

LXA₄ 诱导 HO-1 高表达对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用

唐艳荣, 吴升华*

(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)在大鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤中的保护作用及可能机制。方法:将细胞随机分为 5 组,每组 6 孔,分别为对照组(con 组)、缺氧/复氧组(H/R 组)、LXA₄ 预处理的缺氧/复氧组(LXA₄ + H/R 组)、HO-1 抑制剂锌原卟啉(ZnPP)预处理的缺氧/复氧组(ZnPP + H/R 组)、LXA₄ + ZnPP 预处理的缺氧/复氧组(LXA₄ + ZnPP + H/R 组)。观察细胞形态改变,测定细胞上清液中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶(creatine kinase, CK)水平以反映细胞损伤,并检测心肌细胞 HO-1 活性和 HO-1 的 mRNA 表达水平。结果:与 H/R 组比较, LXA₄ + H/R 组细胞形态较规整, LDH、CK 水平较低,而 HO-1 的活性及 mRNA 表达水平明显增加; LXA₄ + ZnPP + H/R 组终止了 LXA₄ 对缺氧/复氧细胞的保护作用,细胞形态明显改变,细胞死亡较多, HO-1 的活性及 mRNA 水平受到抑制。结论: LXA₄ 预处理可诱导大鼠心肌细胞 HO-1 高表达,具有抗心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用。

[关键词] 脂氧素; 血红素加氧酶; 缺氧/复氧; 心肌细胞

[中图分类号] R329.26

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)04-458-05

Protective role of overexpression of HO-1 induced by lipoxin A₄ on hypoxia/reoxygenation lesion of myocardial cells

TANG Yan-rong, WU Sheng-hua*

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the roles of lipoxin A₄ (LXA₄) in attenuating myocardial hypoxia/reoxygenation (H/R) lesion and the possible mechanisms. **Methods:** The cells were randomly divided into five groups: control group, H/R group, LXA₄ + H/R group, ZnPP + H/R group, LXA₄ + ZnPP + H/R group. Pathological changes of cells was observed. The levels of LDH and CK in cellular supernatants were measured, and activity of HO-1 was measured. HO-1 mRNA expression was analyzed by RT-PCR. **Results:** Pretreatment of the cells undergoing hypoxia/reoxygenation lesion with LXA₄ significantly reduced the LDH and CK levels of cells, protected cells from necrosis, and increased the HO-1 activity and the HO-1 mRNA expression as compared with those in the cells without LXA₄ pretreatment. However, HO-1 inhibition by ZnPP abolished the protective role of LXA₄ on the cells undergoing hypoxia/reoxygenation lesion. **Conclusion:** LXA₄ can induce HO-1 overexpression which provide the protective role on myocardial cells undergoing hypoxia/reoxygenation lesion.

[Key words] lipoxin; heme oxygenase; hypoxia/reoxygenation; myocardial cells

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(4): 458-462]

脂氧素 A₄(lipoxin A₄, LXA₄)是二十烷类家族中一类花生四烯酸的代谢产物,具有广泛的抗炎、促进炎症消散和抗增殖作用,被称为炎症反应的“刹车信号”^[1]。血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)是近几年发现的一种抗氧化防御酶,能通过血红

素产生的降解产物发挥对伤害性刺激的适应和保护性反应,在心血管疾病发生发展的病理生理过程中起重要作用^[2-4]。

近年来发现, LXA₄ 可诱导内皮细胞、上皮细胞、肺组织等 HO-1 高表达^[5-8],有研究表明,在大鼠心脏缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)损伤模型中, HO-1 在 LXA₄ 的心肌保护作用中起重要作用^[9-10]。本实验旨在证实在细胞水平 LXA₄ 诱导心肌 HO-1 高

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30871180)

*通讯作者, E-mail: kad-yc@163.com

表达及 LXA₄ 所诱导的 HO-1 在 H/R 损伤中的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

