

网络出版时间: 2019-1-11 14:05 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190109.1117.007.html>

缺血预处理诱导的外泌体对心肌细胞低氧/复氧损伤及 Bcl-2、Bax 表达的影响

刘中, 产进中, 黄俊, 张丽, 张野, 何淑芳

摘要 目的 探讨缺血预处理(IPC)诱导的外泌体(exosome)对心肌细胞低氧/复氧(H/R)损伤及凋亡蛋白B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关x蛋白(Bax)表达的影响。方法

SD大鼠进行IPC或对照处理后,提取血清中的外泌体,标记为IPC-Exo、CON-Exo。采用BCA蛋白定量法测定外泌体浓度。H9c2心肌细胞随机分为Control组、H/R组、H/R+IPC-Exo组和H/R+CON-Exo组。除Control组细胞常规培养外,其余各组细胞均给予5h低氧和1h复氧处理,H/R+IPC-Exo组和H/R+CON-Exo组细胞在H/R损伤前分别与相应外泌体共孵育12h。处理结束后,分别检测各组细胞活力、乳酸脱氢酶活性、细胞凋亡和Bcl-2、Bax蛋白表达情况。结果 IPC明显增加血清外泌体释放。与H/R组比较,IPC-Exo与H9c2心肌细胞共孵育,可以增加细胞活力、减少乳酸脱氢酶释放、抑制心肌细胞凋亡,减轻心肌细胞H/R损伤;且能上调Bcl-2表达,下调Bax表达。而CON-Exo与心肌细胞共孵育后,对H/R损伤无明显影响。结论 缺血预处理

诱导的外泌体可以减轻H9c2心肌细胞H/R损伤,其机制可能是通过上调Bcl-2、下调Bax表达,从而发挥心肌保护作用。

关键词 缺血预处理;外泌体;心肌细胞;低氧/复氧损伤;Bcl-2;Bax

中图分类号 R 322.11; R 364.12; R 845.22

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)02-0197-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.02.007

心肌在缺血基础上血流再灌注后损伤反而加重,称为心肌缺血再灌注损伤(ischemic reperfusion injury, IRI)。在急性心肌梗死溶栓治疗、介入治疗以及心脏外科中常常发生再灌注损伤,导致心肌损伤加重,严重影响心功能恢复。Murry et al^[1]首次提出缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC)的概念,证实IPC可以减轻IRI,是目前已知最强的内源性心肌保护方法,但至今具体的作用机制仍未完全明确。

外泌体是一种囊泡样小体,其中包含了丰富的蛋白质、核酸,可传输多种信号分子,是介导细胞间通讯的重要物质^[2]。大量研究^[3-4]显示,干细胞来源的外泌体,可作用于受损的心肌组织,抑制心肌细胞凋亡,减少梗死面积,发挥心肌保护作用。然而,外泌体是否参与介导了IPC的心肌保护作用,尚未

2018-09-12 接收

基金项目:安徽省高等学校自然科学研究项目重点项目(编号:KJ2017A172)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院麻醉与围术期医学科,合肥 230601

作者简介:刘中,男,硕士研究生;

何淑芳,女,博士,副研究员,硕士生导师,责任作者, E-mail: hsf77@163.com

migration and angiogenesis of ECV304 cells (human umbilical vein endothelial cells). **Methods** The lentiviral expression vector was constructed and transfected into ECV304 cells. The expression of BMP-2 was different in ECV304 cells. The experiment was divided into Normal group, LV-SH-BMP-2 group and Overexpression-LV-BMP-2 group. CCK-8, scratch assay, Western blot, and tube formation assay were used to detect the proliferation, migration, angiogenesis-related protein expression and angiogenesis of ECV304 cells. After co-culture, the subcutaneously transplanted tumor model was injected subcutaneously into the right armpit of nude mice to observe the growth and microvessel density (MVD) of the transplanted tumor. **Results** The proliferation, migration, angiogenesis-related protein expression and angiogenesis of ECV304 cells in Overexpression-LV-BMP-2 group were significantly higher than those in Normal group and LV-SH-BMP-2 group. The difference was statistically significant ($P < 0.05$); *In vivo* experiments showed that the volume, weight and microvessel density in ECV304 cells in Overexpression-LV-BMP-2 group were significantly higher than those in Normal group and LV-SH-BMP-2 group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** BMP-2 can promote ECV304 cell proliferation, migration and angiogenesis.

