

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.26.005
文章编号: 1005-8982 (2018) 26-0030-08

小窝蛋白-3/RISK 介导 HBO-PC 对 心肌的保护作用研究*

袁利邦, 殷亮, 秦福恩, 刘洪, 查鹏, 付海钰, 巩固

(成都军区总医院 麻醉科, 四川 成都 610083)

摘要: 目的 探究高压氧预处理 (HBO-PC) 减轻心肌缺血再灌注 (I/R) 损伤的具体分子机制。**方法** 对心肌细胞予以 HBO-PC 处理, 并复制缺氧复氧 (H/R) 模型, 用试剂盒测定丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、乳酸脱氢酶 (LDH) 及一氧化氮 NO 的含量, Western blot 检测促/抗凋亡蛋白、蛋白激酶 C ϵ (PKC ϵ)、小窝蛋白-3 (Cav-3)、再灌注损伤挽救激酶 (RISK) 通路中蛋白及其磷酸化水平的变化, 免疫共沉淀和免疫荧光染色检测 PKC ϵ 与 Cav-3 的结合; 同时使用 PKC 抑制剂 Chelerythrine (CHE) 和 RISK 通路抑制剂进一步验证 HBO-PC 对心肌细胞 I/R 损伤的作用机制。**结果** H/R 模型模拟 I/R 损伤过程。HBO-PC 降低 MDA 和 LDH 含量、Caspase-3 活性和 Bax 的表达, 增加 SOD 和 NO 含量、Bcl-2 表达, 抑制心肌细胞凋亡, 减轻 I/R 损伤。同时, HBO-PC 促进 PKC ϵ 活化及其与 Cav-3 的结合, 增加 Cav-3 蛋白表达, 以及 RISK 通路中胞外信号调节激酶 (ERK) 1/2、蛋白激酶 B (Akt)、磷脂酰肌醇 3-羟激酶 (PI3K) 和下游效应激酶糖原合酶激酶 (GSK) 3 β 的磷酸化水平; CHE 能够抑制 HBO-PC 的作用。RISK 通路抑制剂增加 Caspase-3 活性和 Bax 表达, 减少 Bcl-2 表达, 阻断 HBO-PC 对心肌细胞凋亡的拮抗作用。**结论** HBO-PC 可能通过调控 PKC ϵ /Cav-3/RISK 通路, 抑制心肌细胞凋亡, 抵抗心肌 I/R 损伤, 发挥心肌保护作用。

关键词: 高压氧预处理; 心肌缺血再灌注损伤; 小窝蛋白-3; 蛋白激酶 C; 再灌注损伤挽救激酶通路
中图分类号: R654.2 **文献标识码:** A

Hyperbaric oxygen preconditioning exerts myocardial protection through caveolin-3/RISK pathway*

Li-bang Yuan, Liang Yin, Fu-en Qin, Hong Liu, Peng Zha, Hai-yu Fu, Gu Gong
(Department of Anesthesiology, General Hospital of Chengdu Military Region of PLA,
Chengdu, Sichuan 610083, China)

Abstract: Objective To investigate the specific molecular mechanism of hyperbaric oxygen preconditioning (HBO-PC) on myocardial ischemia-reperfusion (IR) injury. **Methods** HBO-PC and hypoxia-reoxygenation (HR) models were performed in cardiomyocytes. Commercial kits were used to analyze the content of MDA, SOD, LDH, and NO. Western blot was used to detect the expressions of pro-/anti-apoptotic proteins, and the levels of protein kinase C ϵ (PKC ϵ), caveolin (Cav)-3 and reperfusion injury salvage kinase (RISK) pathway related proteins. The combination of PKC ϵ and Cav-3 was determined by co-immunoprecipitation and immunofluorescence staining. At the same time, cardiomyocytes were treated with the inhibitors of PKC (Chelerythrine, CHE) and RISK pathway to confirm the mechanism of HBO-PC on myocardial IR injury. **Results** The HR model mimicked the process of IR injury. HBO-PC decreased the levels of MDA and LDH, caspase-3 activity and Bax expression, and increased the

收稿日期: 2018-02-03

* 基金项目: 2016 年度军队后勤科研计划 (No: CCD16J001)

[通信作者] 巩固, E-mail: gugongcd@163.com

levels of SOD, NO and Bcl-2, which suggested that HBO-PC dampened myocardial cell apoptosis and IR injury. In addition, HBO-PC promoted the binding of PKC ϵ to Cav-3 and up-regulated the levels of Cav-3, p-ERK1/2, p-Akt, p-PI3K and p-GSK3 β ; while CHE inhibited the effect of HBO-PC. RISK pathway inhibitors increased caspase-3 activity and Bax expression, reduced Bcl-2 expression, which showed RISK inhibitors attenuated the effect of HBO-PC on myocardial cell apoptosis. **Conclusions** HBO-PC may protect the heart from myocardial IR injury through regulating PKC ϵ /Cav-3/RISK pathway and subsequently inhibiting myocardial cell apoptosis.

