

ted through the anti-inflammatory, anti-oxidant, and anti-apoptosis functions by HO-1.

【Key words】 Lipopolysaccharides; Heme oxygenase (decyclizing); Myocytes, cardiac; Tumor necrosis factor-alpha

脂多糖(LPS)是内毒素的主要成分,严重感染、重度烧伤后 24 h 内毒素即进入体内产生内毒素血症,并抑制心肌收缩,最终导致休克^[1]。血红素氧合酶 1(HO-1)是一种新型应激蛋白,可减轻高温对肺、肝、脑等器官的损伤^[2]。但 HO-1 对烧伤后 LPS 诱导的心肌细胞损伤是否具有保护作用以及其机制尚不清楚。为此,笔者进行了以下研究。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

HO-1 诱导剂 LPS、氯化血红素(hemin)及 HO-1 阻断剂 ZnPP-IX(美国 Sigma 公司),DMEM 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司),Trizol 试剂盒、胰蛋白酶(美国 Promega 公司),噻唑蓝(MTT,美国 Ameresco 公司),兔抗大鼠 HO-1、核因子 κB(NF-κB)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)购自美国 Santa Cruz 公司,凋亡试剂盒购于杭州联科生物技术有限公司, Taq 酶购自日本 TaKaRa 公司。HO-1 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 心肌细胞的培养

选用出生后 1~2 d 的 SD 乳鼠(南昌大学医学院医学实验动物中心),参照文献[3]方法分离培养心肌细胞,取培养第 4 天的细胞用于实验。

1.3 实验分组

将细胞分为对照组(A组):常规培养;LPS 组(B组):培养液中加入终浓度为 30 μmol/L 的 LPS 作用 1 h;LPS + hemin 组(C组):加入终浓度为 5 μmol/L 的 hemin,作用 1 h 后再加入 30 μmol/L 的 LPS 作用 1 h;LPS + ZnPP 组(D组):加入终浓度为 3 μmol/L 的 ZnPP-IX,作用 1 h 后再加入 30 μmol/L 的 LPS 作用 1 h。

1.4 检测指标

1.4.1 心肌细胞乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)及超氧化物歧化酶(SOD)含量检测 分别用硫代巴比妥酸比色法及黄嘌呤氧化酶法测定。

1.4.2 心肌细胞节律的检测 实验前后在倒置显微镜下连续观察 30 s,记录各组心肌细胞搏动频率及节律。

1.4.3 细胞存活率的检测 采用 MTT 法,在波长 490 nm 处测定各孔细胞的吸光度值,计算心肌细胞存活率。

1.4.4 细胞凋亡率检测 操作按凋亡试剂盒说明书进行。

1.4.5 HO-1 mRNA 的检测 采用反转录-PCR 法。HO-1 上游引物为 5'-AGAGCGACATAAGCA-GCAC-3',下游引物 5'-CCTCGTGCCAAGAACTT-3',扩增长度 523 bp,PCR 反应条件:94 ℃变性 45 s,54 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环。β 肌动蛋白上游引物 5'-GTAAAGACCTCTATGCCAACA-3',下游引物 5'-ACTCATCGTACTCCTGCTTG-3',扩增长度 223 bp,PCR 反应条件:94 ℃变性 45 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环。琼脂糖凝胶电泳后行 SynGene 凝胶电泳分析,计算各点 HO-1 与 β 肌动蛋白的吸光度比值。

1.4.6 心肌细胞 HO-1、TNF-α、NF-κB 的检测 采用蛋白质印迹法检测心肌细胞内 HO-1、TNF-α 含量。NF-κB 的检测参照文献[4]进行,取细胞平均荧光强度值作为测定值,计算各组与空白管比值。

1.5 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.5 统计软件行方差分析。

2 结果

2.1 心肌细胞 LDH、MDA 及 SOD 含量

与 A 组比较,B、C、D 组心肌细胞 LDH、MDA 均升高,而 SOD 降低($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组心肌细胞乳酸脱氢酶、丙二醛、超氧化物歧化酶含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	乳酸脱氢酶 (U/L)	丙二醛 (mmol/L)	超氧化物歧化酶 (U/mL)
A 组	4	69 ± 10	0.87 ± 0.25	24.3 ± 3.6
B 组	4	113 ± 15 ^a	1.88 ± 0.36 ^a	17.8 ± 1.8 ^a
C 组	4	79 ± 13 ^{ab}	1.16 ± 0.32 ^{ab}	22.5 ± 2.4 ^{ab}
D 组	4	154 ± 22 ^{ab}	2.84 ± 0.44 ^{ab}	13.4 ± 1.5 ^{ab}

