文章编号:1000-5404(2012)17-1707-04

论著

LPS预处理对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用

刘 丹[1*],尹 东[2*],汤 蕾[1],孙 惦[1],许 旻[1],何 明[1] (330006 南昌,南昌大学医学院:药理教研室[1],第二附属医院江西省分子医学重点实验室[2])

[摘要] **目的** 探讨14-3-3γ基因在LPS预处理对抗心肌细胞缺氧/复氧(A/R)损伤中的作用。**方法** 构建pSUPER/14-3-3γ RNA干扰重组质粒,转染入心肌细胞,分为5组:对照组、A/R组、LPS+A/R组、pSUPER+LPS+A/R组、pSUPER/14-3-3γ+LPS+A/R组。Western blot检测14-3-3γ蛋白表达,生化自动分析仪测定乳酸脱氢酶(LDH)活性,MTT法测定细胞存活率,流式细胞仪检测细胞凋亡,线粒体肿胀实验检测线粒体通透性转换孔(mPTP)开放。**结果** A/R损伤使细胞存活率下降,LDH升高,细胞凋亡增加,mPTP开放;LPS预处理可使14-3-3γ表达明显增加,通过抑制mPTP开放,对A/R损伤的细胞有保护作用;pSUPER/14-3-3γ RNA干扰重组质粒通过抑制14-3-3γ蛋白表达,取消LPS预处理的保护作用。**结论** LPS预处理可对抗心肌细胞缺氧/复氧损伤,其机制与上调14-3-3γ,从而抑制mPTP开放有关。

[关键词] 14-3-3γ;内毒素耐受;缺氧/复氧损伤;RNA干扰
[中图法分类号] R394-33; R394.2; R542.2 [文献标志码] A

Protective effect of lipopolysaccharide pretreatment on cardiomyocytes anoxia/reoxygenation injury

Liu Dan[1*], Yin Dong[2*], Tang Lei[1], Sun Dian[1], Xu Ming[1], He Ming[1] ([1]Department of Pharmacology, School of Medical College, [2]Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Second Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi Province, 330006, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the role of 14-3-3γ gene in the protection of cardiomyocytes with lipopolysaccharide (LPS) pretreatment against anoxia/reoxygenation (A/R) injury. **Methods** A RNA interference (RNAi) recombinant plasmid of pSUPER/14-3-3γ was constructed and transferred into cardiomyocytes. The cardiomyocytes were divided into five groups including a control group, an A/R group, a LPS+A/R group, a pSUPER+LPS+A/R group and a pSUPER/14-3-3γ+LPS+A/R group. The protein level of 14-3-3γ was detected by Western blotting. The activity of lactate dehydrogenase (LDH) was determined by an automated biochemical analyzer. Cell viability was analyzed by MTT assay. Cell apoptosis was measured by flow cytometry. The opening of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) was determined by swelling of isolated cardiac mitochondria. **Results** The A/R damage resulted in cell viability decrease, LDH and cell apoptosis increase, and mPTP opening. The LPS pretreatment up-regulated 14-3-3γ protein expression and protected cardiomyocytes against A/R injury through inhibiting the mPTP opening. The pSUPER/14-3-3γ RNAi recombinant plasmid could reduce 14-3-3γ protein expression and then reverse the protective effect of LPS pretreatment. **Conclusion** LPS pretreatment may have a protective effect on cardiomyocytes subjected to A/R injury, and its mechanism may be related to 14-3-3γ upregulation and subsequent mPTP opening inhibition.

[**Key words**] 14-3-3γ; endotoxin tolerance; anoxia/reoxygenation injury; RNAi

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81160402,81072632,81100104) and China Postdoctoral Science Foundation(20110491496). Liu Dan and Yin Dong are coauthors who contributed equally to this work. Corresponding author: He Ming, Tel: 86-791-86362231, E-mail: jxhm56@hotmail.com

内毒素主要是革兰阴性杆菌的细胞壁脂多糖(lipopolysacharide, LPS)成分,内毒素耐受(endotoxin tolerance,ET)是指预先给予小剂量内毒素刺激后机体产生的一系列复杂的适应性调节反应[1]。研究[2-3]表明,ET不仅可以减轻随后大剂量内毒素所致的机体损伤,还可对抗多个脏器的缺血/再灌注损伤,但机制不明。14-3-3蛋白家族是几乎存在于所有细胞内的一种重要的功能信号分子,文献[4]指出14-3-3γ亚型在大

