文章编号:1000-5404(2006)19-1935-04

论著

培养心肌细胞缺氧时胞红蛋白表达变化特点

黄　绒,高文祥,廖卫公,陈　建,高钰琪　(第三军医大学高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,全军高原医学重点实验室,重庆 400038)

提　要: 目的　探讨心肌细胞缺氧后胞红蛋白表达变化的特点与规律。**方法**　利用酶消化法及差速贴壁法分离培养新生 2~3 d 大鼠的心肌细胞,分为 4 组:对照组,缺氧 4、12、24 h 组。对照组置常规培养箱(5% CO_2、95% 空气,37 ℃)中培养,缺氧组置缺氧培养箱中培养(2% O_2,5% CO_2,93% N_2,37 ℃),于不同时间(4、12、24 h)后,取心肌细胞进行免疫组化染色和免疫印迹分析蛋白水平的分布与表达的变化,用逆转录 PCR 法分析胞红蛋白 mRNA 水平的变化。**结果**　免疫组织化学染色显示胞红蛋白主要分布于细胞质,缺氧各组胞红蛋白染色强度均高于常氧组(对照组)。免疫印迹灰度分析结果显示,缺氧 4 h 组胞红蛋白表达量高于常氧组,但差异无统计学意义($P>0.05$),而缺氧 12、24 h 组胞红蛋白表达高于常氧组,差异有统计学意义($P<0.05$)。缺氧 4、12、24 h 组胞红蛋白 mRNA 水平均高于常氧组($P<0.05$),缺氧 12、24 h 组较缺氧 4 h 组更进一步增高($P<0.05$)。**结论**　胞红蛋白分布于心肌细胞的细胞质。培养心肌细胞缺氧 4 h 后胞红蛋白转录增强,缺氧 12 h 后蛋白水平增强。胞红蛋白表达增加可能是心肌细胞对缺氧的一种代偿反应。

关键词: 胞红蛋白/组红蛋白;缺氧;心肌细胞
中图法分类号: R322.11; R329.28; R331.41　　**文献标识码**: A

Hypoxia upregulates cytoglobin in rat cardiac myocytes

HUANG Jian, GAO Wen-xiang, LIAO Wei-gong, CHEN Jian, GAO Yu-qi (Department of Pathophysiology and High Altitude Physiology, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective　To explore the characteristics of cytoglobin expression in cardiac myocytes after hypoxia. **Methods**　The cardiac myocytes from neonatal Wistar rats were exposed to hypoxia (2% O_2, 5% CO_2, 93% N_2, 37 ℃) for 4, 12, 24 h, and the control cells exposed to normoxia (95% air, 5% CO_2, 37 ℃). The expression of cytoglobin protein cardiac myocytes was assayed by immunohistochemical staining and Western blotting, while the mRNA level by reverse transcription PCR. **Results**　Cytoglobin located in plasma of cardiac myocytes. As compared to normoxic cardiac myocytes, immunohistochemical staining showed cytoglobin protein in all hypoxic cardiac myocytes was enhanced, and Western blotting showed the cytoglobin of the cells exposed to hypoxia for 4 h was of no significance ($P>0.05$) and that for 12 and 24 h was of statistical significance ($P<0.05$). The cytoglobin mRNA level of hypoxic cardiac myocytes was higher than normoxic cells ($P<0.05$). The cytoglobin expression of cells exposed to hypoxia for 12 and 24 h was higher than for 4 h ($P<0.05$). **Conclusion**　Cytoglobin is a plasma protein in cardiac myocytes. Hypoxia can upregulate the expression of cytoglobin in cardiac myocytes.

