

p38 丝裂素活化蛋白激酶信号传导通路对低氧预处理后心脏成纤维细胞血红素氧化酶-1 基因表达的影响

林杰, 吴岚, 王螺, 张海燕, 杨禹娟

(中国医科大学附属第一医院老年病科, 辽宁 沈阳 110001)

[摘要] 目的:探讨 p38 丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)信号传导对低氧预处理(HPC)的细胞保护作用以及 HPC 后血红素氧化酶-1(HO-1)mRNA 表达的影响。方法:选用新生 Wistar 大鼠心脏进行成纤维细胞培养,给予 HPC 及低氧/复氧处理(HR)。药物处理组在 HPC 和 HR 处理过程中向培养液中加入 SB203580。测定细胞培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)浓度和细胞 HO-1 mRNA 表达量。结果:低氧/复氧后,HPC/SB 组 LDH 浓度显著高于 HPC/NSB 组 ($P < 0.05$)。HR 组低氧/复氧后各亚组 LDH 浓度均显著升高 ($P < 0.01, P < 0.01$); 低氧/复氧处理前 HPC 组中 NSB 亚组于低氧预处理后 HO-1 mRNA 表达显著上升 ($P < 0.001$),低氧/复氧处理后其表达有所下降;SB 亚组其表达也显著上升($P < 0.01$)。HR 组中各亚组于低氧/复氧处理后 HO-1 mRNA 表达也显著上升($P < 0.01$)。结论:对培养的心脏成纤维细胞给予低氧预处理能够减轻其后低氧/复氧对细胞的损伤,低氧预处理较低氧/复氧处理更能够显著诱导心脏成纤维细胞 HO-1 mRNA 的表达。

[关键词] 血红素氧化酶-1;低氧预处理;心脏成纤维细胞;丝裂素活化蛋白激酶

[中图分类号] R541.9 [文献标识码] A [文章编号] 0258-4646(2007)06-0653-03

p38 MAPK signaling pathway involved in the expression of HO-1 mRNA following hypoxic preconditioning in neonatal cardiac fibroblasts

LIN Jie, WU Lan, WANG Lei, ZHANG Hai-yan, YANG Yu-juan

(Department of Gerontology, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[Abstract] Objective: To investigate whether p38MAPK signaling pathway involved in the protection of hypoxic preconditioning (HPC) to cardiac fibroblasts from hypoxia-reoxygenation (HR) injury and the expression of HO-1mRNA in cardiac fibroblasts following HPC. Methods: Cardiac fibroblasts were prepared from neonatal Wistar rats in the third passage at confluence. HPC and HR treatment were applied to them. Cell treatment with SB203580 were performed by adding it into the culture medium during HPC and HR. The released LDH-activity of the culture supernatant was measured. HO-1 mRNA levels were examined by real-time PCR. Results: LDH activity in HPC/SB group was significantly higher than NSB group after HPC/HR ($P < 0.05$). In HR group, LDH activity after HR were significantly higher in both NSB and SB subgroup ($P < 0.01, P < 0.01$). In HPC group, the transcription induction of HO-1 elevated most significantly in NSB subgroup after HPC ($P < 0.001$), then, it decreased slightly after HPC/HR ($P < 0.001$); expression of HO-1 also increased significantly ($P < 0.01$) in SB subgroup. In HR group, HO-1 mRNA increased significantly after HR ($P < 0.01$). Conclusion: In summary, hypoxic preconditioning can reduce a subsequent hypoxic/reoxygenation-induced injury in cardiac fibroblasts. This protection can be inhibited by the administration of SB203580, a selective inhibitor of p38 MAPK. Elevation of HO-1mRNA induction following HPC was more significant than that following HR, this augmented expression could also be suppressed by SB203580.

