

LXA₄ 通过 p38MAPK/Nrf2 信号通路诱导 H9c2 心肌细胞 HO-1 高表达

周 昱, 吴升华*, 陈筱青, 唐艳荣

(南京医科大学第一附属医院儿科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨脂氧素 A₄(lipoxin A₄, LXA₄)诱导心肌细胞 H9c2 中血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)-1 表达可能涉及的信号转导通路。方法:分别用核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor-E2 related factor 2, Nrf2)的抑制剂 ATRA、p38MAPK 的抑制剂 SB203580、LXA₄ 联合 ATRA、LXA₄ 联合 SB203580 预处理 H9c2 细胞后进行缺氧/复氧处理, RT-PCR、Western blot、免疫荧光等检测 HO-1、Nrf2 以及 p38MAPK mRNA 和蛋白表达的变化。结果:与只行缺氧/复氧处理的细胞相比, LXA₄ 预处理的 H9c2 细胞 HO-1 mRNA 和蛋白的表达明显升高 ($P < 0.05$), 而 ATRA、SB203580 分别抑制了 Nrf2 的聚集和 p38MAPK 的磷酸化 ($P < 0.05$), 从而抑制了 LXA₄ 对 HO-1 的诱导 ($P < 0.05$)。结论:LXA₄ 预处理诱导心肌细胞 H9c2 的 HO-1 高表达, 具有抗缺氧/复氧损伤的作用, 其机制与 p38MAPK/Nrf2 信号通路有关。

[关键词] 脂氧素; 血红素加氧酶; 核因子 E2 相关因子 2; p38MAPK; 缺氧/复氧损伤

[中图分类号] Q257

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)11-1493-06

LXA₄ increases the expression of HO-1 by activation of p38MAPK/Nrf2 pathway in H9c2 cardiomyocytes

ZHOU Yu, WU Sheng-hua*, CHEN Xiao-qing, TANG Yan-rong

(Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the possible mechanisms of signal transduction pathways of heme oxygenase (HO)-1 expression induced by lipoxin A₄ (LXA₄) in H9c2 cardiomyocytes. **Methods:** H9c2 cells were exposed to hypoxia followed by reoxygenation with or without pretreatment of LXA₄, nuclear factor-E2 related factor 2 (Nrf2) inhibitor (ATRA), p38MAPK inhibitor (SB203580), LXA₄ combined with ATRA, and LXA₄ combined with SB203580. The mRNA transcription and protein expression of HO-1, Nrf2 and p38MAPK was examined by RT-PCR, Western blot and immunofluorescence staining. **Results:** Compared with hypoxia/reoxygenation group, the mRNA transcription and protein expression of HO-1 in H9c2 cardiomyocytes pretreated with LXA₄ increased significantly ($P < 0.05$). The expression of HO-1 in H9c2 cardiomyocytes decreased ($P < 0.05$) after treated with ATRA or SB203580. ATRA blocked the nuclear accumulation of Nrf2 and decreased HO-1 protein expression induced by LXA₄ pretreatment ($P < 0.05$). SB203580 inhibited the phosphorylation level of p38MAPK and decreased HO-1 protein expression induced by LXA₄ pretreatment ($P < 0.05$). **Conclusion:** LXA₄ can induce HO-1 over-expression which has protective effect on H9c2 cardiomyocytes of hypoxia/reoxygenation injury. Its mechanism is related to p38MAPK/Nrf2 signal transduction pathways.

