

反义 p38 α 丝裂原活化蛋白激酶对缺氧复合烧伤血清处理心肌细胞的作用研究



郑军 黄跃生 黄晓元 范鹏举 贺伟峰 张小容

【摘要】 目的 研究反义 p38 α MAPK(以下简称 p38 α)对缺氧及烧伤血清复合处理心肌细胞的作用。方法 取 30 只成年 SD 大鼠制备烧伤血清(背部 40% TBSA III 度烧伤)。取 80 只 SD 大鼠的乳鼠分离、培养心肌细胞,按随机数字表法将细胞分为 4 组:正常对照组,心肌细胞未经任何处理,常规培养;烧伤血清+缺氧组,心肌细胞中加入体积分数 10% 烧伤大鼠血清后行缺氧培养;烧伤血清+缺氧+感染组,采用反义 p38 α 转染的腺病毒感染心肌细胞,再加入体积分数 10% 烧伤大鼠血清后行缺氧培养;烧伤血清+缺氧+空载感染组,用空载腺病毒感染心肌细胞,再加入体积分数 10% 烧伤大鼠血清行缺氧培养。后 3 组于缺氧 1、3、6、12 h 后,分别采用 RT-PCR 法和蛋白质印迹法检测各组心肌细胞 p38 α mRNA 和蛋白表达,采用噻唑蓝法检测细胞活力,检测乳酸脱氢酶(LDH)含量;于缺氧 1、6、12 h 后,采用膜联蛋白 V 单染法检测心肌细胞凋亡率。正常对照组行同上检测。每组各时相点设 3 个复孔。对数据进行单因素方差分析及 LSD-*t* 检验。结果 (1)缺氧 1、3、6 h,烧伤血清+缺氧组 p38 α mRNA 表达水平与正常对照组和烧伤血清+缺氧+感染组比较均升高,且差异有统计学意义(*t* 值为 2.725~4.375, *P* 值均小于 0.05)。(2)缺氧 1、3、6 h,烧伤血清+缺氧组 p38 α 蛋白表达水平与正常对照组和烧伤血清+缺氧+感染组比较均显著升高(*t* 值为 5.351~7.981, *P* 值均小于 0.01)。(3)缺氧 3、6、12 h,烧伤血清+缺氧组心肌细胞活力分别为 0.115 \pm 0.007、0.104 \pm 0.006、0.094 \pm 0.005,与正常对照组的 0.141 \pm 0.014 和烧伤血清+缺氧+感染组的 0.136 \pm 0.009、0.124 \pm 0.010、0.112 \pm 0.007 比较均降低,且差异有统计学意义(*t* 值为 2.357~6.812, *P* 值均小于 0.05)。(4)缺氧后各时相点,烧伤血清+缺氧组 LDH 含量与正常对照组和烧伤血清+缺氧+感染组比较均显著升高(*t* 值为 22.753~201.273, *P* 值均小于 0.01)。(5)缺氧 1、6、12 h,烧伤血清+缺氧组心肌细胞凋亡率分别为(5.4 \pm 0.7)%、(8.7 \pm 1.1)%、(13.6 \pm 1.7)%,与正常对照组的(3.1 \pm 0.3)%和烧伤血清+缺氧+感染组的(4.3 \pm 0.5)%、(5.1 \pm 0.7)%、(7.2 \pm 0.9)%比较均升高(*t* 值为 2.345~9.700, *P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。结论 反义 p38 α 对烧伤血清+缺氧损伤条件下心肌细胞具有保护作用。

【关键词】 烧伤; 血清; 缺氧; p38 丝裂原活化蛋白激酶类; 肌细胞,心脏; 细胞凋亡

Effects of antisense p38 α mitogen-activated protein kinase on myocardial cells exposed to hypoxia and burn serum ZHENG Jun, HUANG Yue-sheng, HUANG Xiao-yuan, FAN Peng-ju, HE Wei-feng, ZHANG Xiao-rong. Department of Burns and Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of the University of South China, Hengyang 421001, China

Corresponding author: HUANG Yue-sheng, 400038, Email: yshuang1958@163.com, Tel: 023-68766023

【Abstract】 Objective To study the effects of antisense p38 α mitogen-activated protein kinase (hereinafter referred to as p38 α) on myocardial cells exposed to hypoxia and burn serum. **Methods** Thirty adult SD rats were inflicted with 40% TBSA full-thickness burn on the back to obtain burn serum.