Keywords: hyperbaric oxygen preconditioning; myocardial ischemia-reperfusion injury; caveolin-3; protein kinase C; reperfusion injury salvage kinase pathway

缺血再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 损伤是多因素、多途径参与的病理生理过程。研究发现, 高压氧预处理 (hyperbaric oxygen preconditioning, HBO-PC) 可通过提高机体抗氧化损伤能力^[1]、调控血管生长因子^[2]和血红素氧化酶^[3]的表达, 减轻心肌 I/R 损伤。心肌的细胞膜小窝蛋白-3 (Caveolin-3, Cav-3)^[4]可通过影响下游再灌注损伤挽救激酶 (reperfusion injury salvage kinase, RISK) 通路, 保护心肌^[5]。但 Cav-3/RISK 是否介导 HBO-PC 的心肌保护作用尚无报道。本文复制 H9c2 心肌细胞缺氧复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 模型, 旨在探讨 HBO-PC 保护心肌的具体作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

1.1.1 细胞及试剂 H9c2 心肌细胞 (中国科学院上海细胞库), DMEM 培养基和胎牛血清 (fetal calf serum, FBS) 购自美国 Hyclone 公司, 丙二醛 (Malonaldehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒购自美国 Sigma 公司, 一氧化氮 NO 测定试剂盒 (上海恒远生物有限公司), Protein A/G Plus-Agarose、蛋白激酶 C (protein kinase, PKC) 抑制剂 Chelerythrine (CHE)、RISK 通路激酶抑制剂 LY294002 和 PD98059 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。

1.1.2 抗体 兔单抗 Caspase-3 (1 : 1 000)、兔单抗 Cleaved caspase-3 (1 : 500)、兔单抗胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinases, ERK) 1/2 (1 : 1 000)、兔单抗 p-ERK1/2 (1 : 500)、兔单抗磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) (1 : 1 000)、兔多抗 p-PI3K (1 : 500)、兔单抗蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) (1 : 1 000)、兔单抗 p-Akt (1 : 1 000)、鼠单抗糖原合酶激酶 (glycogen synthase kinase, GSK) 3 β (1 : 1 000)、兔

单抗 p-GSK-3 β (1 : 500) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司, 兔多抗 Bcl-2 (1 : 500)、兔单抗 PKC ϵ (1 : 1 000) 及兔多抗 Cav-3 (1 : 500) 购自美国 Abcam 公司, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔和山羊抗鼠 IgG 购自北京中山金桥生物技术有限公司。

1.1.3 仪器 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), Sorvall Stratos 型高速冷冻离心机、Heracell 150I 型细胞培养箱购自美国 Thermo Scientific 公司, Synergy HT 型酶标仪 (美国 BioTek 公司), YLC0.5/1A 型婴儿 HBO 舱 (武汉中国船舶重工集团公司第 701 研究所), 共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司)。

1.2 细胞培养及分组

37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳 CO₂ 条件下, 用 DMEM 完全培养液培养 H9c2 心肌细胞, 选用对数生长期的细胞进行实验。实验设计主要分 2 部分: ①探究 HBO-PC 对心肌 I/R 损伤的作用, 将细胞分为正常培养的对照组、H/R 组及 HBO-PC+H/R 组; ②探讨 HBO-PC 对心肌 I/R 损伤的作用机制, 将细胞分为正常培养的对照组、H/R 组、HBO-PC+H/R 组及 HBO-PC+H/R+ 激酶抑制剂组。HBO-PC 条件: 纯氧洗舱 10 min, 0.28 MPa 稳压 1 h, 加压和减压过程控制至 5 min。HBO-PC 后 2 h 开始复制 H/R 模型。CHE、LY294002 及 PD98059 作用于心肌细胞的终浓度分别为 1、40 和 25 μ mol/L。

1.3 H/R 模型的复制

培养心肌细胞至融合度为 80% ~ 90%, 将完全培养液换成无糖 Tyrode's 溶液, 持续通入含 95% 氮气 N₂ 和 5% CO₂ 的混合气体, 形成密闭缺氧空间, 以模拟缺血。4 h 后换含糖 Tyrode's 溶液, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 2 h, 该过程为复氧, 以模拟再灌注。复制 H/R 模型后换成 DMEM 完全培养液进行正常培养, 或者加入激酶抑制剂作用心肌细胞, 24 h 后收集细胞或者培养液进行后续检测。

1.4 收集富含 Cav-3 的膜片段

按照文献 [6] 的方法, 收集各组心肌细胞, 加入

2 ml 0.5 mol/L Na_2CO_3 溶液 (pH 11.0) 重悬并匀浆。向匀浆液中加入 2 ml 90% 蔗糖溶液, 一起转移至超速离心管中, 加入 4 ml 35% 蔗糖溶液和 4 ml 5% 蔗糖溶液, 10 000 r/min 离心 18 ~ 20 h, 用样品管从上向下梯度收集液体, 1 ml/管, 共 12 管, 其中 4 ~ 6 ml 部分为富含小窝蛋白的部分。2 000 r/min 离心 2 h 收集该部分沉淀, 加入蛋白裂解液, 超声裂解后所得蛋白样品进行 Western blot 检测。

1.5 免疫共沉淀

各组心肌细胞裂解后离心取上清, 进行蛋白定量。取 500 μg 蛋白样品与 2 μg 兔多抗 Cav-3 一抗混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 加入 20 μl Protein A/G Plus-Agarose, 4 $^{\circ}\text{C}$ 震荡过夜。离心收集沉淀, PBS 洗涤 4 次, 加入 1 \times SDS 样品缓冲液重悬, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, Western blot 检测 PKC ϵ 的含量。

1.6 免疫荧光染色

心肌细胞经爬片、4% 多聚甲醛固定和 0.1% Triton X-100 透化后, 加入 10% 羊血清常温孵育 30 min, PBS 洗涤后加入一抗孵育, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS 充分洗涤后加入带有荧光标记的二抗, 避光常温孵育 2 h, PBS 充分洗涤后用 95% 甘油封片, 共聚焦显微镜观察拍照。

