分类号： 单位代码：**10114**

密 级： 学 号：**BS2010003**

**ALDH2 在异氟烷预处理抗 MIRI 中的作用及其调控机制研究**

**the Role of ALDH2 in Protective Effect against Myocardial Ischemia Reperfusion Injury during Isoflurane Preconditioning: A Study of Its Mechanism**

研 究 生： 郎小娥

指 导 教 师： 王 雄 教授

合 作 指 导 教 师：

申 请 学 位 门 类 级 别： 医学博士

专 业 名 称： 心血管内科学 研 究 方 向： 冠心病的基础与临床 所 在 学 院： 第一临床医学院

**二〇一三年三月十日**

目 录

[英文缩略表](#_Toc686776996) 2

[英文缩写 英文全称中文全称](#_Toc686776997) 5

[摘](#_Toc686776998)[要](#_Toc686776998) 5

[第一部分 大鼠](#_Toc686776999)**[ALDH2](#_Toc686776999)**[基因调控腺病毒载体的构建](#_Toc686776999) 5

[第二部分](#_Toc686777000) **[ALDH2](#_Toc686777000)**[的抗心肌细胞凋亡作用机制及其与](#_Toc686777000)**[IsoP](#_Toc686777000)** 5

[第三部分](#_Toc686777001) **[ALDH2](#_Toc686777001)**[磷酸化参与](#_Toc686777001)**[IsoP](#_Toc686777001)**[诱导的心脏保护](#_Toc686777001) 5

[第四部分](#_Toc686777002) **[PKC](#_Toc686777002)**[信号通路在](#_Toc686777002)**[ALDH2](#_Toc686777002)**[介导的](#_Toc686777002)**[IsoP](#_Toc686777002)**[抗](#_Toc686777002)**[MIRI](#_Toc686777002)**[中的](#_Toc686777002) 6

**[Abstract](#_Toc686777003)** 6

[前](#_Toc686777004)[言](#_Toc686777004) 8

[参考文献](#_Toc686777005) 9

[第一部分 大鼠](#_Toc686777006)**[ALDH2](#_Toc686777006)**[基因调控腺病毒载体的构建](#_Toc686777006) 10

**[1.1](#_Toc686777007)** [前言](#_Toc686777007) 10

**[1.2](#_Toc686777008)** [实验材料](#_Toc686777008) 10

[净 化 工 作 台 江 苏 苏 净 公 司](#_Toc686777009) 13

**[1.3](#_Toc686777010)** [实验方法](#_Toc686777010) 13

**[1.4](#_Toc686777011)** [实验结果](#_Toc686777011) 30

**[1.5](#_Toc686777012)** [讨论](#_Toc686777012) 33

**[1.6](#_Toc686777013)** [结论](#_Toc686777013) 33

[第二部分](#_Toc686777014) **[ALDH2](#_Toc686777014)**[的抗心肌细胞凋亡作用机制及其与](#_Toc686777014)**[IsoP](#_Toc686777014)** 33

**[2.1](#_Toc686777015)** [前言](#_Toc686777015) 33

**[2.2](#_Toc686777016)** [实验材料](#_Toc686777016) 33

[HRP标记的ft羊抗兔IgG二抗SANTA CRUZ公司Cytotoxicity Detection Kit(LDH)德国Roche公司其他试剂及试剂的配制见第一部分](#_Toc686777017) 33

**[ECL](#_Toc686777018)**[化学发光检测：等体积混合ECL试剂盒中的A液和B液（各1ml），浸](#_Toc686777018) 35

**[2.4](#_Toc686777019)** [实验结果](#_Toc686777019) 35

**[2.5](#_Toc686777020)** [讨论](#_Toc686777020) 36

**[2.6](#_Toc686777021)** [结论](#_Toc686777021) 36

[第三部分](#_Toc686777022) **[ALDH2](#_Toc686777022)**[磷酸化参与](#_Toc686777022)**[IsoP](#_Toc686777022)**[诱导的心脏保护](#_Toc686777022) 36

**[3.1](#_Toc686777023)** [前言](#_Toc686777023) 36

**[3.2](#_Toc686777024)** [实验材料](#_Toc686777024) 36

[小动物呼吸机江西省特力麻醉呼吸设备公司](#_Toc686777025) 37

**[3.3](#_Toc686777026)** [实验方法](#_Toc686777026) 37

[和直接激活剂（Alda-44）对大鼠心梗面积的影响：a.为单个大鼠心脏中有代表性的横断面切片; b.为梗死面积除以缺血危险区面积进行归一化后的结果。](#_Toc686777027)**[C-D.](#_Toc686777027)**[对大鼠血清LDH和CK-MB浓度进行分析](#_Toc686777027) 38

**[3.5](#_Toc686777028)** [讨论](#_Toc686777028) 38

**[3.6](#_Toc686777029)** [结论](#_Toc686777029) 38

[第四部分](#_Toc686777030) **[PKC](#_Toc686777030)**[信号通路在](#_Toc686777030)**[ALDH2](#_Toc686777030)**[介导的](#_Toc686777030)**[IsoP](#_Toc686777030)**[抗](#_Toc686777030)**[MIRI](#_Toc686777030)** 38

**[4.1](#_Toc686777031)** [前言](#_Toc686777031) 38

**[4.2](#_Toc686777032)** [实验材料](#_Toc686777032) 38

**[4.3](#_Toc686777033)** [实验方法](#_Toc686777033) 39

[实验三使用PKCδ抑制剂](#_Toc686777034)**[rottlerin](#_Toc686777034)**[验证PKCδ参与了](#_Toc686777034)**[ALDH2](#_Toc686777034)**[的磷酸化](#_Toc686777034) 40

**[4.5](#_Toc686777035)** [讨论](#_Toc686777035) 41

[我们还发现，IsoP导致PKCε转位到线粒体。尽管许多研究探讨了PKC 的](#_Toc686777036) 41

**[4.6](#_Toc686777037)** [结论](#_Toc686777037) 41

[本研究的创新之处和潜在价值](#_Toc686777038) 42

**[1](#_Toc686777039)** [人类](#_Toc686777039)**[ALDH2](#_Toc686777039)**[基因的遗传多态性与冠心病的关系](#_Toc686777039) 42

**[1.1](#_Toc686777040)****[ALDH2](#_Toc686777040)**[概述](#_Toc686777040) 42

**[1.2](#_Toc686777041)** [人类](#_Toc686777041)**[ALDH2](#_Toc686777041)**[基因的遗传多态性](#_Toc686777041) 42

**[1.3](#_Toc686777042)****[ALDH2](#_Toc686777042)**[基因型与心肌缺血再灌注损伤](#_Toc686777042) 42

**[1.4](#_Toc686777043)****[ALDH2](#_Toc686777043)**[基因型与冠心病](#_Toc686777043) 42

**[2](#_Toc686777044)** [线粒体](#_Toc686777044)**[ALDH2](#_Toc686777044)**[对乙醛及其代谢产物](#_Toc686777044)**[4-HNE](#_Toc686777044)**[的清除和解毒功能](#_Toc686777044) 42

**[2.1](#_Toc686777045)** [活性氧的产生和对心肌的损伤作用](#_Toc686777045) 42

**[2.2](#_Toc686777046)** [线粒体](#_Toc686777046)**[ALDH2](#_Toc686777046)**[对乙醛及其代谢产物](#_Toc686777046)**[4-HNE](#_Toc686777046)**[的清除和解毒功能](#_Toc686777046) 43

**[5](#_Toc686777047)** [急性心肌梗死凋亡基因的表达与](#_Toc686777047)**[ALDH2](#_Toc686777047)**[的抗凋亡作用](#_Toc686777047) 44

**[5.1](#_Toc686777048)****[Bcl-2](#_Toc686777048)**[和](#_Toc686777048)**[Bax](#_Toc686777048)** 44

**[5.2](#_Toc686777049)****[P53](#_Toc686777049)**[和](#_Toc686777049)**[Bcl-2](#_Toc686777049)** 44

**[5.3](#_Toc686777050)** [促细胞凋亡因子](#_Toc686777050)**[Fas](#_Toc686777050)**[和](#_Toc686777050)**[CPP32](#_Toc686777050)** 44

[结 语](#_Toc686777051) 44

[参考文献](#_Toc686777052) 44

[攻读博士学位期间以第一作者发表的](#_Toc686777053)**[SCI](#_Toc686777053)**[论文](#_Toc686777053) 50

[个人简介](#_Toc686777054) 50

# 英文缩略表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英文缩写** | **英文全称** | **中文全称** |
| MIRI | Myocardial ischemia/reperfusion injury | 心肌缺血再灌注损伤 |
| ALDH2 | Aldehyde dehydrogenase 2 | 乙醛脱氢酶 2 |
| IsoP | Isoflurane preconditioning | 异氟烷预处理 |
| AMI | Acute myocardial infarction | 急性心肌梗死 |
| IPC | Ischemic preconditioning | 缺血预处理 |
| APC | Anesthetic preconditioning | 麻醉剂预处理 |
| PKC | Protein kinase C | 蛋白激酶 C |
| ROS | Reactive oxygen species | 活性氧 |
| PKCε | Protein kinase C epsilon | 蛋白激酶 Cε亚型 |
| I/R | Ischemia/ reperfusion | 缺血/再灌注 |
| 4-HNE | 4-hydroxy-2-nonenal | 4-羟基-2-壬烯醛 |
| LAD | Left anterior descending | 左前降支 |
| TTC | Triphenyl tetrazolium chloride | 氯化三苯基四氮唑 |
| LDH | Lactate dehydrogenase | 乳酸脱氢酶 |
| CK-MB | Creatine kinase-MB | 肌酸激酶-MB |
| PAGE | Polyacrylamide gel electrophoresis | 聚丙烯酰胺凝胶电泳 |
| PVDF | Polyvinylidene difluoride | 聚偏二氟乙烯 |
| ECL | Chemiluminescence reaction | 化学发光反应 |
| siRNA | Short inhibition RNA | 小抑制 RNA |
| MOI | Multiplicity of infection | 感染复数 |
| PBS | Phosphate-buffered saline | 磷酸盐缓冲液 |
| SEM | Standard error of the mean | 标准误 |
| LSC | Laser scanning cytometry | 激光扫描仪 |
| eNOS | Endothelial ROS | 内皮细胞活性氧 |

# 英文缩写 英文全称 中文全称

CIP Calf Intestinal Alkaline Phosphatase 小牛肠碱性磷酸酶

H/R hypoxia/reoxygenation 缺氧/复氧

FBS fetal bovine serum 胎牛血清 DMEM dulbecco's modified eagle medium 细胞培养基 PMSF phenylmethylsulfonyl fluoride 苯甲基磺酰氟

CA-ALDH2 constitutively active mutant of ALDH2 持续活化突变型乙醛脱氢酶 2 TdT terminal deoxynucleotidyl transferase 末端脱氧核苷酸转移酶 mPTP Mitochondrial permeability transition pore 线粒体通透性转换孔

摘 **要**

# 第一部分 大鼠**ALDH2**基因调控腺病毒载体的构建

**研究目的**：通过构建抑制ALDH2基因表达的腺病毒和ALDH2持续活化的突变体腺病毒，来证实ALDH2在IsoP诱导的心脏保护中所起到的关键作用，并确定ALDH2表达调控在功能上的重要性，

**研究方法**(1)根据ALDH2基因序列及siRNA的设计原则，参考Cortinez, G

的文献，设计小分子干扰RNA的序列，以ALDH2为靶基因设计并合成小发卡结构两端配对的siRNA寡核苷酸链，再经变性，复性后形成双链ALDH2-siRNA. 采用DNA重组技术，将ALDH2-siRNA与线性化RetroQ载体连接，酶切鉴定后进行扩增，然后将Rat-ALDH2-siRNA从RetroQ-Rat-ALDH2(siRNA)上切下连接到pShuttle-Basic-ERFP重组穿梭载体，得到pShuttle-RFP-Rat-ALDH2-siRNA重组穿梭质粒，将pShuttle-RFP-Rat-ALDH2-siRNA转移到pAdeno载体上，得到pAdeno-RFP-Rat-ALDH2-siRNA病毒质粒。(2)以前的研究表明：持续活化的ALDH2 487位氨基酸必须是谷氨酸而不是赖氨酸，Thr185、Thr412和Ser279需磷酸化。因此，我们通过在野生型大鼠ALDH2的cDNA引入突变Lys487Glu，

Thr185Asp, Thr412Asp和Ser279Asp，获得了持续活化突变型ALDH2（CA-ALDH2），用DNA重组技术将CA-ALDH2基因连接到pShuttle-CMV-RFP重组穿梭载体，得到pShuttle-CA-ALDH2-RFP重组穿梭质粒；将pShuttle-CA-ALDH2-RFP转移到

pAdeno载体上，得到pAdeno-CA-ALDH2病毒质粒。

**研究结果：**(1)成功构建了以ALDH2基因为靶点的 pAdeno

-RFP-Rat-ALDH2-siRNA病毒载体，经酶切鉴定，所构载体无基因突变，结果与预期符合。（2）通过定点突变技术成功构建了pAdeno-CA-ALDH2病毒载体，经酶切鉴定，所构载体无基因突变，为下一步实验奠定了基础。

**研究结论：**成功构建了pAdeno -RFP-Rat-ALDH2-siRNA病毒载体, Western

blot结果表明该siRNA能很好的抑制ALDH2基因在大鼠心肌细胞中的表达；成功构建了pAdeno-CA-ALDH2病毒载体，Western blot结果表明该基因能在心肌细胞中持续表达。

**关键词：**RNA干扰； 腺病毒； 载体构建； ALDH2基因

# 第二部分 **ALDH2**的抗心肌细胞凋亡作用机制及其与**IsoP**

**的关系**

**研究目的**：以构建好的ALDH2干扰型和永久激活型腺病毒载体感染新生大鼠的心肌细胞，在基因水平特异性激活或抑制ALDH2，研究ALDH2在IsoP抗心肌细胞凋亡中的作用，并探索其抗凋亡机制。

**研究方法**：将原代培养的1日龄新生SD大鼠心肌细胞随机同样地分成如下不同的实验组：空质粒感染同时异氟烷处理和未处理组；Adeasy-Si-ALDH2感染

同时异氟烷处理和未处理组以及Adeasy-CA-ALDH2感染同时异氟烷处理和未处理组。使用含0.5 mM异氟烷（大约1.0肺泡最小浓度）的0.5％FBS的DMEM培养细胞5分钟，进行IsoP。在缺氧处理前迅速除去含异氟烷的培养基并用PBS洗涤细胞。低氧室中培养离体的新生大鼠心肌细胞24 h后供氧12h以模拟I/R制备H/R模型。H/R结束后采用免疫印迹法(Western Blot)检测各实验组凋亡通路蛋白Cleaved caspase-3和FL-caspase-3的表达、用Caspase-3比色测定试剂盒检测细胞裂解产物中的caspase-3酶活性、用TUNEL法检测心肌细胞凋亡水平以及用Cytotoxicity Detection Kit(LDH)检测心肌细胞培养基中的LDH释放量。综合上述指标评估ALDH2下调或活化在IsoP抗心肌细胞凋亡损伤中的作用。

**研究结果：**IsoP通过激活AlDH2缓解了体外H/R损伤诱导的心肌细胞凋亡：

缺氧24h复氧12h后，与未经H/R处理的心肌细胞相比，H/R处理显著升高了心肌细胞的凋亡指数（图1 B）、凋亡通路蛋白酶Cleaved Caspase3的相对表达（图1 C）、Caspase3活性（图1 D）和LDH释放（图1 E），TUNEL染色，可见DNA碎片增加，即明显的心肌细胞凋亡。IsoP显著降低了Ad-RFP感染组H/R诱导的心肌细胞的凋亡指数、Cleaved Caspase-3的相对表达、Caspase3活性和LDH浓度的升高（P﹤0.05, 图1B-E）。然而在Ad-Si-ALDH2感染组中，由Ad-Si-ALDH2介导ALDH2基因下调使ALDH2蛋白表达水平降低的情况下（图1A），IsoP不能降低H/R诱导的心肌细胞的凋亡指数、Cleaved Caspase-3的相对表达、

Caspase-3活性和LDH释放的显著升高（P﹥0.05, 图1B-E），即Ad-Si-ALDH2介导ALDH2基因下调后取消了IsoP的上述心脏保护作用，IsoP与未处理组无显著差异。上述结果表明：IsoP显著抑制了H/R诱导的心肌细胞凋亡，而ALDH2基因下调则抑制了IsoP诱导的抗心肌细胞凋亡的作用。这一结果支持我们的假设即ALDH2可能在IsoP诱导的心肌保护中发挥关键作用。免疫印迹分析表明，与Ad-RFP感染的细胞组相比，Ad-CA-ALDH2-RFP感染的细胞组中的ALDH2水平

大幅度增加（图2A）。持续活化的ALDH2显著抑制H/R引起的TUNEL阳性染色的增加，Caspase-3活性的增加和LDH的释放（P﹤0.05**,** 图2B-E, ）。而在

Ad-CA-ALDH2介导ALDH2持续活化的情况下，再用IsoP则不能进一步增强上述心脏保护作用，即IsoP与未处理组无差异。这说明了活化的ALDH2（即磷酸化的ALDH2）参与IsoP诱导的心脏保护作用。

**研究结论**：IsoP通过激活AlDH2缓解了体外H/R损伤诱导的心肌细胞凋亡。

ALDH2基因下调, H/R后心肌细胞凋亡数目大大增加，持续活化的ALDH2（即ALDH2基因上调）显著抑制H/R引起的心肌细胞凋亡，这表明活化的ALDH2参与了IsoP诱导的心肌保护作用。这一结果支持我们的假设即磷酸化ALDH2可能在IsoP诱导的心肌保护中发挥关键作用。ALDH2的抗心肌细胞凋亡作用的机制可能与其抑制Caspase3的激活从而抑制凋亡通路的激活有关。

**关键词：**乙醛脱氢酶2； 异氟烷； 缺氧/复氧； 心肌细胞； 凋亡

# 第三部分 **ALDH2**磷酸化参与**IsoP**诱导的心脏保护

**研究目的：**通过ALDH2激动剂及抑制剂，在药理水平激动或者抑制ALDH2，研究内源性ALDH2及其特异位点磷酸化在IsoP抵抗在体MIRI中的作用。

**研究方法：**采用结扎冠状动脉左前降支(LAD) 40分钟之后进行120分钟再

灌注处理制备雄性SD大鼠心肌I/R模型。为了证实异氟烷诱导的ＡＰＣ作用，从大鼠稳定期开始，以最小肺泡浓度1.0（2.1%）的异氟烷开始持续吸入30分钟，之后进行30分钟洗脱，再进行冠状动脉闭塞处理。根据不同的处理方法将大鼠随机分配到下列各组：假手术对照组和IsoP的假手术对照组：无/有IsoP，开胸分离冠状动脉左前降支，仅在LAD下穿线，但不阻断血流，持续160分钟（每组5只）；缺血再灌注组和IsoP的缺血再灌注组：无/有IsoP，可逆性的结扎

LAD造成区域性心肌缺血40分钟，再灌注120分钟（每组5只）；为了评估ALDH2磷酸化在异氟烷诱导的心脏保护中的作用，在IsoP和无IsoP缺血处理前5分钟分别给予ALDH2的激活剂Alda-44（40μM）（每组8只），和ALDH2抑制剂

cyanamide（5mM），（每组8只）。再灌注结束后，取出心脏采用伊文思蓝和TTC双重染色法测定心肌梗死面积。取出心脏前采集5ml血样，LDH和CK-MB的浓度用全自动生化分析仪7600及商用试剂盒进行测定；采用免疫印迹法测定信号通路蛋白（磷酸化的ALDH2 and总ALDH2）的表达。

**研究结果：**（1）IsoP诱导的心脏保护作用：与假手术对照组相比，结扎LAD

引起区域性心肌缺血40分钟然后进行120分钟再灌注使I/R组大鼠的血清LDH和CK-MB浓度和心梗面积显著增加(P<0.01)。而IsoP诱导的APC作用显著地降低了I/R所导致的心肌细胞LDH和CK-MB释放且大幅度地减少了I/R-诱导的心肌梗死面积（P<0.05）见图1；(2) ALDH2的磷酸化参与IsoP诱导的心脏保护：与I/R对照组相比，IsoP后使心肌细胞中磷酸化的ALDH2浓度显著升高

（P<0.01），即缺血前IsoP增加了ALDH2的磷酸化。而ALDH2酶抑制剂cyanamide显著抑制了异氟烷诱导的ALDH2磷酸化后的激活效应（P<0.05）。使用ALDH2的直接激活剂Alda-44大幅度地增加了心肌细胞中ALDH2的磷酸化水平（P<0.01），

但Alda-44并没有使IsoP诱导的ALDH2磷酸化效应进一步增强（图2A）。与ALDH2磷酸化相一致，我们观察到IsoP和使用Alda-44均显著减少了I/R引起的心肌细胞LDH和CK-MB向血浆的泄漏并减少了心梗面积（P<0.01, 图2B-D）。IsoP和同时使用Alda-44不能进一步增强这种降低，即二者无叠加效应。然而，IsoP诱导的减少LDH和CK-MB释放和减少了心梗面积效应可明显被ALDH2抑制剂氰胺所阻断（P<0.01, 图2B-D）。这些研究结果表明IsoP介导的心脏保护主要是由激活ALDH2所引起。

**研究结论：**IsoP诱导的APC作用显著减少了大鼠心脏I/R损伤所致的LDH

和CK-MB释放，通过增加ALDH2的磷酸化减少了I/R-诱导的心肌梗死面积。我们推测IsoP介导的心脏保护可能主要是由激活ALDH2所引起。

**关键词**：乙醛脱氢酶2； 心肌缺血/再灌注损伤； 异氟烷； 心脏保护

# 第四部分 **PKC**信号通路在**ALDH2**介导的**IsoP**抗**MIRI**中的

**作用**

**研究目的：**通过Western Blot检测PKC两种亚型（PKCε和PKCδ）的线粒体转位，确定PKC两种亚型在**IsoP**抗MIRI中的活化情况；通过加入PKC两种亚型的抑制剂，研究PKC双亚型在ALDH2介导的**IsoP**抗MIRI中的作用。从而探索PKC信号通路与ALDH2分子的内源性信号转导途径与分子调控机制。

**研究方法**：（1） 为了验证PKCε参与ALDH2的磷酸化，在IsoP和无IsoP 缺

血处理前5分钟给予雄性SD大鼠PKCε抑制剂PKCεV1-2（1μM）（每组8只），分别测定各实验组（I/R组、I/R +IsoP组、I/R+εV1-2组和I/R+IsoP+εV1-2组）大鼠的血清LDH和CK-MB的浓度，并用伊文思蓝-TTC双染色法测定心梗面积，并计算出心梗面积的百分比。Western blot测定信号通路蛋白（Phos-ALDH2和Total-ALDH2、Mito-PKCε与Total-PKCε）的表达；（2）为了探讨IsoP对PKCδ的活化及向线粒体转位的影响，分别测定各实验组（SHAM组、I/R组、SHAM+

IsoP组和I/R + IsoP组）的Mito-PKCδ和Total-PKCδ的表达量。（3）为了探讨

PKCδ在ALDH2磷酸化中的作用，在IsoP和无IsoP缺血处理前5分钟给予PKCδ的抑制剂Rottlerin（1μM）（每组8只）。分别测定各实验组（I/R组、I/R+IsoP组、I/R+rottlerin组和I/R+IsoP+rottlerin组）大鼠血清中LDH和CK-MB的浓度。Western blot测定信号通路蛋白（Phos-ALDH2和Total-ALDH2）的表达。

**研究结果**：（1）PKCε参与了IsoP诱导的ALDH2的磷酸化和心脏保护：PKCε

转位到线粒体后使ALDH2磷酸化是保护心脏免受I/R损伤的必需步骤。与未经

IsoP的I/R对照组相比，IsoP后心肌细胞线粒体中的PKCε浓度显著升高

（P<0.01）同时伴有心肌细胞中磷酸化的ALDH2浓度显著升高（P<0.01），而

PKCε抑制剂εV1-2能显著抑制这种升高（P<0.01）。在此，我们证明：IsoP导致PKCε在线粒体中浓度升高且伴随着ALDH2的磷酸化。IsoP介导的ALDH2的磷酸化被PKCε抑制剂εV1-2所抑制。由于PKCε在线粒体中的转位迅速发生，导致细胞质基质PKCε水平相应下降，因为细胞总的PKCε水平没有发生变化（图

1A），因此我们的数据表明IsoP使PKCε动态转位到线粒体上以应对I/R引起的损伤。与PKCε转运到线粒体的情形相对应，PKCε抑制剂εV1-2取消了IsoP诱导的减少LDH和CK-MB释放效应以及减少心肌梗死面积的效应(图1B-D);（2）

IsoP减少了心肌细胞的PKCδ的活化及向线粒体转位：我们的数据表明：与假手术对照组相比，I/R导致心肌细胞线粒体中的PKC**δ**浓度显著增高（P﹤0.01），IsoP后大大减少了心肌细胞中的PKCδ向线粒体转位使心肌细胞线粒体中的PKCδ浓度显著降低（P﹤0.01）（图2A-B）（3）PKCδ向线粒体转位减少参与了IsoP诱导的心脏保护：IsoP减少了PKCδ从胞浆转位到线粒体中，PKCδ抑制剂rottlerin显著抑制了I/R导致的心肌细胞ALDH2磷酸化水平的降低（图3A-B）以及LDH和CK-MB释放（图3C-D），其效果与IsoP相当免疫印迹分析结果表明：使用

PKCδ抑制剂rottlerin抑制了PKCδ的活性后，无论是否施用IsoP, I/ R损伤后

ALDH2磷酸化水平都显著升高。类似地，IsoP使PKCδ的活性被抑制从而使PKCδ

线粒体移位减少以应对I/R引起的心肌损伤。

**研究结论：**IsoP导致PKCε在线粒体中的浓度显著升高且伴随着ALDH2的磷酸化，同时减少PKCδ的线粒体移位，通过双向调节PKC双亚型（PKCε和PKCδ）通路在心肌I/R过程中的活化水平，从而进一步激活了ALDH2，抵抗了心肌I/R损伤。即IsoP诱导的抗心肌I/R损伤机制可能是通过激活PKC（PKCε和PKCδ）

-ALDH2信号通路实现的。

**关键词：**PKC 信号通路； 异氟烷； 心肌缺血/再灌注损伤

**Abstract**

**PART1 Construction of adenovirus vectors for rat ALDH2 gene regulation**

**Objective:** Confirm the critical role of ALDH2 in isoflurane-induced

Cardioprotection and detect the functional significance of manipulating ALDH2 expression by construction of ALDH2 knockdown adenovirus and constitutively active ALDH2 mutant adenovirus.

**Methods** ( 1) according to the sequence of ALDH2 and the principle of

SiRNA, we designed a siRNA refer to Cortinez, G's paper. target the ALDH2 gene we synthesis small hairpin siRNA, after denature and refolding, formed double strand ALDH2-siRNA. Using the DNA recombination technology, we linked ALDH2- siRNA and lined RetroQ vector. After Identification by restriction endonuclease digestion and replication, we cut the Rat-ALDH2-SiRNA from RetroQ-Rat-ALDH2 and link it to pShuttle-Basic-ERFP shuttle vector, get the pShuttle- RFP-Rat- ALDH2-siRNA vector. Finally we transfer pShuttle- RFP-Rat- ALDH2-siRNA to

PAdeno vector to get pAdeno -RFP-Rat- ALDH2- siRNA vector. ( 2) Previous

Studies demonstrated that the constitutively active ALDH2 amino acid 487 must be Glu not Lys, and Thr185, Thr412 and Ser279 must be constitutively phosphorylated. Accordingly, we obtained constitutively active mutant ALDH2 (CA-ALDH2) by nucleotide substitutions leading to the mutations Lys487Glu, Thr185Asp, Thr412Asp, and Ser279Asp introduced into the wild-type rat ALDH2 cDNA. Using the DNA recombination technology, We linked CA-ALDH to pShuttle-CMV-RFP shuttle vector, the pShuttlet-CA-ALDH2-RFP vector. We transfer pShuttle-CA-ALDH2-RFP to pAdeno vector to get pAdeno -CA-ALDH2-RFP vector.

**Results:** (1) Successfully constructed pAdeno-RFP-Rat-ALDH2-siRNA vector,

After Identification by restriction endonuclease digestion, there is no mutation in the sequence, which is in our expectation. ( 2) Using the site-mutation technology we

Constructed pAdeno-CA-ALDH2 vector after Identification by restriction endonuclease digestion, and got the right sequence, which Laid the foundation for our next experiments.

**Conclusions:** Successfully constructed pAdeno-RFP-Rat-ALDH2-siRNA

Vector, Western blot analysis showed siRNA can inhibite ALDH2 gene expression in rat Myocardial cells; Successfully constructed pAdeno-CA-ALDH2 vector, Western blot analysis showed the CA-ALDH2 can expressed in Myocardial cells quite well.

**Key words:** RNA interference; Adenovirus; Vector construction; ALDH2 gene

**PART 2 The mechanism of cardiomyocytes anti-apoptosis effect By ALDH2and its relationship with IsoP**

**Objective:** Elucidate the role of ALDH2 and in anti-apoptosis effect induced by isoflurane pretreatment by implementing specific activation or suppression on ALDH2 gene, where neonatal rat cardiomyocytes were infected by pre-prepared ALDH2 knockdown and constitutively active mutant adenovirus vectors.

**Methods:** primary cultured one-day old neonatal SD rat cardiomyocytes were randomly and homogeneously divided into different experimental groups as follows: vector-infected with and without isoflurane, Adeasy-Si-ALDH2-treated with and without isoflurane; vector-infected with and without isoflurane, Adeasy-CA -ALDH2

-treated with and without isoflurane. Exposure to isoflurane was performed by incubating the cells for 5 minutes in 0.5 mM isoflurane (approximately 1.0 minimum alveolar concentration) in 0.5% FBS DMEM. The isoflurane-containing medium was removed immediately before the onset of hypoxic conditions and the cells were washed with phosphate-buffered saline(PBS). Simulated I/R was achieved by culturing the Isolated neonatal cardiomyocytes in 0.5% FBS DMEM in a hypoxia chamber, saturated with 5%CO2/95%N2 at 37°C for 24h and following reoxygenation for 12 h using 0.5% FBS DMEM in the normal incubating condition. At the end of

H/R, the apoptosis pathway proteins(Cleaved caspase-3 and full-length caspase-3) in

Different cell groups were determined by Western Blot analysis; the caspase-3 enzyme activity of cell lysate in different groups was detected by Caspase-3 Colorimetric assay kit; apoptosis index was performed using terminal deoxyribonucleotide transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) with an in situ cell death detection kit, according to the manufacturer's protocol for cultured cells and the lactate dehydrogenase(LDH) activity released from the cytosol of damaged cells into the culture medium was measured by Cytotoxicity Detection Kit (LDH, Roche). The role of ALDH2 downregulation or activation in isoflurane-induced myocardial anti-apoptotic effect was evaluated by the values above.

**Results:** Isoflurane preconditioning attenuated cardiomyocytes apoptosis

Induced by H/R injury in vitro: After 24 h of hypoxia followed by 12h of reoxygenation we observed significant cardiomyocyte apoptosis demonstrated by increased DNA fragmentation using TUNEL staining, by laser scanning cytometry and caspase 3 activity in the vector control(Ad-RPF) group (Figure 1B-E). Pretreatment with isoflurane significantly inhibited the H/R-induced increase in

TUNEL positive staining, caspase 3 activity and leakage of LDH (P﹤0.05，Figure

1B-E). However, when ALDH2 was downregulated (Figure 1A) in cardiomyocytes by Ad-Si-ALDH2, increased TUNEL positive staining level, more intense cleaved caspase-3 staining, caspase 3 activity and LDH release (P﹥0.05，Figure1B-E) were observed, which supports the hypothesis that ALDH2 might play a critical role in isoflurane-induced cardioprotection. Immunoblotting analysis showed a substantial

Increase in ALDH2 level in Ad-CA-ALDH2-RFP-infected cells compared to Ad-RFP (Figure 2A). Constitutively active ALDH2 induced by Ad-CA-ALDH2 significantly inhibited the H/R-induced increase in TUNEL positive staining, caspase 3 activity

And leakage of LDH (**P﹤0.05，**Figure2B-E), which were not further increased by

Isoflurane treatment, i. e. no significant difference existed between control and isoflurane-pretreatment group. This suggests that activated (or phosphorylated) ALDH2 involves isoflurane-induced cardioprotection.

**Conclusions:** Isoflurane preconditioning alleviated in vitro H/R injury by

Activation of ALDH2. Downregulated ALDH2 gene leads to a great increase in apoptotic cardiomyocytes. Constitutively activated ALDH2 (upregulated ALDH2 gene) results in a significant inhibition of H/R induced cardiomyocytes apoptosis, which indicates that activated ALDH2 involves isoflurane-induced cardioprotection. This result supports our hypothesis that phosphorylated ALDH2 may play a critical role in isoflurane-induced cardioprotection. The anti-apoptotic mechanism of ALDH2 may involves inhibition of caspase-3 and hence inhibition of apoptotic pathway.

**Key words** ALDH2:; Isoflurane; Hypoxia / reoxygenation; Cardiomyocytes;

apoptosis

**PART 3 ALDH2 phosphorylation involves IsoP-induced cardioprotection**

**Objective:** Reveal the role and mechanism of endogenic ALDH2 and its

Phosphorylation at specific site in anti-apoptosis effect induced by isoflurane pretreatment by means of pharmacologic activation or inhibition of ALDH2 in vivo.