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2013.03.010

基金项目:湖南省自然科学基金(05JJ40038);湖南省卫生厅基金(B2006-114);湖南省教育厅基金(05C467);创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室开放基金(SKCLKF2010026)

作者单位:421001 湖南省衡阳市,南华大学附属第一医院烧伤整形外科(郑军);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(黄跃生、贺伟峰、张小容);中南大学湘雅医院烧伤重建外科(黄晓元),整形美容外科(范鹏举)

通信作者:黄跃生,400038,Email:yshuang1958@163.com,电话:023-68766023

The myocardial cells were isolated from 80 neonatal SD rats and cultured, then they were divided into 4 groups according to the random number table: normal control group (N, ordinary culture without any treatment), hypoxia + burn serum group (HB, exposed to hypoxia after being treated with 10% burn rat serum), hypoxia + burn serum + infection group (HBI, exposed to hypoxia and 10% burn rat serum after being infected with antisense p38 α gene-carrying adenovirus), hypoxia + burn serum + empty vector infection group (exposed to hypoxia and 10% burn rat serum after being infected with adenovirus empty vector). At post hypoxia hour (PHH) 1, 3, 6, and 12, mRNA and protein expression levels of p38 α in the latter 3 groups were determined by RT-PCR and Western blotting, cell viability was determined by methylthianolyldiphenyl-tetrazolium bromide assay, and lactate dehydrogenase (LDH) activity was assayed at the same time point. At PHH 1, 6, and 12, apoptosis rate of myocardial cells was assessed by annexin V staining method. The indexes of group N were determined with the methods mentioned-above. Three wells were set at each time point in each group. Data were processed with one-way analysis of variance and LSD-*t* test. **Results**

(1) At PHH 1, 3, and 6, the p38 α mRNA level was higher in group HB than in group N and group HBI (with *t* values from 2.725 to 4.375, *P* values all below 0.05). (2) At PHH 1, 3, and 6, the p38 α protein level was higher in group HB than those in group N and group HBI (with *t* values from 5.351 to 7.981, *P* values all below 0.01). (3) At PHH 3, 6, and 12, the cell viability in group HB (0.115 \pm 0.007, 0.104 \pm 0.006, 0.094 \pm 0.005) was lower than that in group N (0.141 \pm 0.014) and group HBI (0.136 \pm 0.009, 0.124 \pm 0.010, 0.112 \pm 0.007, with *t* values from 2.357 to 6.812, *P* values all below 0.05). (4) The LDH activity was up-regulated in group HB as compared with that in group N and group HBI at each time point (with *t* values from 22.753 to 201.273, *P* values all below 0.01). (5) At PHH 1, 6, and 12, the apoptosis rate of myocardial cells in group HB [(5.4 \pm 0.7)%, (8.7 \pm 1.1)%, (13.6 \pm 1.7)%] was higher than that of group N [(3.1 \pm 0.3)%] and group HBI [(4.3 \pm 0.5)%, (5.1 \pm 0.7)%, (7.2 \pm 0.9)%], with *t* values from 2.345 to 9.700, *P* < 0.05 or *P* < 0.01]. **Conclusions** Antisense p38 α can protect the myocardial cells from the injury of hypoxia and burn serum.

【Key words】 Burns; Serum; Anoxia; p38 mitogen-activated protein kinases; Myocytes, cardiac; Apoptosis

严重烧伤后 MODS 已成为患者的主要死亡原因^[1],其中由于早期缺血缺氧、失控性炎症反应等导致的器质性心肌损害尤为突出^[2-3]。p38 MAPK 是应激信号传递的一条主要通路^[4-6],在应激性刺激所致的细胞损害乃至死亡中起重要作用,而其亚型 p38 α MAPK(以下简称 p38 α)与组织细胞损伤关系最为密切且在心肌细胞中有明显表达^[7-8]。鉴于此,本研究拟通过建立体外烧伤血清 + 缺氧损伤心肌细胞模型,将反义 p38 α 基因重组腺病毒导入心肌细胞,观察心肌细胞活力、凋亡及乳酸脱氢酶(LDH)漏出等,以探讨其对缺氧复合烧伤血清损伤心肌细胞的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