Key words bone morphogenetic protein 2; ECV304 cells; proliferation; migration; angiogenesis

可知。该研究拟探讨 IPC 诱导的外泌体对 H9c2 心肌细胞低氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)损伤以及凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 x 蛋白(Bcl-2 associated x protein, Bax)表达的影响,以期为 IPC 心肌保护机制研究提供新的思路和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与细胞株 健康成年雄性 SD 大鼠 SPF 级,体质量(250 ± 30) g,由安徽医科大学动物实验中心提供,实验动物随机分为对照组(CON 组)和 IPC 组,每组 3 只。大鼠 H9c2(2-1)胚胎心肌细胞株购自中科院上海细胞库。

1.1.2 主要试剂及仪器 无外泌体血清、Exo-Quick™ Exosome Precipitation Solution 试剂盒购自美国 SBI 公司;DME/F-12 细胞培养液购自美国 HyClone 公司;鼠抗 HSP60 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 生物技术公司;Bcl-2、Bax 单克隆兔抗购自美国 CST 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;细胞增殖检验试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)购自广州 Biosharp 公司;乳酸脱氢酶(lactic acid dehydrogenase, LDH)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;FITC Annexin V 凋亡试剂盒购自美国 BD 公司;低氧小室购自加拿大 Stem Cell 公司;荧光显微镜购自日本 Olympus 公司;蛋白电泳仪、Tanon Fine Do X6 全自动化学发光图像分析系统购自上海 Tannon 公司;Cytomics FC500 流式细胞仪购自美国 Beckman 有限公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠缺血预处理 参考文献^[5],建立大鼠心肌缺血再灌注损伤模型。大鼠腹腔注射 5% 戊巴比妥 50 mg/kg 进行麻醉,气管插管后,连接小动物呼吸机。于左锁骨中线处切开皮肤 2 cm,在第 4、5 肋间打开胸腔,剪开心包,轻压大鼠胸廓,挤出心脏,在肺动脉圆锥与左心耳之间冠状动脉左前降支处用 6-0 Prolene 线进针作一线结,回纳心脏于胸腔,稳定 15 min 后开始心脏缺血再灌注损伤实验,收紧线结即为结扎左冠状动脉前降支致心肌缺血,松开线结即为心肌再灌注。对心肌进行缺血 5 min,再灌注 5 min,3 个循环,即为 IPC。对照组大鼠麻醉后,仅穿线不结扎。

1.2.2 血清外泌体提取 预处理结束后收集大鼠血液,采用 ExoQuick™ 试剂盒提取血清中的外泌体。

血清以 5 686 r/min 离心 15 min 去除细胞和细胞碎片,留取上清液;上清经过 0.22 μm 一次性滤器过滤,所得上清液按照试剂盒说明书,加入沉淀剂,混合均匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;随后将孵育好的混合物在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 021 r/min 离心 30 min,离心后外泌体呈米黄色或白色沉淀沉于管底;弃上清液,再次 4 021 r/min 离心 5 min,留取沉淀,即为外泌体,用 400 μl PBS 或 DMEM/F12 培养液重悬,分别标记为 IPC-Exo 和 CON-Exo,保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.3 外泌体浓度测定 采用 BCA 蛋白定量法测定外泌体浓度,严格按照 BCA 试剂盒的说明书测定样品的浓度。将 0.5 mg/ml 的蛋白标准品按照 0、1、2、4、8、12、16、20 μl 顺序加到 96 孔板的标准品孔中,各孔加入 PBS 补足到 20 μl ;上述提取的外泌体样品稀释 10 倍后,取 5 μl 加到 96 孔板中,加 PBS 补足到 20 μl ;各孔加 BCA 工作液 200 μl ,用加样枪轻轻吹打混匀;37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后放入酶标仪,于波长 570 nm 处测定各孔的吸光度值。