[Key words] lipoxins; heme oxygenase; nuclear factor-E2 related factor 2; p38MAPK; hypoxia/reoxygenation injury

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(11): 1493-1498]

缺血性心脏病是危害人类健康的常见病, 目前已成为世界范围内导致死亡的主要病症之一。氧自由基是造成心肌缺血/再灌注损伤的直接重要原因, 减少活性氧的爆发对缺血/再灌注损伤的心肌具有保护作用。而血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)是

近几年发现的体内减轻氧自由基损伤强有力的抗氧化防御酶^[1]。脂氧素(lipoxins, LXs)是二十烷类家族中一类花生四烯酸(arachidonic acid, AA)的产物, 前期已证实脂氧素 A₄(lipoxin A₄, LXA₄)通过诱导心肌细胞 HO-1 的高表达而保护心肌细胞缺氧/复氧损伤^[2]。但迄今为止, LXA₄ 诱导细胞 HO-1 高表达的信号通路机制尚无报道^[3-5]。本研究采用体外培养的 H9c2 心肌细胞建立缺氧/复氧损伤模型, 探讨 LXA₄

[基金项目] 国家自然科学基金(30973534, 81173052)

*通讯作者, E-mail: kad-yc@163.com

诱导的 H9c2 心肌细胞 HO-1 高表达的信号转导通路。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠心肌细胞株 H9c2 购自上海生命科学研究院细胞库。RT-PCR 试剂盒、TRIzol(日本 TaKaRa 公司),HO-1 一抗(英国 ABcam 公司),核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor-E2 related factor 2,Nrf2)一抗、p38MAPK 一抗(美国 Santa Cruz 公司),p-p38MAPK 一抗(美国 Cell Signaling Technology 公司), β -actin 一抗和辣根过氧化物酶标记的二抗(北京中杉金桥),全蛋白提取试剂盒(南京凯基生物公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(杭州碧云天生物科技有限公司),LXA₄(德国 Merck-Calbiochem 公司),Nrf2 抑制剂全反式视黄酸 ATRA(美国 Sigma 公司),p38MAPK 抑制剂 SB203580(美国 Santa Cruz 公司),其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 心肌细胞 H9c2 的培养和实验分组

H9c2 细胞株在含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 完全培养基中培养(37℃、5%CO₂),2~3 d 传代 1 次。实验时取对数生长期细胞。将细胞随机分成 8 组:①不处理的对照组:正常培养细胞不做任何处理;②LXA₄处理的对照组:正常培养的细胞用含有 10 μ mol/L LXA₄的 DMEM 完全培养基预处理 12 h,不做缺氧/复氧处理;③缺氧/复氧组:缺氧培养是用饱和氮气、pH6.8 的 Hanks 液于低氧培养箱中培养细胞,低氧培养条件为 94%N₂、1%O₂、5%CO₂、37℃,缺氧培养 12 h 后进行复氧处理;④LXA₄预处理的缺氧/复氧组:用含 10 μ mol/L LXA₄的 DMEM 完全培养基预处理细胞 12 h,然后再进行缺氧/复氧处理;⑤Nrf2 抑制剂 ATRA 预处理的缺氧/复氧组:用含 1 μ mol/L ATRA 的 DMEM 完全培养基预处理 12 h,然后进行缺氧/复氧处理;⑥LXA₄ + ATRA 预处理的缺氧/复氧组:用含 10 μ mol/L LXA₄和 1 μ mol/L ATRA 的 DMEM 完全培养基预处理 12 h,然后进行缺氧/复氧处理;⑦p38MAPK 抑制剂 SB203580 预处理的缺氧/复氧组:用含 10 μ mol/L SB203580 的 DMEM 完全培养基预处理 30 min 后行缺氧/复氧处理;⑧LXA₄ + SB203580 预处理的缺氧/复氧组:用 10 μ mol/L LXA₄预处理细胞 12 h 和 10 μ mol/L SB203580 的 DMEM 完全培养基预处理 30 min,然后进行缺氧/复氧处理。

