DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.18.003
第25卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 18
2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

文章编号:1000-5404(2003)18-1599-03

论著

c-fos 反义基因转染对缺氧复合烧伤血清处理大鼠心肌细胞保护作用的实验研究

胡安根,黄跃生 (第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨 *c-fos* 反义基因转染对缺氧复合烧伤血清处理心肌细胞的保护作用。方法 烧伤血清采自30%TBSAⅢ度烫伤Wistar大鼠;采用含1%O_2的混合气体作为缺氧模型;采用基因重组技术构建 *c-fos* 反义基因重组体;由Lipofectamine kit介导心肌细胞转染;于缺氧复合烧伤血清处理1,3,7 h不同时相点采用RT-PCR检测 *c-fos* mRNA的表达变化,采用Western blot检测c-fos蛋白,肌钙蛋白-T(TnT)和β-微管蛋白(β-Tubulin)的表达变化。结果 加入烧伤血清并造成缺氧的非转染心肌细胞(下文称非转染组), *c-fos* mRNA和蛋白显著表达,3 h达到最高峰,与正常对照组比较,TnT和β-Tubulin表达显著下降,7 h降至最低水平;转染 *c-fos* 反义基因重组体(下文称转染组)后, *c-fos* mRNA和蛋白表达显著下降,TnT和β-Tubulin表达却显著回升。结论 缺氧复合烧伤血清处理产生的 *c-fos* 会引起心肌细胞损伤, *c-fos* 反义基因重组体转染对缺氧复合烧伤血清处理心肌细胞具有保护作用。

关键词:β-微管蛋白;肌钙蛋白-T;反义基因;缺氧;烧伤血清; *c-fos*;基因转染;PcDNA3.1(+)
中图法分类号:R322.1+1; R394.2; R644 文献标识码:A

Effect of *c-fos* antisense gene transfection on protection of cardiomyocytes following hypoxia and burn serum treatment in rats

HU An-gen, HUANG Yue-sheng (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of *c-fos* antisense gene transfection on the protection of cardiomyocytes following hypoxia and burn serum treatment. **Methods** Burn serum was collected from Wistar rats with 30% total body surface area (TBSA) of Ⅲ degree burns. The mixture gas containing 1% O_2 was used as hypoxia model. The *c-fos* antisense gene recombinant was constructed by genetic recombination technique. Cardiomyocytes from neonatal Wistar rats were cultured *in vitro* with hypoxia and burn serum treatment. *c-fos* antisense gene recombinant was transfected into the cultured cardiomyocytes. Expression of *c-fos* mRNA was determined by RT-PCR. Expressions of c-fos protein, troponin-T and β-Tubulin in cardiomyocytes were determined by Western blotting in the transfected and non-transfected groups. **Results** RT-PCR results showed that the expression of *c-fos* mRNA increased significantly in the non-transfected group. But after transfection of *c-fos* antisense gene recombinant, the expression of *c-fos* mRNA decreased significantly as compared with the non-transfected cardiomyocytes. Western blotting results showed that the expression of c-fos protein in the transfected group decreased remarkably as compared with the non-transfected group, but the expressions of β-Tubulin and troponin-T increased significantly in the transfected group. **Conclusion** Burn serum and hypoxia can cause the injury of cardiomyocytes. *c-fos* antisense gene recombinant transfection has the protective effect on cardiomyocytes exposed to burn serum and hypoxia.

Key words: β-Tubulin; troponin-T; cardiomyocyte; PcDNA3.1(+); hypoxia; burn serum; *c-fos*; antisense gene transfection

业已证明,缺血缺氧和炎症介质是烧伤早期"休克心"的重要原因[1]。心肌缺血缺氧时核转录因子 *c-fos* 显著表达,表达增加的c-fos通过调控心肌的蛋白组成和蛋白比例改变导致心肌损害[2]。近年来研究表明,心肌细胞缺血缺氧时TnT[3]和β-Tubulin[4]表达明显减少。TnT是心肌细胞收缩器结构蛋白的一种,在心肌收缩舒张过程中起重要的作用[5]。β-Tubulin是细胞骨架的重要组成部分,不仅参与构成细胞支架,而且还与

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054202);国家杰出青年科学基金资助项目(30125040);全军"十五"指令性课题(01L066);教育部高等学校骨干教师资助计划项目(2000);军队首批临床高新技术重大项目(2002)
作者简介:胡安根(1977-),男,江西省吉安市人,硕士,医师,主要从事严重烧伤"休克心"的防治方面的研究,现在南京军区第175医院。电话:13159131371, E-mail:hmfpfmhbt0301090@sina.com.cn
通信作者:黄跃生,电话:(023)68754173, E-mail:yshuang@cta.cq.cn
收稿日期:2003-07-18;修回日期:2003-08-24