注:A 组为对照组,B 组为脂多糖(LPS)组,C 组为 LPS + 氯化血红素组,D 组为 LPS + ZnPP 组;与 A 组比较,^a $P < 0.05$;与 B 组比较,^b $P < 0.05$

2.2 心肌细胞节律、存活率及凋亡率的变化

B、C、D 组心肌细胞节律、凋亡率均高于 A 组($P < 0.05$),存活率低于 A 组($P < 0.05$)。其中 C 组心肌细胞存活率高于 B 组,凋亡率低于 B 组($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组心肌细胞节律、存活率及凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	细胞搏动 (次/min)	节律不齐 (次/min)	存活率 (%)	凋亡率 (%)
A 组	4	146 ± 15	1.48 ± 0.10	100	3.4 ± 0.5
B 组	4	185 ± 21 ^a	6.50 ± 0.70 ^a	78 ± 6 ^a	12.4 ± 1.8 ^a
C 组	4	160 ± 18 ^{ab}	2.70 ± 0.30 ^{ab}	87 ± 7 ^{ab}	5.3 ± 1.6 ^{ab}
D 组	4	115 ± 14 ^{ab}	10.10 ± 1.30 ^{ab}	59 ± 6 ^{ab}	15.8 ± 2.6 ^{ab}

注: A 组为对照组, B 组为脂多糖(LPS)组, C 组为 LPS + 氯化血红素组, D 组为 LPS + ZnPP 组; 与 A 组比较, ^a*P* < 0.05; 与 B 组比较, ^b*P* < 0.05

2.3 HO-1 mRNA 的表达

B、C、D 组心肌细胞 HO-1 mRNA 表达均高于 A 组 (*P* < 0.05), 其中 C 组升高最明显。见图 1。

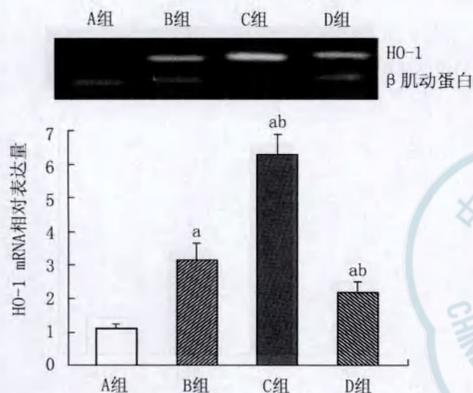


图 1 各组心肌细胞血红素氧合酶 1 (HO-1) mRNA 表达。上图为反转录-PCR 检测结果, 下图为半定量分析; A 组为对照组, B 组为脂多糖(LPS)组, C 组为 LPS + 氯化血红素组, D 组为 LPS + ZnPP 组; 与 A 组比较, ^a*P* < 0.05; 与 B 组比较, ^b*P* < 0.05

2.4 心肌细胞 HO-1、TNF-α、NF-κB 值

B、C、D 组心肌细胞 HO-1、TNF-α、NF-κB 值均高于 A 组 (*P* < 0.05)。其中 C 组 HO-1 值最高(图 2), D 组 TNF-α、NF-κB 值最高(图 3, 4)。

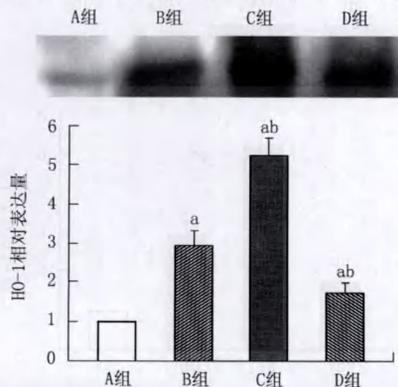


图 2 各组心肌细胞血红素氧合酶 1 (HO-1) 表达量的比较。上图为蛋白质电泳图, 下图为半定量分析; A 组为对照组, B 组为脂多糖(LPS)组, C 组为 LPS + 氯化血红素组, D 组为 LPS + ZnPP 组; 与 A 组比较, ^a*P* < 0.05; 与 B 组比较, ^b*P* < 0.05

