

· 论著 ·

P 物质对体外培养大鼠心肌细胞 β_1 -肾上腺素能受体表达下调作用的研究

马艳霞 郭政

【摘要】 目的 观察 P 物质(SP)对体外培养新生大鼠心肌细胞 β_1 -肾上腺素能受体(β_1 -AR)表达的影响。方法 选择出生 1~3 d 的 SD 大鼠,分离、培养心肌细胞,将细胞培养至 72 h 待用。用 6 孔培养板将细胞随机分为对照组与 10^{-7} mol/L SP 组,每组 3 孔;采用免疫细胞化学技术测定心肌细胞中 β_1 -AR 的表达。另取 15 孔培养板将细胞随机分为对照组(不加药物干预)与 SP 组(分别给予 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L SP 干预),每组 3 孔;采用流式细胞术测定心肌细胞膜表面 β_1 -AR 的表达。结果 免疫细胞化学结果显示,SP 组心肌细胞 β_1 -AR 阳性单位和平均吸光度(A)值均低于对照组(阳性单位: 179.61 ± 48.18 比 205.79 ± 117.42 , A 值: 128.26 ± 22.72 比 157.35 ± 33.11 , P 均 < 0.05)。流式细胞术结果显示,不同浓度 SP 组 β_1 -AR 表达均低于对照组,除 10^{-9} mol/L SP 组(158.87 ± 3.12)外, 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L SP 组与对照组比较差异有统计学意义(151.85 ± 4.63 , 135.00 ± 6.84 , 121.41 ± 5.22 比 161.35 ± 3.09 , P 均 < 0.05),且呈剂量依赖性。结论 SP 可以抑制体外培养大鼠心肌细胞 β_1 -R 的表达。

【关键词】 P 物质; 心肌细胞; β_1 -肾上腺素能受体

Effect of substance P on expression of β_1 -adrenergic receptor in cultured rat cardiomyocytes MA Yan-xia, GUO Zheng. Department of Anesthesiology, Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China

Corresponding author: GUO Zheng (Email: guozheng713@yahoo.com)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of substance P (SP) on expression of β_1 -adrenergic receptor (β_1 -AR) in cultured neonatal rat cardiomyocytes. **Methods** Cardiomyocytes were obtained from 1-3 days old Sprague-Dawley (SD) rats and cultured for 72 hours. Six wells of the cultured cells were divided into two groups ($n=3$ in each group): control group and SP group (incubated with 10^{-7} mol/L of SP). Immunocytochemistry was used to detect the expression of β_1 -AR in cultured rat cardiomyocytes. Fifteen wells of the cultured cells were divided into five groups ($n=3$ in each group): control group and four SP groups (incubated with 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L of SP respectively). Quantitative analysis of the expression of β_1 -AR in cultured neonatal rat cardiomyocytes of all the groups was performed using flow cytometry. **Results** The results of immunocytochemistry showed that the expression of β_1 -AR in cardiomyocytes in SP group was lower than that in control group (positive unit: 179.16 ± 48.18 vs. 205.79 ± 117.42 , average light density: 128.26 ± 22.72 vs. 157.35 ± 33.11 , both $P < 0.05$). The results of flow cytometry showed that significantly lower levels of expression of β_1 -AR were observed in the groups treated with SP in the concentrations ranging from 10^{-8} mol/L to 10^{-6} mol/L (151.85 ± 4.63 , 135.00 ± 6.84 , 121.41 ± 5.22 vs. 161.35 ± 3.09 , all $P < 0.05$). **Conclusion** SP could down-regulate the expression of β_1 -AR in cultured rat cardiomyocytes in vitro.

【Key words】 substance P; cardiomyocyte; β_1 -adrenergic receptor

急性心肌缺血损伤作为一种伤害刺激,可引起全身交感-肾上腺素能活性增强,致使心肌细胞外液中去甲肾上腺素(NE)浓度明显增高^[1-2]。在本实验室前期研究中观察到,在体情况下心肌缺血区与非缺血区内有 NE 与 P 物质(SP)表达水平的同时增

高^[3]。心肌细胞中的 NE 受体主要为 β_1 -肾上腺素能受体(β_1 -AR)和 β_2 -AR,而人类心脏中以 β_1 -AR 占优势^[4],那么这两种神经递质的共存是否成为相互作用的基础,SP 是否可能影响心肌细胞中 β_1 -AR 的表达,是值得探讨的问题。本研究中采用体外培养新生大鼠心肌细胞作为研究对象,选取 β_1 -AR 作为研究指标,观察 SP 作用下心肌细胞 β_1 -AR 的表达变化。

