

· 烧伤后早期脏器损害与防治 ·

c-jun 反义基因重组体转染对缺氧复合烧伤血清刺激下大鼠心肌细胞的保护作用

胡安根 黄跃生

【摘要】 目的 观察 c-jun 反义基因重组体转染对缺氧复合烧伤血清刺激下大鼠心肌细胞的保护作用。方法 培养大鼠心肌细胞,分为:(1)正常对照组;(2)转染组:构建 c-jun 反义基因重组体并转染入心肌细胞,随后进行缺氧复合烧伤血清刺激;(3)非转染组:仅进行缺氧复合烧伤血清刺激,不作其他处理。于刺激后 1、3、7 h,采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 c-jun mRNA 的表达变化;用 Western blot 检测 c-jun 蛋白、肌钙蛋白 T(TnT)和 β -微管蛋白的表达变化;在光镜和电镜下观察心肌细胞形态结构改变。结果 (1)与正常对照组比较,非转染组 c-jun mRNA 与蛋白表达显著,转染组较非转染组显著下降。(2)与正常对照组比较,非转染组 TnT 与 β -微管蛋白表达显著下降,转染组较非转染组明显回升。(3)转染组心肌细胞骨架结构基本保持完好,偶见断裂与溶解。非转染组骨架网状结构紊乱、溶解与断裂,呈颗粒状。结论 缺氧复合烧伤血清刺激可使大鼠心肌细胞 c-jun 表达上调,进而引起心肌细胞损伤,c-jun 反义基因重组体转染对该刺激条件下的心肌细胞具有保护作用。

【关键词】 烧伤; 基因; 肌钙蛋白 T; 细胞低氧; 微管蛋白; 转染

Protective effects of c-jun anti-sense gene recombinant transfection on rat cardiomyocytes inflicted by hypoxia and burn serum HU An-geng, Huang Yue-sheng. Institute of Burn Research, Southwestern Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the protective effects of c-jun antisense gene recombinant transfection on rat cardiomyocytes inflicted by hypoxia and burn serum. Methods Cardiomyocytes from Wistar rat were isolated and cultured before being divided into normal control (C), transfection (T) and non-transfection(NT) groups. C-jun antisense gene recombinant was constructed and transfected into cardiomyocytes, which were then treated by hypoxia and burn serum in T group, while those in NT group were simply treated by hypoxia and burn serum. The changes in the c-jun mRNA expression were determined by RT-PCR at 1, 3 and 7 hours after the cardiomyocytes being stimulated, and the changes in the expressions of c-jun protein, troponin-T (TnT) and β -tubulin were assayed by Western blot. The morphological changes in the cardiomyocytes were observed by LM and EM. Results 1) The expressions of c-jun mRNA and protein in the NT group were increased evidently when compared with those in C and T groups. 2) The expressions of TnT and β -tubulin in NT group were decreased evidently in contrast to those in C and T groups. In addition, there exhibited evident structural derangement, dissolution and fragmentation to granules of cardiomyocytes in NT group, while the myocardial cytoskeletal structure was well preserved with scarce fragmentation and dissolution in T group. Conclusion Increased expression of c-jun in rat cardiomyocytes resulting in myocardial injury could be induced by combined treatment of hypoxia and burn serum, while c-jun antisense gene recombinant transfection might protect rat cardiomyocytes from injury.

【Key words】 Burn; Gene; Troponin-T; Cell hypoxia; Tubulin; Transfection

烧伤后早期出现“休克心”,是当前缺血缺氧性

损害防治研究的重要课题之一^[1]。以往研究表明,心肌缺血缺氧时,核转录因子 c-jun 显著表达,并通过转录调控心肌的蛋白组成和比例,导致心肌损害^[2]。新近研究认为,心肌细胞缺血缺氧时肌钙蛋白 T(TnT)和 β -微管蛋白表达明显减少^[3,4]。TnT 是心肌细胞收缩器结构蛋白之一,参与调节心肌收缩的钙激活过程,在心肌收缩舒张过程中起重要作用^[5]; β -微管蛋白是细胞骨架的重要组成部分,与细胞运动、胞内物质运输、细胞分化等功能密切相关^[6],但关于烧伤后两者的变化情况尚未见报道。

基金项目:国家杰出青年科学基金资助项目(30125040);国家重点基础研究发展规划资助项目(G1999054202);军队“十五”指令性课题资助项目(011L066);高等学校骨干教师资助计划项目;军队首批临床高新技术重大资助项目(第 23 项)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所、创伤烧伤复合伤国家重点实验室(胡安根现在漳州解放军第一七五医院烧伤科,363000)

