DOI:10.16016/j.1000-5404.201412217

论著

钴原卟啉诱导HO-1表达增加对老龄小鼠骨骼肌组织氧化应激和炎症反应的影响

李亚楠[1],吴志彬[2],吴韦铆[1],司维柯[1],舒 彬[3],杨 忠[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院医学检验系临床血液学教研室[1];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所康复科[2];400050 重庆,重庆医科大学附属大公馆康复医院[3])

[摘要] **目的** 探讨注射钴原卟啉(cobalt protoporphyrin,CoPP)诱导血红素加氧酶-1(heme oxygenase 1,HO-1)表达增加在老龄小鼠骨骼肌微环境包括氧化应激、炎症反应的调节作用。**方法** 分别将正常成年(2月龄)和老年(18月龄)C57BL/6雄性小鼠按照简单随机抽样法分为对照组及注射CoPP组;CoPP组小鼠连续3 d腹腔注射CoPP溶液[5 mg/(kg·d)],对照组注射同体积生理盐水。在3、7、14 d后取新鲜腓肠肌组织,Western blot检测HO-1(3 d组)的表达,ELISA检测过氧化标志分子丙二醛(MDA)、过氧化氢(H_2O_2)含量及抗氧化酶类CuZn-超氧歧化酶(SOD)等活性变化。用老年C57BL/6小鼠建立腓肠肌损伤模型,采用简单随机抽样法分为CoPP处理组和对照组,分别在3、7、14 d后检测中性粒细胞和M2型巨噬细胞浸润。**结果** 正常老年组HO-1表达量高于成年组,老年组注射CoPP后HO-1表达升幅显著低于成年组($P<0.05$);注射CoPP后,成年和老年组MDA、H_2O_2含量均下降,SOD、CuZn-SOD、GSH-Px和CAT酶活性升高,且老年CoPP组过氧化标志分子含量高于成年CoPP组,抗氧化酶活性较低($P<0.05$)。骨骼肌损伤后3、7 d,CoPP处理组中性粒细胞浸润均低于对照组;CD163阳性M2型巨噬细胞浸润出现较晚,且注射CoPP后,M2型巨噬细胞的浸润显著高于对照组。**结论** 老年骨骼肌对CoPP的反应性下降,抗氧化应激能力下降。损伤后诱导HO-1表达增加能够降低早期中性粒细胞、促进M2型巨噬细胞的浸润,可能有助于骨骼肌损伤修复。

[关键词] 血红素加氧酶1;骨骼肌;老化;氧化应激;炎症反应
[中图法分类号] R345; R363; R685 [文献标志码] A

Effect of cobalt protoporphyrin-induced heme oxygenase 1 un-regulation on oxidative stress and inflammatory responses in skeletal muscle of aged mice

Li Yanan[1], Wu Zhibin[2], Wu Weiru[1], Si Weike[1], Shu bin[3], Yang Zhong[1]([1]Department of Clinical Hematology, Faculty of Laboratory Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Rehabilitation, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; [3]Dagongguan Rehabilitation Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400050, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the role of systematic heme oxygenase 1 (HO-1) in the regulation of oxidative stress and inflammation in aged skeletal muscle after intraperitoneal injection of cobalt protoporphyrin (CoPP). **Methods** Normal adult (2 months old) and aged (18 months old) male C57BL/6 mice were randomly divided into control group and injection group. The mice of the injection group were intraperitoneally injected with CoPP solution [5 mg/(kg·d)] for 3 consecutive days, and those of the control group were given normal saline at the same volume. Fresh gastrocnemius samples were harvested in 3, 7 and 14 d after injection. The expression of HO-1 was examined with Western blotting. The levels of oxidative stress markers, malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H_2O_2), and the activity of antioxidant enzyme CuZn-super oxide dismutase (SOD) was detected by ELISA. Then gastrocnemius injury model was established