1.2.2 RT-PCR 检测 HO-1 mRNA 表达

用 TRIzol 试剂提取总 RNA,紫外分光光度计测量 RNA 样品的纯度,光密度比值 $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 介于 1.8~2.0 的样品按两步法 RT-PCR 试剂盒说明进行逆转录和 PCR 操作。其中 HO-1 引物:上游 5'-GCTCTATCGTGCTCGCATGA-3',下游 5'-AATCCCCACTGCCA2CGGTC-3',扩增片段大小为 319 bp; β -actin 引物:上游 5'-CCCTAAGGCCAACCGTGAA-3',下游 5'-CCGCTCATTGCCGATAGTGA-3',扩增片段大小为 430 bp;PCR 条件为:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 30 s, β -actin 共进行 20 个循环后取出,HO-1 共进行 31 个循环,最后 72℃延伸 5 min。PCR 产物以 2.0%琼脂糖凝胶电泳分离鉴定,紫外凝胶成像系统进行半定量分析。

1.2.3 免疫荧光法定位心肌细胞 HO-1 蛋白及 Nrf2 蛋白表达

将心肌细胞 H9c2 培养于放有盖玻片的 12 孔板中制作细胞爬片,分组间处理后用 3.7%多聚甲醛固定,0.2%Triton-100 透化,用 1%BSA 湿盒封闭 1 h 后分别加入 HO-1 一抗(1:200)和 Nrf2 一抗(1:50),4℃过夜,次日 PBS 冲洗后加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG (1:50)作为二抗,37℃、1 h,PBS 冲洗后用 Hoechst(1:1 000)染核 1 min。荧光显微镜下激发荧光拍照观察。

1.2.4 Western blot 检测心肌细胞 HO-1 蛋白表达水平

收集各组细胞,用 PBS 洗涤 2 次,加入含有 PMSF 的细胞裂解液,冰上作用 30 min,12 000 r/min 4℃离心 15 min,取上清进行蛋白浓度测定,取 50 μ g 总蛋白样品行 12%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,随后转印至 PVDF 膜,用 5%脱脂奶粉封闭后加入 β -actin、HO-1 一抗(稀释度 1:2 000)4℃孵育过夜,二抗(稀释度 1:5 000)37℃孵育 1 h,暗室显影曝光。实验结果使用天能软件分析系统定量分析条带的光密度,实验重复 3 次。

1.2.5 心肌细胞 H9c2 磷酸化 p38MAPK 蛋白表达的检测

生长良好的心肌细胞分组处理后去除培养液,收集各组细胞,按上述方法提取蛋白后进行浓度测定,取 50 μ g 总蛋白样品行 12%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,随后转印至 PVDF 膜,用 5%脱脂奶粉封闭后分别加入一抗 β -actin(1:2 000),p-p38MAPK 一抗(1:200)4℃摇床孵育过夜,二抗(1:5 000)37℃孵育

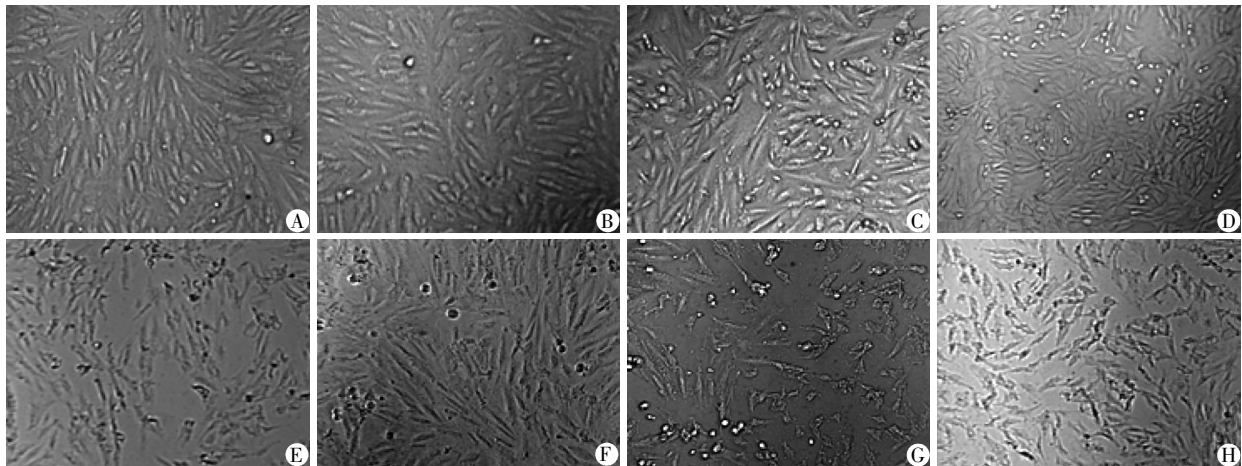
1 h, 暗室显影曝光。实验结果使用天能软件分析系统定量分析条带的光密度。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