**Methods:** The acute myocardial I/R injury model was performed by LAD

Ligation. To confirm isoflurane-induced APC, a minimal alveolar concentration of isoflurane of 1.0 (2.1%) was started at the end of the stabilization period and administered for 30 minutes, followed by 30 minutes of washout before coronary occlusion. Rats were randomly assigned to one of the following groups subjected to different protocols: Sham groups, non-ischemic control group of sham-operated rats without and with isoflurane: rats were opened chest without ligating LAD for 160 minutes (n=5, respectively); I/R group andIsoP+ I/R group: 40 minutes of myocardial ischemia and 120 minutes of reperfusion without and with isoflurane (n=5, respectively). To evaluate the role of ALDH2 in isoflurane-induced cardioprotection, the direct activator of ALDH2, Alda-44 (40μM), was given 5 minutes prior to ischemia in the groups without and with isoflurane (n=8, respectively), and the ALDH2 inhibitor, cyanamide (5 mM), was given without and with isoflurane (5 minutes prior to isoflurane) (n=8, respectively). At the end of the

Reperfusion, the heart was removed and infarct size(IS) and area at risk(AAR) were

Assayed by Evans Blue and TTC staining．Before removing the heart, 5 ml blood samples were taken. Lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase-MB (CK-MB) were assayed using commercial kits by an automatic analyzer 7600; signal pathway

Proteins ( Phos- ALDH2 and Total-ALDH2 in different groups) were assayed by Western Blot analysis.

**Results:** (1) Cardioprotective effect induced by Isoflurane preconditioning ：

Regional myocardial ischemia for 40 minutes by LAD ligation followed by 120 minutes of reperfusion markedly increased the leakage of LDH, CK-MB and myocardial infarctsize compared to sham controls(P<0.01). Isoflurane-induced APC

Significantly reduced the I/R-induced increase in LDH, CK-MB release in rat heart and substantially decreased I/R-induced myocardial infarct size(P<0.05). As shown in Figure 1. (2) Phosphorylation of ALDH2 participated in cardioprotection induced by IsoP: Pretreatment with isoflurane prior to ischemia increased the phosphorylation of ALDH2 compared to I/R groups ( P<0.01). The ALDH2 inhibitor, cyanamide, significantly inhibited isoflurane-induced activation of ALDH2(P<0.05). The direct activator of ALDH2, Alda-44, substantially increased the phosphorylation of ALDH2 P<0.01 ), but did not enhance the phosphorylation of ALDH2 by isoflurane(图2A) Consistent with ALDH2 phosphorylation, we observed that isoflurane and Alda-44 markedly attenuated I/R-induced leakage of LDH and CK-MB in plasma, as well as myocardial infarct size(P<0.01, 图2B-D) However, the isoflurane-induced decrease in LDH and CK-MB release, and reduction of infarct size was significantly blocked by the ALDH2 inhibitor cyanamide (P<0.01, Figure 2B-D). These findings suggest that isoflurane-mediated cardioprotection is mainly mediated by activation of ALDH2.

**Conclusions:** LDH and CK-MB leakage from rat heart I/R injury is significantly

Reduced by APC effect by isoflurane preconditioning, with a decrease in infarct size caused by upregulation of ALDH2 phosphorylation. We suggest isoflurane-induced cardioprotective effect may essentially result from ALDH2 activation.

**Key words** ALDH2; Myocardial I/R injury; Isoflurane; Cardioprotection

**Part 4** The role of PKC pathway **in ALDH2-mediated cardioprotective effect against myocardial I/R injury induced by isoflurane preconditioning**

**Objective:** Measure the activity of two PKC subtypes(PKCεand PKCδ) in isoflurane pretreatment against myocardial I/R injury by detection of mitochondrial translocation of both subtypes with Western blotting. Identify the role of both

Subtypes in ALDH2-mediated isoflurane pretreatment by application of inhibitors of both subtypes. Explore endogenic PKC and ALDH2 signaling pathway and its molecular regulation mechanism.

**Methods:** (1) To verify that PKCε participates in the phosphorylation of ALDH2,

The PKCεinhibitor, PKCεv1-2 (1μM), was given 5 minites prior to ischemia without and with isoflurane (n=8, respectively,). Analyze the concentration of LDH and CK-MB in the rat Serum. Evans Blue-TTC stainning to analyze infarct area in

Different groups(I/R, I/R +IsoP, I/R+εv1-2 and I/R+IsoP+εv1-2 group). Signaling

Pathway proteins( Phos-ALDH2, Total-ALDH2, Mito-PKCεand Total-PKCεin Four

Different groups) were assayed by Western Blot analysis(. 2) To identify the effect of

Isoflurane preconditioning on PKCδactivation and translocation, we measured mito-PKCδand total PKCδexpression in all groups (Sham, I/R, Sham+IsoP and I/R+IsoP group). (3) To identify the role PKCδplays in phosphorylation of ALDH2, the PKCδ inhibitor, Rottlerin(1μM), was given 5 minites prior to ischemia without and with isoflurane (n=8). Analyze the concentration of LDH and CK-MB in the Serum. Signaling pathway proteins( Phos-ALDH2, Total-ALDH2 in Four different groups) were assayed by Western Blot analysis.

**Results: (1)** PKCεis involved in isoflurane-induced phosphorylation of ALDH2 and cardioprotection: PKCεtranslocation to mitochondria and then phosphorylation

Of ALDH2 is required to protect the heart from I/R injury. Compared with control group without isoflurane preconditioning, isoflurane pretreatment significantly enhanced mitochondrial PKCεconcentration in cardiomyocytes (P<0.01), accompanied with significant increase in phosphorylated ALDH2 in cardiomyocytes (P<0.01), whileεV1-2, a PKCε inhibitor, could significantly inhibit this effect

(P<0.01). Here we demonstrate that pretreatment with isoflurane resulted in elevated mitochondrial levels of PKCεaccompanied by phosphorylation of ALDH2. Isoflurane-induced phosphorylation of ALDH2 was inhibited by the PKCεinhibitor, PKCεV1-2. Because mitochondrial translocation of PKCεoccurs rapidly, with a corresponding decline in cytosolic PKCεlevels, and because the total cellular PKCε levels do not change (Figure1A), our data suggest that pretreatment with isoflurane enables dynamic mitochondrial translocation of PKCε in response to I/R. Consistent with PKCεtranslocation to mitochondria, PKCεV1-2 had a detrimental effect on isoflurane-induced attenuation of LDH and CK-MB leakage and the decrease in

Myocardial infarct size (Figure1B-D); (2) Pretreatment with isoflurane resulted in

Decreased PKCδactivity and mitochondrial levels in cardiomyocytes. Our data shows that compared to sham groups, I/R led to a significant increase in PKCδlevels in mitochondria of cardiomyocytes ( P﹤0.01), Isoflurane preconditioning greatly

Inhibits mitochondria translocation of PKCδin cardiomyocytes, and significantly decreases mitochondria PKCδconcentration in cardiomyocytes**( P﹤0.01)(**Figure

**2A-B）.** ( 3) Decreased level of PKCδtranslocation to mitochondria involves isoflurane preconditioning-induced cardioprotection: Isoflurane- afforded inhibition

Of ALDH2 phosphorylation level decrease (Figure3A-B) and LDH and CK-MB release (Figure3C-D) by I/R was mimicked by Rottlerin. Western blot showed that inhibition of PKCδsignificantly elevated phosphorylation of ALDH2 regardless of isoflurane preconditioning. Similarly, isoflurane preconditioning inhibits PKCδactivity, thus inhibiting its mitochondria translocation to act against I/R-induced myocardial injury.

**Conclusions:** Pretreatment with isoflurane resulted in significantly elevated mitochondrial levels of PKCεaccompanied by phosphorylation of ALDH2, in the same time attenuated translocation of PKCδ. The bi-directional regulation of PKC two subtypes activation level during I/R would further activate ALDH2, and guarantee resistance to ischemia-reperfusion injury. Isoflurane preconditioning may activate PKC (PKCεand PKCδ) -ALDH2 signaling pathway to induce protective effect against myocardial I/R injury.

**Key words** PKC pathway; Isoflurane; myocardial ischemia/ reperfusion injury

前 **言**

**研究背景及国内外研究现状**

心血管疾病已经成为危害人类健康的第一杀手，其中冠心病为西方国家致

死的首要原因，在发展中国家也已经成为致死的主要原因之一。在全球范围内，每年有数以百万计的人死于急性心肌梗死（acute myocardial infarction, **AMI**）[**1**]，

**AMI**多由于急性闭塞性血栓形成完全阻断冠脉血流导致供血区域心肌缺血坏死所致，属冠心病的严重类型，致死率极高。虽然通过静脉溶栓、冠脉介入（球囊扩张及支架置入）和冠状动脉旁路移植术等内外科再灌注治疗手段及时开通梗死相关动脉，尽早恢复心肌血流灌注，挽救濒死心肌是治疗AMI最有效最关键的措施具有重要的临床意义，然而无论哪种方式使冠脉血运重建都必然经历心肌缺血/再灌注(Ischemia/Reperfusion, **I/R**)过程，缺血心肌的再灌注也存在不利的一面，可引起新的损伤即心肌I/R损伤（myocardial ischemia reperfusion injury, **MIRI**）。随着心脏外科手术和介入治疗技术的进展以及心肌缺血病人的增加，

MIRI已成为临床上常见的一种病理生理过程。研究表明MIRI过程包含一系列复杂的病理生理变化，表现为心肌细胞适应、代偿、修复、坏死、凋亡、心肌结构损害、心功能障碍和心律失常等[1-3]. MIRI的动物实验提示致死性再灌注损伤

（即导致再灌注前本已存活的心肌细胞发生死亡）引起的心肌梗死面积约占全部梗死面积的50％。临床研究发现AMI后即使心肌及早获得了充分再灌注，而其死亡率仍高达10%、心力衰竭发生率将近25%的主要原因是MIRI所致。因此，警惕再灌注损伤的发生，并采取有效的心脏保护措施来减轻这种潜在的损伤以降低AMI和心脏手术患者等的病死率已成为临床和基础医学急需解决的重大问题。

伴随着研究的深入，许多心肌保护措施被发现，其中缺血预处理(Ischemic preconditioning, IPC)也称预缺血或缺血预调的发现揭示了机体本身具有内源性的可被激活的保护机制，对心肌保护的研究产生了深远的影响[4]。预缺血保护在临床上已得到证实和应用。在心肌梗死前有数次心绞痛发作（预缺血）的冠心病人与无心绞痛发作的病人相比，其梗死面积小，心源性休克及充血性心衰发生率低。心内直视手术中引进预缺血，心肌保护明显优于单用冷晶体停跳液或氧

合血停跳液者[**5**]。虽然IPC有强大的心肌保护作用但由于IPC需要通过中断心脏血供诱导其保护作用，在临床实践中很难推广应用，所以基于伦理学与方法学上的原因，人们更趋向于研究应用药物进行心肌保护。除IPC外，通过吸入性药物预处理可以达到同样的心脏预处理效果[**6-7**]。在心肌I/R前吸入挥发性麻醉药物如异氟烷可诱导心脏保护作用，这种现象被称为吸入挥发性麻醉药预处

理（**anesthetic-induced preconditioning, APC**）[**3-4**]. IPC曾被认为是抑制继发性

MIRI最有效的内源性保护机制，而APC不但能模拟IPC的心脏保护效果，而且在转录水平具有更均一和可预测的心脏保护表型，使APC在临床应用中更加安全和可靠。

异氟烷为恩氟烷的异构体，属吸入性麻醉药，麻醉诱导和复苏均较快。1988年，**warltier**等首次发现吸入挥发性麻醉药异氟烷预处理（**Isoflurane**

**preconditioning，IsoP**）动物心肌后，可以减轻随后发生的MIRI[8].1989年，

Davis等证实**IsoP**能降低动物I/R心肌的梗死面积[9]。1999年，**IsoP**首次被应用于临床，证实对心肺转流术下冠脉搭桥术病人心肌有保护作用[10]。大量临床研究发现在主动脉阻断前吸入异氟烷能改善心肌功能，减少肌钙蛋白的释放而发挥心脏保护作用。除了早期的APC效果外，异氟烷和七氟醚也能产生迟发的“第二窗”的心脏保护作用，七氟醚APC后的保护性因子持续72小时[11]，而异氟烷在心肌I/R后2周仍显著改善心肌功能，减少心肌细胞凋亡[12]。众多资料显示，**IsoP**能提供与IPC相似的心肌保护作用。同时，**IsoP**具有安全、方便和伦理学上的可行性，是目前研究心脏保护作用的热点药物之一。**IsoP**为防治MIRI提供了一条新途径。**IsoP**减轻MIRI作用主要表现为：（l）减少心肌梗死面积；（2）改善心肌收缩功能；（3）减少心律失常的发生和（4）改善预后等[**13 -16**]。

**IsoP**对**I/R**损伤心肌的保护机制涉及多种介质及信号通路。目前的研究主要集中在腺苷受体[**17**]和PKCε通路[**18**]的激活，活性氧的释放[**19**]以及线粒体**KATP**通道 的打开[**20**]等。但是其确切作用靶点及保护机制仍有待于进一步研究。

**PKC**家族在心肌保护中最为重要的两个亚型分别是PKCε和PKCδ，PKCε的活化以及向线粒体或者细胞膜上转位介导了如IPC和乙醇预处理等预处理手段

的心脏保护作用[**18-21**]. PKCε活化转位之后就会磷酸化附近的蛋白并起到保护作用[**22**]，但是关于**IsoP**中，PKCε通过磷酸化并激活何种下游机制并不清楚；另一方面，同样作为PKC家族的一员，PKCδ却起着与**PKCε**截然不同的作用。在再灌注初期PKCδ活化可通过调控线粒体介导细胞的凋亡和坏死，抑制PKCδ则会减轻

I/R的各项损伤指标[23]。

本课题的学术构想

线粒体乙醛脱氢酶2（aldehyde dehydrogenase 2, ALDH2）是心肌细胞保护的关键酶，ALDH2介导了醛类代谢和硝酸甘油转变为活性的NO。最近，Che-Hong Chen等人发表在*Science*上的一篇文献报道，线粒体ALDH2的激活与减轻缺血性心脏损害有关联，且ALDH2活性与心脏损害之间呈负相关。他们的研究证明了乙醇预处理能够诱导PKCε激活，并使其转位到线粒体，使线粒体

ALDH2磷酸化而活化，进而引起心脏保护[24]。PKCε-ALDH2通路引起心脏保护的机制尚未完全阐明。有研究认为ALDH2在清除I/R过程中所产生的毒性膜脂氧化产物中有着重要的作用。此外心脏缺血时会积累一种有毒的醛4-羟基-2-壬烯醛（4HNE），4HNE的毒性已有很多报道，*Nature*上的一篇文献报道，I/R后，

4HNE使糖分解的酶活性降低[25]。另外，4HNE还可能是线粒体通透性转换孔

（mPTP）的激活剂，而人们认为mPTP[**26**]的开放是MIRI时细胞坏死的主要事件[**27-28**]. ALDH2对4HNE的代谢作用可能是ALDH2诱导心脏保护的部分机制。但4HNE本身可以与ALDH2形成加合物并使其失活。因此ALDH2活性增高会

产生正反馈效应，减少毒性醛4HNE的积累从而引起心脏保护[24]**。**

ALDH2在IsoP诱导APC中的作用及其机制研究迄今尚未见报道。由于乙醇能够激活PKCε-ALDH2通路，而异氟烷可以使PKCε激活，因此我们推测PKCε-ALDH2通路介导了IsoP的心肌保护作用，本课题的实验结果也证实了这一点；另一方面，异氟烷是否可以通过调节PKCδ通路，起到对抗MIRI的保护作用，目前尚不清楚，PKCδ通路和ALDH2是否相互关联，是心肌保护领域至今仍未阐明的问题。我们假设：**IsoP**通过激活PKCε同时抑制PKCδ，双向调节

PKC双亚型通路在心肌I/R过程中的活化水平，从而进一步激活了ALDH2，抵抗了MIRI。

**本研究的实用价值和理论意义**

本课题旨在通过体内和体外的系列研究，阐明异氟烷等挥发性麻醉药物预

处理对抗MIRI的分子保护机制，明确ALDH2等心脏内源性保护分子的作用机制及其与药物预处理抗MIRI的相关性。对挥发性麻醉药物预处理分子保护机制的研究具有非常重要的生理学意义和临床应用价值。而对其作用靶点的研究，为心脏内源性生存信号关键因子提供证据，对临床药物的开发具有重要的指导性意义。

**本研究重点解决以下问题**

1、确定ALDH2及其特异位点磷酸化在IsoP抗体内MIRI及体外心肌细胞

H/R损伤中的作用；验证PKCε介导的线粒体ALDH2激活在IsoP中起关键作用这一假设。

2确定PKC双亚型在IsoP抗MIRI中的活化情况；研究PKC双亚型在ALDH2介导的IsoP抗MIRI中的作用及其分子调控机制。

参考文献

[1] Anversa P, Cheng W, Liu Y, et al. Apoptosis and myocardial infarction. Basic Res. Cardiol, 1998, 93: 8-12

[2] Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. Cell, 2005, 120(4): 483-495.

[3] Maxwell SR, Lip GY. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. International Journal of Cardiology, 1997, 58(2): 95-117

[4] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation, 1986, 74: 1124-1136

[5] Illes RW, Swoyer KD. Prospective, randomized clinical study of ischemic

Preconditioning as an adjunct to intermittent cold blood cardioplegia. Annals of Thoracic Surgery, 1998,65(3):748-753

[6] Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, et al. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. Anesthesiology, 1997, 87(2): 361-370

[7] Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, et al. Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. Anesthesiology, 1997, 87(5): 1182-1190

[8] Warltier DC, al-Wathiqui MH, Kampine JP, et al. Recovery of contractile function of stunned myocardium inchronically instrumented dogs is enhanced by halothane or isoflurane. Anesthesiology, 1988, 69(4): 552-565

[9] Davis RF, Sidi A. Effect of isoflurane on the extent of myocardial necrosis and on systemic hemodynamics, regional myocardial blood flow, and regional myocardial metabolism in dogs after coronary artery occlusion. Anesth. Analg, 1989, 69(5): 575-586

[10] Belhomme D, Peynet J, Louzy M, et al. Evidence for preconditioningby isofluran in coronary artery bypass graft surgery. Circulation, 1999, 100(19): II340-II344

[11] WEBER N C, SCHLACK W. Inhalational anaesthetics and cardioprotection [J]. Handb Exp Pharmacol, 2008, 182: 187-207

[12] TSUTSUMI Y, PATEL H, LAI C, et al. Isoflurane produces sustained cardiac protection after ischemia-reperfusion injury in mice [J]. Anesthesiology, 2006, 104(3): 495-502.

[13] Bignami E, Biondi-Zoccai G, Landoni G, et al. Volatile anesthetics reduce mortality in cardiac surgery. J. Cardiothorac. Vasc. Anesth, 2009, 23: 594-599

[14] Landoni G, Bignami E, Oliviero F, et al. Halogenated anaesthetics andcardiac protection in cardiac and non-cardiac anaesthesia. Ann. CardAnaesth, 2009, 12: 4-9

[15] Landoni G, Fochi O, Torri G. Cardiac protection by volatile anaesthetics: a review. Curr. Vasc. Pharmacol. 2008; 6: 108-111.

[16] Pratt PF Jr, Wang C, Weihrauch D, et al. Cardioprotection by volatile anesthetics:

New applications for old drugsCurr. Opin. Anaesthesiol. 2006;19:397-403. [17]UeckerM, DaSilvaR, GRAmppT, etal. Translocationofproteinkinase C

Isoforms to subcellular targets in ischemic and anesthetic preconditioning. Anesthesiology,2003; 99, 138-147.

[18] Tanaka K, Weihrauch D, Kehl F, et al. Mechanism of preconditioning by isoflurane in rabbits: a direct role for reactive oxygen species. Anesthesiology, 2002; 97 (6), 1485-1490

[19] Novalija E, Varadarajan SG, Camara AK, et al. Anesthetic preconditioning: triggering role of reactive oxygen and nitrogen species in isolated hearts. Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol, 2002; 283(1): H44-H52

[20] Churchill EN, Disatnik MH, Mochly-Rosen D. Time-dependent and ethanol-induced cardiac protection from ischemia mediated by mitochondrial translocation of varepsilonPKC and activation of aldehyde dehydrogenase 2. J. Mol. Cell Cardiol. 2009; 46 (2): 278-284.

[21] Miyamae M, Rodriquez MM, Camacho SA, et al. Activation of epsilon protein kinase C correlates with a cardioprotective effect of regular ethanol consumption. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 1998; 95(14): 8262-8267

[22] Churchill EN, Mochly-Rosen D. The roles of PKCdelta and epsilon isoenzymes in the regulation of myocardial ischaemia/reperfusion injury. Biochem. Soc. Trans, 2007, 35(5): 1040-1042

[23] Chen CH, Budas GR, Churchill EN, et al. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. Science, 2008; 321 (5895): 1493-1495

[24] DAVID T. LUCAS AND LUKE I. SZWEDA. Declines in mitochondrial respiration during cardiac reperfusion: Age-dependent inactivation of a-ketoglutarate dehydrogenase. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96: 6689–6693

[25] Kristal BS, Park BK, Yu BP. 4-Hydroxyhexenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition. J Biol Chem, 1996, 271(11): 6033-8

[26] Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, et al., Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. Nature, 2005,

434(7033): 658 -62.

[27] Andrew Halestrap, Biochemistry: A pore way to die. Nature, 2005, 434, 578 -579 [28] Nakagawa T, Shimizu S, Waranabe T, etal. Cyclophilin D-dependentmitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. Nature, 2005, 434(7033): 652-8

# 第一部分 大鼠**ALDH2**基因调控腺病毒载体的构建

## **1.1** 前言

为了探讨和证实ALDH2在IsoP诱导的心脏保护中的关键作用和确定调控

ALDH2表达的功能上的重要性，我们构建了一个抑制大鼠ALDH2基因表达的腺病毒载体Ad-si-ALDH2-RFP，靶向沉默ALDH2；同时构建了一个大鼠

ALDH2持续活化型突变体腺病毒载体Ad-CA-ALDH2-RFP。为下一步研究

ALDH2基因被抑制和被持续活化状态下IsoP所诱导的ALDH2抗MIRI作用奠定了基础。

## **1.2** 实验材料

### **1.2.1** 主要实验试剂

限制性内切酶英国New England Biolabs公司T 4 D N A l i g a s e 晶美生物工程有限公司CIP(Calf Intestinal Alkaline Phosphatase 美国promega公司

pfx DNA polymerase美国Invitrogen公司

dNTPs(10mM each)上海生工生物工程技术服务有限公司

1kb DNA ladder Thermo Scientific公司

DNA Marker DL2000大连宝生物公司

DMEM、胎牛血清和胰酶美国Hyclone公司真核转染试剂Lipofectamine 2000 Gibco BRL公司

双抗Invitrogen公司

引物合成于上海生工生物工程技术服务有限公司

质粒小/中量提取纯化试剂盒、DNA纯化试剂盒（柱离心型）、DNA凝胶回收与纯化试剂盒（柱离心型）均购自威格拉斯生物技术（北京）有限公司；

溴化乙锭和琼脂糖、EDTA、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠(SDS)、

TEMED、过硫酸胺(APS)、Tween-20、甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、

DMSO(dimethylsulfoxide, 二甲亚枫)均购自于美国Sigma公司显影粉天津天感公司

RI PA裂解液碧云天生物技术研究所

PM S F 碧云天生物技术研究所

B C A 蛋白定量试剂盒 美国 P i e r c e 公司

EC L 系统 美国 Mi l l i p o r e 公司

PVDF膜美国GEHealthcare公司

预染蛋白 M a r k e r 美国 F e r m e n t a s 公司

We s t e r n 一抗稀释液 碧云天生物技术研究所 兔抗大鼠 A L D H 2 抗体 A b c a m 公司

抗 大 鼠 β - a c t i n 抗 体 美 国 S a n t a C r u z 公 司

H R P 标记的ft 羊抗兔 I g G 二抗 美国 S a n t a C r u z 公司

### **1.2.2** 主要溶液的配制

�**琼脂糖凝胶电泳主要溶液的配制**

(1) EB(溴化乙锭) 10mg/ml：在100ml水中加入1g溴化乙锭，磁力搅拌数小时以确保其完全溶解，然后用铝箔包裹或转移至棕色瓶中，保存于室温。

**（2）**2xTris甘氨酸电泳缓冲液：15.1 g Tris, 94g甘氨酸和10%SDS，加去离子水至1000ml。

**（3）**1%琼脂糖凝胶：1g琼脂糖加入100ml去离子水中，摇匀，置于微波炉中煮沸，

立即取出，间断摇动。

� **Western-blot主要溶液配制**

**（1）配制SDS-PAGE凝胶所需试剂的配制：**

**1M Tris-HCI:** 24.22g Tris溶于去离子水（终体积200m1），用HCl调PH值为8.8; 1.5M Tris—HCI pH 8．8

**1M Tris-HCI:** 24.22g Tris溶于去离子水（终体积200m1），用HCl调PH 值

为6.8.

**30%丙烯酰胺(Acr-Bis(29:1))：**丙烯酰胺29g, N，N'--亚甲双丙烯酰胺1g，加去离子水至100m1，置于棕色瓶中，4℃避光保存。

**10%十二烷基磺酸钠(SDS)**: SDS 8.0g加去离子水至80ml,滤纸过滤。

10%过硫酸胺(APS): APS 0.1g加去离子水至1 ml，分装后-20℃保存。

**TEMED**易挥发，需盖紧瓶盖4℃避光保存。

**（2）分离胶／浓缩胶的配制**

|  |  |
| --- | --- |
| **10％聚丙烯酰胺分离胶配方** | **ml** |
| 蒸馏水 | 1.3 |
| 1M Tris-HCl pH8.8 | 1.9 |
| 30%Acr-Bis(29:1) | 1.7 |
| 10%SDS | 0.05 |
| 10% APS | 0.05 |
| TEMED | 0.002 |
| **Total** | **5** |
| **12％聚丙烯酰胺分离胶配方** | **ml** |
| 蒸馏水 | 1.6 |
| 1.5M Tris-HCl pH8.8 | 1.3 |
| 30%Acr-Bis(29:1) | 2.0 |
| 10%SDS | 0.05 |
| 10%APS | 0.05 |
| TEMED | 0.002 |
| **Total** | **5** |
| **5％聚丙烯酰胺浓缩胶配方** | **ml** |
| 蒸馏水 | 1.4 |
| 1M Tris-HCl pH6.8 | 0.25 |

30%Acr-Bis(29:1) 0.33

10% SDS 0.02

10% APS 0.02

TEMED 0.002

**Total 2**

(3)封膜液：将5g脱脂奶粉加到100 ml的TBST Buffer中充分搅溶倒入保鲜盒中

(4) 5X SDS-PAGE蛋白上样缓冲液：O.2M Tris-HCL(PH=6.8) 2.5m1, 10% SDS 4m1，甘油2m1, 0.05%溴酚蓝0.5m1, 200mM DDT1m1，去离子水4m1,

-20℃保存。

(5) l0xSDS电泳缓冲液:0.25M Tris,1.92M甘氨酸和1%SDS，室温保存。使用时按l:10稀释为1xSDS电泳缓冲液。

(6) 1XTBST: l0mM Tris-HC1(PH 7.5) 5ml, 150mM NaCl 15 ml,

0.05%Tween20 0.25m1,加去离子水至5OOml。

(7)电转移液：：甘氨酸2.9g，Tris碱5.8g，SDS 0.37g，甲醇200m1，加去离子水至1000ml。

�**培养细胞主要溶液的配制**

**（1）**磷酸盐缓冲液(PBS)的配制：将NaCl 8.0g, KC1 0.2g, Na2HPO4-12H20 3.56g, KH2P04 0.24g，溶于1000ml三蒸水，NaOH调整pH值为6.0-7.0，高温高压灭菌，4℃保存。

(2) DMEM培养液的配制：将10g DMEM干粉溶于800m1三蒸水，加入青霉素

0.08g,链霉素0.08g, HEPS 3.5g，用三蒸水定容至1000mI，搅拌均匀后用碳酸氢钠调节pH为7.2，过滤器正压过滤除菌后分装为200m1/瓶，加入无菌FBS,分别配制成含10%FBS和20%FBS的DMEM完全培养液，-20℃保存。

(3) 0.25%胰酶的配制:0.8g胰酶，先加40m1 D-Hank's液调成糊状，再加

D-Hank's液至200m1，充分混匀，过滤除菌，-20℃保存，临用前缓慢复温。

### **1.2.3** 主要实验仪器和器械等

C O 2 培养箱 德国 H e r a e u s 公司

倒置生物显微镜 重庆光电仪器有限公司 全能台式高速冷冻离心机 德国 H e r a e u s 公司电热恒温水浴箱 北京东方仪器厂

霉菌培养箱广东医疗仪器厂

低温循环水浴箱美国POLYSCIENCE公司

P C R 扩 增仪 美 国 A B I 公 司

梯度PCR仪英国GENE TECHNOLOGIES公司

漩涡混匀器 美国 B I O E M I A 公司

医用 X 射线胶片 美国 K o d a k 公司

分光光度计美国Alpha lnnotech公司

微量离心机 德国 E p p e n d o r f 公司

高速冷冻离心机 德国 H e r a e u s 公司

高速低温离心机 德国 H e r a e u s 公司

全自动高压灭菌器 德国 H e r a e u s 公司真空冷冻干燥及离心浓缩系统 德国 M a r t a i n C h r i s t 公司干燥箱 德国 B i n d e r 公司

B H - 5 光学显微镜 日本 O LY M P U S 公司超低温冰箱 M D F U 5 1 8 6 S 日本 S A N Y O 公司

医用低温保存箱 M D F U 5 4 1 0 日本 S A N Y O 公司

制冰机 S I M - F 1 2 3 日本 S A N Y O 公司超纯水系统 美国 M i l l i p o r e 公司

精 密 p H 仪 美 国 O r i o n 公 司

玻 璃 匀 浆 器 上 海 精 科 公 司

磁 力 搅 拌 器 上 海 精 科 公 司

## 净 化 工 作 台 江 苏 苏 净 公 司

电 热 恒 温 水 浴 箱 北 京 东 方 仪 器 厂

摇 床 江 苏 华 利 达 公 司

水 箱 江 苏 华 利 达 公 司

冰 箱 冰 柜 海 尔 集 团

微 波 炉 格 兰 仕 公 司

液氮罐 四川乐ft 东亚

电子天平 日本 O l y m p u s 公司

研究级倒置荧光显微镜及图像分析系统 北京赛多利斯仪器系统有限公司 荧光显微镜 德国 C a r l Z e i s s 公司/ A x t o v e r t Z o o M电泳仪、电泳槽、转膜仪、凝胶成像系统和酶标仪等均购于美国Bio-rad公司 手术器械：眼科剪、眼科镊、止血钳、手术刀、手术剪、缝合线、动物手术台等均购于美国BD公司

其他：各种规格的微量移液器（德国Eppendorf公司）；15ml离心管及50ml离心管（BD公司）；六孔板、96孔板、75cm2培养瓶、60mm培养皿和150mm培养皿（Corning公司）；透析卡（Pierce公司）；滤膜滤器（Millipore 公司）

## **1.3** 实验方法

### **1.3.1** **Ad-RFP-Rat-ALDH2-siRNA**腺病毒载体构建流程

#### **1.3.1.1** 构建方法简要步骤

�合成ALDH2-siRNA序列颈环状DNA，退火后装入RetroQ载体

�将**Rat-ALDH2-siRNA**(U6+Rat-ALDH2-siRNA完整读码框)从**RetroQ-Rat-**

**ALDH2(siRNA)**上切下连接到pShuttle-Basic-ERFP重组穿梭载体，得到

**pShuttle-RFP-Rat-ALDH2-siRNA**重组穿梭质粒

�将**pShuttle-RFP-Rat-ALDH2-siRNA**转移到pAdeno载体上，得到**pAdeno**

**-RFP-Rat-ALDH2-siRNA**病毒质粒。

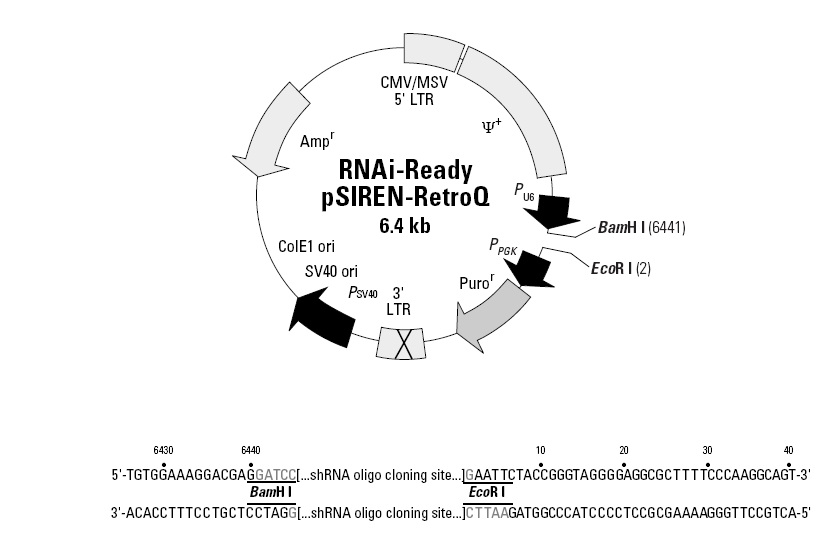
#### **1.3.1.2** 重组穿梭载体构建具体操作步骤

�**ALDH2-siRNA序列GCAACCAGATTCATTAATT,来自文献**[1]**，**合成的上下游颈环结构引物如下，其两端分别导入BamHI和EcoRI酶切位点

**Si-f** 5'-gatccGCAACCAGATTCATTAATTTTCAAGAGAAATTAATGAATCTGGTTGCTTTTTTg-----3'

**Si-r** 5'-aattcAAAAAAGCAACCAGATTCATTAATTTCTCTTGAAAATTAATGAATCTGGTTGCg-----3'

将上下游引物95度5分钟后退火至室温，然后与线性化的RetroQ载体进行连接，转化得到阳性克隆，即为RetroQ-Rat-ALDH2(siRNA)