H₉C₂ 大鼠心肌细胞株购自上海生命科学研究院细胞库。RT-PCR 试剂盒、TRIzol(TaKaRa 公司,日本),全蛋白提取试剂盒(南京凯基生物公司),HO-1 活性测定试剂盒(Genmed Scientifics 公司,美国),BCA 蛋白定量试剂盒、胎牛血清及胰酶(杭州碧云天公司),DMEM 培养液(Hyclone 公司,美国),LXA₄(Merck-Calbiochem 公司,德国),ZnPP(Sigma-Aldrich 公司,美国),其他常规试剂等来自国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将 H₉C₂ 大鼠心肌细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基中,置入 5%CO₂ 培养箱,37℃ 培养,2~3 d 更换培养液,倒置相差显微镜下观察细胞生长状态,至 80%~90%以上融合时可用于实验。

1.2.2 建立心肌细胞 H/R 模型

将细胞接种于 6 孔板中,用含 10%胎牛血清无双抗的 DMEM 培养基培养,待心肌细胞 80%~90% 融合时,弃原培养基,PBS 漂洗 2 次,加入充入饱和氮气的 D-Hanks 液,置于自制缺氧箱中,充入含 95%N₂ 和 5%CO₂ 的混合气体,测得缺氧箱内氧浓度<1.0%时,密封,将缺氧箱置于 37℃水温箱培养 10 h 后取出培养板,以含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基更换无血清培养基,再置于 37℃、5% CO₂、常氧、饱和湿度的恒温细胞培养箱培养 2 h,即完成复氧。

1.2.3 实验分组

将细胞分成 5 组,每组 6 孔:①不处理的对照组(con 组);②H/R 组:H₉C₂ 心肌细胞缺氧/复氧处理如上所述;③LXA₄ 预处理的 H/R 组(LXA₄+H/R 组):用含 LXA₄(10 μg/L)的 DMEM 培养基预处理细胞 12 h,然后进行 H/R 处理同上;④HO-1 抑制剂锌原卟啉(ZnPP)预处理的 H/R 组(ZnPP+H/R 组):用含 ZnPP(20 μmol/L)的 DMEM 培养基预处理细胞 12 h,然后进行 H/R 处理;⑤LXA₄+ZnPP 预处理的 H/R 组(LXA₄+ZnPP+H/R 组):用含 LXA₄(10 μg/L)和 ZnPP(20 μmol/L)的 DMEM 培养基预处理细胞 12 h,再进行 H/R 处理。

1.2.4 大鼠心肌细胞形态学观察

各组加入相应试剂后,于 5%CO₂,37℃温箱中培

养 12 h,待 H/R 处理后在倒置显微镜下观察细胞形态变化,并照相。

1.2.5 生化指标测定

将各组细胞作相应处理后,提取细胞上清液,应用全自动生化分析仪检测乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)及肌酸激酶(creatine kinase,CK)活力水平。

1.2.6 HO-1 活性测定

按照试剂盒说明书,提取各组细胞蛋白,用 BCA 法测定各标本蛋白浓度。取 1.5 ml 的 EP 管,标记背景管(1 只)及样品管(5 只),分别加入 Genmed 缓冲液、反应液及底物液后,加入 Genmed 阴性液到背景管,加入待测标本到样品管。每只样品管内加入对应标本 50 μg,混匀,37℃下孵育 60 min 后,分别加入 Genmed 终止液终止反应。分别取 100 μl 下层液相液体加入到 96 孔板,即刻放进酶标仪读取 464 nm 和 530 nm 的吸光值。根据消光系数 40 mol(L·cm),代入公式计算出 HO-1 的活力[pmol/(mg·h)]。

1.2.7 RT-PCR 检测 HO-1 mRNA 表达

按照 RT-PCR 试剂盒提取 mRNA 后逆转录合成 cDNA。合成 HO-1 引物,大鼠 HO-1 上游引物:5'-GCTCTATCGTGCTCGCATGA-3',下游引物:5'-AAT-TCCCACTGCCA2CGGTC-3';β-actin 上游引物:5'-CCCTAAGGCCAACCGTGAA-3',下游引物 5'-CC-GATCATTGATAGTGA-3'。根据试剂盒说明书,以 cDNA 作为标准品,实行半定量 PCR。PCR 的循环参数为:94℃ 2 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s 循环 30 次;最后 72℃延伸 10 min。取 RT-PCR 产物行 2.0%琼脂糖凝胶电泳,应用 UVP 凝胶成像系统拍摄、打印和分析实验结果。