1.7 SOD、MDA、LDH 和 NO 的检测

收集细胞和培养液, 将细胞裂解后离心取上清, 按照 SOD、MDA、LDH 和 NO 检测试剂盒说明书进行操作, 根据测定结果计算各组细胞内 SOD 和 MDA、以及细胞培养液中 LDH 和 NO 的含量。

1.8 Western blot 检测

由心肌细胞提取的蛋白经 10% SDS-PAGE 分离后, 电转至硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂奶粉常温封闭 1 h, 加入兔单抗 Caspase-3、Cleaved caspase-3、PKC ϵ 、ERK1/2、Akt、PI3K、p-ERK1/2、p-Akt、p-GSK-3 β , 鼠单抗 GSK-3 β , 兔多抗 p-PI3K、Bcl-2、

Cav-3, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBST 洗膜后加入 HRP 标记的兔抗大鼠 IgG (1 : 5 000), 常温孵育 2 h, PBST 洗膜, 进行 ECL 反应, 分析蛋白条带。

1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析, 两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HBO-PC 减轻心肌 I/R 损伤

2.1.1 3 组 SOD、MDA、LDH、NO 的含量变化 对 H9c2 细胞予以 HBO-PC 处理, 复制 H/R 模型 24 h 后, 对照组、H/R 组、HBO-PC+H/R 组的 SOD、MDA、LDH、NO 含量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验, H/R 组与对照组的 MDA、LDH、SOD 和 NO 含量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 H/R 升高 MDA 和 LDH 含量, 降低 SOD 和 NO 含量; HBO-PC+H/R 组与 H/R 组的 MDA、LDH、SOD 和 NO 含量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 HBO-PC+H/R 组 MDA 和 LDH 含量低于 H/R 组, SOD 和 NO 含量高于 H/R 组。见表 1。

2.1.2 3 组 Caspase-3 活性、Bax 和 Bcl-2 蛋白相对表达量比较 对照组、H/R 组、HBO-PC+H/R 组 H9c2 细胞中 Caspase-3 活性、Bax 和 Bcl-2 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验, H/R 组与对照组的 Caspase-3 活性、Bax 和 Bcl-2 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 H/R 可增强 Caspase-3 活性, 增加 Bax 蛋白表达, 减少 Bcl-2 蛋白表达; HBO-PC+H/R 组与 H/R 组的 Caspase-3 活性、Bax 和 Bcl-2 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 HBO-PC 减弱 Caspase-3 活性, 减少 Bax 表达, 增加 Bcl-2 表达。见表 2 和图 1、2。

表 1 3 组 SOD、MDA、LDH、NO 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

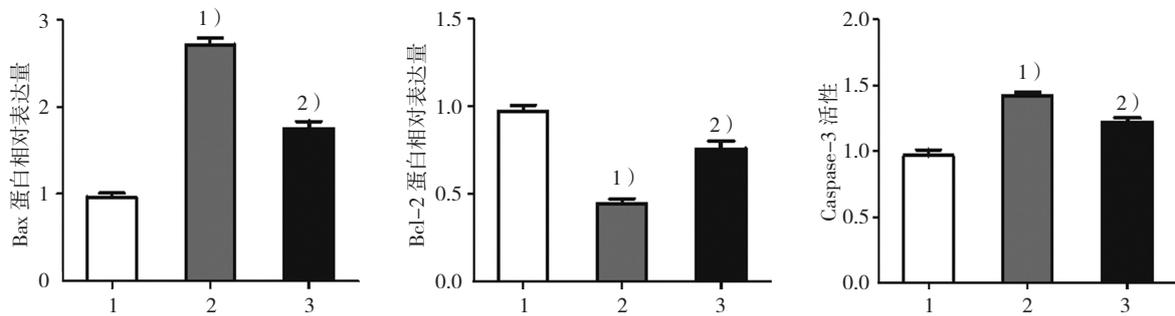
组别	SOD/ (u/ml)	MDA/ ($\mu\text{mol/L}$)	LDH/ (u/L)	NO/ ($\mu\text{mol/L}$)
对照组	210.12 \pm 15.33	1.02 \pm 0.41	50.60 \pm 2.31	4.35 \pm 0.36
H/R 组	113.58 \pm 12.47 ¹⁾	2.84 \pm 0.18 ¹⁾	124.05 \pm 3.15 ¹⁾	2.27 \pm 0.12 ¹⁾
HBO-PC+H/R 组	175.66 \pm 10.29 ²⁾	1.91 \pm 0.32 ²⁾	78.75 \pm 3.46 ²⁾	3.61 \pm 0.25 ²⁾
F 值	43.400	24.160	453.900	48.45
P 值	0.000	0.001	0.000	0.000

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 H/R 组比较, $P < 0.05$

表 2 3 组 Caspase-3 活性、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Caspase-3 活性	Bax 蛋白	Bcl-2 蛋白
对照组	0.967 ± 0.076	0.958 ± 0.081	0.970 ± 0.062
H/R 组	1.423 ± 0.045 ¹⁾	2.713 ± 0.134 ¹⁾	0.443 ± 0.051 ¹⁾
HBO-PC+H/R 组	1.220 ± 0.557 ²⁾	1.743 ± 0.155 ²⁾	0.757 ± 0.078 ²⁾
F 值	143.900	50.260	42.960
P 值	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 H/R 组比较, $P < 0.05$



1: 对照组; 2: H/R 组; 3: HBO-PC+H/R 组。1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 H/R 组比较, $P < 0.05$

