

· 论著 ·

丝裂素活化蛋白激酶途径在缺氧复合烧伤血清致心肌细胞损伤中的作用

张家平 黄跃生 杨宗城

【摘要】目的 观察缺氧复合烧伤血清对心肌细胞丝裂素活化蛋白激酶(MAPKs)活化的影响,探讨 MAPKs 信号途径在缺氧复合烧伤血清致心肌细胞损伤中的作用。**方法** 乳鼠心肌细胞原代培养,缺氧复合烧伤血清作用心肌细胞后不同时间点用免疫印迹化学发光法检测 p38 激酶、细胞外信号调节激酶(ERK)和 c-Jun 氨基末端蛋白激酶(JNK)磷酸化程度;分别用 p38 激酶特异抑制剂 SB203580 和 ERK 特异抑制剂 PD98059 抑制 p38 激酶和 ERK 途径,观察其对缺氧复合烧伤血清培养条件下心肌细胞活性和培养上清中乳酸脱氢酶(LDH)含量的影响。**结果** 心肌细胞 p38 激酶和 ERK 在缺氧复合烧伤血清作用后迅速、持续活化,而 JNK 活化不明显。用 SB203580 抑制 p38 激酶可显著减少细胞 LDH 漏出(各时间点 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)和改善细胞活性(双因素作用 12 h 后,两者间比较, P 均 < 0.01);相反,抑制 ERK 途径在一定程度上增加了细胞 LDH 漏出和降低细胞活性(双因素作用 6 h 和 12 h,两者间比较, P 均 < 0.01)。**结论** 心肌细胞 MAPKs 的 3 条信号转导途径中, p38 激酶途径和 ERK 途径介导了缺氧复合烧伤血清刺激信号的胞内转导。其中 p38 激酶途径激活介导了心肌细胞的损伤效应,而 ERK 途径激活则有一定的细胞保护作用。

【关键词】 心肌细胞; 丝裂素活化蛋白激酶; 缺氧; 烧伤血清

Role of mitogen-activated protein kinases signal pathway in cardiomyocyte injury induced by serum after hypoxia and burn injury ZHANG Jia-ping, HUANG Yue-sheng, YANG Zong-cheng. State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: HUANG Yue-sheng

【Abstract】Objective To observe the activation and explore the role of three major mitogen-activated protein kinases (MAPKs), including extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 kinase and c-Jun NH₂-terminal protein kinase (JNK), in cardiomyocytes injury induced by serum after hypoxia and burn injury. **Methods** Phosphorylation of the three major MAPKs in primary cultured neonatal rat cardiomyocytes were determined by Western blotting. Contents of released lactate dehydrogenases (LDH) and death-rate of myocytes treated with serum after hypoxia and burn injury, SB203580+hypoxia and burn serum, PD98059+hypoxia and burn serum were observed respectively. **Results** Exposing rat neonatal cardiomyocytes to hypoxia and burn serum resulted in a rapid and prolonged activation of p38 kinase and ERK. Phosphorylation degree of p38 kinase, ERK1/2 was increased. Myocytes treated with SB203580 (10 μmol/L), a selective inhibitor of p38 kinase, resulted in a significant decline in LDH leakage and cell death. However, with pretreatment of cell with PD98059 (25 μmol/L), an inhibitor of ERK, LDH leakage and cell death were increased. **Conclusion** Serum obtained after hypoxia and burn injury activate p38 kinase and ERK, but not JNK, in cardiomyocytes. p38 kinase pathway might play a role in mediating cardiomyocytes injury, whereas ERK plays a protective role.