实验数据使用 SPSS17.0 统计学处理软件, 多组均数间比较采用单因素方差分析(ANOVA), 组间比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 LXA₄ 及各抑制剂预处理对心肌细胞 H9c2 形



A: 未经任何处理的对照组; B: 只加入 LXA₄ 预处理的对照组; C: 缺氧/复氧组; D: LXA₄ 预处理的缺氧/复氧组; E: ATRA 预处理的缺氧/复氧组; F: LXA₄+ATRA 预处理的缺氧/复氧组; G: SB203580 预处理的缺氧/复氧组; H: LXA₄+SB203580 预处理的缺氧/复氧组。

图 1 不同处理组 H9c2 心肌细胞形态学表现($\times 100$)

Figure 1 Morphology of H9c2 cardiomyocytes under different treatments($\times 100$)

2.2 缺氧/复氧及 LXA₄ 预处理对心肌细胞 HO-1 蛋白和 Nrf2 蛋白定位的影响

缺氧/复氧组和 LXA₄ 预处理的缺氧/复氧组心肌细胞 HO-1 蛋白在荧光显微镜下均显示定位于胞浆中, 相对于缺氧/复氧组而言, LXA₄ 预处理的缺氧/复氧组 HO-1 蛋白表达明显增多(图 2A)。而 Nrf2 在胞浆胞核均有表达, LXA₄ 预处理的缺氧/复氧组中 Nrf2 发生了明显的核转位。实验重复 3 次, 每次每组细胞分析 3 个视野(图 2B)。

2.3 ATRA、SB203580 预处理对 HO-1 mRNA 和蛋白表达水平的影响

对照组 HO-1 mRNA 和蛋白表达水平很低, 缺氧/复氧组 HO-1 的 mRNA 和蛋白水平较对照组略有增加($P < 0.05$); 而 LXA₄ 预处理的缺氧/复氧组的 HO-1 mRNA 和蛋白水平较缺氧/复氧组有明显增加($P < 0.05$)。Nrf2 抑制剂 ATRA 处理组、p38MAPK 抑制剂 SB203580 处理组 HO-1 mRNA 和蛋白水平较缺氧/复氧组均有明显下降($P < 0.05$), LXA₄ 的加入可以分别逆转 ATRA 和 SB203580 的抑制作用, HO-1

态的影响

对照组细胞形态正常, 呈梭形; 只加入 LXA₄ 处理组的细胞形态与对照组形态相似; 缺氧/复氧组细胞形态异常, 部分皱缩呈圆形, 表面漂浮有大量死亡细胞; LXA₄ 预处理组细胞形态与死亡细胞数量介于对照组和缺氧/复氧组之间; Nrf2 抑制剂 ATRA 和 p38MAPK 抑制剂 SB203580 预处理组较对照组细胞形态明显, 类似于缺氧/复氧组; 加入 LXA₄ 预处理后可以逆转抑制剂对细胞形态和死亡数量的影响(图 1)。

