DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.23.005
第26卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 23
2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

文章编号:1000-5404(2004)23-2093-04

论著

机械牵张对缺氧复合烧伤血清乳鼠心肌细胞NF-κB活化情况观察

范鹏举[1],黄跃生[1],黄晓元[2],郑 军[1] ([1]第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038;[2]中南大学湘雅医院烧伤整形外科,长沙 430008)

提 要:目的 观察缺氧复合烧伤血清对心肌细胞NF-κB的影响以及在此条件下高牵张刺激对心肌细胞NF-κB的影响。方法 采用原代培养的乳鼠心肌细胞,分别给予正常血清(SN组)、烧伤血清+缺氧(1%O_2)(SH组)、烧伤血清+缺氧(1%O_2)+10%轴向静态牵张(SHS组)3种处理,采用Western bloting检测p50、p65、IκB-α表达水平,并以免疫荧光检测p50核转位情况。结果 同SN组比较,SH组、SHS组p50、p65表达增强,SHS组p50、p65表达水平较SH组升高,p50发生较明显的核转位而IκB-α表达水平却下降。结论 缺氧复合烧伤血清促进心肌细胞NF-κB的表达与核转位,机械牵张加强了这一作用。

关键词:NF-κB;烧伤;机械牵张
中图法分类号:R322.11;R392.13;R644.02 文献标识码:A

Effects of high stretch on the activation of NF-κB in cardiomyocytes under hypoxia combined with burn sera

FAN Peng-ju[1], HUANG Yue-sheng[1], HUANG Xiao-yuan[2], ZHENG Jun[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Burns, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 430008, China)

Abstract: Objective To observe the effects of high stretch on NF-κB in cardiomyocytes under burn sera combined with hypoxia. Methods Ventricular cardiomyocytes isolated from neonatal rats were employed in this study. The cells were stimulated by sera of normal rats (SN group), burn sera and hypoxia (SH group), burn sera and hypoxia and 10% axial static stretch (SHS group), respectively. Expressions of p50, p65, and IκB-αin the cardiomyocytes were determined by Western blotting and the translocation of the former two was determined by immunofluorescence. Results Enhanced expression and activation of p50 and p65 were found in SH and SHS groups as compared with those in SN group. The expression and activation of p50 and p65 in SHS group were higher than those in SH group, but IκB-α decreased at the same time. Conclusion Mechanical stretch can enhance the expression and nuclear translocation of NF-κB resulted from hypoxia combined with burn sera.

Key words: NF-κB; burn; mechanical stretch

NF-κB是一种具有多向调节作用的核转录因子,广泛调控着昆虫至人类的一系列基因的表达,尤其是与免疫反应、应激反应和炎症反应相关的基因。体外实验显示,缺氧可以激活血管内皮细胞及心肌细胞中NF-κB的活性。严重烧伤后常常合并机体缺氧[1],以及各种原因所致的心负荷增加。本研究通过构建严重烧伤后心肌负荷增加的体外细胞模型,着重探讨缺氧复合烧伤血清对心肌细胞NF-κB的影响及在此条件下高牵张刺激对心肌细胞NF-κB的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

DMEM/F12培养基、硅酮膜(由重庆大学生物工程学院黄

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054205);国家杰出青年科学基金资助项目(30125040)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054205) and the National Science Fund for Young Distinguished Scholars (30125040)
作者简介:范鹏举(1973-),男,河南省林州市人,博士研究生,主要从事创面修复,瘢痕形成机制及严重烧伤后脏器功能方面的研究。电话:(0731)4327006
通信作者:黄跃生,电话:(023)68754173,E-mail:yshuang@public.cta.cq.cn
收稿日期:2004-09-10;修回日期:2004-11-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

启平博士提供)，p65、p50和IκB-α抗体(北京中山)，山羊抗兔IgG-HRP(Cell Signaling technology公司美国)，山羊抗兔IgG-FITC(北京中山)，BCA-200蛋白定量试剂盒(Pierce公司美国)，半干转移电泳仪(Pharmacia)，紫外分光光度计(Beckman美国)，免疫荧光显微镜(日本，Olympus)。

1.2 方法

1.2.1 乳鼠原代心肌细胞培养及纯化 心肌细胞来源于正常SD大鼠之乳鼠心室肌，心肌细胞分离采用胰酶组织消化法，纯化采用差速贴壁法和Brdu化学抑制法。具体方法参见文献[2]。将消化后细胞接种至FBS衬底的硅酮膜上(将FBS加入硅酮膜上，37 ℃静置4 h后弃去FBS，并以PBS冲洗两次即完成衬底)，置入细胞培养箱，隔日换液，改用不含Brdu的培养基。4~5 d后施加刺激因素。