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

细胞运动，细胞内物质运输，细胞分化等功能相关[6]。但在烧伤还没有这方面的报道，为此，本实验以缺氧和烧伤血清处理模拟烧伤早期心肌损害的主要因素（缺血缺氧和炎症介质），通过构建 *c-fos* 反义基因重组体，转染心肌细胞，然后对心肌细胞进行缺氧复合烧伤血清处理，通过观察 TnT 和β-Tubulin 的表达变化来判断 *c-fos* 反义基因转染是否对心肌细胞具有保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

c-fos-PGEM2 质粒（Dr JB 惠赠），PcDNA3.1(＋)质粒（晶美公司）；*Eco*RⅠ，*Hind* Ⅲ，*BamH*Ⅰ（TaKaRa）；β-Tubulin（兔抗），TnT（兔抗），*c-fos*（兔抗）（Santa Cruz Biotechnology）；Bio-Rad 蛋白电泳系统，凝胶成像系统（BIORAD 公司）；CO_2 培养箱（美 Sheldon. Inc. SHEL2300 型）。

1.2 实验模型及分组

1.2.1 心肌细胞分离及培养 取出生 1～2 d Wistar 大鼠（雌雄不拘，由本校实验动物中心提供）心脏，PBS 液冲洗 3 次，留心尖部剪碎，加入 0.125% 胰酶 5 ml，轻轻吹打，37 ℃消化 7 min，小牛血清终止反应，弃第 1 次消化液，重复消化 7 次，收集每次消化液，200 目滤网过滤消化液，1 000 r/min 离心 10 min，DMEMf12 含胎牛血清培养基接种细胞沉淀，光镜下观察，见有大量悬浮细胞，37 ℃、5% CO_2 孵箱培养。0.5 h 后差速贴壁，并换含 Brdu 的 DMEMf12 培养基。光镜下观察细胞，见有许多悬浮细胞，37 ℃、5% CO_2 孵箱培养。

1.2.2 烧伤血清的制备 Wistar 大鼠 20 只，体质量 200～260 g，雌雄不拘，由本校实验动物中心提供。实验前 12 h 禁食，异戊巴比妥（30 mg/kg）麻醉，98 ℃水浴烫伤 20 s，造成 30% 总体表面积（TBSA）Ⅲ度烫伤，伤后按 Parkland 公式补液，6 h 后由腹主动脉抽血制备血浆，1 000 r/min 离心收集血清备用。

1.2.3 实验分组 正常对照组（常氧加正常大鼠血清组）；非转染组：10% 烧伤大鼠血清＋缺氧（1% O_2）；转染组：先转染，然后 10% 烧伤大鼠血清＋缺氧（1% O_2）。

1.3 *c-fos* 反义基因重组体的构建

1.3.1 *c-fos*-PGEM2 质粒和 PcDNA3.1(＋)的酶切与回收 参照《分子克隆实验指南》。

1.3.2 *c-fos* 酶切片断的平端化和 PcDNA3.1(＋)酶切片断的去磷酸化 按 Blunting kit 说明书操作。

1.3.2 *c-fos* 和 PcDNA3.1(＋)酶切片断的连接 按 T4 DNA Ligase 说明书操作。

1.3.3 反义 *c-fos*-PcDNA3.1(＋)重组体的鉴定 采用 *Hind* Ⅲ和 *Bam*HⅠ两种酶对 *c-fos*-PcDNA3.1(＋)重组体进行双酶切，根据正反义基因重组体酶切片断大小不同鉴定出 *c-fos* 反义基因重组体。

1.4 反义 *c-fos*-PcDNA3.1(＋)重组体转染

按 Lipofectamine kit 说明书操作。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 采用 RT-PCR 检测 *c-fos* mRNA 心肌细胞总 mRNA 提取按 Ttipure kit 说明书操作，引物序列 L：*c-fos* 上游 5′-TGC CTA AGC GGA TTA CGC TG-3′，下游 5′-TAA CCG GTC GAG GCT AAC GT-3′，扩增产物长度 0.475 kb。逆转录条件：50 ℃ 30 min；扩增条件：94 ℃变性 2 min，94 ℃变性 30 s，59 ℃复性 30 s，72 ℃延伸 1 min，30 个循环后 72 ℃延伸 5 min。

1.5.2 采用 Western blot 检测 c-fos 蛋白，TnT 和β-Tubulin 用 SDS 载样缓冲液收集心肌细胞总蛋白，经 SDS-PAGE，电转膜，抗体反应，最后化学发光法显带。