1.2.4 Western blot 检测外泌体标志蛋白 HSP60

上述提取的两组外泌体样品,取 100 μl ,加入 RIPA 裂解液冰上裂解随后与 5 $\times$ SDS 上样缓冲液混匀,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮 10 min,制成蛋白样品。取 20 μg 蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后,转移至 PVDF 膜,在含 5% 脱脂牛奶的 TBST 液中室温孵育 1~2 h, TBST 液漂洗 3 次,每次 10 min,加入 HSP60 一抗(1:500) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日 TBST 液漂洗 3 次,每次 10 min,加二抗孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次,每次 10 min,采用 ECL 发光试剂盒显影并采集图像。

1.2.5 细胞培养 H9c2 心肌细胞用含 10% 无外泌体血清的 DMEM/F-12 培养液培养,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养。选取对数生长期的细胞用于实验。当细胞密度在 80% 左右时,用 0.25% 胰酶消化 1 min 左右,以 1:3 的比例传代,每隔 2~3 d 传代 1 次。

1.2.6 建立心肌细胞 H/R 损伤模型 参照文献^[6]中方法,换去 H9c2 细胞正常培养时的完全培养基,加入无血清无糖的低氧液(139 mmol/L NaCl、4.7 mmol/L KCl、0.5 mmol/L MgCl_2 、1.0 mmol/L CaCl_2 、5 mmol/L HEPES, pH 7.4),细胞置于低氧小室中,通入 95% N_2 -5% CO_2 饱和 10 min 以驱除小室内的氧气,随后将低氧小室放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 5 h 进行低氧处理,然后用含 10% 无外泌体血清的完全培养基正常培养 1 h 进行复氧。

1.2.7 实验分组及处理 H9c2 心肌细胞随机分为

4 组: ① 对照组 (Control 组): H9c2 细胞置于 DMEM/F12 细胞培养液中常规培养; ② 低氧/复氧组 (H/R): 将 H9c2 细胞进行 5 h 低氧和 1 h 复氧处理; ③ H/R + IPC-Exo 组: 将 MPC-Exo 以 20 mg/L 的终浓度加入 H9c2 心肌细胞培养液, 与心肌细胞共孵育 12 h 后, 进行 H/R 处理; ④ H/R + CON-Exo 组: 将 CON-Exo 以 20 mg/L 的终浓度加入 H9c2 心肌细胞培养液, 与心肌细胞共孵育 12 h 后, 进行 H/R 处理。

1.2.8 心肌细胞活力的检测 将 H9c2 细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔 8×10^3 个, 按上述方法进行分组及处理完成后, 每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液 (此时培养基为 100 μ l), 在细胞培养箱内孵育 4 h 后, 酶标仪上于波长 450 nm 处测定各组吸光度值, 空白对照孔为不含细胞的培养液。H9c2 心肌细胞活力为实验测定孔吸光度值减去空白对照孔吸光度值。计算各组平均值。实验独立重复 3 次。

1.2.9 检测 LDH 活性 接种在 96 孔板的 H9c2 细胞按照以上进行分组及处理完成后, 每组各取 40 μ l 细胞培养上清液, 严格按照 LDH 试剂盒说明书操作, 利用酶标仪于波长 450 nm 处测定各孔吸光度值, 然后根据公式计算各组 LDH 活性。实验独立重复 3 次。

1.2.10 Annexin-V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡 将 H9c2 心肌细胞以 3×10^6 个/孔接种在 6 孔培养板, 按照上述进行分组及处理完成后, 0.25% 胰酶 (不含 EDTA) 消化, PBS 洗涤细胞 2 次, 1 500 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 用 100 μ l $1 \times$ 缓冲液重悬细胞, 每组加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI, 轻轻混匀后, 室温避光反应 15 min, 每组再加入 400 μ l 缓冲液重悬细胞, 随后流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。以单染 PI 细胞和单染 Annexin-V-FITC 细胞作为基准参照, 每个样本获取 3×10^4 个细胞, 用 FCS Express V 4.0 软件进行分析。实验独立重复 3 次。

