

• 论著 •

重组腺病毒介导反义 p38α 基因抑制烧伤复合缺氧条件下乳鼠心肌细胞凋亡的研究

范鹏举 沈艳 黄云 郑军 黄晓元 黄跃生

【摘要】 目的 探讨烧伤血清复合缺氧条件下乳鼠心肌细胞 p38 丝裂素活化蛋白激酶(p38MAPK)活化与细胞凋亡之间的关系。方法 采用原代培养的乳鼠心肌细胞,按照处理因素不同分为 3 组:正常对照组细胞自然生长;烧伤缺氧组细胞给予烧伤血清+缺氧刺激(含 10%的 40%总体表面积Ⅱ度烧伤大鼠伤后 6 h 血清的 DMEM/F12 培养液+1%O₂、5%CO₂ 和 94%N₂);反义阻断组在细胞转染反义 p38α 重组腺病毒(AD-ASp38α)后给予烧伤血清+缺氧刺激。细胞培养 6 h 后,采用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 p38 磷酸化水平;采用 DNA 片断和流式细胞术检测心肌细胞凋亡情况。结果 与正常对照组比较,烧伤缺氧组 p38 磷酸化水平(灰度值)明显提高(8.68±0.14 比 3.21±0.05, P<0.01),细胞凋亡率明显增高[(50.367±0.451)%比(2.063±0.111)% , P<0.01];心肌细胞转染 AD-ASp38α 后,p38 磷酸化水平(灰度值)明显下降(5.46±0.16 比 8.68±0.14, P<0.01),细胞凋亡率明显降低[(13.200±0.121)%比(50.367±0.451)% , P<0.01]。结论 烧伤血清复合缺氧条件下通过促使 p38MAPK 活化导致心肌细胞凋亡增多;阻断 p38MAPK 信号转导通路可减轻严重烧伤早期心肌细胞的损伤。

【关键词】 p38 丝裂素活化蛋白激酶; 烧伤; 缺氧; 反义 p38α 重组腺病毒; 心肌细胞; 凋亡

Study on adenovirus mediated antisense p38α fragment gene in suppressing apoptosis of the myocardium of neonatal rat by burn serum and hypoxia FAN Peng-ju*, SHEN Yan, HUANG Yun, ZHENG Jun, HUANG Xiao-yuan, HUANG Yue-sheng. * Department of Burns and Plastic Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan, China

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between the activation of p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) in the myocardium and the apoptosis in the presence of burn serum and hypoxia. **Methods** Ventricular myocardium isolated from neonatal rats were employed in this study, and they were divided into three groups as the normal control group, with the myocardium grew naturally; burn serum+hypoxia group, in which the myocardium was stimulated by the serum collected from the rat 6 hours after burn injury involving 40% of total body surface area (TBSA), and at the same time exposed to 1%O₂, 5% CO₂, and 94%N₂; antisense blocking group, in which rats were pretreated by AD-antisense (AS) p38α, then exposed to the same conditions as burn serum+hypoxia group. The phosphorylation of p38 in the myocardium was determined by Western blotting. The level of myocardium apoptosis was determined by DNA ladder and flow cytometry. **Results** Compared with normal control group, the level of phosphorylation of p38 (gray value) was markedly increased (8.68±0.14 vs. 3.21±0.05, P<0.01) after being exposed to burn serum and hypoxia, and at the same time myocardium apoptosis was strikingly increased [(50.367±0.451)% vs. (2.063±0.111)% , P<0.01]. When the myocardium was transfected by AD-ASp38α, the phosphorylation of p38 (gray level) was decreased remarkably (5.46±0.16 vs. 8.68±0.14, P<0.01), the rate of the apoptosis was lowered remarkably [(13.200±0.121)% vs. (50.367±0.451)% , P<0.01]. **Conclusion** Burn serum combined with hypoxia can induce apoptosis of the myocardium by activating p38MAPK; blockage of p38MAPK signal transduction pathway may lessen the damage of the myocardium in early period of severe burn.