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31171148)
[通信作者] 杨 忠,E-mail:yangzhong1999@yahoo.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150410.1505.012.html(2015-04-10)

in aged male C57BL/6 mice, and the mice were randomly divided into CoPP treatment and control group. The gastrocnemius was harvested in 3, 7 and 14 d after final injection for neutrophil counting and M2 macrophage infiltration. **Results** The expression of HO-1 was higher in the aged group than the adult group, but the increase of HO-1 induced by CoPP injection was much lesser in the aged mice than adult group ($P<0.05$). After induction of HO-1, the contents of MDA and H_2O_2 were declined while the activities of SOD, CuZn-SOD, GSH-Px and CAT enzyme were enhanced in both adult and aged groups, whereas the level of oxidation markers were higher and the antioxidant enzyme activity was lower in aged than in adult CoPP group ($P<0.05$). CoPP injection resulted in lower neutrophil infiltration than in the control group in 3 and 7 d after muscle injury. The $CD163^+$ M2 macrophage was infiltrated later, and more macrophage infiltrated in CoPP group than in the control. **Conclusion** Aged skeletal muscle has markedly lower reactivity to CoPP, and reduced ability to resist oxidative stress. Induction of HO-1 by Copp reduces early neutrophils and promotes M2 macrophage infiltration after injury, which may be helpful in skeletal muscle regeneration.

[**Key words**] heme oxygenase 1; skeletal muscle; aged; oxidative stress; inflammation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31171148). Corresponding author: Yang Zhong, E-mail: yangzhong1999@yahoo.com

骨骼肌在老化过程中逐步呈现结构和功能的退变减弱,称为增龄性骨骼肌丢失症(sarcopenia),该改变不仅严重影响老年人的生理活动和生活质量,也常引起或加重一些老年相关退行性疾病[1]。研究显示,老年骨骼肌组织内两类常见的病理改变即氧化应激和炎症反应在肌肉丢失症的发生、发展中扮演了重要角色[2]。血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)是血红素代谢的起始及限速酶,近十余年研究显示血红素加氧酶-1(HO-1)及其代谢产物具有抗氧化、抗炎症等生物学作用,是应激与多种病理情况下组织细胞自我保护、重建微环境稳态的重要机制[3-4]。对此领域的深入研究对于发掘促进老年骨骼肌再生能力的新途径,有效防治增龄性骨骼肌丢失症等肌萎缩性疾病的发生、发展,具有重要的理论和医学实践意义。本研究观察诱导HO-1表达增加后老年小鼠骨骼肌组织过氧化标志分子含量和抗氧化酶活性的变化,以及在损伤老年小鼠骨骼肌组织中性粒细胞和巨噬细胞浸润的变化,以探讨微环境变化对老年骨骼肌损伤修复的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 30只雄性2月龄C57BL/6小鼠,体质量(30±8)g,30只雄性18月龄C57BL/6小鼠,体质量(40±10)g,购自第三军医大学实验动物中心。

1.1.2 试剂 钴原卟啉(cobalt protoporphyrin, CoPP)购自Sigma公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)分型试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(gluathion peroxidase, GSH-Px)试剂盒、过氧化氢酶(catalase, CAT)测定试剂盒等购自南京建成生物工程研究所;RIPA裂解液、PMSF、BCA蛋白浓度测定试剂盒、抗体稀释液等购自碧云天生物技术研究所;小鼠单克隆GAPDH抗体、β-actin抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)抗体、兔抗髓过氧化物酶(MPO)多克隆抗体购自北京中杉金桥生物有限公司;兔多克隆HO-1抗体(ab13243)购自Abcam公司;兔多克隆CD163抗体购自Santa Cruz;SABC免疫组化试剂盒等为武汉博士德生物工程有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 骨骼肌组织HO-1蛋白表达水平的检测

将16只2月龄和18月龄C57雄性小鼠采用简单随机抽样法分为对照组及注射钴原卟啉组(CoPP组)。CoPP组小鼠连续3 d腹腔注射钴原卟啉溶液5 mg/(kg·d),对照组注射同体积生理盐水,3 d后取新鲜腓肠肌组织标本,液氮速冻。提取总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,煮沸变性后,行SDS-PAGE凝胶电泳,半干转印,5%脱脂牛奶封闭2 h,一抗(1∶1 000)4 ℃孵育过夜,TBST洗膜,二抗(1∶2 000)室温孵育,洗膜3次,化学发光检测。用Quantity One软件进行光密度分析,内参蛋白为β-actin。