【Key words】 cardiomyocyte; mitogen-activated protein kinase; hypoxia; burn serum

缺氧、炎症因子等是严重烧伤早期心肌损害的主要原因^[1]。我们的前期研究发现,烧伤后 1 h 心肌组织丝裂素活化蛋白激酶(MAPKs)信号途径即迅

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(G1999054202);国家杰出青年科学基金项目(30125040);国家自然科学基金青年科学基金项目(30300366);全军医药卫生科研基金课题(01L066)

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、烧伤与复合伤国家重点实验室

通讯作者:黄跃生,教授

作者简介:张家平(1972-),男(汉族),湖南省醴陵人,医学博士,讲师,主治医师,主要研究方向为烧伤后脏器功能障碍。

速活化^[2]。由于 MAPKs 信号途径广泛参与了缺氧、炎症因子、自由基等信号事件的细胞内转导,我们推测这条信号途径可能与严重烧伤早期心肌损害有关。本研究中,我们建立了缺氧复合烧伤血清培养心肌细胞模型,进一步观察缺氧复合烧伤血清对心肌细胞 MAPKs 途径活化的影响,并探讨不同 MAPKs 信号途径在缺氧复合烧伤血清致心肌细胞损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器:抗磷酸化细胞外信号调节激

酶(ERK)、p38 激酶和 c-Jun 氨基末端蛋白激酶(JNK)抗体购自美国新英格兰生物实验公司;超信号皮克级兔 IgG 免疫印迹检测试剂盒购自美国 Pierce 公司;p38 激酶特异抑制剂 SB203580、ERK 特异抑制剂 PD98059 均购自美国 Carlsbiochem 公司;乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;Dulbecco 改良 Eagle 培养基-F₁₂(DMEM-F₁₂)购自美国 Hyclone 公司;DU-7 紫外分光光度计由美国 Beckman 公司生产。

1.2 乳鼠心肌细胞原代培养及实验分组:参照文献[3,4]方法略加修改。取出生后 1~2 d Wistar 乳鼠心脏,加质量分数为 0.125%的胰蛋白酶,37 °C 消化,重复多次至组织消化完全。滤网过滤细胞悬液,1 000 r/min 离心 5 min,0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)洗细胞沉积 1 次,用含体积分数为 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM-F₁₂ 培养基重悬细胞,采用差速贴壁法和 5 溴-2 脱氧尿苷(BrdU)化学抑制法纯化心肌细胞,然后接种于 6 孔板和 96 孔板。实验分为缺氧复合烧伤血清组、常氧复合正常大鼠血清组(对照组)、PD98059(25 μmol/L)抑制组和 SB203580(10 μmol/L)抑制组。缺氧条件采用体积分数为 1%的 O₂、5%CO₂ 和 94%N₂;烧伤血清取自 40%总体表面积Ⅲ度烫伤大鼠伤后 6 h 腹主动脉血。

1.3 用免疫印迹化学发光法检测磷酸化 p38 激酶、ERK 和 JNK。

1.3.1 组织蛋白提取:培养心肌细胞的 6 孔板中每孔加入 100 μl 预冷放射性免疫沉淀(RIPA)缓冲液:50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液,含 150 mmol/L NaCl、体积分数为 1%的 NP-40 和质量分数为 1%的脱氧胆酸钠、0.1%的十二烷基硫酸钠(SDS)、10 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)、2.5 mmol/L 乙二醇双乙胺醚-N,N-四乙酸(EGTA)、1 mmol/L 钒酸钠、蛋白酶抑制剂[20 μg/ml Aprotinin、Pepstatin、Leupeptin,1 mmol/L 苯甲酰胺、苯甲基磺酰氟(PMSF)和 100 μg/ml N-对甲苯磺酰苯丙氨酸甲酯(TPCK)],磷酸酶抑制剂(50 mmol/L NaF,20 mmol/L 磷酸对硝基苯酚,30 mmol/L β-磷酸甘油)。吸管反复吹打数次,彻底溶解细胞,溶解液经 15 000 r/min 离心 15 min(4 °C),上清于 -70 °C 下保存。Bradford 法测定蛋白浓度。

1.3.2 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳、免疫印迹检测:各时间点取 10 μg 细胞蛋白行 SDS-PAGE 凝胶电泳,完毕后将蛋白转移至硝酸纤维素滤膜,将滤膜分别与一抗、二抗、化学发