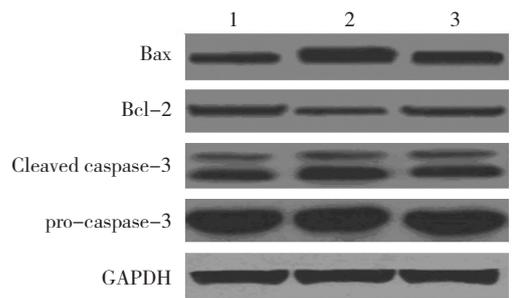
图 2 HBO-PC 对 H/R 处理后 H9c2 细胞 Caspase-3 活性、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

2.2 HBO-PC 促进 PKC ϵ 与 Cav-3 结合

对照组、H/R 组、HBO-PC+H/R 组、HBO-PC+H/R+CHE 组的 PKC ϵ 相对表达量比较, 经方差分析, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。4 组 Cav-3、PKC ϵ 与 Cav-3 结合的相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验, H/R 组与对照组的 PKC ϵ 与 Cav-3 结合、Cav-3 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 H/R 增加 PKC ϵ 与 Cav-3 的结合, 下调 Cav-3 的表达; HBO-PC+H/R 组与 H/R 组的 PKC ϵ 与 Cav-3 结合、Cav-3 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 HBO-PC 进一步增加 PKC ϵ 与 Cav-3 的结合, 上调 Cav-3 的表达; HBO-PC+H/R+CHE 组与 HBO-PC+H/R 组的 PKC ϵ 与 Cav-3 结合相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); HBO-PC+H/R+CHE 组与 HBO-PC+H/R 组的 Cav-3 相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示 CHE 抑制 PKC ϵ 与 Cav-3 的结合, 不影响 Cav-3 的表达。见表 3 和图 3 ~ 5。

2.3 HBO-PC 激活 RISK 通路

对照组、H/R 组、HBO-PC+H/R 组、HBO-PC+



1: 对照组; 2: H/R 组; 3: HBO-PC+H/R 组

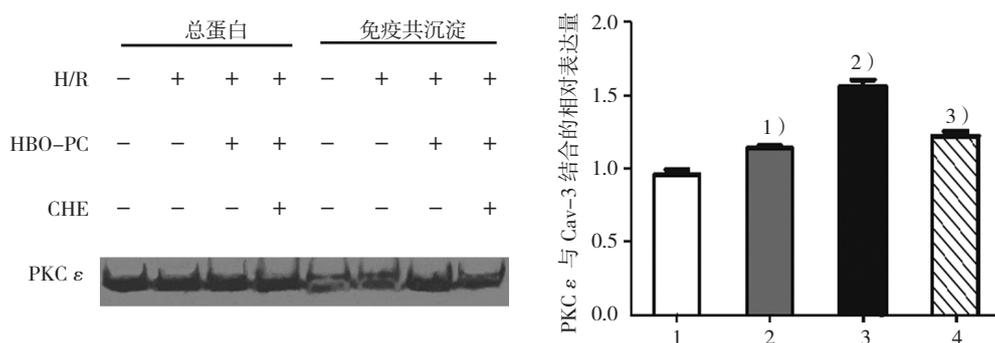
图 1 3 组 Bax、Bcl-2、Cleaved caspase-3、pro-caspase-3 蛋白的表达

H/R+CHE 组的 (p -ERK1/2) / (ERK1/2)、 p -Akt/Akt、 p -PI3K/PI3K 及 p -GSK3 β /GSK3 β 比值比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验, H/R 组 (p -ERK1/2) / (ERK1/2)、 p -Akt/Akt、 p -PI3K/PI3K 及 p -GSK3 β /GSK3 β 比值高于对照组 ($P < 0.05$); HBO-PC 组 (p -ERK1/2) / (ERK1/2)、 p -Akt/Akt、 p -PI3K/PI3K 及 p -GSK3 β /GSK3 β 比值高于 H/R 组 ($P < 0.05$);

表 3 4 组 PKC ϵ 、Cav-3 及 PKC ϵ 与 Cav-3 结合的表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

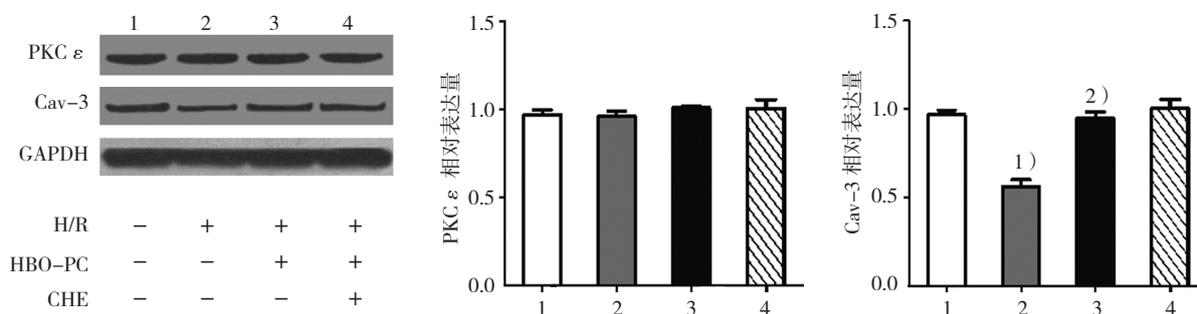
组别	PKC ϵ	Cav-3	PKC ϵ 与 Cav-3 结合
对照组	0.970 ± 0.044	0.973 ± 0.041	0.957 ± 0.060
H/R 组	0.960 ± 0.046	0.563 ± 0.065 ¹⁾	1.137 ± 0.032 ¹⁾
HBO-PC+H/R 组	1.007 ± 0.021	0.950 ± 0.062 ²⁾	1.560 ± 0.075 ²⁾
HBO-PC+H/R+CHE 组	1.003 ± 0.087	1.003 ± 0.087	1.220 ± 0.056 ³⁾
F 值	0.549	29.030	56.990
P 值	0.663	0.000	0.000