1.2.2 骨骼肌组织过氧化分子及抗氧化酶活性的检测

将1.2.1中冻存的肌组织冰上解冻,制备10%的组织匀浆:生理盐水清洗,滤纸吸干,称量,加入9倍体积预冷的生理盐水,13 000 r/min冰上匀浆,2 000 r/min低温离心15 min,取上清分装8管,每管50 μL;分别用于检测总蛋白、SOD、CuZn-SOD、GSH-Px、CAT酶活性及MDA、H_2O_2含量。

1.2.3 老年骨骼肌损伤模型中中性粒细胞、M2型巨噬

细胞的免疫组化染色　用 4% 水合氯醛 350 mg/kg 腹腔注射麻醉小鼠，暴露腓肠肌，用手术刀片(11#)在距其远端约 60% 的最大直径处十字切割肌腹(全层，宽度横切 50%、纵切 5 mm)，不缝合，然后用 5-0 的黑丝线全层缝合皮肤筋膜切口。采用简单随机抽样法分为 CoPP 处理组和对照组，处理组在损伤后连续 3 d 腹腔注射 CoPP [5 mg/(kg·d)]，对照组注射同体积生理盐水，分别在 3、7、14 d 后进行心脏灌注固定取材：固定液为过碘酸盐-赖氨酸-多聚甲醛(PLP)，取出腓肠肌用 PLP 后固定 24 h，30% 蔗糖溶液脱水 48 h 后 OCT 包埋，行厚度 8 μm 的冰冻切片。染色：PBS 漂洗 3 次/5 min，3% H_2O_2 室温封闭 30 min，PBS 漂洗 3 次/5 min，1% BSA/0.1% Triton X-100 室温封闭 1 h，MPO 或 CD163 一抗(1∶100) 37 ℃孵育 2 h，4 ℃过夜，PBS 漂洗 3 次/5 min，二抗孵育 37 ℃，2 h，PBS 漂洗，SABC 室温 1.5 h，PBS 漂洗，DAB 显色，PBS 终止后脱水透明封片。

1.2.4　老年骨骼肌损伤模型中 CD163 蛋白表达水平检测　建模方法参照 1.2.3，在 3、7、14 d 后取材：麻醉动物后快速分离取材新鲜腓肠肌，冻存备用，参照 1.2.1 中 Western blot 的方法检测 CD163 蛋白动态表达。

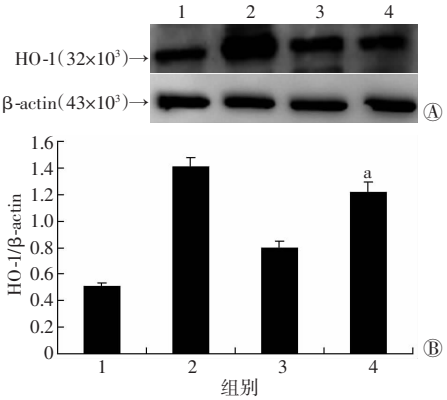
1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 Graphpad Prism 5 统计软件进行随机区组设计的方差分析，组间两两比较采用独立样本 t 检验。

2　结果

2.1　腹腔注射 CoPP 诱导 HO-1 的表达

与对照组相比，腹腔注射 CoPP 处理能够增加 HO-1 蛋白的表达量；老年对照组 HO-1 表达量高于成年对照组，但在注射 CoPP 后，老年 CoPP 组 HO-1 表达量低于成年 CoPP 组($P<0.05$，图 1)。



1：成年对照组；2：成年 CoPP 组；3：老年对照组；4：老年 CoPP 组
A：Western blot 检测结果；B：HO-1 的相对表达量　a：$P<0.05$，与成年 CoPP 组比较