通讯作者:黄跃生(电话:023-68754173, E-mail: yshuang@public.cta.cq.cn)400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所

本研究通过构建 c-jun 反义基因重组体,并转染入心肌细胞,随后对心肌细胞进行缺氧复合烧伤血清刺激,观察 TnT 和 β -微管蛋白的表达变化,以探讨 c-jun 反义基因重组体转染对心肌细胞的保护作用。

材 料 与 方 法

一、主要试剂与仪器

DMEM/F12(含胎牛血清)细胞培养基(美国 Gibco 公司);c-jun-pGEM3 质粒(由 J. B. 博士惠赠);pcDNA3.1(+)质粒(晶美生物工程有限公司);EcoR I、Hind III、RNA 聚合酶链式反应(PCR)试剂盒 Ver. 2.1、E. Z. N. A. 总 RNA 抽提试剂盒(日本 Takara 公司); β -微管蛋白、TnT、c-jun 均为兔抗,购自美国 Santa cruz 公司;蛋白电泳系统、凝胶成像系统 Quantity One 图像分析软件(美国 Bio-rad 公司);T4 DNA 连接酶(美国 Promega 公司)。

二、实验模型及分组

1. 心肌细胞的分离培养:取新生 Wistar 大鼠心脏,用磷酸盐缓冲液冲洗 3 次,将心尖部剪碎,加入 1.25 g/L 胰蛋白酶 5 ml,37℃ 消化 7 min,随后用小牛血清终止反应。弃第 1 次消化液,重复消化 7 次,收集每次消化液,采用 200 目滤网过滤后,离心半径 8 cm,1 000 r/min 离心 10 min。用 DMEM/F12(含胎牛血清)培养基接种细胞,置于 37℃、体积分数 5% CO₂ 孵箱培养。半小时后差速贴壁,并换含 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)的 DMEM/F12 培养基,于 37℃、体积分数 5% CO₂ 条件下继续培养。

2. 烧伤血清的制备:Wistar 大鼠 20 只,体重 200~260 g,实验前禁食 12 h。采用异戊巴比妥(30 mg/kg)麻醉动物后,将大鼠置于 98℃ 热水中 20 s,造成 30% TBSA III 度烫伤。伤后按照 Parkland 公式补液,6 h 后由腹主动脉抽血,离心半径 8 cm,1 000 r/min 离心 10 min 收集血清备用。

3. 实验分组:将生长融合的心肌细胞分为以下 3 组进行实验。(1)正常对照组:正常培养的心肌细胞;(2)非转染组:于正常培养的心肌细胞中加入体积分数 10% 的烧伤血清进行缺氧培养(37℃, O₂、N₂、CO₂ 的体积分数分别为 1%、94%、5%);(3)转染组:先转染正常培养的心肌细胞,3 h 后加入体积分数 10% 的烧伤血清进行缺氧培养,条件同前。转染组及非转染组于缺氧复合烧伤血清刺激后设 1、3、7 h 共 3 个观察时相点。

三、c-jun 反义基因重组体的构建及转染

(1) c-jun-pGEM3 质粒和 pcDNA3.1(+)质粒

的酶切与回收:参照文献[7]进行。(2)c-jun 酶切片断的平端化和 pcDNA3.1(+)酶切片断的去磷酸化:按 blunting kit 说明书操作。(3)c-jun、pcDNA3.1(+)酶切片断的连接:按 T4 DNA 连接酶说明书操作。(4)反义 c-jun-pcDNA3.1(+)重组体的鉴定:pcDNA3.1(+)与 pGEM3 上的 EcoR I、Hind III 酶切位点方向相反,构建出来的 c-jun-pcDNA3.1(+)重组体即为反义重组体。(5)反义重组体的转染:按 lipofectamine kit 说明书操作。

四、观察指标及方法

1. 形态学观察:对各组心肌细胞进行光镜和电镜观察,方法参照文献[8]。

2. 采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 c-jun mRNA:按 E. Z. N. A. 总 RNA 抽提试剂盒说明书,提取各组各时相点心肌细胞总 mRNA。引物序列:c-jun 上游 5'-GCTTGCAACCGATGCTAATC-3',下游 5'-GCTAAGGCCTCCGAATTATG-3',扩增产物长度 485 bp。反转录条件:50℃,30 min;扩增条件:94℃ 变性 2 min,94℃ 变性 30 s,59℃ 复性 30 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环后于 72℃ 延伸 5 min。将扩增产物放入 15 g/L 的琼脂糖凝胶中电泳(80 V),扫描测定染色带密度,计算目的基因扩增产物与 β -actin 扩增产物的比值。

