DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.12.008
第23卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 12
2001年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2001

文章编号:1000-5404(2001)12-1399-04

论著

缺氧复氧对培养仔鼠心肌细胞NRF1和mtTFA表达的影响与L-carnitine保护作用

谢 燕[1],朱光旭[1],江海洪[2],周 舟[1],余争平[1] (第三军医大学:[1]预防医学系劳动卫生学教研室;[2]科技部;重庆 400038)

提 要:目的 探讨培养仔鼠心肌细胞缺氧复氧能量代谢损伤的机制及L-肉毒碱(L-carnitine)的保护作用。方法 以原代培养仔鼠心肌细胞建立缺氧复氧损伤模型,应用高效液相色谱检测心肌细胞内ATP、ADP、AMP含量;应用RT-PCR方法检测心肌细胞核呼吸因子(Nuclear respiratory factor 1, NRF1)和线粒体转录因子A(Mitochondrial transcription factor A, mtTFA)mRNA表达。结果 与正常对照组比较,培养的心肌细胞缺氧24 h复氧0、2、4、8 h,心肌细胞ATP、ADP含量均明显下降。与单纯缺氧复氧组比较,L-carnitine预处理组心肌细胞缺氧复氧后ATP含量明显提升;培养的心肌细胞缺氧24 h,NRF1和mtTFA mRNA明显降低,复氧2、4、8 h进一步降低。L-carnitine预处理使缺氧24 h复氧4 h的心肌细胞NRF1和mtTFA mRNA表达分别提升15%和20%。结论 心肌细胞缺氧复氧过程中能量代谢明显降低,其损伤可能与NRF1和mtTFA mRNA表达下调有关;L-carnitine对培养仔鼠心肌细胞缺氧复氧能量代谢损伤具有保护作用,其机制可能是L-carnitine从转录调控水平改善了缺氧复氧过程中心肌细胞的能量代谢。

关键词:缺氧复氧;能量代谢;NRF1;mtTFA;L-肉毒碱
中图法分类号:364.4 文献标识码:A

Effects of hypoxia/reoxygenation on expressions of NRF1 and mtTFA mRNA in cultured neonatal rat myocardial cells and protective effects of L-carnitine

XIE Yan, ZHU Guang-xu, JIANG Hai-hong, ZHOU Zhou, YU Zheng-ping (Department of Labour Hygiene, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the mechanism of energy disturbance and protective effects of L-carnitine on cultured neonatal rat myocardial cells after hypoxia/reoxygenation(H/R). Methods A model of H/R of cultured myocardial cells was used. Adenylic acid (ATP, ADP, AMP) contents in cultured myocardial cells were determined with high performance liquid chromatography. Cultured myocardial cells NRF1 and mtTFA mRNA expressions were assayed with RT-PCR. Results Compared with control, ATP and ADP contents in cultured myocardial cells were significantly decreased after 24 h hypoxia and reoxygenation for 0, 2, 4 and 8 h. Compared with H/R group, ATP content in cultured myocardial cells significantly recovered with L-carnitine pretreatment. NRF1 and mtTFA mRNA expression were decreased in cultured myocardial cells after hypoxia for 24 h. After reoxygenation for 2, 4, 8 h, NRF1 and mtTFA mRNA decreased again. L-caritine effectively prevented the decrease of mRNA expressions of NRF1 and mtTFA. Conclusion H/R insult suppresses energy metabolism in myocardial cells and the mechanisms are related to downregulation of NRF1 and mtTFA mRNA expreesions; L-carnitine posssesses the protective effect on H/R insult and its protective effect might be due to improve oxidative phosphorylation.

Key words: hypoxia-reoxygenation; energy metabolism; NRF1; mtTFA; L-carnitine

心肌缺血再灌注损伤不仅是缺血性心肌病最为常见的并发症,也是严重创伤后心肌功能损害形成心脏与其它脏器功能不全/衰竭的重要原因。研究证明心肌缺血再灌注过程中造成心肌损伤的最关键因素是心肌细胞缺氧/复氧(Hypoxia/reoxygenation, H/R)。在心肌细胞缺氧复氧过程中线粒体能量代谢明显受到抑制[1],其分子机制未完全阐明。近年来发现NRF1和mtTFA通过调控线粒体呼吸链上蛋白质亚基表达,调控线粒体能量代谢。L-carnitine对心肌缺氧损伤的线粒体呼吸酶起显著保护效应[2]。因此本研究建立了培养仔鼠心肌细胞缺氧复氧的损伤模型,从转录调控水平探讨缺氧复氧心肌细胞能量代谢损伤机制以及L-carnitine的保护作用,为临床治疗提供理论基础。