[Key words] heme-oxygenase-1; preconditioning; cardiac fibroblast; mitogen-activated protein kinase

预先短暂反复多次缺血的心肌对其后严重缺血的抵抗和耐受性增强的现象称为“缺血预适应”(ischemic preconditioning, IPC)。大量动物实验均证实了 IPC 不仅可以减少其后心肌梗死面积,还可以促进心功能的恢复,减少再灌注性心律失常的发生^[1,2]。血红素氧化酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)是血红素分解代谢的限速酶,在机体受到各种刺激处于应激状态时被诱导升高。心脏缺血预适应和缺

血再灌注时 HO-1 表达增强并参与保护心肌、减轻心肌损伤的作用^[3,4]。近年来的研究发现,细胞中广泛存在着丝裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)系统,它是细胞内主要的信号传导系统。各种应急刺激均可激活 MAPK 信号传导通路,并通过该通路引起内源性保护物质的合成、释放以及一系列受体的通道开放,从而发挥生理活性^[5,6]。

本试验以培养乳鼠的心脏成纤维细胞作为研究对象,给予细胞低氧预处理(hypoxic preconditioning, HPC)及低氧/复氧处理(hypoxia/reoxygenation, HR),观察低氧预处理对细胞的保护作用以及

[基金项目] 辽宁省教育厅高等学校科研基金资助项目(05L526)

[作者简介] 林杰(1963-),女,教授,博士。

E-mail: linjiew@163.com

低氧预处理后细胞 *HO-1*mRNA 表达的变化,并进一步探讨了 p38MAPK 抑制剂 SB203580 对该保护作用和对 *HO-1*mRNA 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

无菌操作取出新生 Wistar 大鼠细胞培养基本上按照 SIMPSON 方法进行^[7],实验采用第三代心脏成纤维细胞。

1.2 研究方法

(1) 实验分组:细胞分为低氧预处理组(HPC 组)和低氧/复氧处理组(HR 组),每组再分为非药物处理组(NSB 亚组)和药物处理组(SB 亚组)。药物处理组是在处理过程中,向细胞培养液中加入 p38MAPK 阻断剂 SB203580,浓度为 10 μmol/L。(2) 低氧预处理及低氧/复氧处理:低氧预处理刺激条件是将细胞置入低氧培养箱中孵育 20 min,取出置入常氧培养箱中 30 min,共 3 个循环;低氧/复氧处理条件是将细胞置入低氧培养箱中孵育 4 h,取出置入常氧培养箱中 2 h。低氧培养箱中低氧条件为 94% N₂、1% O₂、5% CO₂,37 °C。HPC 组在低氧预处理后再给予低氧/复氧处理,HR 组直接给予低氧/复氧处理。(3) 细胞培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)浓度的测定。(4) RNA 提取和 cDNA 合成:HPC 组于低氧预处理前、后和低氧/复氧处理后,

HR 组于低氧/复氧处理前后自心脏成纤维细胞中提取总 RNA,按照操作流程使用 Rneasy Mini Kit 进行。逆转录试剂盒购自 Promega 公司,操作步骤按照制造商说明书进行。(5) 即时定量 RT-PCR:即时定量 PCR 按照 ABI Prism 7700 Sequence Detection 系统操作流程进行。*HO-1*、*GAPDH*(作为内部对照)的引物和 TaqMan 探针设计应用引物设计软件 Primer Express 1.0 计算机辅助设计,由 TaKaRa 公司合成。PCR 反应混合物包括 RT 产物 3 μl、TaqMan 探针 2.5 μl、前向和后向引物各 1 μl、2×TaqMan Universal PCR Master Mix 12.5 μl,按照下列参数进行 PCR:50 °C 2 min 1 循环、95 °C 10 min 1 循环、95 °C 15 s、60 °C 1 min 40 循环。数据分析使用绝对标准曲线方法,应用相应的被提纯的 PCR 产物的稀释系列制作标准曲线^[8]。数据使用 Sequence Detector 软件分析。

1.3 统计学分析

结果用 $\bar{x} \pm s$ 差表示,各组间统计学差异使用 ANOVA 分析。用 SPSS 统计分析软件包的 Independent-sample test 进行统计学处理。

2 结果

2.1 HPC 组低氧预处理前、后和低氧/复氧处理后,HR 组低氧/复氧处理前、后细胞培养上清液中 LDH 浓度的比较(表 1)

表 1 HPC 组 HPC 前、HPC 后和 H/R 后、H/R 组 H/R 前后细胞培养上清液中 LDH 浓度的比较($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 Comparison of the LDH level in the culture supernatants in different groups($\bar{x} \pm s$)