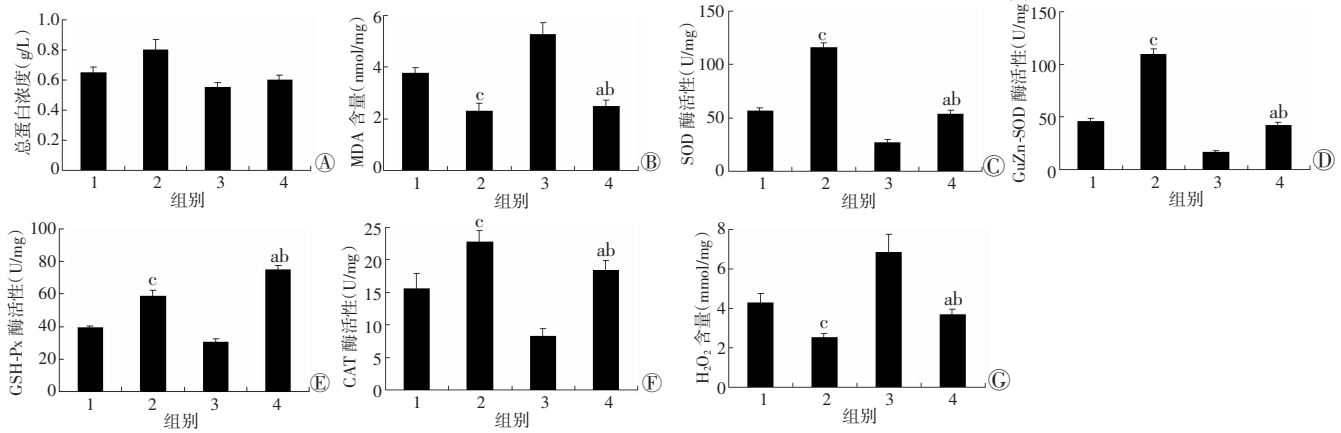
图 1　Western blot 检测腹腔注射 CoPP 诱导 HO-1 的表达

2.2　诱导 HO-1 表达增加对老年骨骼肌氧化应激状态的影响

腹腔注射 CoPP 后，成年 CoPP 组和老年 CoPP 组 SOD、CuZn-SOD 酶活性均升高，MDA 含量降低；老年 CoPP 组 SOD 酶活性低于成年 CoPP 组，CuZn-SOD 酶活性低于成年 CoPP 组，MDA 含量高于成年 CoPP 组($P<0.05$，图 2A～D)。成年 CoPP 组和老年 CoPP 组 GSH-Px、CAT 酶活性升高，H_2O_2 含量降低；老年 CoPP 组 GSH-Px 酶活性高于成年 CoPP 组，CAT 酶活性低于成年 CoPP 组，H_2O_2 含量高于成年 CoPP 组($P<0.05$，图 2E～G)。