[基金项目] 国家自然科学基金(81160402,81072632,81100104);教育部博士后基金(20110491496)
* 同等贡献者
[通信作者] 何 明, E-mail: jxhm56@hotmail.com

鼠主动脉受损的心肌组织中表达明显升高，提示其有可能在提高心肌组织对损伤的反应性以及作为修复信号等方面发挥重要作用。本实验拟培养原代乳鼠心肌细胞，建立缺氧/复氧（A/R）损伤模型，以模拟心肌缺血/再灌注损伤，研究小剂量 LPS 预处理，对心肌细胞 A/R 损伤的直接作用，探讨 14-3-3γ 蛋白在其中所起的作用。

1 材料与方法

1.1 受试药品与主要试剂

限制性内切酶 *Bgl* Ⅱ、*Xho* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ（NEB 公司），T_4 DNA 连接酶、凝胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒（Promega 公司），14-3-3γ 抗体、β-actin 抗体及相应二抗（Santa Cruz 公司），线粒体分离试剂盒（BioVision 公司），Lipofectamine™2000（Invitrogen 公司），MEM 培养基（Gibco BRL 公司），胎牛血清（杭州四季青生物工程材料有限公司），伤寒菌内毒素脂多糖（LPS）、增强化学发光印迹试剂、硝酸纤维素膜（Amersham, UK）、胰酶、MTT、HEPES、PMSF、亮肽素、丙烯酰胺、SDS，亚甲基双丙烯酰胺、过硫酸铵、TEMED、EDTA 和 DTT（Sigma 公司），其他试剂均为分析纯。

1.2 心肌细胞的分离培养

参照文献[5]的方法，取出生 1～3 d 的 SD 乳鼠的心脏，0.1% 胰酶消化分离心肌细胞，用含 15% 胎牛血清的 MEM 培养基混悬后置 CO_2 培养箱（5% CO_2、37 ℃）培养 2 h 去除成纤维细胞，计算细胞悬液中台盼蓝拒染的活细胞数，需达 90% 以上。分别按 5×10^5/孔、1×10^5/孔接种于 6 孔培养板和 96 孔培养板内置 CO_2 培养箱培养，前 3 d 加入终浓度为 0.1 mmol/L Brdu 抑制纤维细胞生长。培养 4 d 随机分组进行实验。

1.3 心肌细胞 A/R 模型建立[6]

正常氧含量为 21%，为使心肌细胞氧含量明显低于 21% 造成缺氧，本实验室先以模拟缺氧液（mmol/L：NaH_2PO_4 0.9、$NaHCO_3$ 6.0、$CaCl_2$ 1.8、$MgSO_4$ 1.2、HEPES 20、NaCl 98.5、KCl 10.0，pH 6.8，并用95% N_2 和5% CO_2 混合气体饱和30 min）置换正常培养基，并置细胞于缺氧环境中（95% N_2 和 5% CO_2 混合气体持续通气的缺氧密闭容器中）孵育 3 h，然后换用模拟复氧液，并于复氧环境中孵育 2 h，建立心肌细胞 A/R 损伤模型。

1.4 pSUPER RNAi 质粒构建

从 GenBank 中获得大鼠 14-3-3γ 基因序列号：D17447，运用美国 OligoEngine 公司提供的 RNA 干扰设计软件，输入 D17447，即获得所需的靶序列：5′-CATGAAGAACGTGACAGAG-3′（278）。根据 pSUPER 质粒特点及 shRNA 设计要求，合成带“TTCAAGAGA”茎环序列和 *Bam*H Ⅰ、*Xho* Ⅰ的黏性末端的 DNA 序列，配对的 2 条互补单链寡核苷酸退火后形成双链，用于构建重组质粒。合成的正向序列：5′-GATCCCCCATGAAGAACGT-GACAGAGTTCAAGAGACTCTGTCACGTTCTTCATGTTTTTC-3′。为保证 RNA 干扰靶序列的特异性，设计阴性对照的正向序列：5′-GATCCCCAGGAGGAGGTACACACATATTCAAGAGATATGTG-TGTACCTCCTCCTTTTTTC-3′。以 pSUPER 质粒为载体，*Bgl* Ⅱ、*Xho* Ⅰ双切后，插入带有黏性末端的 14-3-3γ shRNA 或阴性对照 shRNA 核苷酸序列。

1.5 基因转染[7]