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)分题(G1999054202)
作者简介:谢 燕(1968-),女,四川省西昌市人,博士,讲师,主要从事物理因素与健康方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68752289
收稿日期:2001-02-23;修回日期:2001-05-09

1 材料和方法

1.1 心肌细胞培养与实验分组

无菌取新生3 d的Wistar大鼠仔鼠左心室,经0.125%胰蛋白酶消化,以200目泥龙网过滤,分散成单个细胞,以含15%胎牛血清的DMEM培养基,在95%空气+5%CO_2,37 ℃条件下应用差速贴壁法,先培养90 min以纯化心肌细胞,然后按实验设计继续培养。

实验分为3组,缺氧复氧组:将已培养好的心肌细胞,缺氧24 h,再分别复氧0、2、4、8 h;L-carnitine药物预处理组:已培养好的心肌细胞在缺氧前2 h加入终浓度50 nmol/L的L-carnitine,缺氧24 h后分别复氧0、2、4、8 h;正常对照组:已培养好的心肌细胞除不作缺氧处理外,其余条件同实验组。

1.2 主要试剂

DMEM培养基,L-carnitine,ATP,ADP,AMP标准品均购自美国Sigma公司,PCR试剂(上海生工)。灭活胎牛血清(美国Hyclone公司)。

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

1.3 主要设备与器材

新生Wistar大鼠仔鼠(3 d龄)购于本校实验动物中心。二氧化碳培养箱(美国Queue 2721型),倒置相差显微镜(日本Olympus公司),PCR仪(美国PT-100),高效液相色谱分析仪(日本岛津公司)。

1.4 缺氧模型的建立

将培养仔鼠心肌细胞置37 ℃恒温干燥罐,以含95%N_2:5%CO_2气体缺氧24 h,重新置含95%空气:5%CO_2、37 ℃培养箱按实验设计复氧,进行各项指标测定。

1.5 培养心肌细胞ATP、ADP、AMP含量的测定

在培养心肌细胞中(10^7个细胞),加入1 ml 0.1 mol/L高氯酸,冰上匀浆,在4 ℃,1 5000×g离心10 min;然后上清液用0.5 mol/L碳酸钠溶液中和并调整pH至6.5~7.0,重复离心一次,取上清液作高效液相色谱分析。采用公式EC(Energy charge,EC)=(ATP+0.5ADP)/(ATP+ADP+AMP)计算能荷。

1.6 RT-PCR检测缺氧复氧心肌细胞NRF1和mtTFA mRNA的表达[3]

总RNA提取:按异硫氰酸胍法提取心肌细胞总RNA,低温保存备用。在A_{260}/A_{280}条件下进行RNA纯度鉴定和定量,并用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳进一步确认RNA质量。取总RNA 5.0 μg逆转录合成cDNA,然后按分子克隆进行半定量PCR反应。NRF1反应条件为:95 ℃变性30 s,61 ℃退火30 s,72 ℃延伸1 min,进行39个循环,72 ℃延伸7 min;β-actin反应条件同上。mtTFA反应条件为:95 ℃变性1 min,55 ℃退火1 min,72 ℃延伸1 min,进行35个循环,72 ℃延伸7 min;β-actin反应条件同上,引物序列见表1。反应结束后,各取PCR产物4 μl进行1.7%琼脂糖电泳,并用Gel Doc 2000凝胶图像分析仪扫描,PCR产物量以光密度值×面积表示,目的片段与β-actin的光密度比值作为目的片段mRNA的相对含量。

表1 PCR引物序列

Tab 1 PCR primer sequences

	Upper primer	Lower primer
mtTFA(540 bp)	5-CGC CTA AAG AAG AAA GCA CAA ATC-3'	5-CG C CTA AAG AAG AAA GCA CAA ATC-3'
NRF1(120 bp)	5-CCA CAT TAC AGG GCG GTG AA-3'	5-AGT GGC TCC CTG TTG CAT CT-3'
β-actin(764 bp)	5-TTG TAA CCA CCT GGG ACG ATA TGG-3'	5-GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT AG-3'