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 H/R 组比较, $P < 0.05$; 3) 与 HBO-PC+H/R 组比较, $P < 0.05$



1: 对照组; 2: H/R 组; 3: HBO-PC+H/R 组; 4: HBO-PC+H/R+CHE 组。1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 H/R 组比较, $P < 0.05$; 3) 与 HBO-PC+H/R 组比较, $P < 0.05$

图 3 HBO-PC 促进 PKC ε 与 Cav-3 的结合 (免疫共沉淀)



1: 对照组; 2: H/R 组; 3: HBO-PC+H/R 组; 4: HBO-PC+H/R+CHE 组。1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 H/R 组比较, $P < 0.05$

图 4 各组 PKC ε、Cav-3 的表达比较 (Western blot 检测)

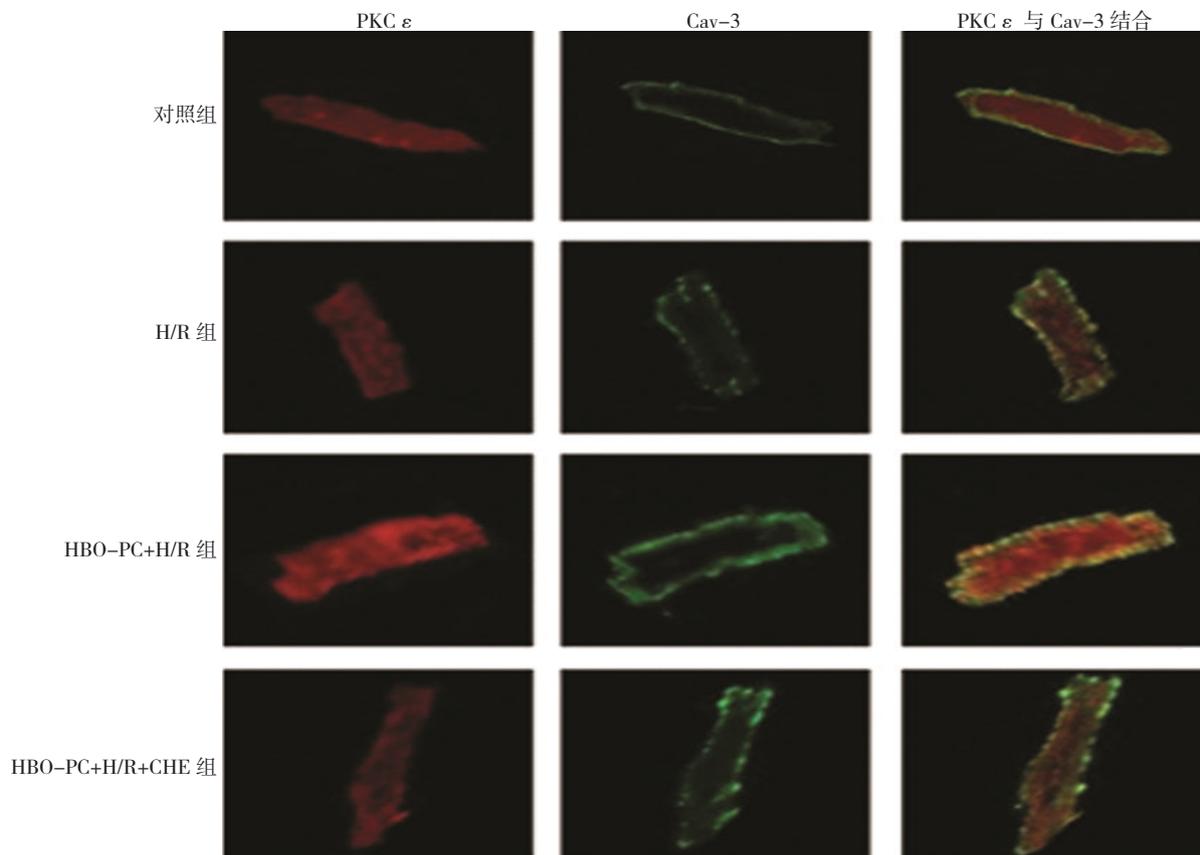


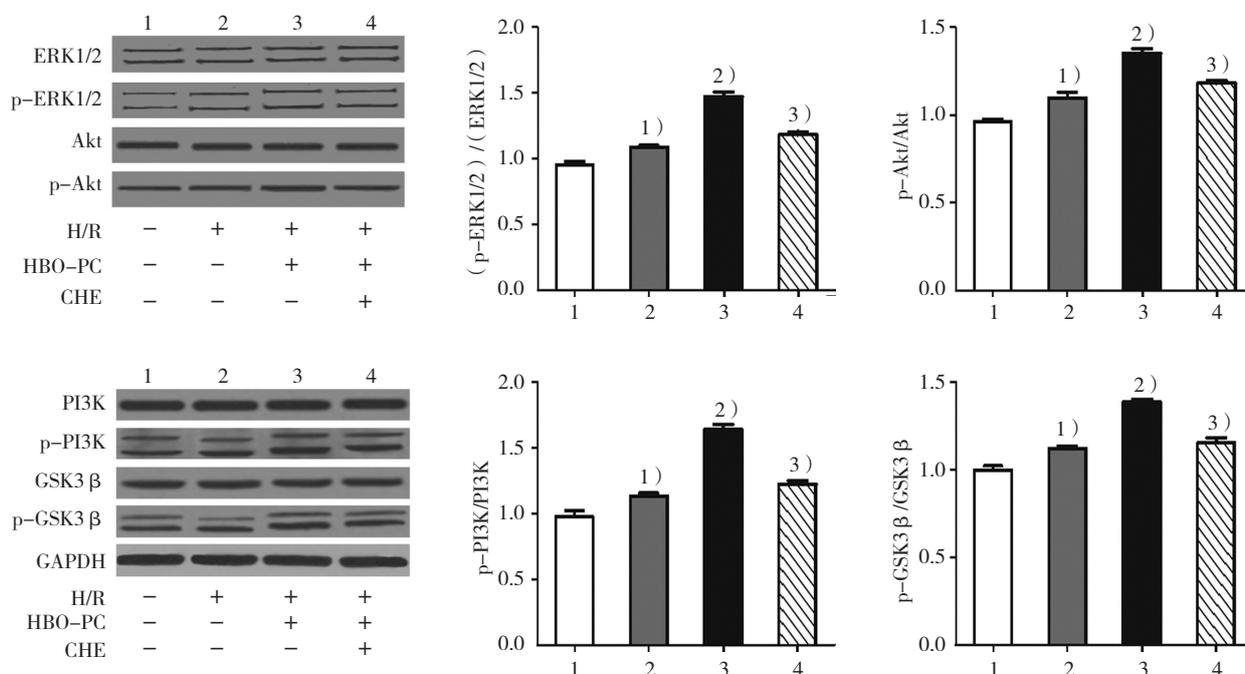
图 5 HBO-PC 促进 PKC ε 与 Cav-3 的结合 (免疫荧光染色 × 100)

HBO-PC+H/R+CHE 组 (p-ERK1/2) / (ERK1/2)、p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K 及 p-GSK3β /GSK3β 比值低于 HBO-PC+H/R 组 (P < 0.05)。见表 4 和图 6。

表 4 4 组 (p-ERK1/2) / (ERK1/2)、p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K 及 p-GSK3β /GSK3β 比值比较 (x̄ ± s)

组别	(p-ERK1/2) / (ERK1/2)	p-Akt/Akt	p-PI3K/PI3K	p-GSK3β /GSK3β