转染前去除培养基中的抗生素，将 Lipofectamine™2000 与 DNA 以（μl）2.0∶0.8 混合，加入到每孔细胞中。

1.6 pSUPER RNAi 质粒干扰效率的检测

干扰效率检测实验分为 3 组：①正常对照组：未转染质粒，②pSUPER 阴性对照组：转染 pSUPER 质粒，③pSUPER/14-3-3γ 组：转染 pSUPER/14-3-3γ 质粒。用 Lipofectamine™2000 将构建的相应质粒放入细胞液，共同孵育 24 h，Western blot 检测 14-3-3γ 的蛋白表达，验证 pSUPER RNAi 质粒干扰效率。

1.7 实验分组

共分 5 组，每组重复 6 次。①对照组：弃去原培养液，换用复氧液置于培养箱（5% CO_2 -95% 空气，37 ℃）3 h，再换上复氧液孵育 2 h；②A/R 组：按 1.3 方法建立 A/R 损伤模型；③LPS + A/R 组：200 ng/ml LPS 预先加入心肌细胞培养基，24 h 后再进行 A/R 损伤；④pSUPER + LPS + A/R 组：用 Lipofectamine™2000 将空载质粒转染入心肌细胞，24 h 后再进行 LPS + A/R 处理；⑤pSUPER/14-3-3γ + LPS + A/R 组：用 Lipofectamine™2000 将重组质粒（pSUPER/14-3-3γ）转染入心肌细胞，24 h 后进行 LPS + A/R 处理。

1.8 检测方法

1.8.1 Western blot 检测 加入三去污剂裂解液裂解细胞，提取总蛋白，同等量蛋白质完成 SDS-PAGE 后，进行电转膜，再先后结合一抗和二抗，最后 X 线片曝光分析。

1.8.2 MTT 比色法检测细胞存活率 每组细胞以 10^4/孔接种于 96 孔培养板，每孔加入 MTT 溶液（5 mg/ml 溶于 PBS）20 μl，37 ℃孵育 4 h。后每孔加 DMSO 150 μl 振荡 10 min，使蓝色结晶充分溶解。酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测定其光吸收值[D(490)]，间接反映各组活细胞数量。

1.8.3 生化检测 各组分别取孵育液 200 μl，美国 Beckman 生化自动分析仪测定乳酸脱氢酶（LDH）活性。

1.8.4 细胞凋亡检测 各级处理结束后，收集细胞，在细胞悬液中加入 10 μl Annexin V-FITC 和 5 μl 的 PI，混匀并避光室温反应 15 min，后加入 300 μl Binding buffer，立即行流式细胞仪检测。

1.8.5 线粒体通透性转换孔道（mitochondria permeability transition pore，mPTP）开放检测 按试剂盒说明分离心肌细胞线粒体，Janus green B 染色检测线粒体活性，电镜证实纯度[8]。通过线粒体肿胀实验检测 mPTP 的开放。520 nm 波长测各组吸光度初值（$D1$），加 200 μmol/L $CaCl_2$ 诱导 mPTP 开放，20 min 后吸光度不再变化，记录此时吸光度值（$D2$），$\triangle D = D1 - D2$。用 $\triangle D$/min ×1 000 表示 mPTP 开放程度。

1.9 统计学处理

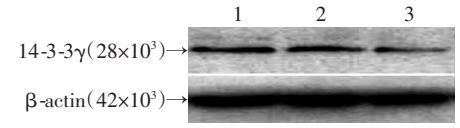
数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.5 统计软件行组间方差分析。

2 结果

2.1 pSUPER/14-3-3γ 质粒的干扰效率

由于原代心肌细胞质粒转染效率很低，为保证实验的可靠性，我们首先通过 Western 印迹检测质粒转染后 14-3-3γ 蛋白

的表达。正常对照组 14-3-3γ 蛋白有表达(0.42 ± 0.05),转染阴性质粒 pSUPER(0.45 ± 0.06)对 14-3-3γ 蛋白表达基本无影响,pSUPER/14-3-3γ 组 14-3-3γ 蛋白表达(0.12 ± 0.02)较正常组明显下降(P < 0.01,图 1),提示重组 RNA 干扰质粒能有效降低 14-3-3γ 的表达,可以进行后续实验。