1 材料与方法

1.1 心肌细胞培养: 出生 1~3 d 的 SD 大鼠,雌雄不拘,由山西医科大学实验动物中心提供。无菌条件

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471656,30772083)

作者单位:030001 山西太原,山西医科大学麻醉学系,山西医科大学第二医院麻醉科

通信作者:郭政,医学博士,教授,主要从事伤害性刺激信号转导与器官损伤的研究,Email: guozheng713@yahoo.com

作者简介:马艳霞(1980-),女(汉族),山西省人,硕士研究生,编辑,Email: myxia1980@yahoo.com.cn.

下取大鼠心室肌剪成约 1 mm×1 mm×1 mm 大小的组织块,用胶原酶 I 溶液反复消化,离心并收集细胞悬液。用差速贴壁分离法(贴壁 70 min)去除贴壁的非心肌细胞,按一定密度(用于免疫细胞化学检测时接种密度约为 $2 \times 10^8/L$,用于流式细胞术检测时约为 $5 \times 10^8/L$)接种于 6 孔培养板,在 37 °C 下 CO₂ 培养箱中培养,24 h 更换 1 次培养基[含体积分数为 10%胎牛血清的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)]。在培养的最初 24 h,于培养基中加入 0.1 mol/L 的 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-BrdU)抑制非心肌细胞的生长,24 h 后换为不含 5-BrdU 的 DMEM 培养 72 h,细胞呈亚融合状态时待用。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 免疫细胞化学染色法测定 β_1 -AR 的表达:取 6 孔板培养 72 h,呈亚融合状态且自主搏动良好的心肌细胞,按随机数字表法分为对照组与 SP 组,每组 3 孔。对照组不加任何干预药物;SP 组给予 1×10^{-7} mol/L 的 SP 作用 3 h。采用免疫细胞化学技术链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶(SABC)法测定心肌细胞 β_1 -AR 表达,主要步骤:用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗长有心肌细胞的玻片 5 min×3 次;体积分数为 4%的多聚甲醛水溶液固定 20 min, PBS 冲洗 5 min×3 次;滴加 50 μ l 非免疫动物羊血清(BSA)封闭非特异背景,常温 30 min;甩去多余 BSA,滴加 50 μ l 一抗(兔抗大鼠 β_1 -AR 多克隆抗体),4 °C 过夜;室温放置 1 h, PBS 冲洗 3 min×3 次;加生物素化羊抗兔 IgG,室温放置 2 h, PBS 冲洗 3 min×3 次;加 SABC,室温放置 20 min, PBS 冲洗 5 min×4 次;3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,水溶性封片剂封片,光镜下观察并照相。另外取 3 孔以 PBS 代替一抗作为阴性对照。每张图片随机选取 10 个视野,分析其平均吸光度(A)值和阳性单位,用来表示 β_1 -AR 的表达水平。

1.2.2 流式细胞术测定 β_1 -AR 的表达:取 15 孔板培养 72 h,呈亚融合状态且自主搏动良好的心肌细胞,按随机数字表法分为对照组及 SP 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L 组,每组 3 孔。除对照组外,其余各组均在同一时间点加入不同浓度的 SP。加入 SP 后 3 h 停止药物作用,将处理过的贴壁培养心肌细胞用胰蛋白酶消化,制成单细胞悬液,在光学显微镜下用白细胞计数板计数,调整细胞数量为 $1 \times 10^9/L$ 。先采用兔抗大鼠 β_1 -AR 多克隆抗体在常温下孵育 30 min;加入 PBS,离心 4 min,再用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗兔 IgG 进行荧光标记,4 °C 避

光孵育 30 min;加入 PBS,离心 4 min,采用流式细胞仪检测。用 FITC-IgG 作为阴性对照。检测结果为细胞膜表面 β_1 -AR 的平均表达水平,用平均荧光强度表示,数值越高,表明细胞膜表面 β_1 -AR 的表达量越多。