光底物孵育,最后滤膜于暗室中用感光胶片感光、冲洗,按试剂盒说明书操作。

1.4 细胞活性的测定:采用四唑盐比色(MTT)法。

1.5 培养上清 LDH 含量的测定:按试剂盒说明书操作。

1.6 统计学处理:结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用四星图像分析软件扫描蛋白条带吸光度值(A 值),采用 SPSS10.0 统计学软件行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 缺氧复合烧伤血清对 MAPKs 途径的活化(图 1~4):对照组心肌细胞 p38 激酶几乎不活化,缺氧复合烧伤血清作用 0.5 h,心肌细胞 p38 激酶磷酸化程度显著增强,1 h 和 6 h 形成两次高峰,12 h 仍相当明显。对照组心肌细胞 ERK 磷酸化程度低,缺氧复合烧伤血清作用后,心肌细胞 ERK1、ERK2 磷酸化程度逐渐增强,分别于作用后 12 h 和 3 h 达高峰,其中 ERK1 强于 ERK2。实验中未见 JNK 明显活化。



图 1 缺氧复合烧伤血清对心肌细胞 p38 激酶磷酸化水平的影响

Figure 1 Effect of hypoxia and burn serum on protein expression of phosphorylated p38 kinases

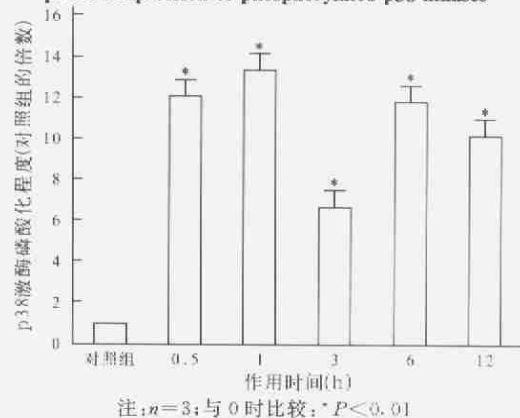


图 2 缺氧复合烧伤血清对心肌细胞 p38 激酶活化的影响

Figure 2 Effect of hypoxia and burn serum on activation of p38 kinase in cardiomyocytes

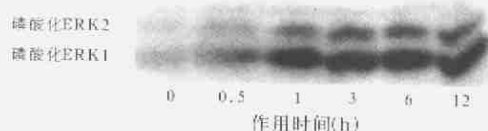
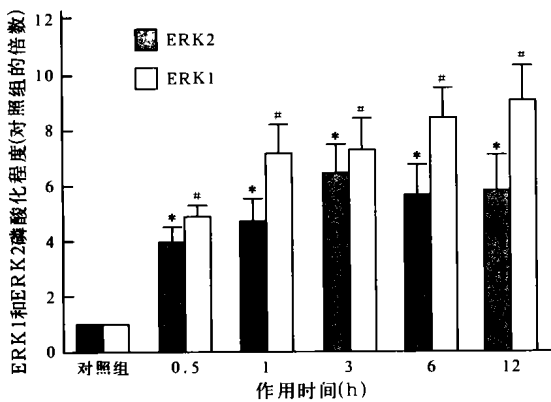


图 3 缺氧复合烧伤血清对心肌细胞 ERK1 和 ERK2 激酶磷酸化水平的影响

Figure 3 Effect of hypoxia and burn serum on protein expression of phosphorylated ERK1 and ERK2 kinases