1.2.11 Western blot 检测 Bcl-2、Bax 蛋白表达 按照上述分组及处理结束后, 提取各组细胞内总蛋白, 制备蛋白样品。取 20 μ g 蛋白样品经电泳后, 转膜, 后在含 5% 脱脂牛奶的 TBST 封闭液中室温孵育 1~2 h, TBST 液漂洗 3 次, 每次 10 min, 加入 Bcl-2、Bax 一抗 (1:1 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日 TBST 液漂洗 3 次, 每次 10 min, 加入二抗孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min, 采用 ECL 发光试剂盒显影并采集图像。采用 Image J 软件进行分析, 以 Bcl-2 或 Bax 与 β -actin 条带灰度值之比来表示蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析和统计学处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 两两比较采用 Tukey 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IPC 对外泌体释放的影响 采用 BCA 蛋白定量法测定血清外泌体浓度, 结果表明 CON-Exo 浓度为 (7.46 ± 1.77) mg/ml, IPC-Exo 浓度为 (14.93 ± 1.27) mg/ml, 提示 IPC 可诱导血清外泌体释放显著增加 ($P < 0.01$), 见图 1A。Western blot 结果显示 IPC-Exo、CON-Exo 均表达外泌体标志性蛋白 HSP60, 见图 1B, 且 IPC 后提取的外泌体中 HSP60 蛋白表达水平增加 ($P < 0.05$)。

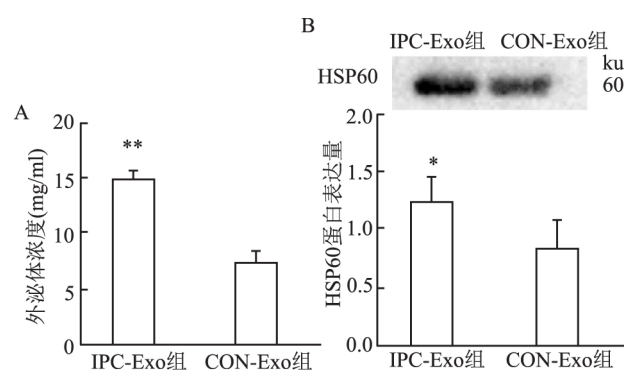


图1 IPC 对外泌体释放的影响

A: 两组外泌体浓度统计分析图; B: Western blot 检测血清外泌体标志蛋白 HSP60, 且 IPC 后提取的外泌体中 HSP60 蛋白表达水平增加; 与 CON-Exo 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 IPC-Exo 对 H9c2 心肌细胞活力的影响

H9c2 细胞活力检测结果如图 2 所示, 与 CON 组 (1.14 ± 0.09) 相比, H/R 组 (0.47 ± 0.08) 细胞活力明显降低 ($P < 0.01$); 与 H/R 组比较, H/R + IPC-Exo 组 (0.78 ± 0.04) 细胞活力增加 ($F = 169.1$, $P < 0.01$); 而 H/R + CON-Exo 组 (0.51 ± 0.11) 细胞活力无明显增加, 差异无统计学意义, 说明 IPC-Exo 可以明显增加细胞活力。

2.3 IPC-Exo 对 H9c2 心肌细胞 LDH 的活性的影响 细胞培养液中 LDH 的水平可以用来表示细胞损伤的程度, 各组测得结果分别为 CON 组 (67.33 ± 9.71)、H/R 组 (166.00 ± 12.17)、H/R + IPC-Exo 组 (111.33 ± 11.68)、H/R + CON-Exo 组 (149.67 ± 13.80)。如图 3 所示, 与 CON 组比较, H/R 组心肌细胞 H/R 损伤后 LDH 活性明显增加 ($P < 0.01$); 与 H/R 组比较, H/R + IPC-Exo 组可减轻心肌细胞 H/R 损伤, 降低 H9c2 心肌细胞 LDH 的活性 ($F =$

40.73, $P < 0.05$)。而 H/R + CON-Exo 组 LDH 活性无明显变化, 差异无统计学意义。提示 IPC-Exo 能够降低 H9c2 心肌细胞 LDH 的活性。