Key words: cytoglobin/histoglobin; hypoxia; cardiac myocytes

2001 年 10 月,Burmester 等[1]先后通过生物信息学的方法发现了哺乳动物的一种新型血红蛋白家族成员 - 胞红蛋白(组红蛋白)。胞红蛋白单亚基含有 190 个氨基酸残基,由 2 个相同的亚基形成二聚体。胞红蛋白与其他血红蛋白家族成员在一级结构上至少有 30% 的同源性,人与小鼠胞红蛋白 cDNA 序列中有 92.8% 的相同,氨基酸序列中有 95.3% 相同[1,2],这种高同源性也说明这一蛋白的高保守性。胞红蛋白晶体衍射分析也证实了胞红蛋白具有典型的螺旋珠蛋白结构[3,4]。这一种蛋白质在体内广泛分布,尤其是在心肌、甲状腺、肾脏、脑组织等部位表达较为丰富。此蛋白质由于含有血红素,具备与氧分子结合的结构基础,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200092)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30200092)
作者简介:黄　绒(1968-),男,湖北省仙桃市人,博士,副教授,主要从事缺氧病理生理学方面的研究。电话:(023)60662834,E-mail: hj3red@yahoo.com
通讯作者:高钰琪,电话:(023)68752331,E-mail: gaoy66@yahoo.com
收稿日期:2005-07-12;**修回日期**:2005-11-28

其与细胞缺氧反应可能存在十分密切的关系。但是此种蛋白质的功能目前还不清楚。本研究通过免疫组织化学、免疫印迹以及 RT-PCR 等方法检测培养的心肌细胞缺氧后胞红蛋白，以探讨其表达变化特点。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

PCR 仪（Amplitron Thermolyne 美国），DME/F-12 培养基，新生小牛血清（Hyclone，美国），胰蛋白酶（Sigma）。阿糖胞苷（上海试剂厂）。抗胞红蛋白单克隆抗体（一抗），由美国 Southwestern 医学院 CBI 抗体中心提供。S-P 免疫组化试剂盒（北京中山生物技术有限公司），生物素化羊抗兔 IgG（二抗）（中山公司）。DAB 试剂盒（北京中山生物技术有限公司）。Trizol（德国宝灵曼公司），DNA 聚合酶（上海生工生物工程公司）。

1.2 乳鼠心肌细胞的体外原代培养

取出生 1～2 d 的 Wistar 大鼠乳鼠，75% 乙醇消毒乳鼠前胸皮肤。沿胸骨左缘 4、5 肋间剪开胸腔，露出心脏。剪取心室部分。置入 D-Hanks 液中剪开冲洗，剪去血管、心包等结缔组织。剪碎心脏组织成约 0.5 mm 的组织块。加 0.125% 胰酶约 5 ml 转移至小三角烧瓶中。37 ℃水浴孵育 5 min，再振荡 1 min，共 2 次，取上层消化液加入预先准备好的含 4 ml 5% 血清培养液的离心管中终止消化。离心 1 500 r/min，10 min。吸弃上清，向沉淀加入 3 ml 的含 5% 血清培养液。重复消化并收集消化液，至心脏组织基本消化完为止，并用 100 目钢网过滤。滤过液再次离心 1 500 r/min，10 min。吸弃上清，向沉淀中加培养基约 2 ml，再吹打接种至塑料培养瓶。5% CO_2、37 ℃细胞培养箱中培养 1.5 h。取未贴壁的心肌细胞转入新的培养板中培养，接种密度约为 1×10^5/ml，并加入阿糖胞苷（1 μmol/L）抑制成纤维细胞生长。第 2 天换培养基，以后每 2 天换 1 次。培养的心肌细胞第 2 天开始出现自发搏动，生长 4～5 d 后生长良好，开始实验。

1.3 细胞缺氧

细胞分为常氧组（对照组）、缺氧 4、12、24 h 组。常氧组细胞置常规培养箱内（95% 空气，5% CO_2）培养，缺氧各组将细胞置缺氧培养箱内培养（2% O_2，5% CO_2，93% N_2）。于相应时间取出测定各指标。

1.4 胞红蛋白免疫组化染色

将心肌细胞培养于盖玻片上，生长约 3 d 后，PBS（0.01 mol/L，pH 7.4）漂洗 2 次，4% 多聚甲醛固定 20 min。PBS 漂洗 5 min×3 次。在 0.75% H_2O_2-PBS 中浸泡 30 min，37 ℃。0.3% Triton-100 PBS 清洗 3 min×2 次。1% BSA 封闭 30 min，37 ℃。PBS 漂洗 5 min×3 次。一抗 1∶50，4 ℃过夜。PBS 漂洗 5 min×3 次。加生物素标记二抗（羊抗兔 IgG），37 ℃孵育 30 min。PBS 漂洗 5 min×3 次。加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素，37 ℃孵育 30 min。PBS 漂洗 5 min×3 次。DAB 显色，在显微镜下观察着色适宜时，乙醇脱水，70% 1 次，95% 2 次，无水乙醇 3 次，每次 1 min。中性树脂封片。