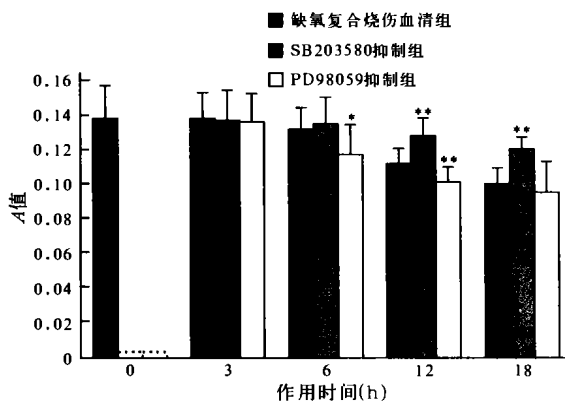


注: n=3; 与 ERK2 0 时比较: * P<0.01;
与 ERK1 0 时比较: # P<0.01

图 4 缺氧复合烧伤血清对心肌细胞 ERK1 和 ERK2 激酶活化的影响

Figure 4 Effect of hypoxia and burn serum on activation of ERK1 and ERK2 kinases in cardiomyocytes

2.2 培养心肌细胞活性变化(图 5): SB203580 为 p38 激酶特异抑制剂, PD98059 为 ERK 特异抑制剂, 二者在实验中所用浓度范围内无交叉抑制作用。缺氧复合烧伤血清作用心肌细胞 12 h 后, SB203580 抑制组心肌细胞活性显著高于缺氧复合烧伤血清组; PD98059 抑制组心肌细胞活性在缺氧复合烧伤血清作用细胞 6 h 和 12 h 两个时间点显著低于缺氧复合烧伤血清组。

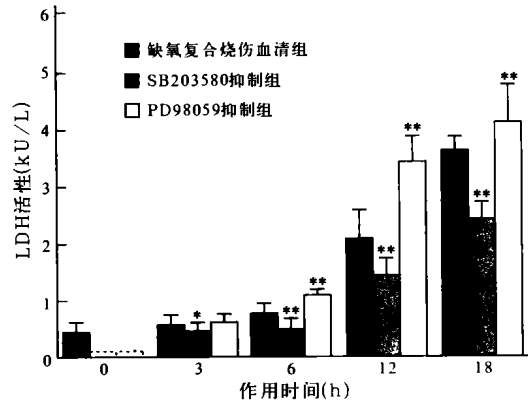


注: n=5; 与同时间点缺氧复合烧伤血清组比较:
* P<0.05, ** P<0.01

图 5 抑制 p38 激酶和 ERK 对心肌细胞活性的影响

Figure 5 Effects of inhibition of p38 kinase and ERK on activity of cardiomyocytes treated with hypoxia and burn serum

2.3 心肌细胞培养液 LDH 含量的变化(图 6): 缺氧复合烧伤血清加入心肌细胞后的培养液中, LDH 含量明显增多, 其中 SB203580 抑制组各时间点培养液中 LDH 含量均显著低于缺氧复合烧伤血清组, 而 PD98059 抑制组培养液中 LDH 含量经缺氧复合烧伤血清作用 6 h 后显著高于缺氧复合烧伤血清组。



注: n=5; 与同时间点缺氧复合烧伤血清组比较:
* P<0.05, ** P<0.01

图 6 抑制 p38 激酶和 ERK 对心肌细胞培养液 LDH 活性的影响

Figure 6 Effects of inhibition of p38 kinase and ERK on contents of LDH in culture medium of cardiomyocytes treated with hypoxia and burn serum

3 讨论

我们先前的大量研究表明, 严重烧伤早期存在器质性心肌损害和心功能不全, 此现象称为烧伤后“休克心”。“休克心”不仅加大烧伤早期复苏的难度, 还诱发或加重休克, 导致其他脏器缺血、缺氧性损害⁽¹⁾。业已证明, 缺氧和炎症因子等是导致烧伤早期“休克心”的两大主要因素, 如何减轻、遏止其介导的损伤效应是防治“休克心”的关键。MAPKs 信号途径包括 ERK、p38 激酶和 JNK 3 个成员, 是多种细胞外信号引起核反应的细胞内汇聚通路, 广泛参与细胞生长、分化、死亡等多种生理、病理过程⁽⁵⁻⁷⁾。我们前期动物实验发现, 烧伤可迅速激活伤后 1 h 心肌细胞 ERK 和 p38 激酶信号途径, 并在观察的 24 h 内呈持续高活化状态, 但对其作用尚不清楚⁽²⁾。

