DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.18.002
第25卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 18
1596 2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)18-1596-03

p38激酶途径介导缺氧复合烧伤血清所致乳鼠心肌细胞损害

张家平,黄跃生,杨宗城 (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 观察缺氧复合烧伤血清对心肌细胞p38激酶和JNK活化的影响,探讨p38激酶在缺氧复合烧伤血清损伤心肌细胞中的作用。方法 免疫印迹化学发光法检测缺氧复合烧伤血清作用培养心肌细胞前后p38激酶及JNK磷酸化程度;观察p38激酶抑制剂SB203580预先处理,对心肌细胞p38激酶磷酸化、心肌细胞活力、培养液中LDH活性及凋亡的影响。结果 缺氧复合烧伤血清使心肌细胞p38激酶迅速、持续活化,而JNK活化不明显;10 μmol/L SB203580可有效抑制p38激酶活化,并显著降低细胞培养液中LDH活性及细胞凋亡率,改善心肌细胞活力。结论 MAPKs家族两条应激活化的信号途径当中,p38激酶途径是缺氧复合烧伤血清作用条件下心肌细胞主要被激活途径,并较早参与介导心肌细胞损害。

关键词:心肌细胞;蛋白激酶p38;缺氧;烧伤血清
中图法分类号:R322.1+1;R644.02;R845.2+2 文献标识码:A

p38 kinase pathway mediated cardiomyocyte injury in rats due to hypoxia and burn serum

ZHANG Jia-ping, HUANG Yue-sheng, YANG Zong-cheng (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the roles of the activated p38 kinase in cell injury by observation of the effects of hypoxia and burn serum on cardiomyocyte p38 kinase and JNK activation. Methods Phosphorylation of p38 kinase and JNK in primary cultured neonatal rat cardiomyocytes before and after hypoxia and burn serum was determined by Western blotting. Effects of pretreatment with SB203580 at the dose of 10 μmol/L on the changes of phosphorylation of p38 kinase in cardiomyocytes, lactate dehydrogenase (LDH) activity, cell vitality and apoptosis were investigated, respectively. Results Exposure of rat neonatal cardiomyocytes to hypoxia and burn serum resulted in a rapid and long-lasting activation of p38 kinase but no significant activation of JNK. SB203580 (10 μmol/l), a selective inhibitor of p38 kinase, could inhibit p38 kinase activation dramatically, decrease the LDH activity in culture media and cell apoptosis significantly and improve cell vitality. Conclusion In the two stress-activated signal pathways of MAPKs family, p38 kinase pathway, but not JNK, is the major pathway activated by hypoxia and burn serum and participates in the cardiomyocyte injury.

Key words: cardiomyocyte; protein kinase p38; hypoxia; burn serum

丝裂素活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinases, MAPKs)途径是哺乳类细胞重要的信号转导途径,包括ERK、p38激酶和JNK 3个成员。其中,p38激酶与JNK途径主要被缺血缺氧、炎症因子、内毒素、紫外线辐射等应激性刺激因素激活,此二条途径又被称为应激活化的信号通路。普遍认为,该类途径的过度活化可导致细胞损害。本研究建立缺氧复合烧伤血清损伤心肌细胞模型,旨在观察缺氧复合烧伤血清对心肌细胞p38激酶、JNK的活化作用,并探讨激活的信号途径与心肌细胞损害的关系。

1 材料与方法

1.1 乳鼠心肌细胞原代培养及实验分组

参照文献[1,2]略加修改。出生1~2 d Wistar乳鼠,24只,雌雄不拘,由本校实验动物中心提供。乳鼠活杀后取心脏,加0.125%胰蛋白酶37 ℃消化,每次7 min,重复7~9次至组织消化完全。滤网过滤细胞悬液,1 000 r/min离心5 min,0.01 mol/L PBS洗细胞沉积1次,DMEM-F12培养基(含10%胎牛血清)重悬细胞,接种于6孔板和96孔板。采用差速贴壁法和Brdu化学抑制法纯化心肌细胞。实验分缺氧加烧伤血清组,常氧加正常大鼠血清组(对照组),SB203580(10 μmol/L)抑制组。缺氧条件为1%O_2、5%CO_2和94%N_2,烧伤血清为40% III度烫伤大鼠伤后6 h所收集血清。