�将**pShuttle-Basic-ERFP**重组穿梭载体用BglII/EcoRI酶切，切胶回收约4.2Kb目的基因片段[2]

酶切体系及反应条件

载体质粒DNA 2ug

10×Buffer 5.0μL

10×BSA 5.0μL

BglII (NEB,20 U/μL) 1.5μL

EcoRI(NEB,20 U/μL) 1.5μL

ddH2O补齐至50.0μL

总体积50.0μL

37℃3-4小时

酶切完成后加样至1%的琼脂糖凝胶，电泳，在紫外灯下切下目的片段，用DNA凝胶回收与纯化试剂盒（柱离心型）（具体步骤参照试剂盒使用说明）回收（为避免紫外照射时间过久损伤DNA，本步骤不存有电泳图）。

�将原始质粒用BglII/EcoRI酶切，切胶回收约0.3Kb目的基因片段(U6+Rat-ALDH2-siRNA). 由于RetroQ质粒U6启动子前还带有BglII酶切位点，故可用BglII/EcoRI双酶切将U6- Rat-ALDH2-siRNA整段切出

酶切体系及反应条件

含目的基因的质粒DNA 2ug

10×Buffer 5.0μL

10×BSA 5.0μL

EcoRI (NEB,20 U/μL) 1.5μL

BglII (NEB,20 U/μL) 1.5μL

ddH2O补齐至50.0μL

总体积50.0μL

37℃3-4小时

酶切完成后加样至1%的琼脂糖凝胶，电泳，在紫外灯下切下目的片段，用DNA凝胶回收与纯化试剂盒（柱离心型）（具体步骤参照试剂盒使用说明进行操作）回收（为避免紫外照射时间过久损伤DNA，本步骤不存有电泳图）

�**将处理好的载体片段和插入片段用T4 DNA连接酶进行连接**

连接体系及反应条件

回收的目的DNA产物片段6μL

回收的载体DNA产物片段2μL

10×ligase Buffer 1μL

T4 DNA ligase(5 Weiss u/μL)) 1μL

总体积10.0μL

22℃3-4小时

**�取3μL连接产物转化化学感受态细胞DH5a菌株涂布到卡那抗性固体培养基平皿**

转化的具体步骤：

(1)从-80℃取出提前制备好的DH5a感受态置于冰浴中

(2)待DH5a感受态细胞融化后，取3μL连接产物于50μL DH5a感受态细胞中，充分混匀，冰浴中静置30分钟

(3)将离心管放入42℃水浴锅中90秒（期间不要摇动离心管），然后快速移至冰浴中，静置2分钟。

(4)向离心管中加入600μL的无菌的LB培养基（不加抗生素），混匀后置于摇床中37℃，180rpm，振摇1小时。目的是使质粒上相关的抗性标记基因表达，使菌体复苏。

(5)台式离心机中8000rpm离心2分钟，弃掉大部分培养基，留下部分培养基充分重悬起沉淀后，涂布到卡那抗性固体培养基平皿中

(6) 37℃培养箱中培养过夜。

**�挑取若干单克隆菌落，接种到卡那抗性液体培养基中，摇床中37℃300rpm振荡培养过夜**

�**小提质粒（威格拉斯质粒小/中量提取纯化试剂盒，具体步骤参照试剂盒使用说明进行）**

#### **1.3.1.3** 重组穿梭载体质粒的酶切鉴定

BglII/EcoRI酶切鉴定：

阴性克隆：4.2kb一条带

阳性插入克隆：0.3kb/4.2Kb两条带，（正确，我们想得到的）

酶切鉴定体系及反应条件

穿梭质粒DNA 1μL

10×Buffer 1μL

10×BSA 1μL

BglII(NEB,20 U/μL) 0.3uL

EcoRI (NEB,20 U/μL) 0.3uL

ddH2O补齐至10μL

总体积10μL

37℃1-2小时

酶切完成后加样至1%的琼脂糖凝胶，电泳**。**

#### **1.3.1.4** 重组腺病毒载体质粒构建具体步骤

将验证正确的pShuttle-RFP-Rat-ALDH2-siRNA转移到pAdeno载体上，得到

pAdeno-RFP-Rat-ALDH2-siRNA病毒质粒

**�I-CeuI+I-SceI双酶切处理pAdeno载体，并做CIP去磷酸化处理**

酶切体系及反应条件

载体质粒 DNA 3-4 ug

10×Buffer 5μL

10×BSA 5μL

I-CeuI (NEB,5U/μL) 2μL

I-SceI (NEB,5 U/μL) 2μL

ddH2O补齐至50μL

总体积 50μL

37℃3-4小时

CIP 0.5μL

37℃0.5小时

**�上述酶切反应体系中加入10SDS 75℃灭活10分钟**



�**用乙醇沉淀法回收载体**

乙醇沉淀法具体步骤

（1）加去离子水补到150ul，然后加入75ul的酚，75ul的氯仿，充分混匀，12000rpm离心5分钟；

（2）吸上清至新的离心管中，加入1/10体积的3M PH5.2的NaOAc，再加入

2.5倍体积的无水乙醇，-20℃沉淀15分钟；

（3）4℃离心15分钟，小心吸去上清，加入500ul 70％乙醇，4℃离心5分钟，小心吸去上清；

（4）重复上一步骤一次；

（5）晾干3-5分钟，加入适量的去离子水溶解。

**I-CeuI+I-SceI双酶切处理插入片段pShuttle-Rat-ALDH2-siRNA，跑胶回收含目的基因的片段**

酶切体系及反应条件

穿梭质粒DNA 2 ug

10×Buffer 5μL

10×BSA 5μL

I-CeuI (NEB,5U/μL) 2μL

I-SceI (NEB,5 U/μL) 2μL

ddH2O补齐至50μL

总体积50μL

37℃3-4小时

酶切完成后加样至1%的琼脂糖凝胶，电泳，在紫外灯下切下目的片段，用DNA凝胶回收与纯化试剂盒（柱离心型）（具体步骤参照试剂盒使用说明操作）回收（为避免紫外照射时间过久损伤DNA，本步骤不存有电泳图）

� **将处理好的载体片段和插入片段用T4 DNA连接酶进行连接**

连接体系及反应条件

回收的目的DNA产物片段6μL

回收的载体DNA产物片段2μL

10×ligase Buffer 1μL

T4 DNA ligase(5 Weiss u/μL) 1μL

总体积10.0μL

22℃3-4小时

�**取3μL连接产物转化化学感受态细胞DH5a菌株，涂布到氨卞抗性固体培养基平皿**

转化的具体步骤：

（1）从-80℃取出提前制备好的DH5a感受态置于冰浴中

（2）待DH5a感受态细胞融化后，取3μL连接产物于50μL DH5a感受态细胞中，充分混匀，冰浴中静置30分钟

（3）将离心管放入42℃水浴锅中90秒（期间不要摇动离心管），然后快速移至冰浴中，静置2分钟。

（4）向离心管中加入600μL的无菌的LB培养基（不加抗生素），混匀后置于摇床中37℃，180rpm，振摇1小时。目的是使质粒上相关的抗性标记基因表达，使菌体复苏。

（5）台式离心机中8000rpm离心2分钟，弃掉大部分培养基，留下部分培养基充分重悬起沉淀后，涂布到氨卞抗性固体培养基平皿中

（6）37℃培养箱中培养过夜。

**�挑取若干单克隆菌落，接种到氨卞抗性液体培养基中培养过夜**

�**小提质粒（威格拉斯质粒小/中量提取纯化试剂盒参照试剂盒使用说明进行）**

#### 1.3.1.5 重组腺病毒载体质粒的酶切鉴定

XhoI（根据重组后腺病毒载体的序列分析携带目的基因表达框的阳性克隆被

XhoI酶切后应该由以下8条带组成）：

阳性克隆：14.5k/11.7k/4.1k/2.66k/2.47k/1.45k/0.6k/0.5k没有重组的腺病毒空载体应该由以下6条带组成：

阴性克隆：14kb,11.8kb,4.0kb,2.47kb,1.45kb,0.6kb

酶切鉴定的反应条件如下：

重组病毒载体DNA 1μL

10×Buffer 1μL

10×BSA 1μL

XhoI (NEB,20 U/μL) 0.3μL

ddH2O补齐至10μL

总体积10μL

37℃1-2小时

### **1.3.2** 重组腺病毒**Ad-rat-ALDH2-siRNA-ERFP**的Th产与纯化实验流程

重组腺病毒载体质粒由1.3.1构建得到，详细构建流程及信息见1.3.1部分内容。

#### **1.3.2.1** 大量制备重组质粒

1）将对数生长期的菌液2ml加入100mL含100ug/ml Amp的LB培养基中；

2）37℃300rpm震荡摇菌过夜；

3）用威格拉斯大提质粒试剂盒提取质粒（操作步骤参照试剂盒说明）

#### **1.3.2.2** 重组腺病毒载体的包装，收毒及扩增

�**铺细胞**：

转染前一天，将293细胞接种于六孔板中，每孔5×105个细胞，培养基为DMEM+10% Hyclon胎牛血清，置37℃含5% CO2的培养箱中培养过夜。

**�腺病毒载体质粒的线性化**

转染前将鉴定正确的携带目的基因的腺病毒质粒用PacI限制性内切酶线性

化

酶切反应体系如下：

Ad-RFP–rALDH2 -siRNA 5ug

10×Buffer 5.0μL

PacI (NEB,20 U/μL) 1μL

ddH2O补齐至50μL

总体积50.0μL

�**转 染**

37℃3-4小时

转染当天换液，用新鲜的含10%胎牛血清的DMEM培养基继续培养。待细胞生长至底面积的80-90%时，取重组腺病毒载体质粒Ad-rALDH2- siRNA-

ERFP，用Lipofectamine2000脂质体按其所附说明书进行转染。具体步骤为：

a．每个转染孔取重组腺病毒载体质粒Ad-**rALDH2**-**siRNA**-ERFP5ug，用

300μl的DMEM培养液进行稀释，室温放置5分钟；

b．取10μl的脂质体用300μl的DMEM培养液进行稀释，室温放置5分钟；d．将两者混和，室温避光放置30分钟。然后将混合物加入到细胞中。

**�换液**

转染6小时后，更换新鲜的细胞培养液。每天观察细胞出毒迹象。出毒现象为细胞变大变圆，呈葡萄状，并开始出现明显噬斑。待细胞大部分病变并从底部脱落进行收毒。

**�收毒（P1）**

每天观察细胞出毒迹象。出毒现象为细胞变大变圆，呈葡萄状，并开始出现明显噬斑。待细胞大部分病变并从底部脱落进行收毒。将六孔板中两个孔的所有细胞及培养液收于15ml离心管中，放入-80℃冰箱保存。

**�冻融**

取一个能够容纳离心管架子的冰盒，放入干冰和酒精的混合物，打开恒温水浴锅至37℃，在干冰酒精及37℃水浴反复冻融三次后，3000转离心5分钟，收集含病毒的上清液，弃沉淀。该上清即为Ad-rALDH2-siRNA-ERFP第一代毒种

（P1），作为随后大量病毒扩增的毒种。

**�扩增**

从P1代病毒上清（约3 ml左右）中取2ml感染一个75cm2的细胞培养瓶的细胞（细胞密度保证90%以上）。余下的病毒上清放入外旋的冻存管中-80℃保留，做为毒种保留！！

**�收毒（P2）**

病毒扩增两天后待所有细胞脱落底面即可进行收毒，将细胞连同培养液一同收入15ml离心管中，2000转离心5分钟弃掉上清，加入1ml ST buffer（培养液+10%血清+2.5%甘油），votex混匀-80℃保存待用。依据前面的冻融方法，冻融三次，取上清进行下一代扩增或于－80℃保存。以后每代的病毒扩增及收毒都如此反复进行。

#### **1.3.2.3** 腺病毒大量扩增

�**腺病毒大量扩增**

1）按每个75cm2方瓶中接种4×106 293细胞，接种6个75cm2培养瓶，培养过夜，待细胞生长满至90%时，将P2代病毒（除取少量留毒种外）全部接种培养瓶内，24小时后显微镜下观察发现有60%细胞病变，46小时后细胞完全病变。

2）收获病变细胞混悬液后，2000rpm离心5分钟，离心，弃上清，加入6ml ST buffer（培养液+10%血清+2.5%甘油），votex混匀，于-80℃和37℃间冻融三次，3000rpm离心5分钟取上清，按同样方法接种于另外40个75cm2方瓶中，46 小时完全病变。

3）混悬液3000rpm离心，弃上清，细胞沉淀用腺病毒保存液重悬，经反复冻融后保存于-80℃保存待用

#### **1.3.2.4** 病毒的滴度测定及检测

1)测定OD260，并按照VP/ml=OD260×1.1×1012，计算得到每ml制品中的病毒颗粒数（VP/ml）

2）测定OD260/OD280该比值反应病毒的纯度正常范围为1.2 ~1.3之间。

3）用经典方法测定病毒制品的**TCID50**值。

**Ad-rat-ALDH2-siRNA-RFP重组腺病毒TCID50测定操作规程如下：**

**前言：**本检测须做两组重复实验，两组实验可在同一天进行也可在不同天进行。**材料：**293细胞；DMEM完全培养基，含有5％的FBS；病毒样品

**方法：**

培养293细胞，待细胞生长密度约为80-90％时，消化细胞并计数细胞数量。用含有5％FBS的DMEM培养液制备细胞悬液，每板需要11ml浓度为1×105/ml的细胞悬液。

按每孔100μl（即1×104个细胞）加入2个96孔板。制备感染样品

无菌操作进行第一组稀释：

对高浓度样品：106开始连续8个稀释梯度

对低浓度样品：104开始连续8个稀释倍数

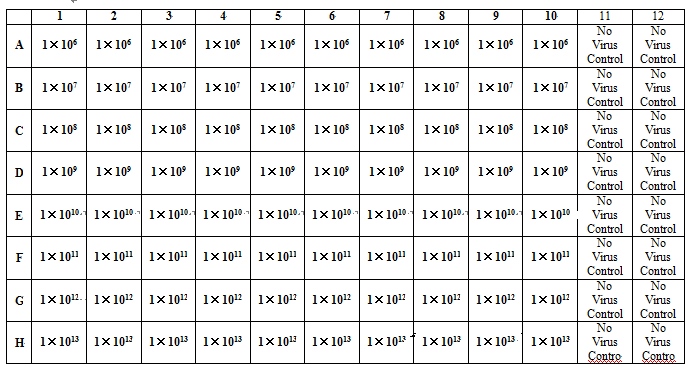
再进行第二组稀释，小心操作，以免将两组样品稀释液混淆。接种样品：

将96孔板中的11、12两列各加入100μl 5％FBS的DMEM，做阴性对照。

依次加入96孔板中的A-H排，各加100μl标记为8各连续梯度稀释的样品溶液。盖上第一个板并在37℃CO2培养箱中培养。

同样步骤操作第二块板。

盖上第二个板并在37℃CO2培养箱中培养。实验中培养板的结构如下：



注：样品稀释梯度可随具体情况调整

1. 将 96 孔板置于 37℃ CO2 培养箱中培养 10 天。从第 3 天到第 10 天观察细胞状况。

2. 第 10 天分析、记录 CPE 结果：

1）CPE 应在 10 天之内出现。

2）第10天在显微镜下观察每孔CPE情况，并与阴性对照的一排对比，记录每排样品的阳性孔数。

3）如有一个板被污染，实验必须重做。

3. 结果计算：

1）在第10天，（a）至少有一个样品稀释液在12个孔内CPE都是明显的。（b）至少有一个样品稀释液最少有3个但不多于9个孔内有明显的CPE。（c）至少有一个样品稀释液在12个孔内都是明显无

CPE。

2）病毒活性计算公式

对于100μl样品，滴度T＝101+d(s-0.5)

d＝log10稀释度＝1（对于10倍的稀释度而言）

s＝阳性比率之和（从第一个10倍稀释度算起）

将TCID50/ml转换成PFU/ml: T＝a×10bTCID50/ml＝a×10b-0.7PFU/ml

两次重复实验得到的滴度值应相差≤100.7**注意事项**

1.稀释病毒液时要充分混匀。

2.每次吸病毒液时要更换Tip头，以防导致稀释不准确。

结果：

稀释度 阳性比率

10-6 10/10=1

10-7 10/10=1

10-8 10/10=1

10-9 10/10=1

10-10 10/10=1

10-11 3/10=0.3

10-12 2/10=0.2

10-13 0/10=0

滴度：

T=101+(10.5-0.5) =1011TCID50/ml

将TCID50/ml换算成PFU/ml T=1011-0.7=2×1010PFU/ml

### **1.3.3** **Ad-CA-ALDH2-RFP**腺病毒载体构建流程

#### **1.3.3.1** 构建方法简要步骤

以前的研究[3-4]表明：持续活化的ALDH2 487位氨基酸必须是谷氨酸而不是赖氨酸，Thr185、Thr412和Ser279需磷酸化。因此，我们通过在野生型大鼠ALDH2的cDNA引入突变Lys487Glu，Thr185Asp，Thr412Asp和Ser279Asp，获得了持续活化突变型ALDH2（CA-ALDH2），即从CA-ALDH2原始质粒上扩增得到

CA-ALDH2基因[4]，用DNA重组技术将CA-ALDH2基因连接到pShuttle-CMV-RFP

重组穿梭载体，得到pShuttle-CA-ALDH2-RFP重组穿梭质粒；将pShuttle- CA-

ALDH2-RFP转移到pAdeno载体上，得到pAdeno-CA-ALDH2病毒质粒。

#### **1.3.3.2** 重组穿梭载体构建具体操作步骤

**引物设计**

CA-ALDH2的CDNA序列ORIGIN

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 gctttatctg ctaagctccg ctcagttcag catgctgcgc gccgcactca gcaccgcccg | | | | | | |
| 61 | ccgtgggcca | cgcctgagcc | gcctgctgtc | cgccgccgcc | accagcgcgg | tgccagcccc |
| 121 | caaccagcag | cccgaggtct | tctgcaacca | gatcttcatt | aacaatgagt | ggcatgatgc |
| 181 | tgtcagcaag | aaaacattcc | ccaccgtcaa | cccttccacg | ggggaggtca | tctgccaggt |
| 241 | agccgaaggg | aacaaggagg | acgtagacaa | ggcagtgaag | gccgctcagg | cagccttcca |
| 301 | gctgggctcg | ccctggcgcc | gcatggatgc | atctgacagg | ggccggctgt | tgtaccgatt |
| 361 | ggctgatctc | atcgaacggg | accggaccta | cctggcggcc | ttggagaccc | tggacaacgg |
| 421 | caagccttat | gtcatctcct | acctggtgga | tttggacatg | gttctgaaat | gtctccgcta |
| 481 | ttatgctggc | tgggctgaca | agtaccacgg | gaaaaccatt | cccatcgatg | gcgacttctt |
| 541 | cagctacacc | cgccacgagc | ctgtgggcgt | gtgtggacag | atcattccgt | ggaacttccc |
| 601 | gctcctgatg | caagcctgga | agctgggccc | tgccttggca | actggaaacg | tggtggtgat |
| 661 | gaaagtggcc | gagcagacac | cgctcactgc | actctacgtg | gccaacttga | tcaaggaggc |
| 721 | aggcttcccc | cctggtgtgg | tcaatattgt | tcctggattc | ggccctaccg | ccggggctgc |
| 781 | catcgcgtcc | cacgaggatg | tggacaaagt | ggccttcaca | ggttccactg | aggttggtca |
| 841 | cctaatccag | gttgccgccg | ggagcagcaa | tctcaagaga | gtaaccctgg | aactgggggg |
| 901 | aaagagcccc | aatatcatca | tgtcagacgc | tgacatggac | tgggctgtgg | aacaggccca |
| 961 | ctttgccctg | ttcttcaacc | agggccagtg | ctgttgtgcg | ggctcccgga | ccttcgtgca |
| 1021 | ggaggatgtg | tatgatgaat | tcgtggaacg | cagtgtggcc | cgggccaagt | ctcgggtggt |
| 1081 | cgggaaccct | ttcgacagcc | ggacggagca | ggggccgcag | gtggatgaga | ctcagtttaa |
| 1141 | gaagatcctg | ggctatatca | agtcaggaca | acaagaaggg | gcgaagctgc | tgtgcggtgg |
| 1201 | gggcgccgcc | gcagaccgtg | gttacttcat | ccagcccacc | gtgttcggag | acgtcaaaga |
| 1261 | tggcatgacc | atcgccaagg | aggagatctt | cggaccagtg | atgcagatcc | tcaaattcaa |
| 1321 | gaccattgag | gaggttgtgg | ggcgagccaa | taattccaag | tacgggctgg | ctgccgctgt |
| 1381 | cttcacaaag | gacctggaca | aggccaatta | cctgtcccaa | gctctgcagg | ctgggactgt |
| 1441 | gtggatcaac | tgctacgatg | tgtttggggc | ccagtcccca | tttggtggct | ataagatgtc |
| 1501 | ggggagcggc | agggagctgg | gcgagtatgg | cctgcaggcc | tacacggaag | tgaagacggt |
| 1561 | caccgtcaaa | gtgccacaga | agaactcgta | aagtggcgtg | caggcttcct | cagccagcgc |
| 1621 | ccaaaaaccc | aacaagatcc | tgagaaaagc | caccaccaag | cacactgcgc | ctgccaagag |
| 1681 | aaaacccctt | caccaaagcg | tcttgggcca | agaaagtcag | gatttgataa | acagggcagg |
| 1741 | gttggtgggc | ggtgtgtggg | gagcatccca | gtaaactggg | gaagggagga | gctctgtgca |
| 1801 | gactaccacg | cgcacgcaca | cacgctcact | gggtccttct | gtgctggatg | ctggttccac |
| 1861 | cctcagtgct | taaacaaatg | agcaataaa |  |  |  |

根据**CA-ALDH2 cDNA**序列信息设计如下引物，以CA-ALDH2原始质粒为模板，用高保真酶(pfx DNA ploymerase)扩增CA-ALDH2目的基因。引物序列如下：

CA-ALDH2-SfiI-F: AAAAGGCCAAGCTCCGCTCAGTTCAG CA-ALDH2-SfiI-R: AAAAGGCCTCCTCCCTTCCCCAGTT

� **将pShuttle-CMV-RFP重组穿梭载体用SfiI酶切，CIP去磷酸化处理，切胶回**

**收3.4kb载体片段**

酶切体系及反应条件

载体质粒 DNA 2 ug

10×Buffer 5.0μL

10×BSA 5.0μL

SfiI (NEB,20 U/μL) 1.5μL

ddH2O补齐至50.0μL

总体积50.0μL

37℃ 3-4 小时

CIP 0.5μL

37℃ 0.5 小时

酶切完成后加样至1%的琼脂糖凝胶，电泳，在紫外灯下切下目的片段，用DNA凝胶回收与纯化试剂盒（柱离心型）（具体步骤参照试剂盒使用说明）回收（为避免紫外照射时间过久损伤DNA，本步骤不存有电泳图）

�**以CA-ALDH2原始cDNA质粒为模板，用高保真酶(pfx DNA ploymerase)扩增CA-ALDH2目的基因，切胶回收约2.3Kb插入片段**

PCR体系

模版 1.0μL

CA-ALDH2-F-BamHI (10μM) 1.5μL

CA-ALDH2-R-EcoRI(10μM) 1.5μL

dNTP(each 10μM) 1.5μL

50mM MgSO4 1μL

10×pfx Amplification Buffer 5μL pfx DNA ploymerase(invitrogen, 2.5U/μL) 0.6μL

ddH2O补齐至50μL

总体积 50μL



**PCR扩增CA-ALDH2电泳结果**

M 1



M: Marker(1kb DNA ladder)

从上到下是:10kb,8kb,6kb,5kb,4kb,3.5kb,3kb,2.5kb,2kb,1.5kb,1kb,750bp,500bp, 250bp

1: PCR扩增CA-ALDH2电泳结果

PCR结束后加样至1%的琼脂糖凝胶，电泳，在紫外灯下切下目的片段，用DNA

凝胶回收与纯化试剂盒（柱离心型）（具体步骤参照试剂盒使用说明）回收

�**将回收后的PCR片段进行SfiI酶切处理，得到含有相应粘性末端（SfiI）的片段**

酶切体系及反应条件

PCR回收DNA片段30μL

10×Buffer 5μL

10×BSA 5μL

SfiI (NEB,20 U/μL) 1μL

ddH2O补齐至50.0μL

总体积50.0μL

37℃3-4小时

酶切结束后，用DNA纯化试剂盒（柱离心型）回收相应片段（具体操作步骤参照试剂盒使用说明）

�**将处理好的载体片段和插入片段用T4 DNA连接酶进行连接**

连接体系及反应条件

回收的目的DNA产物片段6μL

回收的载体DNA产物片段2μL

10×ligase Buffer 1μL

T4 DNA ligase(5 Weiss u/μL) 1μL

总体积10.0μL

22℃3-4小时

**�取3μL连接产物转化化学感受态细胞DH5a菌株，涂布到卡那抗性固体培养基平皿**

转化的具体步骤：

(1)从-80℃取出提前制备好的DH5a感受态置于冰浴中

(2)待DH5a感受态细胞融化后，取3μL连接产物于50μL DH5a感受态细胞中，充分混匀，冰浴中静置30分钟

(3)将离心管放入42℃水浴锅中90秒（期间不要摇动离心管），然后快速移至冰浴中，静置2分钟。

(4)向离心管中加入600μL的无菌的LB培养基（不加抗生素），混匀后置于摇床中37℃，180rpm，振摇1小时。目的是使质粒上相关的抗性标记基因表达，使菌体复苏。

(5)台式离心机中8000rpm离心2分钟，弃掉大部分培养基，留下部分培养基充分重悬起沉淀后，涂布到卡那抗性固体培养基平皿中

(6) 37℃培养箱中培养过夜。

**�挑取若干单克隆菌落，接种到卡那抗性液体培养基中，摇床中37℃300rpm振**

**荡培养过夜**

�**小提质粒（威格拉斯质粒小/中量提取纯化试剂盒，具体操作步骤参照试剂盒使用说明）**

#### **1.3.3.3** 重组穿梭载体质粒酶切鉴定

SfiI酶切鉴定

阴性克隆将得到：3.4kb一条带

阳性克隆将得到：2.3kb/3.4kb两条带，（正确，我们想得到的）酶切鉴定体系及反应条件

穿梭质粒DNA 1μL

10×Buffer 1μL

10×BSA 1μL

SfiI (NEB,20 U/μL) 0.3μL

ddH2O补齐至10μL

总体积10μL

37℃1-2小时

酶切完成后加样至1%的琼脂糖凝胶，电泳

#### **1.3.3.4** 重组腺病毒载体质粒构建具体步骤

**将验证正确的pShuttle-CA-ALDH2转移到pAdeno载体上，得到pAdeno- CA-**

**ALDH2病毒质粒**

**I-CeuI+I-SceI双酶切处理pAdeno载体，并做CIP去磷酸化处理**

酶切体系及反应条件

pAdeno 载体质粒 DNA 3-4 ug 10×Buffer 5μL

10×BSA 5μL

I-CeuI (NEB,5U/μL) 2μL

I-SceI (NEB,5 U/μL) 2μL

ddH2O补齐至50μL

总体积 50μL

37℃ 3-4 小时

CIP 0.5μL

37℃0.5小时

**�上述酶切反应体系中加入10SDS 75℃ 灭活10**分钟



�**用乙醇沉淀法回收载体**

乙醇沉淀法具体步骤

（1）加去离子水补到150µl，然后加入75µl的酚，75µl的氯仿，充分混匀，

12000rpm离心5分钟，

（2）吸上清至新的离心管中，加入1/10体积的3M PH5.2的NaOAc，再加入2.5倍体积的无水乙醇，-20℃沉淀15分钟，

（3）4℃离心15分钟，小心吸去上清，加入500µl 70％乙醇，4℃离心5分钟，小心吸去上清

（4）重复上一步骤一次

（5）晾干3-5分钟，加入适量的去离子水溶解。

**I-CeuI+I-SceI双酶切处理插入片段pShuttle-CA-ALDH2，跑胶回收含目的基因的片段**

酶切体系及反应条件

穿梭质粒DNA 2 ug

10×Buffer 5μL

10×BSA 5μL

I-CeuI (NEB,5U/μL) 2μL

I-SceI (NEB,5 U/μL) 2μL

ddH2O补齐至50μL

总体积50μL

37℃3-4小时

酶切完成后加样至1%的琼脂糖凝胶，电泳，在紫外灯下切下目的片段，用DNA凝胶回收与纯化试剂盒（柱离心型）（具体步骤参照试剂盒使用说明）回收（为避免紫外照射时间过久损伤DNA，本步骤不存有电泳图）

�**将处理好的载体片段和插入片段用T4 DNA连接酶进行连接**

连接体系及反应条件

回收的目的DNA产物片段6μL

回收的载体DNA产物片段2μL

10×ligase Buffer 1μL T4 DNA ligase(5 Weiss u/μL) 1μL

总体积10.0μL

22℃3-4小时

� **取3μL连接产物转化化学感受态细胞DH5a菌株，涂布到氨卞抗性固体培养基平皿**

转化的具体步骤：

（1）从-80℃取出提前制备好的DH5a感受态置于冰浴中

（2）待DH5a感受态细胞融化后，取3μL连接产物于50μL DH5a感受态细胞中，充分混匀，冰浴中静置30分钟

（3）将离心管放入42℃水浴锅中90秒（期间不要摇动离心管），然后快速移至冰浴中，静置2分钟。

（4）向离心管中加入600μL的无菌的LB培养基（不加抗生素），混匀后置于摇床中37℃180rpm振摇1h。目的是使质粒上相关的抗性标记基因表达，使菌体复苏。

（5）台式离心机中8000rpm离心2分钟，弃掉大部分培养基，留下部分培养基充分重悬起沉淀后，涂布到氨卞抗性固体培养基平皿中（6）37℃培养箱中培养过夜

**�挑取若干单克隆菌落，接种到氨卞抗性液体培养基中培养过夜**

�**小提质粒（威格拉斯质粒小/中量提取纯化试剂盒，具体步骤参照试剂盒使用说明）**

#### **1.3.3.5** 重组腺病毒载体质粒酶切鉴定

XhoI（根据重组后腺病毒载体的序列分析携带目的基因表达框的阳性克隆被XhoI

酶切后应该有以下7条带组成）：

阳性克隆：14K/11.7K/3.1K/2.66kb/2.47K/1.45K/0.6K

没有重组的腺病毒空载体应该由以下6条带组成：

阴性克隆：14.5kb,11.7kb,4.0kb,2.47kb,1.45kb,0.6kb酶切鉴定的反应条件如下：

重组病毒载体DNA 1μL

10×Buffer 1μL

10×BSA 1μL

XhoI (NEB,20 U/μL) 0.3μL

ddH2O补齐至10μL

总体积10μL

37℃1-2小时

酶切完成后加样至1%的琼脂糖凝胶，电泳

### **1.3.4** 重组腺病毒**Ad-CA-ALDH2-RFP**的Th产与纯化实验流程

重组腺病毒载体质粒由1.3.3构建得到，详细构建流程及信息见1.3.3部分内容。

#### **1.3.4.1** 大量制备重组质粒

1）将对数生长期的菌液2ml加入100mL含100ug/ml Amp的LB培养基中；

2）37℃300rpm震荡摇菌过夜；

3）用威格拉斯大提质粒试剂盒提取质粒（步骤参照试剂盒说明）

#### **1.3.4.2** 重组腺病毒载体的包装，收毒及扩增

�**铺细胞：**

转染前一天，将293细胞接种于六孔板中，每孔5×105个细胞，培养基为

DMEM+10% Hyclon胎牛血清，置37℃含5% CO2的培养箱中培养过夜。

**�腺病毒载体质粒的线性化**

转染前，将鉴定正确的携带目的基因的腺病毒质粒用PacI限制性内切酶线性化酶切反应体系如下：

Ad-CA-ALDH2-RFP 5ug

10×Buffer 5.0μL

PacI (NEB,20 U/μL) 1μL

ddH2O补齐至50μL

总体积50.0μL

37℃3-4小时

�**转 染**

转染当天换液，用新鲜的含10%胎牛血清的DMEM培养基继续培养。待细胞生长至底面积的80-90%时，取重组腺病毒载体质粒Ad-CA-ALDH2-RFP，用

Lipofectamine2000脂质体按其所附说明书进行转染。具体步骤为：

a．每个转染孔取重组腺病毒载体质粒Ad-CA-ALDH2-RFP 5ug，用300μl的DMEM

培养液进行稀释，室温放置5分钟。

b．取10μl的脂质体用300μl的DMEM培养液进行稀释，室温放置5分钟。

d．将两者混和，室温避光放置30分钟，然后将混合物加入到细胞中。

**�换液**

转染6小时后，更换新鲜的细胞培养液。每天观察细胞出毒迹象。出毒现象为细胞变大变圆，呈葡萄状，并开始出现明显噬斑。待细胞大部分病变并从底部脱落进行收毒。

� **收毒（P1）：**

每天观察细胞出毒迹象。出毒现象为细胞变大变圆，呈葡萄状，并开始出现明显噬斑。待细胞大部分病变并从底部脱落进行收毒。将六孔板中两个孔的所有细胞及培养液收于15ml离心管中，放入-80℃保存。

**�冻融：**

取一个能够容纳离心管架子的冰盒，放入干冰和酒精的混合物，打开恒温水浴锅至37℃，在干冰酒精及37℃水浴反复冻融三次后，3000转离心5分钟，收集含病毒的上清液，弃沉淀。该上清即为Ad-CA-ALDH2-RFP第一代毒种（P1），作为随后大量病毒扩增的毒种。