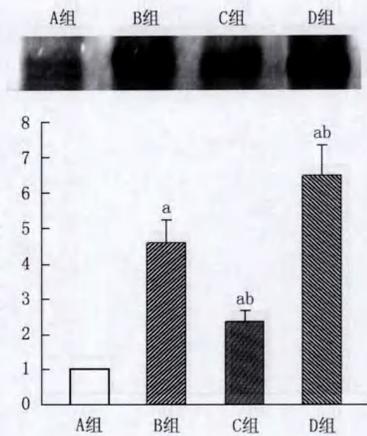


图 3 各组心肌细胞肿瘤坏死因子 α (TNF-α) 表达量的比较。上图为蛋白质电泳图, 下图为半定量分析; A 组为对照组, B 组为脂多糖(LPS)组, C 组为 LPS + 氯化血红素组, D 组为 LPS + ZnPP 组; 与 A 组比较, ^a*P* < 0.05; 与 B 组比较, ^b*P* < 0.05

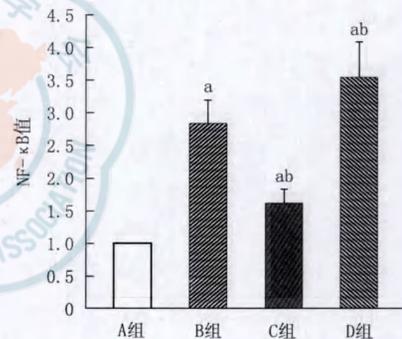


图 4 各组心肌细胞核因子 κB (NF-κB) 水平比较。A 组为对照组, B 组为脂多糖(LPS)组, C 组为 LPS + 氯化血红素组, D 组为 LPS + ZnPP 组; 与 A 组比较, ^a*P* < 0.05; 与 B 组比较, ^b*P* < 0.05

3 讨论

炎症因子在心肌细胞损伤中起着重要作用。研究表明, 白细胞介素 1β 可抑制心肌收缩, 导致心功能不全^[5]。本研究通过检测心肌细胞 LDH、MDA、SOD 含量和细胞存活率、凋亡率等来评估细胞损伤情况; 以检测 NF-κB、TNF-α 水平来评估 HO-1 的抗炎性作用。结果观察到, LPS 通过上调 NF-κB 活性, 使心肌细胞 TNF-α 表达明显增多, 氧化应激增加, 诱发细胞炎症反应, 加重细胞损伤, 使其活力下降、死亡率增加。HO-1 通过降低心肌细胞内 NF-κB 活性, 减少炎症因子 TNF-α 的表达, 从而减轻 LPS 对心肌细胞的损伤, 增强细胞活力, 减少细胞凋亡。

本研究观察到, LPS 使心肌细胞 LDH、MDA 含量明显增加, SOD 活力下降, 心肌细胞凋亡增多。MDA 在生物膜内能相互交联, 使细胞膜流动性下

降,通透性增加,细胞结构受损,导致细胞内 LDH 大量渗漏到细胞外。LPS 作用后心肌细胞搏动频率明显增加,幅度增强,这种改变并不是心肌细胞功能加强的表现,而是其早期功能受损的表现。hemin 可诱导心肌细胞 HO-1 高表达,明显降低 LDH 含量,恢复 SOD 活力,使细胞氧化应激下降,活力增强,凋亡减少,发挥了细胞保护作用。而用 ZnPP-IX 阻断 HO-1 的表达后,细胞活力下降更明显,凋亡明显增多,心肌细胞的损伤加重。这说明 HO-1 对心肌细胞具有直接的保护作用。

