

腺病毒介导的 β_2 -AR 过表达对心力衰竭大鼠心肌细胞 IL-18 分泌的影响

林艳 刘颖 彭珍 宫海滨

【摘要】 目的 研究 β_2 -AR 过表达对心力衰竭大鼠心肌细胞 IL-18 分泌的影响。方法 采用腹主动脉缩窄法建立慢性心力衰竭大鼠模型, 胶原酶消化法分离大鼠心肌细胞, 用携带 β_2 -AR 基因的重组腺病毒转染大鼠心肌细胞, 培养 48 h 后, Western blot 法检测心肌细胞 β_2 -AR 蛋白的表达及 ELISA 法测定 IL-18 的含量。经筛选后心力衰竭大鼠随机分为心力衰竭对照组 (HF 组)、转染 EGFP 组 (HF+EGFP 组)、转染 β_2 -AR-EGFP 组 (HF+ β_2 组); 假手术组也相应随机分为对照组 (sham 组)、转染 EGFP 组 (sham+EGFP 组)、转染 β_2 -AR-EGFP 组 (sham+ β_2 组)。结果 与假手术组相比, 心力衰竭组左心室舒张末期内径 (LVEDD)、左心室收缩末期内径 (LVESD) 均升高 ($P < 0.05$), 左心室短轴缩短率 (FS) 及射血分数 (EF) 均降低 ($P < 0.05$)。Western blot 结果显示 HF+ β_2 组心肌细胞 β_2 -AR 蛋白表达量高于 HF+EGFP 组及 HF 组 ($P < 0.05$)。与 sham 组相比, HF 组 IL-18 含量显著升高 ($P < 0.05$); HF+ β_2 组 IL-18 含量明显低于 HF+EGFP 组及 HF 组 (P 均 < 0.05)。结论 心力衰竭大鼠心肌细胞分泌炎症因子 IL-18 增加, β_2 -AR 过表达后能抑制心肌细胞 IL-18 的分泌。

【关键词】 心力衰竭; 转染; 白细胞介素 18; β_2 肾上腺素受体

Effects of adenovirus mediated β_2 -AR overexpression on IL-18 level secreted by cardiomyocytes of heart failure rats LIN Yan*, LIU Ying, PENG Zhen, GONG Hai-bin. *Graduate School, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221009, China

Corresponding author: GONG Hai-bin, Email: ghbzxh@126.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of β_2 -AR overexpression on IL-18 content secreted by cardiomyocytes of heart failure rats. **Methods** The rats model of chronic heart failure was established by partially banding abdominal aorta and the cardiomyocyte was isolated with collagenase II, then the cardiomyocyte was transfected with Ad5-ADRBeta2-EGFP for 48 h to observe the changes of β_2 -AR protein expression in Western Blot and IL-18 content in ELISA. The experiment was divided into six groups: HF group, HF+EGFP group, HF+ β_2 group, sham group, sham+EGFP group and sham+ β_2 group. **Results** Compared with the sham-operated group, left ventricular diastolic dimension (LVEDD), left ventricular systolic dimension (LVESD) were all increased ($P < 0.05$), ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) were decreased ($P < 0.05$) in HF group. Compared with HF group and HF+EGFP group, the expression of β_2 -AR protein of cardiomyocytes was increased in HF+ β_2 group ($P < 0.05$). Compared with sham group, IL-18 content secreted by cardiomyocytes in HF group was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with HF group and HF+EGFP group, IL-18 content in HF+ β_2 group were both increased ($P < 0.05$). **Conclusion** The content of IL-18 is increased in the cardiomyocytes of heart failure rats. The overexpressed β_2 -AR protein can decrease the IL-18 content secreted by cardiomyocytes of heart failure rats.

【Key words】 Heart failure; Transfection; Interleukin-18; β_2 -adrenergic receptor

慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF) 是大多数心血管疾病的最终归宿, 也是最主要的死亡原因。

交感神经系统及各种细胞因子在心力衰竭 (简称心衰) 的发生发展中均起着重要的作用。 β 肾上腺素能受体 (β -adrenergic receptor, β -AR) 是心脏交感神经系统的主要受体, 心肌细胞上主要存在的 β -AR 为 β_1 及 β_2 -AR, 在心衰时, 由于 β_1 -AR 的选择性下调, β_2 -AR 的生理作用显著提高^[1]。有学者发现 β_2 -AR 表达增加的转基因小鼠, 其心肌细胞收缩功能明显增强^[2]。除此之外, 炎症细胞因子在心衰的进程中发挥的作用也越来越引

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.16.029

基金项目: 江苏省生命健康科技专项资金 (BL2012019)