**�扩增：**

从P1代病毒上清（约3 ml左右）中取2ml感染一个75cm2的细胞培养瓶的细胞（细胞密度保证90%以上）。余下的病毒上清放入外旋的冻存管中-80℃保留，做为毒种保留！！

� **收毒（P2）：**

病毒扩增两天后待所有细胞脱落底面即可进行收毒，将细胞连同培养液一同收入15ml离心管中，2000转离心5分钟弃掉上清，加入1ml ST buffer（培养液+10%血清+2.5%甘油），votex混匀-80℃保存待用。依据前面的冻融方法，冻融三次，取上清进行下一代扩增或于－80℃保存。以后每代的病毒扩增及收毒都如此反复进行。

#### **1.3.4.3** **Ad-CA-ALDH2**腺病毒**PCR**检验报告

**PCR检测：**

取10µl腺病毒做如下处理：

Virus 10µl

Priteinase K(10mg/ml) 2µl

ddH2O 38µl

50µl反应体系



50℃水浴1小时



100℃煮沸5分钟



PCR检测

以上述反应产物为模板，分别以CA-ALDH2-SfiI-F和CA-ALDH2-SfiI-R为引物做

PCR反应

**PCR引物：**

CA-ALDH2-SfiI-F: AAAAGGCCAAGCTCCGCTCAGTTCAG CA-ALDH2-SfiI-R: AAAAGGCCTCCTCCCTTCCCCAGTT

**PCR体系：**

**PCR条件：**

模板1µl

Primer F 1ul

Primer R 1ul

10×Taq Buffer 5ul

DNTP (10uM) 1ul

Taq 0.5ul

ddH2O 40.5ul

**50ul**

94℃5分钟94℃ 30s 58℃30s 72℃2.5 分钟72℃10分钟4℃保存

30 Cycles

#### **1.3.4.4** 病毒的滴度测定及检测

用经典方法测定病毒制品的TCID50值，Ad-CA-ALDH2-RFP重组腺病毒TCID50测定操作规程同Ad-ALDH2-siRNA-RFP重组腺病毒TCID50测定操作规程。

结果：

稀释度 阳性比率

10-6 10/10=1

10-7 10/10=1

10-8 10/10=1

10-9 10/10=1

10-10 10/10=1

10-11 3/10=0.3

10-12 1/10=0.1

10-13 0/10=0

滴度：

T=101+(10.4-0.5) =1010.9TCID50/ml

将TCID50/ml换算成PFU/ml T=1010.9-0.7=1.6×1010PFU/ml

### **1.3.5** 腺病毒感染心肌细胞及**Western blot**分析腺病毒的转染效果

#### **1.3.5.1** 新生大鼠心肌细胞的培养和感染

表达RFP、si-ALDH2和RFP、持续活化的ALDH2（CA-ALDH2）突变体以及CA-ALDH2和RFP的病毒载体使用的是AdEasy系统（Stratagene公司）[5]。从新生1日龄SD雄性大鼠的心室中分离得到心肌细胞，按1×105 cells/cm2的密度接种于60mm的培养皿中并用NCS-DMEM在37°C和5% CO2条件下培养心肌细胞24小时后，当细胞密度达到约70%的融合度时，将细胞在含有10% FBS的培养基中培养过夜，然后加入构建好的腺病毒液以感染复数（MOI）20感染心肌细胞6小时，此后在不含血清的培养基中再培养24小时，再添加试剂进行实验。

#### **1.3.3.2** **Western Blot**验证干扰及过表达效率

�用预冷的RIPA裂解液裂解上述心肌细胞，并用BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量；

�灌胶：配置12%的分离胶和5%的浓缩胶。以上两种胶配置时一旦加入

TEMED，应快速混匀后迅速在玻璃夹层灌注混合液；

�上样：取出上样样品至200µl的EP管中，加入1/4体积5XSDS上样缓冲液，计算含50µg蛋白的溶液体积为上样量。

�电泳和转膜：浓缩胶时用90V电压，到分离胶以后用120V电压，电泳至溴酚蓝刚跑出即可终止电泳。然后进行转膜将凝胶中的蛋白质转移到PVDF膜上；

�封闭：将印迹后的PVDF膜放入盛有封膜液的平皿中，室温孵育封闭2小时；

�免疫反应：用抗体稀释液按1: 1000稀释兔抗大鼠ALDH2抗体，按1: 500稀释抗大鼠β-actin抗体，4℃孵育过夜。把PVDF膜用TBST（1:2000）稀释的HRP标记的ft羊抗兔IgG二抗，室温下孵育2小时。

�ECL显影：将ECL试剂盒A和B两种试剂等体积混合浸没PVDF膜约1分钟后吸去过多试剂。在暗室中，把X-光胶片放在保鲜膜包裹好的膜上，根据信号的强弱适当调整曝光时间，显影定影后立即冲洗；将胶片进行扫描或拍照，用凝胶图象处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。

## **1.4** 实验结果

### **1.4.1** 重组穿梭质粒酶切鉴定结果

pShuttle-RFP-Rat-ALDH2-siRNA BglII酶切鉴定结果，见图1:

M 1 2



**图1**  **pShuttle-RFP-Rat-ALDH2-siRNA 鉴定结果图**

M: Marker(1kb DNA ladder)

从上到下是:10kb,8kb,6kb,5kb,4kb,3.5kb,3kb,2.5k,2kb,1.5kb,1kb,750bp,500bp,250bp 1-2: 阳性克隆

### **1.4.2** 重组腺病毒质粒鉴定结果

p**Adeno**-RFP-Rat-ALDH2-siRNA XhoI酶切鉴定结果，见图2

M 1 2



**图2**  **pAdeno-RFP-Rat-ALDH2-siRNA 鉴定结果图**

M: Marker(1kb DNA ladder)

从上到下是:10kb,8kb,6kb,5kb,4kb,3.5kb,3kb,2.5k,2kb,1.5kb,1kb,750bp,500bp,250bp 1-2: 阳性克隆；

### **1.4.3** 腺病毒空质粒鉴定结果

p**Adeno**空载体XhoI酶切鉴定结果，见图3

1 M



**图3**  **pAdeno空载体XhoI酶切电泳图（阴性对照）**

M: Marker(1kb DNA ladder)

从上到下是:10kb,8kb,6kb,5kb,4kb,3.5kb,3kb,2.5k,2kb,1.5kb,1kb,750bp,500bp,250bp

1: 阴性克隆14kb,11.8kb,4.0kb,2.47kb,1.45kb,0.6kb

### **1.4.4** **PCR**扩增**CA-ALDH2**电泳结果

M CA



**图4** **PCR扩增CA-ALDH2电泳结果**

M: Marker(1kb DNA ladder)

从上到下是:10kb,8kb,6kb,5kb,4kb,3.5kb,3kb,2.5kb,2kb,1.5kb,1kb,750bp,500bp, 250bp

CA: PCR扩增CA-ALDH2电泳结果

### **1.4.5** 重组穿梭质粒酶切鉴定结果

pShuttle-CA-ALDH2 SfiI酶切鉴定结果，见图5:

M 1 2 3 4 M



**图5** **pShuttle-CA-ALDH2鉴定结果**

M: Marker(1kb DNA ladder)

从上到下是:10kb,8kb,6kb,5kb,4kb,3.5kb,3kb,2.5kb,2kb,1.5kb,1kb, 750bp, 500bp, 250bp

1：阳性克隆；2.3kb/3.4kb（选择验证正确的1#进行下游实验）

### **1.4.6** 重组腺病毒质粒酶切鉴定结果

pAdeno-CA-ALDH2 XhoI酶切鉴定结果，见图6

1 2 3 M



**图6** **pAdeno-CA-ALDH2鉴定结果**

M: Marker(1kb DNA ladder)

10Kb,8kb,6kb,5kb,4kb,3.5kb,3kb,2.5kb,2kb,1.5kb,1kb, 750bp, 500bp 1, 2AC- CA-ALDH2-RFP阳性克隆；

3：错误克隆；

### **1.4.7** 腺病毒空质粒酶切鉴定结果

pAdeno空载体XhoI酶切鉴定结果，见图7

1 M



**图7** **pAdeno空载体XhoI酶切电泳图（阴性对照）**

M: Marker(1kb DNA ladder)

从上到下是: 10kb,8kb,6kb,5kb,4kb,3.5kb,3kb,2.5kb,2kb,1.5kb,1kb, 750bp, 500bp, 250bp

1: 阴性克隆14kb,11.8kb,4.0kb,2.47kb,1.45kb,0.6kb

### **1.4.8** **Ad-CA-ALDH2**腺病毒**PCR**检验结果

PCR电泳结果，见图 8

**M** 1 2 3



**图8** **PCR电泳结果图**

M: 分子量markerDL2000(从上至下为：2000bp,1000bp,750bp,500bp,250bp,100bp) 1: **CA-ALDH2-RFP**病毒，**(Ad-CA-ALDH2AC-RFP**为模板)

2: pShuttle-CMV-CA-ALDH2-RFP质粒

3: 阴性对照(Ad-null为模板)

### **1.4.9** **Western blot** 测定腺病毒的转染效果



**图 9** **Western blot检测ALDH2基因干扰RNA腺病毒的干扰效果**

与未经ALDH2基因干扰RNA腺病毒感染的心肌细胞相比在Ad-Si-ALDH2感染的

心肌细胞中总ALDH2蛋白的表达水平显著降低用β-actin衡量上样量的一致性



**图 10** **Western Blot验证ALDH2过表达效率**

与未经持续活化突变型ALDH2（CA-ALDH2）腺病毒感染的心肌细胞相比在

Ad-CA-ALDH2-RFP感染的心肌细胞中ALDH2蛋白表达水平大幅度增加用

β-actin来衡量上样量的一致性





**图 11** **ALDH2基因干扰RNA腺病毒载体示意图**

**图 12** **持续活化突变型ALDH2（CA-ALDH2）腺病毒载体示意图**

## **1.5** 讨论

醛脱氢酶(Aldehyde dehydrogenase, ALDH)是一组NAD(P) +依赖性酶，广泛参与体内醛类物质的氧化反应（脱氢作用）[6]。线粒体醛脱氢酶(Aldehyde dehydrogenase 2, ALDH2)是醛脱氢酶的亚型之一[**7**]，研究表明，ALDH同工酶中以ALDH2的活性最强，ALDH2是存在于线粒体内的一种氧化乙醛的酶，因此也称为乙醛脱氢酶2，而且它与生物氧化有密切的关系，可防止乙醛对膜的脂质过氧化，减少活性氧代谢产物4-HNE等对细胞的损害[**8**]在清除体内醛类物质中起主要作用。由于醛类物质具有很强的氧化活性和细胞毒性，各种因素引起的

ALDH2失活均可导致醛类物质堆积，对机体组织、器官等造成不可逆性损伤。研究发现ALDH2活性变化与酒精、缺血等因素引起的心肌损伤和硝酸甘油耐受的发生密切相关。

ALDH2在人群中分布表现为基因多态性：人编码ALDH2的基因在第12个外显子存在着碱基A被G替换的基因多态性，导致504位的谷氨酸残基突变为赖氨酸（E504K），即ALDH2 504 位点存在A 被G 替代的单核苷酸多态性，这一突变使ALDH2出现三种不同的基因型：野生型(ALDH2\*1/\*1，酶活性正常)、

突变杂合子型(ALDH2\*2/\*1, 酶活性下降30％-50％)以及突变纯合子型(ALDH2\*2/\*2，酶活性基本丧失)。ALDH2的基因多态性可以直接影响体内乙醇和乙醛的浓度，从而可能与嗜酒及酒精相关性疾病的发生有关，ALDH2的缺陷基因型可导致饮酒后乙醛蓄积，后者是肯定的致癌剂，与肿瘤发生有关[**9, 10,11**]。有实验显示ALDH2催化短链的醛类如乙醛等，可使乙醛变成乙酸，并且分解乙醛衍生物4-HNE，减轻乙醛对细胞的氧化损伤[**12**]。已经发现ALDH2活性的降低可使乙醛向乙酸盐分解的过程受阻，使体内乙醇代谢的中间产物乙醛的浓度显著增高，导致血中乙醛积聚，刺激肥大细胞释放血管活性物质使血管舒张而出现脸红、出汗、发音困难、心动过速、恶心和低血压等反应。ALDH2\*2/\*2纯合子者饮酒后血中乙醛的含量比野生型者升高6-20倍，乙醛的强烈舒血管作用是导致这些人容易脸红的主要原因[**13**]。

研究发现45%左右的东亚人群携带着这种突变型的基因[14-15]。有报道表明在亚洲一些人群中，如中国的汉族，日本等民族，存在高频率的缺陷型人类乙醛脱氢酶2(ALDH2\*2)，即第12个外显子上的一个单核苷酸多态(SNP)，该核苷酸的变化直接导致了该密码子编码的赖氨酸转变为谷氨酸，使缺陷型的ALDH2\*2对乙醛的催化活性几乎丧失。美国约有10％的心绞痛患者对硝酸甘油药物无效，而在中国汉族比例高达25％以上，这些都是缺陷型的ALDH2\*2所致[**16**]。

与ALDH2缺失引起一系列疾病及耐药性反应相反，高表达ALDH2能保护机体应对氧化胁迫，发挥较强的抗凋亡作用。本部分实验分别构建了抑制ALDH2基因表达的腺病毒载体pAdeno-RFP-Rat-ALDH2-siRNA和表达持续活化型

ALDH2腺病毒载体Ad-rat-CA-ALDH2-ERFP，为下一步研究ALDH2基因被抑制和被持续活化状态下在IsoP的心脏保护中的作用奠定了基础。

## **1.6** 结论

成功构建了pAdeno-RFP-Rat-ALDH2-siRNA病毒载体, Western blot结果表明该siRNA能显著地抑制ALDH2基因在大鼠心肌细胞中的表达；成功构建了pAdeno-Rat-CA-ALDH2-RFP病毒载体，Western blot结果表明该基因能在心肌细胞中持续表达。

# **第二部分** **ALDH2**的抗心肌细胞凋亡作用机制及其与**IsoP**

**的关系**

## **2.1** 前言

前期我们构建了抑制大鼠ALDH2基因表达的腺病毒载体Ad-si- ALDH2-

RFP和表达持续活化型的ALDH2腺病毒载体Ad-CA-ALDH2-RFP，并成功地转染了大鼠心肌细胞。为了全面地分析ALDH2及PKC信号通路在IsoP抵抗MIRI中的作用机理，本研究采用RNA干扰技术(RNA interference, RNAi)沉默ALDH2基因，观察ALDH2基因被抑制后对IsoP保护体外原代培养的新生大鼠心肌细胞免受H/R损伤作用的影响；另外我们通过转入持续活化的ALDH2基因：CA-ALDH2，研究了ALDH2基因在持续活化状态下对IsoP保护新生大鼠心肌细胞免受H/R损伤作用的影响。通过在基因水平特异性激活或抑制ALDH2，研究ALDH2在IsoP抵抗心肌细胞凋亡中的作用，并探索其抗凋亡机制。ALDH2的抗心肌细胞凋亡作用机制目前尚未完全清楚，ALDH2与IsoP在心脏保护中的相互作用关系的研究未见报道。因此我们假设ALDH2在IsoP诱导的心脏保护中发挥关键作用。

## **2.2** 实验材料

**2.2.1主要实验试剂与药品**

异氟烷（Is oflurane）美国雅培制药有限公司

TUNEL原位细胞凋亡检测试剂盒德国Roche公司

Caspase-3比色检测试剂盒美国MBL公司

BCA蛋白定量试剂盒美国Pierce公司

C a s p a s e - 3 抗体 美国 C e l l S i g n a l i n g 公司 Cytotoxicity Detection Kit (LDH) 德国 Roche 公司抗大鼠β-actin SANTA CRUZ 公司

## HRP标记的ft羊抗兔IgG二抗SANTA CRUZ公司Cytotoxicity Detection Kit(LDH)德国Roche公司其他试剂及试剂的配制见第一部分

**2.2.2主要实验仪器**

气相色谱仪（GC-8A）日本京都岛津制作所

7600全自动生化分析仪日本Hitachi公司厌氧袋日本三菱瓦斯化学公司制

其他仪器见第一部分

**2.3****实验方法**

**2.3.1心肌细胞的培养和感染、IsoP和H/R处理**

从1日龄新生Sprague-Dawley雄性大鼠（由清华大学实验动物中心提供）取心脏，只保留心室，并保存在冰浴的无Ca2+和Mg2+的PBS中。用眼科小剪将心脏剪成约1 mm3的组织碎块，加入0.1%的胰蛋白酶溶液，其量约为心脏组织的5倍。心室在0.1％胰蛋白酶溶液中迅速搅碎。弃去第一次消化后释放的细胞，而随后消化的细胞用NCS-DMEM（加入20％NCS，100 U / ml青霉素，100μg/ ml链霉素的DMEM）培养。胰蛋白酶逐步消化后（10分钟，4-5次），将混合物离心（1500转/分，5分钟）。将细胞重悬在NCS-DMEM中，然后先转移到培养皿中，在37℃的ＣＯ２培养箱中培养1小时用差速贴壁法析出成纤维母细胞**[1]**。悬浮的细胞再接种的密度为1×104 cells/cm2和上述相同的条件下温育。接种后前2天向培养基中加入溴脱氧尿苷（BrdU, 0.1mM）,以抑制成纤维母细胞的生长。

心肌细胞的腺病毒感染方法同第一部分1.3.5.1**；**通过在含0.5 mM异氟烷（约1.0

最小肺泡浓度）的0.5％FBS的DMEM中培养细胞5分钟，进行**IsoP**；在缺氧处理前迅速除去含异氟烷的培养基并用PBS洗涤细胞**[2]**。麻醉药浓度用气相色谱法测定；然后进行体外模拟I/R制备H/R模型实验：用含0.5％FBS的DMEM在低氧室中培养心肌细胞，低氧室中含饱和的5％CO2/95％N2并放置一个厌氧

袋，在37℃下进行24小时培养然后复氧12小时（95%空气5%CO2），并在正常含0.5％FBS的DMEM中培养**[3]**。细胞分组如下：质粒(Ad-RFP)异氟烷处理和未处理、Adeasy-Si-ALDH2异氟烷处理和未处理、Adeasy-CA-ALDH2异氟烷处理和未处理。

**2.3.2心肌细胞凋亡检测**

为了定量确定心肌细胞的凋亡情况，采用TUNEL法在原位检测心肌细胞凋亡。方法为根据制造商提供的说明，使用TUNEL原位细胞凋亡检测试剂盒进行检测。从不同实验组（包括对照组和处理组）各取105/ml心肌细胞培养在含爬片的6孔板中。在各实验组的心肌细胞爬片上滴加4%多聚甲醛室温（15℃

-25℃）固定细胞1小时，PBS冲洗2次，去尽PBS后，接着用蛋白酶K（10µg/ml）在37℃下消化15分钟，去尽PBS后，滴加100μl由PBS配制的0.1%TritonX-100液于4℃下处理5分钟，使细胞通透性增强，PBS清洗2次，待爬片干后，各实验组滴加50μl含有TdT和荧光素标记的dUTP的TUNEL反应混合液于心肌细胞标本上，加盖玻片在暗湿盒中于37℃孵育1小时, PBS漂洗3次。在荧光显微镜下计数凋亡细胞（激发光波长为495nm，检测光波长为545nm），以核为绿色为阳性结果判定的标准，可在显微镜下观察到细胞核着色的凋亡细胞。末端标记阳性细胞的百分数通过在每张爬片中随机选取视野确定。在荧光显微镜下观察细胞凋亡情况并进行拍照，在每个实验组中，至少计数500个细胞。每张

爬片计数5个视野，以凋亡细胞占所测细胞总数的百分比作为凋亡指数(AI))。阳性对照组先加入100μlDNase1，在15℃-25℃反应10分钟，后面步骤同实验组。阴性对照为不加TDT液处理的细胞。每个实验组用5个独立的实验样品进行实验。

**2.3.3测定Caspase-3活性**

**测定方法：**使用Caspase-3比色检测试剂盒，根据制造商的操作说明来测定

Caspase-3的活性。

**测定原理：**活化的Caspase-3能够识别底物分子中的4-5个氨基酸序列，其羧基端是一个天冬氨酸残基，Caspase-3 识别的序列是DEVD，切割位点紧

随第二个天冬氨酸残基。在Caspase-3的底物多肽DEVD上标记pNA (p-nitroanilide, p硝基苯胺)，当活化的Caspase-3特异剪切pNA标记的多肽底物DEVD- pNA (acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide)后，释放出游离的pNA。游离的pNA呈黄色，在405 nm附近具有最大吸收峰，用酶标仪可测定吸光度来检测Caspase-3的活性。游离的pNA释放量与样品中活化的Caspase-3的活性成正比，因此可根据pNA标准管吸光度OD值和标准曲线，计算来自底物肽释放的

pNA浓度，得到样品中Caspase-3的水解活性，从而反映Caspase-3被活化的程度。

**测定Caspase-3活性的主要步骤：**

1）心肌细胞培养在6孔板中，从各实验组分别收获1X106细胞，用PBS洗细胞2次，将其转入EP管，400Xg 离心5分钟弃尽上清；

2）用预冷的200μL细胞裂解缓冲液重悬细胞并在冰浴孵育细胞10分钟；

3）将细胞裂解物在4oC 10,000Xg离心5分钟，收集上清即为细胞总蛋白。将上清（cell extracts）转移到新的离心管中并置于冰上。取少量上清用BCA法进行样品蛋白质浓度测定（蛋白质定量），然后用细胞裂解液调整各实验组总蛋

白液浓度为2µg/µl。

4）在96孔板的每孔中加入50μL含有10mM DTT的2X反应缓冲液【注】临用前才将10mM DTT加到2X反应缓冲液中；

5）实验设空白对照孔和待测样品孔，待测样品孔加50μL/孔经过定量的细胞总蛋白，每个样品加一个复孔；空白孔加50µl/孔细胞裂解液而不加细胞总蛋白来测量空白吸光度；

6）在每孔（空白对照孔和待测样品孔）中均加入5μL Caspase-3底物

DEVD-pNA；

7）用膜封闭96孔板在37℃下孵育2小时；8）空白孔加100μL/孔pNA (p-nitroanilide)标准品；

9）孵育结束后，用酶标仪在405nm处读取每孔的吸光度值。用pNA的吸

光度值绘制标准曲线。用试剂盒给定的计算公式计算每个样品的Caspase-3活性。每个样品做两个复孔，每个实验组用5个独立的实验样品进行实验**。**

**2.3.4 Western blot检测各实验组心肌细胞凋亡通路蛋白Cleaved Caspase-3 和**

**FL Caspase-3蛋白表达的变化：蛋白样品的制备**

�细胞总蛋白的提取：收获各实验组106细胞，用PBS洗细胞2次，将其转入

EP管，400Xg离心5分钟并弃尽上清，用手指把细胞用力弹散；每个EP

管细胞加入150µl预冷的RIPA裂解液（加有1mM PMSF）吹打均匀后在

4℃下进行裂解15分钟；充分裂解后将匀浆于4℃12000×g离心力离心5分钟。收集上清液，并用BCA蛋白定量试剂盒，根据制造商（Pierce公司）的操作说明，测定蛋白样品的浓度。然后作量的均衡处理。将可溶性上清液分装至少两份于干净的离心管中，用液氮冷冻，并储存在-70℃下。

�蛋白样品的处理：计算含50μg蛋白的溶液体积为上样量，根据测定的蛋白浓度，用RIPA裂解液均衡各实验组的样品蛋白液浓度为10μg/μl后，加入5Xloading buffer，加蒸馏水补足体积后，100℃加热变性5分钟，一20℃贮存备用或冷却到室温后，直接上样，每个泳道上样50μg可溶性提取物。

**SDS-PAGE电泳**

�**灌胶：**将配置好的分离胶（丙烯酰胺溶液）灌至距矮玻璃板顶2cm处，注入ddH2O封胶压平液面，室温静置20分钟，待胶聚合后，倒去ddH2O覆盖液，滤纸条吸干，往浓缩胶里加入适量TEMED混匀后缓慢灌入到聚合好的分离胶上灌至矮板顶部，插入梳子，室温聚合20分钟左右至浓缩胶聚合，拔下梳子，用ddH2O冲洗梳孔3次。将制好的胶放入Bio-rad电泳槽中，注意确保内槽不漏缓冲液，加满电泳缓冲液后开始上样。

�**蛋白质上样：**预染蛋白Marker上5µl作为分子量对照。每个样品孔保证蛋白上样量一致，每泳道上样20µl(50µg蛋白质)，空孔用1×蛋白上样缓冲液补齐。

�**电泳：**浓缩胶中运行电压为90V，到达分离胶界面后电压调升至120V，继续电泳直至溴酚蓝到达分离胶底部即可关闭电泳仪停止电泳。

**电转膜：**切去浓缩胶，在分离胶左下切角作标记, PVDF膜和印迹滤纸的大小应裁剪至与分离胶的大小相同。PVDF膜在甲醇里浸泡15秒；将滤纸、凝胶、PVDF膜一起放在转膜缓冲液中浸泡10分钟；按照阳极一滤纸一滤纸一滤纸—PVDF膜一凝胶一滤纸一滤纸一滤纸一阴极的顺序依次装好，叠放时每步都需赶去每

层间的气泡，并记住膜与胶的接触面。将组装好的夹子放置在电转仪阳极板上，要使夹子的黑面对槽的黑面。添加电泳缓冲液，盖上带阴极板的上盖。以80V的恒压转移1.5h。把转膜槽放在冰浴中进行转膜，避免严重的发热现象。

**封闭：**蛋白质转移到PVDF膜上后，将印迹后的PVDF膜放入盛有封膜液的平皿

中，在摇床上缓慢摇动室温孵育封闭2h。

**免疫反应：**用抗体稀释液按1: 500稀释Caspase-3抗体，将PVDF膜蛋白面朝下放于抗体液面上，4℃孵育过夜。用TBST洗涤PVDF膜3次，每次5分钟。[注]按1: 500稀释抗大鼠β-actin抗体，进行内参检测。把PVDF膜用TBST（1:2000）稀释的HRP标记的ft羊抗兔IgG二抗，室温下孵育2h. TBST室温下洗膜3次，每次10分钟。

## **ECL**化学发光检测：等体积混合ECL试剂盒中的A液和B液（各1ml），浸

没PVDF膜约1分钟后，吸去过多试剂。在暗室中，把X-光胶片放在保鲜膜包裹好的膜上，根据信号的强弱适当调整曝光时间，显影定影后立即冲洗。

**结果分析：**将胶片进行扫描或拍照，用凝胶图象处理系统分析目标带的分子量和

净光密度值。

2.3.5 **LDH活性的测定**：，从各实验组的细胞培养皿中各取1ml心肌细胞培养基，经1000转/分离心5分钟后，取上清按Cytotoxicity Detection Kit（LDH）和7600全自动生化分析仪的操作说明测定LDH活性。

### **2.3.6** 统计学处理方法

采用SPSS**15.0**统计软件进行数据分析。连续数据以均数士标准误(SEM)表示。多组样本均数比较采用单因素方差分析（One-Way ANOVA）法进行，组间的多重比较采用LSD-test（the least significant difference test）和SNK法进行，P值<0.05认为差异有统计学意义（第三部分和第四部分也采用该统计分析方法）。

## **2.4** 实验结果

为了证实ALDH2在IsoP诱导的心脏保护中的关键作用，我们用

Ad-Si-ALDH2

介导ALDH2基因下调，使ALDH2蛋白表达水平降低；用Ad-CA-ALDH2介导

ALDH2

基因上调，使ALDH2蛋白表达水平大幅度增加。然后分别分析了上述两种情况下各实验组心肌细胞的凋亡指数、凋亡通路蛋白酶Cleaved Caspase-3（活化型的Caspase-3）的相对表达、Caspase-3活性和LDH释放的定量变化，综合上述指标评估ALDH2下调和上调（活化）在IsoP抗心肌细胞凋亡损伤中的作用来确定调节ALDH2表达的功能意义，从而探讨ALDH2的抗心肌细胞凋亡作用机制及其与IsoP的关系

### **2.4.1** **ALDH2**基因下调取消了**IsoP**抗**H/R**损伤诱导的心肌细胞凋亡作用

与未经H/R处理的心肌细胞相比，H/R处理显著升高了心肌细胞的凋亡指

数（图1B）、凋亡通路蛋白酶Cleaved Caspase-3的相对表达（图1C）、Caspase-3活性（图1D）和LDH释放（图1E），TUNEL染色，可见DNA碎片增加，即明显的心肌细胞凋亡。IsoP显著降低了Ad-RFP感染组H/R诱导的心肌细胞的凋亡指数、Cleaved Caspase-3的相对表达、Caspase-3活性和LDH浓度的升高（图1B-E, P＜0.05）。然而在Ad-Si-ALDH2感染组中，由Ad-Si-ALDH2介导ALDH2基因下调使ALDH2蛋白表达水平降低的情况下（图1A），IsoP不能降低H/R诱导的心肌细胞的凋亡指数、Cleaved Caspase-3的相对表达、Caspase-3活性和

LDH释放的显著升高（图1B-E, P＞0.05），这提示Ad-Si-ALDH2介导ALDH2基因下调后取消了IsoP的上述心脏保护作用，即IsoP与未处理组无显著差异。上述结果表明：IsoP显著抑制了H/R诱导的心肌细胞凋亡，而ALDH2基因下调则抑制了IsoP诱导的抗心肌细胞凋亡的作用。这一结果支持我们的假设即磷酸化的ALDH2可能在IsoP诱导的心肌保护中发挥关键作用。









**图1** **抑制ALDH2蛋白表达取消了IsoP诱导的保护心肌细胞免受H/R损伤作用**

Values are means±S. E. M. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. Control group, and #P<0.05 vs. the corresponding Ad-RFP group.β-actin被用作上样量一致的对照。A.免疫印迹测定ALDH2蛋白的表达水平；B. ALDH2下调抑制了IsoP诱导的降低TUNEL阳性染色水平的作用。

（a）使用TUNE染色法检测凋亡细胞的DNA碎片：24h缺氧和12h复氧后，使用荧光显微镜对心肌细胞拍照, TUNE染色后凋亡阳性细胞发绿色荧光，位于胞核，可见DNA碎片增加，红色荧光表示腺病毒转染有效。（b）定量分析（以凋亡细胞数占所测细胞总数的百分比作为凋亡指数）用直方图显示；C. 有代表性的Cleaved Caspase-3和FL Caspase-3表达的Western blot图像（a）各实验组细胞裂解物中Cleaved Caspase-3/FL Caspase-3比值的定量比较（b）；D.定量测定各实验组心肌细胞裂解产物的Caspase-3 活性；E比较各实验组心肌细胞培养基中LDH浓度的变化

### **2.4.2** 持续活化的**ALDH2**参与了**IsoP**抗**H/R**损伤引起的心肌细胞凋亡

与未经H/R处理的心肌细胞相比，H/R处理显著升高了心肌细胞的凋亡指

数、Caspase-3活性和LDH释放，即H/R导致了明显的心肌细胞凋亡。（图2B-E）。

IsoP显著抑制了Ad-RFP感染组H/R导致的TUNEL染色阳性率的增加、Cleaved-Caspase-3相对表达的增加、Caspase-3活性的增加和LDH的释放（图2B-E, P<0.05）。免疫印迹分析表明，与Ad-RFP感染的心肌细胞相比，Ad-CA-ALDH2-RFP感染的心肌细胞中的ALDH2蛋白表达水平大幅度增加（图2 A）。持续活化的ALDH2显著抑制了H/R引起的TUNEL阳性染色率的增加、Cleaved-Caspase-3的相对表达的增加、Caspase-3活性的增加和LDH的释放（图2B-E, P<0.05），而在Ad-CA-ALDH2介导ALDH2持续活化的情况下，再用IsoP则不能进一步增强上述心脏保护作用，即IsoP与未处理组无差异。这说明了活化的ALDH2（即磷酸化的ALDH2）参与IsoP诱导的心脏保护作用。









**图 2** **激活ALDH2诱导心肌细胞免受H/R损伤**

Values are means±S. E. M. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. Control group, and #P<0.05 vs. the corresponding Ad-RFP group. β-actin被用作装载对照衡量上样量的一致性。A.免疫印迹测

定ALDH2蛋白的表达水平；B. 持续活化的ALDH2突变体表达降低了TUNEL阳性染色水平，异氟烷不能增强此效应。（a）使用TUNEL染色法检测凋亡心肌细胞的DNA碎片：24h缺氧和12h复氧后使用荧光显微镜对各实验组心肌细胞进行拍照，TUNEL染色后凋亡阳性细胞发绿色荧光，位于胞核，可见DNA碎片增加，红色荧光表示腺病毒转染有效（b）定量分析（以凋亡细胞数占所测细胞总数的百分比作为凋亡指数）用直方图显示；C.代表性的Cleaved Caspase-3和FL Caspase-3表达的Western blot图像（a）各实验组心肌细胞裂解物中Cleaved Caspase-3/FL Caspase-3比值的定量比较（b）；D.定量测定各实验组心肌细胞裂解产物的Caspase-3活性；E.比较各实验组心肌细胞培养基中LDH浓度的变化

## **2.5** 讨论

ALDH2同时具有脱氢酶和酯酶的催化活性，其酯酶活性可通过将硝酸甘油（GTN）脱硝基形成NO，由N0发挥扩血管作用直接改善缺血区心肌的血液供应[4]。ALDH2在辅助因子NAD(P) +的参与下通过其脱氢酶的活性将体内代谢过程中产生的醛类物质脱氧成为相应的羧酸，消除醛类物质主要是乙醛及其衍生物4-HNE对机体的毒性作用[**5**]。对ALDH2的研究以往集中在酒精代谢方面，之后发现ALDH2是体内催化GTN生物转化的关键酶，其心肌保护作用则是近年来提出的一个新发现[**6**]。心肌I/R过程中活性氧自由基的产生是心肌发生I/R损伤的始发环节，通过脂质过氧化导致大量活性醛类物质如4-HNE在心肌中产生和堆积，这些活性醛类物质比活性氧自由基具有更高的细胞毒性，更长的半衰期以及更强的扩散性[**7-9**]。