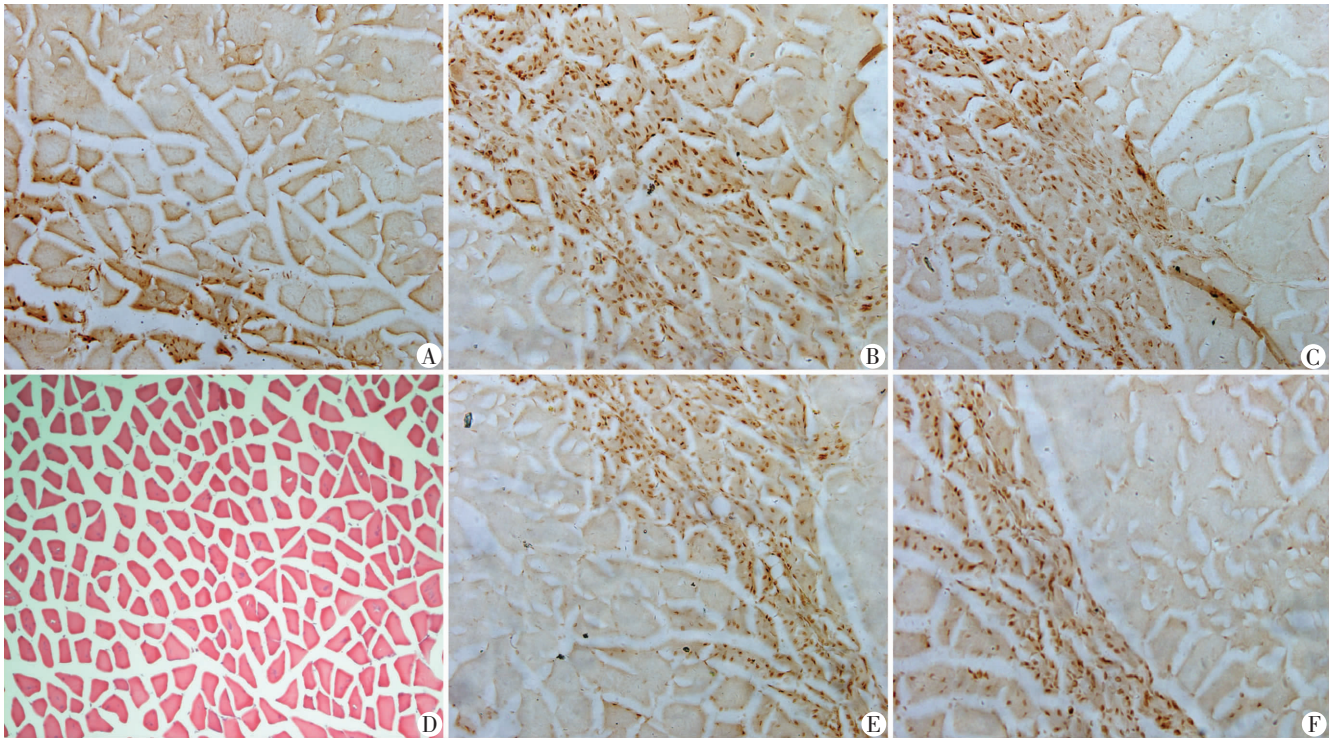
2.3　诱导 HO-1 表达增加对老年损伤模型炎症反应中中性粒细胞的影响

老年小鼠骨骼肌损伤模型建立后，采用免疫组织化学染色观察对照组和损伤组炎症反应中性粒细胞的浸润，损伤后 3 d，中性粒细胞大量浸润，损伤 7 d，中性粒细胞浸润减少(图 3)。



1：成年对照组；2：成年 CoPP 组；3：老年对照组；4：老年 CoPP 组
a：$P<0.05$，与成年 CoPP 组比较；b：$P<0.05$，与老年对照组比较；c：$P<0.05$，与成年对照组比较
A：总蛋白；B：MDA；C：SOD；D：CuZn-SOD；E：GSH-Px；F：CAT；G：H_2O_2

图 2　诱导 HO-1 表达增加对老年骨骼肌组织氧化应激状态的影响

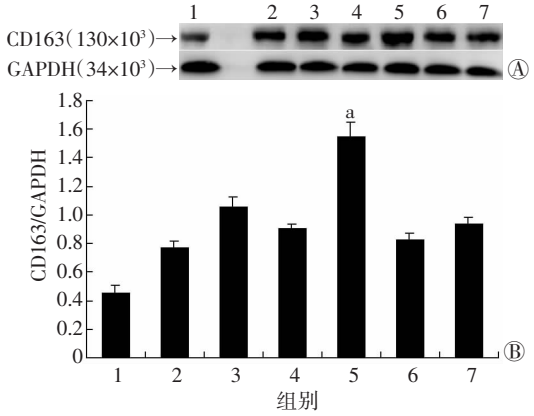


A:对照组 SABC 染色;B:损伤 3 d 组 SABC 染色;C:损伤 7 d 组 SABC 染色;D:对照组 HE 染色;E:CoPP 处理 3 d 组 SABC 染色;F:CoPP 处理 7 d 组 SABC 染色

图 3 诱导 HO-1 表达增加对老年损伤模型炎症反应中中性粒细胞浸润的影响 (×100)

2.4 诱导 HO-1 表达增加对老年损伤模型炎症反应中 M2 型巨噬细胞的影响

老年小鼠骨骼肌损伤模型建立后,采用 Western blot 检测对照组和 CoPP 处理组 M2 型巨噬细胞标记分子 CD163 的表达量,损伤后注射 CoPP 诱导 HO-1 表达增加 3、7 d,CoPP 处理组 CD163 表达量高于对照组,CoPP 处理 7 d 组出现最大表达量(图 4)。