反义 p38 α 转染腺病毒由本实验室自制^[9],总 RNA 提取试剂购自美国 Roche 公司,二辛丁酸蛋白浓度测定试剂盒购自美国 Pierce 公司,抗 p38 α 激酶抗体购自美国 Chemicon 公司,噻唑蓝购自美国 Sigma 公司,LDH 试剂盒购自南京建成生物工程研究所,膜联蛋白 V 荧光染色试剂盒购自美国 Roche 公司,CO₂ 细胞培养箱购自德国 Heraeus 公司,PE9600 型 PCR 仪购自美国 Perkin Elmer 公司,

CKX31 型倒置相差显微镜、IX71 型荧光显微镜购自日本 Olympus 公司,电泳仪、电转仪购自北京六一仪器厂,SX-100 型凝胶成像仪购自上海四星公司,DU-7 型紫外分光光度计购自美国 Beckman 公司,FACS CaliburTM 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.2 动物来源

清洁级健康成年 SD 大鼠 30 只,雌雄不拘,体质量 200 ~ 280 g;出生 1 ~ 2 d 清洁级健康 SD 大鼠乳鼠 80 只,雌雄不拘。动物均由第三军医大学实验动物中心提供。

1.3 实验方法

1.3.1 烧伤大鼠血清制备及心肌细胞培养 取 30 只成年 SD 大鼠造成背部 40% TBSA III 度烫伤,取血清备用^[10]。取 80 只 SD 大鼠的乳鼠,参照文献^[10]方法分离培养大鼠心肌细胞。

1.3.2 细胞分组与处理 将心肌细胞按每孔 5 \times 10⁵ 个接种于 6 孔培养板中,待细胞生长至 80% 融合时,按随机数字表法分为 4 组:(1)正常对照组,心肌细胞未经任何处理,常规培养。(2)烧伤血清 + 缺氧组,在心肌细胞中加入体积分数 10% 烧伤大鼠血清后行缺氧培养^[10]。(3)烧伤血清 + 缺氧 + 感染组,去除培养上清液,每孔加入感染复数为 91 的反义 p38 α 转染的腺病毒,补充 500 μ L DMEM-F12 培

养液, 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 条件下孵育, 每隔 30 min 轻轻摇匀数次, 3 h 后每孔加入 DMEM-F12 培养液 1500 μL 感染 72 h。再加入体积分数 10% 烧伤大鼠血清后同前行缺氧培养。(4) 烧伤血清 + 缺氧 + 空载感染组, 用空载腺病毒感染心肌细胞, 方法同上, 再加入体积分数 10% 烧伤大鼠血清行缺氧培养。

1.4 检测指标与方法

后 3 组细胞于缺氧 1、3、6、12 h 后收集标本检测 p38α mRNA 及蛋白表达、细胞活力及 LDH 活性; 而心肌细胞凋亡率仅于缺氧 1、6、12 h 后测定。正常对照组不施加任何刺激, 但于同时相点收集标本进行相应指标测定。每组各时相点设 3 个复孔。

1.4.1 心肌细胞 p38α mRNA 和蛋白表达 分别采用 RT-PCR 法和蛋白质印迹法检测各组心肌细胞 p38α mRNA 和蛋白表达, 操作参照文献[9]方法进行, 结果均用灰度值比值表示。

1.4.2 心肌细胞活力 采用噻唑蓝法检测。在各组细胞中分别加入 5 mg/mL 的噻唑蓝 20 μL, 孵育 4 h, 终止培养, 弃上清液。每孔加入二甲基亚砷 150 μL, 于 490 nm 波长下, 采用分光光度计测定各时相点吸光度值。

1.4.3 LDH 含量 收集心肌细胞培养上清液, 以 200 × g 离心 2 min, 取上清液, 检测 LDH 含量, 操作按 LDH 检测试剂盒说明书进行。

1.4.4 心肌细胞凋亡率 采用膜联蛋白 V 单染法检测。将各组心肌细胞以 PBS 冲洗 2 次, 用滴管轻轻吹打或 1.25 g/L 胰蛋白酶消化使之脱壁, 收集到 10 mL 的离心管中, 按膜联蛋白 V 荧光染色试剂盒说明书操作, 流式细胞仪检测心肌细胞凋亡率。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 18.0 统计软件进行单因素方差分析及 LSD-*t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌细胞 p38α mRNA 表达水平

