DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.23.003
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)23-2089-04

论著

机械牵张对烧伤血清复合缺氧培养大鼠心肌细胞p38、JNK、c-jun、ATF-2表达的影响

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 构建严重烧伤后合并心肌负荷增加的体外心肌细胞模型,探讨p38、JNK、c-jun、ATF-2的活化情况,明确高机械牵张刺激对严重烧伤后心肌细胞损伤信号的传导。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Westem bloting检测磷酸化p38、JNK、c-jun、ATF-2水平。结果 施加缺氧复合烧伤血清刺激后,磷酸化p38、c-jun、ATF-2水平升高。在施加高机械牵张后p38升高更加明显,而后两者与前者表现相反。JNK自始至终没有出现活化。结论 严重烧伤后,p38可能是介导心肌细胞损伤的重要信号传导分子,而JNK并未参与严重烧伤后心肌细胞损伤的信号传导,转录因子c-jun、ATF2亦可能参与严重烧伤后心肌细胞的损伤,但在严重烧伤合并心脏负荷增加的情况下可能并不是主要的调控因子。

关键词:p38;c-jun;ATF2;烧伤;机械牵张
中图法分类号:R322.11;R363.11;R644.02 文献标识码:A

High stretch accelerates the activation of p38MAPK in cardiomyocytes under burn sera and hypoxia

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 investigate the activation of p38, JNK, c-jun, and ATF2 by high stretch in cardiomyocytes after severe burn and to understand the signal transduction through which the high stretch injuries cardiomyocyte after the severe burn. Methods Ventricular cardiac myocytes 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. Activation of p38, JNK, c-jun, and ATF2 in cardiomyocytes was determined by Western bloting. Results The activation of p38, c-jun, and ATF2 in SH group and SHS group increased as compared with that in SN group. High stretch on cardiomyocytes under burn sera and hypoxia induced significant increase of p38, but the latter two were different from the former one. JNK was not activated by the two stimuli. Conclusion After severe burn, p38 may be the important signal transducer in cardiomyocytes, but JNK may not take part in this signal transduction. C-jun and ATF2 may contribute to cardiomyocyte damage after sever burn, but they may not be the main regulatory factors after severe burn combined with the increase of heart load.

Key words: p38; c-jun; ATF2; burn; mechanical stretch

严重烧伤合并吸入性损伤时除了一般严重烧伤的病理生理特点外,其早期缺氧尤其突出,缺氧包括肺脏局部缺氧和全身缺氧,肺脏缺氧导致肺血管痉挛,肺循环高压,右心后负荷加重,如果再合并早期不正确超大量补液,左心包括右心前负荷也会加重,这样心脏除了受到缺血缺氧、应激反应以及炎性反应产生的激素、细胞因子和炎性因子等刺激外,还受到负荷加重的机械刺激。本所研究业已证实p38、c-jun、ATF-2参与缺氧复合烧伤血清所致的心肌细胞损伤,本研究重点通过

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054205)和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:2004-11-14

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

构建严重烧伤后合并心肌负荷增加的体外大鼠心肌细胞模型,考察高机械刺激对烧伤血清复合缺氧大鼠心肌细胞 p38、JNK、c-jun、ATF-2 活化情况。

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启平博士提供),磷酸化 p38 抗体、磷酸化 JNK 抗体、磷酸化 c-jun 抗体、磷酸化 ATF-2 抗体山羊抗兔 IgG-HRP(Cell Signaling technology 公司 美国),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[1]。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 2 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),于直径 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 硅胶管。牵张时,7 cm 长的钢针穿过硅酮膜两端的硅胶管,向两端牵拉硅酮膜并将其固定于支架上,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

Western bloting 检测 p-p38、p-JNK、p-c-jun、p-ATF-2 水平变化。收集细胞,经冰 PBS 冲洗 2 次后,采用 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。以 BSA 为标准蛋白,采用 BCA 法蛋白定量。20 μg 总蛋白 10%SDS-PAGE 电泳分离,转移到硝酸纤维素膜上,20 g/L 脱脂奶粉-TBS 溶液室温封闭 1 h,加入特异性 p-p38、p-JNK、p-c-jun、p-ATF-2(rabbit IgG)一抗在 4 ℃条件下保温过夜,0.05% TBST 洗膜,每次 5 min,共 3 次,二抗使用山羊抗兔 IgG-HRP 于 37 ℃孵育 1 h,上述方法洗膜 3 次后,化学发光底物孵育,硝酸纤维素膜于暗室中用感光胶片感光,冲洗。结果经扫描后用 Bandscan5.0 软件行灰度扫描,以灰度值表示。