【Key words】 p38 mitogen-activated protein kinase; Burn; Hypoxia; Adenovirus mediated antisense p38α; Myocardium; Apoptosis

p38 丝裂素活化蛋白激酶(p38MAPK)是 MAPK 家族成员之一,是一组细胞内信号转导分子,在炎

症、细胞生长、细胞分化、细胞周期及细胞死亡等过程中发挥重要的调控作用。严重烧伤后常发生缺血、缺氧,同时各种炎症因子的表达可导致心肌细胞损伤、坏死及功能下降^[1]。本研究中通过体外构建严重烧伤后心肌细胞损伤模型,探讨 p38MAPK 在严重烧伤早期心肌细胞凋亡中的作用,并初步探讨采用基因治疗严重烧伤早期心肌细胞损伤的可行性。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.11.007

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(G1999054202)

作者单位:410008 湖南长沙,中南大学湘雅医院烧伤整形科(范鹏举、黄晓元);南华大学附属第一医院烧伤科(郑军);第三军医大学西南医院烧伤研究所,创伤、烧伤、复合伤国家重点实验室(黄跃生)

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂: 1~3 日龄的 SD 大鼠, 由本校实验动物中心提供, 动物合格证号 SDXK(湘)2006-0002。DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司), 磷酸化 p38(p-p38)抗体、山羊抗兔辣根过氧化物酶标记的 IgG(IgG-HRP, 美国 Cell Signaling technology 公司); BCA-200 蛋白定量试剂盒(美国 Pierce 公司); 碘化丙啶(PI, 美国 Sigma 公司); 动物细胞基因组 DNA 快速提取试剂盒(北京鼎国生物技术有限责任公司)。

1.2 心肌细胞培养及分组: 参照文献^[2]方法培养心肌细胞 4~5 d 后, 将其分为 3 组, 分别进行干预。正常对照组: 让细胞自然生长 6 h 后检测。烧伤缺氧组: 弃原培养液, 用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 2 次, 改用含 10% 大鼠烧伤血清的 DMEM/F12 培养液, 缺氧培养(烧伤血清为 40% 总体表面积 III 度烫伤大鼠伤后 6 h 的血清, 缺氧条件为 1% O₂、5% CO₂ 和 94% N₂) 6 h 后检测。反义阻断组: 心肌细胞转染反义 p38 重组腺病毒(AD-ASp38α)后给予烧伤血清+缺氧刺激, 培养 6 h 后检测。

1.3 反义 p38α 基因重组体(pAD-ASp38α)构建和转染: p38α 目的基因片段的扩增及载体构建、鉴定参照文献^[3]方法; 用构建好的 AD-ASp38α(滴度为 5×10⁹ pfu/ml)转染心肌细胞 3 h, 弃去转染液, 用 PBS 洗 3 次, 换培养液继续培养 24 h 后给予刺激。

1.4 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 p-p38 水平: 收集细胞, 用冰 PBS 冲洗, 蛋白裂解液裂解细胞, 收集裂解液, 离心取上清液, 二喹啉甲酸法(BCA 法)行蛋白定量。取 20 μg 总蛋白经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离, 转膜, 20 g/L 脱脂奶粉-三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液(TBS)室温封闭; 与一抗过夜, 含 0.05% 吐温 20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液(TBST)洗膜, 每次 5 min, 共 3 次; 加山羊抗兔 IgG-HRP 孵育 1 h, 按上述方法洗膜、化学发光底物孵育、暗室感光, 冲洗。吸光度扫描仪扫描结果, 用 BandScan 5.0 软件进行蛋白条带灰度分析, 数据采用对数值表示。

1.5 流式细胞仪检测凋亡细胞: 收集细胞, 调整细胞数为 1×10⁶/ml, 经 PBS 离心冲洗 2 次, 75% 乙醇固定过夜; PBS 离心冲去乙醇, 加入 RNA 水解酶(终浓度 60 μg/L), 37 °C 置于 4 °C 温浴 30 min, 加入 PI(终浓度为 50 μg/ml), 4 °C 暗染 30 min, 用流式细胞仪检测凋亡细胞百分率。

1.6 DNA 片断检测细胞凋亡: 收集细胞, 加 150 μl 1% 乙基苯基聚乙二醇裂解液反应 10 s, 离心收集上清液, 加入 SDS 至 1%, 并用 RNA 酶(终浓度 50 μg/L)56 °C 作用 1~2 h, 然后加入蛋白 K 至终浓度 100 μg/L, 处理 2 h, 乙醇沉淀 DNA, 用 10~20 μl TE 溶解 DNA, 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察电泳条带, 用 TanonGIS 凝胶图像处理系统扫描。