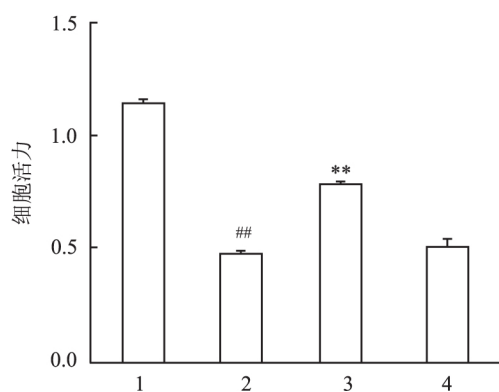


图2 IPC-Exo 对 H9c2 心肌细胞活力的影响 ($n = 3 \bar{x} \pm s$)

1: CON 组; 2: H/R 组; 3: H/R + IPC-Exo 组; 4: H/R + CON-Exo 组; 与 CON 组比较: ## $P < 0.01$; 与 H/R 组比较: ** $P < 0.01$

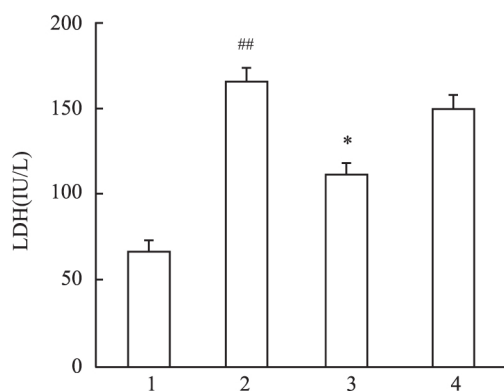


图3 IPC-Exo 对 H9c2 心肌细胞 LDH 的活性的影响 ($n = 3 \bar{x} \pm s$)

1: CON 组; 2: H/R 组; 3: H/R + IPC-Exo 组; 4: H/R + CON-Exo 组; 与 CON 组比较: ## $P < 0.01$; 与 H/R 组比较: * $P < 0.05$

2.4 IPC-Exo 对 H9c2 心肌细胞凋亡的影响 Annexin-V-FITC/PI 双染法检测心肌细胞凋亡, 结果表明, 与 CON 组比较, H/R 组凋亡细胞 (右上象限、右下象限) 明显增多 ($P < 0.01$); 与 H/R 组比较, H/R + IPC-Exo 组凋亡细胞明显减少 ($F = 13.63$, $P < 0.05$); 而 H/R + CON-Exo 组心肌细胞凋亡率无明显变化, 差异无统计学意义, 见图 4 表明 IPC-Exo 可以抑制 H9c2 心肌细胞凋亡。

2.5 IPC-Exo 对 H9c2 心肌细胞 Bcl-2、Bax 表达的影响 Western blot 检测结果表明, 与 CON 组比较, H/R 组心肌细胞 H/R 损伤后 Bcl-2 表达明显减少 ($F = 5.736$, $P < 0.05$), Bax 表达增加 ($F = 26.02$, $P < 0.01$), 而 H/R + IPC-Exo 组 Bcl-2 表达增加、Bax 表达减少, 与 H/R 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 H/R + CON-Exo 组差异无统计学意义, 见图 5 说明 IPC-Exo 能上调 H9c2 细胞 Bcl-2 表达、下