4 组细胞在缺氧 1、3、6 h 时 p38α mRNA 表达水平比较, 差异有统计学意义 (*P* 值均小于 0.05)。与正常对照组比较, 烧伤血清 + 缺氧组 p38α mRNA 表达水平在缺氧 1、3、6 h 均明显升高 (*t* 值分别为 3.541、3.125、2.725, *P* 值均小于 0.05); 而烧伤血清 + 缺氧 + 感染组 p38α mRNA 表达水平在缺氧 1、3、6 h 较烧伤血清 + 缺氧组均明显下降 (*t* 值分别为

3.541、4.375、3.564, *P* 值均小于 0.05)。见表 1。

表 1 缺氧不同时相点各组心肌细胞 p38α MAPK mRNA 表达水平变化 ($\times 10^4, \bar{x} \pm s$)

组别	缺氧 1 h	缺氧 3 h	缺氧 6 h	缺氧 12 h
烧伤血清 + 缺氧组	0.39 ± 0.08 ^a	0.37 ± 0.07 ^a	0.35 ± 0.09 ^a	0.19 ± 0.03
烧伤血清 + 缺氧 + 感染组	0.22 ± 0.03 ^b	0.16 ± 0.03 ^b	0.18 ± 0.03 ^b	0.18 ± 0.04
烧伤血清 + 缺氧 + 空载感染组	0.39 ± 0.07 ^a	0.37 ± 0.08 ^a	0.35 ± 0.06 ^a	0.19 ± 0.05
<i>F</i> 值	8.38	9.91	6.80	0.54
<i>P</i> 值	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

注: 表中数据以灰度值比值表示; 各组样本数为 12; 正常对照组心肌细胞 p38α MAPK mRNA 表达水平为 (0.22 ± 0.04) × 10⁴; 与正常对照组比较, ^a*P* < 0.05; 与烧伤血清 + 缺氧组比较, ^b*P* < 0.05

2.2 心肌细胞 p38α 蛋白表达水平

4 组细胞在缺氧 1、3、6 h 时 p38α 蛋白表达水平比较, 差异有统计学意义 (*P* 值均小于 0.01)。与正常对照组比较, 烧伤血清 + 缺氧组 p38α 蛋白表达水平在缺氧 1、3、6 h 显著升高 (*t* 值分别为 7.981、5.351、5.963, *P* 值均小于 0.01); 而烧伤血清 + 缺氧 + 感染组 p38α 蛋白表达水平在缺氧 1、3、6 h 均较烧伤血清 + 缺氧组显著下降 (*t* 值分别为 7.720、5.852、6.188, *P* 值均小于 0.01)。见表 2。

表 2 缺氧不同时相点各组心肌细胞 p38α MAPK 蛋白表达水平变化 ($\times 10^4, \bar{x} \pm s$)

组别	缺氧 1 h	缺氧 3 h	缺氧 6 h	缺氧 12 h
烧伤血清 + 缺氧组	6.39 ± 0.74 ^a	5.43 ± 1.21 ^a	5.03 ± 0.93 ^a	2.18 ± 0.35
烧伤血清 + 缺氧 + 感染组	2.26 ± 0.09 ^b	1.81 ± 0.24 ^b	2.01 ± 0.17 ^b	2.12 ± 0.15
烧伤血清 + 缺氧 + 空载感染组	6.42 ± 1.07 ^a	5.33 ± 0.87 ^a	5.06 ± 0.72 ^a	2.13 ± 0.07
<i>F</i> 值	41.50	20.40	24.87	0.06
<i>P</i> 值	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05

注: 表中数据以灰度值比值表示; 各组样本数为 12; 正常对照组心肌细胞 p38α MAPK 蛋白表达水平为 (2.12 ± 0.13) × 10⁴; 与正常对照组比较, ^a*P* < 0.01; 与烧伤血清 + 缺氧组比较, ^b*P* < 0.01

2.3 心肌细胞活力

4 组心肌细胞活力在缺氧 3、6、12 h 时比较, 差异有统计学意义 (*P* 值均小于 0.05)。与正常对照组比较, 烧伤血清 + 缺氧组的细胞活力在缺氧 3、6、12 h 降低 (*t* 值分别为 3.224、4.360、6.812, *P* 值均小于 0.05); 而烧伤血清 + 缺氧 + 感染组的细胞活力在缺氧 3、6、12 h 时较烧伤血清 + 缺氧组均升高 (*t* 值分别为 2.604、2.357、2.609, *P* 值均小于