对照组	0.950 ± 0.050	0.963 ± 0.023	0.977 ± 0.071	0.997 ± 0.040
H/R 组	1.083 ± 0.029 ¹⁾	1.097 ± 0.055 ¹⁾	1.133 ± 0.035 ¹⁾	1.117 ± 0.029 ¹⁾
HBO-PC+H/R 组	1.470 ± 0.066 ²⁾	1.350 ± 0.046 ²⁾	1.637 ± 0.065 ²⁾	1.383 ± 0.031 ²⁾
HBO-PC+H/R+CHE 组	1.180 ± 0.046 ³⁾	1.180 ± 0.026 ³⁾	1.220 ± 0.050 ³⁾	1.150 ± 0.050 ³⁾
F 值	60.000	49.360	73.370	53.240
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与对照组比较, P < 0.05; 2) 与 H/R 组比较, P < 0.05; 3) 与 HBO-PC+H/R 组比较, P < 0.05



1: 对照组; 2: H/R 组; 3: HBO-PC+H/R 组; 4: HBO-PC+H/R+CHE 组。1) 与对照组比较, P < 0.05; 2) 与 H/R 组比较, P < 0.05; 3) 与 HBO-PC+H/R 组比较, P < 0.05

图 6 HBO-PC 对 RISK 通路的影响

2.4 RISK 通路抑制剂减弱高压氧对心肌细胞 I/R 损伤的保护作用

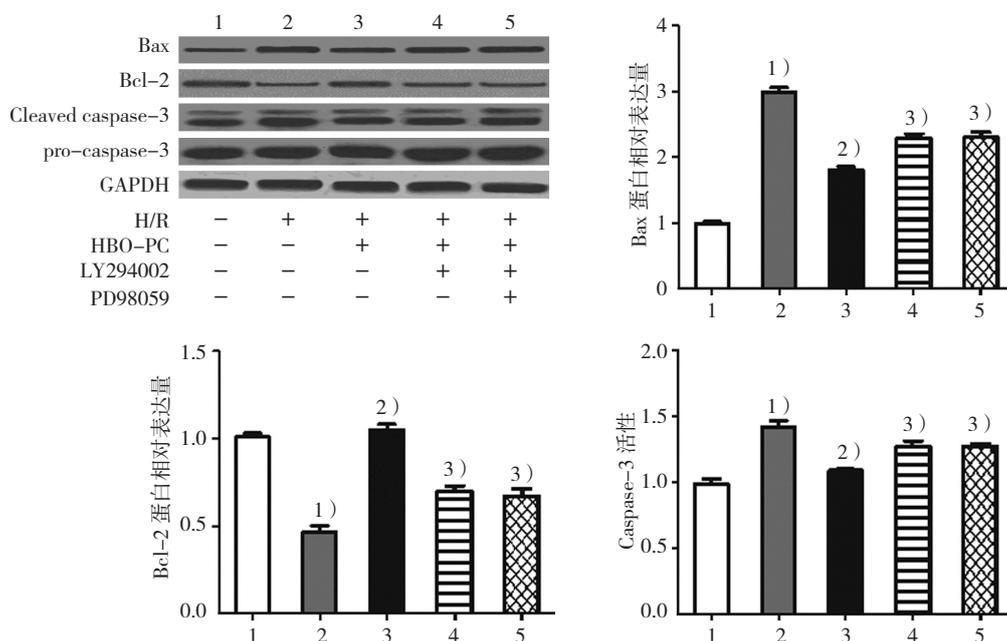
对照组、H/R 组、HBO-PC+H/R 组、HBO-PC+H/R+LY294002 组、HBO-PC+H/R+PD98059 组的 Caspase-3 活性、Bax 和 Bcl-2 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。进一步两两比较经 LSD-t 检验, HBO-PC+H/R+LY294002 组与 HBO-PC+H/R 组的 Caspase-3 活