1.3 统计学方法

采用统计学 SPSS17.0 统计学软件,实验结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,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。

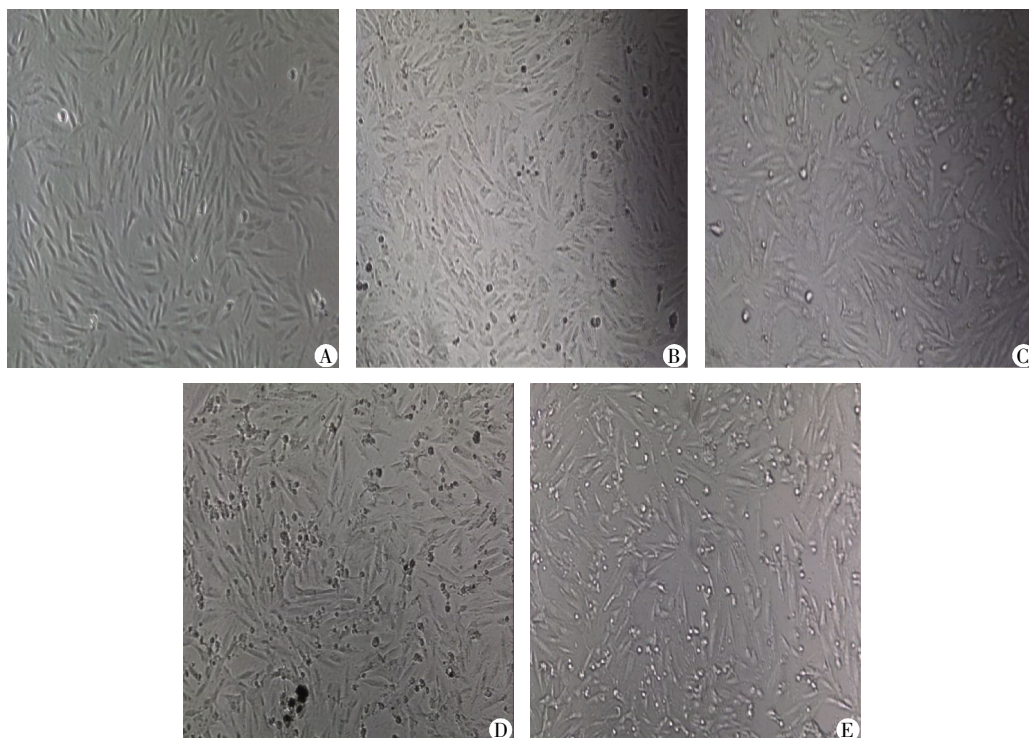
2 结果

2.1 不同处理组对大鼠心肌细胞生长状态的影响

倒置相差显微镜下观察不同处理组的 H₉C₂ 大鼠心肌细胞,对照组细胞贴壁生长,细胞呈梭形,形态饱满;H/R 组细胞明显皱缩,呈梭形、不规则三角形,可见分叉;LXA₄ 预处理组细胞形态较 H/R 组规整,可见少量分叉;ZnPP 预处理组的心肌细胞可见大量细胞呈不规则三角形,分叉较多,细胞贴壁不

佳,部分细胞坏死;LXA₄+ZnPP+H/R 组较单纯 ZnPP 预处理组细胞坏死较少。可见 LXA₄ 可减轻缺氧复氧对心肌细胞的损伤,同时可部分抑制 ZnPP 对心肌细胞的损伤作用(图 1)。

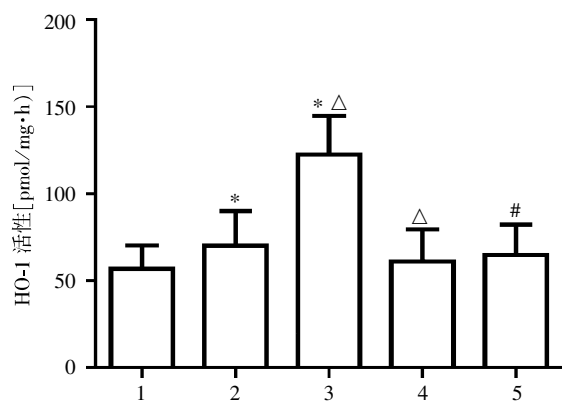
2.2 不同处理组对心肌细胞 HO-1 活性的影响



A: con 组; B: H/R 组; C: LXA₄ + H/R 组; D: ZnPP + H/R 组; E: LXA₄ + ZnPP + H/R 组。

图 1 各组细胞处理后对细胞生长状态的影响(× 100)