调 Bax 表达。

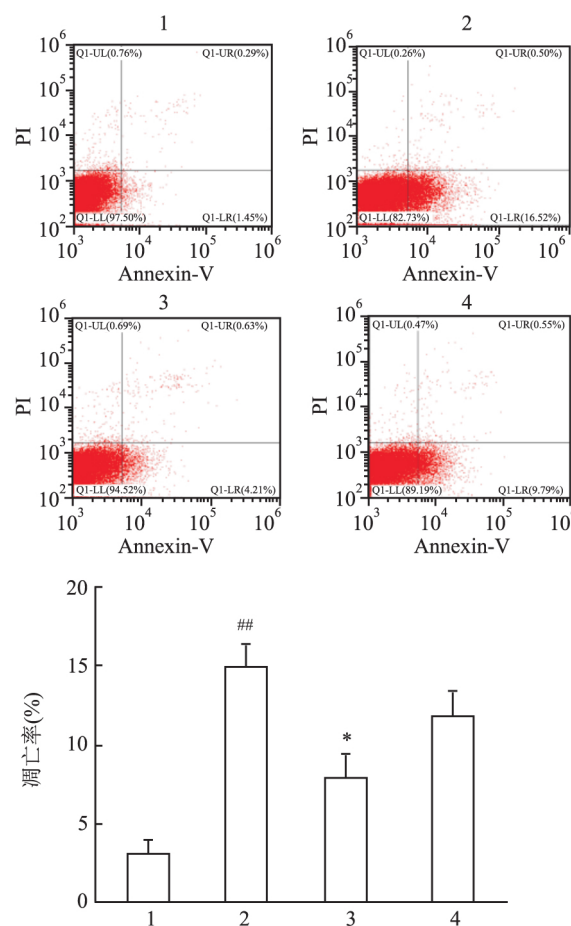


图4 IPC-Exo 对 H9c2 心肌细胞凋亡的影响 ($n = 3 \bar{x} \pm s$)

1: CON 组; 2: H/R 组; 3: H/R + IPC-Exo 组; 4: H/R + CON-Exo 组; 与 CON 组比较: ## $P < 0.01$; 与 H/R 组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

近年来, 外泌体在心血管疾病中的作用得到广泛关注, 外泌体在缺血性心脏病中的重要作用逐渐得到认识。研究^[4]显示, 间充质干细胞来源的外泌体能明显减小小鼠的心肌梗死面积, 通过增加 ATP 水平, 减少氧化应激, 激活 PI3K/Akt 通路, 从而减轻 IRI。同时有研究^[7]表明, 血浆外泌体可以介导蛋白 HSP70 的转运, 激活心肌细胞内 ERK 和 p38 MAPK 信号通路从而减轻 I/R 损伤, 从而起到心肌保护作用。此外, 心脏祖细胞来源的外泌体在小鼠心肌梗死中也发挥作用, 可抑制心肌细胞凋亡, 减少心肌梗死面积, 改善心脏功能^[8]。以上研究均表明, 外泌体在缺血性心脏病中具有心肌保护作用, 这为 IRI 后心肌修复治疗提供了新策略和新思路。

IPC 是指反复几次短暂缺血再灌注后, 可诱导

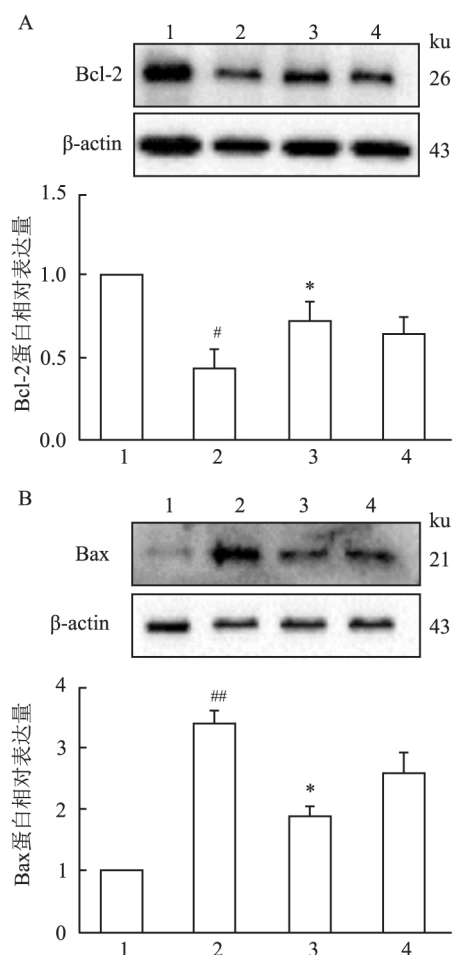


图5 IPC-Exo对H9c2心肌细胞Bcl-2、Bax表达的影响

A: Bcl-2; B: Bax; 1: CON组; 2: H/R组; 3: H/R + IPC-Exo组; 4: H/R + CON-Exo组; 与CON组比较: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; 与H/R组比较: ^{*} $P < 0.05$