1.3 统计学分析:采用 SPSS 13.0 统计软件包,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫细胞化学染色结果(彩色插页图 1~2;表 1):对照组与 SP 组心肌细胞的胞质和胞核内棕黄色颗粒即为 β_1 -AR 免疫细胞化学染色阳性物质。与对照组比较,SP 组 β_1 -AR 的阳性单位和 A 值均降低(P 均 < 0.05)。以 PBS 代替一抗的阴性对照组结果为阴性。

表 1 免疫细胞化学检测两组大鼠心肌细胞 β_1 -AR 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	β_1 -AR 表达阳性单位	β_1 -AR 表达 A 值
对照组	3	205.79±117.42	157.35±33.11
SP 组	3	179.61±48.18*	128.26±22.72*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

2.2 不同浓度 SP 对外培养大鼠心肌细胞 β_1 -AR 表达的影响(表 2):不同浓度 SP 组 β_1 -AR 表达均较对照组降低,除 SP 10^{-9} mol/L 组外,其余浓度组与对照组比较差异均有统计学意义(P 均 < 0.05);在一定范围内,随着 SP 浓度的增高, β_1 -AR 表达逐渐降低,显示出剂量依赖性。

表 2 流式细胞术检测不同浓度 SP 对大鼠心肌细胞 β_1 -AR 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	β_1 -AR 表达	组别	孔数	β_1 -AR 表达
对照组	3	161.35±3.09	SP 10^{-7} mol/L 组	3	135.00±6.84*
SP 10^{-9} mol/L 组	3	158.87±3.12	SP 10^{-6} mol/L 组	3	121.41±5.22*
SP 10^{-8} mol/L 组	3	151.85±4.63*			

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

3 讨论

SP 是由 11 个氨基酸组成的直链多肽,相对分子质量为 1 340,是速激肽家族中的一员,在中枢神经系统、外周神经系统及外周组织器官中均能检测出 SP 的存在^[5]。SP 具有多种生物学作用,如可作为神经源性炎症介质、免疫调节肽、神经递质或调质。近年研究证实,SP 可与神经激肽 A 受体(NK-1R)结合,通过 Akt 途径起到抗凋亡作用^[6]。常加松等^[7]

通过给兔脑室注射 SP 及其拮抗剂,并电针内关穴,发现中枢 SP 在电针内关促进急性心肌缺血损伤恢复过程中起重要作用。本实验室前期的研究观察到,在体情况下心肌内 NE 与 SP 表达水平同时增高^[3],这两种神经递质共存是否成为相互作用的基础,相互作用的结果如何,SP 是否可能影响心肌细胞中 β_1 -AR 的表达,目前相关知识甚少。SP 对心肌细胞 β_1 -AR 的作用尚未见报道,我们假设上调的 SP 可能在心肌缺血损伤/抗损伤中发挥某种作用,也可能与肾上腺素能机制之间存在某种相互作用。人类心脏中的 NE 受体以 β_1 -AR 占优势,因此我们从 SP 对 β_1 -AR 的影响方面观察 SP 是否对 β_1 -AR 表达具有调制作用。本实验中观察到,同一时间点不同浓度 SP 均对心肌细胞 β_1 -AR 表达产生影响。免疫细胞化学染色结果显示, 10^{-7} mol/L SP 组 β_1 -AR 的阳性单位和 A 值均低于对照组,说明 10^{-7} mol/L SP 可能抑制 β_1 -AR 的表达。流式细胞术定量分析结果也显示,不同浓度 SP 均可抑制 β_1 -AR 的表达,且该作用呈剂量依赖性,SP 浓度越高, β_1 -AR 表达越低。

正常心肌组织中 β_1 -AR 被激活后可产生正性变时、正性变力作用;NE 与 β_1 -AR 途径激活后还可以产生致凋亡作用^[8-10]。急性心肌缺血患者缺血心肌组织中 NE 明显升高^[1-2];NE 的异常升高可以对心脏产生毒性作用,对心肌代谢和心肌梗死病理过程产生影响,并导致心律失常的发生^[11]。但是伴随 NE 升高的同时 SP 也升高^[3]。刘晓春等^[10]报道切断大鼠脊髓背根神经刺激其外周端,可使体感一级传入神经的外周端释放 SP,而 SP 对 NE 的释放有调制作用。这些信息提示我们 SP 作为一种神经调制物质,可能通过某种途径与 NE 之间发生调节作用。我们观察到 SP 可以对心肌细胞 β_1 -AR 产生下调作用,由此推测 β_1 -AR 下调后可以调制 β_1 -AR 途径的激活及其引起的生物学效应,使心肌组织免受异常增高的 NE 的毒性作用。Tan 等^[12]研究表明, β -AR