1.5 胞红蛋白 Western blot 检测

细胞经 RIPA（1% NP40，0.1% SDS，100 μg/ml 苯甲基磺酰氟，0.5% 脱氧胆酸钠，溶于磷酸盐缓冲液）裂解提取细胞质蛋白，上清液移至另一 EP 管（100 μl/管）中，置 100 ℃水中，6 min。用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。经变性后取 25 μg 经 10% SDS-PAGE 电泳，转移到 PVDF 膜，5% 脱脂奶粉 4 ℃封闭过夜，用小鼠抗人胞红蛋白单抗室温孵育 2 h，洗膜后加入辣根过氧化物标记的羊抗鼠二抗，ECL 显影，X 线片暗室中感光，用凝胶成像分析系统进行扫描并记录光密度强度。各条带与同一膜上对照常第 1 泳道上的条带进行比较形成相对灰度，以相对灰度值进行统计学分析。

1.6 细胞红蛋白 mRNA 水平测定

采用逆转录-PCR 法。用 Trizol 法提取总 RNA，然后用逆转录酶将 mRNA 逆转录为 cDNA。然后通过构建 PCR 体系（上游引物：5′-ATGGAGAAAGTGCCGGGCGACATGG-3′；下游引物：5′-CTATGGCCCTGAAGAGGGCAGTGTG -3′。*Taq* 酶催化）。热循环：95 ℃预热 4 min，30 个循环（95 ℃ 65 s，退火 90 s，72 ℃ 90 s），72 ℃温育 10 min，4 ℃结束反应。用 1% 琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色。用 Quantity one 4.0 进行灰度分析。用各条带灰度值与内参 actin 灰度值的比值进行统计学分析。

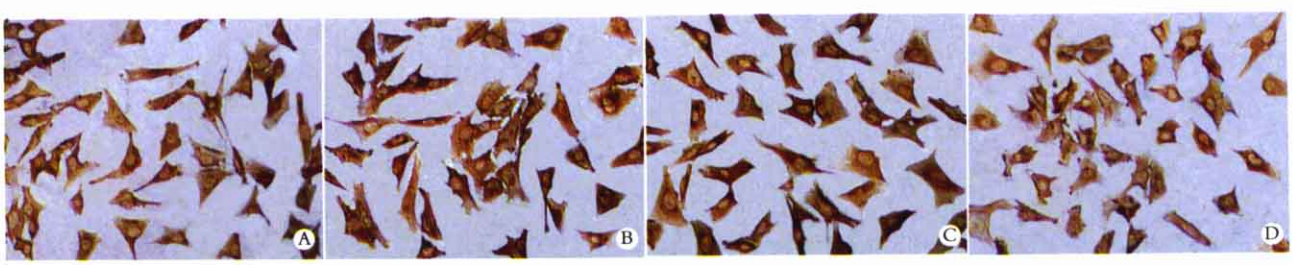
1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析，采用 Student New Keals 法进行均数间差别显著性检验。

2 结果

2.1 胞红蛋白的免疫组化学染色观察

通过免疫组织化学染色，缺氧 4 d 组较对照组显色稍深，但不明显，而缺氧 12 h 和缺氧 24 h 胞红蛋白染色明显增强。另外，细胞核明显淡染，着色主要分布于细胞质，见图 1。

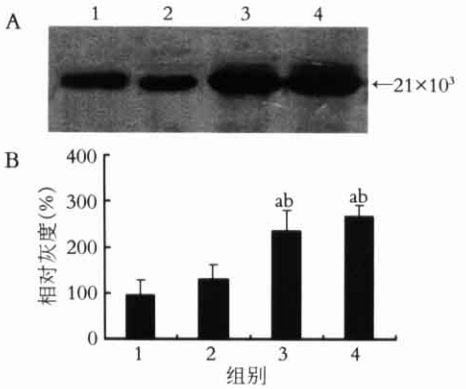


A：对照组；B：缺氧 4 h 组；C：缺氧 12 h 组；D：缺氧 24 h 组

图 1 缺氧对培养心肌细胞胞红蛋白表达的影响 （SABC×200）

2.2　胞红蛋白的 Western blot 观察

通过免疫印迹显示，胞红蛋白在缺氧 4 h 组较对照组染色加深，在缺氧 12 h 组与缺氧 24 h 组较对照组、较缺氧 4 h 组明显加深（图 2A）。通过灰度测量，并进行统计学分析显示，缺氧 4 h 组虽然高于对照组，但是无统计学意义（$P>0.05$），缺氧 12 h 或缺氧 24 h 组较对照组和缺氧 4 h 组灰度增加，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。缺氧 12 h 与缺氧 24 h 组相差不显著（$P>0.05$），见图 2B。