LDH 浓度(U/L)	HPC 组			HR 组	
	HPC 前	HPC 后	HPC/HR 后	HR 前	HR 后
NSB 亚组	16.2 ± 2.98	20.5 ± 2.54	24.2 ± 5.32	15.2 ± 2.14	78.4 ± 8.12 ²⁾
SB 亚组	17.1 ± 3.19	22.9 ± 3.18	54.5 ± 7.83 ¹⁾	15.9 ± 2.98	85.1 ± 9.15 ²⁾

注:1)与本组 HPC 前、HPC 后及 HPC/NSB 组同项相比较 $P < 0.05$;2),与 HPC/SB 组 HPC+H/R 的值相比较, $P < 0.01$

处理前各组细胞培养上清液中 LDH 浓度无显著差异。HPC 组低氧预处理后 NSB 亚组和 SB 亚组 LDH 浓度仅轻度升高,再经过低氧/复氧处理后,NSB 亚组 LDH 浓度仍无显著升高,而 SB 亚组 LDH 浓度显著高于本组 HPC 前、后及 NSB 组同项的 LDH 浓度($P < 0.05$)。HR 组低氧/复氧处理后 NSB

亚组和 SB 亚组 LDH 浓度均显著升高($P < 0.01$, $P < 0.01$),升高幅度无显著差异。

2.2 HPC 组低氧预处理前、后和低氧/复氧处理后,HR 组低氧/复氧处理前、后细胞 *HO-1*mRNA 表达量的比较(表 2)

表 2 HPC 组 HPC 前、HPC 后和 H/R 后、H/R 组 H/R 前后细胞 *HO-1*mRNA 表达量的比较($\bar{x} \pm s$)
Tab.2 Comparison of the *HO-1*mRNA level in neonatal cardiac fibroblasts in different groups($\bar{x} \pm s$)

<i>HO-1</i> mRNA 表达(倍数)	HPC 组			HR 组	
	HPC 前	HPC 后	HPC/HR 后	HR 前	HR 后
NSB 亚组	1.017 ± 0.183	7.089 ± 1.184 ¹⁾	5.078 ± 0.965 ¹⁾	1.201 ± 0.123	4.058 ± 0.812 ³⁾
SB 亚组	1.214 ± 0.169	3.521 ± 0.529 ²⁾	3.106 ± 0.416 ²⁾	1.089 ± 0.202	3.898 ± 0.792 ³⁾

注:1)与本组 HPC 处理前相比较, $P < 0.01$;2)与本组 HPC 处理前及 HPC/NSB 组同项相比较, $P < 0.01$;3)与本组 HPC 处理前、HPC/NSB 组 HPC 后相比较, $P < 0.01$

处理前各组细胞 *HO-1*mRNA 表达无显著差异。HPC 组中 NSB 亚组于低氧预处理后 *HO-1*mRNA 表达显著上升 ($P < 0.001$), 其后的低氧/复氧处理后其表达有所下降, 但仍显著高于本组 HPC 处理前水平 ($P < 0.001$); SB 亚组上述 *HO-1*mRNA 表达也显著上升 ($P < 0.01$), 但上升幅度低于 NSB 亚组 ($P < 0.01$)。HR 组中各亚组于低氧/复氧处理后 *HO-1* mRNA 表达也显著上升 ($P < 0.01$), 但上升幅度显著低于 HPC/NSB 亚组 HPC 后的水平 ($P < 0.01$)。

3 讨论

许多研究已经证实了内源性 HO-1 在氧化应激过程中对机体能产生保护作用, 此作用主要归因于 HO-1 催化 hemin 转化为具有血管活性的 CO 分子和具有抗氧化作用的胆红素^[8,9]。本研究结果提示 HPC 可能作为刺激因素引起心脏成纤维细胞 *HO-1*mRNA 的表达上调, 从而使 *HO-1* 活性升高, 减轻了其后低氧/复氧处理对细胞的损伤。