1.2.2 细胞牵张装置的制备及牵张方法 裁取3.6 cm×6.4 cm大小的硅酮膜，硅酮膜两端各使用硅胶粘着固定3.6 cm长硅胶管(内径1.5 mm，外径3 mm)，选直径12 cm的培养皿内选取7.2 cm×3.6 cm区域，四角分别粘着固定一段5 mm长硅胶管。牵张时，7 cm长的钢针穿过硅酮膜两端的硅胶管，向两端牵拉硅酮膜将其固定于支架上，此时硅酮膜牵张延长约10%(误差0.3 mm内)。根据实验要求牵张相应时间。

1.2.3 正常大鼠及烧伤大鼠血清制备 正常及40%、Ⅲ度烧伤6 h后SD大鼠，无菌操作抽取腹主动脉血。4 ℃过夜待血块凝缩，仔细吸出血清，4 ℃离心(3 000 r/min)15 min，取上清，56 ℃加热30 min灭活补体。分装，-20 ℃冻存备用。

1.2.4 损伤实验、分组及时相点设置 正常组(SN组)：正常培养的心肌细胞。烧伤血清+缺氧组(SH组)：于正常培养的心肌细胞中加入体积分数10%的烧伤血清进行缺氧培养(37 ℃，O_2、N_2、CO_2的体积分数分别为1%、94%、5%)；制作烧伤缺氧模型。烧伤血清+缺氧+10%牵张组(SHS组)：在缺氧复合烧伤血清条件下，牵张硅酮膜。每组取3个标本，刺激1、3、6、12 h后收集相应标本进行检测。

1.3 观察指标

1.3.1 p65、p50和IκB-α水平变化 不同时相点收集细胞，PBS冲洗2次后，RIPA裂解液(Tris-HCl：50 mmol/L，pH 7.4，NP-40：1%，Na-deoxycholate：0.25%，NaCl：150 mmol/L，EDTA：1 mmol/L，PMSF：1 mmol/L，Aprotinin，leupeptin，pepstatin：1 microgram/ml each，activated Na_3VO_4：1 mmol/L，NaF：1 mmol/L)裂解细胞，12 000× g、4 ℃离心10 min，收集上清。BSA为标准蛋白，BCA法蛋白定量。20 μg总蛋白10%SDS-PAGE电泳分离，电转于硝酸纤维素膜，之后20 g/L脱脂奶粉-TBS溶液室温封闭1 h，加入特异性p65、p50和IκB-α(rabbit IgG)一抗4 ℃保温过夜，0.05%TBST洗膜，每次5 min，共3次，二抗山羊抗兔IgG-HRP于37 ℃孵育1 h，上述方法洗膜3次，化学发光底物孵育，硝酸纤维素膜暗室感光胶片感光，冲洗。扫描后用Bandscan5.0行灰度分析，以灰度值表示。

1.3.2 检测p50核转位 施加刺激因素1h后，弃培养基，冰PBS冲洗3次，含0.3%Triton-X-100的4%多聚甲醛(pH 7.4)4 ℃固定30 min，PBS冲洗3次，每次5 min，10%山羊血清室温封闭15 min，PBS同上冲洗3次，2%BSA稀释一抗(p50，1∶1 000)，4 ℃过夜，PBS同上冲洗3次，2%BSA稀释二抗(山羊抗兔IgG-FITC)，37 ℃暗湿盒孵育30 min。去离子水冲洗1 min，免疫荧光显微镜观察，摄像。

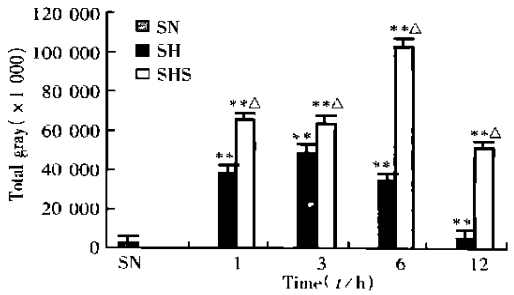
1.4 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS12.0软件进行方差分析、t检验。

2 结果

2.1 心肌细胞p50的表达

同SN组比较，施加烧伤血清复合缺血刺激和烧伤血清复合缺血+10%轴向静态牵张刺激，p50水平表达上调，SHS组表达较同时相点SH组高。SH组12 h表达水平开始明显下降，SHS组12 h仍维持较高水平(图1)。