1.6 统计学处理

对蛋白免疫印迹产物和 RT-PCR 产物电泳条带，采用 Bio-Rad 公司的 Quantity one 图像分析软件进行定量分析，采用 SPSS10.0 统计软件进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 *c-fos*-PcDNA3.1(＋)重组体的构建和鉴定

c-fos-PGEM2 酶切结果见图 1；反义 *c-fos*-PcDNA3.1(＋)重组体 *Hind* Ⅲ和 *Bam*HⅠ双酶切鉴定结果见图 2。

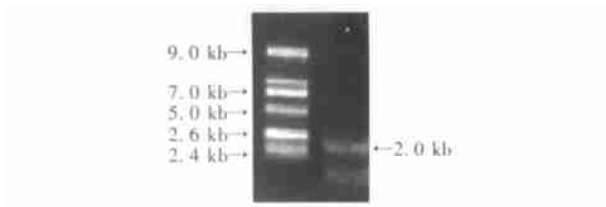


图 1 *c-fos*-PGEM2 *Eco*RⅠ单酶切结果

Fig 1 Result of *c-fos*-PGEM2 digested with *Eco*RⅠ

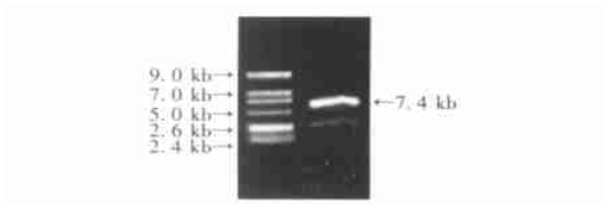


图 2 反义 *c-fos*-PcDNA3.1(＋)重组体 *Hind* Ⅲ，*Bam*HⅠ双酶切结果

Fig 2 Results of antisense *c-fos*-PcDNA3.1(＋) recombinant digested with *Hind* Ⅲ and *Bam*HⅠ

2.2 *c-fos* mRNA RT-PCR 结果

非转染组心肌细胞缺氧复合烧伤血清处理 1，3，7 h 后，*c-fos* mRNA 均显著表达，3 h 达到高峰；转染组心肌细胞缺氧复合烧伤血清处理 1，3，7 h 后，*c-fos* mRNA 表达不明显，7 h 降至最低水平，较非转染组显著下降（$P<0.01$）。

2.3 c-fos 蛋白 Western blot 结果

非转染组心肌细胞缺氧复合烧伤血清处理 1，3，7 h，c-fos 蛋白显著表达，7 h 达到高峰；转染组心肌细胞缺氧复合烧伤血清处理 1，3，7 h，c-fos 蛋白表达不明显，较非转染组显著下降（$P<0.01$）。

2.4 TnT Western blot 结果

正常对照组心肌细胞 TnT 显著表达；非转染组心肌细胞缺

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

氧复合烧伤血清处理 1, 3, 7 h, TnT 表达较正常组显著下降; 转染组心肌细胞 TnT 表达虽然较正常对照组下降, 但比非转染组显著增加($P<0.01$)。

2.5　β-Tubulin Western blot 结果

正常对照组心肌细胞β-Tubulin 显著表达; 非转染组心肌细胞缺氧复合烧伤血清处理 1, 3, 7 h, β-Tubulin 表达较正常组显著下降, 7 h 最明显。转染组心肌细胞β-Tubulin 表达虽然较正常组有所下降, 但比非转染组显著增加($P<0.01$)。

3　讨论

缺血缺氧时, 心肌产生的核转录因子 *c-fos* 可通过调控下游基因的转录引起心肌的蛋白组成及蛋白比例改变而导致心肌损伤[7]。严重烧伤时休克心的出现实质上是一个心肌缺血缺氧损伤过程。因此, 研究如何防治心肌缺血缺氧 *c-fos* 引起的心肌损伤对严重烧伤休克心的治疗有重要的理论指导意义和临床价值。

本实验中转染组较非转染组心肌细胞在缺氧复合烧伤血清处理 1, 3, 7 h 后, *c-fos* mRNA R 的表达分别下降了 52.6%, 23.1%和 70%; c-fos 蛋白的表达分别下降了 45%, 45.6%和 59.7%($P<0.01$), 具有显著的统计学意义, 表明 *c-fos* 反义重组体已成功高效转染进入心肌细胞, 并且有效地抑制了 c-fos 的表达。