Figure 1 The effect to the growth appearance of myocardial cells with different treatments (× 100)



1: con 组; 2: H/R 组; 3: LXA₄+H/R 组; 4: ZnPP+H/R 组; 5: LXA₄+ZnPP+H/R 组; 与 con 组比较, * $P < 0.01$; 与 H/R 组比较, Δ $P < 0.01$; 与 LXA₄+H/R 组相比, # $P < 0.01$ ($n = 6$)。

图 2 各组细胞 HO-1 活性水平

Figure 2 Activity of HO-1 in myocardial cells

2.3 LXA₄ 对心肌细胞 LDH 及 CK 水平的影响

H/R 组的 LDH、CK 活力水平较对照组升高($P < 0.01$), LXA₄+H/R 组的 LDH、CK 水平较 H/R 组有明显下降($P < 0.05$), 较 LXA₄+ZnPP+H/R 组也有明

与对照组相比, H/R 组的 HO-1 活性明显升高($P < 0.01$), LXA₄+H/R 组与 H/R 组相比, HO-1 的活性升高($P < 0.01$), ZnPP+H/R 组抑制 HO-1 的表达, 而 LXA₄+ZnPP+H/R 组中, ZnPP 阻断了 LXA₄ 对 HO-1 的诱导作用($P < 0.01$, 图 2)。

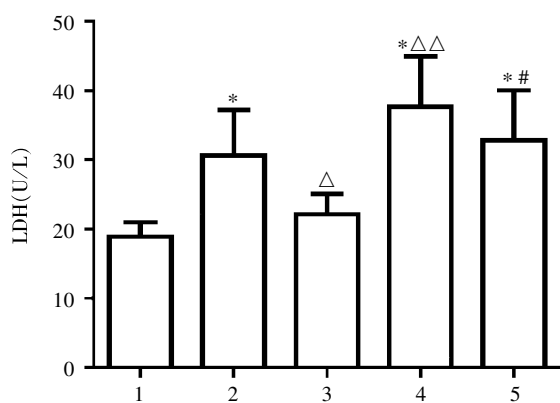
显下降($P < 0.05$)。而对照组与 LXA₄ + H/R 组的 LDH 水平无明显差异($P > 0.05$), ZnPP + H/R 组的 LDH 及 CK 活力水平较 H/R 组升高($P < 0.01$, 图 3, 4)。

2.4 LXA₄ 预处理对 HO-1 mRNA 表达水平的影响

对照组 HO-1 mRNA 表达水平很低, H/R 组的 HO-1 mRNA 表达水平较对照组增加($P < 0.01$); LXA₄ + H/R 组的 HO-1 mRNA 表达水平较 H/R 组明显增加($P < 0.01$); ZnPP + H/R 组 HO-1 mRNA 表达水平较 H/R 组明显降低($P < 0.01$); LXA₄ + ZnPP + H/R 组的 HO-1 mRNA 表达水平低于 LXA₄ + H/R 组($P < 0.05$, 图 5)。

3 讨论

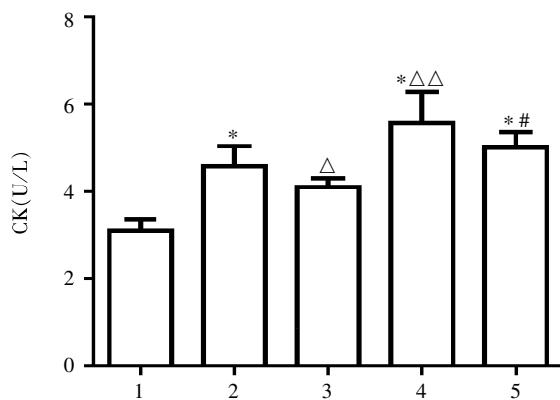
缺血性心脏病是危害人类健康的常见病, 心肌 H/R 损伤引起再灌注心律失常、无复流现象、心肌顿抑及心肌冬眠、细胞坏死及凋亡。近年来已有研究表明脂氧素在脑、心肌、肾脏、胃、肠等器官的缺