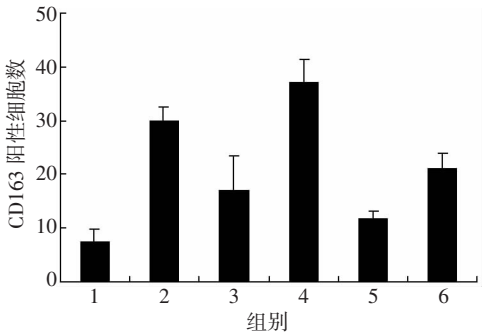


1:对照组;2:损伤 3 d 对照组;3:CoPP 处理 3 d 组;4:损伤 7 d 对照组;5:CoPP 处理 7 d 组;6:损伤 14 d 对照组;7:CoPP 处理 14 d 组 a:$P<0.05$,与对照组比较

A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果

图 4 诱导 HO-1 表达增加对老年损伤模型炎症反应中 M2 型巨噬细胞的影响

免疫组织化学染色观察对照组和 CoPP 处理组炎症反应中巨噬细胞的浸润,CD163 阳性 M2 型巨噬细胞浸润出现较晚,且注射 CoPP 后,M2 型巨噬细胞的浸润仍高于对照组(图 5、6)。

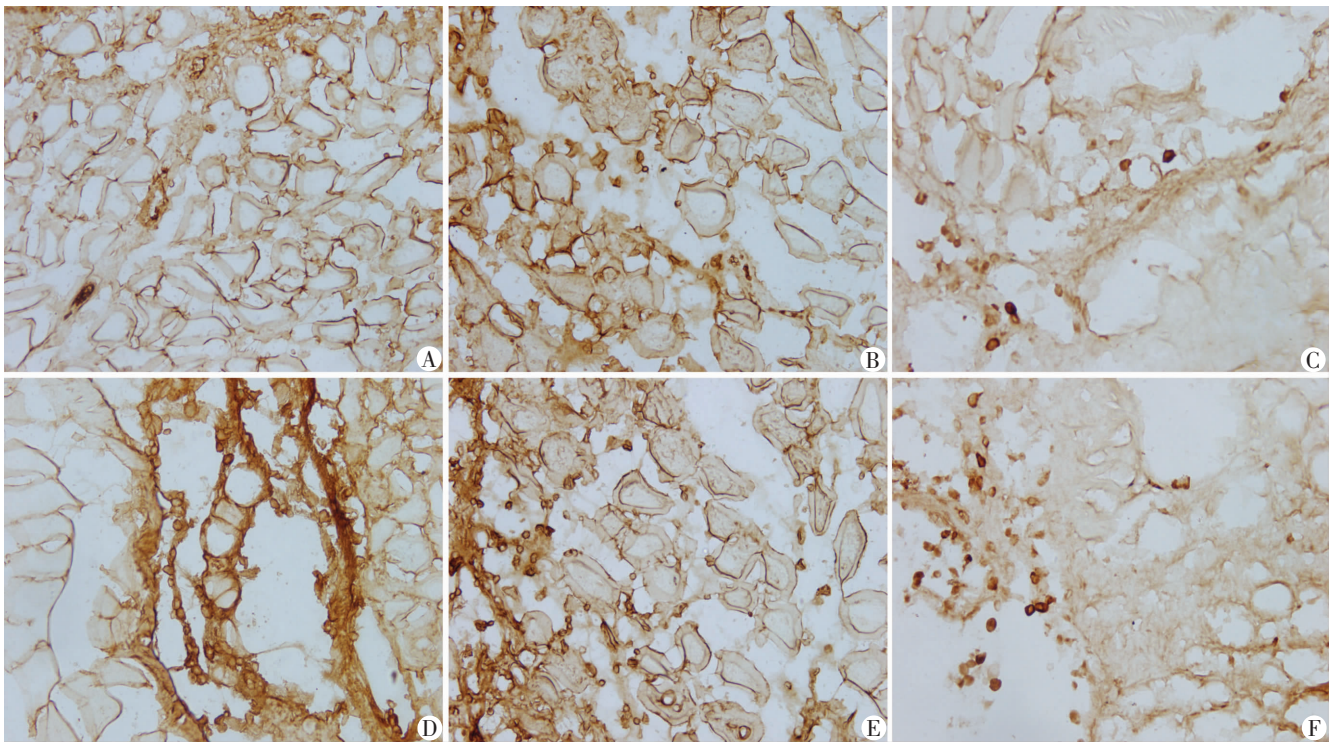


1:损伤 3 d 对照组;2:损伤 7 d 对照组;3:损伤 14 d 对照组;4:CoPP 处理 3 d 组;5:CoPP 处理 7 d 组;6:CoPP 处理 14 d 组

图 5 诱导 HO-1 表达增加对老年骨骼肌损伤模型中 M2 型巨噬细胞浸润的 SABC 染色的半定量分析结果

3 讨论

骨骼肌是受老化进程影响最大的组织器官之一,伴随着衰老进程,骨骼肌组织微环境常出现两类明显



A:损伤 3 d 对照组;B:损伤 7 d 对照组;C:损伤 14 d 对照组;D:CoPP 处理 3 d 组;E:CoPP 处理 7 d 组;F:CoPP 处理 14 d 组

图 6　诱导 HO-1 表达增加对老年骨骼肌损伤后炎症反应中 M2 型巨噬细胞浸润的影响　(SABC ×200)

病理改变即氧化应激和炎症反应,研究显示它们是导致组织稳态失衡和再生能力下降的重要原因[2]。HO-1 具有抗氧化、抗炎等细胞保护和维持内环境稳态的作用,对造血系统干细胞微环境具有重要的调节作用[5-6];但诱导 HO-1 表达增加对老年骨骼肌微环境的影响目前尚不清楚。