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:张家平(1972-),男,湖南省醴陵市人,博士,医师,主要从事烧伤后脏器功能障碍方面的研究。发表论文5篇。电话:(023)68754148-8026
通信作者:黄跃生,电话:(023)68754173

收稿日期:2003-07-20;修回日期:2003-08-24

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

1.2　主要试剂

抗磷酸化 p38 激酶与 JNK 抗体购自美国新英格兰生物实验公司, 超信号皮克级兔 IgG Westem blot 检测试剂盒购自美国 Pierce 公司, SB203580 购自美国 Carlbiochem 公司, LDH 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所, Anexin-V 流式检测试剂盒购自美国罗氏公司。

1.3　免疫印迹化学发光法检测磷酸化p38 激酶和 JNK

按试剂盒说明操作。在培养心肌细胞的 6 孔板中, 每孔加入 100 μl 预冷 RIPA 缓冲液(50 mmol/L Tirs-HCl 缓冲液: 含 150 mmol/L NaCl、1% NP-40、1% 脱氧胆酸钠、0.1%SDS、10 mmol/L EDTA、2.5 mmol/L EGTA、1 mmol/L 钒酸钠)、蛋白酶抑制剂(20 μg/ml Aprotinin、Pepstatin、Leupetin, 1 mmol/L Benzamidine、PMSF 和 100 μg/ml TPCK), 磷酸酶抑制剂(50 mmol/L NaF, 20 mmol/L 磷酸对硝基苯酚, 30 mmol/L β-磷酸甘油), 吸管吹打数次以充分裂解细胞, 15 000 r/min 离心 15 min(4 ℃), 取上清并用 Bradford 法测定蛋白浓度。各时相点取 10 μg 细胞蛋白行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 完毕后转移蛋白至硝酸纤维素滤膜, 分别与一抗、二抗、化学发光底物孵育, 然后滤膜于暗室中用感光胶片感光、冲洗。

1.4　细胞活力测定

采用四唑盐比色法(MTT 法)。

1.5　培养液中 LDH 活性测定

按试剂盒说明书操作。

1.6　心肌细胞凋亡检测

按试剂盒说明书操作。用浓度为 0.25%的胰蛋白酶消化培养心肌细胞至细胞变圆, 轻轻吹打后收集细胞悬液, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 加 100 μl 染色液(含 2 μl Annexin-V 荧光素标记溶液、94 μl Hepes 缓冲液和 2 μl PI)重悬心肌细胞, 混匀, 室温放置 15 min; 加 900 μl Hepes 缓冲液, 流式细胞仪检测凋亡率(激发波长: 488 nm, 探测波长 515 nm)。

1.7　统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 四星图像分析软件扫描蛋白条带光密度值, 采用 SPSS10.0 统计学软件行单因素方差分析。

2　结果

2.1　培养心肌细胞 p38 激酶、JNK 的活化

正常对照组心肌细胞 p38 激酶未活化。缺氧和烧伤血清作用心肌细胞 0.5 h, 心肌细胞 p38 激酶活化程度显著增强, 于作用后 1、6 h 形成两次活化高峰, 并持续活化至观察的 12 h 期间。正常对照组及缺氧加烧伤血清组心肌细胞 JNK 未见活化, 见图 1。

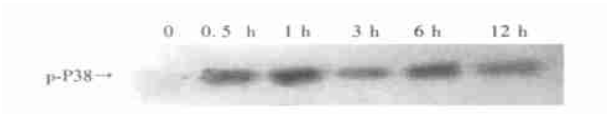


图 1　缺氧复合烧伤血清对心肌细胞 **p38** 激酶磷酸化程度的影响(***n*** = 3)

Fig 1　Effects of hypoxia and burn serum on the phosphorylation of p38 kinase in cardiomyocytes(*n* = 3)

2.2　SB203580 对心肌细胞 p38 激酶活化的抑制作用

使用 SB203580 0.5 h, 心肌细胞 p38 激酶活化程度降至缺氧加烧伤血清组的(41 ± 8)%, 使用 SB203580 3 h 后, 几乎检测不到其活化, 见图 2

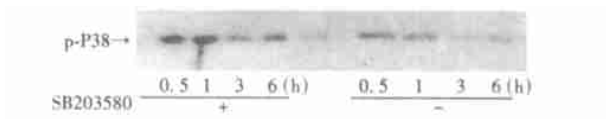


图 2　10 μmol/L SB203580 对心肌细胞 p38 激酶磷酸化程度的影响(***n*** = 3)