1: con 组; 2: H/R 组; 3: LXA₄+H/R 组; 4: ZnPP+H/R 组; 5: LXA₄+ZnPP+H/R 组; 与 con 组比较, * $P < 0.01$; 与 H/R 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 LXA₄+H/R 组相比, # $P < 0.05$ ($n = 6$)。

图 3 各组细胞上清液中 LDH 的测定

Figure 3 Levels of LDH in cellular supernatants

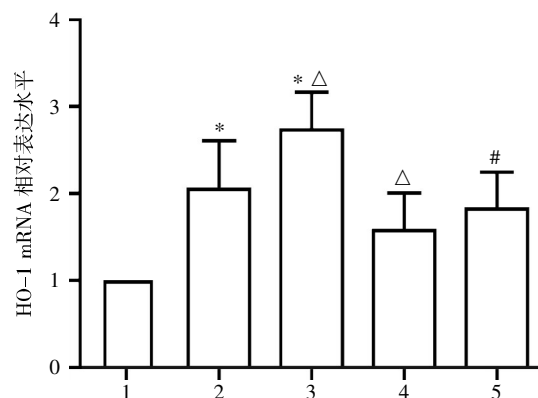
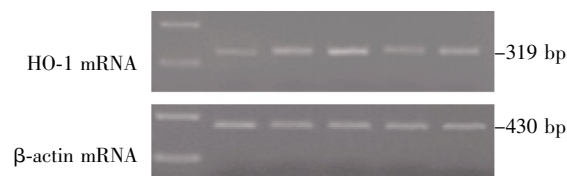


1: con 组; 2: H/R 组; 3: LXA₄+H/R 组; 4: ZnPP+H/R 组; 5: LXA₄+ZnPP+H/R 组; 与 con 组比较, * $P < 0.05$; 与 H/R 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 LXA₄+H/R 组相比, # $P < 0.05$ ($n = 6$)。

图 4 各组细胞上清液中 CK 的测定水平

Figure 4 Levels of CK in cellular supernatants

血/再灌注损伤方面起到一定的保护作用。随着溶栓、PTCA 等再灌注治疗的广泛开展, 使心肌 H/R 损伤的防治成为目前医学研究的热点。HO 是血红素代谢的限速酶, 可分解血红素生成一氧化碳、胆绿素、胆红素和游离铁。HO-1 是其诱导型, 有研究证明, 在缺血预处理中, HO-1 具有较强的抗 H/R 损伤作用, 能缩小离体灌注心脏的梗死范围, 减轻 H/R 损伤时的组织病理学改变, 并且抑制白细胞的活化, 降低其聚集率^[2-4]。因此诱导 HO-1 高表达可减轻心肌 H/R 的损伤。近年来发现, LXA₄ 可诱导多种组织 HO-1 的表达^[5-8]。据此, 本实验从心肌细胞水平模拟 H/R 模型, 通过观察不同处理组细胞形态改变及心肌标志物 LDH、CK 测定及 HO-1 mRNA 水平及活性表达的比较, 观察 LXA₄ 对心肌细胞的保护作用。



1: con 组; 2: H/R 组; 3: LXA₄+H/R 组; 4: ZnPP+H/R 组; 5: LXA₄+ZnPP+H/R 组; 与 con 组比较, * $P < 0.01$; 与 H/R 组比较, $\Delta P < 0.01$; 与 LXA₄+H/R 组相比, # $P < 0.05$ ($n = 6$)。

图 5 各组细胞 HO-1 的 mRNA 表达水平

Figure 5 Expression of HO-1 mRNA in each groups

本实验通过 LXA₄ 及 ZnPP 预处理后制备心肌细胞 H/R 模型, 从倒置显微镜下观察的结果显示, LXA₄ 对心肌 H/R 损伤有保护作用, 而 ZnPP 组较单纯 H/R 组细胞分叉较多, 坏死细胞增加, 可见抑制 HO-1 表达可加重心肌缺氧损伤, 而诱导 HO-1 高表达可有效维持心肌细胞的形态结构, 对心肌细胞有保护作用。