作者单位: 221009 江苏省, 徐州医学院研究生学院 (林艳); 徐州市中心医院中心实验室 (刘颖), 彩超室 (彭珍); 徐州市心血管病研究所 徐州市中心医院心内科 (宫海滨)

通讯作者: 宫海滨, Email: ghbzxh@126.com

起重视^[3]。白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18) 是新近发现的具有强烈促炎作用的细胞因子, 能促进 IL-1、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α) 等促炎因子及一氧化氮等细胞毒性因子的生成及释放, 心衰时血清中 IL-18 水平升高^[4], 因而 IL-18 可能与心衰的发生发展相关。而又有研究者^[5-6]通过实验发现儿茶酚胺兴奋 β 2-AR 可经 PKA-cAMP 通路来抑制促炎因子的产生及促进抗炎因子的生成, 从而抑制炎症反应。那么, 在心衰时, 增加 β 2-AR 的表达是否会影响心肌 IL-18 的分泌, 目前尚未有文献报道。本实验通过携带目的基因的重组腺病毒转染心衰大鼠心肌细胞, 使心肌细胞过表达 β 2-AR, 从而初步探索 β 2-AR 对心肌细胞 IL-18 分泌的影响。

材料与方 法

一、实验动物

健康雄性 SD 大鼠, 体重: 180~220 g, 由徐州医学院实验动物中心提供。

二、实验试剂

携带 β 2-AR 目的基因的重组腺病毒 (Ad5-ADRBeta2-EGFP)、仅携带增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 重组腺病毒 (Ad5-EGFP) 由北京本元正阳基因有限公司构建, II 型胶原酶购自 Worthington 公司; M199 培养基、肉毒碱、牛磺酸、双抗等购自 Sigma 公司; 牛血清白蛋白 (BSA) 购自 Sunshine 公司; 抗 β 2-AR (H-20): sc-569 购自 Santa Cruz 公司; 抗 β -Actin 购自 Cell Signaling 公司; NBT/BCIP 试剂盒购自 Promega 公司; 大鼠 IL-18 ELISA 试剂盒购自武汉博士德公司。

三、方 法

1. CHF 大鼠模型的建立: 采用腹主动脉缩窄法建立大鼠心衰模型, 假手术组仅分离腹主动脉不结扎。术后 12 周用彩色多普勒超声仪 (美国 GE 公司, Vivid7, 徐州市中心医院提供), 10S 探头 (探头频率 11.0 MHz) 探查心内结构及功能, 分别测量左心室舒张末期内径 (LVEDD)、左心室收缩末期内径 (LVESD)、左心室短轴缩短率 (FS) 及射血分数 (EF), 每一超声测定值取 5 个心动周期求平均值。筛选标准: 大鼠出现食欲差、体重不增、精神萎靡、活动少、被毛蓬松无光泽、呼吸急促等表现; 心脏彩色多普勒超声指标 EF < 60%。符合上述条件者纳入心衰组。将纳入的心衰组大鼠随机分为: 心衰对照组 (HF 组)、转染 EGFP 组 (HF+EGFP 组)、转染 β 2-AR-EGFP 组 (HF+ β 2 组); 假手术组也随机分为对照组 (sham 组)、转染 EGFP 组 (sham+EGFP 组)、转染 β 2-AR-EGFP 组 (sham+

β 2 组)。

2. 大鼠心肌细胞分离及培养: 采用 II 型胶原酶消化法分离大鼠心肌细胞。大鼠麻醉前 30 min 腹腔注射肝素钠 (1500 U/100 g), 麻醉后迅速开胸取心脏, 置于冰冷的 1 mmol/L 含钙 KH 液中停跳, 迅速挂于 Langendorff 灌流装置上, 用 1 mmol/L 含钙 KH 液经主动脉逆行灌流 5 min 后转换低钙液灌流 5 min, 转换酶液循环灌流 10~15 min, 整个灌流过程温度保持在 37 °C, 流速保持在 8~10 ml/min。待心脏质地变软后剪下心肌于培养皿中, 剪碎后于酶液中振荡孵育 5 min, 用 300 μ m 尼龙网过滤, 滤液以 16 \times g (400 r/min) 离心 1 min, 弃上清, 用 1 mmol/L 含钙的 KH 液重悬后自然沉降, 反复 3 次。心肌细胞采用视野计数法计算细胞密度, 用含 0.2% BSA 的 M199 培养液按活细胞 1 \times 10⁵/ml 的细胞密度培养细胞。

3. 大鼠心肌细胞基因转染: 用携带 β 2-AR 或 EGFP 基因的重组腺病毒转染大鼠心肌细胞, 感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 100。转染 48 h 后, 从培养箱中取出, 在荧光显微镜下观察拍照, 随机选取 5 个视野, 分别计算转染效率, 即同一视野中有绿色荧光表达的杆状细胞数/杆状细胞总数。