HO-1 作为一种应激保护蛋白,生理情况下在许多组织器官仅有低水平表达,但在低氧、多种细胞因子、热休克及氧化应激等条件下常被诱导上调[3]。本研究发现老年肌组织 HO-1 表达量明显高于成年组,但在注射诱导剂 CoPP 后,老年 CoPP 组 HO-1 表达量的升幅却显著低于成年 CoPP 组,提示与成年相比,老年骨骼肌对 CoPP 的反应性下降。

氧化应激的发生是机体内氧化与抗氧化系统功能失衡的结果,它既可能源于以活性氧自由基为代表的氧化分子产生增多,也可能由于组织内抗氧化系统特别是抗氧化酶类的合成减少所致[7-8]。近年研究提示老年人对于生理条件引起的氧化应激更为敏感[9]。本研究同时检测了骨骼肌组织内氧化标志分子和抗氧化酶类的表达及活性,显示腹腔注射 CoPP 后,肌组织 MDA、H_2O_2 含量降低,提示 HO-1 是老年骨骼肌中过氧化反应的一种抑制剂;SOD、CuZn-SOD、GSH-Px、CAT 酶活性升高,说明这些抗氧化酶降低了氧化应激对肌组织的损害,HO-1 提高了老年骨骼肌内的抗氧化反应程度。

骨骼肌损伤早期组织呈现急性炎症反应,我们通过建立老年骨骼肌损伤模型,显示损伤后 3 d 中性粒细胞大量浸润,7 d 时有所减少;诱导 HO-1 表达增加后中性粒细胞浸润减少,提示 HO-1 高表达可以降低老年骨骼肌损伤早期炎症反应。文献[10-11]报道老年骨骼肌运动损伤后中性粒细胞大量浸润会释放 MPO,继而加重组织微环境内的氧化应激反应。Ghaly 等[9]研究也显示老年小鼠骨骼肌挫伤后,MPO 和 NFκβ 含量增加,会增加炎症反应程度。研究表明骨骼肌损伤后的强大再生能力主要依赖于急性炎症后肌卫星细胞的活化增殖,在此过程中发挥关键激活作用的是炎性反应后期具有抗炎作用的 M2 型巨噬细胞[12-16]。我们应用标记分子 CD163 观察了损伤后肌组织 M2 型巨噬细胞浸润和诱导 HO-1 表达增加的影响,显示 3 d 时 M2 型巨噬细胞较少,7 d 时有浸润量最大,经 CoPP 诱导后 CD163 的表达量显著高于损伤对照组;提示损伤后诱导 HO-1 表达增加可能有助于损伤骨骼肌组织卫星细胞的活化增殖。诱导 HO-1 表达增加后,通过降低氧化应激和炎症反应以及二者之间