LDH、CK 可反映心肌细胞损害, 心肌细胞缺血坏死时可释出 LDH 及 CK, 细胞损伤越重, LDH 及 CK 指标越高。有研究表明, 在正常培养条件下, 心肌细胞 LDH 水平较低, H/R 刺激后 LDH 释放也明显增加^[11]。本实验中, 与对照组比较, H/R 组 LDH 及 CK 水平明显增加, LXA₄ 预处理组较 H/R 组有明显下降, 加入 ZnPP 后细胞释出的 LDH 及 CK 有所升高。说明 ZnPP 可通过抑制 HO-1 活性而阻断其对心肌的保护作用。进一步证实 LXA₄ 对 H/R 心肌细胞的保护作用是通过 HO-1 实现。

本实验从 HO-1 活性表达及 mRNA 水平研究 LXA₄ 对心肌细胞 H/R 的保护作用, 结果显示 LXA₄ 使 HO-1 的活性及 mRNA 表达加强, ZnPP 的加入抑制了 LXA₄ 对 HO-1 的诱导作用, 从而终止了 LXA₄ 对心肌细胞 H/R 的保护作用。由此可见, H/R 损伤可引起 HO-1 反应性升高, LXA₄ 可诱导 HO-1 进一步高表达, 在细胞水平对心肌缺血/再灌注损伤中起保护作用。

[参考文献]

- [1] 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
- [2] Katori M, Anselmo DM, Busuttil DM, et al. A novel strategy against ischemia and reperfusion injury; cyto-protection with heme oxygenase system [J]. Transpl Immunol, 2002, 9(2-4): 227-233
- [3] Fujii H, Takahashi T, Nakabira K, et al. Role of heme oxygenase-1 in the intestinal tissue injury in an experimental model of sepsis [J]. Crit Care Med, 2003, 31(3): 893-902
- [4] Masini E, Vannacci A, Marzocca C, et al. Heme oxygenase-1 and the ischemia-reperfusion injury in the rat heart [J]. Exp Biol Med, 2003, 228(5): 546-549
- [5] 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
- [6] Biteman B, Hassan IR, Walker E, et al. Interdependence of lipoxin A4 and heme-oxygenase in counter-regulating inflammation during corneal wound healing [J]. FASEB J, 2007, 21(9): 2257-2266
- [7] 金胜威, 张 力, 姚尚龙, 等. 脂氧素 A4 对内毒素诱导小鼠肺内炎症反应的影响 [J]. 中国急救医学, 2006, 26 (8): 594-596
- [8] 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
- [9] 王国华, 钟爱梅, 孙宗全, 等. 脂氧素 A4 对心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中华胸心血管外科杂志, 2009, 25(8): 187-189
- [10] 李 倩, 武维恒, 李东野, 等. 辛伐他汀在心肌细胞缺血再灌注中的作用及机制 [J]. 中华全科医学, 2011, 9 (11): 1668-1670
- [11] 孙婷婷, 朱铁兵, 邵旭武, 等. 钙敏感受体在缺氧复氧大鼠心肌细胞凋亡中的作用 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2009, 29(1): 45-49

[收稿日期] 2011-12-11

科技出版物中阿拉伯数字的书写规则

1. 为使多位数字便于阅读, 可将数字分成组, 从小数点起, 向左或向右每 3 位分成 1 组, 组间留空隙(约为一个汉字的 1/4), 不得用逗号、圆点或其他方式。
2. 纯小数必须写出小数点前用以定位的“0”。
3. 阿拉伯数字不得与除万、亿及法定计量单位词头外的汉字数字连用。如 453 000 000 可写成 45 300 万或 4.53 亿或 4 亿 5 300 万, 但不能写成 4 亿 5 千 3 百万; 三千元写成 3 000 元或 0.3 万元, 但不能写成 3 千元。
4. 一个用阿拉伯数字书写的数值, 包括小数与百分数, 不能拆开转行。
5. 表示用阿拉伯数字书写的数值范围, 使用波浪号“~”。如 10%~20%, $(2\sim6)\times 10^3$ 或 $2\times 10^3\sim 6\times 10^3$, 30~40 km。

(本刊编辑: 接雅俐)