0.05)。见表 3。

表 3 缺氧不同时相点各组心肌细胞活力变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	缺氧 1 h	缺氧 3 h	缺氧 6 h	缺氧 12 h
烧伤血清 + 缺氧组	0.127 ± 0.012	0.115 ± 0.007 ^a	0.104 ± 0.006 ^a	0.094 ± 0.005 ^a
烧伤血清 + 缺氧 + 感染组	0.139 ± 0.015	0.136 ± 0.009 ^b	0.124 ± 0.010 ^b	0.112 ± 0.007 ^b
烧伤血清 + 缺氧 + 空载感染组	0.129 ± 0.011	0.120 ± 0.008 ^a	0.108 ± 0.010 ^a	0.098 ± 0.004 ^a
F 值	0.86	4.78	7.91	19.00
P 值	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:表中数据以吸光度值表示;各组样本数为 12;正常对照组心肌细胞活力为 0.141 ± 0.014;与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与烧伤血清 + 缺氧组比较,^b $P < 0.05$

2.4 心肌细胞培养液中 LDH 含量

4 组心肌细胞培养液 LDH 含量在缺氧 1、3、6、12 h 时比较,差异均有统计学意义 (P 值均小于 0.01)。与正常对照组比较,烧伤血清 + 缺氧组细胞培养液 LDH 含量在缺氧 1、3、6、12 h 显著升高 (t 值为 128.026 ~ 201.273, P 值均小于 0.01);而烧伤血清 + 缺氧 + 感染组细胞培养液 LDH 含量在缺氧 1、3、6、12 h 时较烧伤血清 + 缺氧组均显著降低 (t 值为 22.753 ~ 58.708, P 值均小于 0.01)。见表 4。

表 4 缺氧不同时相点各组心肌细胞培养液中 LDH 含量变化 (U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	缺氧 1 h	缺氧 3 h	缺氧 6 h	缺氧 12 h
烧伤血清 + 缺氧组	3497 ± 37 ^a	4079 ± 27 ^a	4904 ± 42 ^a	6143 ± 45 ^a
烧伤血清 + 缺氧 + 感染组	2889 ± 35 ^{ab}	2963 ± 27 ^{ab}	3357 ± 41 ^{ab}	4250 ± 46 ^{ab}
烧伤血清 + 缺氧 + 空载感染组	3493 ± 38 ^a	4076 ± 26 ^a	4904 ± 41 ^a	6141 ± 44 ^a
F 值	7476.00	18 055.00	11 713.00	15 727.00
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:各组样本数为 12;正常对照组心肌细胞培养液乳酸脱氢酶 (LDH) 含量为 (79 ± 16) U/L;与正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与烧伤血清 + 缺氧组比较,^b $P < 0.01$

2.5 心肌细胞凋亡率

4 组心肌细胞凋亡率在缺氧 1、6、12 h 时比较,差异有统计学意义 (P 值均小于 0.01)。与正常对照组比较,烧伤血清 + 缺氧组细胞凋亡率在缺氧 1、6、12 h 显著升高 (t 值分别为 4.903、7.919、9.700, P 值均小于 0.01);而烧伤血清 + 缺氧 + 感染组细胞凋亡率在缺氧 1、6、12 h 时较烧伤血清 + 缺氧组均显著降低 (t 值分别为 2.345、5.091、5.912, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 5。

表 5 缺氧不同时相点各组心肌细胞凋亡率变化 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	样本数	缺氧 1 h	缺氧 6 h	缺氧 12 h
烧伤血清 + 缺氧组	9	5.4 ± 0.7 ^a	8.7 ± 1.1 ^a	13.6 ± 1.7 ^a
烧伤血清 + 缺氧 + 感染组	9	4.3 ± 0.5 ^b	5.1 ± 0.7 ^c	7.2 ± 0.9 ^c
烧伤血清 + 缺氧 + 空载感染组	9	5.5 ± 0.7 ^a	8.2 ± 1.1 ^a	13.7 ± 1.8 ^a
F 值		11.48	28.06	45.89
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

注:正常对照组心肌细胞凋亡率为 (3.1 ± 0.3)%;与正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与烧伤血清 + 缺氧组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