Fig 2　Effect of SB203580(10 μmol/L) on the phosphorylation of p38 kinase in cardiomyocytes(*n* = 3)

2.3　心肌细胞活力变化

缺氧和烧伤血清作用心肌细胞 12 h 后, 心肌细胞活力显著下降; 使用 SB203580 可减低心肌细胞活力下降幅度, 见表 1。

表 1　缺氧复合烧伤血清作用条件下心肌细胞活力变化及 SB203580 对其影响($\bar{x} \pm s$, *A*)

Tab 1　Effects of hypoxia and burn serum and SB203580 treatment on the changes of activity of cardiomyocytes($\bar{x} \pm s$, *A*)

Group	Before injury	Time after injury (h)			
		3	6	12	18
Hypoxia and burn serum	0.138 ± 0.019	0.138 ± 0.015	0.132 ± 0.012	0.115 ± 0.008 #	0.101 ± 0.009 #
SB inhibition		0.137 ± 0.017	0.135 ± 0.020	0.128 ± 0.010 *	0.120 ± 0.007 **

#: $P < 0.01$ *vs* control group (before injury); *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ *vs* hypoxia and burn serum group

2.4　心肌细胞培养液中 LDH 活性变化

缺氧和烧伤血清作用心肌细胞 3 h, 细胞培养液中 LDH 活性显著升高, 作用 12 h 后, 培养液中 LDH 活性急剧升高; 使用 SB203580 3 h 后, 细胞培养液中 LDH 活性下降, 见表 2。

表 2　缺氧复合烧伤血清作用条件下心肌细胞培养液中 LDH 活性变化及 SB203580 对其影响($\bar{x} \pm s$, U/L)

Tab 2　Effects of hypoxia and burn serum and SB203580 treatment on changes of LDH activity in cardiomyocytes in incubation media ($\bar{x} \pm s$, U/L)

Group	Before injury	Time after injury (h)			
		3	6	12	18
Hypoxia and burn serum	451 ± 42	570 ± 67 #	786 ± 92 ##	2 096 ± 482 ##	3 856 ± 224 ##
SB inhibition		471 ± 34 *	494 ± 75 **	1 435 ± 309 **	2 417 ± 306 **

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ *vs* hypoxia and burn serum group; #: $P < 0.05$, ##: $P < 0.01$ *vs* control group (before injury)

2.5　心肌细胞凋亡变化

正常对照组心肌细胞凋亡率极低, 缺氧和烧伤血清作用心肌细胞 12 h 后, 心肌细胞凋亡显著增多, 使用 SB203580 可降低心肌细胞凋亡率, 见表 3。

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

表 3 缺氧复合烧伤血清作用条件下心肌细胞凋亡变化及 SB203580 对其影响($\bar{x}\pm s$, %)

Tab 3 Effects of hypoxia and burn serum and SB203580 treatment on changes of apoptosis rate of cardiomyocytes ($\bar{x}\pm s$, %)

Group	Before injury	Time after injury (h)		
		6	12	18
Hypoxia and burn serum	3.1±0.3	4.2±0.5	10.4±0.8 #	16.1±2.3 #
SB inhibition		4.6±0.6	5.5±0.7 *	9.2±1.2 *

*: $P<0.01$ *vs* hypoxia and burn serum group; #: $P<0.01$ *vs* control group (before injury)

3 讨论

严重烧伤早期即存在器质性心肌损害与功能不全,此为烧伤后"休克心"现象。"休克心"导致、加重休克,引发早期多脏器损害[3]。业已证明,缺氧和失控性炎症反应是烧伤早期"休克心"的主要两大致病因素[3],如何遏止、减轻其心肌损害作用是防治"休克心"的关键。