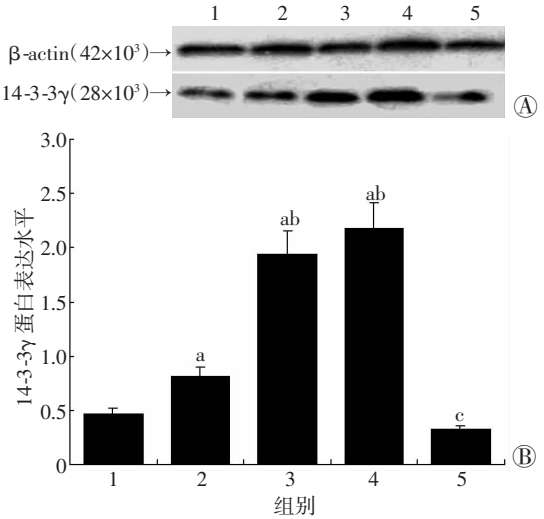


1:正常对照组;2:pSUPER 阴性对照组;3:pSUPER/14-3-3γ 组

图 1　Western blot 检测 pSUPER/14-3-3γ 重组质粒 RNA 干扰效率

2.2　各组 14-3-3γ 蛋白表达

心肌细胞遭受 A/R 损伤后,14-3-3γ 蛋白表达较对照组升高(P < 0.01),而当预先给予 LPS 处理,14-3-3γ 蛋白表达进一步升高,是 A/R 组的 1 倍。pSUPER 空载质粒对 14-3-3γ 的蛋白表达无影响,而 pSUPER/14-3-3γ 重组质粒则能明显降低 LPS 预处理所诱导的 14-3-3γ 蛋白表达上升(P < 0.01,图 2)。



1:对照组;2:A/R 组;3:LPS + A/R 组;4:pSUPER + LPS + A/R 组;5:pSUPER/14-3-3γ + LPS + A/R 组

A:Western blot 检测;B:半定量分析　a:P < 0.01,与对照组比较;b:P < 0.01,与 A/R 组比较;c:P < 0.01,与 LPS + A/R 组比较

图 2　Western blot 检测各组 14-3-3γ 蛋白表达水平

2.3　pSUPER/14-3-3γ 质粒转染后对心肌细胞存活率、LDH 的影响

A/R 损伤使心肌细胞存活率较正常组明显下降,LDH 值明显升高(P < 0.01)。LPS 预处理对 A/R 损伤的心肌细胞有保护作用,能使细胞存活率升高,LDH 值下降(P < 0.01)。转染 pSUPER 空载质粒对 LPS 预处理的心肌细胞的存活率及 LDH 值没有明显影响(P > 0.05),但是转染 pSUPER/14-3-3γ 重组质粒,则使 LPS 预处理的心肌细胞存活率明显下降,LDH 值明显升高(P < 0.01)。与未转染组相比,转染了 RNA 干扰的重组质粒组细胞存活率、LDH 值差异有统计学意义(P < 0.01,表 1)。

表 1　各组对心肌细胞缺氧/复氧损伤时 LDH 及细胞存活率的影响(n = 6, $\bar{x} \pm s$)

组别	存活率(%)	LDH(IU/L)
对照组	94.6 ± 7.4	2.38 ± 0.32
A/R 组	21.3 ± 3.2[a]	37.42 ± 4.83[a]
LPS + A/R 组	75.4 ± 5.7[b]	10.52 ± 1.17[b]
pSUPER + LPS + A/R 组	72.7 ± 4.2[b]	12.67 ± 1.52[b]
pSUPER/14-3-3γ + LPS + A/R 组	24.6 ± 3.1[c]	35.21 ± 4.36[c]

a:P < 0.01,与对照组比较;b:P < 0.01,与 A/R 组比较;c:P < 0.01,与 LPS + A/R 组比较

2.4　pSUPER/14-3-3γ 质粒转染后对心肌细胞凋亡的影响

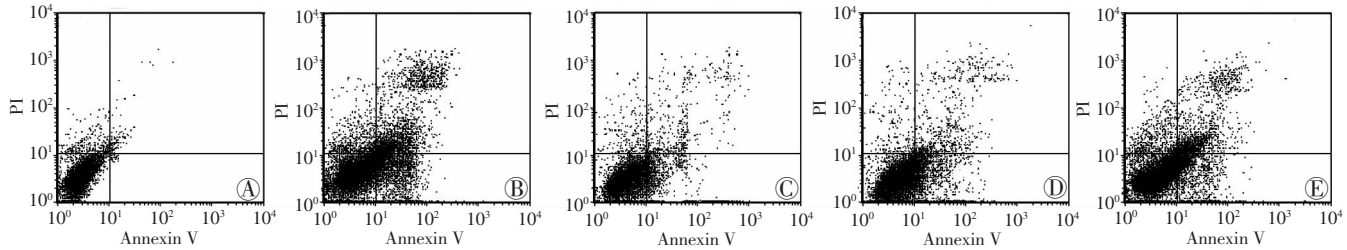
A/R 损伤组心肌细胞凋亡较正常组[(2.6 ± 0.4)%]明显升高,达到(42.7 ± 6.2)%(P < 0.01)。LPS 预处理的心肌细胞再遭受 A/R 损伤时,较直接遭受 A/R 损伤的细胞,能明显降低心肌细胞的凋亡(P < 0.01),只有(16.5 ± 2.4)%。pSUPER 空载质粒对 LPS 预处理的心肌细胞凋亡[(18.2 ± 2.7)%]无明显影响,但是 pSUPER/14-3-3γ 重组质粒则能取消 LPS 预处理所致的心肌细胞凋亡减少,使心肌细胞凋亡率升至(37.5 ± 5.5)%(P < 0.01,图 3)。