1.7 统计学分析

实验结果用$\bar{x}\pm s$表示,采用Microsoft Excel软件进行t检验。

2 结果

2.1 缺氧复氧不同时间心肌细胞ATP、ADP、AMP含量的变化

大鼠培养心肌细胞缺氧24 h复氧0、2、4、8 h,ATP含量明显下降,分别下降54.2%、50.4%,39.7%,55.5%,复氧4 h,ATP含量有恢复趋势,复氧8 h,ATP含量比复氧4 h明显降低($P<0.05$);心肌细胞缺氧复氧后,心肌细胞ADP含量也明显降低,变化趋势同ATP含量的变化;AMP含量仅在复氧后4 h有明显下降;心肌细胞缺氧复氧各个时相点能荷明显降低。见表2。

2.2 L-carnitine预处理对大鼠心肌细胞缺氧复氧后ATP、ADP、AMP含量的影响

与正常对照组比较,L-carnitine预处理后缺氧24 h心肌细胞ATP含量无明显差异,在2、4、8 h仍明显低于对照组,分别下降了8.7%,19.1%,20.3%;缺氧复氧后心肌细胞能荷无明显差异见表3。与单纯缺氧复氧组比较,L-carnitine预处理后心肌细胞缺氧复氧0、2、4、8 h ATP含量分别提升88.2%,84.2%,34.2%,79.1%。

表2 缺氧复氧不同时间心肌细胞(10^7个细胞)ATP、ADP、AMP含量的变化(nmol,$\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes of ATP, ADP and AMP contents in myocardial cells (10^7 cells) after H/R (nmol, $\bar{x}\pm s$)

	Control (n=4)	0 h (n=4)	2 h (n=4)	4 h (n=4)	8 h (n=4)
ATP	70.91±2.53	32.43±7.56 **	35.12±4.06 **	42.73±4.92 **	31.59±3.48 **#
ADP	8.55±0.75	6.64±0.08 *	5.98±0.79 *	6.75±0.51 *	6.79±0.68 *
AMP	2.17±0.35	2.04±0.09	1.62±0.16	1.40±0.02 *	2.47±0.13
EC	0.920±0.005	0.866±0.030 *	0.891±0.004 **	0.883±0.032 *	0.855±0.014 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$ *vs* 4 h

表3 L-carnitine预处理对大鼠心肌细胞(10^7个细胞)缺氧复氧后ATP、ADP、AMP含量的影响(nmol,$\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Effects of L-carnitine on ATP, ADP and AMP contents in myocardial cells (10^7 cells) after H/R (nmol, $\bar{x}\pm s$)

	n	ATP	ADP	AMP	EC
Control	4	70.91±2.53	8.55±0.75	2.17±0.35	0.920±0.005
0 h	4	61.02±8.66	7.01±0.75	2.77±1.04	0.910±0.017
2 h	4	64.75±2.04 *	8.95±0.68	1.72±0.49	0.918±0.009
4 h	4	57.38±5.35 **	9.08±1.77	3.31±0.58	0.887±0.025
8 h	4	56.54±2.28 **	8.29±0.53	1.77±0.35	0.911±0.003

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

2.3 NRF1和mtTFA PCR扩增结果

NRF1和mtTFA RT-PCR产物电泳结果显示扩增片段长分别为120 bp和540 bp,与预期设计的目的片段大小相同,见图1。

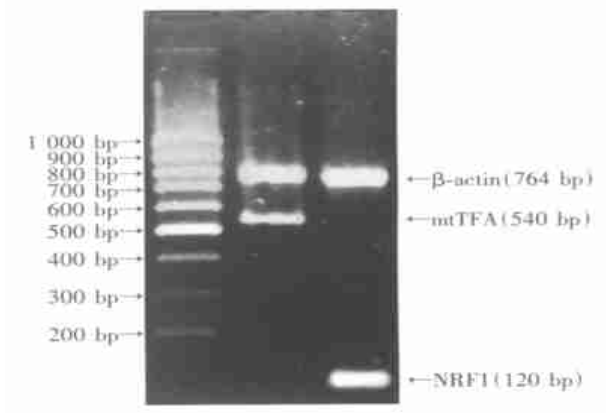


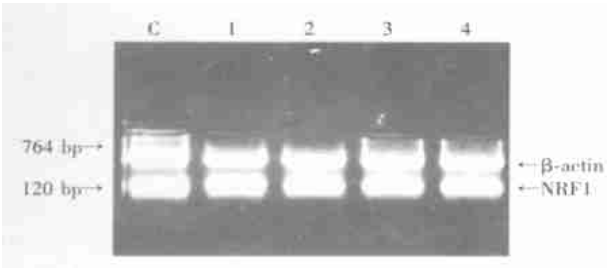
图1 NRF1, mtTFA RT-PCR扩增产物

Fig 1 NRF1, mtTFA products with RT-PCR

2.4 大鼠心肌细胞缺氧复氧不同时间NRF1和mtTFA mRNA表达的变化

培养的心肌细胞缺氧24 h,NRF1mRNA和mtTFA mRNA表达呈明显降低;缺氧复氧2、4、8 h各时相点NRF1mRNA和mtTFA mRNA表达进一步下降,缺氧复氧8 h NRF1mRNA比4 h明显降低,见图2~5。