大量研究发现缺血和药物预处理或后处理对氧化应激引起的心肌细胞损伤的保护作用主要是通过激活ALDH2，消除4-HNE等活性醛类对心肌的氧化损伤实现的[10]，提示ALDH2 可能是心肌保护信号转导通路中的重要环节之一。研究还发现ALDH2野生型是对抗氧化应激的保护因子，通过减少活性氧(reactive oxygen species, ROS)或解毒4-HNE[**11-12**]途径抑制体内的氧化应激诱导的心肌细胞凋亡、减轻AMI时缺血心肌的再灌注损伤、减轻动脉粥样硬化并通过将GTN脱硝基形成NO发挥扩血管作用直接改善缺血区心肌的血供来缓解心绞痛[**13**]。因此提高ALDH2活性有望成为冠心病防治的新突破。新近研究表明，ALDH2酶活性的下降将加重酒精、缺血等多种因素引起的心肌损伤和促进硝酸甘油耐受的发生，因此以ALDH2为靶点开发和研制特异性激动剂来提高ALDH2 活性以及寻找抗心肌缺血损伤的新药物将为缺血性心脏疾病的药物防治提供新思路。

为了研究ALDH2在IsoP中对心肌细胞的保护作用，本研究从基因水平正反两方面验证了ALDH2的作用。ALDH2基因被干扰的情况下，IsoP失去了对心肌细胞的保护作用，而持续活化ALDH2基因在H/R损伤中则能保护心肌细

胞，而IsoP不能进一步增强这种保护作用。这一结果也验证了我们的假设即磷酸化的ALDH2可能在IsoP诱导的心肌保护中发挥关键作用。我们还发现IsoP或使ALDH2基因持续活化均能显著降低活化型Caspase-3（Cleaved-Caspase-3）的浓度和Caspase-3的活性，这充分说明了IsoP在H/R损伤中对心肌细胞的保护作用是通过ALDH2发挥作用的，通过ALDH2的磷酸化使ALDH2活化，进而减少了LDH的释放，减少了氧自由基对心肌细胞的损伤。活化型Caspase-3的浓度下降以及Caspase-3活性的降低也说明了这一点。Caspase家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用，其中Caspase-3 为关键的执行分子，它

在凋亡信号传导的许多途径中发挥着**不可替代的作用**。现在普遍认为细胞凋亡

是一系列高度调控的半胱氨酸蛋白酶Caspase级联反应事件的结果, Caspase-3被证实处于该级联反应的下游，活化型的Caspase-3可作用于其他下游的Caspase成员并降解相应的胞浆胞核底物，最终导致心肌细胞凋亡。我们的研究结果表明，H/R导致了明显的心肌细胞凋亡，而IsoP或使ALDH2基因持续活化均能显著抑制H/R引起的心肌细胞的TUNEL阳性染色率的增加、活化型Caspase 3的相对表达的增加、Caspase- 3活性的增加和LDH的释放。即激活ALDH2后大大降低了H/R诱导的心肌细胞凋亡的发生。因此我们推测IsoP介导的ALDH2抗心肌细胞凋亡作用的部分机制可能是IsoP通过激活ALDH2后抑制了活化型的Caspase-3的相对表达并降低了Caspase-3的活性从而抑制凋亡通路的激活实现的。

## **2.6** 结论

IsoP通过激活ALDH2缓解了体外H/R损伤诱导的心肌细胞凋亡。这一结果首次证明了磷酸化的ALDH2可能在IsoP诱导的心肌保护中发挥关键作用。IsoP介导的ALDH抗心肌细胞凋亡作用的部分机制可能与其抑制了活化型Caspase-3的相对表达并降低了Caspase-3的活性从而抑制凋亡通路的激活有关。

# **第三部分** **ALDH2**磷酸化参与**IsoP**诱导的心脏保护

## **3.1** 前言

ALDH2的主要生物活性是氧化乙醛成乙酸盐并且分解乙醛衍生物4HNE，从而减轻乙醛及其衍生物对细胞的氧化损伤[**1**]。此外其酯酶活性能够使GTN脱硝基转化生成有生物活性的NO来改善缺血区心肌的血供。ALDH2活性降低或缺失除可产生GTN耐受现象外还可使乙醇代谢的中间产物乙醛向乙酸盐分解的过程受阻而使体内乙醛的浓度显著增高从而使心肌细胞缺乏保护作用和心脏不良事件发生。ALDH2缺失型者少量饮酒就易诱发心绞痛发作[**2**]。饮酒不能改变

ALDH2野生型的心率却能增加ALDH2缺失型24小时平均心率。酒精诱导

ALDH2缺失型心动过速可能是由于乙醛引起肾上腺素分泌增加和/或通过影响自主神经系统的功能所致[3-4]；此外，饮酒后，正常个体血液中乙醛的浓度是

ALDH2缺失型个体的1/6[**5**]。在长期饮酒者中，ALDH2缺失型者因体内大量乙醛堆积而易罹患肝癌、食道癌、胃癌结肠癌等消化道癌症[**6**]。ALDH2缺失型患者的神经系统更易遭受氧化攻击，晚发型阿尔茨海默病进一步说明了ALDH2基因对人体的长期影响[**7**]。

然而关于ALDH2的很多研究目前仍然停留在流行病学及酒精代谢相关的实验，而ALDH2在心肌细胞研究中的实验报道不多，动物模型方面的研究更是鲜见。那么ALDH2在应对心衰，MIRI等临床常见心肌损伤时到底扮演了一个怎样的角色呢？提高ALDH2活性能否减轻心肌I/R诱导的氧化应激损伤程度从而逆转心肌损伤的病理过程呢？其相应的应对MIRI的机制及其信号转导通路又是如何呢？本研究的第二部分首先制备了离体新生一天大鼠心肌细胞H/R模型，通过在基因水平特异性激活或者抑制ALDH2，研究ALDH2的抗心肌细胞凋亡作用机制及其与IsoP的关系。其研究结果表明：IsoP通过激活ALDH2缓解了体外H/R损伤诱导的心肌细胞凋亡，其抗凋亡的部分机制可能与抑制Caspase-3的激活从而抑制凋亡通路的激活有关。为了进一步证实磷酸化ALDH2与IsoP诱导的抗在体

MIRI之间的关系，本部分研究制备了SD雄性大鼠急性心肌I/R模型，通过使用

ALDH2激动剂及抑制剂，在药理水平激动或者抑制ALDH2，研究内源性ALDH2及其特异位点磷酸化在IsoP抵抗在体MIRI中的作用。并探讨IsoP与激活ALDH2的心脏保护机制。通过体内和体外实验研究来证实我们的假设即磷酸化的ALDH2可能在IsoP诱导的心肌保护中发挥关键作用。从而揭示ALDH2在应对MIRI过程中所发挥的关键作用。

## **3.2** 实验材料

### **3.2.1** 实验动物

本实验使用的动物为雄性Sprague-Dawley（SD）大鼠，由清华大学实验动物中心提供。体重200〜220克。它们被安置在一个无特殊病原体条件下，温度

（23±3℃）和湿度（60±5％）的控制室内，光暗周期为12小时：12小时（光照早上8点开始）。饮用水和标准饲料均经灭菌后供动物自由取用。

### **3.2.2** 主要实验试剂和药物

Alda44和Cyanmide美国sigma公司

戊巴比妥钠 美国 sigma 公司

伊文思蓝 美国 Fluka 公司

三甲基氯化四氮唑（TTC）: 美国 Fluka 公司异氟烷 美国雅培公司

抗大鼠β-actin抗体SANTA CRUZ公司

HRP标记的ft羊抗兔IgG二抗SANTA CRUZ公司

Creatine Kinase-MB Liquid Reagent德国Roche公司

Cytotoxicity Detection Kit(LDH)德国Roche公司

兔抗大鼠 phos-ALDH2 抗体 南京金斯瑞公司 兔抗大鼠 ALDH2 抗体 abcam 公司

其他试剂见第一部分

### **3.2.3** 主要实验仪器

Langendorff装置美国Radnoti公司

## 小动物呼吸机江西省特力麻醉呼吸设备公司

呼气末气体监测仪德国drager公司电子微量注射泵浙江大学仪器厂

**其他仪器见第一部分**

## **3.3** 实验方法

**实验一**验证**IsoP诱导的抵抗在体MIRI作用**

### **3.3.1** 大鼠急性心肌**I/R**模型和**IsoP**模型的制备

建立大鼠急性心肌I/R模型：给予实验SD雄性大鼠腹腔注射戊巴比妥钠

（30mg／kg）麻醉，气管切开术后，大鼠肺组织进行机械正压通气，使用30%至

40%的空气/氧气混合物，通过调整呼吸频率和潮气量，在整个实验中维持动脉血气PH值在生理范围内。心肌梗死是由结扎冠状动脉左前降支（LAD）引起。在大鼠胸骨左缘第四或第五肋间隙开胸，实施胸廓切开术及心包切开术后，暴露心脏，在距LAD基部2-3mm处用6-0无创伤性丝线进行结扎，通过结扎LAD造成心肌梗死即可建立大鼠急性心肌缺血模型。剪断结扎线心肌复灌。假手术组除丝线不结扎外，其余操作均同模型组。对所有大鼠（除假手术组外）进行区域性心肌缺血40分钟，之后进行120分钟再灌注处理[8]。为了证实异氟烷诱导的APC作用，从大鼠稳定期开始，给予实验大鼠最小肺泡浓度1.0（2.1%）的异氟烷持续吸入30分钟，之后进行30分钟洗脱，然后进行上述冠状动脉LAD的闭塞处理。

**雄性SD大鼠根据不同的处理被随机分配到以下4组，每组5只：**

**假手术组**(**SHAM组**)：开胸分离LAD后仅在LAD下穿线不结扎，持续160分钟；**缺血再灌注组(I/R组):**可逆性的结扎LAD造成心肌缺血40分钟，再灌注120分钟；**IsoP+SHAM组**：IsoP后，仅在LAD下穿线，不结扎，持续160分钟；**IsoP+I/R组**：IsoP后可逆性结扎LAD造成心肌缺血40分钟再灌注120分钟

### **3.3.2** 采用伊文思蓝／氯化三苯基四氮唑(TTC)双重染色法测定心梗面积[9-10]

抽血后，取出心脏用Langendorff装置灌流10分钟冲出里面的血液。冠状动

脉再闭塞，再次阻断冠状动脉左前降支，在主动脉根部注入2％伊文思蓝2ml，深蓝色标记的为正常灌流区。充分染色后剪去心房、右心室和大动脉，将左心室放入-20℃冰箱冰冻30分钟以利于切片后，从心尖起平行横向切成等厚2mm左右的薄片，可见伊文思蓝染的正常区域着蓝色，缺血危险区(AAR)不着色；将心脏薄片放入pH=7.40, 1％TTC磷酸盐缓冲液中370C孵育1小时，染色过程中不时摇动染色液容器，使染色液与待染组织充分接触。然后用10%甲醛固定12小时，以增强颜色对比。染色结束后，切面上可见存活心肌细胞被染成砖红色，梗死区心肌不着色，肉眼观呈灰白色。用蒸馏水冲去组织切片上多余的染料，放在玻片上，用滤纸吸干水分，并且由数字相机拍摄。在危险区域（伊文思蓝阴性）和梗死区（TTC阴性）使用Imageproplus分析软件（Version4.1, Media Cybernetics, LP, USA）进行量化，并求出梗死面积的面积百分比。计算公式为： 心肌梗死面积(%) =梗死区面积/红色缺血危险区面积×100%。

### **3.3.3** 血清**LDH**活性和**CK-MB**活性的测定

在取出大鼠心脏之前，从各实验组大鼠采集5ml静脉血样本，使用台式离心机以5000g离心5分钟，血清保存于液氮中。样品解冻后进行分析测定。使用7600全自动生化分析仪及商用试剂盒Creatine Kinase-MB Liquid Reagent和Cytotoxicity Detection Kit(LDH)测定LDH和CK-MB的活性。

**实验二研究ALDH2磷酸化与IsoP诱导的心脏保护作用的相关性**

为了评估ALDH2磷酸化在IsoP诱导的心脏保护中的作用，在IsoP或无IsoP缺血处理前5分钟给予大鼠ALDH2激活剂Alda-44(40μM)[11]和ALDH2抑制剂cyanamide(5mM)[**12**] 。大鼠急性心肌I/R模型和IsoP模型的制备：同3.3.1

**雄性SD大鼠根据不同的处理被随机分配到以下6组，每组8只：**

I/R 组

I/R-IsoP 组

I/R-Cyanamide 组

I/R-Cyanamide+IsoP 组

I/R-Alda-44 组

I/R-Alda-44+IsoP 组

**3.3.4各实验组大鼠血清LDH和CK-MB活性的测定：方法同3.3.3**

**3.3.5 Western blot测定心肌组织Phos-ALDH2和Total-ALDH2蛋白的表达**

于再灌注末，迅速剪下各实验组大鼠的心脏，每只大鼠取相同部位的左心室前壁心肌组织0.2g，用生理盐水冲洗，剪碎心肌组织后加入2mlRIPA裂解液(1mlRIPA+10µ1PMSF)至玻璃匀浆器中，冰浴下进行机械匀浆，匀浆液在冰上静置30分钟直至充分裂解后，以12000 rpm 4℃离心30分钟，取上清，用BCA法测定蛋白质浓度。用RIPA裂解液均衡每一样品中的蛋白液浓度，保证每个样品孔蛋白上样量一致，加入5×loading buffer后， 于

100℃煮沸变性5分钟，分装蛋白上样液并于－70℃储存。50µg蛋白上样进行SDS-PAGE电泳，电泳分离蛋白后，将目标蛋白带转移至PVDF膜上，将印迹后的PVDF膜放入盛有封膜液的平皿中室温孵育封闭2小时。用抗体稀释液按1: 1000分别稀释兔抗大鼠ALDH2抗体和兔抗大鼠Phos-ALDH2抗体，按1: 500稀释抗大鼠β-actin抗体，将PVDF膜蛋白面朝下放于抗体液面上，

4℃孵育过夜。用TBST洗涤PVDF膜3次，每次5分钟。然后将膜用TBST（1:2000）稀释的HRP标记的ft羊抗兔IgG二抗室温下孵育2小时后，用TBST室温下洗膜3次，每次10分钟。ECL显色。将胶片进行扫描或拍照，用凝胶图像处理系统分析目标带的分子量和净光密度值等记录相应的表达量。

**3.3.6采用伊文思蓝/TTC双染色测定各组实验大鼠的心梗面积：方法同3.3.2**

**3.4****实验结果**

实验一IsoP减少了在体MIRI引起的LDH和CK-MB释放，同时减少了梗死面积：与假手术对照组相比，结扎LAD引起区域性心肌缺血40分钟然后进行

120分钟再灌注使I/R组大鼠的血清LDH和CK-MB浓度和心梗面积显著增加

（P<0.01）。而IsoP诱导的APC作用显著地降低了I/R所导致的心肌细胞LDH 和

CK-MB释放且大幅度地减少了I/R-诱导的心肌梗死面积（P<0.05）。见图 1





**图1** **IsoP显著降低I/R导致的LDH和CK-MB释放且大幅度减少了I/R诱导的心梗面积**

Values are means±S. E. M., \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. sham group and #P<0.05 vs. the I/Rcontrol group. A, B. 分析大鼠血清中LDH和CK-MB浓度；C.伊文思蓝/TTC双染色大鼠心脏测定心梗面积：IsoP和未处理组的单个大鼠心脏中有代表性的横断面切片，梗死面积除以缺血危险区面积进行归一化。+表示经过该条件处理 –表示未经该条件处理

**实验二ALDH2的磷酸化参与IsoP诱导的心脏保护**

与I/R对照组相比，IsoP后使心肌细胞中磷酸化的ALDH2浓度显著升高

（P<0.01），即缺血前IsoP增加了ALDH2的磷酸化。而ALDH2酶抑制剂cyanamide显著抑制了异氟烷诱导的ALDH2磷酸化后的激活效应（P<0.05）。使用ALDH2的直接激活剂Alda-44大幅度地增加了心肌细胞中ALDH2的磷酸化水平（P<0.01），但Alda-44并没有使IsoP诱导的ALDH2磷酸化效应进一步增强（P﹥0.05）见图2A。与ALDH2磷酸化相一致，我们观察到IsoP和使用Alda-44均显著减少了I/R引起的心肌细胞LDH和CK-MB向血浆的泄漏并减少了心梗面积（P<0.01, 图2B-D）。IsoP和同时使用Alda-44不能进一步增强这种降低，即二者无叠加效应。然而，IsoP诱导的减少LDH和CK-MB释放和减少了心梗面积效应可明显被ALDH2抑制剂氰胺所阻断（P<0.01, 图2B-D,）。这些研究结果表明了IsoP介导的心脏保护主要是由激活ALDH2所引起。









**图 2** ALDH2磷酸化与**IsoP**诱导的心脏保护相关

Values are means±S. E. M., ## P<0.01 vs. the saline control group and \* P<0.05, \*\* P<0.01vs. the corresponding control. **+**表示经过该条件处理**–**表示未经该条件处理**A．**施用或不施用ALDH2抑制剂及激活剂时IsoP对ALDH2磷酸化的影响: a.磷酸化的ALDH2与总ALDH2有代表性的Western blot图像β-肌动蛋白用来作等量蛋白装载的参比b.量化了不同实验组磷酸化的ALDH2与总ALDH2的比例数据；**B．**为ALDH2抑制剂（cyanamide）

## 和直接激活剂（Alda-44）对大鼠心梗面积的影响：a.为单个大鼠心脏中有代表性的横断面切片; b.为梗死面积除以缺血危险区面积进行归一化后的结果。**C-D.**对大鼠血清LDH和CK-MB浓度进行分析

## **3.5** 讨论

研究表明，心肌I/R过程中引发的氧化应激反应诱导大量醛类物质在心肌

中堆积导致心肌发生I/R损伤：由于大量氧自由基释放，造成生物膜脂质过氧化、细胞内多种生物酶失活及DNA损伤[**13-16**]。同时，由于细胞膜结构通透性增加、钙离子通道异常开放，致细胞内钙超载；线粒体ATP合成与利用障碍、活性氧族类物质增加[**17**]；再灌注期血管内皮细胞和白细胞表达增强，粘附因子、趋化因子合成与释放增多，各种致炎症因子释放，白细胞粘附、聚集，致心肌微循环障碍，进一步加重心肌损伤。上述多种损伤机制交互作用，于再灌注早期即可出现心肌细胞凋亡或坏死[**18**]。

线粒体在细胞的存活中至关重要，在吸入麻醉药保护心肌的复杂信号转导通路中，产生三磷酸腺苷和调节细胞凋亡[**19**]中发挥重要作用。IsoP最终减少梗死面积的机制仍然不清楚。细胞凋亡[**20-22**]和炎症反应[**23**]被认为与I/R损伤有关。已与我们的研究结果一致的是，异氟烷处理的小鼠进行缺血和再灌注2周表明凋亡基因的表达降低，显著下调活化的caspase-3的表达，和TUNEL阳性染色。

ALDH2因为其在代谢乙醇中间体乙醛中的作用为人们所熟知。这些高度毒性，高反应性醛类能与蛋白作用产生醛加成物，使蛋白质失活和产生组织损伤，进而引发各种疾病，如癌症和心梗[24]。据报道，ALDH2基因的过度表达可能会减轻I/R损伤和缺血性心脏功能紊乱[25-26]。与此相一致，ALDH2基因敲除可能会加剧I/R损伤[27-28]。这些数据支持我们的研究结果，即ALDH2对IsoP诱导的在**I/R**损伤中对心脏的保护中起着至关重要的作用。研究表明，过表达ALDH2显著减少乙醛和乙醇诱导的氧化应激（ROS产生），激活应激信号分子，胎儿心肌细胞凋亡[**29**]。在此，我们发现，IsoP增加了ALDH2的磷酸化和活性。这些数据也支持了我们的观点，IsoP减少了I/R诱导的心肌细胞凋亡，与ALDH2的磷酸化和激活有关。

IsoP效应的具体机制目前尚不十分清楚，我们通过分子生物学和生物化学方法对与该机制密切相关的线粒体ALDH2进行深入分析和研究，以求揭示其中的机理。本部分研究首先探讨了IsoP抵抗在体MIRI作用：通过建立SD大鼠在体急性心肌I/R模型和IsoP模型，然后测定了各实验组中大鼠血清中LDH和CK-MB的浓度和心梗面积，以此来评价在体MIRI程度和确定IsoP抵抗在体MIRI作用，研究结果发现：结扎LAD引起区域性心肌缺血40分钟然后进行120分钟再灌注使I/R组大鼠的血清LDH和CK-MB浓度和心梗面积显著增加，而IsoP诱导的APC作用显著地降低了I/R所导致的心肌细胞LDH和CK-MB释放且大幅度地减少了I/R-诱导的心肌梗死面积。其次本部分还通过IsoP前使用ALDH2的抑制剂cyanamide和ALDH2的直接激活剂Alda-44，然后测定各实验组中大鼠血清中CK-MB和LDH的水平、心梗面积和ALDH2蛋白的活化水平，以此评价抑制和活化ALDH2对IsoP抗MIRI中的作用，我们观察到IsoP和使用ALDH2的直接激活剂Alda-44均显著减少了I/R引起的心肌细胞LDH和CK-MB向血浆的泄漏并减少了心梗面积且使心肌细胞中磷酸化的ALDH2浓度大幅度地升高。然而，IsoP诱导的减少LDH和CK-MB释放和减少了心梗面积以及增加心肌细胞中ALDH2磷酸化水平的效应可明显地被ALDH2抑制剂

cyanamide所阻断。这充分说明了IsoP诱导的APC作用是通过增加ALDH2的磷酸化进而显著减少了I/R-诱导的心肌梗死面积和LDH和CK-MB释放来实现的。这些研究结果表明：IsoP介导的心脏保护主要是由激活ALDH2所引起。

## **3.6** 结论

IsoP诱导的APC作用显著减少了大鼠MIRI所致的LDH和CK-MB释放，

通过增加ALDH2的磷酸化减少了I/R-诱导的心肌梗死面积。我们推测IsoP介导的心脏保护可能主要是由激活ALDH2所引起。

# 第四部分 **PKC**信号通路在**ALDH2**介导的**IsoP**抗**MIRI**

**中的作用**

## **4.1** 前言

APC是一种心脏保护策略，它通过激发先天保护机制增强抵抗心肌缺血和再灌注损伤。APC的作用在多种动物模型以及人体中均有文献证实[1-6]。研究显示APC能够减少心肌梗死面积并减轻心肌缺血引起的收缩功能障碍。APC过程中的细胞信号通路是复杂的，而且在很多方面与IPC的细胞信号通路类似。APC相关的细胞内机制尚未完全阐明。现在已知多种细胞信号通路参与细胞表现型形成，使得心脏更加耐受缺血损伤。迄今报道的机制包括抑制线粒体通透性转换孔（mPTP）的开放[7]、激活蛋白激酶，如蛋白激酶C(PKC)[8-9]，产生活性氧（ROS）[10-11]，以及开放三磷酸腺苷敏感性钾通道（KATP）[**1, 12-13**]。

人们已知PKC亚型从细胞质基质转位到膜上的过程是IPC的关键介导步骤。PKCε激活对于保护心脏免受缺血再灌注（I/R）损伤是充分必要的[14-15]。最近有证据表明PKCε作用于线粒体，并与多种线粒体蛋白，包括线粒体醛脱氢酶2（ALDH2）相互作用[16]。线粒体亚型的ALDH2在代谢乙醛及其他有毒醛类中起关键性作用，它被PKCε磷酸化而激活在心肌保护中是必须的[**17-18**]。通过转基因的方式使ALDH2过表达可减轻I/R损伤以及I/R后缺血性心室机能障碍[**19-20**]。与此相一致，ALDH2基因敲除会加重I/R损伤[**21**]。这些数据表明ALDH2在对抗心脏I/R损伤中发挥重要作用。然而，ALDH2诱导心脏保护的机制可能是多样的，包括生物活化硝酸甘油、减少自由基的产生[**22**]、减少4HNE-蛋白质加合物形成[**18**]并最终减轻线粒体机能障碍[**21**]等所有的I/R损伤标志。

由于麻醉剂诱导的预处理也在人类中发挥作用，因此对其信号传导机制的彻底了解可能会影响临床应用APC进行心脏保护。然而，ALDH2在IsoP诱导

APC中的作用尚未研究。因此本研究验证的是PKCε介导的线粒体ALDH2激活在IsoP中起关键作用这一假设。另一方面，异氟烷是否可以通过调节PKCδ

通路，起到对抗MIRI的保护作用，目前尚不清楚，PKCδ通路和ALDH2是否相互关联，是心脏保护领域至今仍未阐明的问题。我们假设：IsoP通过激活PKCε同时抑制PKCδ，双向调节PKC双亚型通路在心肌I/R过程中的活化水平，从而进一步激活ALDH2，抵抗MIRI，发挥其心脏保护作用。

## **4.2** 实验材料

### **4.2.1** 实验动物

本实验中使用的动物为雄性Sprague-Dawley（SD）大鼠，体重200〜220克。动物由清华大学实验动物中心提供。它们被安置在一个无特殊病原体条件下，温度（23±3℃）和湿度（60±5％）的控制室内，光暗周期为12小时：12

小时（光照早上8点开始）。饮用水和标准饲料均经灭菌后供动物自由取用。

### **4.2.2** 主要实验试剂

PK C ε 抑制剂ε V1 - 2 Si g m a 公司

PK C δ 抑制剂 ro t t l e r i n Si g m a 公司

兔抗大鼠 P K C ε 抗体 C e l l S i g n a l i n g 公司

兔抗大鼠 P K C δ 抗体 C e l l S i g n a l i n g 公司

Anti-ALDH2 antibody Abcam公司

抗大鼠β - a c t i n Sa n t a Cr u z 公司

HRP标记的ft羊抗兔IgG二抗Santa Cruz公司

Creatin e Kin ase- MBL iq uid Reag ent Roche公司

Cy t o t o x i c i t y De t e c t i o n Ki t ( L D H) Ro c h e 公司其他试剂见第一部分

### **4.2.3** 主要实验仪器：见第一部分

## **4.3** 实验方法

**大鼠急性心肌I/R模型和IsoP模型的制备方法：同第三部分3.3.1**

**实验一** 使用PKCε抑制剂PKCεV1-2验证PKCε参与了ALDH2的磷酸化并探索

PKCε通路在ALDH2介导的IsoP抗MIRI中的作用：IsoP（IsoP前5分钟）和无IsoP

缺血处理前5分钟给予大鼠1µM PKCε抑制剂εV1-2处理5分钟，接着进行IsoP和制备在体心肌I/R模型，然后分别测定各实验组大鼠的心梗面积、信号通路蛋白[磷酸化ALDH2（Phos-ALDH2）和总ALDH2（Total- ALDH2）、线粒体PKCε（Mito- PKCε）和总PKCε（Total-PKCε）]的表达变化以及血清LDH和CK-MB活性的变化。

### 4.3.1 实验动物分组：雄性SD大鼠32只，随机分成以下4组，每组8只：I/R 组I/R+IsoP 组

I/R+εV1-2 组

I/R+IsoP +εV1-2 组

4.3.2采用伊文思蓝-TTC染色测定心梗面积：方法同第三部分3.3.2

4.3.3 LDH活性和CK-MB活性的测定：方法同第三部分3.3.3

4.3.4 Western blot测定Phos-ALDH2和Total-ALDH2、Mito-PKCε和总PKCε的表达：

#### 4.3.4.1 大鼠心肌组织裂解匀浆中Phos-ALDH2和Total- ALDH2蛋白表达的测定：方法同第三部分3.3.5

#### 4.3.4.2 大鼠心肌组织裂解匀浆中PKCε蛋白表达的测定：

用抗体稀释液按1: 1000稀释兔抗大鼠PKCε抗体，按1: 500稀释抗大鼠β-actin抗体，按1: 2000稀释HRP标记的ft羊抗兔IgG二抗。各实验组大鼠心肌组织裂解匀浆中总蛋白的提取方法和总蛋白浓度的测定方法以及Western blot检测方法同第三部分3.3.5。

#### 4.3.4.3 大鼠心肌线粒体中的PKCε（Mito-PKCε）蛋白表达的测定：

[线粒体蛋白的提取：按照线粒体蛋白提取试剂盒](http://www.biogo.net/)（研卉生物）使用说明书进行，具体步骤如下：

（一）线粒体的提取

1、样本的处理：组织裂解匀浆

⑴迅速剪下各实验组大鼠的心脏，取新鲜的左心室前壁心肌组织0.2g，

PBS或生理盐水冲洗，洗净血水，滤纸吸干。

⑵把组织放在一个置于冰上的离心管中，用剪刀把组织剪切成非常细小的组织碎片。

⑶加入1.5 mL预冷的裂解液1, 0℃冰浴上下研磨组织20次。（相差显微镜下检查未裂解细胞应在50%左右即可）

2、将心肌组织匀浆转移到离心管，4℃，800×g离心5分钟。细胞核、大的膜碎片、未裂解细胞等在管底。

3、在另一个新的预冷的离心管中预先加入0.5mL溶液A，将匀浆后的上清液0.5mL（溶液A：上清液体积=1: 1）沿管壁小心地加入预冷的离心管中，覆盖于溶液A的上层。

4、4℃离心（15,000×g 10分钟）。离心后的上清为胞浆成分，将上清转移到新离心管，沉淀为线粒体。

5、往沉淀中加入0.2 mL漂洗液重悬线粒体沉淀，4℃离心（15,000×g 10分钟），弃上清。

（二）线粒体蛋白的提取

1、裂解液2工作液的准备

在每1mL冷裂解液2加入10μL磷酸酶抑制剂，1μL蛋白酶抑制剂和5μL 100mM PMSF，混匀。冰上保存数分钟待用。

2、每20μL线粒体压积中，加入200μL上述配制好的冷裂解液2工作液。

3、置于4℃摇床平台上，温和振荡15分钟。

4、离心（12,000rpm, 4℃）15分钟，取上清为线粒体蛋白提取物，用BCA法进行蛋白定量。

5、分装保存于-70℃，避免反复冻融。

（三）Mito-PKCε蛋白表达的测定：. 用裂解液均衡每一样品中的蛋白液浓度，加入5×loading buffer后，于100℃煮沸变性5分钟，以50µg蛋白上样进行

SDS—PAGE电泳，电泳分离蛋白后，将目标蛋白带转移至PVDF膜上，将印迹后的PVDF膜用TBST及5%脱脂奶粉封闭液室温孵育封闭2小时。按1: 1000稀释兔抗大鼠PKCε抗体，Western blot的具体操作方法同第二部分2.3.4

**实验二探讨IsoP与PKCδ的活化及向线粒体转位的关系**

为了探讨IsoP在PKCδ的活化及向线粒体转位中的作用，在IsoP和无IsoP

后结扎或不结扎LAD，然后分别测定以下各实验组的线粒体PKCδ（Mito-PKCδ）和总PKCδ（Total-PKCδ）表达的变化**；**

4.3.5实验动物分组：雄性SD大鼠32只，随机分成以下4组，每组8 只

**SHAM 组**

**I/R 组**

**SHAM+IsoP 组**

**I/R+IsoP 组**

### **4.3.6** 各实验组大鼠心肌组织裂解匀浆中Total-PKCδ蛋白表达的测定：

用抗体稀释液按1: 1000稀释兔抗大鼠PKCδ抗体，按1: 500稀释抗大鼠β-actin抗体，按1: 2000稀释HRP标记的ft羊抗兔IgG二抗。各实验组心肌细胞总蛋白的提取方法和总蛋白浓度的测定方法以及Western blot检测方法同第三部分3.3.5。

### **4.3.7** 大鼠心肌Mito-PKCδ蛋白表达的测定：

大鼠心肌线粒体蛋白的提取和线粒体蛋白的定量方法：同4.3.4.3

Mito-PKCδ蛋白表达的测定：用裂解液均衡每一样品中的蛋白液浓度，加入5×loading buffer后，于100℃煮沸变性5分钟，以50µg蛋白上样进行SDS—PAGE电泳，电泳分离蛋白后，将目标蛋白带转移至PVDF膜上，将印迹后的PVDF膜放入盛有封膜液的平皿中室温孵育封闭2小时。用抗体稀释液按1: 1000稀释兔抗大鼠PKCδ抗体，按1: 500稀释抗大鼠β-actin抗体，按1: 2000稀释HRP标记的ft羊抗兔IgG二抗。其余Western blot的具体操作方法同第三部分2.3.4。

## 实验三使用PKCδ抑制剂**rottlerin**验证PKCδ参与了**ALDH2**的磷酸化

为了验证PKCδ参与了ALDH2的磷酸化，在IsoP前5分钟和无IsoP缺血处理前5分钟给予大鼠1μM PKCδ抑制剂rottlerin处理5分钟，接着进行IsoP和制备在体心肌I/R模型，然后分别测定各实验组大鼠的心梗面积、信号通路蛋白

（Phos-ALDH2和Total-ALDH2）的表达以及血清LDH、CK-MB浓度的变化，以此来评价PKCδ通路在ALDH2介导的IsoP抗MIRI中的作用。

**4.3.8实验动物分组：雄性SD大鼠32只，随机分成以下4组，每组8只：**

**I/R组 I/R+IsoP组I/R+rottlerin组I/R+IsoP+rottlerin 组**

4.3.9**大鼠心肌组织裂解匀浆中Phos-ALDH2和Total-ALDH2蛋白表达的测定：**方法同第三部分3.3.5；LDH活性和CK-MB活性的测定：方法同第三部分3.3.3