本研究以缺氧复合烧伤血清模拟烧伤早期心肌损害的体内主要致病因素, 建立烧伤后心肌损害培养细胞模型, 采用烧伤血清模拟炎症刺激因素是基于烧伤后血液中含有大量炎症细胞因子和用血清更接近体内心肌细胞所处环境这两点考虑⁽⁸⁻¹⁰⁾。结果发现, 缺氧和烧伤血清双因素能显著激活 ERK 和 p38 激酶途径, 而 JNK 活化不明显, 这与在体实验结果一致⁽²⁾。

MTT 法是检测细胞活性的理想方法, 培养上清中 LDH 含量的变化则反映普遍意义上的细胞损伤情况。采用这两种方法, 我们进一步观察了 ERK、p38 激酶活化与实验条件下心肌细胞损伤的关系。结果发现, 抑制 p38 激酶活化能显著减轻缺氧复合烧伤血清所致心肌细胞损伤, 表现为 LDH 含量在双因素作用 3 h 后显著低于缺氧复合烧伤血清组,

细胞活性在双因素作用 12 h 后显著高于缺氧复合烧伤血清组;而抑制 ERK 途径使心肌细胞损伤在一定程度上有所加重,表现为缺氧复合烧伤血清组在双因素作用后 6~12 h 较 PD98059 抑制组细胞活性显著下降,而细胞培养液中 LDH 含量则明显增多。表明在本实验条件下,p38 激酶途径是介导细胞损伤的主要信号转导途径之一,而 ERK 途径则介导了一定的抗损伤效应。目前认为,细胞在受到外界应激刺激时,往往存在应激损伤和应激保护两个方面,而应激损伤和应激保护力量大小对比取决于应激刺激的强弱和持续时间,最终又决定了细胞的生存或死亡^[11]。本研究中,缺氧复合烧伤血清一方面使介导细胞损伤的 p38 激酶途径激活,另一方面也激活具有促细胞生存作用的 ERK 途径,启动细胞自身内源性保护机制,使心肌细胞免受损害。我们认为,p38 激酶/ERK 途径作用强弱对比可能是决定本实验中心肌细胞损伤的重要因素,这为临床防治烧伤早期心肌损害提供了新思路和干预切入点。

参考文献:

- 1 黄跃生. 重视缺血缺氧与细胞因子在“休克心”发生机制中的作用[J]. 中华烧伤杂志,2002,18:261-262.
- 2 张家平,黄跃生,刘敬,等. 严重烧伤后心肌细胞丝裂素活化蛋白激酶

- 的活化及胞内分布研究[J]. 中华烧伤杂志,2003,19:137-140.
- 3 斯佩克特 D L,戈德曼 R D,莱因万德 L A. 细胞实验指南(上册)[M]. 北京:科学出版社,2001. 79-82.
 - 4 孙红. 体外培养心肌细胞的纯化方法及其应用[J]. 细胞生物学杂志,1988,10:85-87.
 - 5 Bogoyevitch M A. Signalling via stress-activated protein kinases in the cardiovascular system[J]. Cardiovasc Res, 2000,45:826-842.
 - 6 王振辉,常晓彤,付小兵,等. 不同发育阶段大鼠小肠上皮细胞 c-Jun, p38 基因表达的特征及其与肠损伤修复的关系[J]. 中国危重病急救医学,2003,15:77-80.
 - 7 杨银辉,付小兵,孙同柱,等. 碱性成纤维细胞生长因子对缺血-再灌注损伤后肠道细胞信号转导途径的影响[J]. 中国危重病急救医学,2002,14:407-410.
 - 8 Vanni H E, Gordon B R, Levine D M, et al. Cholesterol and interleukin-6 concentrations relate to outcomes in burn-injured patients[J]. J Burn Care Rehabil, 2003,24:133-141.
 - 9 廖建坤,廖红梅,罗学宏. 核转录因子- κ B 在烧伤早期的活性变化及意义[J]. 中国危重病急救医学,2003,15:220-221.
 - 10 Holzheimer R G, Curley P, Saporoschetz I B, et al. Circadian rhythm of cytokine secretion following thermal injury in mice: implications for burn and trauma research[J]. Shock, 2002,17:527-529.
 - 11 冯刚,周元国. 应激反应的细胞损伤和抗损伤机制及其调控[J]. 创伤外科杂志,1999,1:51-53.