近年来的研究发现缺血预适应的心脏或缺氧预适应的培养心肌细胞中 MAPK 活性明显增高并与预适应对细胞的保护作用密切相关, 其中 p38 的磷酸化目前被认为是参与 IPC 保护作用的较为重要的信号传导通路^[10,11]。KACIMI^[12]等的研究进一步发现 16 h 持续低氧后的心肌细胞 *HO-1* 的基因表达和蛋白表达显著增加, 并可被 p38MAPK 抑制剂 SB203580 所强烈抑制。这些研究结果表明, p38MAPK 信号传导通路在预处理过程中对心脏的保护作用与 HO-1 的诱导有较为密切的关系。

本研究结果表明, 低氧预处理能够减轻其后低氧/复氧处理对细胞的损伤, 但是, 在处理过程中加入 SB203580 可减弱低氧预处理对细胞的保护作用。而对于单纯低氧/复氧处理的细胞, SB203580 对其引起的细胞损伤无显著影响。与之相对应, 低氧预处理可显著诱导 *HO-1* mRNA 表达, SB203580 能够抑制低氧预处理后 *HO-1* mRNA 表达的增强, 但是对单纯低氧/复氧引起的 *HO-1* mRNA 表达上调无显著影响。这一研究结果与上述研究结果是相一致的。提示了 p38MAPK 信号传导通路在低氧预适应过程中通过上调保护性蛋白 HO-1 的表达发挥其细胞保护作用, p38MAPK 抑制剂 SB203580 能够显著减弱或消除此保护作用。

参考文献:

- [1] MURRY CE, JENNINGS RB, REIMER KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium [J]. *Circulation*, 1986, 74(5): 1124-1136.
- [2] CHOTT R, ROHMANN S, BRAUN E, et al. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium [J]. *Circ Res*, 1990, 66(4): 1133-1142.
- [3] ABRAHAM NG, DRUMMOND GS, LUTTON JD et al. The biological significance and physiological role of heme oxygenase [J]. *Cell Physiol Biochem*, 1996, 6(3): 129-168.
- [4] ANGAISHI M, ISHIZAKA N, AIZAWA T, et al. Induction of heme oxygenase-1 can act protectively against cardiac ischemia/reperfusion in vivo [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 279(2): 582-588.
- [5] AHN NG. The MAP kinase cascade discovery of a new signal transduction pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 1993, 127-128(1): 201-209.
- [6] UGDEN PH, CLERK A. Stress-responsive mitogen-activated protein kinase (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinase) in the myocardium [J]. *Circ Res*, 1998, 83(4): 345-352.
- [7] SIMPSON P, SAVION S. Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. Cross-striations, ultrastructure, and chronotropic response to isoproterenol [J]. *Circ Res*, 1982, 50(1): 101-116.
- [8] MOTTERLINI RA, GONZALES R, FORESTI JE, et al. Heme oxygenase-1 derived carbon monoxide contributes to the suppression of acute hypertensive responses in vivo [J]. *Circ Res*, 1998, 83(5): 568-577.
- [9] FORRESTI R, GOATLY H, GREEN CJ, et al. Role of heme oxygenase-1 in hypoxia-reoxygenation requirement of substrate heme to promote cardioprotection [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 281(5): H1976-H1984.
- [10] NAKANO A, BAINES CP, KIM SO, et al. Ischemic preconditioning activates MAPKAPK2 in the isolated rabbit heart: Evidence for involvement of p38 MAPK [J]. *Circ Res*, 2000, 86(2): 144-151.
- [11] SAURIN AT, HEADS RJ, FOLEY C, et al. Inhibition of p38MAPK activation may underlay protection in a surrogate model of ischemic preconditioning [J]. *Circulation*, 1999, 100(suppl 1): 489-492.
- [12] CIMI R, CHENTOUFI J, HONBO N, et al. Hypoxia differentially regulates stress proteins in cultured cardiomyocytes: role of the p38 stress-activated kinase signaling cascade, and relation to cytoprotection [J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 46(1): 139-150.
- [13] NANANO A, COHEN MV, CRITZ S, et al. SB 203580, an inhibitor of p38MAPK, abolishes infarct-limiting effect of ischemic preconditioning in isolated rabbit hearts [J]. *Basic Res Cardiol*, 2000, 95(6): 466-471.

[收稿日期] 2007-03-14

(编辑 孙宪民)