3 讨论

由于缺血缺氧和炎症因子是烧伤后心肌损伤的主要原因,本研究旨在体外建立缺氧和烧伤血清复合损伤心肌细胞模型,用以模拟体内烧伤后心肌损害,为其防治提供依据。

p38 α 在介导应激性损伤中发挥重要作用。采用基因工程技术构建反义 p38 α 基因腺病毒重组体,目的在于特异性靶向抑制 p38 α 的 mRNA,降低 p38 α 蛋白表达水平,从而阻止 p38 α 位点上的信号转导,观察抑制 p38 α 的表达是否对烧伤后心肌细胞具有保护作用。本研究中,烧伤血清 + 缺氧 + 感染组大鼠经缺氧复合烧伤血清刺激后,心肌细胞 p38 α mRNA 与蛋白的表达较烧伤血清 + 缺氧组及烧伤血清 + 缺氧 + 空载腺病毒感染组明显下降,表明 p38 α 反义重组体成功进入心肌细胞,能有效抑制 p38 α 的表达。为研究反义 p38 α 对缺氧复合烧伤血清损伤条件下心肌细胞的保护作用打下了重要基础。

本研究观察到烧伤血清 + 缺氧 + 感染组细胞活力较烧伤血清 + 缺氧组明显增强,说明反义 p38 α 基因重组体感染对心肌细胞在缺氧复合烧伤血清刺激下具有保护作用,细胞活力得以明显改善。糖代谢的重要酶系 LDH 广泛存在于心、肺等器官的组织细胞内,一旦上述组织器官受损,LDH 即经受损的细胞膜漏出并引起血清中 LDH 浓度升高。研究证明,严重烧伤后心脏组织内 LDH 活性明显增强^[11]。结果表明,烧伤血清 + 缺氧组和烧伤血清 + 缺氧 + 感染组心肌细胞培养液中的 LDH 含量较正常对照组明显升高,而烧伤血清 + 缺氧 + 感染组中的 LDH 活性较烧伤血清 + 缺氧组明显降低。提示反义 p38 α 基因重组体感染,能有效抑制缺氧复合烧伤血清对心肌细胞的刺激,进而起到保护心肌细胞的作用。

细胞凋亡又称程序性细胞死亡,是受细胞外微

环境因素和细胞内基因调控的细胞主动死亡方式。适度的凋亡有利于细胞组织的再生与功能维持,而缺血缺氧等不良刺激和各种病理状态下的过度细胞凋亡可导致组织细胞数锐减及组织器官功能障碍。因为细胞凋亡早期即有磷脂酰丝氨酸由细胞膜内翻转到膜外侧,所以笔者选用易与其结合的膜联蛋白 V 早期检测凋亡细胞。本研究结果显示烧伤血清 + 缺氧 + 感染组心肌细胞凋亡率较烧伤血清 + 缺氧组明显下降,证实了在缺氧和烧伤血清刺激下反义 p38 α 能较大幅度减少心肌细胞凋亡、保护心肌组织。

由于严重烧伤早期机体出现缺血缺氧,并伴炎症因子大量入血,心脏容易出现功能障碍甚至衰竭,因而对烧伤特别是严重烧伤后心脏损害的防治显得尤为必要与迫切。此外,细胞对外界各种刺激信号作出反应都会通过相应的信号转导途径介导,而 p38 α 激酶途径就是细胞炎症、凋亡等反应的重要传导途径^[6,12],并且有关研究还证实 p38 α 直接参与介导了心肌细胞凋亡等病理过程,在其应激反应与损伤中充当重要角色^[7,13-14]。本研究亦证实,反义 p38 α 基因重组体感染能明显提高缺氧复合烧伤血清刺激下心肌细胞活力、减轻细胞膜损伤、减少 LDH 漏出及心肌细胞凋亡,起到保护心肌细胞的作用。同时也证实 p38 α 是缺氧复合烧伤血清刺激下介导心肌细胞损伤的重要信号途径。而反义 p38 α 对缺氧复合烧伤血清损伤心肌细胞保护作用的具体机制有待进一步探讨研究。

参考文献

- [1] 黎鳌. 黎鳌烧伤学. 上海:上海科学技术出版社,2001:465.
- [2] 黄跃生,杨宗城,迟路湘,等. 烧伤后“休克心”的研究. 中华烧伤杂志,2000,16(5):275-278.
- [3] 黄跃生. 严重烧伤早期心肌损害与防治. 继续医学教育,2006,20(14):6-12.