**4.4****实验结果**

**4.4.1 PKCε参与了IsoP诱导的ALDH2的磷酸化和心脏保护**

PKCε活化后转位到线粒体使ALDH2磷酸化是保护心脏免受I/R损伤的必需步骤。与未经**IsoP**的**I/R**对照组相比，**IsoP**后心肌细胞线粒体中的PKCε浓度显著升高（P<0.01）同时伴有心肌细胞中磷酸化的ALDH2浓度显著升高

（P<0.01），而PKCε抑制剂εV1-2能显著抑制这种升高（P<0.01）。在此，我们证明：IsoP导致PKCε在线粒体中的浓度显著升高且伴随着ALDH2的磷酸化。

IsoP诱导的ALDH2磷酸化被PKCε抑制剂εV1-2所抑制。由于PKCε在线粒体中的易位迅速发生，导致细胞质基质内PKCε水平相应下降，因为细胞总的PKCε水平没有发生变化（图1A），因此我们的数据表明IsoP使动态的线粒体PKCε易位以应对I/R引起的心肌损伤。与PKCε转位到线粒体的情形相对应，PKCε抑制剂εV1-2取消了IsoP介导的减少心肌梗死面积效应和减少LDH和CK-MB

释放效应。即与未经IsoP的对照组相比，IsoP显著减少了I/R产生的心梗面积并显著降低了I/R导致的LDH和CK-MB释放（P﹤0.05）。IsoP诱导的这一心脏保护效应明显地被PKCε抑制剂εV1-2所取消（P﹤0.05）（图1B-D）







**图 1** PKCε**参与了IsoP诱导的ALDH2磷酸化和心脏保护**

Values are means±S. E. M. \*P<0.05, \*\*P<0.01vs. the saline control group and # P<0.05, ##P<0.01 with PKCεV1-2vs. the corresponding group without PKCεV1-2. +表示经过该条件处理–表示未经该条件处理**A.** PKCε转位与IsoP诱导的ALDH2磷酸化相关（a）磷酸化的ALDH2、总ALDH2、β-肌动蛋白、线粒体PKCε和总PKCε的有代表性的Western blot图像。使用β-肌动蛋白作为等量蛋白装载的参比。（b）不同实验组的p-ALDH2与T-ALDH2的相对表达以及M-PKCε与T-PKCε的相对表达的比较；**B.**代表性的横断面切片图来自于不同实验组的单个大鼠心脏；梗死面积除以缺血危险区面积进行归一化处理。**C, D.**分析了血清LDH及CK-MB浓度的浓度变化

**4.4.2 IsoP减少了心肌细胞PKCδ的活化及向线粒体转位**

我们的数据表明：与假手术对照组相比，I/R导致心肌细胞线粒体中的PKC**δ**浓度显著增高（P﹤0.01），IsoP后大大减少了心肌细胞中的PKCδ向线粒体转位使心肌细胞线粒体中的PKC**δ**浓度显著降低（P﹤0.01）（图2A-B）。



**Mito- PKCδ/Total- PKCδ**Mito- PKCδ/Total- **PKCδ**

**图 2** IsoP**抑制了心肌细胞中的PKCδ向线粒体转位**

Values are means±S. E. M. ## P<0.01 vs. the sham control group and \*\* P<0.01 with isoflurane vs. the corresponding group without isoflurane. A.各实验组中Mito- PKCδ、Total- PKCδ和β-actin的代表性的免疫印迹图像，β-actin被用作等量蛋白上样的参比；B. Mito-PKCδ除以Total-

PKCδ进行归一化量化

**4.4.3 PKCδ向线粒体转位减少参与了IsoP诱导的ALDH2磷酸化和心脏保护**

我们的结果表明：与I/R对照组相比，IsoP使心肌细胞ALDH2磷酸化水平显著升高（P﹤0.01, 图3A-B）且显著降低了LDH（P﹤0.05）和**CK-MB**（P﹤0.01）的释放（图3C-D）；PKCδ抑制剂rottlerin也使心肌细胞ALDH2磷酸化水平显著升

高（P﹤0.05, 图3A-B）且显著降低了LDH和CK-MB的释放（P﹤0.05图3C-D）。使用PKCδ抑制剂rottlerin抑制了PKCδ的活性后，无论是否施用IsoP

**ALDH2**磷酸化水平都显著升高。单独使用rottlerin处理组和rottlerin加异氟烷协

同处理组**LDH**和**CK-MB**释放量存在显着差异（P﹤0.01），这表明两种处理方式

在降低此两项生化指标方面存在叠加效应（图3C-D），但二者促进ALDH2磷酸化的作用没有叠加效应（图3A-B）。同样，IsoP使PKCδ的活性被抑制从而使动态的线粒体PKCδ易位减少以应对I/R引起的心肌损伤





## 图 **3** PKCδ向线粒体转位的减少参与了**IsoP**诱导的**ALDH2**的磷酸化和心脏保护

Values are means±S. E. M., # P<0.05 ## P<0.01 vs. the vehicle control group and \* P<0.05,

\*\* P<0.01 vs. the corresponding control. A, B.各实验组磷酸化的ALDH2和总ALDH2代表性的免疫印迹分析图，β-actin用作蛋白等量上样的参比；C, D.血清LDH and CK-MB释放量分析

## **4.5** 讨论

挥发性麻醉药应用于临床已经有相当长的时间。与我们的结果一致，大量研究表明，在有害的缺血事件发生前或在再灌注开始时施用挥发性麻醉药对心脏有保护作用。还表明这一保护的特征与经典IPC引起保护的特征相似。有一些研究试图阐释其中所涉及的机制。这些研究表明APC（挥发性麻醉药物预处理）所产生的心肌保护机制涉及激活磷脂酰肌醇3-激酶[23]，细胞外信号调节激酶1和2（ERK1 / 2）激活[24]、70-kDa核糖体蛋白S6激酶激活、内皮细胞活性氧（eNOS）产生[**25**]、线粒体KATP通道激活[**26-28**]和抑制糖原合酶激酶3-β[**29**]，然而APC的确切机制尚未阐明。

最近，许多研究[30, 28, 31]都以心肌线粒体为目标研究挥发性麻醉剂的心脏保护作用。线粒体通过产生三磷酸腺苷及调节细胞凋亡，全面参与了挥发性麻醉剂介导的心脏保护。异氟烷减少梗死面积的最终机制尚不清楚。细胞凋亡[**32-34**]和炎症反应[**32, 35**]被认为与MIRI有关，也与我们的研究结果一致，IsoP后的小鼠缺血处理后进行为期2周的再灌注处理，其促凋亡基因表达减少，活化的caspase-3表达显著降低，和TUNEL阳性染色减弱[**36**]。

ALDH2基因对乙醇的中间体乙醛的代谢作用广为人知，乙醛具有强毒性，和高反应活性，能够与蛋白质形成醛加合物，从而导致蛋白质功能障碍和组织损伤，且乙醛还与多种人类疾病包括癌症和心肌损伤[**37**]有关。据报道，ALDH2基因过度表达可能会减轻I/ R损伤和I/ R后缺血性心脏功能障碍[**38, 39**]。与此相一

致的是，ALDH2基因敲除后可能会加剧MIRI [40-41]**。**这些数据支持我们的研究

结果即：在异氟烷诱导的抗MIRI中ALDH2发挥了重要作用。已经表明ALDH2过表达能够显著减轻乙醛和乙醇诱导的氧化应激（ROS产生），应激信号分子激活和胎儿心肌细胞凋亡[**42**]

在本研究中，我们发现，IsoP增加了ALDH2的磷酸化水平及其活性。这些数据印证了我们的观点即：IsoP抵抗H/R诱导的心肌细胞凋亡作用与磷酸化和激活ALDH2有关。

## 我们还发现，IsoP导致PKCε转位到线粒体。尽管许多研究探讨了PKC 的

磷酸化和转位作为IPC心肌保护作用的关键步骤，而且PKCε似乎在预处理的信号级联机制中发挥了关键作用[**30, 43**]**，**但是很少有数据表明PKC参与了APC[**30,44**]。

有研究表明，PKCε的磷酸化和转位依赖于挥发性麻醉剂的浓度。在较高的异氟烷浓度下可能存在其他通路[45]。

最近研究报道PKCε转位后定位于线粒体内膜，使多种线粒体内蛋白质磷酸化[**46-49**]。线粒体ALDH2已被确认为是PKCε的一个作用底物，线粒体ALDH2的活性与抵抗MIRI紧密相关[**46,50,49**]。我们的研究结果表明，异氟烷诱导的ALDH2激活伴随着PKCε由细胞质转位到线粒体中，而这一过程能够被PKCε抑制剂所抑制。已有研究表明ERK1/2阻滞会抵消PKCε激活作用，说明ERK通路参与了地氟烷预处理诱导的PKCε的激活作用[**51**]。线粒体三磷酸腺苷敏感性钾通道开放与活性氧产生是IsoP中PKCε激活的上游事件[**43**]。ALDH2激活能减少ROS产生[**42**]，这表明ALDH2可能是异氟烷诱导保护过程中的关键介导物。ALDH2与线粒体的相互作用机制尚需进一步研究。

尽管ALDH2基因多态性是心肌梗死的独立危险因素[**33, 52**]，但最近一项研究表明心脏手术时ALDH2活性抑制会减轻I/R损伤并改善心脏功能[**53**]。这一相反的临床结果可能需要更多样本和更强的证据来验证。然而，从APC未来临床应用的角度来看，对于遭受缺血事件的ALDH2活性较低的患者来说，使用异氟烷可能需要重新考虑。

PKCδ在心脏保护中的作用尚有争议。我们的研究结果表明，在心肌I/R过程中，PKCδ被活化并从胞浆转运到线粒体从而使线粒体中PKCδ的浓度显著增高，这提示，PKCδ介导的MIRI可能是通过与线粒体相互作用来实现的，这与以前的研究相一致。然而，IsoP组与对照组相比，总PKCδ没有发现任何显着差异，这似乎与Churchill[17]等人的蛋白酶调控机制是相矛盾的。

此外，我们首次发现，抑制PKCδ后，ALDH2的磷酸化水平是上调的，这表明，PKCδ在异氟烷诱导的心肌保护作用中是通过ALDH2通路来实现的。

## **4.6** 结论

IsoP诱导PKCε激活和转位到线粒体使其在线粒体中的浓度显著升高且伴随

着ALDH2的磷酸化水平显著升高，同时IsoP会抑制PKCδ激活和向线粒体转位使其在线粒体中的浓度显著减少从而显著抑制了I/R导致的心肌细胞中ALDH2磷酸化水平的降低，PKCδ可能是一种ALDH2的抑制剂，这一发现首次证明IsoP通过双向调节PKC双亚型（PKCε和PKCδ）通路在心肌I/R过程中的活化水平，

从而进一步激活了ALDH2，抵抗了MIRI。即IsoP诱导的抗MIRI机制可能是通过调控PKCε和PKCδ-ALDH2信号通路实现的。**ALDH2在IsoP抗MIRI中的作用及其可能的调控机制见图 4**



**图4图示一种可能的机制**：促进PKCε激活后向线粒体转位同时抑制PKCδ向线粒体转位使ALDH2磷酸化在IsoP诱导的抗MIRI的心脏保护中发挥重要作用。IPC/后处理及药物处理会导致RISK通路激活，进而引起PKCε磷酸化与向线粒体转位。另一方面，IsoP会抑制PKCδ的转位，PKCδ可能是一种ALDH2的抑制剂。两种效应均与心脏保护相关

**全文总结**

本课题对吸入麻醉药IsoP诱导的ALDH2介导的心脏保护机制进行了体内和体外的系列研究发现：（1） 缺血前IsoP或使用ALDH2直接激活剂Alda-44均可减少

LDH和CK-MB释放，减少心梗面积，并增强ALDH2磷酸化，这一效应可被ALDH2抑制剂Cyanamide所阻断；(2) H/R引起的心肌细胞凋亡和损伤增加现象也可由IsoP或激活ALDH2而得到缓解。ALDH2激活或IsoP诱导ALDH2激活引起的心脏保护可根本上被PKCε抑制剂εV1-2所阻断和被PKCδ抑制剂Rottlerin所增强。本研究的上述结果表明（1）PKCε引起的ALDH2磷酸化与活化对于IsoP诱导的体外和体内心肌保护是必需的，即IsoP诱导线粒体的ALDH2磷酸化而激活的作用是由PKCε从细胞质基质转位到线粒体介导的而且是实现心脏保护的必需步骤；(2) IsoP引起的ALDH2活化可减轻H/R引起的心肌细胞凋亡与损伤，这表明抗凋亡作用也参与了ALDH2诱导的心脏保护；（3）本课题还探讨了PKCδ在IsoP诱导的心脏保护中的作用并首次发现PKCδ被抑制后ALDH2磷酸化水平上调，这表明PKCδ通过ALDH2通路参与了IsoP诱导的心脏保护作用。因此我们得出结论：PKCε促使ALDH2磷酸化激活，而PKCδ却减弱这一效应。总之，IsoP减轻活体大鼠的MIRI和保护离体新生大鼠心肌细胞免受H/R损伤诱导的心肌细胞凋亡是通过ALDH2磷酸化实现的。ALDH2磷酸化在IsoP诱导的心脏保护效应中发挥关键作用。

# 本研究的创新之处和潜在价值

异氟烷等挥发性麻醉药物预处理已被广泛证明可对抗MIRI，而这种外源性预处理所激发的内源性分子保护机制尚有待进一步研究。本课题的实验研究结果首次证明：ALDH2是IsoP对抗MIRI作用中的关键因子，抑制ALDH2可取消IsoP的心肌保护作用。本研究还首次发现IsoP可显著活化PKCε同时抑制PKCδ，PKCε已被证明是ALDH2活化的关键蛋白激酶，而关于PKCδ和ALDH2之间的相互调控关系至今未见报道。本研究首次提出并证实：IsoP通过激活PKCε同时抑制PKCδ，双向调节PKC双亚型通路在心肌I/R过程中的活化水平，从而进一步激活ALDH2，抵抗了MIRI。

另外，传统研究ALDH2的方法常采用药理学方法，由于药物作用的不确定性以及非专一性，会产生诸如假阳性及药物毒性等一系列问题，而本研究首次构建出有效的大鼠ALDH2干扰型腺病毒载体以及ALDH2永久激活型腺病毒载体，这种基因操作的方式比起传统的药理学方法更加精准与专一，也是本项目技术上的特色及创新之所在。

对挥发性麻醉药物预处理分子保护调控机制的研究具有非常重要的生理学意义和临床应用价值。而对其作用靶点的研究，为心脏内源性生存信号关键因子提供证据，对临床药物的开发具有重要的指导性意义。本研究的数据提供了一个IsoP诱导的线粒体依赖的PKCε和ALDH2介导的抵抗活体MIRI和体外心肌H/R损伤的保护机制。在实验结果的基础上，对PKCδ在心脏保护信号通路中的作用，本研究也提出了自己的见解，这对于目前的APC研究扩展到临床应用中起了一定的促进作用。

**文献综述**

**线粒体乙醛脱氢酶2抗冠心病作用研究进展**

**摘要：**线粒体醛脱氢酶(Aldehyde dehydrogenase 2, ALDH2)是醛脱氢(Aldehydedehydrogenase, ALDH)的亚型之一，同时具有脱氢酶和酯酶的催化活性，其酯酶活性可通过将硝酸甘油（GTN）脱硝基形成NO，由N0发挥扩血管作用直接改善缺血区心肌的血供。ALDH2在辅助因子NAD(P) +的参与下通过其脱氢酶的活性将体内代谢过程中产生的醛类物质脱氧成为相应的羧酸，消除醛类物质主要是乙醛及其衍生物4-羟基-2-壬烯醛(4-HNE)对机体的毒性作用。对

ALDH2的研究以往多集中在酒精代谢方面，之后发现ALDH2是体内催化GTN生物转化的关键酶其心肌保护作用则是近年来提出的一个新发现。心肌缺血/再灌注(I/R)过程中活性氧自由基的产生是心肌发生MIRI的始发环节，通过脂质过氧化导致大量活性醛类物质如4-HNE在心肌中产生和堆积，这些活性醛类物质具有比活性氧自由基更高的细胞毒性，更长的半衰期以及更强的扩散性。大量研究发现缺血和药物预处理或后处理对氧化应激引起的心肌细胞损伤的保护作用主要是通过激活ALDH2，消除4-HNE等活性醛类对心肌的氧化损伤实现的，提示ALDH2可能是心肌保护信号转导通路中的重要环节之一。冠心病为西方国家致死的首要原因。在发展中国家其发病率和死亡率呈逐年上升趋势，并已成为致死的主要原因之一。急性心肌梗死（acute myocardial infarction, AMI）属冠心病的严重类型，致死率极高。研究发现ALDH2野生型是对抗氧化应激的保护因子通过减少活性氧(reactive oxygen species, ROS)或解毒4-HNE途径抑制体内的氧化应激诱导的心肌细胞凋亡、减轻AMI时缺血心肌的再灌注损伤、减轻动脉粥样硬化并通过将GTN脱硝基形成NO发挥扩血管作用直接改善缺血区心肌的血供来缓解心绞痛。因此提高ALDH2活性有望成为冠心病防治的新突破。新近研究表明，ALDH2酶活性的下降将加重酒精、缺血等多种因素引起的心肌损伤和促进硝酸甘油耐受的发生，因此以ALDH2为靶点开发和研制特异性

激动剂来提高ALDH2活性以及寻找抗心肌缺血损伤的新药物将为缺血性心脏疾病的药物防治提供新思路。本文就线粒体ALDH2在冠心病的发生发展以及缺血心肌再灌注过程中所发挥的抗毒性醛类对心肌的氧化损伤、抗心肌细胞凋亡和改善缺血区的血供等作用及其机制作一综述。

# **1** 人类**ALDH2**基因的遗传多态性与冠心病的关系

## **1.1** **ALDH2**概述

醛脱氢酶（ALDH）是一组NAD(P) +依赖性酶，广泛参与体内醛类物质的氧化反应（脱氢作用）[**1**]。体内乙醇、氨基酸、生物胺、维生素、类固醇等物质在代谢过程中会产生众多醛类物质，ALDH在这些物质的代谢中发挥重要作用。人体内有19种ALDH，常见的有ALDHl一ALDH4四种，由位于四个不同染色体上的独立基因位点编码。其中线粒体ALDH2位于线粒体内，而ALDH1、ALDH3、ALDH4则位于胞液内[**2**]。ALDH2进化上相当保守。定位于12号染色体的ALDH2是线粒体ALDH的主要编码基因。ALDH2是ALDH的一种低Km形式，是一类典型的线粒体蛋白，由核基因编码，在细胞质中合成前体蛋白经转运到线粒体，切除N末端的17个氨基酸的信号肽，形成成熟的蛋白。成熟的人类线粒体醛脱氢酶是一个同源四聚体，每个亚基有500个氨基酸残基，分子量大小约

54KD。研究表明，ALDH同工酶中以ALDH2的活性最强，ALDH2是存在于线粒体内的一种氧化乙醛的酶，因此也称为乙醛脱氢酶2，而且它与生物氧化有密切的关系，可防止乙醛对膜的脂质过氧化，减少活性氧代谢产物4-HNE等对细胞的损害[3]在清除体内醛类物质中起主要作用。由于醛类物质具有很强的氧化活性和细胞毒性，各种因素引起的ALDH2失活均可导致醛类物质堆积，对机体组织、器官等造成不可逆性损伤。研究发现ALDH2活性变化与酒精、缺血等因素引起的心肌损伤和硝酸甘油耐受的发生密切相关。ALDH2在人体内分布具有组织特异性，在人群中表现为基因遗传多态性。目前，国内外研究主要集中在

rs671SNP位上，该位点在辅酶结合位点的连接结构中发挥重要作用[4]，这个位点突变使ALDH2失去结合辅酶的能力，造成酶的活性丧失。

## **1.2** 人类**ALDH2**基因的遗传多态性

ALDH2在人群中分布表现为基因多态性：人编码ALDH2的基因在第12个外显子存在着碱基A被G替换的基因多态性，导致504位的谷氨酸残基突变为赖氨酸（E504K），即ALDH2 504 位点存在A 被G 替代的单核苷酸多态性，这一突变使ALDH2出现三种不同的基因型：野生型(ALDH2\*1/\*1，酶活性正常)、突变杂合子型(ALDH2\*2/\*1，酶活性下降30％一50％)以及突变纯合子型(ALDH2\*2/\*2，酶活性基本丧失)。ALDH2的基因多态性可以直接影响体内乙醇和乙醛的浓度，从而可能与嗜酒及酒精相关性疾病的发生有关，ALDH2的缺陷基因型可导致饮酒后乙醛蓄积，后者是已知的致癌剂，与肿瘤的发生有关**[5, 6, 7]**。有实验显示ALDH2催化短链的醛类如乙醛等，可使乙醛变成乙酸，并且分解乙醛衍生物4-HNE，减轻乙醛对细胞的氧化损伤**[8]**。已经发现ALDH2活性的降低可使乙醛向乙酸盐分解的过程受到阻遏，使体内乙醇代谢的中间产物乙醛的浓度显著增高，导致血中乙醛积聚，刺激肥大细胞释放血管活性物质使血管舒张而出现脸红、出汗、发音困难、心动过速、恶心和低血压等反应**[9]**。有研究者发

现ALDH2\*2/\*2纯合子饮酒后血中乙醛的含量比野生型升高6-20倍。

研究发现45%左右的东亚人群携带着这种突变型的基因**[10-11]**。有报道表明在亚洲一些人群中，如中国的汉族，日本等民族，存在高频率的缺陷型人类乙醛脱氢酶2(aldh2\*2)，即第12个外显子上的一个单核苷酸多态(SNP)，该核苷酸的变化直接导致了该密码子编码的赖氨酸转变为谷氨酸，使缺陷型的ALDH2\*2对乙醛的催化活性几乎丧失。美国约有10％的心绞痛患者对硝酸甘油药物无效，而在中国汉族比例高达25％以上，这些都是缺陷型的ALDH2\*2所致**[12]**。2003年日本学者转染缺失型ALDH2 cDNA入PCI2细胞，发现这类细胞对内源性和外源性4-HNE的损伤尤其敏感，相对于野生型ALDH2 cDNA转染的细胞，它们的存活率则显著下降；ALDH2高表达的内皮细胞对抗ROS的耐受性增加，延缓细胞凋亡过程**[13]**。2004年Shi的研究显示：外源性乙醛可引起人脐静脉内皮细胞ROS产生增多，细胞凋亡加速，应激信号ERK1／2和P38 MAPK激活，

而ALDH2的高表达可抑制这些事件的发生[14]。这些研究提示线粒体中ALDH2

使机体组织中某些类型的细胞对氧化损伤具有更强的抵抗力。

## **1.3** **ALDH2**基因型与心肌缺血再灌注损伤

虽然在AMI时及时开通梗死相关动脉，尽早恢复心肌血流灌注是挽救濒死心肌的关键，具有重要的临床意义。然而，无论是体外循环下心内直视手术，还是急性心肌梗死后的溶栓术、冠脉介入（球囊扩张及支架置入）以及冠状动脉旁路移植手术都必然经历心肌缺血/再灌注过程。缺血心肌的再灌注也存在不利一面，可引起新的损伤即心肌缺血再灌注损伤（m y o c a r d i a l i s c h e m i a reperfusion injury, MIRI）心肌缺血再灌注过程中所产生的活性氧簇（ROS）导致的氧化应激通过诱导大量醛类物质在心肌中的产生和堆积导致心肌发生缺血再灌注损伤[15-17]。这些活性醛类物质具有比活性氧自由基更高的细胞毒性，更长的 半衰期以及更强的扩散性[18]氧化应激(OxidativeStress)是指机体或细胞内氧自由基的产生与清除失衡，导致ROS在体内或细胞内蓄积而引起的氧化损伤过程。

ALDH2通过脱氢酶的活性将醛类代谢成相应的羧酸，解除醛类对心肌的氧化损伤。一般认为突变型的ALDH2活性降低甚至散失对醛类的代谢能力减弱。导致醛类在心肌中大量堆积引起MIRI。然而在MIRI过程中ALDH2基因突变型是否具有保护作用仍存在争议[**19**]。Chen等[**20**]研究小组在大鼠心梗模型和大鼠离体心肌模型上通过ALDH2特异性激活剂alda-1在缺血前预处理，降低了60%的心梗面积，证实其保护作用是通过增强ALDH2对醛类的代谢所产生的。但Endo等[**21**]通过转基因人ALDH2突变型基因小鼠研究发现，缺血再灌注导致的心肌线粒体醛类应激，通过代谢重构激活谷胱甘肽氧化还原循环，诱导糖代谢通路转向糖代谢旁路，导致抗缺血再灌注损伤的保护作用。张裕坚等[**22**]的研究结果与其相一致他们在人类身上观察到了线粒体ALDH2基因突变型对抗人心肌缺血再灌注损伤的保护作用。

## **1.4** **ALDH2**基因型与冠心病

ALDH2 基因型与冠心病的关系紧密，主要涉及心绞痛和心肌梗死两个方面。饮酒诱发的血管痉挛性心绞痛在ALDH2基因型上没有差异，而ALDH2缺失型病人少量饮酒就能诱发心绞痛发作**[23]**。可以把ALDH2基因型作为饮酒后血管痉挛性心绞痛的共同因素。ALDH2基因型对酒精摄入的反应明显不同[24]：饮酒不能改变ALDH2野生型的心率，却能增加ALDH2缺失型型者的24小时平均心率。酒精诱导ALDH2缺失型心动过速可能是乙醛引起肾上腺素分泌增加和（或）影响自主神经系统来发挥作用**[25]**。

ALDH2缺失型与心肌梗死的关系：Takagi等调查研究发现ALDH2缺失型组年龄较大，糖尿病发病率高，高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)更低；ALDH2缺失型能够明显减少饮酒和降低HDL-C水平。ALDH2基因缺失型是日本男性人群中心肌梗死发生的危险因素，通过降低HDL-C水平来实现**[26]**。近来，Jo等**[27]**临床研究分析：ALDH2缺失型、HDL-C异常是韩国老年男性心肌梗死的独立的危险因素。近来研究发现：ALDH2缺失型有更高的心肌梗死率和糖尿病的发病率；ALDH2缺失型是中国汉族人群心肌梗死的独立危险因素**[28]**。ALDH2缺失型可能通过减少饮酒和破坏斑块稳定性而造成心肌梗死。ALDH2缺失型减少饮酒，增加高密度脂蛋白载脂蛋白的转运，产生剂量依赖型HDL和apoAl、A2增加**[29]**。ALDH2缺失型能够增加血液乙醛浓度，乙醛明显增强斑块的炎症反应，使斑块易损性增加，造成心肌梗死。Nakamura等**[30]**发现：中等剂量的酒精摄入不能提高ALDH2缺失型携带者HDL水平，并且对此类携带者没有心血管疾病保护作用。这说明中等剂量酒精对心血管的保护作用可能部分是通过ALDH2发挥作用。Ohsawa等**[31]**在对人群调查研究发现：ALDH2缺失型组中脂质过氧化物(LPO)水平明显升高。ALDH2缺失型会增加体内的氧化应激，ALDH2是对抗氧化应激的保护因子，保护作用的降低可能增加心肌梗死。男性饮酒的频率明显高于女性，其经常饮酒引起体内氧化应激增加，掩盖了ALDH2野生型对脂质过氧化物血清水平降低的作用。这提示ALDH2是不依赖调节酒精摄入来发挥心

血管保护作用，为ALDH2研究开辟了新的思路**[32]**。总之，ALDH2缺失型能够增加体内的氧化应激，破坏斑块的稳定性，成为心肌梗死的独立危险因素。而

ALDH2野生型是对抗氧化应激的保护因子，通过减少ROS或解毒4-HNE途径抑制体内的氧化应激诱导的心肌细胞凋亡，减轻动脉粥样硬化和高血压。提高

ALDH2活性有望成为冠心病防治的新突破。

# **2** 线粒体**ALDH2**对乙醛及其代谢产物**4-HNE**的清除和解毒功能

## **2.1** 活性氧的产生和对心肌的损伤作用

活性氧（ROS）在正常细胞代谢过程中不断地从线粒体产生并被释放到胞外。随着ROS的不断产生，它们能被体内的酶系统（超氧化物岐化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等）和非酶系统（维生素E、维生素C、牛磺酸等）清除，维持体内氧化和抗氧化系统的动态平衡，使得细胞内ROS处于一个相对稳定的水平

**[33]**. 心肌缺血缺氧时可使心肌细胞线粒体ROS产生增多，其原因是血供减少，使真核细胞在有氧呼吸过程中，一小部分氧不能被完全还原，生成了具有较强氧化作用的ROS：包括超氧阴离子（02-）、羟自由基(0H．)、过氧化氢(H202)、一氧化氮(No.)、OCL、ON00-等多种物质，最常见的ROS是过氧化氢、单线态氧和羟自由基。过多的自由基堆积一方面可以攻击多聚不饱和脂肪酸并夺取线粒体膜和细胞膜不饱和脂肪酸侧链上的氢原子而启动脂质过氧化（Lipid

peroxidation，LPO）链式反应，产生过多的丙二醛(Malondialdehyde, MDA)和乙醛衍生物4-HNE等醛类代谢产物而损伤细胞结构。4-HNE是一种强亲电子剂，通过吸收细胞内蛋白、结合谷光甘肽、抑制钠-钾-ATP酶磷酸化活性造成细胞凋亡或坏死**[34,35,36]**。ROS可引起脂类的过氧化，蛋白质的变性，DNA的断裂等等，近年来还发现ROS还可参与细胞信号转导，启动某些基因的表达，心肌缺血再灌注过程中活性氧自由基的产生是机体发生缺血再灌注损伤的始发环节，因此细胞内ROS的水平对细胞基本新陈代谢状态有重要的影响**[37]**；另一方面过多的

ROS使一氧化氮合成酶(eNOS) 生成NO的平衡失调，破坏了一氧化氮(NO)

的生物转化，NO在含氧实验体系极不稳定，迅速被氧化为亚硝酸盐，即ROS

还能与NO快速作用，这不仅导致No生物活性的降低，还可以产生另外一种

ROS过氧亚硝酸盐(ON00.一)，从而放大氧化应激效应，加重了对细胞的氧化损伤。减弱了NO改善缺血区心肌的血供来缓解心绞痛的功能。

## **2.2** 线粒体**ALDH2**对乙醛及其代谢产物**4-HNE**的清除和解毒功能

线粒体通过其产生一些有益的保护因子来减少或对抗膜脂质过氧化及

ROS的升高，而高活力ALDH2是重要的保护因子之一。ALDH2具有多种酶功能，主要包括脱氢酶和酯酶功能。体内脂质过氧化过程中产生的醛类大约有200多种，其中包括4-HNE和MDA**[38,39]**. ALDH2作为线粒体酶，是机体醛类物质（如乙醛、4-HNE）的主要代谢酶，ALDH2在辅助因子NAD(P) +的参与下将醛类物质脱氧成为相应的羧酸，其中肝脏细胞中的ALDH2对4-HNE清除极为重要。如

ALDH2通过脱氢酶的活性将乙醛变成无生物毒性的乙酸，并且分解4-HNE，从而减轻乙醛及其代谢产物4-HNE对细胞的氧化损伤。对醛类物质的解毒和氧化损伤的减轻起重要作用。ALDH2发挥酯酶功能则不需要辅助因子，可将羧酸酯或者其他酸转化为相应的羧酸和醇。即ALDH2可能对ROS引起的细胞损伤起保护作用并可参与细胞内的生物转化**[40,1]**。ALDH2的催化中心含有3个巯基基团**[41]**，其中两个作为电子供体参与催化某些物质如硝酸甘油的还原反应，另一个以二硫键的形式留在催化中心。ALDH2的活性受氧化还原剂的调节，如超氧阴离子、过亚硝酸盐等活性氧可抑制其活性，而二硫醇类物质如二氢硫辛酸则可以增加其活性**[42-44]**. ALDH2野生型能够抑制心肌细胞凋亡发挥心肌保护作用，还能减缓动脉粥样硬化进展，增加斑块的稳定性，减少心肌梗死。任何原因引起的ALDH2活性的降低或失活均可使体内乙醇代谢的中间产物乙醛及4-HNE等具有强氧化活性和细胞毒性的醛类物质在体内堆积而浓度显著增高对机体组织、器官等造成不可逆性损伤**[45]**。ALDH2基因缺失和过表达对神经和内皮细胞具有损伤或保护作用；Takagi等发现ALDH2基因缺失型是日本男性人群中心肌梗死发生的危险因素，均提示了ALDH2可能对心肌细胞氧化损伤起保护作用**[46-47]**，因此人们认为4-HNE也是心肌细胞氧化损伤的重要作用因素。

MDA和4-HNE为LPO过程中具有代表性的代谢产物，可引起蛋白质交联变性、

DNA损伤断裂和促进肿瘤的形成[48]；也有人认为P12神经细胞在4-HNE刺激下，对氧化攻击损伤的易感性明显增加，细胞膜变形和钙运输改变，因此迅速去除4-HNE氧化损伤作用对细胞的生存非常重要**[49-50]**；有研究在心肌细胞体外实验证实了野生型ALDH2基因的作用就是能够较快清除4-HNE，保证线粒体的正常功能，说明线粒体内的ALDH2对氧化损伤具有重要的抗损伤保护作用，同时他们从体内和体外的实验都证明了ALDH2酶活性与缺血缺氧的关系是：缺氧心肌细胞的ALDH2的酶活性随缺氧时间延长而下降且缺血缺氧大鼠左室心肌线粒体ALDH2表达降低。在蛋白质组水平证实线粒体乙醛脱氢酶2(ALDH2)在缺血缺氧心肌中低表达，同时在mRNA水平证实心梗后3天一直到28天过程中，