(收稿日期:2004-11-17)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

烧伤后免疫炎症反应受遗传因素的影响

热损伤能导致免疫功能障碍和生理参数的改变。已有研究发现,遗传能影响创伤或脓毒症的预后,然而遗传对烧伤后免疫炎症反应的影响研究甚少。最近美国研究人员对此进行了研究。他们选用 3 种不同遗传种系的小鼠(C57BL/6NCrIBR、BALB/cNCrIBR 和 129S6/SvEvTac)进行实验,设烧伤组 and 对照组。3 d 后分离血和脾的免疫细胞(巨噬细胞和脾细胞)进行研究。结果显示:烧伤组中 C57BL/6NCrIBR 小鼠的脾 T 细胞增殖受到抑制且向 Th2 细胞转化增加(γ -干扰素生成减少),另两种小鼠的脾 T 细胞增殖无明显改变;C57BL/6NCrIBR 和 129S6/SvEvTac 小鼠的巨噬细胞呈高炎症反应,表现为肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和氧化氮释放量增加,而 BALB/cNCrIBR 小鼠却未观察到上述改变;C57BL/6NCrIBR 小鼠巨噬细胞产生的白细胞介素-10(IL-10)升高,而 BALB/cNCrIBR 小鼠产生的 IL-10 却下降;热损伤后不同种系小鼠空腹血糖和胰岛素改变差异无显著性;BALB/cNCrIBR、129S6/SvEvTac 小鼠烧伤后体重明显降低,而 C57BL/6NCrIBR 小鼠体重仅轻微下降。研究者认为:烧伤后免疫炎症反应受遗传因素影响,这方面的进一步研究有助于改良现有的烧伤治疗方法及开发出新的治疗手段。

任清华,编译自《Shock》,2005,23:123-128;胡森,审校

还原型辅酶 II 氧化酶抑制因子减轻失血性休克引起的器官损伤

活性氧化合物是诱发失血性休克时多器官功能障碍综合征(MODS)的因素之一。最近法国科学家研究了两种不同化学结构的还原型辅酶 II 氧化酶的抑制因子与失血性休克时循环衰竭和器官损害的关系。研究者通过放血将大鼠平均动脉压降低至 45 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)且持续 90 min,然后回输失血,复苏 4 h 可延迟血压下降、减轻肾功能障碍及肝损伤。以 1 mg/kg DPI(一种还原型辅酶 II 氧化酶的抑制因子)静脉注入以治疗失血性休克大鼠能减轻肾功能障碍及肝损伤;而加拿大麻素(3 mg/kg,腹腔注射)只能减轻肝损伤,对肾功能障碍则无疗效。组织病理学检查证实 DPI 和加拿大麻素都能减轻肺、肠的损伤;且在肝脏两者都可消除超氧阴离子的形成,却不能显著延迟缺血-再灌注时的循环衰竭以及减少一氧化氮的生成。此外,DPI 能抑制肝转录因子激活剂蛋白-1 的活化。研究者认为:还原型辅酶 II 氧化酶通过促进超氧阴离子的生成引起失血性休克时的肝损伤,因此还原型辅酶 II 氧化酶抑制因子可用于失血性休克的辅助治疗。

任清华,编译自《Shock》,2005,23:107-114;胡森,审校