3. 采用 Western blot 检测 c-jun 蛋白、TnT 和 β -微管蛋白:用十二烷基硫酸钠(SDS)载样缓冲液收集各组各时相点心肌细胞总蛋白,经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),电转膜,抗体反应,最后用化学发光法显带,用图像分析软件进行半定量分析。

五、统计学处理

采用 SPSS10.0 统计软件,对各图像分析结果进行 t 检验。

结 果

1. c-jun-pcDNA3.1(+)重组体的构建和鉴定:c-jun-pGEM3 酶切片断为 2 460 bp(图 1)。构建的 c-jun-pcDNA3.1(+)重组体片断为 7 400 bp(图 2)。

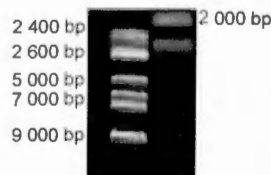


图 1 c-jun-pGEM3 EcoR I、Hind III 双酶切结果
Fig 1 Double enzyme digestion of c-jun-pGEM3 by EcoRI and Hind III

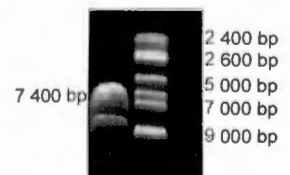


图 2 c-jun-pcDNA 3.1(+)重组体
Fig 2 The c-jun-pcDNA 3.1(+) recombinant

2. 心肌细胞形态学观察结果:(1)光镜观察:经天青美-蓝染色,转染组大鼠心肌细胞核仁明显,核膜清楚,胞浆淡染,细胞骨架基本完整(图3);非转染组心肌细胞骨架明显断裂呈颗粒状散布在核周围,细胞轮廓不清(图4)。(2)电镜观察:转染组微管排列整齐,基本保持完好,偶见断裂和溶解;非转染组心肌细胞出现骨架网状结构紊乱,有的细胞骨架甚至全部断裂,呈颗粒状散布在核周围。

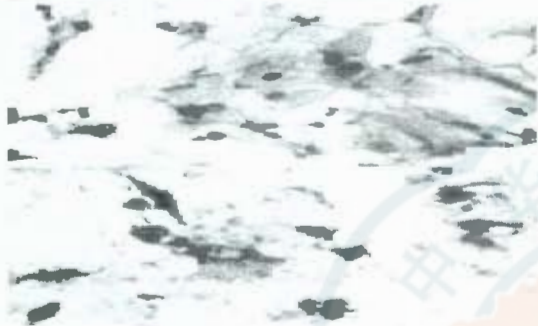


图3 转染组大鼠心肌细胞核仁明显,核膜清楚,胞浆淡染,细胞骨架基本完整 光镜×400

Fig 3 There exhibited evident nucleolus, clear nucleus membrane, light cytoplasm staining and integral cytoskeleton in rat cardiomyocyte in T group LM×400



图4 非转染组大鼠心肌细胞骨架断裂,呈颗粒状散布在核周围 光镜×400

Fig 4 There exhibited fragmentation of cytoskeleton to granules, scattering around the nucleus of rat cardiomyocyte in NT group LM×400

3. c-jun mRNA RT-PCR 检测结果:缺氧复合烧伤血清刺激 1、3、7 h 后,非转染组大鼠心肌细胞的 c-jun mRNA 表达显著,3 h 达高峰;转染组表达不明显,较非转染组分别下降了 48.6%、44.5%、35.0% ($P < 0.01$),见图 5、6。



图5 非转染组 c-jun mRNA RT-PCR 结果

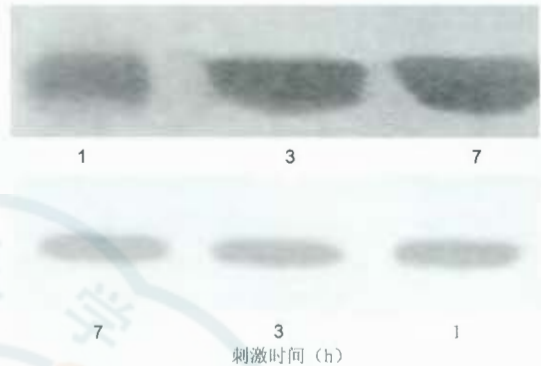
Fig 5 Analysis of c-jun mRNA expression in NT group by RT-PCR