脱敏可能对心肌细胞起保护作用。因此推测 SP 可能对心肌组织产生保护作用,但 SP 具体通过什么途径作用于 β_1 -AR,其作用机制还有待于进一步研究。另外,NE 与 β_1 -AR 途径激活后在心肌组织中还可以产生致凋亡作用^[7-8,13],而 SP 有抗凋亡作用^[6],那么 SP 导致的 β_1 -AR 下调是否在心肌细胞的抗凋亡作用中发挥作用,也还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 王兴祥. 心肌缺血时的交感-肾上腺素能活性[J]. 国外医学内科学分册, 2000, 27(12): 522-528.
- [2] Schömig A. Catecholamines in myocardial ischemia: systemic and cardiac release[J]. Circulation, 1990, 82(3 Suppl): I 13-22.
- [3] 张建文, 郭政. 结扎大鼠冠状动脉诱发心肌及背根神经节内 P 物质变化的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(4): 201-205.
- [4] Brodde OE, Michel MC. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart[J]. Pharmacol Rev, 1999, 51(4): 651-690.
- [5] Mantyh PW. Neurobiology of substance P and the NK1 receptor[J]. J Clin Psychiatry, 2002, 63 (Suppl 11): 6-10.
- [6] Koon HW, Zhao D, Zhan Y, et al. Substance P mediates anti-apoptotic responses in human colonocytes by Akt activation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(6): 2013-2018.
- [7] 常加松, 戴启刚, 徐德国. 中枢 P 物质在内关和心脏相关联系中的作用研究[J]. 山西中医, 2006, 22(4): 56-58.
- [8] Communal C, Singh K, Sawyer DB, et al. Opposing effects of β_1 - and β_2 -adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis: role of a pertussis toxin-sensitive G protein[J]. Circulation, 1999, 100(22): 2210-2212.
- [9] Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function[J]. Nature, 2002, 415 (6868): 206-212.
- [10] 刘晓春, 施静, 李玲俐, 等. 刺激大鼠离断背根神经对所支配皮区浸泡液内 P 物质、去甲肾上腺素及肾上腺素含量的影响[J]. 同济医科大学学报, 1997, 26(1): 4-6.
- [11] 霍士照. 交感-肾上腺素能系统对冠状动脉粥样硬化性心脏病的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2002, 9(6): 368-370.
- [12] Tan LB, Benjamin IJ, Clark WA. Beta adrenergic receptor desensitisation may serve a cardioprotective role [J]. Cardiovasc Res, 1992, 26(6): 608-614.
- [13] 贺忠梅, 刘慧荣. β 肾上腺素能受体与心肌细胞凋亡[J]. 心血管病学进展, 2005, 26(增刊): 57-61.

(收稿日期: 2008-03-19 修回日期: 2008-10-29)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

脓毒症中内毒素耐受性研究

已有研究表明,脂多糖(LPS)预处理巨噬细胞会发生 LPS 耐受, LPS 耐受表现为抑制肿瘤坏死因子(TNF)释放、细胞外信号调节激酶减少和 p38 激酶活性降低。然而, LPS 预处理的浓度($10 \mu\text{g/L}$)可能远远超过实际患者的 LPS 浓度,因此,最近美国学者研究了不同浓度 LPS 预处理后的巨噬细胞对 LPS 的反应。实验采用巨噬细胞体外培养,用 0.1、10、100 $\mu\text{g/L}$ LPS 预处理 24 h 后再以相同浓度的 LPS 刺激细胞,3 h 时用酶联免疫吸附法(ELISA)检测分泌的 TNF。结果显示:100 $\mu\text{g/L}$ 的 LPS 预处理能明显抑制 TNF 的释放;1 $\mu\text{g/L}$ LPS 预处理能显著增加 TNF 的释放。因此研究者认为,早期 LPS 预处理可能通过改变中性粒细胞的细胞因子表达来对抗后来的 LPS 刺激。这一过程严格依赖于预处理的 LPS 浓度。

李响, 周国勇, 编译自《J Trauma》, 2008, 65(4): 893-898; 胡森, 审校

P物质对体外培养大鼠心肌细胞 β 1-肾上腺素能受体表达下调作用的研究

(正文见710页)