1.7 统计学处理: 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS 11.0 软件进行 t 检验或方差分析, P<0.05 为差异有统计学意义。

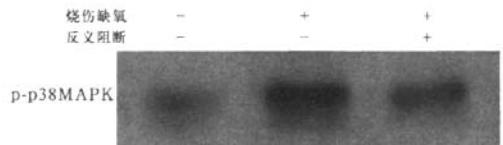
2 结果

2.1 各组心肌细胞 p-p38MAPK 的表达(表 1; 图 1): Western blotting 结果显示, 给予烧伤血清+缺氧刺激 6 h 后, p-p38MAPK 水平较正常对照组明显提高(P<0.01); AD-ASp38α 转染心肌细胞后, 再给予同样刺激, p-p38MAPK 水平较烧伤缺氧组显著下降(P<0.01)。

表 1 各组原代培养大鼠心肌细胞 p-p38MAPK 表达及心肌细胞凋亡率的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	p-p38MAPK(灰度值)	细胞凋亡率(%)
正常对照组	3	3.21±0.05	2.063±0.111
烧伤缺氧组	3	8.68±0.14 ^a	50.367±0.451 ^a
反义阻断组	3	5.46±0.16 ^{ab}	13.200±0.121 ^{ab}

注: p-p38MAPK, 磷酸化 p38 丝裂素活化蛋白激酶; 与正常对照组比较, ^aP<0.01, 与烧伤缺氧组比较, ^bP<0.01



p-p38MAPK: 磷酸化 p38 丝裂素活化蛋白激酶

图 1 蛋白质免疫印迹法检测各组原代培养大鼠心肌细胞 p-p38MAPK 表达水平

2.2 各组细胞凋亡率(表 1; 图 2): 与正常对照组比较, 烧伤缺氧组、反义阻断组细胞凋亡率均明显增高(均 P<0.01); 反义阻断组细胞凋亡率较烧伤缺氧组明显降低(P<0.01)。

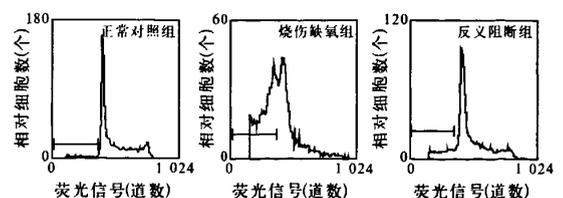


图 2 流式细胞术检测各组原代培养大鼠心肌细胞凋亡情况

2.3 DNA 凝胶电泳结果(图 3):烧伤缺氧组、反义阻断组均出现 DNA 梯状带,其中以烧伤缺氧组最明显,而正常对照组无梯状带.说明烧伤缺氧组细胞凋亡最多,反义阻断组较烧伤缺氧组细胞凋亡减少.

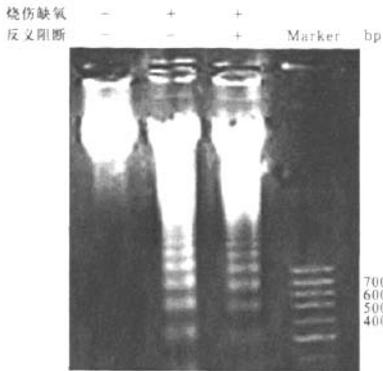


图 3 DNA 凝胶电泳检测各组原代培养大鼠心肌细胞凋亡情况

3 讨论

即使正常及时补液,心肌在烧伤 12 h 后仍存在缺血、缺氧^[4].采用烧伤血清+缺氧作为刺激因素基本能够模拟严重烧伤后早期心肌细胞所处的内环境;将烧伤血清+缺氧作为一个独立刺激因素看待,对于临床防治严重烧伤后心肌损伤具有直接的提示作用. p38MAPK 属于 MAPK 通路之一,依靠其活化环内 Thr-X-Tyr 序列的苏氨酸、酪氨酸双位点被磷酸化而使激酶活化,磷酸化水平就代表被活化的程度.当 p38MAPK 被磷酸化后就转位于核内,磷酸化相应的转录调节因子,启动基因转录.过度活化的 p38MAPK 能导致肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及白细胞介素-1 β (IL-1 β)表达、细胞生长阻滞甚至死亡^[5].本研究中通过直接检测 p-p38MAPK 水平及心肌细胞凋亡情况,并构建 AD-ASp38 α ,特异阻断 p38 α ,探讨严重烧伤早期 p38MAPK 磷酸化与心肌细胞凋亡间的关系,为临床严重烧伤早期心肌细胞损伤防治提供一定参考.

