 PKC 的激活对心肌保护发挥了关键作用,PKC 的激活是缺血预处理所共有的细胞内机制。Liu 等^[4]首次在家兔 IPC 模型上证实了 PKC 的作用。他们在整体动物上观察到 PKC 抑制剂 Staurosporine 或多黏菌素 B 均能阻断 IPC 的缩小心肌梗死范围作用,而在离体动物模型上用 PKC 激动剂 PMA 或 OAG 可模拟出 IPC 效应。Speechly-Dick 等^[5]于在体大鼠模型上发现,用 PKC 激动剂 DOG 预处理可出现心肌保护作用,IPC 的心肌保护作用可被特异性 PKC 抑制剂 Chelerythrine 所阻断。由于 PKC 是细胞内普遍存在的信息传导物质,因此可能在 IPC 机制中起着共同通道作用。应用药物破坏心肌细胞的微管结构,阻断 PKC 在细胞内的移位,则消除了 IPC 对心肌的保护作用,表明 IPC 的心肌保护作用涉及细胞内 PKC 的移位。

本课题组的前期研究显示,高强度间歇运动训练和一次高强度间歇运动 24h 后都可以减少缺血 30min、再灌注 40min 后心肌的损伤程度,即高强度间歇运动训练和一次高强度间歇运动都产生了延迟性 IPC 效应^[2]。本实验采用 RT-PCR 技术检测心肌组织中 PKCmRNA 的表达,结果显示 PKCmRNA 在对照假手术组大鼠心肌组织中表达较弱,而对照缺血再灌注模型组大鼠心肌中 PKCmRNA 表达增加,间歇运动训练和一次间歇运动组大鼠心肌组织中 PKCmRNA 的表达明显高于 I/R 组。免疫组化结果基本相同,而且发现 PKC 在假手术组中主要存在细胞质中,而对照模型组、间歇运动训练模型组和一次间歇运动模型组在细胞膜和细胞核部位也能发现。实验结果说明间歇运动训练和一次间歇运动促进了 PKC 的表达,激活 PKC 并发生了转位,因而可以推测间歇运动训练和一次间歇运动对心脏缺血的保护是通过激活 PKC 途径而起作用。

已有研究发现运动引起延迟性心脏保护作用中伴有 PKC 激活。运动引起心肌 PKC 的适应性变化与 IPC 和热应激中 PKC 的变化一致^[6]。间歇运动训练和一次间歇运动引起 I/R 心肌中 PKCmRNA 和

PKC 蛋白表达增加的可能机制为:运动引起了心肌组织的相对缺氧,而心肌组织的缺氧成为最初的适应触发因子。缺氧引起心肌合成并释放肾上腺素、缓激肽、腺苷和内源性阿片肽等,这些物质与受体结合后再与七次跨膜 G 蛋白偶联,进而激活抑制性 G 蛋白(Gi),激活的 Gi 使腺苷酸环化酶活性下降,减少了细胞膜上有效 Ca²⁺通道数量,Ca²⁺内流减少,心肌收缩力降低。同时内源性物质与受体结合后,还可激活另一种 G 蛋白(Gq),Gq 可激活 PLC 的膜效应器酶,PLC 使 PIP₂ 分解生成 IP₃、DG 和 DAG,进而激活 PKC,引起延迟性心脏保护作用^[7]。去甲肾上腺素、阿片肽也部分来自心肌中神经元的运动反应,活性氧也可激活 PKC,而且不依赖于 G 蛋白^[8]。间歇运动训练和一次间歇运动激活 PKC 后,PKC 能活化心肌的 5'-核苷酸酶,该酶促进心肌细胞合成和释放腺苷到心肌间质,通过激活腺苷受体,使预适应期间持续释放内源性腺苷,发挥保护心肌的作用。

参考文献

- [1] Mitchell MB, Meng X, Ao L, et al. Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C [J]. *Circ Res*, 1995,76(1):73—81.
- [2] 彭峰林,陈建文,任绮. 间歇运动训练对心脏缺血再灌注损伤大鼠心肌抗氧化酶的影响[J]. *中国运动医学杂志*.2008,27(1):97—99.
- [3] Eskildsen-Helmond YE, Van Heugten HA, et al. Regulation and functional significance of phospholipase D in myocardium [J]. *Mol Cell Biochem*,1996,157(1-2):39—48.
- [4] Liu Y, Ytrehus K, Downey JM. Evidence that translocation of protein kinase C is a key event during ischemic preconditioning of rabbit myocardium [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1994,26(5):661—668.
- [5] Speechly-Dick ME, Mocanu MM, Yellon DM. Protein kinase C. Its role in ischaemic preconditioning in the rat [J]. *Circ Res*, 1994,75(3): 586—590.
- [6] Qiu Y, Ping P, Tang XL, et al. Direct evidence that protein kinase C plays an essential role in the development of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits and that is the isoform involved [J]. *J Clin Invest*, 1998,101(10):2182—2198.
- [7] Critz SD, Cohen MV, Downey JM. Mechanisms of acetylcholine- and bradykinin-induced preconditioning [J]. *Vascular Pharmacology*,2005,42(5—6):201—209.
- [8] Yamashita N, Baxter GF, Yellon DM, et al. Exercise directly enhances myocardial tolerance to ischaemia-reperfusion injury in the rat through a protein kinase C mediated mechanism[J]. *Heart*,2001,85(3):331—336.