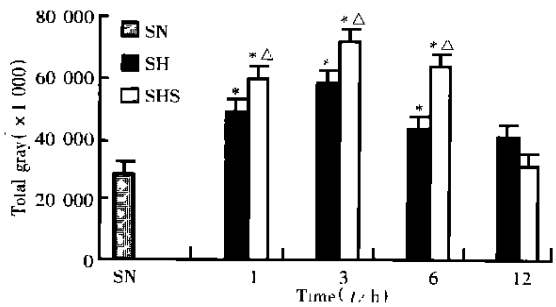
**：$P<0.01$，*vs* SN；△：$P<0.01$，*vs* SH

图1 p50各时相点灰度值比较

Fig 1 Comparison of gray scales of p50 in SN, SH, and SHS groups

2.2 p65的表达

同SN组比较，SH组、SHS组p65水平升高，而SHS组相同时相点较SH组为高($P<0.01$)，两组12 h p65表达水平和正常组相比无显著性差异，表现出和p50不相同的规律(图2)。



*：$P<0.05$，*vs* SN；△：$P<0.05$，*vs* SH

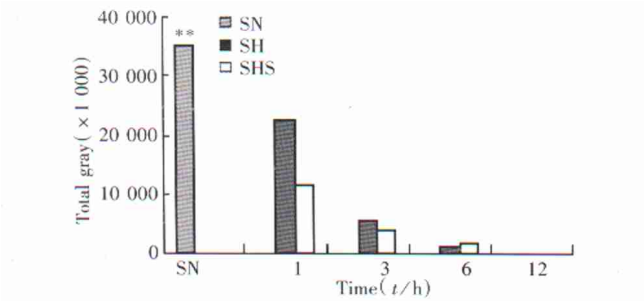
图2 p65各时相点光密度值比较

Fig 2 Comparison of gray scales of p65 in SN, SH, and SHS groups

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3　IκB-α 的表达

同 SN 组比较, SH 组、SHS 组 IκB-α 水平随刺激时间延长而下降, 12 h 二者都未见其表达(图 3)。



**: $P<0.01$, *vs* SN and SHS

图 3　IκB-α 在 SN、SH、SHS 组各时相点光密度值比较

Fig 3　Comparison of gray scales of IκB-α in SN, SH, and SHS groups

2.4　p50 核转位观察

p50 发生核转位, 仅检测施加刺激因素 1 h 后 p50 核转位情况, 见图 4~6。

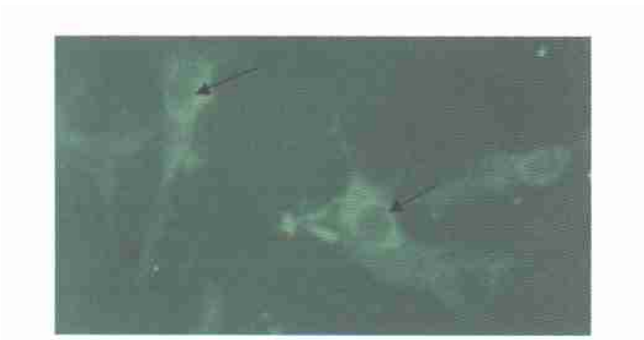


图 4　正常组 **p50** 主要在胞质中表达, 胞核未见明显表达, 如箭头所示　(免疫荧光法× 400)

Fig 4　p50 expressed mainly in the cytoplasm but little in the nucleus　(IFA× 400)



图 5　施加烧伤血清复合缺血后, **p50** 发生核转位, 箭头所示 **p50** 在胞核表达增加　(免疫荧光法× 400)

Fig 5　Nuclear translocation of p50 in cardiomyocytes stimulated by burn sera and ischemia　(IFA× 400)

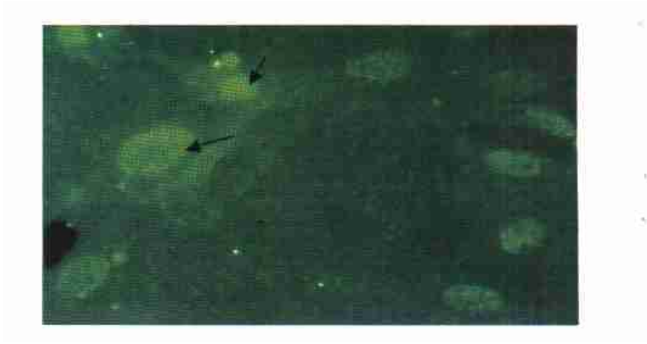


图 6　烧伤血清复合缺血+ 牵张刺激, **p50** 发生核转位, 箭头所示 **p50** 在胞核表达　(免疫荧光法× 400)