本研究发现,给予烧伤血清+缺氧刺激 6 h 后, p-p38MAPK 水平明显升高, DNA 凝胶电泳可见明显的 DNA 梯状条带,流式细胞术检测显示细胞大量凋亡,达到 50%左右,而转染 AD-ASp38 α 的心肌细胞在同样的刺激下, p-p38MAPK 水平较正常对照组明显升高,细胞凋亡较正常对照组显著加重;但与烧伤缺氧组比较,其 p-p38MAPK 水平和细胞凋亡水平都显著下降.本课题组前期研究亦证实,抑制 p38MAPK 的持续活化可以有效下调烧伤血清+

缺氧刺激条件下心肌细胞 TNF- α 、IL-1 的表达^[2].实际上,在多种细胞、不同损伤因素的作用下, p38MAPK 的激活可导致 TNF- α 水平的增高,最终导致细胞损伤, TNF- α 途径可能是 p38MAPK 激活促进细胞凋亡的主要途径.毛岸荣等^[6]构建猪多器官功能障碍综合征(MODS)发病模型,证实外周血单核细胞 p38MAPK 磷酸化使 TNF- α 基因转录活性明显增强,血中 TNF- α 升高;李海峰等^[7]给予复苏大鼠血必净注射液发现,心肌细胞及脑细胞损伤与 p38MAPK 及 TNF- α 水平明显相关;Haase 等^[8]研究证实,阻断 p38MAPK 可阻断镉离子所诱导的单核细胞 TNF- α 水平升高.由于 AD-ASp38 α 阻断的特异性,我们认为,在烧伤血清+缺氧刺激下, p38MAPK 的活化增强,并导致心肌细胞大量凋亡, TNF- α 途径可能是主要凋亡途径;阻断 p38MAPK 信号通路,有望减轻严重烧伤早期心肌细胞损伤.

综上所述,本研究中对基因治疗严重烧伤早期心肌细胞损伤进行了初步探索,研究以腺病毒为载体进行转染,理论上, AD-ASp38 α 为复制缺陷型,在非 293 类细胞中不能复制^[9],因此对这些靶细胞毒性很小,这一特点为基因治疗的安全性提供了保障,但如在临床采用仍有大量工作需要进行.

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,2000,16:275-278.
- [2] 郑军,黄跃生,黄晓元,等.反义 p38 α 基因转染对缺氧复合烧伤血清处理心肌细胞炎症因子的表达.第三军医大学学报,2004,26:2097-2101.
- [3] 郑军,黄跃生,黄晓元,等.大鼠反义 p38 α MAPK 腺病毒载体的构建.第三军医大学学报,2004,26:2165-2167.
- [4] 黄跃生,李志清,吴庆云,等.缺血缺氧在大鼠烧伤后“休克心”中的作用及其机制探讨.中华创伤杂志,2002,18:205-209.
- [5] Hecquet C, Lefevre G, Valtink M, et al. Activation and role of MAP kinase-dependent pathways in retinal pigment epithelium cells; JNK1, p38 kinase, and cell death. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44:1320-1329.
- [6] 毛岸荣,黄河,方国恩,等. p38 丝裂素活化蛋白激酶磷酸化对多器官功能障碍综合征肿瘤坏死因子- α 基因表达调控的影响.中国危重病急救医学,2009,21:518-520.
- [7] 李海峰,于亚欣,姜晓明,等.血必净注射液对复苏后大鼠细胞因子和 p38 丝裂素活化蛋白激酶通路的影响.中国中西医结合急救杂志,2010,17:148-151.
- [8] Haase H, Ober-Blobaum JL, Engelhardt G, et al. Cadmium ions induce monocytic production of tumor necrosis factor-alpha by inhibiting mitogen activated protein kinase dephosphorylation. Toxicol Lett, 2010, 198:152-158.
- [9] Graham FL. Adenovirus vectors for high-efficiency gene transfer into mammalian cells. Immunol Today, 2000, 21:426-428.

(收稿日期:2010-09-06)

(本文编辑:李银平)