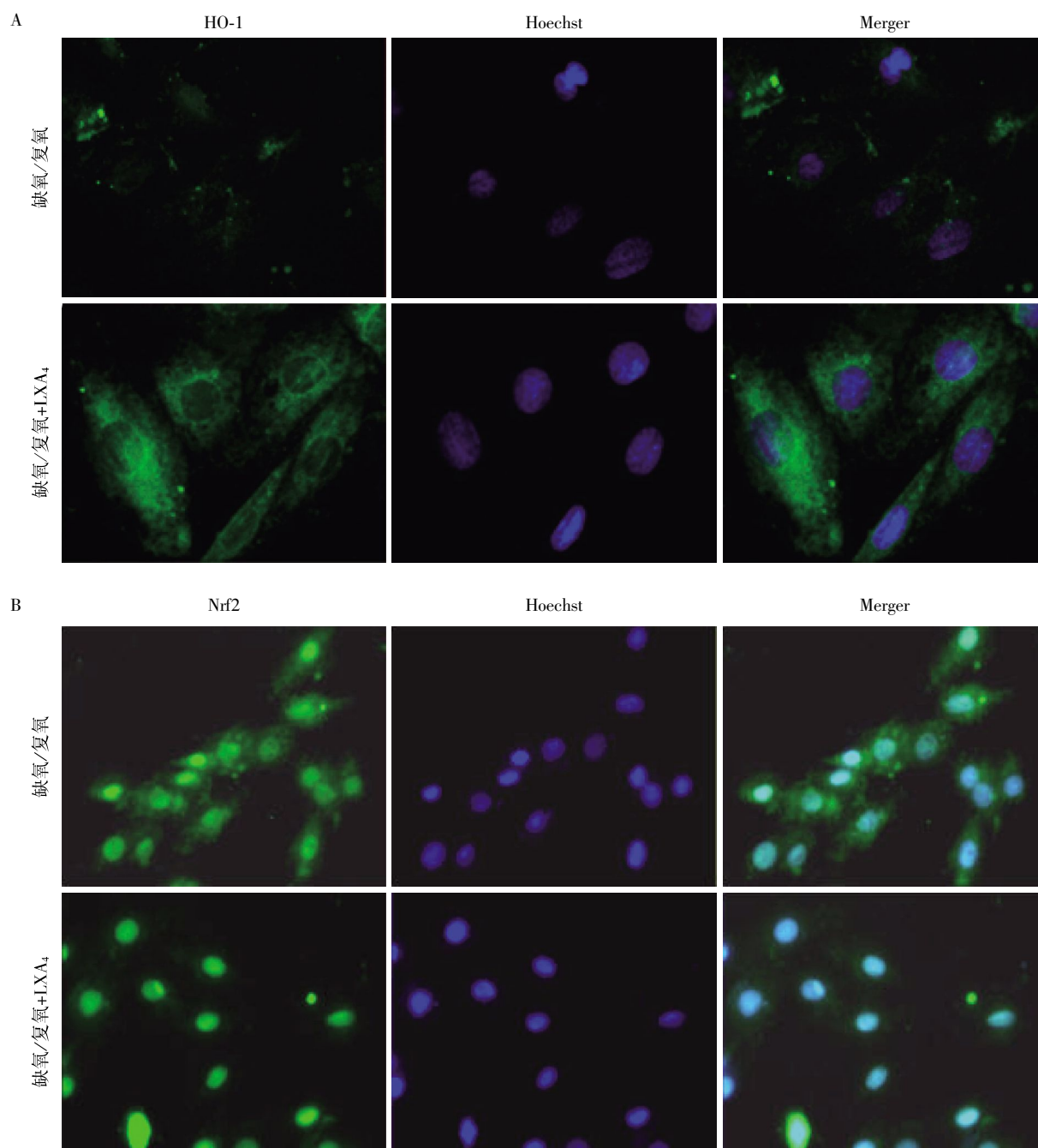
mRNA 和蛋白水平较只加 ATRA 和 SB203580 的组明显增加(图 3)。