性、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 提示 LY294002 增强 Caspase-3 活性, 增加 Bax 表达, 减少 Bcl-2 表达; HBO-PC+H/R+PD98059 组与 HBO-PC+H/R 组的 Caspase-3 活性、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 提示 PD98059 增强 Caspase-3 活性, 上调 Bax 表达, 下调 Bcl-2 表达。见表 5 和图 7。

表 5 5 组 Caspase-3 活性、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Caspase-3 活性	Bax 蛋白	Bcl-2 蛋白
对照组	0.990 ± 0.060	0.996 ± 0.050	1.010 ± 0.036
H/R 组	1.420 ± 0.080 ¹⁾	3.000 ± 0.100 ¹⁾	0.467 ± 0.061 ¹⁾
HBO-PC+H/R 组	1.090 ± 0.017 ²⁾	1.813 ± 0.080 ²⁾	1.050 ± 0.056 ²⁾
HBO-PC+H/R+LY294002 组	1.273 ± 0.067 ³⁾	2.300 ± 0.100 ³⁾	0.700 ± 0.050 ³⁾
HBO-PC+H/R+PD98059 组	1.271 ± 0.035 ³⁾	2.303 ± 0.142 ³⁾	0.673 ± 0.070 ³⁾
F 值	166.900	58.240	26.990
P 值	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 H/R 组比较, $P < 0.05$; 3) 与 HBO-PC+H/R 组比较, $P < 0.05$



1: 对照组; 2: H/R 组; 3: HBO-PC+H/R 组; 4: HBO-PC+H/R+LY294002 组; 5: HBO-PC+H/R+PD98059 组。1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 H/R 组比较, $P < 0.05$; 3) 与 HBO-PC+H/R 组比较, $P < 0.05$

图 7 RISK 通路抑制剂对 H9c2 细胞凋亡的影响

3 讨论

I/R 诱发的心肌细胞功能异常和细胞死亡是心脏病患者发病率和死亡率增加的主要原因, 发生机制主要与能量代谢障碍、钙超载、线粒体损伤、细胞自噬和炎症等有关^[7]。药物和缺血的预处理与后处理是临床研究中比较重要的心肌保护策略。高压氧自身具有抗氧化功能, 可以抑制氧化损伤, 是一氧化碳中毒、减压病和动脉栓塞症的基础治疗方法, 也是创伤愈合和缺血性损伤等疾病的辅助治疗手段^[2]。最近研究发现, HBO-PC 通过上调抗氧化酶 SOD 表达, 下调神经炎症因子环氧合酶-2 表达, 抑制神经元细胞凋亡, 从而减轻缺血性脑损伤; 动物模型中, HBO-PC 通过调

控心肌 PI3K/Akt/Nrf2 通路, 高压氧后处理通过降低 Caspase-3 活性和凋亡蛋白表达, 抑制细胞凋亡通路, 减轻心肌 I/R 损伤, 从而发挥心肌保护作用^[8]。但是有关 HBO-PC 保护心肌的具体机制尚未明确。本研究表明, HBO-PC 能够减少 H/R 诱发的心肌损伤标志物 LDH、MDA 含量和 Bax 表达、减弱 Caspase-3 活性, 增加抗氧化酶 SOD、缺血预适应触发因子 NO 的含量和 Bcl-2 表达, 说明 HBO-PC 可减少自由基、对抗脂质过氧化和抑制细胞凋亡, 从而减轻 H/R 诱发的心肌细胞损伤。这与之前高压氧预/后处理在动物体内的研究保持一致^[9]。

小窝是细胞膜上的微小结构, 小窝蛋白参与多种细胞基本生命活动, 如细胞内吞、胆固醇运输、细胞

膜组装、信号传导等^[9]。小窝蛋白有 Cav-1、Cav-2 和 Cav-3 3 种亚型, 心肌特异性 Cav-3 过表达可模拟缺血预适应引起的内源性心肌保护作用^[10], 而 Cav-3 表达的缺失可阻断抗氧化系统加重 I/R 损伤程度^[11]。另有研究发现, 缺血损伤后, Cav-3 敲除小鼠的存活率低于野生型小鼠, 而 Cav-3 过表达小鼠则对心肌 I/R 损伤耐受^[12]。活化的 PKC 亚型, 如 PKC α 、PKC ϵ 、PKC δ 能够靶向并结合心肌细胞小窝结构中的 Cav-3 蛋白, 是活化信号向下游分子转导的关键环节。研究报道, 缺氧预适应诱导 PKC 亚型选择性转位到小窝浆膜, 结合 Cav-3 蛋白, 可导致下游信号分子, 如 Akt、ERK 等的激活^[6]。PI3K 和 ERK 信号通路合称 RISK 通路, 缺血或者药物的预/后处理能够激活该通路, 促使开放的线粒体通透性转换孔(mitochondria permeability transition pore, mPTP) 关闭, 促进 Ca²⁺ 摄取和 NO 合成、释放, 同时抑制细胞凋亡途径, 进而拮抗 I/R 损伤的发生^[13-14]。此外, GSK3 β 是 RISK 通路下游的效应激酶, 其磷酸化水平升高预示酶活性降低^[14]。心肌特异性 Cav-3 过表达的小鼠体内实验结果显示, Cav-3 促进 Akt 磷酸化后能够激活 GSK3 β 的磷酸化, 使 GSK3 β 处于失活状态, 从而抑制 mPTP 的开放, 发挥保护心肌的作用^[10,12]。