- [4] Wakeman D, Guo J, Santos JA, et al. p38 MAPK regulates Bax activity and apoptosis in enterocytes at baseline and after intestinal resection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 302(9):G997-1005.
- [5] Weber DS, Jadhav R, Dodd T, et al. Sustained activation of p38 MAPK and MMP2 and 9 exacerbate neointima formation following vascular injury in metabolic syndrome rats. *FASEB J*, 2012, 26:866.
- [6] Ferrari G, Terushkin V, Wolff MJ, et al. TGF- β 1 induces endothelial cell apoptosis by shifting VEGF activation of p38 (MAPK) from the prosurvival p38 β to proapoptotic p38 α . *Mol Cancer Res*, 2012, 10(5):605-614.
- [7] Otsu K, Yamashita N, Nishida K, et al. Disruption of a single copy of the p38alpha MAP kinase gene leads to cardioprotection against ischemia-reperfusion. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 302(1):56-60.
- [8] Makena PS, Gorantla VK, Ghosh MC, et al. Apoptosis signal regulating kinase 1 negatively regulates survivin via p38/MAPK and Egr1 in ventilator induced apoptosis and lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 185(1):A5438.
- [9] 郑军,黄跃生,黄晓元,等. 大鼠反义 p38 α MAPK 腺病毒载体的构建. 第三军医大学学报,2004,26(23):2165-2167.
- [10] 郑军,黄跃生,黄晓元,等. 反义 p38 α 基因转染对缺氧复合烧伤血清处理心肌细胞炎症因子的表达. 第三军医大学学报,2004,26(23):2097-2101.
- [11] Park GB, Kim YS, Lee HK, et al. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of EBV-transformed B cells by cross-linking of CD70 is dependent upon generation of reactive oxygen species and activation of p38 MAPK and JNK pathway. *J Immunol*, 2010, 185(12):7274-7284.
- [12] Lemos JC, Roth CA, Messinger DI, et al. Repeated stress dysregulates κ -opioid receptor signaling in the dorsal raphe through a p38 α MAPK-dependent mechanism. *J Neurosci*, 2012, 32(36):12325-12336.
- [13] Liu H, Pedram A, Kim JK. Oestrogen prevents cardiomyocyte apoptosis by suppressing p38 α -mediated activation of p53 and by down-regulating p53 inhibition on p38 β . *Cardiovasc Res*, 2011, 89(1):119-128.
- [14] Shi J, Guan J, Jiang B, et al. Amyloidogenic light chains induce cardiomyocyte contractile dysfunction and apoptosis via a non-canonical p38alpha MAPK pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(9):4188-4193.

(收稿日期:2013-01-18)

(本文编辑:贾津津)

· 科技快讯 ·

辛伐他汀对烧伤小鼠肝细胞凋亡的影响

肝脏是烧伤后多器官功能障碍中的一个重要靶器官。本研究拟探讨他汀类药物处理对烧伤后肝细胞凋亡水平的影响,研究者假设他汀类药物可调节凋亡相关基因表达,从而减少烧伤后肝细胞凋亡。研究采用 30% TBSA III 度烧伤的小鼠模型,分为辛伐他汀给药和不给药 2 种情况。取小鼠肝脏组织进行组织学分析与基因表达检测。为了明确相应的机制,利用 TNF- α 基因敲除小鼠和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 基因敲除小鼠,观察辛伐他汀对烧伤诱导的肝脏损伤的作用,探讨辛伐他汀对培养的小鼠肝细胞 TNF- α 及 caspase-3 表达的影响。研究显示,烧伤能够引起明显的肝脏损伤,并且肝细胞凋亡在此过程中发挥重要作用。辛伐他汀能够降低烧伤后肝脏中 TNF- α 及 caspase-3 的表达水平,也能够减轻肝细胞凋亡,而 TNF- α 抑制剂或 caspase-3 抑制剂能抵消这一作用。在 TNF- α 基因敲除小鼠和 caspase-3 基因敲除小鼠中,烧伤后肝细胞凋亡明显减少,使用辛伐他汀不能够阻止肝细胞进一步凋亡。体外研究显示,辛伐他汀能够抑制原代培养的小鼠肝细胞中 TNF- α 及 caspase-3 的表达。