Fig 6　Nuclear translocation of p50p in cardiomyocytes stimulated by burn sera and ischemia and 10% axial static stretch　(IFA× 400)

3　讨论

静息情况下, NF-κB 以同源或异源二聚体(主要是 p50 与 p65)形式存于胞浆, 与抑制性蛋白 IκB 结合呈无活性状态。当细胞外刺激(如细胞因子、LPS、病毒、紫外线和活性氧自由基等)通过一系列信号转导, IκB 经磷酸化、泛素化和蛋白体酶途径而降解, 导致 NF-κB-IκB 复合物解体, NF-κB 活化, 借助于被暴露的核定位信号(NLS) 进入细胞核, 与核内靶基因的特异序列结合并启动转录。它与免疫细胞的活化, T 和 B 淋巴细胞的发育, 应激性反应, 细胞凋亡等多种细胞活动有关。在心肌细胞, 也存在 NF-κB 的表达, 黄颖等[3] 综述了 NF-κB 在心血管疾病中的作用, 指出: NF-κB 与心力衰竭的心肌病理过程, 急性心血管事件, 心肌缺血再灌注炎性因子的活化都有较大关系。

严重烧伤后, 心肌常常处于缺血缺氧状态, 既往研究[4,5] 证实单纯缺氧能够激活 NF-κB, 但缺氧复合烧伤血清对心肌细胞 NF-κB 影响如何尚少见报道。本实验显示 NF-κB 被激活, p50 较 p65 更明显。与此相对照, IκB-α 随着刺激时间的延长, 表达逐渐递减, 尽管当刺激时间延长时(12 h), NF-κB 表达有所降低, 但 IκB-α 表达并没有回升。上述结果提示: 心肌细胞在严重烧伤后存在 NF-κB 的激活, NF-κB 可能参与严重烧伤后心肌的病理生理过程。

心肌负荷增高促进了 NFκB 的表达和 IκBα 的降解。国内外研究[6~8] 表明: 机械牵张可激活 NF-κB, 可能是机械牵张激活 ROS, 进一步导致 NF-κB 的激活。本实验中, 在缺氧复合烧伤血清条件下, 通过对培养的乳鼠心肌细胞施加 10%轴向静态牵张, 证实 NF-κB 同样被激活, 且激活程度较缺氧复合烧伤血清刺激为强,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

说明严重烧伤后,伴随着心肌负荷增加可能会进一步促进 NF-κB 活化。单纯对心肌细胞施加 20%的轴向静态牵张时,免疫组化示施加刺激 1 h 未见 NF-κB 核转位,而在本实验中,在施加刺激 1 h 就出现明显的核转位,以上都说明缺氧复合烧伤血清、机械牵张在激活 NFκB 时有协同作用。

总之,本实验研究着眼于严重烧伤后心肌细胞 NF-κB 表达激活情况尤其是在心肌负荷增加时的情况,实验说明缺氧、烧伤血清、高机械刺激能够协同促使 NF-κB 表达激活,说明 NF-κB 可能是心肌细胞对严重烧伤后机体生理环境巨大变化反应的重要信号分子,但是否参与严重烧伤后心肌细胞损伤仍需进一步研究。

参考文献:

[1] 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[J]. 中华创伤杂志, 2002, 18(4): 205-209.

[2] 胡安根, 黄跃生. c-jun 反义基因重组体转染对缺氧复合烧伤血清刺激下大鼠心肌细胞的保护作用[J]. 中华烧伤杂志, 2003, 19(5): 267-270.

[3] 黄 颖, 陈运贞. NF-κB 与心血管疾病[J]. 心血管病学进展, 2002, 23(4): 246-250.

[4] 佘 强, 陈运贞. 大鼠缺血心肌中 NF-κB 活性改变及其对 iNOS 表达的影响[J]. 基础医学与临床, 2003, 23(2): 204-207.

[5] Chandrasekar B, Smith J B, Freeman G L. Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor-KappaB and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine[J]. Circulation, 2001, 103(18): 2296-2302.

[6] Cook S A, Novikov M S, Ahn Y, *et al*. A20 is dynamically regulated in the heart and inhibits the hypertrophic response[J]. Circulation, 2003, 108(6): 664-667.