4. Western blot 法检测 β 2-AR 蛋白表达: 收集腺病毒转染 48 h 后的心肌细胞, 培养基清洗 2 次, 离心去上清, 加入含有蛋白酶抑制剂混合物的匀浆液, 超声破碎细胞, 按 Lowry 法测其蛋白浓度后, 将含相同蛋白量的样品中加入等体积的 4 \times laemmli 蛋白上样缓冲液, 置沸水浴中变性 5 min。取等量变性蛋白质样品 (100 μ g), 加入 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 以半干转电转至 NC 膜上。将 NC 膜置封闭液中室温孵育 3 h 后, 加入一抗工作液 (抗 β 2-AR 抗体), 4 °C 过夜, TBST 洗膜 5 min \times 3 次, 加入 AP 标记的二抗工作液, 室温孵育 2 h, TBST 洗膜 5 min \times 3 次。使用显色剂 NBT/BCIP 试剂盒在新配置的 AP 显色液中显色, 流水洗涤中止反应。将显色条带扫描入电脑, 并以 Image J、Sigmastat、SigmaPlot 等软件处理。假手术对照组光密度值设为 1, 其余组以其倍数表示。

5. ELISA 法检测 IL-18 含量: 各组心肌细胞培养 48 h 后, 于离心机以 389 \times g 离心 20 min, 收集上层培养上清液, 置于 -80 °C 保存。采用酶联免疫吸附法检测心肌细胞分泌 IL-18 的含量, 按试剂盒说明书操作。

四、统计学分析

应用 SPSS 17.0 进行统计学分析, 计量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 大鼠超声心功能测定结果采用 *t* 检验, Western blot 数据及 ELISA 检测结果

方差齐性检验后用单因素方差分析(ANOVA)进行统计分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

结 果

1. 大鼠心衰模型鉴定: 雄性 SD 大鼠 70 只行部分腹主动脉缩窄术建立心衰模型, 30 只仅分离腹主动脉不结扎作为假手术组。术后模型组死亡 18 只, 死亡率 26%; 假手术组死亡 1 只, 死亡率 3%。术后心衰模型组大鼠逐渐出现食欲差、体重不增、精神萎靡、活动减少、被毛无光泽、蓬松、呼吸急促等表现, 12 周时结合彩色多普勒超声检查符合心衰标准的共有 27 只, 进行随机分组; 假手术大鼠组无上述症状, 从 29 只中随机选取 27 只同样进行超声检查, 然后同样进行随机分组。术后 12 周时彩色多普勒超声检查结果显示: 与假手术组比较, 心衰组大鼠 LVEDD、LVESD 均明显增加 ($P < 0.05$), FS、EF 明显降低 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 术后 12 周心衰组与假手术组心脏超声指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	LVEDD(mm)	LVESD(mm)	FS(%)	EF(%)
假手术组	27	5.93±0.68	3.25±0.72	46.22±6.28	81.59±5.20
心衰组	27	8.78±0.80 ^a	6.15±0.95 ^a	26.30±3.17 ^a	55.96±5.05 ^a

注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$

2. 携带 $\beta 2$ -AR 或 EGFP 基因的腺病毒转染心肌细胞的结果: 携带 $\beta 2$ -AR 或 EGFP 基因的腺病毒转染大鼠心肌细胞 48 h 后, 在荧光倒置显微镜下可看到明显的绿色荧光, 计算其转染率约为 80% 以上 (图 1)。

3. 转染带有 $\beta 2$ -AR 或 EGFP 基因的腺病毒后大鼠心肌细胞 $\beta 2$ -AR 表达: 与 sham 组相比, HF 组 $\beta 2$ -AR 表达无明显增加 ($P > 0.05$)。HF+ $\beta 2$ 组心肌细胞 $\beta 2$ -AR 量明显高于 HF+EGFP 组及 HF 组 ($P < 0.05$), sham+ $\beta 2$ 组 $\beta 2$ -AR 表达量高于 sham+EGFP 组及 sham 组 ($P < 0.05$) (图 2)。

4. ELISA 法检测心肌细胞 IL-18 结果: 与 sham 组相比, HF 组 IL-18 含量显著升高 ($P < 0.05$); HF+ $\beta 2$ 组 IL-18 含量明显低于 HF+EGFP 组及 HF 组 ($P < 0.05$), 而 sham+ $\beta 2$ 组 IL-18 含量较 sham+EGFP 组及 sham 组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 2)。

讨 论

心衰是一种复杂的临床综合征, 许多实验研究证明促炎细胞因子参与了心衰的发生发展。目前文献报道比较多的 IL-1、IL-6、TNF- α 、C 反应蛋白 (C-reactive