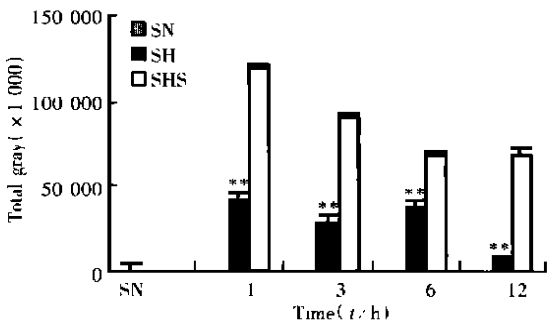
1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS120.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 p-p38 的表达

p-p38 水平,SN 组基本未见表达,SH 组、SHS 组 p-p38 水平升高,SH 组6 h 达高峰,12 h 明显下降,SHS 组同时相点都较 SH 组为高($P<0.05$),1 h 达高峰,12 h 仍表达明显,见图 1。



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

图 1 p-p38 在 SN、SH、SHS 组各时相点灰度值比较

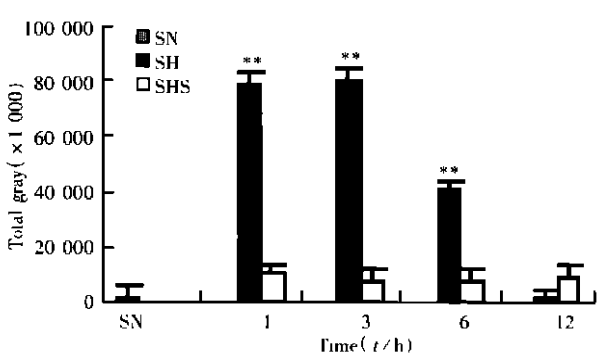
Fig 1 Comparison of gray scales of p-p38 in SN, SH and SHS groups

2.2 p-JNK 的表达

p-JNK 正常组、SH 组、SHS 组均无表达。

2.3 p-c-jun 的表达

正常情况下,p-c-jun 很少活化,缺氧复合烧伤血清刺激后,活化明显增强,1 h 即达高峰,随后减弱,12 h 后已基本检测不到;与此对照,在缺氧复合烧伤血清基础上施加机械牵张刺激后,其活化水平低于 SH 组,见图 2。



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

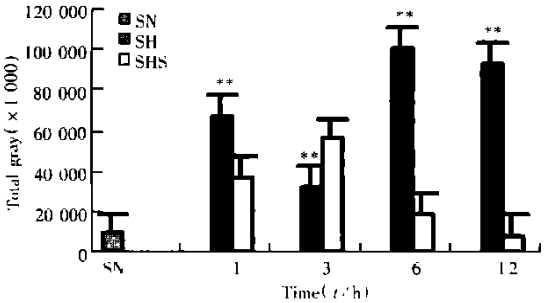
图 2 p-c-jun 在 SN、SH、SHS 组各时相点灰度值比较

Fig 2 Comparison of gray scales of p-c-jun in SN, SH, and SHS groups

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

2.4　SH 组和 SHS 组心肌细胞 p-ATF2 的表达

对于 p-ATF2 的活化情况基本和 p-c-jun 相似, 但其在缺氧复合烧伤血清刺激后 6、12 h 活化却增强, 见图 3。



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

图 3　p-ATF2 在 SN、SH、SHS 组各时相点灰度度值比较

Fig 3　Comparison of gray scales of p-ATF2 in SN, SH, and SHS groups

3　讨论

先前的研究提示严重烧伤后机体处于缺血缺氧状态, 而且伴随着大量的炎性因子、细胞因子的释放[2], 如前所述, 吸入性损伤、不正确大量补液都可导致心肌负荷加重。通过对培养的 SD 大鼠心肌细胞施加缺氧复合烧伤血清刺激, 并施加 10%高牵张机械刺激, 模拟严重烧伤后机体缺血缺氧、大量炎性因子和细胞因子释放这一基本病理生理环境下心脏负荷增大的情况, 探讨 p38、JNK、c-jun、ATF-2 的活化情况。

本研究显示: 缺氧合并烧伤血清刺激乳鼠心肌细胞, p38、c-jun、ATF-2 活化增强, 加入 10%的机械张力刺激, p38 活化更加明显, 说明张力刺激促进了前者的活化; 但对于 c-jun、ATF2 而言机械张力并没有促进其活化, 相反, 二者活化水平降低。而 JNK 在正常、以及给与两种不同刺激情况下, 都没有出现变化。