心脏产生内源性保护机制,使其对后面较长时间的缺血性损伤产生明显的耐受,显著减少心律失常的发生以及减轻梗死面积。然而IPC减轻IRI的确切机制仍未完全阐明。研究^[9]表明主要是涉及细胞因子、凋亡基因、激活激酶途径等。进一步深入研究IPC的作用机制,将促进其在心肌梗死、心脏再灌注等临床治疗中的应用,为预防或减轻IRI提供新靶点。本研究通过在大鼠体内进行IPC,预处理结束后收集血液,随后分别提取CON组和IPC组血清中的外泌体,采用BCA蛋白定量法测定血清中外泌体浓度,结果表明IPC组外泌体浓度明显高于CON组,表明IPC可刺激内源性外泌体的释放,从而增加其在血清内的含量。外泌体含量及内容物的变化,可以反映机体的生理病理状态,对机体产生不同的影响^[10]。Gircz et al^[11]研究发现,离体灌流的供体心脏经过IPC处理后,其冠脉流出液中的细胞外囊

泡(其中包含外泌体),可以减轻受体心脏的IRI损伤。此外有研究^[12]显示,缺血预处理可以刺激富含miRNA-144的外泌体的释放,而miRNA-144激活PI3K/Akt和ERK信号通路,从而发挥心肌保护作用。

为进一步探讨IPC诱导释放的血清外泌体对H/R损伤的影响,将IPC-Exo与H9c2心肌细胞共孵育12h,随后进行H/R损伤,研究结果表明,IPC-Exo能增加H9c2心肌细胞活力,降低LDH的活性,抑制心肌细胞凋亡,而CON-Exo并未有此作用。心肌细胞凋亡是IRI中重要的损伤环节,在其发生中扮演着重要角色。研究^[13]表明,细胞凋亡是一种受多基因控制的程序性死亡,并且Bcl-2和Bax是细胞凋亡的重要调控因子。Bcl-2是重要的抗凋亡基因,主要通过抑制细胞色素c的释放来调节凋亡^[14]。相反,Bax是促细胞凋亡基因,可抑制Bcl-2活性或作用于线粒体膜通透性转换孔导致线粒体通透性改变,引起一系列级联反应^[15]。本研究结果表明,H/R组心肌细胞H/R损伤后细胞凋亡率明显增加,而H/R + IPC-Exo组凋亡细胞明显减少,同时显示H/R组Bcl-2表达明显减少,Bax表达增加,而H/R + IPC-Exo组Bcl-2表达增加、Bax表达减少,表明IPC-Exo能上调Bcl-2蛋白、下调Bax蛋白的表达。据此推测IPC-Exo可以减轻H9c2心肌细胞H/R损伤,其机制可能是通过上调Bcl-2、下调Bax表达抑制心肌细胞凋亡从而发挥心肌保护作用。然而,本研究主要在H9c2细胞上进行的,H9c2细胞是大鼠胚胎心肌细胞株,但其不同于原代的乳鼠心肌细胞和成年心肌细胞,因此IPC诱导释放的血清外泌体是否能够减轻原代心肌细胞H/R损伤,发挥心肌保护作用,有待于进一步研究。此外本研究只观察了Bcl-2和Bax的变化,探讨了初步的分子机制,具体的作用机制有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Murry C E, Jennings R B, Reimer K A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium[J]. *Circulation*, 1986, 74(5): 1124-36.
- [2] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends[J]. *J Cell Biol*, 2013, 200(4): 373-83.
- [3] Ong S G, Wu J C. Exosomes as potential alternatives to stem cell therapy in mediating cardiac regeneration[J]. *Circ Res*, 2015, 117(1): 7-9.
- [4] Arslan F, Lai R C, Smeets M B, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress

- and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Stem Cell Res*, 2013, 10(3):301–12.
- [5] 成伶俐, 吴素华, 李志梁, 等. 大鼠心肌缺血再灌注损伤动物模型的建立与评估[J]. *中国实验诊断学*, 2010, 14(8):1163–5.
- [6] 韩正怡, 何淑芳, 程洁, 等. 吗啡预处理对 H9c2 心肌细胞低氧/复氧时 microRNA 表达的影响[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(11):1552–7.
- [7] Vicencio J M, Yellon D M, Sivaraman V, et al. Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 65(15):1525–36.
- [8] Ibrahim A G, Cheng K, Marbān E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy[J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 2(5):606–19.
- [9] Lochner A, Marais E, Genade S, et al. Protection of the ischaemic heart: investigations into the phenomenon of ischaemic preconditioning[J]. *Cardiovasc J Afr*, 2009, 20(1):43–51.
- [10] Tian J, Guo X, Liu X M, et al. Extracellular HSP60 induces inflammation through activating and up-regulating TLRs in cardiomyocytes[J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 98(3):391–401.
- [11] Gircic Z, Varga Z V, Baranyai T, et al. Cardioprotection by remote ischemic preconditioning of the rat heart is mediated by extracellular vesicles[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 68:75–8.
- [12] Przyklenk K. MicroRNA-144 is a circulating effector of remote ischemic preconditioning[J]. *Basic Res Cardiol*, 2014, 109(5):429.
- [13] Soto-Cerrato V, Llagostera E, Montaner B, et al. Mitochondria-mediated apoptosis operating irrespective of multidrug resistance in breast cancer cells by the anticancer agent prodigiosin[J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68(7):1345–52.
- [14] Caraccio N, Cuccato S, Pratesi F, et al. Effect of type I interferon (s) on cell viability and apoptosis in primary human thyrocyte cultures[J]. *Thyroid*, 2009, 19(2):149–55.
- [15] Zhang S, Ye J, Zhang Y, et al. P2Y12 protects platelets from apoptosis via PI3k-dependent Bak/Bax inactivation[J]. *J Thromb Haemost*, 2013, 11(1):149–60.

Effects of ischemic preconditioning induced exosomes on hypoxia/reoxygenation injury and expression of Bcl-2 and Bax in cardiomyocytes

Liu Zhong, Chan Jinzhong, Huang Jun, et al

(Dept of Anesthesiology and Perioperative Medicine, The Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the effects of ischemic preconditioning (IPC) induced exosomes on hypoxia/reoxygenation (H/R) injury and expression of Bcl-2 and Bax in cardiomyocytes. **Methods** The exosomes were isolated from serum after rats were subjected to IPC or the control treatment and labeled with IPC-Exo, CON-Exo, respectively. The concentration of exosomes was determined by BCA protein assay. In another series of experiment, H9c2 cardiomyocytes were randomly divided into control, H/R, H/R + IPC-Exo and H/R + CON-Exo groups. The cells in control group were cultured under normal condition. In H/R group, H9c2 cardiomyocytes were exposed to 5 h of hypoxia followed by 1 h of reoxygenation. The cells in H/R + CON-Exo group and H/R + IPC-Exo group were pre-incubated with CON-Exo or IPC-Exo for 12 h before H/R, respectively. Then cell viability, lactate dehydrogenase activity, cell apoptosis and the expression of Bcl-2, Bax protein were detected separately. **Results** IPC significantly increased the release of serum exosomes. Compared with H/R group, IPC-Exo pre-incubation protected H9c2 cells from H/R injury by increasing cell viability, inhibiting LDH activity, attenuating cell apoptosis and up-regulating Bcl-2 protein and down-regulating Bax protein. However, CON-Exo failed to prevent H/R injury in H9c2 cells. **Conclusion** IPC induced exosomes may exert cardioprotection by reducing H/R injury in H9c2 cardiomyocytes, the mechanism may be related to up-regulating the expression of Bcl-2 and down-regulating the expression of Bax.

Key words ischemic preconditioning; exosome; cardiomyocytes; hypoxia/reoxygenation injury; Bcl-2; Bax