在刺激因素介导细胞效应的过程中,细胞信号转导是关键中间环节。阻断某些刺激因素的主要信号途径,能有效消除或消减刺激因素诱导的细胞效应。我们的前期研究表明,MAPKs 家族两条主要应激活化的信号途径当中,烧伤激活大鼠心肌细胞 p38 激酶途径,并推测该途径可能与严重烧伤早期心肌损害有关[4]。本研究以缺氧复合烧伤血清(含有大量炎症因子)模拟烧伤早期心肌损害的主要致病因素,建立了细胞水平的烧伤后心肌损害模型。研究显示,缺氧和烧伤血清作用心肌细胞 0.5 h,心肌细胞 p38 激酶活化程度即显著增强,作用后 1、6 h 出现两次活化高峰,并呈持续活化状态,而 JNK 活化不明显。p38 激酶的迅速、持续活化表明,该途径是本研究中心肌细胞的主要应激活化信号途径,与我们的在体实验结果一致[4]。有报道指出,心肌细胞单纯缺氧 6 h 后,p38 激酶的活化即明显减退[5],而在本研究中,缺氧复合烧伤血清作用心肌细胞 12 h,p38 激酶活化仍相当明显,推测烧伤血清中大量炎性因子等与缺氧因素叠加可能是导致心肌细胞 p38 激酶呈持续高活化状态的主要原因。

SB203580 为 p38 激酶选择性抑制剂,在不同的细胞中,其有效抑制 p38 激酶的浓度从 0.1~10 μmol/L 均有报道[6,7]。研究观察了 10 μmol/L 的 SB203580 对心肌细胞 p38 激酶活化的抑制作用,结果显示,使用 SB203580 0.5 h,心肌细胞 p38 激酶活化程度下降 50% 以上($P<0.01$);使用 SB203580 3 h 后,几乎检测不到活化的 p38 激酶,表明实验所选 SB203580 浓度是高效抑制缺氧和烧伤血清作用条件下心肌细胞 p38 激酶活化的理想浓度。使用该浓度 SB203580 3 h 后,心肌细胞培养液中 LDH 活性显著降低,12 h 后心肌细胞凋亡显著减少、心肌细胞活力改善,证明持续活化的 p38 激酶途径在介导缺氧和烧伤血清所致心肌细胞损害中起关键作用。

值得注意的是,过往研究将 p38 激酶途径介导的细胞损害主要归结于细胞凋亡,其机制部分与促进 caspase 活化有关[8,9]。本研究结果显示,心肌细胞凋亡主要发生在缺氧和烧伤血清作用心肌细胞 12 h 后(与对照组比较,$P<0.01$),而培养液中 LDH 活性在缺氧和烧伤血清作用细胞 3 h 后已显著增高(与对照组比较,$P<0.05$),抑制 p38 激酶可显著降低相应时相点培养液中 LDH 活性。生理情况下,LDH 存于胞浆,只有当细胞膜通透性增高或破坏时才漏出胞外,由此可见,p38 激酶途径不仅介导细胞凋亡,还较早参与以膜损害为特征的细胞损伤,其机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] D. L. 斯佩克特, R. D. 戈德曼, L. A. 莱因万德. 细胞实验指南(上册)[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 79-82.

[2] 孙 红. 体外培养心肌细胞的纯化方法及其应用[J]. 细胞生物学杂志, 1988, 10(2): 85-87.

[3] 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.

[4] 张家平, 黄跃生, 刘 敬, 等. 烫伤大鼠心肌细胞丝裂素活化蛋白激酶的活化及胞内分布规律的研究[J]. 中华烧伤杂志, 2003, 19(3): 137-140.

[5] Mackay K, Mochly R D. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia[J]. J Bio Chem, 1999, 274(10): 6272-6279.

[6] Oliver W, Jenny K, Bengt S, *et al*. 5-Lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases[J]. Cell Biology, 2000, 97(10): 5261-5266.

[7] Miyazawa K, Mori A, Miyata H, *et al*. Regulation of interleukin-1β-induced interleukin-6 gene expression in human fibroblast-like synoviocytes by p38 mitogen-activated protein kinase[J]. J Biol Chem, 1998, 273(38): 24832-24838.

[8] Chae H J, Kim S C, Han K S, *et al*. Hypoxia induces apoptosis by caspase activation accompanying cytochrome C release from mitochondria in MC3T3E1 osteoblasts; p38 MAPK is related in hypoxia-induced apoptosis [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2001, 23(2): 133-152.

[9] Yang J, Fier A, Carter Y, *et al*. Liver injury during acute pancreatitis. The role of pancreatitis-associated ascitic fluid (PAAF), p38-MAPK, and caspase-3 in inducing hepatocyte apoptosis[J]. J Gastrointest Surg, 2003, 7(2): 200-208.

(编辑 张 宁)

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