应激丝裂酶原激活蛋白("stress-regulated" mitogen-activated protein kinases, SR-MAPKs)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着重要的调控作用[3]。有报道心肌组织或细胞处于缺血缺氧环境时, p38 表达增加, 本实验除缺氧因素外, 通过加入烧伤血清来模拟严重烧伤后心脏所处炎性环境, 发现: p38 无论在缺氧复合烧伤血清还是在缺氧复合烧伤血清+机械牵张情况下, 都出现高表达, 且后者表达水平明显高于前者。说明: ①缺氧复合烧伤血清(相当于严重烧伤后环境)促进心肌细胞 p38 的表达; ②机械牵张刺激在心肌细胞处于缺氧复合烧伤血清情况下促进 p38 的表达, 即 p38 通路可能是心肌对严重烧伤后负荷增加的应激性反应的重要传导通路。但同样的刺激下, JNK 未见表达。文献[4]报道: 心肌细胞缺血缺氧时 p38 表达增强, JNK 并不表达, 但在缺氧后的再灌注阶段表达增强。高张机械刺激, 无论在大体模型还是在细胞模型, p38、JNK 表达都增强。本实验中, 加入烧伤血清和牵张刺激, JNK 均无活化。说明 JNK 未参与严重烧伤后早期心肌细胞缺氧、负荷增加所致的心肌细胞损伤的信号传导。

c-jun、ATF-2 属于 AP-1 家族, 是 JNK、p38 的底物, 二者以二聚体或三聚体形式结合于顺式作用元件, 当上游激酶将其磷酸化后就成为活性形式而启动其下游基因转录[3,5]。c-jun 主要是通过 Ser-63 和 Ser-73 两个位点的磷酸化而活化。ATF-2 包含 3 个磷酸化位点, 即: Thr-69, Thr-71 和 Ser-90, 但 Ser-90 不直接参与转录。c-jun 参与心肌细胞肥大、凋亡等反应[6,7]。ATF-2 通过结合于 cAMP 反应元件(CREs), 参与调节各种炎性蛋白的表达[8]。心肌组织或细胞在受到缺血缺氧或高机械张力时二者表达活化增强[9]。我们先前反义基因重组技术阻断 c-jun 证实: 缺氧复合烧伤血清刺激可使大鼠心肌细胞 c-jun 表达上调, 进而引起心肌细胞损伤, c-jun 反义基因重组体转染对该刺激条件下的心肌细胞具有保护作用。本实验中, 无论缺氧复合烧伤血清刺激, 还是缺氧复合烧伤血清+机械张力刺激, 两者活化都增强, 但后者活化水平并未如预期高于前者, 其活化水平反而降低。本实验中我们仅检测二者活化水平, 即其磷酸化形式, 未检测其总表达水平, 而总表达水平降低后, 亦会引起磷酸化水平降低(底物减少); 由于二者是 p38、JNK 下游底物, 尽管 JNK 未活化, 但 p38 活化却明显增强, 推测二者在牵张时活化水平降低可能是由于其总表达水平降低, 且二者在缺氧复合烧伤+机械牵张刺激时并不是心肌细胞损伤的主要调控因子, p38 介导严重烧伤后心肌细胞损伤可能是通过其他转录因子。

总之: 在本实验中 p38 活化明显增强, JNK 未活化, 二者下游底物 c-jun、ATF-2 活化增强。我们认为: 严重烧伤后早期, p38 是重要的心肌损伤信号传导因子, p38 的下游转录因子 c-jun、ATF-2 可能参与心肌损伤, 但在严重烧伤伴随心肌负荷增加时, 尽管 p38 作用仍然很重要, 但可能并非主要通过 c-jun、ATF-2, 而可能存在其他信号传到通路。

参考文献:

[1] 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.

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

[2] 黄跃生. 重视缺氧缺氧与细胞因子在"休克心"发生机制中的作用[J]. 中华烧伤杂志, 2002, 18(5): 261－262.
[3] Sugden P H, Clerk A. "Stress-Responsive" mitogen-activated protein kinases(c-Jun N-Terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium[J]. Circ Res, 1998, 83(4): 345－352.
[4] Wang Y, Su B, Sah V P, *et al*. Cardiac hypertrophy induced by mitogen-activated protein kinase kinase 7, a specific activator for c-Jun NH2-terminal kinase in ventricular muscle cells[J]. J Biol Chem, 1998, 273(10): 5423－5426.
[5] Clerk A, Sugden P H. Cell stress-induced phosphorylation of ATF2 and c-Jun transcription factors in rat ventricular myocytes[J]. Biochem J, 1997, 325(Pt 3): 801－810.
[6] Omura T, Yoshiyama M, Yoshida K. Dominant negative mutant of c-Jun inhibits cardiomyocyte hypertrophy induced by endothelin 1 and phenylephrine[J]. Hypertension, 2002, 39(1): 81－86.
[7] Aoyama T, Takemura G, Maruyama R, *et al*. Molecular mechanisms of non-apoptosis by Fas stimulation alone versus apoptosis with an additional actinomycin D in cultured cardiomyocytes[J]. Cardiovasc Res, 2002, 55(5): 787－798.
[8] Kawasaki H, Schiltz L, Chiu R, *et al*. ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation[J]. Nature, 2000, 405(6783): 195－200.
[9] Webster K, Discher D J, Bishopric N H, *et al*. Induction and nuclear accumulation of fos and jun proto-oncogenes in hypoxic cardiac myocyte[J]. J Biol Chem, 1993, 268(22): 16852－16876.