图6 转染组 c-jun mRNA RT-PCR 结果

Fig 6 Analysis of c-jun mRNA expression in T group by RT-PCR

4. c-jun 蛋白 Western blot 检测结果:缺氧复合烧伤血清刺激 1、3、7 h 后,非转染组大鼠心肌细胞 c-jun 蛋白表达增强,7 h 达到高峰;转染组表达不明显,较非转染组分别下降了 46.3%、48.1%、34.3% ($P < 0.01$),见图 7。



注:上图为非转染组,下图为转染组
图7 非转染组、转染组 c-jun 蛋白 Western blot 检测结果

Fig 7 Analysis of c-jun expression in T and NT groups by Western blot

5. TnT Western blot 检测结果:正常对照组心肌细胞 TnT 显著表达;缺氧复合烧伤血清处理 1、3、7 h 后,非转染组心肌细胞 TnT 表达较正常对照组显著下降;转染组心肌细胞 TnT 表达虽然较正常对照组下降,但比非转染组分别增加了 59.5%、39.7% 和 46.7% ($P < 0.01$)。

6. β -微管蛋白 Western blot 结果:正常对照组大鼠心肌细胞 β -微管蛋白表达显著;缺氧复合烧伤血清刺激 1、3、7 h 后,非转染组心肌细胞 β -微管蛋白表达较正常对照组显著下降,7 h 最明显;转染组 β -微管蛋白表达虽然较正常对照组有所下降,但与非转染组比较,分别增加 30.5%、39.7%、36.7% ($P < 0.01$)。

讨 论

本研究中,缺氧复合烧伤血清刺激后,转染组大鼠心肌细胞 c-jun mRNA 及 c-jun 蛋白的表达较非转染组明显下降 ($P < 0.01$),表明 c-jun 反义重组体已转染进入心肌细胞,能有效抑制 c-jun 的表达。

心肌肌钙蛋白是心肌收缩的调节蛋白,是心肌细胞收缩器结构蛋白之一,参与调节心肌收缩的钙激活过程,它有 3 个亚单位:即 TnI、TnC、TnT。TnT 能在心肌收缩时介导钙激活,将肌钙蛋白复合物与原肌球蛋白结合存在于细丝中,其中 TnT 和 TnI 是心肌细胞的特有蛋白,与骨骼肌 Tn 无交叉反应。鉴于此,笔者选用心肌特有并对其收缩起重要作用的 TnT 作为观察指标。Sato 等^[9]的实验表明,心肌缺血缺氧时,增加的 c-jun 通过下调 TnT 表达使心肌

收缩力下降,进而导致心功能不足。本研究结果显示,非转染组心肌细胞 c-jun 表达显著而 TnT 表达明显下降;转染组心肌细胞 TnT 表达较非转染组明显增加 ($P < 0.01$)。表明 c-jun 反义基因重组体转染,能有效抑制缺氧复合烧伤血清对心肌细胞的刺激,进而起到保护心肌细胞的作用。

微管蛋白包括 α -微管蛋白和 β -微管蛋白,是细胞骨架的主要成分之一,具有构成细胞支架、维持细胞形态、固定和支持细胞器的位置、参与细胞运动、细胞内物质运输、细胞分化和维持心肌细胞固有的粘弹性等功能。Vantighem 等¹⁰观察到,心肌细胞缺血缺氧后 c-jun 蛋白表达异常增加, β -微管蛋白表达显著减少,心肌细胞骨架出现严重紊乱、溶解和断裂;在心肌细胞缺血缺氧前应用 c-jun 抑制剂进行预处理,上述指标得到明显改善。由此认为,心肌缺血缺氧时,大量的 c-jun 通过下调 β -微管蛋白表达使心肌细胞骨架紊乱、溶解或断裂,进而导致心肌损害。

本研究中,笔者首先构建了 c-jun 反义基因重组体并将之转染入心肌细胞,经相关指标测定及心肌细胞形态学观察,证实 c-jun 反义基因重组体转染,能有效阻止缺氧复合烧伤血清刺激后心肌细胞 β -微管蛋白表达的下降,起到保护心肌细胞的作用。缺氧和细胞因子(烧伤血清中含有大量的致炎细胞因子)是烧伤早期心肌损害的主要因素,本研究结