TNF- α 与心肌损害有密切关系。黄跃生^[6]观察到,重度烧伤后早期存在心肌收缩力下降,心排出量减少,烧伤后产生的心肌抑制物质与此有关,TNF- α 是其中的主要物质。TNF- α 能降低心肌 α 和 β 肾上腺素能受体的反应性,影响心肌细胞内钙离子浓度,减弱心肌收缩力^[7]。本研究证实,LPS 刺激使心肌细胞 TNF- α 水平明显升高,达到正常的 4.5 倍左右,对细胞产生严重损伤;但 hemin 诱导 HO-1 的产生,能明显下调心肌细胞 TNF- α 的表达,减轻 LPS 对细胞的损伤,ZnPP-IX 可以拮抗 HO-1 的产生,使得 TNF- α 的表达约达正常心肌细胞的 6.5 倍,并明显加重细胞损伤。另有研究表明,HO-1 可显著降低 LPS 刺激后鼠巨噬细胞、肝细胞 TNF- α 的水平,并减轻 LPS 对细胞的损伤^[8]。

HO-1 可能通过 NF- κ B 影响 TNF- α 的表达。NF- κ B 被认为是细胞信号转导的整合器,是 TNF- α 表达调控的直接执行者,其他信号通路通过 NF- κ B 以实现 TNF- α 的调控^[9]。本研究表明,HO-1 对 TNF- α 的影响与 NF- κ B 有直接关系。hemin 诱导 HO-1 的表达能明显抑制心肌细胞 NF- κ B 的活化,并下调 TNF- α 表达。ZnPP-IX 可以阻断 HO-1 的表达,使心肌细胞 NF- κ B 的活性显著升高,TNF- α 的合成也随之增加。推测 HO-1 可能是通过下调 NF- κ B 活性,调控炎症因子 TNF- α 等的合成,以减轻 LPS 对

心肌细胞的损伤。Alcaraz 等^[10]的研究也表明,LPS 刺激后的巨噬细胞 HO-1 水平会增加,且常伴随着 NF- κ B 活性的抑制及炎症因子分泌的减少。

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(5):275-278.
- [2] Sun BW, Sun Y, Sun ZW, et al. CO liberated from CORM-2 modulates the inflammatory response in the liver of thermally injured mice. World J Gastroenterol, 2008, 14(4): 547-553.
- [3] Horton JW, Maass DL, White J, et al. Hypertonic saline-dextran suppresses burn-related cytokine secretion by cardiomyocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 280(4): 1591-1601.
- [4] Cognasse F, Sabido O, Béniguel L, et al. A flow cytometry technique to study nuclear factor-kappa B (NF κ B) translocation during human B cell activation. Immunol Lett, 2003, 90(1): 49-52.
- [5] Cheng XS, Shimokawa H, Momii H, et al. Role of superoxide anion in the pathogenesis of cytokine-induced myocardial dysfunction in dogs *in vivo*. Cardiovasc Res, 1999, 42(3): 651-659.
- [6] 黄跃生. 烧伤后早期心肌损害的分子机制及防治研究进展. 中华烧伤杂志, 2004, 20(5): 257-259.
- [7] Maass DL, White J, Sanders B, et al. Cardiac myocyte accumulation of calcium in burn injury: cause or effect of myocardial contractile dysfunction. J Burn Care Rehabil, 2005, 26(3): 252-259.
- [8] Pae HO, Jeong CS, Kim HS, et al. Costunolide inhibits production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 by inducing heme oxygenase-1 in RAW264.7 macrophages. Inflamm Res, 2007, 56(12): 520-526.
- [9] Jones WK, Brown M, Ren X, et al. NF-kappaB as an integrator of diverse signaling pathways: the heart of myocardial signaling? Cardiovasc Toxicol, 2003, 3(3): 229-254.
- [10] Alcaraz MJ, Vicente AM, Araico A, et al. Role of nuclear factor-kappaB and heme oxygenase-1 in the mechanism of action of an anti-inflammatory chalcone derivative in RAW 264.7 cells. Br J Pharmacol, 2004, 142(7): 1191-1199.

(收稿日期:2007-11-16)

(本文编辑:张红)

读者·作者·编者

关于表格中数据注释符号选用的规定

本刊对来稿中表格数据注释符号作如下要求:

论文表格中的数据如需说明统计学处理后的 P 值,须在该数据的右上角标出注释符号——英文小写字母(按序选用,如 a、b、c……)。请勿采用以往惯用的“*”、“#”、“ Δ ”等。

本刊编辑部