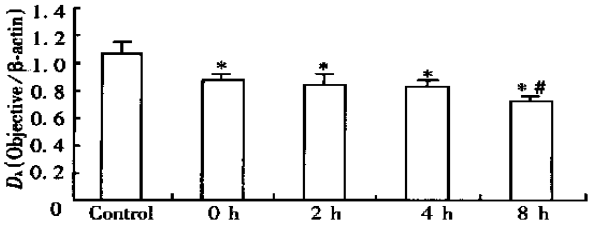
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



C: Control; Lane 1~4: 0.2、4.8 h after H/R

图 2　用 RT-PCR 检测缺氧复氧对 NRF1 mRNA 表达的影响

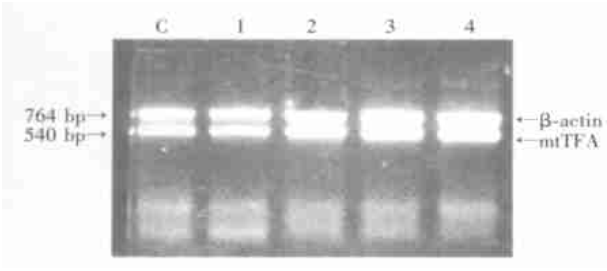
Fig 2　Effect of H/R on NRF1 mRNA expression with RT-PCR



*: $P<0.05$ *vs* control; #: $P<0.05$ *vs* 4 h

图 3　缺氧复氧对 NRF1 mRNA 表达的影响

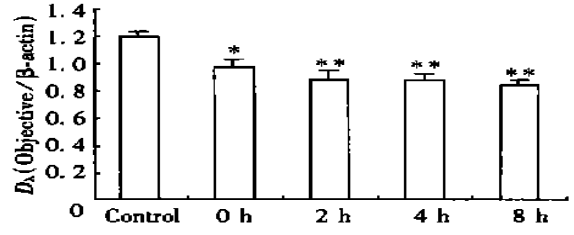
Fig 3　Effect of H/R on NRF1 mRNA expression with RT-PCR



C: Control; Lane 1: Hypoxia 24 h; Lane 2~4: 2、4.8 h after reoxygenation

图 4　用 RT-PCR 检测缺氧复氧对 mtTFA mRNA 表达的影响

Fig 4　Effect of H/R on mtTFA mRNA expression



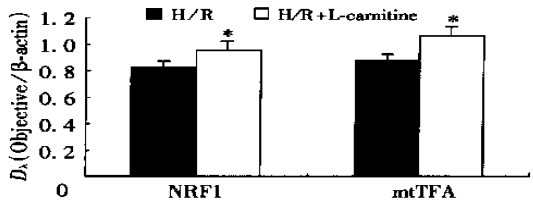
*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

图 5　缺氧复氧对 mtTFA mRNA 表达的影响

Fig 5　Effect of H/R on mtTFA mRNA expression

2.5　L-carnitine 对缺氧复氧大鼠心肌细胞 NRF1 和 mtTFA mRNA 表达的影响。

与缺氧复氧组比较, 用 L-carnitine 预处理可使缺氧复氧大鼠心肌细胞 NRF1mRNA 的表达增加 15%, 使 mtTFAmRNA 的表达增加 20%, 见图 6。



*: $P<0.05$ *vs* H/R

图 6　L-carnitine 对缺氧复氧大鼠心肌细胞 NRF1 和 mtTFA mRNA 表达的影响

Fig 6　Effects of L-carnitine on mRNA expressions of NRF1 and mtTFA in cultured neonatal rat myocardial after H/R