果为寻找防治严重烧伤心肌缺血缺氧性损伤和“休克心”的新策略提供了理论依据。

参 考 文 献

- 1 黄跃生,杨宗城,迟路湘,等.烧伤后“休克心”的研究.中华烧伤杂志,2000,16:25.
- 2 Wang LX, Ideishi M, Yahiro E, et al. Mechanism of the cardioprotective effect of inhibition of the renin-angiotensin system on ischemia. Reperfusion-Induced Myocardial Injury, 2001, 24: 179 - 187.
- 3 Badoff C, Brandes RP, Popp R, et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. Circulation, 2003, 107: 1024 - 1032.
- 4 Kwong RY, Schussheim AE, Rekhraj S, et al. Detecting acute coronary syndrome in the emergency department with cardiac magnetic resonance imaging. Circulation, 2003, 107: 531 - 537.
- 5 左亚刚,尚秀梅,邢玉贵,等.心肌肌钙蛋白与心肌损伤.河北中西医结合杂志,1998,7:25.
- 6 Jirasek T, Mandys V, Viklicky V, et al. Expression of class III beta-tubulin in neuroendocrine tumours of gastrointestinal tract. Folia Histochem Cytobiol, 2002, 40: 305 - 310.
- 7 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 主编. 金冬雁, 黎孟枫, 翻译. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1995. 605 - 611.
- 8 徐承水. 分子细胞生物学手册. 北京: 北京农业大学出版社, 1992. 570 - 572.
- 9 Sato M, Bagchi D, Tosaki A, et al. Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia. reperfusion-induced activation of JNK-1 and C-JUN. Free Radic Bid Med, 2001, 31: 729 - 737.
- 10 Vantighem A, Xu Y, Assefa Z, et al. Phosphorylation of Bcl-2 in G2/M phase-arrested cells following photodynamic therapy with hypericin involves a CDK1-mediated signal and delays the onset of apoptosis. J Biol Chem, 2002, 277: 37718 - 37731.

(收稿日期:2003-06-18)
(本文编辑:罗 勤)

· 病例报告 ·

特重度烧伤并发脑梗死一例

肖伯春 厉建华 周新平 程卓鑫

患者男,63岁,瓦斯火焰烧伤后36h转入本院。查体:意识清楚,体温37℃,脉搏90次/min,呼吸20次/min,血压150/90 mm Hg(1 mm Hg = 0.133 kPa),心肺未见异常。烧伤总面积80%,其中Ⅲ度10%TBSA。既往有高血压病史10余年。入院后行补液、抗感染,给予钙离子通道阻滞剂、氧自由基清除剂等综合治疗,创面外用磺胺嘧啶银。伤后第4天,患者出现嗜睡,言语含糊不清,怀疑为全身感染所致,静脉滴注头孢他啶2g,3次/d,丁胺卡那霉素0.4g,2次/d,效果不明显。伤后第7天,患者诉左下肢麻木,发凉,活动障碍。查体温38.2℃,双侧瞳孔等大同圆,对光反射灵敏,无面、舌瘫,左下肢较右下肢肌力明显下降,babinski征阴性,创面未见溶痂及感染征象,血常规及血生化检查正常,头颅CT示:左侧枕叶脑梗死,脑白质缺血缺氧性改变。诊断为脑

梗死。给予三七总皂甙0.4g静脉滴注1次/d,阿斯匹林100mg口服1次/d,抗血小板聚集;吡拉西坦8g静脉滴注,1次/d,保护脑细胞功能。Ⅲ度创面脱痂后行植皮手术,住院40d,患者创面愈合出院,出院时意识清楚,言语流利,左下肢肌力正常,功能恢复满意。

讨论 特重度烧伤并发脑梗死的原因可能为患者动脉粥样硬化,当发生特重度烧伤时,血液浓缩,血粘稠度增加,血小板粘附率升高,血小板聚集;同时血压下降,血管痉挛,血流变慢,引起脑血栓形成。烧伤并发脑梗死临床少见,早期表现往往容易被特重度烧伤症状和体征所掩盖。因此,对于有高血压或动脉粥样硬化病史的烧伤患者,当出现意识状态改变,难以用烧伤感染、水电解质紊乱、单纯脑水肿等原因解释时,应高度警惕是否并发脑梗死。

(收稿日期:2002-08-12)
(本文编辑:张 红)

作者单位:154007 佳木斯,解放军第二二四医院烧伤科(肖伯春、厉建华、程卓鑫),内科(周新平)