心肌肌钙蛋白是心肌收缩的一种调节蛋白, 它有 3 个亚单位, 即 TnI, TnC, TnT。TnT 能在心肌收缩时介导钙激活, 将肌钙蛋白复合物与原肌球蛋白结合存在于细丝中, 其中 TnT 和 TnI 是心肌细胞特有蛋白, 与骨骼肌 Tn 无交叉反应。鉴于此, 本实验选用对心肌收缩起重要作用而且是心肌特有的 TnT 作为观察指标。Charrasse 等[8] 发现, 心肌缺血缺氧时, 表达增加的 c-fos 通过下调 TnT 的表达使得心肌收缩力下降而导致心功能不足。本实验非转染组心肌细胞 c-fos 显著表达而 TnT 表达明显下降; 本实验转染组心肌细胞 Tn-T 表达较非转染组在缺氧复合烧伤血清处理 1, 3, 7 h 后分别增加 59.5%, 39.7%和 46.7%, $P<0.01$, 具有显著的统计学意义, 表明 *c-fos* 反义基因重组体转染能有效地阻止缺氧复合烧伤血清处理心肌细胞 TnT 的表达下降, 从而对心肌细胞起保护作用。

微管蛋白包括α-Tubulin 和β-Tubulin, 是细胞骨架的主要成分之一, 它具有构成细胞支架, 维持细胞形态, 固定和支持细胞器的位置, 参与细胞运动, 细胞内物质运输, 细胞分化和维持心肌细胞本身固有粘弹性等功能。Collaco-Moraes 等[9] 对心肌细胞造成单纯缺血缺氧, 发现 c-fos 蛋白表达异常增加, β-Tubulin 表达较正常对照组显著减少, 心肌细胞出现骨架严重紊乱, 溶解和断裂, 同时他们用 *c-fos* 抑制剂(Iodoacetic, acid)在缺血缺氧前处理心肌细胞, 与单纯缺血缺氧组比较, 发现 c-fos 蛋白表达明显减少, β-Tubulin 表达显著回升, 而且心肌细胞骨架损伤也得到明显改善, 为此, 他们认为心肌缺血缺氧时大量表达的 c-fos 会通过下调β-Tubulin 的表达使得心肌细胞骨架紊乱, 溶解或断裂而导致心肌损害。本实验中非转染组心肌细胞 c-fos 大量表达而β-Tubulin 表达显著减少; 本实验转染组心肌细胞β-Tubulin 表达较非转染组在缺氧复合烧伤血清处理 1, 3, 7 h 后分别增加 30.5%, 39.7%和 36.7%, $P<0.01$, 具有显著的统计学意义, 表明 *c-fos* 反义基因重组体转染能有效地阻止缺氧复合烧伤血清处理心肌细胞β-Tubulin 的表达下降, 从而对心肌细胞起保护作用。

本实验成功构建了 *c-fos* 反义基因重组体, 并且高效地转染进入心肌细胞, 经测定心肌重要结构和功能蛋白(肌钙蛋白-T 和β-Tubulin)的表达变化, 得出 *c-fos* 反义基因重组体转染对缺氧复合烧伤血清处理心肌细胞具有保护作用, 为寻找防治严重烧伤心肌缺血缺氧损伤的新策略提供了理论依据。

参考文献:

[1] 黄跃生, 杨宗城, 迟路湘, 等. 烧伤后"休克心"的研究[J]. 中华烧伤杂志, 2000, 16(5): 275－278.

[2] Webster K A, Discher D J, Bishopric N H. Regulation of fos and jun immediate-early genes by redox or metabolic stress in cardiac myocytes[J]. Circ Res, 1994, 74(4): 679－686.

[3] Decker Robert S, Decker Marlene L, Nakamura Sakie. HSC73-tubulin complex formation during low-flow ischemia in the canine myocardium[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 283(4): H1322－1333.

[4] Kwong R Y, Schussheim A E, Rekhraj S, *et al*. Detecting acute coronary syndrome in the emergency department with cardiac magnetic resonance imaging[J]. Circulation, 2003, 107(4): 531－537.

[5] 左亚刚, 尚秀梅, 邢玉贵, 等. 心肌肌钙蛋白与心肌损伤[J]. 河北中西医结合杂志, 1998, 7(5): 650－652.

[6] Jirasek T, Mandys V, Viklicky V. Expression of class III beta-tubulin in neuroendocrine tumours of gastrointestinal tract[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2002, 40(3): 305－310.

[7] Corbucci G G. Adaptive changes in response to acute hypoxia, ischemia and reperfusion in human cardiac cell[J]. Minerva-Anestesiol, 2000, 66(7－8): 523－530.

[8] Charrasse S, Meriane M, Comunale F, *et al*. N-cadherin-dependent cell-cell contact regulates Rho GTPases and beta-catenin localization in mouse C2C12 myoblasts[J]. J Cell Biol, 2002, 158(5): 953－965.

[9] Collaco-Moraes Y, Aspey B S, de-Belleroche J S, *et al*. Focal ischemia causes an extensive induction of immediate early genes that are sensitive to MK-801[J]. Stroke, 1994, 25(9): 1855－1861.

(编辑　刘洪娥)

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