(编辑 刘洪娥)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2004)23-2092-01

2 型糖尿病胰岛素强化治疗后胰岛功能部分恢复 21 例报告

The functional recovery of type 2 diabetes after insulin therapy in 21 cases

卢劲辉, 郭 莲, 陈 兵 (第三军医大学西南医院内分泌科, 重庆 400038)

对我院 2000 年 9 月至 2003 年 9 月收治的 846 例 2 型糖尿病患者的血糖及胰岛素 C 肽释放试验进行分析, 发现有 21 例患者在使用胰岛素强化治疗后, B 细胞功能逐渐好转, 且部分患者随着 B 细胞功能的恢复, 胰岛素用量逐渐减少。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本组 21 例患者均符合 1999 年 WHO 关于 2 型糖尿病的诊断标准, 其中男 15 例, 女 6 例, 年龄最小 31 岁, 最大 70 岁, 平均 48.33 岁, 病程最短 2 周, 最长 5 年, 平均 3.7 年。

1.2 检测方法

分别采取空腹、糖负荷后 30 min、1、2 h 及 3 h 静脉血, 用放射免疫测定法对血样中的胰岛素及 C 肽进行测定, 同时用葡萄糖氧化酶法对血样中的葡萄糖水平进行测定。

1.3 入选标准

参照文献[1]报道的入选标准, 全部病例经 OGTT 及 C 肽释放试验发现血糖增高而 C 肽释放曲线无高峰且呈低平者, 予胰岛素强化治疗, 即三餐前 30 min 给予短效胰岛素, 睡前 30 min 给予中效胰岛素。血糖达控制目标并稳定一段时间后, 再行第 2 次胰岛素、C 肽释放试验, C 肽分泌值基本达到正常则说明胰岛 B 细胞功能得到一定程度的恢复。

1.4 统计学方法

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 软件进行配对 t 检验。

2 结果

本组 21 例患者均行胰岛素强化治疗, 患者血糖水平在 2～3 周内基本达控制标准, 治疗前后的血糖及胰岛素 C 肽各时相水平见表 1。血糖达标后未行任何治疗者 9 例, 继续进行降糖治疗者 12 例。

表 1 21 例患者治疗前后血糖及胰岛素 C 肽各时相水平($n=21$, $\bar{x}\pm s$)

	空腹	服糖后时间(min)			
		30	60	120	180
血糖 (mmol/L)					
治疗前	16.23±1.22	22.10±3.1	24.55±3.26	25.82±3.38	19.82±3.87
治疗后	5.84±0.26*	6.7±1.02*	7.10±1.14*	5.25±1.91*	5.02±1.06*
C 肽 (ng/ml)					
治疗前	1.21±0.46	1.80±0.31	2.22±0.26	2.77±0.78	2.15±0.37
治疗后	1.40±0.95**	4.50±0.82**	5.40±0.89**	6.88±1.64**	4.60±1.38**

与治疗前比较, *: $P<0.05$, **: $P<0.05$

3 讨论

2 型糖尿病的特点是胰岛素抵抗和 B 细胞功能进行性下降。分泌适量胰岛素的能力由 B 细胞的功能完整性和总体质量决定。葡萄糖是调节胰岛素分泌和产生的主要因素, 如果胰岛素分泌长期处于过量状态, 会对 B 细胞功能产生不利影响。长期高血糖对 B 细胞所造成的多种代谢的异常, 包括 B 细胞对葡萄糖的敏感性改变、基础胰岛素分泌上升, 对刺激胰岛素分泌的各种刺激物的反应性减低, 以及胰岛素储备逐渐耗竭。由

(下转 2096 页)

作者简介: 卢劲辉(1971－), 女, 广东省潮州市人, 主治医师, 主要从事糖尿病临床方面的研究, 现在重庆市特殊钢铁公司医院工作。电话: (023)65137492

收稿日期: 2004-06-03; 修回日期: 2004-10-28

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