2.4 LXA₄ 预处理对 H9c2 心肌细胞的磷酸化 p38MAPK 蛋白表达水平的影响

与对照组相比, 缺氧/复氧组和凡加入 LXA₄ 的处理组心肌细胞核中的 p-p38MAPK 蛋白水平均增高, 其中以 LXA₄ 预处理的缺氧/复氧组增加最明显(图 4)。SB203580 的加入抑制了心肌细胞中 p38MAPK 的磷酸化水平, LXA₄ 的加入可以逆转 SB203580 的抑制作用。

3 讨 论

LXs 主要在炎症等病理过程中通过跨细胞途径合成, 在炎症反应中发挥抗炎、促进炎症消散和抗增殖作用, 被称为炎症反应的“刹车信号(braking signals)”或“停止信号(stopping signals)”^[6]。以往的研究将 LXA₄ 对心脏缺氧/复氧损伤的保护作用归功于抑制中性粒细胞的聚集^[7]。本课题的前期研究及本研究均表明, LXA₄ 诱导的 HO-1 高表达减轻了心



A;HO-1 蛋白免疫荧光法定位,LXA₄ 治疗显著增加了胞浆中 HO-1 蛋白的表达;B;Nrf2 蛋白免疫荧光法定位,LXA₄ 治疗刺激了 Nrf2 核转位。

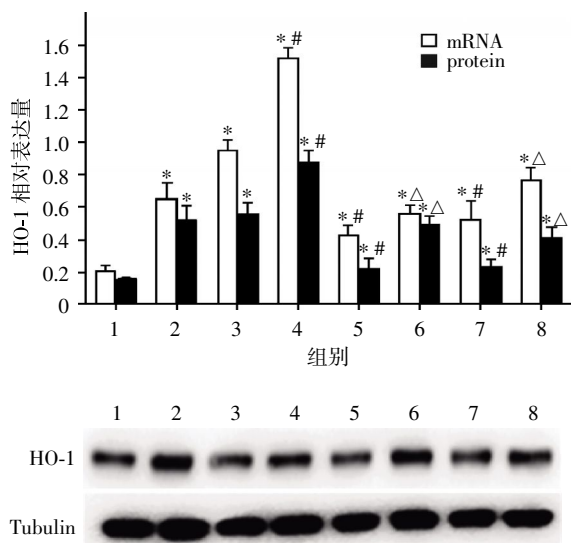
图 2 细胞 HO-1 和 Nrf2 蛋白免疫荧光法定位图(× 200)

Figure 2 HO-1 and Nrf2 expressions in H9c2 cardiomyocytes by immunofluorescence(× 200)

脏缺氧/复氧损伤^[2]。

HO-1 基因位于人染色体 22q12,包含 4 个内含子和 5 个外显子。在 HO-1 的 5' 非编码区即基因启动子区,有一些共存于增强子和调节片段的一致序列,包括激活蛋白、金属反应元件、原癌基因 c-myc/max 异二聚体结合位点、血红素反应片段、抗氧化反应元件 (antioxidant response element,ARE) 及 GC 盒(Spl)结合位点。Nrf2 是一个具有碱性亮氨酸拉链

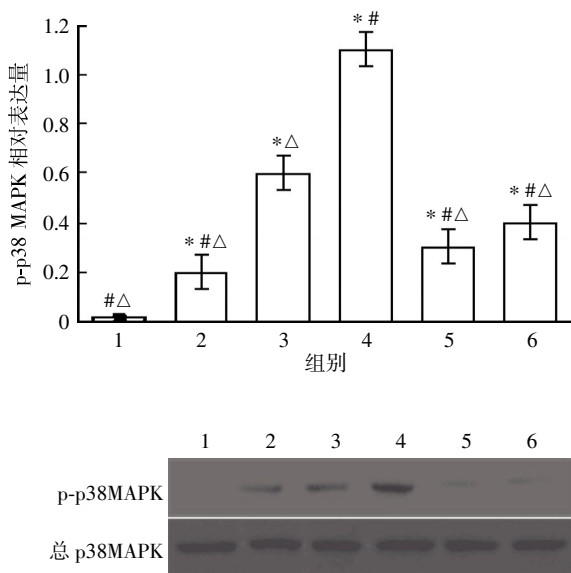
的转录因子,在依赖 ARE 的 HO-1 基因表达中起重要作用^[8]。诱导 HO-1 高表达的信号转导通路,目前研究认为主要是通过丝裂原活化蛋白激酶家族 (mitogen-activated protein kinase,MAPK)、Nrf2 和 ARE。Nrf2 在生理状态下与胞质蛋白伴侣分子 Keap1 结合使 Nrf2 活性处于相对抑制状态,在其半胱氨酸残基发生氧化的情况下,Nrf2 与 Keap1 解偶联后转移入细胞核,与 ARE 结合,启动 ARE 调控的