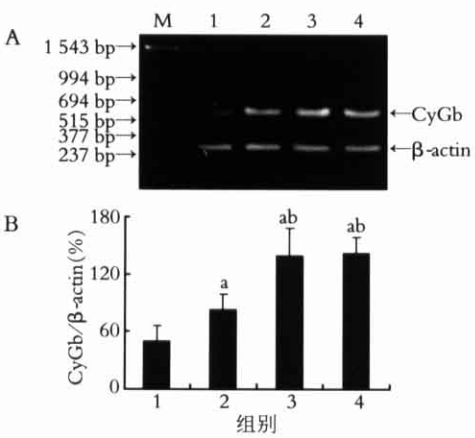


A：Western blot 检测结果；B：Western blot 电泳结果的灰度分析
1：对照组；2：缺氧 4 h 组；3：缺氧 12 h 组；4：缺氧 24 h 组
a：$P<0.05$，与对照组相比；b：$P<0.05$，与缺氧 4 h 组相比

图 2　缺氧后心肌细胞胞红蛋白 Western blot 检测结果及灰度分析

2.3　心肌细胞缺氧后胞红蛋白 RT-PCR 结果

通过 RT-PCR 测定显示，如图 3A 所示，缺氧 4 h 电泳条带显著较对照组显著加深，缺氧 12、24 h 组进一步加深，而内参变化不明显。通过相对灰度分析显示（图 3B），缺氧 4、12、24 h 组胞红蛋白 mRNA 水平均较对照组显著增加，差异具有显著统计学意义（$P<0.05$），缺氧 12 h 组显著高于缺氧 4 h 组（$P<0.05$），缺氧 12 h 与缺氧 24 h 组相差不显著（$P>0.05$）。



A：RT-PCR 产物电泳图；B：RT-PCR 电泳条带灰度分析
M：标准；1：对照组；2：缺氧 4 h 组；3：缺氧 12 h 组；
4：缺氧 24 h 组
a：$P<0.05$，与对照组相比；b：$P<0.05$，与缺氧 4 h 组相比

图 3　培养心肌细胞缺氧时胞红蛋白 mRNA 水平的变化

3　讨论

胞红蛋白是新近发现的哺乳动物血红蛋白家族成员。多数珠蛋白基因含有 2 个保守的内含子，胞红蛋白基因中有 4 个外显子，3 个内含子。其基因中含有第 3 个内含子，说明较哺乳动物其他五配位珠蛋白具有更为古老的进化史[5]。通过 RNA 斑点杂交分析，胞红蛋白的确是一个体内广泛分布的蛋白质，尤其是在心肌、甲状腺、肾、脂肪组织等组织中表达更为丰富[1,2]。通过免疫组织化学方法从蛋白表达水平进行研究也证实其广泛分布于多种组织之中[6]。我们的研究结果明确地表明，在正常组培养心肌细胞中，胞红蛋白有一定丰度的表达。文献[7]报道胞红蛋白主要分布于细胞核中，但本研究结果显示，在心肌细胞中胞红蛋白主要分布于细胞质中。

本研究表明，当心肌细胞缺氧（2% O_2 + 5% CO_2 + 93% N_2）4 h 后，其表达在蛋白水平即有上调。缺氧 12 h后，表达上调更为明显，增加到 2 倍。对胞红蛋白的血红素口袋进行研究显示，卟啉环平面内与铁形成 4 个配位键，E7 和 F8 组氨酸的咪唑基在同一轴上分别与血红素铁形成配位键，共形成6 个配位键，O_2分子进入血红素窑洞内，取代 E7 组氨酸残基，与铁原子形成配位键[5,8]。由于多一个配位键形成，使得胞红蛋白中的铁原子呈低自旋状态，所以，胞红蛋白氧合状态是十分稳定。胞红蛋白血红素窑洞大而且为极性亲水环境，此窑洞与分子外可通过 G、H 螺旋之间一条狭窄的通道相通，此通道可能是 O_2、CO 等配体分子弥散进入的通道[3,4]。因此，胞红蛋白与细胞内的氧相关反应必然存在密切的联系。如可能具有易化细胞内氧向线粒体的弥散的作用。Schmidt 等[6]通过定量 PCR 检测了缺氧（9% O_2 22、44 h）大鼠肝脏细胞胞红蛋白表达，也证明缺氧可以上调胞红蛋白的表达。缺氧时，细胞中的能量代谢平衡被打破，细胞上调胞红蛋白表达的意义可能在于强化细胞从细胞外获取氧，加强细胞内的氧传递。因此，参与细胞获取氧，以及在细胞内将氧传递给线粒体，可能是胞红蛋白的功能之一。