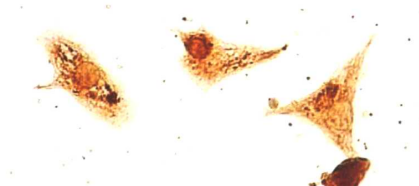


图1 光镜下观察对照组心肌细胞 β 1-AR的表达 (SABC, $\times 400$)

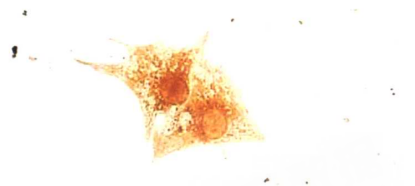
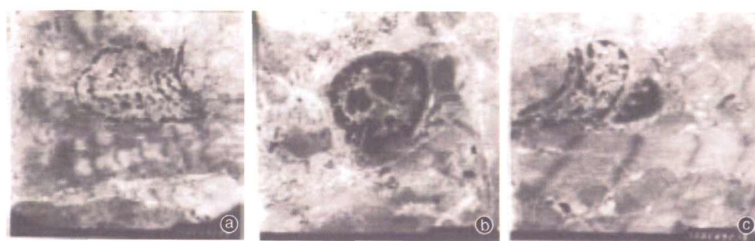


图2 光镜下观察SP组心肌细胞 β 1-AR的表达 (SABC, $\times 400$)

Bcl-2和p53蛋白表达在脓毒症大鼠心肌细胞凋亡中的作用研究

(正文见733页)



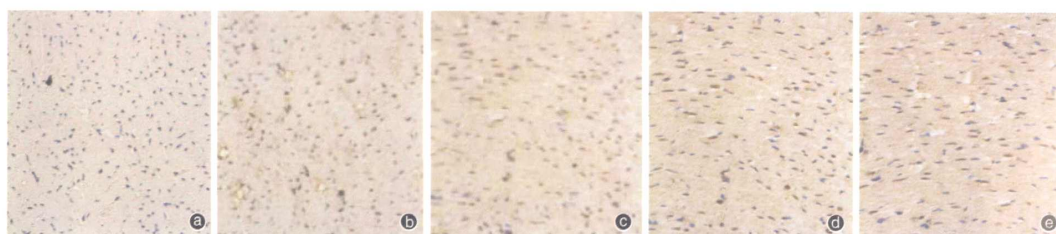
Ⓐ:对照组; Ⓑ:模型9 h组; Ⓒ:模型24 h组

图1 电镜下观察各组大鼠心肌细胞凋亡前后的细胞核(铀-铅双染, $\times 400$)



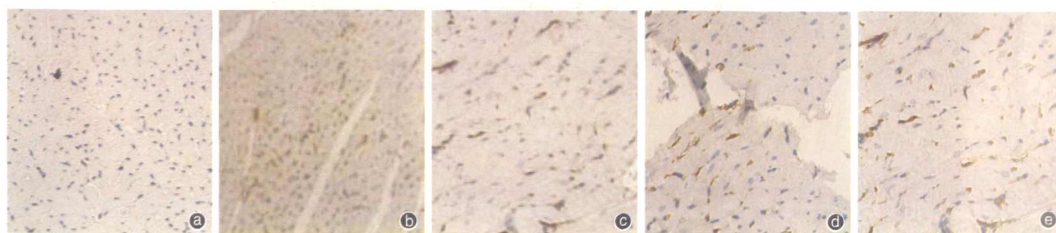
Ⓐ:对照组; Ⓑ:模型3 h组; Ⓒ:模型12 h组

图2 TUNEL检测各组大鼠凋亡心肌细胞 (TUNEL, $\times 400$)



Ⓐ:对照组; Ⓑ:模型3 h组; Ⓒ:模型9 h组; Ⓓ:模型12 h组; Ⓔ:模型24 h组

图3 免疫组化法检测各组大鼠心肌细胞p53蛋白表达 (免疫组化, $\times 400$)



Ⓐ:对照组; Ⓑ:模型3 h组; Ⓒ:模型9 h组; Ⓓ:模型12 h组; Ⓔ:模型24 h组

图4 免疫组化法检测各组大鼠心肌细胞Bcl-2蛋白表达 (免疫组化, $\times 400$)