1: 不处理的对照组; 2: LXA₄ 处理的对照组; 3: 缺氧/复氧组; 4: LXA₄ 预处理的缺氧/复氧组; 5: ATRA 预处理的缺氧/复氧组; 6: LXA₄ + ATRA 预处理的缺氧/复氧组; 7: SB203580 预处理的缺氧/复氧组; 8: LXA₄ + SB203580 预处理的缺氧/复氧组。与不处理的对照组相比, **P* < 0.05; 与缺氧/复氧组相比, #*P* < 0.05; 与只加相应抑制剂处理的组相比, [△]*P* < 0.05 (*n* = 6)。

图 3 各组细胞 HO-1 的 mRNA 和蛋白表达

Figure 3 The mRNA transcription and protein expression of HO-1 in each group



1: 不处理的对照组; 2: LXA₄ 处理的对照组; 3: 缺氧/复氧组; 4: LXA₄ 预处理的缺氧/复氧组; 5: SB203580 预处理的缺氧/复氧组; 6: LXA₄ + SB203580 预处理的缺氧/复氧组。与不处理的对照组相比, **P* < 0.05; 与缺氧/复氧相比, #*P* < 0.05; 与 LXA₄ 预处理的缺氧/复氧组相比, [△]*P* < 0.05 (*n* = 6)。

图 4 LXA₄ 预处理对心肌细胞 H9c2 中 p-p38MAPK 蛋白表达水平的影响

Figure 4 The effect of LXA₄ on p-p38MAPK expression in H9c2 cardiomyocytes

HO-1 表达^[9]。H₂O₂ 诱导的 HO-1 高表达, 是由于 H₂O₂ 活化 p38MAPK 和 Jun 细胞核激酶(Jun nuclear kinase, JNK), 然后使 Nrf2 转移入细胞核, 与 ARE 结合, 启动 HO-1 表达^[10]。

本次研究首次证实, LXA₄ 诱导 H9c2 心肌细胞 HO-1 高表达是通过 p38MAPK/Nrf2 信号通路。p38MAPK 的抑制剂 SB203580 在基因和蛋白水平都显著抑制了 LXA₄ 诱导的 HO-1 的高表达(图 3), 表明 p38MAPK 信号通路参与 LXA₄ 诱导的 HO-1 基因的激活。LXA₄ 处理后 p-p38MAPK 蛋白表达显著升高(图 4), 表明 LXA₄ 激活 p38MAPK。本研究未发现 LXA₄ 活化 ERK(结果未显示)。同样, H₂O₂ 和缺氧诱导心肌细胞 HO-1 的高表达, 也是通过激活 p38MAPK 而非 ERK 实现的^[10-11]。在心脏缺血模型中, 大量的研究证实了 p38MAPK 的重要作用^[12]。本研究也证实了 Nrf2 的转位和激活在 LXA₄ 诱导 HO-1 高表达中是必不可少的。免疫荧光实验发现未经处理的对照组中 Nrf2 广泛弥漫于细胞质中, 而 LXA₄ 预处理可显著增加 Nrf2 的核染色(图 2), 表明 LXA₄ 显著增加了 Nrf2 核转位水平而在 LXA₄ 诱导 HO-1 高表达中起到重要作用。近年来的研究也发现, Nrf2 在调节适应性氧化应激反应和 HO-1 的转录激活中发挥了重要作用^[13-14]。