研究表明，缺氧 4 h 组心肌细胞中胞红蛋白 mRNA 水平即显著高于常氧组，缺氧 12、24 h 更进一步增加。因此胞红蛋白在蛋白水平含量增加的原因之一在于其基因表达增强。Wystub 等[9]通过基因序列分析发现，胞红蛋白与肌红蛋白基因一样具有一段较长的非编码保守序列。在胞红蛋白基因中，含有 2 种序列："缺氧反应元件"与"mRNA 稳定序列"[9]，这强烈提示胞红蛋白基因表达受到细胞内氧水平的调节。因此胞红蛋白 mRNA 水平上调的原因之一可能与其降解减弱有关。敲除小鼠缺氧诱导因子-1（hypoxic inducible

factor-1, HIF-1)后,胞红蛋白表达上调受到影响,在脑、骨骼肌和肝脏,12%、7% O_2缺氧引起胞红蛋白和VEGF表达上调的程度降低[10]。因此,胞红蛋白的基因表达受到缺氧诱导因子1的调节,mRNA水平在缺氧后上调也可能与基因转录增强有关。对HIF-1敲除后心肌组织缺氧(7% O_2),胞红蛋白表达上调程度显著下降,而12%没有效果[10]。这也说明HIF-1对胞红蛋白表达具有调节作用,但在不同的组织、不同缺氧程度时各不一样。胞红蛋白表达变化的方式与VEGF一样[10],而VEGF的缺氧诱导性表达是受到HIF-1途径调节的。从HIF-1敲除后,在某些组织中缺氧诱导胞红蛋白表达的效果并没有完全抑制,这说明其诱导表达可能还通过其他机制来完成,如通过HIF-2等。

总之,胞红蛋白在缺氧时上调的原因主要在于基因表达增强。在此过程中,缺氧诱导因子可能起到一定作用。缺氧时胞红蛋白表达上调的意义值得深入研究,其可能在细胞获取氧以及细胞内的氧传递等方面起代偿作用。

参考文献:

[1] BURMESTER T, EBNER B, WEICH B, *et al*. Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues[J]. Mol Biol Evol, 2002, 19(4): 416-421.

[2] GILLEMANS N, McMORROW T, TEWARI R, *et al*. Functional and comparative analysis of globin loci in pufferfish and humans[J]. Blood, 2003, 101(7): 2842-2849.

[3] DE-SANCTIS D, DEWILDE S, PESCE A, *et al*. Crystal structure of cytoglobin: the fourth globin type discovered in man displays heme hexa-coordination[J]. J Mol Biol, 2004, 336(4): 917-927.

[4] DE-SANCTIS D, DEWILDE S, PESCE A, *et al*. Mapping protein matrix cavities in human cytoglobin through Xe atom binding[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 316(4): 1217-1221.

[5] TRENT J T 3rd., HARGROVE M S. A ubiquitously expressed human hexacoordinate hemoglobin[J]. J Biol Chem, 2002, 277(22): 19538-19545.

[6] SCHMIDT M, GERLACH F, AVIVI A, *et al*. Cytoglobin is a respiratory protein in connective tissue and neurons, which is up-regulated by hypoxia[J]. J Biol Chem, 2004, 279(9): 8063-8069.

[7] GEUENS E, BROUNS I, FLAMEZ D, *et al*. A globin in the nucleus [J]. J Biol Chem, 2003, 278(33): 30417-30420.

[8] SAWAI H, KAWADA N, YOSHIZATO K, *et al*. Characterization of the heme environmental structure of cytoglobin, a fourth globin in humans[J]. Biochemistry, 2003, 42(17): 5133-5142.