2.5　pSUPER/14-3-3γ 质粒转染后对心肌细胞 mPTP 开放的影响

mPTP 开放时,线粒体通透性增大,导致线粒体肿胀,吸光度下降。A/R 组 mPTP 持续开放,线粒体通透性增高,线粒体肿胀,△D/min 值较对照组明显升高(P < 0.01)。LPS 预处理组 mPTP 开放受到抑制,△D/min 值较 A/R 组明显减小(P < 0.01),说明 LPS 预处理能防止 mPTP 的开放。转染空载质粒 pSUPER 对 LPS 预处理抑制 mPTP 开放无明显影响,但是重组质粒 pSUPER/14-3-3γ 组则能使 mPTP 开放明显增加,△D/min 值较 LPS 预处理组明显升高(P < 0.01,图 4)。

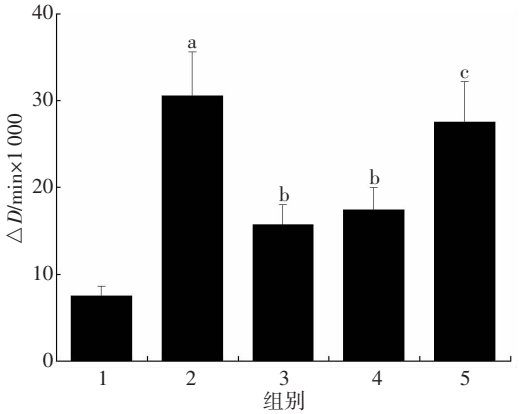
3　讨论

LPS 又名内毒素,进入机体后能激发炎症反应[9]。内毒素又可引起生物体的耐受现象,以避免机体对内毒素刺激过度反应而造成伤害,这是生物在长期进化



A:对照组;B:A/R 组;C:LPS + A/R 组;D:pSUPER + LPS + A/R 组;E:pSUPER/14-3-3γ + LPS + A/R 组

图 3　流式细胞术检测各组细胞凋亡



1:对照组;2:A/R 组;3:LPS + A/R 组;4:pSUPER + LPS + A/R 组;5:pSUPER/14-3-3γ + LPS + A/R 组 a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 A/R 组比较;c:$P<0.01$,与 LPS + A/R 组比较

图4 LPS 预处理及 pSUPER/14-3-3γ 对心肌细胞缺氧/复氧损伤时 mPTP 开放的影响

中形成的一种保护性调节机制。更有研究[10]指出,内毒素耐受还能诱导出机体对缺血再灌注损伤的交叉耐受作用。为此,本实验以原代培养乳鼠心肌细胞为研究对象,建立 A/R 损伤模型以模拟缺血再灌注,结果表明,当预先给予小剂量 LPS 处理 24 h 后,对随后的 A/R 损伤有明显的对抗作用。但是,究竟是何机制涉及小剂量 LPS 预处理对 A/R 损伤的保护作用? 我们认为,小剂量 LPS 的这种保护作用必然与心肌一些重要基因的表达改变有关。14-3-3 是一类共有 7 个亚型的酸性蛋白,分别为 β、ε、γ、η、σ、τ、ζ,几乎存在于机体所有的细胞中[11]。14-3-3 蛋白通过直接调节结合蛋白的催化活性、细胞内胞浆限位或是修饰等调节结合蛋白与其他分子间的相互作用,控制配体蛋白在细胞内的亚定位,在信号传导、细胞周期调控、细胞凋亡等过程中发挥极其重要的作用[12-13]。研究指出,大鼠行球囊扩张术后,颈动脉平滑肌细胞与心肌细胞内 14-3-3γ 亚型蛋白表达上调,提示 14-3-3γ 可能在提高心肌对损伤的反应性以及作为修复信号等方面发挥重要作用,因此,我们高度怀疑 LPS 预处理对心肌的保护作用与 14-3-3γ 有关。为验证此假说,本实验构建了 pSUPER/14-3-3γ 重组质粒,转染入心肌细胞,通过 RNA 干扰方式降低 14-3-3γ 蛋白的表达,结果发现,小剂量 LPS 预处理的抗 A/R 损伤作用被取消,表现为 LDH 活性增加,细胞存活率下降,细胞凋亡明显升高。进一步研究发现,14-3-3γ 的这种保护作用与 mPTP 的开放有关,当 14-3-3γ 表达明显下降时,mPTP 开放明显增加。mPTP 是位于线粒体的跨膜多蛋白复合体孔道,其开放程度决定着细胞的命运[14]。一旦 mPTP 过度开放,会造成线粒体基质膨胀、嵴伸展,使原来存在的线粒体膜电位被驱散,导致线粒体外膜破裂,并使分布在膜间的前凋亡分子如细胞色素 C、Smac/DIABLO、凋亡诱导因子(AIF)等释放,通过 caspase 依赖机制或是 AIF 依赖机制导致细胞凋亡或死亡[15]。