但同时我们发现, 单独 LXA₄ 处理组与缺氧/复氧组对于诱导 HO-1 蛋白表达差异并不明显(图 3), 其原因可能是由于缺氧/复氧本身可以造成细胞应激性 HO-1 增高, 属于自体保护作用, 与单纯使用 LXA₄ 诱导的 HO-1 增加相当。而加入 LXA₄ 预处理的缺氧/复氧组 HO-1 的表达显著增加, 表明 LXA₄ 在缺氧/复氧损伤时的诱导作用更为明显。

总之, 我们的实验表明 LXA₄ 可以上调 HO-1 基因和蛋白的表达, 通过激活 p38MAPK 通路保护心肌缺氧/复氧损伤, 并使得 Nrf2 核易位形成 Nrf2/ARE 复合体, 为应用 LXA₄ 治疗缺血性心脏病提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] Katon M, Anselmo DM, Busuttill DM, et al. A novel strategy against ischemia and reperfusion injury; cyto-protection with heme oxygenase system[J]. *Transpl Immunol*, 2002, 9(224): 227-233
- [2] 唐艳荣, 吴升华. LXA₄ 诱导 HO-1 高表达对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2012, 32(4): 458-462
- [3] Nascimento-Silva V, Arruda MA, Barja-Fidalgo C, et al. Novel lipid mediator aspirin-triggered lipoxin A₄ induces

- heme oxygenase-1 in endothelial cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 289(3): C557-C563
- [4] Biteman B, Hassan IR, Walker E, et al. Interdependence of lipoxin A₄ and heme-oxygenase in counter-regulating inflammation during corneal wound healing [J]. *FASEBJ*, 2007, 21(9): 2257-2266
- [5] Jin SW, Zhang L, Lian QQ, et al. Posttreatment with aspirin-triggered lipoxin A₄ analog attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice: the role of heme oxygenase-1 [J]. *Anesth Analg*, 2007, 104(2): 369-377
- [6] Serhan CN. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways [J]. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25(1): 101-137
- [7] Hecht I, Rong J, Sampaio AL, et al. A novel peptide agonist of formyl-peptide receptor-like 1 (ALX) displays anti-inflammatory and cardioprotective effects [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 328(2): 426-434
- [8] Liu XM, Peyton KJ, Ensenat D, et al. Nitric oxide stimulates heme oxygenase-1 gene transcription via the Nrf2/ARE complex to promote vascular smooth muscle cell survival [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 75(2): 381-389
- [9] Mann GE, Niehueser SJ, Gao L, et al. Nrf2 /ARE regulated antioxidant gene expression in endothelial and smooth muscle cells in oxidative stress: implications for atherosclerosis and preeclampsia [J]. *Acta Physiol Sin*, 2007, 59(2): 117-127
- [10] Aggeli IK, Gaitanaki C, Beis I. Involvement of JNKs and p38-MAPK/MSK1 pathways in H₂O₂-induced upregulation of heme oxygenase-1 mRNA in H9c2 cells [J]. *Cell Signal*, 2006, 18(10): 1801-1812
- [11] Kacimi 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
- [12] Schulz R, Belosjorow S, Gres P, et al. p38MAP kinase is a mediator of ischemic preconditioning in pigs [J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 55(3): 690-700
- [13] Mann GE, Niehueser SJ, Gao L, et al. Nrf2 /ARE regulated antioxidant gene expression in endothelial and smooth muscle cells in oxidative stress: implications for atherosclerosis and preeclampsia [J]. *Acta Physiol Sin*, 2007, 59(2): 117-127
- [14] Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007, 47(1): 89-116

[收稿日期] 2012-08-20



欢迎投稿 欢迎订阅