本研究结果显示, HPO-PC 促进 PKC ϵ 活化转位于小窝并与 Cav-3 结合, 增加 Cav-3 蛋白和 RISK 通路中激酶磷酸化水平的表达, 减弱 GSK3 β 活性, 但是使用 CHE 能够抑制 PKC 活性, 阻断 PKC ϵ 与 Cav-3 结合, 下调 RISK 通路中激酶磷酸化水平的表达, 增强 GSK3 β 活性, 进而减弱 HPO-PC 的作用。上述结果表明, HPO-PC 能够通过调控 Cav-3 蛋白表达及其与 PKC ϵ 的结合, 激活下游的 RISK 通路。此外, 本实验还研究了 PI3K 抑制剂和 ERK 抑制剂对 HBO-PC 与 H/R 共同处理的心肌细胞凋亡的影响, 结果发现 2 种抑制剂可升高 Caspase-3 活性和 Bax 表达, 降低 Bcl-2 表达。说明 RISK 通路抑制剂能够阻断 HBO-PC 对心肌细胞凋亡的拮抗作用, 减弱心肌保护作用, 加重心肌 I/R 损伤。综上所述, HBO-PC 可能通过影响 PKC ϵ /Cav-3/RISK 通路, 抑制心肌细胞凋亡, 抵抗心肌 I/R 损伤, 发挥心肌保护作用。

参 考 文 献:

- [1] ALLEN M W, GOLEMBE E, GORENSTEIN S, et al. Protective effects of hyperbaric oxygen therapy (HBO2) in cardiac care-A proposal to conduct a study into the effects of hyperbaric preconditioning in elective coronary artery bypass graft surgery (CABG)[J]. *Journal of the Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc*, 2015, 42(2): 107-114.
- [2] HAN C, LIN L, ZHANG W, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning alleviates myocardial ischemic injury in rats[J]. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, NJ)*, 2008, 233(11): 1448-1453.
- [3] YIN X, WANG X, FAN Z, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates myocardium ischemia-reperfusion injury through upregulation of heme oxygenase 1 expression: PI3K/Akt/Nrf2 pathway involved[J]. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 2015, 20(4): 428-438.
- [4] 遇红梅, 吕晓明, 杨宇丹, 等. 小窝蛋白-3 在 PKC Epsilon 亚型介导缺血预适应心脏保护中的作用机制 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2013, 26(11): 1580-1584.
- [5] FLICK M, ALBRECHT M, OEI G T, et al. Helium postconditioning regulates expression of caveolin-1 and -3 and induces RISK pathway activation after ischaemia/reperfusion in cardiac tissue of rats[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2016, 791: 718-725.
- [6] YU H, YANG Z, PAN S, et al. Hypoxic preconditioning promotes the translocation of protein kinase C epsilon binding with caveolin-3 at cell membrane not mitochondrial in rat heart[J]. *Cell Cycle (Georgetown, Tex)*, 2015, 14(22): 3557-3565.
- [7] SUN J, NGUYEN T, KOHR M J, et al. Cardioprotective role of caveolae in ischemia-reperfusion injury[J]. *Translational Medicine (Sunnyvale, Calif)*, 2013, 3(1): 113-118.
- [8] CHEN C, CHEN W, NONG Z, et al. Cardioprotective effects of combined therapy with hyperbaric oxygen and diltiazem pretreatment on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 2016, 38(5): 2015-2029.
- [9] SCHILLING J M, ROTH D M, PATEL H H. Caveolins in cardioprotection-translatibility and mechanisms[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2015, 172(8): 2114-2125.
- [10] TSUTSUMI Y M, HORIKAWA Y T, JENNINGS M M, et al. Cardiac-specific overexpression of caveolin-3 induces endogenous cardiac protection by mimicking ischemic preconditioning[J]. *Circulation*, 2008, 118(19): 1979-1988.
- [11] ZHAO J, WANG F, ZHANG Y, et al. Sevoflurane preconditioning attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via caveolin-3-dependent cyclooxygenase-2 inhibition[J]. *Circulation*, 2013, 128(11): S121-S129.
- [12] YANG Y, MA Z, HU W, et al. Caveolin-1/-3: therapeutic targets for myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Basic Research in Cardiology*, 2016, 111(4): 45.
- [13] 黄仙, 庞玺倬, 喻卓, 等. PKG 及 RISK 信号通路对心肌缺血再灌注损伤的保护作用及内在关系 [J]. *临床医学*, 2016, 36(7): 126-128.
- [14] LI J Y, RUFFENACH G, KARARIGAS G, et al. Intralipid protects the heart in late pregnancy against ischemia/reperfusion injury via Caveolin2/STAT3/GSK-3beta pathway[J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2017, 102: 108-116.

(童颖丹 编辑)