ALDH2水平持续下降。说明ALDH2表达下调发生在转录水平。同时用western

blotting的方法从蛋白水平证实在持续心梗时ALDH2表达的下降趋势**[51]** 。

ALDH2不仅是酒精代谢过程中的关键酶，而且还是体内重要的氧化应激分子，能够减少体内的氧化应激，具有抑制细胞凋亡的作用，已成为目前冠心病发病机制研究的新热点。

**3 ALDH2与硝酸甘油缓解心绞痛作用和硝酸甘油耐受**

硝酸甘油(GTN)是近一个多世纪以来被广泛应用于治疗心绞痛急性发作和抗局部缺血的经典药物之一，一般认为其直接通过一氧化氮(NO)／cGMP路径发挥作用**[52]**。2002年Chen等发现线粒体ALDH2是一种硝酸还原酶，这个发现消除了人们长期以来对硝酸甘油为何能缓解心绞痛而又为何产生耐受的疑惑。线粒体ALDH2是体内催化GTN生物转化的关键酶，在硝酸甘油的生物转化中

ALDH2可以催化硝酸甘油产生1，2一二硝酸甘油和亚硝酸盐，这是生成具有生物活性NO的必要环节，NO对缺血缺氧心肌细胞具有保护作用**[53, 54]**。Sydow等**[55]**研究发现ALDH2这种硝酸还原酶，能通过将硝酸甘油脱硝基作用代谢产生一氧化氮(NO)，发挥非内皮细胞依赖性血管舒张作用来缓解心绞痛；而ALDH2缺失型其硝酸还原酶活性显著降低，使硝酸盐血管舒张作用明显减弱或缺失。

ALDH2缺失型对硝酸酯类药物反应能力低下[56]可能是硝酸甘油对某些心血管病病人治疗无效的原因。2005年Chen等利用ALDH2基因缺失小鼠证实ALDH2对硝酸甘油的生物转化非常重要，因为硝酸甘油对整体动物降压作用和对离体血管环的舒血管效应均因ALDH2基因的缺失而明显减弱[41]。在舌下含服硝酸甘油的受试者当中，ALDH2基因突变的携带者，无论是纯合子还是杂合子

（ALDH2\*2／\*2或ALDH2\*2／\*1），他们对硝酸甘油的反应明显减弱，强烈地提示ALDH2酶的活性与硝酸甘油的生物转化直接相关[57]。进一步研究发现**[58-59]**，

ALDH2酶的活性与舒血管物质血浆降钙素基因相关肽(CGRP)水平以及外周血淋巴细胞CGRP mRNA表达呈正相关，提示ALDH2酶可能介导硝酸甘油生物转化为NO, NO可能通过多种途径发挥舒血管效应，其中包括促进CGRP的合成与释放。

但大规模的临床试验表明，长期使用硝酸酯类药物其心肌保护作用会消失或减弱，即产生耐受，且增加低血压的发生率，因此限制了硝酸甘油的临床应用。耐受性发生的机制尚未完全阐明，早期认为与-SH耗竭有关，但新近研究证明，硝酸甘油耐受时机体组织中-sH含量并不降低，可能与硝酸甘油诱发的氧化应激有关。目前认为，持续应用硝酸甘油将导致超氧阴离子(O2¯.)、过氧亚硝基(ONOO-)等活性氧大量产生，抑制ALDH2 的活性，导致硝酸甘油生物转化受阻，

N0生成减少，从而产生耐受**[42, 60]**。或因持续使用硝酸甘油可导致线粒体ALDH2被过剩的亚硝酸盐氧化，NO不能持续产生，从而产生硝酸甘油耐受现象[54]。此外，在持续应用硝酸甘油治疗过的冠心病患者，经搭桥手术后，发现其血管组织中ALDH2的活性明显降低**[61]**，支持长期用药会抑制ALDH2活性的观点。

GTN长期使用可引起耐受，导致平滑肌细胞ALDH2基因和蛋白表达下调**[62-64]**。有研究在心肌细胞中证明GTN预处理1 d可减轻心肌细胞凋亡，ALDH2 mRNA和蛋白水平均较对照组上调，推测GTN短期预处理能明显减轻心肌细胞凋亡的程度，其机制可能与上调ALDH2 mRNA及蛋白表达有关，为心肌保护作用。

GTN作用2、3 d时缺氧心肌细胞ALDH2 mRNA和蛋白表达水平均下调，而缺乏心肌保护作用。因此，初步推测GTN长期使用缺乏心肌保护作用可能与

ALDH2消耗有关。此外，在细胞水平证明GTN作用2～3 d时的心肌细胞凋亡明显增加，且随着剂量的增加而增加。缺氧心肌细胞的凋亡有43％的可能性是由ALDH2基因变化所致。GTN作用后ALDH2基因的表达变化与缺氧心肌细胞的凋亡呈负相关，ALDH2 mRNA 表达量高时，心肌细胞凋亡较少；表达量低时，心肌细胞凋亡较多**[65]**。这与相关文献研究ALDH2对缺血缺氧心肌细胞有保护作用是一致的。Nakamura等**[66]**观察l 042例长期使用硝酸盐类药物的心肌缺血患者后发现，其死亡的风险明显增加。硝酸盐类药物长期使用后不良反应发生的可能机制目前尚存在很大的争议。有研究认为硝酸盐耐受与硝酸盐类药物长期使用预后不良有一定关联，另有研究则认为神经激素系统的激活起着不容忽视的作用，甚至有些专家认为使用硝酸盐后动脉粥样硬化斑块不稳定可能是其原因。

总之，线粒体ALDH2通过使硝酸甘油转换为一氧化氮，发挥舒张血管的作用来缓解心绞痛，而持续使用硝酸甘油可导致线粒体ALDH2被过剩的亚硝酸盐氧化，NO不能持续产生，从而产生硝酸甘油耐受导致缺乏心肌细胞保护作用和心脏不良事件发生。

**4 PKCε-ALDH2通路的抗心肌缺血／再灌注损伤作用**

冠心病是目前全球死亡率极高的疾病。随着冠状动脉内溶栓、冠脉介入（球囊扩张及支架置入）以及冠状动脉旁路移植手术等内外科治疗冠心病手段的广泛应用，在恢复缺血心肌的血流灌注挽救濒死心肌的同时，缺血心肌再灌注过程中产生的活性氧自由基通过脂质过氧化导致大量活性醛类物质如4-HNE在心肌中堆积而触发了心肌缺血再灌注损伤（MIRI）。心肌缺血／再灌注（I/R）损伤的机制涉及多种学说，如中性粒细胞浸润、钙超载、氧化应激和能量代谢障碍等学说，其中氧化应激学说是目前该领域研究的热点。氧化应激已被证实能

够诱导细胞凋亡，产生的ROS被认为是多种细胞凋亡的共同介质，可作为信号分子介导细胞凋亡。线粒体是ROS产生的重要部位，也是ROS攻击的重要目标**[67]**。在缺血和再灌注的过程中都有ROS的产生，低水平ROS对心肌保护有积极意义，但高水平ROS则会破坏心肌细胞内电子转移链以及抑制线粒体通透性转换通道的活化，促进心肌细胞坏死，加重心肌损伤**[68, 69]**。心肌细胞的功能与代谢特点决定了心肌细胞对缺氧特别敏感，有研究发现缺氧产生的自由基在亚毒剂量时就可以充当信号分子，调节细胞质Ca2+的浓度以启动Caspase，影响凋亡相关基因和多个途径**[70-71]**。缺氧对心肌细胞凋亡的影响主要是通过线粒体途径，线粒体功能和结构正常与否是决定细胞生存还是死亡的关键因素。因为哺乳动物心肌细胞线粒体约占其总体积的30％，其功能轻微改变即可影响心肌细胞的代谢；线粒体跨膜电位和通透性改变在细胞凋亡过程中起重要作用；细胞死亡调节蛋白均以线粒体作为靶细胞器**[72]**。ALDH2）是存在于线粒体内的一种氧化乙醛的脱氢酶，可消除乙醛对膜的脂质过氧化，减少活性氧代谢产物对细胞的损害。有研究发现大鼠心肌缺血缺氧模型线粒体ALDH2蛋白的表达降低，这一结果在基因和蛋白质水平均得到了验证**[73]**。最近该研究小组以大鼠离体心肌细胞为缺氧模型，经ALDH2酶的特异性抑制剂daidzin特异阻断ALDH2活性，发现线粒体ALDH2的缺乏可导致心肌细胞对缺氧损伤的易感性增加，从另一角度证实ALDH2对缺氧引起的心肌细胞损伤和凋亡具有拮抗作用[51] ALDH2最早被报道参与乙醛代谢。其心肌保护作用是近年来提出的一个新的发现。心肌细胞缺氧复氧损伤模型上显示乙醇预处理可发挥保护作用，其机制涉及PKC的激活

**[74]**，诱导性一氧化氮合成酶的生成增多**[75]**等。乙醇（EtOH）预处理可以增加PKCε的表达和激活，进而激活下游ALDH2发挥心肌保护作用，也可直接激活ALDH2发挥心肌保护，表明ALDH2是I/R损伤中心肌保护的关键酶**[76]**。心肌I/R通过激活ALDH2可加快4-HNE等醛类物质的消除，减轻心肌的氧化损伤，产生心肌保护作用**[20]**。LI等**[77]**研究发现，转入ALDH2基因后的人脐静脉内皮细胞抗氧化损伤作用显著增强，可明显减少ROS的增加，在其后研究中，将ALDH2

转染人的心肌细胞后，可以减轻乙醛诱导的细胞内ROS产生，降低凋亡比例**[78]**。有研究显示**[79]**：EtOH后处理发挥心肌保护作用时，ALDH2 mRNA表达增高，

ALDH2阻断剂CYA减弱EtOH的保护作用，ALDH2mRNA表达降低，提示EtOH后处理的心肌保护作用与激动ALDH2有关。同时说明ALDH2与氧化应激之间密切相关且EtOH可能通过增高ALDH2的表达发挥抗氧化效应。另有报道认为适量饮酒对心脏是有益的，乙醇能否对心脏产生保护作用取决于给予乙醇的量和时间。在合适的条件下，乙醇可以诱导εPKC转位，转位的εPKC与其锚定蛋白εRACK(receptor for activated C-kinase)相互作用，进而磷酸化周围的底物，产生心肌保护作用。Churchill等**[38]**最近的研究确定了诱导εPKC转位的靶蛋白为

ALDH2。在离体急性心肌梗死模型，缺血／再灌注60 分钟前给予乙醇(0．5 g·kg-1)处理，伴随着εPKC的转位和ALDH2的激活能明显减轻心脏缺血/再灌注损伤。然而，在缺血／再灌注15分钟前给予同样剂量的乙醇处理，则并不能产生明显的心脏保护作用，这一结果有力地证明了乙醇诱导的心脏保护作用与给予乙醇的时间密切相关。有文献报道，培养的心肌细胞或离体心脏，给予浓度为50 mmol·L-1的乙醇能产生保护作用，低于此浓度不会产生保护作用，而高于此浓度则会加重心肌损伤，这说明εPKC和ALDH2的激活受乙醇浓度的调节。乙醇对缺血心肌的保护作用主要是通过激活ALDH2减轻醛类物质对心肌的氧化损伤而实现的，由此推测缺血心肌的防治可通过上调ALDH2活性减轻缺血损伤。

Chen等**[20]**利用高通量技术筛选出小分子物质Alda-l，并证明Aida-1能特异性激活ALDH2。在离体大鼠心脏缺血／再灌注损伤模型，缺血前预先用Alda-1灌注10分钟，则能使其梗死面积减少60％。Aida-1可以升高人ALDH2基因纯合子ALDH2\*2／\*2的酶活性11倍，杂合子ALDH2\*2／\*1的酶活性2．2倍。野生型ALDH2\*1／\*1 的酶活性2．1倍，但对于胞质ALDHI 和线粒体ALDH5的酶活性没有影响。被Aldal-1激活的ALDH2可以加快4-HNE等醛类物质的清除，减轻这类物质对心肌的氧化损伤，产生心肌保护作用。由于AHDH2基因突变体在亚洲人群中约占45％左右的比例，因此通过上调ALDH2 的活性（如利

用外源性Alda-1）对抗心肌缺血/再灌注损伤，从而降低急性心肌梗死的死亡率，在ALDH2基因突变体人群中特别是亚洲人群中意义特别重大。外源性ALDH2激动剂alda-1可产生心肌保护作用，进一步提示ALDH2可能成为研究心肌保护机制的一个新方向**[80]**。

# **5** 急性心肌梗死凋亡基因的表达与**ALDH2**的抗凋亡作用

心肌细胞的死亡是急性心肌梗死（AMI）的病理基础，AMI初期以心肌细胞凋亡为主，此后细胞凋亡现象逐渐减弱而坏死逐渐增强。心肌梗塞过程中的凋亡是造成心肌细胞损伤的重要因素之一**[81]**。心肌经历了缺血缺氧损伤，导致了心肌细胞的凋亡，细胞凋亡是精确调节细胞数量，清除无用的或有潜在危险细胞的过程。但是心肌细胞属终末分化细胞，出生后基本丧失分裂、增殖潜能，心肌细胞凋亡增加可以造成心脏泵动力来源减少**[82]**。目前认为与AM I时心肌细胞凋亡相关的主要基因有p53、Bcl-2基因家族和Fas. p53是肿瘤抑制基因，在许多细胞系中有诱导细胞凋亡的作用；Bcl-2基因家族包括促细胞凋亡成员及抑细胞凋亡成员，它们的蛋白结构有同源区域；Fas基因表达产物Fas抗原属于肿瘤死亡因子。

## **5.1** **Bcl-2**和**Bax**

大量研究表明**[83]**线粒体的Bcl-2基因家族是重要的凋亡调控基因，其家族成员共同构成一个非常复杂网络调控细胞凋亡。其中，Bcl-2（具有抗凋亡作用）和Bax（具有促凋亡作用）是Bcl-2家族中最重要的两个成员，二者密切相关**[84]**。Bcl-2蛋白具有促进细胞生存，对不同因素引起的细胞凋亡均有抑制作用。而Bax蛋白可与Bcl-2蛋白形成异二聚体，使Bcl-2蛋白失活，促进细胞凋亡的发生。

Bax还可通过形成Bax--Bax同二聚体直接启动凋亡程序。Bcl-2则通过与Bax形成Bcl-2--Bax异二聚体，从而阻止Bax启动凋亡程序，因此Bcl-2的相对表达量和所处的状态直接影响着凋亡程序的启动与否。Bcl-2磷酸化以后将不能与Bax形成Bcl-2--Bax异二聚体，可使细胞进入凋亡程序**[85-87]**. Bcl-2在效应性caspases上游阻止蛋白质水解，从而抑制caspases的活化。目前认Bcl-2与caspases相关

有两种机制：（1）Bcl-2通过运输caspases到细胞内的膜结构（如Mt膜），阻止

caspases的活化，维持细胞生存；(2) Bcl-2通过阻止一些caspases活化剂(CtyC或AIF)从Mt释放入细胞浆以阻止caspases活化而维持细胞生存**[88, 89]**。在同时转染野生和缺失型ALDH2基因后，均伴随ROS和MAPK不变。在ALDH2野生型基因使4-HNE降解、进而凋亡减少的情况下，我们检测到了非磷酸化Bcl-2在转染ALDH2野生型基因组的增加，说明ALDH2在分解4-HNE的同时，它的抗凋亡的作用是Bcl-依赖型的[51]。而Bcl-2虽可影响氧自由基的生成，但它的抗凋亡作用可以是ROS依赖或非依赖型的**[90]**，有研究证实ALDH2\*1是通过ROS非依赖性的刺激途径阻止凋亡的发生。与此同时也发现了P53的减少**[51]**。有文献报道缺血后处理及乙醇后处理激动ALDH2表达增高后可上调心肌Bcl-2mRNA，降低BaxmRNA水平, Bcl-2/Bax比值增加，提示其发挥了抗凋亡的作用，而使用ALDH2阻断剂氨基氰阻断ALDH2的作用后，与后处理组相比，Bcl-2mRNA水平下调，BaxmRNA水平升高，Bcl-2/Bax比值降低。以上结果显示促进ALDH2在心肌的表达可以发挥抗凋亡的作用。提示缺血后处理可部分通过提高心肌ALDH2的表达发挥心肌保护作用，其具体机制还有待进一步研究

**[91**]. 转染ALDH2腺病毒载体使ALDH2基因高表达，可以有效地抑制急性心肌梗死后心衰小鼠心肌细胞的凋亡的发生抑制P53的表达**[92-93]**。越来越多的证据支持ALDH2可能是行之有效的心肌保护因子。

## **5.2** **P53**和**Bcl-2**

有研究表明；缺氧使心肌细胞P53基因表达增高，可直接诱导其凋亡。Long等在正常培养的鼠心肌细胞缺氧48h后，观察到细胞凋亡的特征性改变，并发现p53表达及转录活性提高。为进一步确定p53超表达是否足以诱导细胞凋亡，他们观察转染了wt p53(野生型P53)的鼠心肌细胞，发现细胞内有高水平p53表达时，伴有细胞凋亡的特异性改变，而没有转染wt p53的对照组无细胞凋亡现象，提示p53在诱导缺血心肌凋亡中有重要作用**[94-95]**。然而P53诱导凋亡机制与Bcl-2家族密切相关**[96]**。在细胞凋亡过程中，p53可以上调促凋亡基因Bax的启

动子转录，同时伴有Bax蛋白的增多，且在心肌梗死的边界区发现Bax伴随p53同时存在。p53可下调Bcl-2基因转录，而Bcl-2在心肌细胞中过表达可以有效地抑制p53介导的Bax的活化及心肌细胞的凋亡**[97]**。因此在凋亡和抗凋亡的作用中，P53和Bcl-2是相互关联的，一般情况下，在促细胞凋亡途径被激活时，相应的抑制细胞凋亡基因的表达量也会增加，细胞凋亡与坏死的区别在于前者是一种主动的、受到细胞自身基因调控的过程。研究人员发现野生型基因

ALDH2\*I使非磷酸化Bc] -2增多和磷酸化P53减少，说明ALDH2在这一途径中所发挥的作用。因此他们推测ALDH2\*I诱导的抗凋亡作用是4-HNE-Bcl-2-P53而非ROS—MAPK依赖性途径，4-HNE可能是氧化损伤的关键作用因子之一**[51]**。

## **5.3** 促细胞凋亡因子**Fas**和**CPP32**

已有研究观察到缺氧使心肌细胞Fas基因mRNA表达增高。目前已知，Fas是细胞凋亡过程中的重要信号传递分子，CPP32在Fas介导的细胞凋亡中起着非常重要的作用，在心肌细胞凋亡过程中，促细胞凋亡因子Fas、CPP32对缺血性刺激相当敏感，它们的过度表达有可能在心肌细胞凋亡途径的进一步发展中充当了启动细胞凋亡的关键信号，加速急性心肌缺血产生的损伤。表明Fas信号途径可能参与心肌细胞凋亡过程**[98]**。

总之，凋亡相关基因表达量的变化提示大鼠的急性心肌缺血性损伤与P53和Bcl-2家族参与的心肌细胞凋亡有关，也与Fas参与、CPP32介导的心肌细胞凋亡有关。有关抗凋亡因子ALDH2与凋亡相关基因之间的相互联系的机制仍有待于进一步研究。

结 语

随着冠状动脉内溶栓、冠脉介入（球囊扩张及支架置入）以及冠状动脉旁路移植手术等内外科治疗冠心病手段的广泛应用，在恢复缺血心肌的血流灌注挽救濒死心肌的同时，缺血心肌再灌注过程中产生的活性氧自由基通过脂质过氧化导致大量活性醛类物质如4-HNE在心肌中堆积而触发了心肌缺血再灌注损伤。在近半个世纪中，尽管缺血再灌注已经得到广泛的研究与临床应用，但人

们仍在不断地探索对抗致死性再灌注损伤的有效方法，并取得了一些重要进展，如有关小分子物质Alda-1抗心肌缺血损伤、硫辛酸抗硝酸甘油耐受的报道即通过上调ALDH2活性来实现**[43, 20]**。最近研究人员使用蛋白组学方法，确认了在啮齿类动物模型中ALDH2活性与心脏损害之间呈负相关关系。证明了乙醇预处理能够诱导PKCe激活，PKCe再使线粒体ALDH2磷酸化而活化，进而引起心脏保护。ALDH2\*2是ALDH2的一种无活性的突变形式，在45%的东亚人群中发现。他们利用高通量技术筛选出一种小分子物质Alda-1，并证明Alda-1能特异性激活ALDH2。被Alda-l激活的ALDH2可以加快4-HNE等醛类物质的清除。Alda-1对于突变型的ALDH2\*2以及野生型ALDH2\*1均有激活作用，是一种稀有的可以直接“挽救”突变的小分子。即Alda-1能够部分地补偿或恢复突变的

ALDH2\*2的活性，这一点非常重要，因为很难找到能够特异性地“挽救”人类中的突变。因此通过上调ALDH2的活性（如利用外源性ALDH2激动剂alda-1）对抗心肌缺血损伤在ALDH2基因突变体人群中特别是亚洲人群中意义更加重大。Alda-1的主要益处可能是阻止4-HNE诱导的具有细胞保护作用的ALDH2的失活，这就会确保对氧化应激诱导的细胞毒性醛类的持续解毒作用，提示ALDH2是I/R损伤中心肌保护的关键酶。ALDH2对4HNE的代谢作用可能是ALDH2诱导心脏保护的部分机制。但4HNE本身可以与ALDH2形成加合物，并使其失活；而Alda-1可以阻止4HNE与ALDH2形成加合物，而促进ALDH2对4HNE的代谢。即Alda-1能够增强对4HNE的解毒作用。通过药物手段增加ALDH2活性，可能对于遭受心肌缺血/再灌注损伤的患者有益处，无论他们是携带野生型还是突变型ALDH2。因此，Alda-1具有潜在的药用价值。此外从啮齿动物中得到的数据表明了对于经历缺血事件的携带ALDH2\*2的东亚人，持续应用硝酸甘油的方法可能应当重新考虑，而且这些患者如果使用ALDH2激活剂，可能比携带野生型ALDH2的患者获益还要多**[20]**。外源性ALDH2激动剂alda-1可产生心肌保护作用，进一步提示ALDH2有可能成为一种新的治疗靶点和研究心肌保

护机制的一个新方向**[80]**由于ALDH2具有脱氢酶和酯酶等多种酶功能，其不同酶的活性能否独立调控？ALDH2对氧化应激引起心肌细胞损伤的保护作用的信号转导通路以及Alda-1诱导ALDH2心肌保护的分子基础仍有待于进一步研究。

**第一部分**

参考文献

[1] Cortinez G, Sapag A, Israel Y. RNA interference against aldehyde dehydrogenase-2: development of tools for alcohol research. Alcohol, 2009, 43(2): 97-104

[2] TONG-CHUAN HE, SHIBIN ZHOU, LUIS T. DA COSTA, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. Natl. Acad. Sci. USA, 1998,95: 2509-2514

[3] Chen CH, Budas GR, Churchill EN, et al. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. Science, 2008, 321: 1493-1495

[4] Kimura M, Kimura S, Matsushita S, et al. ALDH2 promoter polymorphism has no effect on the risk for alcoholism. Alcohol, 2006, 41: 368-371.

[5] Endo J, Sano M, Katayama T, et al. Metabolic remodeling induced by mitochondrial aldehyde stress stimulates tolerance to oxidative stress in the heart. Circ Res, 2009, 105:1118-1127.

[6] Daiber A, Wenzel P, Oelze M, et a1．Mitochondrial aldehyde of and marker for nitrate tolerance in response to nitroglycer in treatment[J]. Chem Biol Int,2009,178(1-3): 40-7.

[7] Siems WG, Hapner SJ and van Kui jk FJ．4-hydroxynonenal inhibits Na(+) -K(+) -ATPase.

Free Radic．Biol．Med．1996, 20(2)：215-223．

[8] Greenberg AK, Basu S, Hu J, et a1．Selective p38 activation in human non-small cell lung cancer[J]．Am J Respir Cell Mol Biol, 2002, 26(5)：558-564．

[9] Ferguson RA, Goldberg DM．Genetic markers of alcohol abuse．J C1in Chim Acta,1997, 257(2)：199-250．

[10] Watanabe S, Sasahara K, Kinekawa F, et a1．Aldehyde dehydrogenase-2 genotypes and HLA haplotypes in Japanese patients with esophageal cancer．Oncology reports．2002; 9(5)：1063-1068．

[11] Matsuo K, Hamajima N, Hirai T, et a1．Aldehydedehydrogenase 2(ALDH2) genotype affects rectal cancer susceptibility due to alcohol consumption．J Epidemiol. 2002; 12(2): 70-76．

[12] Wei F, Jian HF, YU CS, et a1．A control study on the polymorphism of the ALDH and ALDH genes in high risk alcoholic families of Han ethic population[J]．Chin J Psychiatry,1999, 32: 164-166．

[13] Fernandez-Sola j, Estruch R, Josep M．Grau, et a1．The relation of alcoholic myopathy to cardiomypathy, Ann Intern Med, 1994, 120: 529-536．

[14] Chen YC, Peng GS, Tsao TP, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic basis for overcoming acetaldehyde-induced adverse reaction in Asian alcoholics, heterozygous for the variant ALDH2\*2 gene allele [J]. Pharmacogenet Genomics, 2009,19(8):588-599.

[15]何岚，彭军. 线粒体醛脱氢酶对心脏保护作用的研究进展[J]. 中国药理学通

报,2009,25(12):1548-1551.

[16] Ikawa M, Impraim CC, Wang G, et a1．Isolation and Characterization of Aldehyde Dehydrogenase Isozymes from Usual and Atypical Human Livers．J Biol Chem,1983, 258 (10)：6282-6287．

**第二部分**

[1] Singh KK, Shukla PC, Quan A, et al. Herceptin, a recombinant humanized anti-ERBB2 monoclonal antibody, induces cardiomyocyte death. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 411: 421-426

[2] Pravdic D, Mio Y, Sedlic F, et al. Isoflurane protects cardiomyocytes and mitochondria by immediate and cytosol-independent action at reperfusion. Br J Pharmacol, 2010, 160: 220-232

[3] Park M, Youn B, Zheng XL, et al. Globular adiponectin, acting via AdipoR1/APPL1, protects H9c2 cells from hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis. PLoS One, 2011, 6: e19143

[4] Cotgreave IA, Gerds RG. Recent trends in glutathione biochemistry-glutathione -protein interaction: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation. J Biochem and Biophys Res Commu, 1998, 242：l-9

[5] Churchill E N, Disatnik M H, Rosen D M, et a1．Time-dependent and ethanol-induced cardiac

Protection from ischemia mediated by mitochondrial translocation of ePKC and activation of aldehyde dehydrogenase 2[J]．J Mol Cell Cardiol, 2009,46(2):278-284．

[6] Nieva J, Shafton A, Altobell L J, et a1．Lipid-derived aldehydes accelerate light chain amyloid and amorphous aggregation[J] Biochemistry, 2008, 47(29)：7695-7705

[7] Wei F, Jian Huaf, Yu chunshen, et a1．A control study on the polymorphism of the A D H and A LD H genes in high risk alcoholic families of H an ethic population．Chin J Psychiatry, 1999, 32:1664-1663

[8] Daiber A, Thomas M, Pautz A, et a1．ALDH2 deficiency increases cardiovascular oxidative

Stress-evidence for indirect antioxidative properties[J]．Biochem Biophys Res Commun ，

2008, 367(1)：137-143

[9] Esplugues J V, Rocha M, Nunez C, et a1．Complex I dysfunction and tolerance to nitroglycerin an approach based on mitochondrial-targeted antioxidants. [J] Circ Res, 2006, 99(10):1067-75

[10] Chen C H, Budas G, Churchill E, el a1. Activation of aldehyde dehydrogenase 2 reduces ischemic damage to the heart. [J] *Science*, 2008, 321(5895)：1493-5．

[11] Ikawa M, Impraim CC, Wang G, et a1．Isolation and Characterization of Aldehyde Dehydrogenase Isozymes from Usual and Atypical Human Livers．J Biol Chem．1983, 258(10):6282-6287

[12] Ohsawa I, Nishimaki K, Yasuda, et a1．Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases vulnerability to oxidative stress in PCI2 cells．J Neurochem, 2003, 84:1110-1117．

[13] minami J, Todoroki M, lshimitsu T, et a1．Effects of alcohol intake on ambulatory blood pressure, heart rate, and heart rate variability in Japanese men with different ALDH2 genotypes[J]．J Hum Hypertens, 2002, 16(5)：345-351

**第三部分**

[1] Wei F, JianHuaf, Yuchunshen, et al. A control study on the Polymorphism of the ADH and ALDH genes in high risk alcoholic families of Han ethic population. [J] Chin J Psychiatry, 1999, 32: 1664-1663

[2] Seki T,, Okayama H, Isoyama S, et a1．The role of alcohol dehydrogenase 2 and aldehyde

Dehydrogenase 2 genotypes in alcohol-induced vasospastic angina[J] Tohoku J Exp Med ，

1999, 187(4):311-322

[3] minami J, Todoroki M, lshimitsu T, et a1．Effects of alcohol intake on ambulatory blood pressure, heart rate, and heart rate variability in Japanese men with different ALDH2 genotypes[J]．J Hum Hypertens, 2002, 16(5)：345-351

[4] Nishimura FT, Fukunaga T, Kajiura H, et a1．Effects of aldehyde dehydrogenase-2 genotype on cardiovascular and endocrine responses to alcohol in young Japanese subjects [J]．Auton Neurosci, 2002, 102(1-2):60-70

[5] Yamamoto K, Ueno Y, Mizoi Y, et al. Genetic polymorphism of alcohol and aldehyde

Dehydrogenase and the effects on alcohol metabolism. [J]. Jpn. J. Alc. Drug Depend. 1993, 28:13-25.

[6] Corrao G, Rubbiati L, Bagnardi V, et al. Alcohol and coronary heart disease: a meta-analysis [J]. Addiction, 2000, 95:1505-1523.

[7] Shigeo Ohta, Ikuroh Ohsawa, Kouzhin Kamino, et al. Mitochondrial ALDH2 Deficiency as an Oxidative Stress [J]. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2004, 1011:36-44.

[8] Raphael J, Rivo J, Gozal Y. Isoflurane-induced myocardial preconditioning is dependent on phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signalling. Br J Anaesth, 2005, 95: 756-763

[9] Thibault H, Gomez L, Donal E, et a1．Acute myocardial infarction in mice: assessment of

Transmurality by strain rate imaging．Heart and Circulatory Physiology, 2007, 293(1) ：

H496-502

[10] Suzuki M, Sasaki N, Miki T, et a1．Role of sarcolemmal KATP channels in cardioproteetion against ischemia/reperfusion injury in mice．J Cl in Invest,2002, 109(4)：509-516

[11] Chen CH, Budas GR, Churchill EN, et al. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. Science, 2008, 321: 1493-1495

[12] Budas GR, Disatnik MH, Chen CH, et al. Activation of aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) confers cardioprotection in protein kinaseC epsilon (PKCε) knockout mice. J Mol Cell Cardiol,2010, 48: 757-764

[13] Sayre LM, Lin D, Yuan Q, et al. Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and one[J]. Drug Metab Rev,2006,38(4):651-675

[14] Echtay KS, Brand MD. 4-hydroxy-2-nonenal and uncoupling proteins: an approach for regulation of mitochondrial ROS production[J]. Redox Rep,2007,12(1):26-29.

[15]王德明，刘艳阳，桂靖等. 高氧液对家兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用及与ICAM-1 的

关系[J].温州医学院学报,2009,39(2):123-125

[16] minami J, Todoroki M, lshimitsu T, et a1．Effects of alcohol intake on ambulatory blood pressure, heart rate, and heart rate variability in Japanese men with different ALDH2 genotypes[J]．J Hum Hypertens, 2002, 16(5)：345-351

[17] Wenzel P, Hink U, Oelze M, et a1. Role of reduced lipoic acid in the redox regulation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) activity: implications for mitochondrial oxidative stress and nitrate tolerance[J]．*BiolChem*, 2007, 282(1)：792-9

[18] Daiber A, Oelze M, Sulyok S, et al．Heterozygous deficiency of manganese superoxide

Dismutase in mice(Mn-SOD±): a novel approach to assess the role of oxidative stress for the development of nitrate tolerance[J]．Mol Pharmacol, 2005, 68(3)：579—88

[19] Fernandez-solaj, Estruchr．The relation of alcoholic myopathy to cardiomypathy．Ann Intern Med, 1994, 120: 529—536

[20] Takagi S, 1wai N, Yamanchi R, et a1．Aldehyde dehydrogenase 2 gene is a risk factor for myocardial infarction in Japanese men．Hypertens Res, 2002, 25: 677-681

[21] Ohsawa I, Nishimaki K, Yasuda C, et a1．Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases vulnerability to oxidative stress in PC12 cells．J Neurochemistry, 2003, 84:1110-1117

[22] Sies H．Oxidative stress: oxidants and antioxidants．Exp Physiol, 1997, 82: 291-295

[23] Kruman I, Mattson MP．Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neurla cell apoptosiS and necrosiS．J Neurochem,1999, 72: 529-540

[24] Tjalkens RB, Cook LW, Petersen DR, et a1．Formation and export of the glutathione conjugate of 4-hydroxy-2 3-E-nonenal(4-HNE) in hepatoma cells．Arch Biochem Biophys,1999,361:1 13-1 19

[25]徐丹令，孙爱军，王时俊等．乙醛脱氢酶2在大鼠心肌缺氧损伤中的抗凋亡作用[J]．中国病理生理杂志，2006,22（4）：683-686

[26] Ignarro L J, Cirino G, Casini A．et a1．Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview．J Cardiovasc Pharmacol, 1999, 34: 879-886

[27]徐丹令，孙爱军，付晗等．乙醛脱氢酶2抑制剂daidzin对大鼠心肌细胞缺氧损伤作用的机制．上海医学，2007，30(增刊)：176-177

[28] Chen ZQ, Zhang J, Stamler JS．Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation．Proc Natl Acad Sci,2002, 99(12)：8306—831l

[29] Sydow K, Daiber A, Oelze M, et a1．Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross tolerance [J]．J Clin Invest, 2004, 113(3)：482—489

**第四部分**

[1] Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. Anesthesiology 1997; 87: 361-370.