[7] Higuchi Y, Otsu K, Nishida K, *et al*. Involvement of reactive oxygen species-mediated NF-kappaB activation in TNF-α-induced cardiomyocyte hypertrophy[J]. J Mol Cell Cardiol, 2002, 34(2): 233-240.

[8] 刘荣韬, 尹华虎, 王正荣. 牵张刺激诱导心肌细胞 NF-κB 激活及其机制研究[J]. 中国医学物理学杂志, 2001, 18(3): 173-175.

(编辑 刘洪娥)

(上接 2092 页)

于高血糖会改变 B 细胞特异性转录因子活性,使胰岛素基因转录下降,因此长期高血糖会造成胰岛素的生理分泌模式改变。高血糖也可通过诱导凋亡,对 B 细胞的数量产生不利影响,它不会使 B 细胞和新生出现代偿性的升高。目前有研究对这种过高葡萄糖浓度的不利作用被称为"葡萄糖毒性"[2]。

Rossetti 等[3]认为切除部分胰腺的动物并不一定产生糖尿病,除非剩余的胰腺分泌胰岛素能力进行性丧失,而只有当 B 细胞减少达 80%-90%时才会发生明显的糖尿病。因为胰腺切除60%的大鼠分别经自来水和10%葡萄糖饲养后,自来水组的大鼠血浆葡萄糖水平和胰岛素水平与正常对照组相同,而用葡萄糖饲养的大鼠血浆胰岛素水平明显下降,血浆葡萄糖水平轻度增高。而胰腺切除 90%的大鼠在 2 周内就出现轻度高血糖症及糖耐量下降,若对此组大鼠持续静脉输注根皮苷(一种葡萄糖转运抑制剂,可阻止近端肾曲小管对超生理量的血浆葡萄糖进行再吸收)后,其血浆葡萄糖水平和胰岛素水平完全恢复正常,与对照组相同,而未行此种处理的大鼠则持续发展成为糖尿病。作者根据在大鼠体内、体外的研究结果,推测慢性高血糖症是 B 细胞不能对急性高血糖刺激引起反应的重要原因。

Rossetti 还提出葡萄糖毒性是造成 B 细胞耗竭的因素之一。由于这类患者胰腺内胰岛数量减少或胰岛素合成/分泌装置有先天性生化缺陷,在没有遭受额外应激时(即未发生胰岛素抵抗时),B 细胞的缺陷在临床上不表现症状,当发生高血糖症时,应激状态下的胰岛 B 细胞不能长期维持高速率的胰岛素分泌,以致产生耗竭。由于这种改变是可逆的,因此不难解释一旦血浆葡萄糖浓度正常化,并且在中断治疗后,胰岛素分泌及糖耐量的改善往往还能保持一段时间。

目前各项研究已充分认识到高血糖对 B 细胞的毒性作用,Federic 等所作的研究证实高血糖对胰岛 B 细胞的毒性作用是由于增加了胰岛细胞的凋亡。采用短期胰岛素强化治疗使血糖迅速恢复正常,有利于减轻胰岛 B 细胞凋亡,恢复胰岛 B 细胞的功能[4]。而梁常禧等[5]对糖毒性作用全部采取胰岛素强化治疗取得了较好效果。因此我们认为应及早使用胰岛素强化治疗,尽快解除胰岛 B 细胞的高糖负荷状态,减少高血糖对 B 细胞的毒性作用,使之得到充分"休息",从而尽早恢复其应有功能。

关键词: 2 型糖尿病; 胰岛素强化治疗; 胰岛功能恢复
中图法分类号: R587.1 文献标识码: B

参考文献:

[1] 夏渝敏, 杨孝清. 利用 OGIRT 探讨糖毒作用在糖尿病中的表现[J]. 辽宁实用糖尿病杂志, 2001, 3(9): 44-45.

[2] Kaiser N, Leibowitz G, Nesher R, *et al*. Glucotoxicity and beta-cell failure in type 2 diabetes mellitus[J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2003, 16(1): 5-22.

[3] Rossetti L. Glucose toxicity[J]. Diabetes Care, 1990, 13(6): 601-630.

[4] 李玉秀. 2 型糖尿病治疗措施与减缓胰岛 B 细胞凋亡的再认识和思考[J]. 辽宁实用糖尿病杂志, 2003, 1(11): 54-55.

[5] 梁常禧, 任志玲. 对葡萄糖毒作用的胰岛素强化治疗观察[J]. 辽宁实用糖尿病杂志, 2000, 8(3): 28-29.

(编辑 刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net