的相互影响等途径,共同改善了老年骨骼肌微环境。

近年来有关肌卫星细胞功能属性的研究显示,老年骨骼肌卫星细胞增殖分化能力的下降是其再生能力减退的主要原因。本研究尚未阐明上述微环境的改变与肌卫星细胞功能下降有何内在联系,减轻骨骼肌氧化应激和改善炎性环境对卫星细胞增殖分化及肌肉再生能力有何影响等问题仍需进一步研究。

总之,诱导 HO-1 表达增加可以有效降低老年骨骼肌氧化应激和炎症反应,有助于骨骼肌损伤修复,对此领域的研究将有助于发掘促进老年骨骼肌再生能力的新途径,有效防治增龄性骨骼肌丢失症等肌萎缩性疾病的发生、发展。

参考文献:

[1] Carosio S, Berardinelli M G, Aucello M, *et al*. Impact of ageing on muscle cell regeneration[J]. Ageing Res Rev, 2011, 10(1): 35-42.

[2] Meng S J, Yu L J. Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia[J]. Int J Mol Sci, 2010, 11(4): 1509-1526.

[3] Soares M P, Bach F H. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential[J]. Trends Mol Med, 2009, 15(2): 50-58.

[4] Abraham N G, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase[J]. Pharmacol Rev, 2008, 60(1): 79-127.

[5] Cao Y A, Wagers A J, Karsunky H, *et al*. Heme oxygenase-1 deficiency leads to disrupted response to acute stress in stem cells and progenitors[J]. Blood, 2008, 112(12): 4494-4502.

[6] Sambuceti G, Morbelli S, Vanella L, *et al*. Diabetes impairs the vascular recruitment of normal stem cells by oxidant damage, reversed by increases in pAMPK, heme oxygenase-1, and adiponectin[J]. Stem Cells, 2009, 27(2): 399-407.

[7] Filippin L I, Cuevas M J, Lima E, *et al*. Nitric oxide regulates the repair of injured skeletal muscle[J]. Nitric Oxide, 2011, 24(1): 43-49.

[8] Huang C C, Tsai S C, Lin W T. Potential ergogenic effects of L-arginine against oxidative and inflammatory stress induced by acute exercise in aging rats[J]. Exp Gerontol, 2008, 43(6): 571-577.

[9] Ghaly A, Marsh D R. Aging-associated oxidative stress modulates the acute inflammatory response in skeletal muscle after contusion injury[J]. Exp Gerontol, 2010, 45(5): 381-388.

[10] Dalla-Libera L, Ravara B, Gobbo V, *et al*. A transient antioxidant stress response accompanies the onset of disuse atrophy in human skeletal muscle[J]. J Appl Physiol (1985), 2009, 107(2): 549-557.

[11] Mazumdar J, O'Brien W T, Johnson R S, *et al*. O2 regulates stem cells through Wnt/β-catenin signalling[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(10): 1007-1013.

[12] St-Pierre B A, Tidball J G. Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension[J]. J Appl Physiol (1985), 1994, 77(1): 290-297.

[13] Tidball J G, Villalta S A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010, 298(5): R1173-R1187.

[14] Deng B, Wehling-Henricks M, Villalta S A, *et al*. IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration[J]. J Immunol, 2012, 189(7): 3669-3680.

[15] Mounier R, Theret M, Arnold L, *et al*. AMPKα1 regulates macrophage skewing at the time of resolution of inflammation during skeletal muscle regeneration[J]. Cell Metab, 2013, 18(2): 251-264.

[16] 周宪宾, 姚成芳. 巨噬细胞 M1/M2 极化分型的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(10): 957-960.

(**收稿**:2014-12-22;**修回**:2015-01-15)

(编辑　吴培红)