[2] Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, Hickey RF. Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. Anesthesiology 1997; 87: 1182-1190.

[3] Tsutsumi YM, Patel HH, Lai NC, Takahashi T, Head BP, Roth DM. Isoflurane produces sustained cardiac protection after ischemia-reperfusion injury in mice. Anesthesiology 2006; 104: 495-502.

[4] Toller WG, Kersten JR, Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC. Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs. Anesthesiology 1999; 91: 1437-1446.

[5] Penta de PA, Polisca P, Tomai F, De PR, Turani F, Zupancich E, et al. Recovery of LV contractility in man is enhanced by preischemic administration of enflurane. Ann Thorac Surg 1999; 68: 112-118.

[6] De Hert SG, ten Broecke PW, Mertens E, Van Sommeren EW, De B, I, Stockman BA, et al. Sevoflurane but not propofol preserves myocardial function in coronary surgery patients. Anesthesiology 2002; 97: 42-49.

[7] Pravdic D, Mio Y, Sedlic F, Pratt PF, Warltier DC, Bosnjak ZJ, et al. Isoflurane protects cardiomyocytes and mitochondria by immediate and cytosol-independent action at reperfusion. Br J Pharmacol 2010; 160: 220-232.

[8] Novalija E, Kevin LG, Camara AK, Bosnjak ZJ, Kampine JP, Stowe DF. Reactive oxygen species precede the epsilon isoform of protein kinase C in the anesthetic preconditioning signaling cascade. Anesthesiology 2003; 99: 421-428.

[9] Uecker M, Da SR, Grampp T, Pasch T, Schaub MC, Zaugg M. Translocation of protein kinase C isoforms to subcellular targets in ischemic and anesthetic preconditioning. Anesthesiology 2003; 99: 138-147.

[10] Tanaka K, Weihrauch D, Kehl F, Ludwig LM, LaDisa JF, Jr., Kersten JR, et al. Mechanism of preconditioning by isoflurane in rabbits: a direct role for reactive oxygen species. Anesthesiology 2002; 97: 1485-1490.

[11] Mullenheim J, Ebel D, Frassdorf J, Preckel B, Thamer V, Schlack W. Isoflurane preconditions myocardium against infarction via release of free radicals. Anesthesiology 2002; 96: 934-940.

[12] Pain T, Yang XM, Critz SD, Yue Y, Nakano A, Liu GS, et al. Opening of mitochondrial

K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. Circ Res 2000; 87: 460-466.

[13] Kersten JR, Schmeling TJ, Hettrick DA, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Mechanism of myocardial protection by isoflurane. Role of adenosine triphosphate-regulated potassium (KATP) channels. Anesthesiology 1996; 85: 794-807.

[14] Liu GS, Cohen MV, Mochly-Rosen D, Downey JM. Protein kinase C-epsilon is responsible for the protection of preconditioning in rabbit cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol 1999; 31: 1937-1948.

[15] Dorn GW, Souroujon MC, Liron T, Chen CH, Gray MO, Zhou HZ, et al. Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes epsilon protein kinase C translocation. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96: 12798-12803.

[16] Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD, Mochly-Rosen D. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. Science 2008; 321: 1493-1495.

[17] Churchill EN, Disatnik MH, Mochly-Rosen D. Time-dependent and ethanol-induced cardiac protection from ischemia mediated by mitochondrial translocation of varepsilonPKC and activation of aldehyde dehydrogenase 2. J Mol Cell Cardiol 2009; 46: 278-284.

[18] Budas GR, Disatnik MH, Chen CH, Mochly-Rosen D. Activation of aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) confers cardioprotection in protein kinase C epsilon (PKCε) knockout mice. J Mol Cell Cardiol 2010; 48: 757-764.

[19] Li SY, Li Q, Shen JJ, Dong F, Sigmon VK, Liu Y, et al. Attenuation of acetaldehyde-induced cell injury by overexpression of aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) transgene in human cardiac myocytes: role of MAP kinase signaling. J Mol Cell Cardiol 2006; 40: 283-294.

[20] Sun L, Ferreira JC, Mochly-Rosen D. ALDH2 Activator Inhibits Increased Myocardial Infarction Injury by Nitroglycerin Tolerance. Sci Transl Med 2011; 3: 107ra111.

[21] Endo J, Sano M, Katayama T, Hishiki T, Shinmura K, Morizane S, et al. Metabolic remodeling induced by mitochondrial aldehyde stress stimulates tolerance to oxidative stress in the heart. Circ Res 2009; 105: 1118-1127.

[22] Lagranha CJ, Deschamps A, Aponte A, Steenbergen C, Murphy E. Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. Circ Res 2010; 106: 1681-1691.

[23] Siems WG, Hapner SJ, van Kuijk FJ. 4-hydroxynonenal inhibits Na(+) -K(+) -ATPase. Free Radic．Biol．Med, 1996, 20(2)：215-223

[24] Echtay KS, Brand MD. 4-hydroxy-2-nonenal and uncoupling proteins: an approach for regulation of mitochondrial ROS production[J]. Redox Rep,2007,12(1):26-29

[25] Pain T, Yang XM, Critz SD, et al. Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. Circ Res 2000, 87: 460-466

[26] Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, et al. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. Anesthesiology,1997, 87: 361-370

[27] Dorn GW, Souroujon MC, Liron T, et al. Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes epsilon protein kinase C translocation. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 12798-12803.

[28] minami J, Todoroki M, lshimitsu T, et a1．Effects of alcohol intake on ambulatory blood

Pressure, heart rate, and heart rate variability in Japanese men with different ALDH2 genotypes[J]．J Hum Hypertens, 2002, 16(5)：345-351．

[29] Nishimura FT, Fukunaga T, Kajiura H, et a1．Effects of aldehyde dehydrogenase-2 genotype on cardiovascular and endocrine responses to alcohol in young Japanese subjects [J]．Auton Neurosci, 2002, 102(1-2): 60-70．

[30] Uecker M, Da SR, Grampp T, et al. Translocation of protein kinase C isoforms to subcellular targets in ischemic and anesthetic preconditioning. Anesthesiology, 2003, 99: 138-147.

[ 31] Nishimura FT, Fukunaga T, Kajiura H, et a1．Effects of aldehyde dehydrogenase-2 genotype

On cardiovascular and endocrine responses to alcohol in young Japanese subjects [J]．Auton Neurosci, 2002, 102(1-2): 60-70．

[32] Jo SA, Kim EK, Park MH, et a1．A Glu487Lys polymorphism in the gene for mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 is associated with myocardial infarction in elderly Korean men[J]．Clin Chim Acta,2007,382(1-2): 43—47．

[33] Xu F, Chen YG, Geng YJ, et a1．The polymorphism in acetaldehyde dehydrogenase 2 gene. causing a substitution of Glu> Lys(504), is not associated with coronary atherosclerosis severity in Han Chinese[J]．Tohoku J Exp Med, 2007, 213(3)：215-220．

[34] De Oliveira E Silva ER, Foster D, Harper MM, et al: Alcohol consumption raises HDL cholesterol levels by increasing the transport rate of apolipoproteins A-I and A-II [J] ．

Circulation, 2000, 102(19)：2347-2352

[35] Nakamura Y, Amamoto K, Tamaki S, et a1．Genetic variation in aldehyde dehydrogenase 2 and the effect of alcohol consumption on cholesterol levels[J]．Atherosclerosis, 2002, 164(1)：171—177

[36] Tsutsumi YM, Patel HH, Lai NC, et al. Isoflurane produces sustained cardiac protection after ischemia-reperfusion injury in mice. Anesthesiology 2006, 104: 495-502

[37] Ohsawa I, Kamino K, Nagasaka K, et a1．Genetic deficiency of a mitochondrial aldehyde

Dehydrogenase increases serum lipid peroxides in community-dwelling females[J]．J Hum Genet, 2003, 48(8)：404-409

[38] Dong Xu, Ji li R., Guthrie, et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase attenuates hyperoxia-induced cell death through activation of ERK/MAPK and PI3K-Akt pathways in lung epithelial cells. Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006, 291:966-975

[39] Newton AC. Protein Kinase C: Sructure, Function, and Regulation. J Biol Chem. 1995, 270: 28495-28498

[40] Takagi S, Iwai N, Yamauchi R, et a1．Aldehyde dehydrogenase 2 gene is a risk factor for

Myocardial infarction in Japanese men[J]．Hypertens Res, 2002, 25(5)：677-681．

[41] Jo SA, Kim EK, Park MH, et a1．A Glu487Lys polymorphism in the gene for mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 is associated with myocardial infarction in elderly Korean men[J]．Clin Chim Acta, 2007, 382(1-2): 43-47

[42] Li SY, Li Q, Shen JJ, et al. Attenuation of acetaldehyde-induced cell injury by overexpression of aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) transgene in human cardiac myocytes: role of MAP kinase signaling. J Mol Cell Cardiol,2006, 40: 283-294.

[43] Wei F, JianHuaf, Yuchunshen, et al. A control study on the Polymorphism of the ADH and ALDH genes in high risk alcoholic families of Han ethic population. [J]. Chin J Psychiatry,1999 32:1664-1663.

[44] Chen CH, Sun L, Mochly-Rosen D. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase and cardiac diseases. Cardiovasc Res 2010, 88: 51-57.

[45] Yamamoto K, Ueno Y, Mizoi Y, et al. Genetic polymorphism of alcohol and aldehyde

Dehydrogenase and the effects on alcohol metabolism[J]. Jpn. J. Alc. Drug Depend, 1993, 28(1):13-25.

[46] Corrao G, Rubbiati L, Bagnardi V, et al. Alcohol and coronary heart disease: a meta-analysis

[J]. Addiction, 2000, 95:1505-1523

[47] Shigeo O, Yoshiko A, Yasuhiko K. A Novel Phorbol Ester Receptor/Protein Kinase, nPKC, distantly related to the Protein Kinase C Family. Cell, 1988, 53:731-741

[48] Ping P, Jun Zh, Yu-ting Zh. Demonstration of Selective Protein Kinase C Dependent Activation of Sre and Lck Tyrosine Kinases During Ischemic Preconditioning in Conscous Rabbits. Cir Res, 1999, 85:543-550

[49] Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, et al. Mitochondrial import of PKCepsilon is mediated by HSP90: a role in cardioprotection from ischaemia and reperfusion

[50] Shi-Yan Li, Mark Gomelsky. Jinhong Duan Overexpression of aldehyde dehydrogenase-2 transgene prevents acetaldehyde induced cell injury in human umbilical vein endothelial cells[J]. J. Bio. Che, 2004, 279(12):11244-11252.

[51] Toma O, Weber NC, Wolter JI, et al. Desflurane preconditioning induces time-dependent activation of protein kinase C epsilon and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in the rat heart in vivo. Anesthesiology,2004,101: 1372-1380.

[52] Bian Y, Chen YG, Xu F, et al.. The polymorphism in aldehyde dehydrogenase-2 gene is associated with elevated plasma levels of high-sensitivity C-reactive protein in the early phase of myocardial infarction. [Tohoku J Exp Med,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20467232?dopt=Citation)2010,221:107-112.

[53] Zhang H, Gong DX, Zhang YJ, et al. Effect of mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 genotype on cardioprotection in patients with congenital heart disease. Eur Heart J,2012,33:1606-1614

**综述部分**

[1] Daiber A, Wenzel P, Oelze M, et a1．Mitochondrial aldehyde of and marker for nitrate tolerance in response to nitroglycer in treatment[J]. Chem Biol Int,2009,178(1-3): 40-47.

[2] Moon K H, Kim B J, Song B J．Inhibition of mitochondrial aldehyde dehydrogenase by nitric oxide-mediated S-nitrosylation[J]．FEBS Lett, 2005, 579(27)：6115-6120．

[3] Greenberg AK, Basu S, Hu J, et a1．Selective p38 activation in human non-small cell lung cancer[J]．Am J Respir Cell Mol Biol, 2002, 26(5)：558—564．

[4] Larson HN, Zhou J, Chen Z, et a1. Structural and functional consequences of coenzyme binding to the inactive asian variant of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: Roles of residues 475 and 487[J]．J Biol Chem, 2007, 282(17)：12940—12950．

[5] Ferguson RA, Goldberg DM．Genetic markers of alcohol abuse．J C1in Chim Acta．1997, 257(2)：199—250．

[6] Watanabe S, Sasahara K, Kinekawa F, et a1．Aldehyde dehydrogenase-2 genotypes and HLA haplotypes in Japanese patients with esophageal cancer．0ncol Rep．2002, 9(5)：1063-1068．

[7] Matsuo K, Hamajima N, Hirai T, et a1．Aldehydedehydrogenase 2(ALDH2) genotype affects rectal cancer susceptibility due to alcohol consumption．J Epidemiol．2002, 12(2)：70—6．

[8] Wei F, Jian HF, YU CS, et a1．A control study on the polymorphism of the ALDH and ALDH genes in high risk alcoholic families of Han ethic population[J]．Chin J Psychiatry．1999, 32: 164—166．

[9] Fernandez—Sola j, Estruch R, Josep M．Grau, et a1．The relation of alcoholic myopathy to cardiomypathy, Ann Intern Med, 1994, 120: 529—536．

[10] Chen YC, Peng GS, Tsao TP, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic basis for overcoming acetaldehyde-induced adverse reaction in Asian alcoholics, heterozygous for the variant ALDH2\*2geneallele[J]. PharmacogenetGenomics, 2009,19(8):588-599.

[11]何岚，彭军. 线粒体醛脱氢酶对心脏保护作用的研究进展[J].中国药理学通报，2009，

25(12):1548-1551.

[12] Ikawa M, Impraim CC．，Wang G, et a1．Isolation and Characterization of Aldehyde Dehydrogenase Isozymes from Usual and Atypical Human Livers．J Biol Chem．．1983, 258(10)：6282-6287．

[13] Ohsawa I, Nishimaki K, Yasuda, et a1．Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases vulnerability to oxidative stress in PCI2 cells．J Neurochem, 2003, 84: 1 1 10-ll 17．

[14] Li S, Gomelsky M, Duan J, et a1．Overexpression of aldehyde dehydrogenase-2 transgene prevents acetaldehyde-induced cell injury in human umbilical vein endothelial cells: role of ERK and P38 MAP kinase．J Biol chem, 2004, 279: 11244—11252．

[15] Sayre LM, Lin D, Yuan Q, et al. Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and one[J]. Drug Metab Rev,2006,38(4):651-675.

[16] Echtay KS, Brand MD. 4-hydroxy-2-nonenal and uncoupling proteins: an approach for regulation of mitochondrial ROS production[J]. Redox Rep,2007,12(1):26-29.

[17]王德明，刘艳阳，桂靖，等. 高氧液对家兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用及与ICAM-1 的

关系[J].温州医学院学报,2009,39(2):123-125.

[18] Eaton P, Li JM, Hearse DJ, et al. Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in ischemic rat heart[J]. Am J Physiol,1999,276(3 pt 2):H935-943.

[19] Chen CH, Sun L, Mochly-Rosen D. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase and cardiac diseases[J]. Cardiovasc Res,2010, 88(1):51-57.

[20] Chen C H, Budas G, Churchill E, el a1．Activation of aldehyde dehydrogenase 2 reduces

Ischemic damage to the heart[J]．Science, 2008, 321(5895)：1493—5．

[21] Endo J, Sano M, Katayama T, et al. Metabolic remodeling induced by mitochondrial aldehyde stress stimulates tolerance to oxidative stress in the heart[J]. Circ Res, 2009, 105 (11):1118-1127.

[22]张裕坚，龚丁旭，陈伟，等.线粒体乙醛脱氢酶基因突变型对人心肌缺血再灌注损伤的保

护作用[J].温州医学院学报，2011，41(4):340-342.

[23] Seki T, Okayama H, Isoyama S, et a1．The role of alcohol dehydrogenase 2 and aldehyde dehydrogenase 2 genotypes in alcohol-induced vasospastic angina[J]．Tohoku J Exp Med, 1999, 187(4)：311-322．

[24] minami J, Todoroki M, lshimitsu T, et a1．Effects of alcohol intake on ambulatory blood pressure, heart rate, and heart rate variability in Japanese men with different ALDH2 genotypes[J]．J Hum Hypertens, 2002, 16(5)：345-351．

[25] Nishimura FT, Fukunaga T, Kajiura H, et a1．Effects of aldehyde dehydrogenase-2 genotype on cardiovascular and endocrine responses to alcohol in young Japanese subjects [J]．Auton Neurosci, 2002, 102(1-2): 60-70．

[26] Takagi S, Iwai N, Yamauchi R, et a1．Aldehyde dehydrogenase 2 gene is a risk factor for myocardial infarction in Japanese men[J]．Hypertens Res, 2002, 25(5)：677-681．

[27] Jo SA, Kim EK, Park MH, et a1．A Glu487Lys polymorphism in the gene for mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 is associated with myocardial infarction in elderly Korean men[J]．Clin Chim Acta, 2007, 382(1-2): 43-47．

[28] Xu F, Chen YG, Geng YJ, et a1．The polymorphism in acetaldehyde dehydrogenase 2 gene. causing a substitution of Glu> Lys(504), is not associated with coronary atherosclerosis severity in Han Chinese[J]．Tohoku J Exp Med, 2007, 213(3)：215-220．

[29] De Oliveira E Silva ER, Foster D, Harper MM, et al: Alcohol consumption raises HDL cholesterol levels by increasing the transport rate of apolipoproteins A-I and A-II [J]．Circulation, 2000, 102(19)：2347-2352．

[30] Nakamura Y, Amamoto K, Tamaki S, et a1．Genetic variation in aldehyde dehydrogenase 2 and the effect of alcohol consumption on cholesterol levels[J]．Atherosclerosis, 2002, 164(1)：171—177．

[31] Ohsawa I, Kamino K, Nagasaka K, et a1．Genetic deficiency of a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases serum lipid peroxides in community-dwelling females[J]．J Hum Genet, 2003, 48(8)：404-409．

[32]王振军，孙爱军，葛均波.乙醛脱氢酶2与心血管疾病，国际心血管病杂志，2009, 36（3）：

161-164.

[33] Chapple ILC．Reactive oxygen species and antioxidants in inflamma2tory diseases．J Clin Periodontol, 1997, 24: 287-296．

[34] Uchida K, Stadtman E．R．Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal．Proc．Natl Acad．Sci．USA, 1992, 89: 4544-4548．

[35] Liu W．，Kato M．，Akhand A．A．et a1．4-hydroxynonenal induces a cellular redox status-related activation of the caspase cascade for apoptotic cell death．J．Cell Sci．2000, 113: 635—641．

[36] Siems W. G．, Hapner S．J．and van Kui jk F．J．4-hydroxynonenal inhibits Na(+) -K(+) -ATPase. Free Radic．Biol．Med．1996, 20(2)：215-223．

[37Cotgreave IA, Gerds RG. Recent trends in glutathione biochemistry-glutathione-protein

Interaction: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation. J Biochem and Biophys Res Commu, 1998, 242：l-9．

[38] Churchill E N, Disatnik M H, Rosen D M, et a1．Time-dependent and ethanol-induced cardiac protection from ischemia mediated by mitochondrial translocation of ePKC and activation of aldehyde dehydrogenase 2[J]．J Mol Cell Cardiol, 2009, 46(2)：278—84．

[39] Nieva J, Shafton A, Altobell L J, et a1．Lipid-derived aldehydes accelerate light chain amyloid and amorphous aggregation[J]．Biochemistry, 2008, 47(29)：7695—705．

[40] Wei F, Jian Huaf, Yu chunshen, et a1．A control study on the polymorphism of the A D H and A LD H genes in high risk alcoholic families of H an ethic population．Chin J Psychiatry, 1999, 32: 1664—1663．

[41] Daiber A, Thomas M, Pautz A, et a1．ALDH2 deficiency increases cardiovascular oxidative stress-evidence for indirect antioxidative properties[J]．Biochem Biophys Res Commun, 2008, 367(1)：137—43．

[42] Esplugues J V, Rocha M, Nunez C, et a1．Complex I dysfunction and tolerance to nitroglycerin an approach based on mitochondrial-targeted antioxidants[J]. Circ Res, 2006, 99(10)：1067-75．

[43] Wenzel P, Hink U, Oelze M, et a1. Role of reduced lipoic acid in the redox regulation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) activity: implications for mitochondrial oxidative stress and nitrate tolerance[J]．Biol Chem, 2007, 282(1)：792-9．

[44] Daiber A, Oelze M, Sulyok S, et al．Heterozygous deficiency of manganese superoxide dismutase in mice(Mn-SOD±): a novel approach to assess the role of oxidative stress for the development of nitrate tolerance[J]．Mol Pharmacol, 2005, 68(3)：579—88．

[45] Fernandez-solaj, Estruchr．The relation of alcoholic myopathy to cardiomypathy．Ann Intern Med, 1994, 120: 529—536．

[46] Takagi S, 1wai N, Yamanchi R．et a1．Aldehyde dehydrogenase 2 gene is a risk factor for myocardial infarction in Japanese men．Hypertens Res, 2002, 25: 677-681．

[47] Ohsawa I, Nishimaki K, Yasuda C, et a1．Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases vulnerability to oxidative stress in PC12 cells．J Neurochemistry, 2003，84, 1 1 10- 1 1 17．

[48] Sies H．Oxidative stress: oxidants and antioxidants．Exp Physiol．1997, 82: 291-295．

[49] Kruman I, Mattson MP．Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neurla cell apoptosiS and necrosiS．J Neurochem．1999, 72: 529-540．

[50] Tjalkens RB, Cook LW, Petersen DR, et a1．Formation and export of the glutathione conjugate of 4-hydroxy-2 3-E-nonenal(4-HNE) in hepatoma cells．Arch Biochem Biophys．1999, 361: 1 13-1 19．

[51]徐丹令，孙爱军，王时俊，等．乙醛脱氢酶2在大鼠心肌缺氧损伤中的抗凋亡作用[J]．中国病理生理杂志，2006,22（4）：683-686.

[52] Ignarro L J, Cirino G, Casini A．et a1．Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview．J Cardiovasc Pharmacol, 1999, 34: 879-886．

[51]徐丹令，孙爱军，王时俊，等．乙醛脱氢酶2在大鼠心肌缺氧损伤中的抗凋亡作用[J]．中国病理生理杂志，2006,22（4）：683-686.

[53]徐丹令，孙爱军，付晗，等．乙醛脱氢酶2抑制剂daidzin对大鼠心肌细胞缺氧损伤作用的机制．上海医学，2007, 30(增刊)：176-177．

[54] Chen ZQ, Zhang J, Stamler JS．Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin

Bioactivation．Proc Natl Acad Sci．2002, 99(12)：8306—831l.

[55] Sydow K, Daiber A, Oelze M, et a1．Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross tolerance [J]．J Clin Invest, 2004, 113(3)：482—489．

[56] Mackenzie IS．Maki-Petaja KM, McEniery CM, et a1．Aldehyde dehydrogenase 2 plays a role in the bioactivation of nitroglycerin in humans[J]．Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(9)：1891—1895．

[57] Mackenzie I S, Maki—Petaja K M, Mc-Eniery C M, et a1．Aldehyde dehydrogenase 2 plays a role in the bioactivation of nitroglycerin in humans[J]．Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(9)：1891-5．

[58] Guo R, Chen X P, Guo X, et a1．Evidence for involvement of calcitonin gene related peptide in nitroglycerin response and association with mitochondrial aldehyd dehydrogenase2(ALDH2) Glu 504 Lys polymorphism[J]．J Am Coll Cardiol, 2008, 52(11)：953-60．

[59] Peng J, Li Y J．New insights into nitroglycerin effects and tolerance: role of calcitonin gene-related peptide[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 586(1-3): 9-13．

[60] Daiber A, Wenzel P, Oelze M, et a1．Increased superoxide production in nitrate tolerance is associated with NAD(P) H oxidase and aldehyde dehydrogenase 2 downregulation[J]．J Mol Cell Cardiol,2007, 42(6)：1111-8．

[61] Hink U, Daibe A, Kayhan N, et a1．Oxidative inhibition of the mitochondrial aldehyde dehydrogenase promotes glycerin tolerance in human blood vessels[J]．J Am Coil Cardiol, 2007, 50(23)：2226-32.

[62] Szocs K．Lassegue B, Wenzel P, et a1．Increased superoxide production in nitrate tolerance is associated with NAD(P) H oxidase and aldehyde dehydrogenase 2 downregulation．J Mol Cell Cardiol, 2007, 42: 1111-1118．

[63] Wang E Q, Lee W l, Brazeau D, et a1．cDNA microarray analysis of vascular gene expression after nitric oxide donor infusions in rats: implications for nitrate tolerance mechanisms.

AAPS PharmSci．2002, 4：E10．

[64] Hinz B, Sehr6der H．Nitrate tolerance is specific for nitric acid esters and its recovery requires an intact protein synthesis．Biochem B／ophys Res Commun, 1998, 252: 232—235．

[65]张应花，孙爱军，文小军，等. 硝酸甘油对大鼠缺氧心肌细胞乙醛脱氢酶2表达的影响.

上海医学,2010, 33(5):417-420.

[66] Nakamura Y, Moss A J, Brown M W, et a1．Long-term nitrate use may be deleterious in ischemic heart disease: A study using the databases from two large-scale postinfarction studies．Multicenter Myocardial Ischemia Research Group．Am Heart J, 1999, 138: 577—585．

[67] Li SY, Gilbert SA, Li Q, et al. Aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) ameliorates chronic ingestion-induced myocardial insulin response and endo-plasmic reticulum stress [J]. J Mol Cell cardiol,2009,47(2):247- 255.

[68] Oba T, Maeno Y, Nagao M, et al．Cellular redox state protects acetaldehyde-induced

Alteration in cardiomyocyte function by modifying Ca2+ release from sarcoplasmic reticulum[J]．Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 294(1)：121—133．:

[69] Wang L Y, Liu Y, Li D L, el a1．Protective effect of choline on ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart[J]．Chin Pharmacol Bull, 2007, 23(5)：600—613．

[70] Handel NS, McClintock DS, Feliciano CE, et a1．Reactive oxygen species generated at mitochondrial complexШstabilize hypoxia2 inducible factor 21 alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing．J Biol Chem, 2000, 275(33)：25—30．

[71] Donovan M, Cotter TG．Control of mitochondrial integrity by Bcl -2 family members and caspase 2 independent cell death. Biochim Biophys Acta, 2004, 1644 (2—3)：133—147．

[72] Gill C, MESTRIL R, SAMALI A．Losing heart: the role of apoptosis in heart disease-a novel therapeutic target[J]．FASEBJ, 2002, 16: 135—146．

[73]孙爱军，王克强，杨芤原，等．心衰大鼠模型心肌线粒体蛋白质组分析[J]．中国动脉硬化杂志，2004, 12(2)：183—185．

[74] CHEN C H, GRAY M O, MOCHLY-ROSEN D．Cardioprotection from ischemia by a brief exposure to physiological levels of ethanol: Role of epsilon protein kinase C[J]．Proc Natl Acad Sci USA,1999, 96(22)：12784—12789．

[75] AYEEM M A. Ethanol induced delayed cellular protection in mouse cardiac myocytes: role of inducible nitric oxide synthase[J]．Pol J Pharmacol,2003, 55(4)：595-602．

[76] Budas GR, Disatnik MH, Chen CH, et al. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 confers cardioprotection in protein Kinase C epsilon(PKCε) knockout mice[J]. J Mol Cell Cardiol,2010, 48(4):757-764.

[77] Li SY, Gomelsky M, Duan J, et al. Overexpression of aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2)

Transgene prevents acetaldehyde-induced cell injury in human umbilical vein endothelial cells: role of ERK and P38 mitogen-activated protein kinase[J]. J Biol Chem,2004, 279 (12): 11244- 11252.

[78] Li SY, Li Q, Shen JJ, et al. Attenuation of acetaldehyde-induced cell injury by overexpression of aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) transgene in human cardiac myocytes: role of MAP kinase signaling [J]. J Mol Cell cardiol, 2006,40(2):283-294.

[79]叶红伟，高 琴，王晓梅，等.乙醇后处理心肌保护作用的抗氧化机制探讨[J].医学院学报，

2011,36(11)：1169-1173.

[80] Budas G R, Disatnik M H, Mochly-Rosen D. Aldehyde dehydrogenase 2 in Cardiac Protection: A New Therapeutic TargetTrendsCardiovascMed,2009,19(5):158–164.

[81] Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et a1．Apoptotic and necrotiemyocyte cell death are

Independent contributing variables of infarct size in rate．L ab InvesL 1996; 74: 86—91．[82] Ma XL, Kumar S, Gao F, et a1．Inhibition of P38 mitogen·activated protein kinase decrease

Cardiomyocyte apoptosis all improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion．Circulation．1999, 99(23)：1685-1691．

[83] Lee Y, Gustafsson A B. Role of apoptosis in Cardiovascular disease[J]. Apoptosis, 2009, 14 (4)：536-48.

[84] MacDonald G, Shi L, Vande velde Cetal. mitochondria-dependent and-independent Regulation of Granzyme B-induced Apoptosis．J Exp M ed, 1999, 189: 13l～144．

[85] Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ, et a1．BHl and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax．Nature, 1994, 369(6478)：321-323．

[86] Sato T, Hanada M, Bodrug S, et a1．Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system．Proc Natl Acad Sci USA,1994, 91(20)：9238-9242．

[87] Ishikawa Y, Kusaka E, Enokido Y, et a1．Regulation of Bax translocation through phosphorylation at Ser270 of Bcl-2 by MAPkinase in NO-induced neuronal apoptosis．Mol Cell Neurosci, 2003, 24(2)：451-459．

[88] Crowe DL, Boardman ML, and Fong KS, et a1．Anti-Fas antibody differentially regulates apoptosis in Fas ligand resistant carcinoma lines via the caspase 3 family of cell death proteases but independently of bcl-2 expression．Anticancer Res,1998, 18(5A): 3163-3170．

[89] Liadis N, Murakami K, Eweida M, et a1．Caspase-3-Dependent B-Cell Apoptosis in the Initiation of Autoimmune DiabetesMellitus．Mol Cell Biol,2005, 25: 3620-3629．

[90] CLARK R COFFMAN．Cell Migration and Programmed Cell Death of Drosophila Germ

Cells．Ann．N．Y．Acad．Sci．2003．995: 117一126．

[91]高琴，姜翠荣，于影，等．线粒体乙醛脱氢酶2在心肌缺血后处理中的作用[J].中国药理学通报．2010, 26(8)：1088-1092．

[92] Xu D L, Sun A J, Wang S J, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 prevents rat cardiomyocytes from apoptosis induced by hypoxia [J]. Chin J Pathophysiol, 2006,22(4):683-6.

[93]俞佳艳，孙爱军，贾建国，等.转染乙醛脱氢酶2基因对心肌梗死后心衰小鼠心功能的影

响[J】.中国临床医学，2008，15(3)：277-80.

[94] Long X, Boluyt MO, H ipolito ML, et a1．p53 and the hypoxia induced apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes．J ClinInvest,1997, 99(11): 2635—2643．

[95] Samuni AM, Kasid U, Chuang EY, et a1．Effects of Hypoxia on Radiation—Responsive Stress-Activated Protein Kinase, p53, and Caspase 3 Signals in TK6 Human Lymphoblastoid Ceils．Cancer Res, Jan 2005, 65: 579-586．

[96] Kroemer G．The protooncognene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis．Nature Medicine, 1997, 3: 614—620．

[97] Kirshenbaum LA, de Moissac D．The bal-2 gene product prorevents programmed cell death of ventricular myocytes．Circulation, 1997, 96(5)：1580—1585．

[98] Los M, Craen MV, Penning LC, et a1．Requirement of an ICE /CED23 protease for Fas

／APO-l mediated apoptosis．Nature, 1995, 375: 81—83．

# 攻读博士学位期间以第一作者发表的**SCI**论文

**[1] Isoflurane Preconditioning Confers Cardioprotection by Activation of ALD**[**H2. PLoS ONE**](http://www.yz365.com/Journal/Detail/cdf2fe94-a16d-4a64-8d4e-2dc6fd5eb8fe)**,**[**2013,8(2):**](http://www.yz365.com/Archive/Volume/27a243af-4b5f-483e-9fb2-b7133c64ae03) **e52469**

**[2] Mechanisms of cardioprotection by isoflurane against I/R injury. Frontiers in**

**Bioscience, 2013, 18: 387-93**

致 **谢**

首先，衷心感谢我的恩师王雄教授，他严谨的治学态度、精湛的医疗技术、

渊博的专业知识及忘我的工作热情使我受益终生，是在他的鼓励下，我才能克服重重困难，圆满完成了课题研究。

感谢ft西医科大学第一医院精神卫生科的张克让教授给予的大力支持。感谢ft西医科大学第一医院心内科的吕吉元教授、韩清华教授、范春雨教

授和贾永平教授给予的大力支持和帮助。

感谢ft西医科大学药学院的李青ft教授给予的帮助和支持。特别感谢我儿子在本课题完成的各个环节给予的鼎力帮助。

对三年来陪伴我、鼓励我、支持我的爱人表示无限的感激之情，是他默默的支持与无私的爱激励我走完了漫长而又艰辛的求学之路。

同时感谢每一位关心我、关注我、支持我、帮助我、鼓励我的老师、同事、同学和朋友。

最后，诚挚的感谢ft西医科大学和ft西医科大学第一医院对我的培养和关爱。

# 个人简介

姓名：郎小娥性别：女

职称：副主任医师籍贯：ft西代县

学习工作简历：

1984.7-至今ft西医科大学第一医院工作

2001.9-2004.6 ft西医科大学攻读硕士学位

2010-至今ft西医科大学攻读博士学位

**专业学会任职情况：**

2012—2015任ft西省医师协会老年医学医师分会第二届委员会**常委**

2011—至今任ft西省老年学学会老年病学专业委员会**常委**