3　讨论

心肌缺血一定时间后恢复血供反而加重心肌损伤, 这一现象称之为缺血再灌注损伤。缺血再灌注损伤的最关键因素是缺氧复氧。由于心肌细胞产能的主要方式是依赖发生于线粒体有氧条件下的脂肪酸β氧化, 这一与其它组织绝然不同的供能方式决定了心肌组织对缺氧损伤的高度敏感性以及心肌细胞内脂肪酸代谢的至关重要性。深入研究缺氧复氧能量代谢损伤的调控机制仍然是解决缺血再灌注损伤治疗的关键。

线粒体呼吸链蛋白亚基是由核基因组和线粒体基因组编码合成。由核基因组编码的线粒体呼吸链蛋白的转录翻译等过程受核呼吸因子 NRFs 调节, 目前已证实了细胞色素 c 还原酶和氧化酶、抗氧化物反应元件(Antioxidant response element, ARE)[4,5] 及 ATPase 亚基的基因启动子中均具有 NRF-1 的功能性结合位点。由于 mtTFA 含有 NRFs 的结合位点, mtTFA 也受到 NRFs 的调节; mtTFA 通过调节 mtDNA 的转录与复制, 从而调控 mtDNA 编码呼吸链蛋白亚基[6~8]。我们推测心肌细胞缺氧复氧可能通过降低 NRF1 和 mtTFA 表达, 引起线粒体呼吸链酶蛋白表达降低, 线粒体酶活性下降, 从而损伤线粒体能量代谢。本实验结果显示培养的心肌细胞缺氧复氧 0~8 h, 细胞 ATP、ADP 均明显下降。首次证实, 培养的心肌细胞缺氧 24 h, NRF1mRNA 和 mtTFAmRNA 表达明显降低, 复氧 2~8 h 心肌细胞 NRF1 和 mtTFA mRNA 表达进一步降低。提示心肌细胞在缺氧复氧过程中线粒体 ATP 合成明显减少, 能量代谢降低, 并且与调节线粒体呼吸链亚基表达的重要因子 NRF1 和 mtTFA 表达受到抑制有关。与文献报道心肌细胞在缺氧复氧过程中线粒体酶琥珀酸脱氢酶(Succinodehydrogenase, SDH)、细胞色素氧化酶(Cytochrome c oxidase, CCO)、ATPase 等活性明显下降, 呼吸链上细胞色素 c 等电子传递细胞色素也急剧降低, 导致线粒体能量代谢显著降低一致[9]。

临床上经常用输入外源 ATP 来增加心肌能量, ATP 分子体积大, 并带有静电荷不易进入细胞内, 更主要的是由于细胞膜上存在可使 ATP 分解的酶类, 使 ATP 分解为 ADP 和 AMP, AMP 进一步分解成腺苷等

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

产物。同时,这些酶降解产物本身亦可阻碍 ATP 进入细胞内。因此,人们仍不断探索不同药物对心肌缺血再灌注损伤的保护和治疗作用。L-carnitine 广泛分布于不同组织细胞,其作用是作为携带长链脂酰 CoA 通过线粒体内膜的载体,促进长链脂肪酸的有氧氧化。文献[2]表明,在缺氧条件下,L-carnitine 通过维护 SDH 和 COX 活性,降低心肌细胞的缺氧程度,从而改善线粒体的能量代谢。本实验结果表明与单纯缺氧复氧组比较,L-carnitine 预处理组,心肌细胞缺氧复氧 0、2、4、8 h 后 ATP 含量明显提升;缺氧复氧大鼠心肌细胞 NRF1 和 mtTFA mRNA 的表达增加。说明 L-carnitine 预处理培养心肌细胞可明促进心肌细胞缺氧复氧过程中 ATP 生成,明显改善能量代谢,保护心肌细胞。并首次提出 L-carnitine 在基因转录水平作用机制是调控 NRF1 与 mtTFA 表达的实验证据。

参考文献:

[1] 张建青,刘 俭,赖世忠,等. 卡托普利和依那普利对培养心肌细胞缺氧再复氧损伤的保护作用[J]. 第一军医大学学报,1996,16(3):189-191.
[2] Calvani M, Reda E, Arrigoni-Martelli E. Regulation by carnitine of myocardial fatty acid and carbohydrate metabolism under normal and pathological conditions[J]. Basic Res Cardiol, 2000, 95(2): 75-83.
[3] J 萨姆布鲁克, E F 弗思奇, T. 曼氏阿蒂斯 主编. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 科学出版社,1998.
[4] Venugopal R, Jaiswal A K. NRF-1 and NRF-2 positively and c-fos and Fral negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 gene[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(25): L14 960-14 965.
[5] Venugopal R, Jaiswal A K. NRF-2 and NRF-1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes[J]. Oncogene, 1998, 117(24): L3 145-3 156.
[6] Scarpull R C. Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cell[J]. Bioenergetics Biomembranes, 1997, 29(2): 109-119.
[7] Montoya J, Perez-Martos A, Garstka H L, *et al*. Regulation of mitochondrial transcription by mitochondrian transcription factor A[J]. Molecular Cellular Biochemistry, 1997, 174(1~2): 227-230.
[8] Au H C, Scheffler I E. Promoter analysis of the human succinate dehydrogenase iron-protein gene-both nuclear respirator factor NRF-1 and NRF-2 are requined[J]. Eur J Biochem, 1998, 1 251(1-2): 164-174.
[9] 宋海燕,曾宪惠,刘鸣旺,等. 肉毒碱对实验性心肌损伤线粒体呼吸酶的影响[J]. 哈尔滨医科大学学报,1997,31(1):37-38.

(编辑 薛国文)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2001)12-1402-01

阑尾术后肠腔内出血 3 例报告

Three cases report of intestinal hemorrhage after appendectomy

李义兵,聂 伟 (武警重庆总队医院外一科,重庆 400061)

1 临床病例

病例 1,男,25 岁。诊断为急性阑尾炎,行阑尾切除术。术中见阑尾已化脓,切除阑尾后按常规方法处理残端,即结扎阑尾根部、荷包缝合包埋。术后 2~4 d,每日解暗红色血便 100~200 ml,经止血药物治疗后大便转黄,后行钡灌肠检查未见异常,痊愈出院。

病例 2,男,47 岁。诊断为急性化脓性阑尾炎,行阑尾切除术,术中证实为化脓性阑尾炎。切除阑尾,常规方法处理残端。术后 3~5 d 解暗红色血便共 400 ml,经止血药治疗后大便转黄,后行上消化道钡餐,纤维肠镜检查未见异常,痊愈出院。

病例 3,男,25 岁。因化脓性阑尾炎行阑尾切除术。术中分离阑尾系膜时不慎将阑尾根部分破,遂在破口处切除阑尾,在破口下方结扎阑尾"根部",在盲肠上作荷包缝合包埋残端,术后当天解暗红色血便 500 ml,次日上午解鲜血便 1 000 ml,并出现血压下降,心率 120 次/min。经输血、止血药物治疗无效,再次手术,原切口进腹,见腹腔内无出血,拆开盲肠上荷包缝线,发现阑尾已全切,未见原结扎线,所谓残端为盲肠壁上一直径 1 cm 的缺损,缺损边缘有一小动脉持续喷血,止血后全层间断缝合加浆肌层缝合关闭盲肠缺损,术后未再出血,痊愈出院。

作者简介:李义兵(1953-),男,河北省三和市人,硕士,主任医师,主要从事胃肠道及乳腺肿瘤方面的研究,发表论文 11 篇。电话:(023)62511985-24901

收稿日期:2001-07-11;修回日期:2001-09-14

2 讨论

阑尾手术对残端的处理最常见的方法是:结扎阑尾根部加荷包缝合包埋。有一种观点认为:阑尾残端包埋入盲肠壁内有可能发生残余感染,在盲肠壁内形成脓腔,引起一系列不良后果。因此主张不结扎根部,仅作荷包包埋,或以反结、滑结结扎[1]。这样,当包埋残端的腔内有感染而压力增高时,结可自行松开,腔内脓液可通过开放的残端引流入肠腔。由病例 1~2 得知,残端不结扎或结扎不紧可发生出血,因为即使阑尾系膜动脉已被结扎,阑尾残端仍可接受来自盲肠后动脉的血供[1]。因此从安全考虑,结扎阑尾根部应牢靠,以滑结、反结结扎并不可取。此外,当阑尾根部穿孔或分离系膜不慎分破根部,需行阑尾全切时,不应再试图结扎"阑尾根部",因此时结扎的实际是盲肠壁,往往不易扎紧,特别是作荷包内翻缝合后,结扎线极易松脱,从而导致出血,病例 3 就是属于这种情况,因此,阑尾全切后,应采用全层间断缝合加浆肌层缝合来关闭盲肠缺损。

关键词:急性阑尾炎切除;术后出血
中图法分类号:R656.8 文献标识码:B

参考文献:

[1] 吴阶平,裘法祖 主编. 黄家驷. 外科学[M]. 第 5 版. 北京:人民卫生出版社,1997. 1 231-1 238.

(编辑 张大春)

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