[9] WYSTUB S, EBNER B, FUCHS C, *et al*. Interspecies comparison of neuroglobin, cytoglobin and myoglobin: sequence evolution and candidate regulatory elements[J]. Cytogenet Genome Res, 2004, 105(1): 65-78.

[10] FORDEL E, GEUENS E, DEWILDE S, *et al*. Cytoglobin expression is upregulated in all tissues upon hypoxia: an *in vitro* and *in vivo* study by quantitative real-time PCR[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 319(2): 342-348.

(编辑 汪勤俭)

(上接1934页)

腰穿置换疗法可以治疗SAH,但每次引流量有限,反复腰穿易致局部红肿及蛛网膜下腔黏连,为下次操作增加困难,且多次的搬动患者摆腰穿体位也不利患者的恢复[2]。陆士奇等[3]报道腰大池持续外引流术较脑脊液置换疗法更有效缓解SAH后CVS。腰大池持续外引流术可使蛛网膜下腔的血通过脑脊液自然循环的途径经腰大池引出。与反复腰穿相比有以下优点:①仅腰穿1次,创伤小,操作简单;②带管时间长,可放置15~30 d[4];③感染率低[5],本组无1例感染;④经鞘内给药及取脑脊液化验方便;⑤引流血性脑脊液量大,300~500 ml/24 h[6],脑脊液清亮时间越短,患者预后也越好。腰大池持续外引流术可快速淡化血性脑脊液浓度,缩短了患者的治疗时间,减少了发生CVS及脑积水的机会。本组CVS发生率为10.7%,脑积水发生率为3.6%。

腰大池持续外引流术的禁忌证为:①有颅内占位性病变,脑中线结构移位;②不能明确脑脊液循环通畅与否;③颅内压增高明显,有脑疝可能的患者;④穿刺部位局部感染。该术常见并发症有:①引流管堵塞;②穿刺部位渗液;③患者卧床时间较长;④有引起颅内感染的可能;⑤引流过快引起脑疝的可能。手术注意事项:①椎管内置管一般3~5 cm,不宜过长,避免神经刺激症状;②通过调整引流袋位置控制流速及流量;缓慢放出脑脊液为宜,以免发生脑疝;保持颅内压于正常范围,以100 mmH_2O左右为宜,既不产生颅内低压,又可有效降低颅内压力;③及时发现引流管有无堵塞,必要时用生理盐水通管;④严格无菌操作,定期查脑脊液常规及生化,必要时行脑脊液细菌培养+药敏,一旦确诊感染即可导管内注入敏感抗生素,可达到较好临床效果;⑤穿刺点隔日消毒1次,如有渗液可更换穿刺点。

腰大池持续外引流的同时应加强护理,给予止血、脱水、脑细胞保护、抗癫痫、预防血管痉挛药物,控制血压、血糖、水电解质平衡及凝血机制,预防应激性溃疡,应用广谱抗生素预防感染,营养支持等治疗,维持循环血容量稳定,保持有效脑灌注,可达到较好疗效。

关键词:腰大池持续外引流术;蛛网膜下腔出血
中图法分类号:R743.35 文献标识码:B

参考文献:

[1] 王忠诚.王忠诚神经外科学[M].武汉:湖北科学技术出版社,2005:766.

[2] 蒋中凤,许红霞.保留导管法脑脊液置换治疗蛛网膜下腔出血15例[J].郑州大学学报:医学版,2004,39(4):725-726.

[3] 陆士奇,龚 勇.脑脊液持续引流与置换疗法对蛛网膜下腔出血后迟发性脑血管痉挛疗效的比较[J].中国急救医学,2004,24(10):768.

[4] 刘瑞云,尹绍雅,张楷文.早期腰大池持续引流治疗外伤性蛛网膜下腔出血(附27例报告)[J].中华神经外科杂志,2002,18(4):264-265.

[5] 陈善固,余玉银,曾胜旺.腰大池持续外引流术治疗继发性蛛网膜下腔出血(附46例报告)[J].中华神经外科杂志,2005,21(4):249-250.

[6] 张建党,周汉光,刘 睿.58例高血压脑室内出血治疗体会[J].中华神经外科杂志,2003,19(3):173.

(编辑 薛国文)