综上所述,本实验在原代培养的乳鼠心肌细胞中证实小剂量 LPS 预处理对随后遭受 A/R 损伤的心肌细胞有保护作用,机制涉及 14-3-3γ 蛋白的表达,其保护作用可能是通过抑制 mPTP 的开放实现。

参考文献:

[1] Biswas S K, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance[J]. Trends Immunol, 2009, 30(10): 475-487.

[2] Stevens S L, Leung P Y, Vartanian K B, *et al*. Multiple preconditioning paradigms converge on interferon regulatory factor-dependent signaling to promote tolerance to ischemic brain injury[J]. J Neurosci, 2011, 31(23): 8456-8463.

[3] Li J, Lai X, Chen Y, *et al*. Endotoxin tolerance attenuates liver ischemia/reperfusion injury by down-regulation of interleukin-1 receptor-associated kinase 4 in kupffer cells[J]. Transplant Proc, 2011, 43(7): 2531-2535.

[4] Autieri M V. Inducible expression of the signal transduction protein 14-3-3gamma in injured arteries and stimulated human vascular smooth muscle cells[J]. Exp Mol Pathol, 2004, 76(2): 99-107.

[5] 刘丹, 陈和平, 何明. 新生大鼠心肌细胞分离与原代培养[J]. 江西医学院学报, 2005, 45(5): 53-55.

[6] Liu D, He M, Yi B, *et al*. Pim-3 protects against cardiomyocyte apoptosis in anoxia/reoxygenation injury *via* p38-mediated signal pathway [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(11): 2315-2322.

[7] Huang M, Chan D A, Jia F, *et al*. Short hairpin RNA interference therapy for ischemic heart disease[J]. Circulation, 2008, 118(14 Suppl): S226-S233.

[8] Chaiyarit S, Thongboonkerd V. Comparative analyses of cell disruption methods for mitochondrial isolation in high-throughput proteomics study [J]. Anal Biochem, 2009, 394(2): 249-258.

[9] Nakachi H, Aoki K, Tomomatsu N, *et al*. A structural modulator of tumor necrosis factor type 1 receptor promotes bone formation under lipopolysaccharide-induced inflammation in a murine tooth extraction model[J]. Eur J Pharmacol, 2012, 679(1/3): 132-138.

[10] Langdale L A, Kajikawa O, Frevert C, *et al*. Sustained tolerance to lipopolysaccharide after liver ischemia-reperfusion injury[J]. Shock, 2003, 19(6): 553-558.

[11] Kjarland E, Keen T J, Kleppe R. Does isoform diversity explain functional differences in the 14-3-3 protein family? [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2006, 7(3): 217-223.

[12] Morrison D K. The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development[J]. Trends Cell Biol, 2009, 19(1): 16-23.

[13] Obsilova V, Silhan J, Boura E, *et al*. 14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators[J]. Physiol Res, 2008, 57(Suppl 3): S11-S21.

[14] Kinnally K W, Peixoto P M, Ryu S Y, *et al*. Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both? [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(4): 616-622.

[15] Ryu S Y, Peixoto P M, Teijido O, *et al*. Role of mitochondrial ion channels in cell death[J]. Biofactors, 2010, 36(4): 255-263.

(收稿:2012-02-11;修回:2012-04-18)

(编辑 汪勤俭)