表 2 六组大鼠心肌细胞分泌 IL-18 含量比较

组别	鼠数	IL-18(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)
sham 组	9	51.9±20.30
sham+EGFP 组	9	54.3±19.02
sham+ $\beta 2$ 组	9	37.7±17.88
HF 组	9	278.2±64.12 ^a
HF+EGFP 组	9	260.3±64.59 ^a
HF+ $\beta 2$ 组	9	138.2±41.40 ^{ab}

注: 与 sham 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 HF 组比较, ^b $P < 0.05$

protein, CRP) 等细胞因子在心衰动物模型和心衰患者中均升高, 且升高的程度与心衰严重程度呈正比^[7-9]。IL-18 是新近发现的具有强烈促炎作用的细胞因子, 能促进 IL-1、TNF- α 等促炎因子及一氧化氮等细胞毒性因子的产生, 通过降低心肌收缩功能, 引起心肌肥厚、心室重塑, 促进心衰的发生发展^[10]。Colston 等^[11]报道用部分腹主动脉缩窄术致后负荷增加制作大鼠心肌肥厚模型, 同样的手术分别施于普通大鼠及 IL-18 基因敲除大鼠, 6 周后观察, IL-18 基因敲除大鼠的心肌肥厚程度及心功能减退情况较正常大鼠明显减轻。本实验采用腹主动脉缩窄法造成后负荷增加来模拟慢性心衰的病理形成过程, 从而建立大鼠心衰模型。实验结果也显示心衰组大鼠心肌细胞分泌 IL-18 含量显著高于假手术组, 这与文献报道相一致。

心衰时, $\beta 1$ -AR 下调, $\beta 2$ -AR 成为调节心脏功能的重要受体, 在交感神经冲动产生的正性肌力和正性变时作用中占重要的地位。转基因小鼠实验表明, 心肌特异性过表达 $\beta 2$ -AR 时, 即可改善心脏舒缩功能及逆转心肌肥大; 最近又有实验证明, 在家兔的缺血心肌细胞中, 增加 $\beta 2$ -AR 基因表达能改善心肌收缩力和提高细胞生存率, 但对 $\beta 1$ -AR 作转染, 心功能改善不明显^[12]。本实验室前期研究也表明, 大鼠心衰心肌细胞过表达 $\beta 2$ -AR 后, 可改善心衰大鼠心肌细胞基础收缩功能^[13]。近年来, 研究者用脂多糖建立脓毒症模型, 用特异性 $\beta 2$ -AR 激动剂兴奋 $\beta 2$ -AR, 发现可抑制炎症因子 IL-18 及 IL-12 的产生^[14]。Murray 等^[15]报道 $\beta 2$ 肾上腺素能受体激活可诱导 IL-18 结合蛋白 (IL-18 binding protein, IL-18BP) 的表达增加, 而 IL-18BP 能特异性阻碍 IL-18 与其受体结合, 从而改善异丙肾上腺素诱导的离体心肌细胞肥大及在体心肌组织肥厚。

心衰本身也是一个炎症反应过程, 用基因转染技术直接过表达 $\beta 2$ -AR 是否抑制心衰大鼠心肌细胞 IL-18 的产生, 从而从另一方面发挥保护心肌的作用呢? 我们在实验中观察到心衰大鼠心肌细胞表面 $\beta 2$ -AR 的表达量较对照组无明显降低, 心肌细胞分泌 IL-18 水平较对照组明显升高, 这提示我们 IL-18 可能作为促炎因子参与心衰时的炎症反应, 从而促进心衰

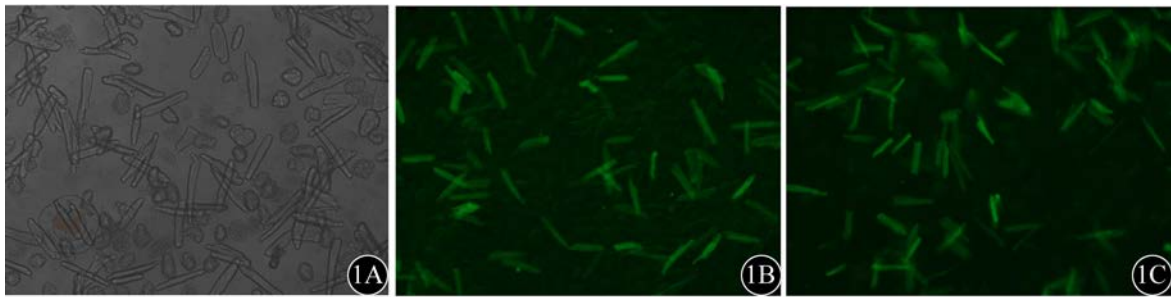


图1 荧光显微镜检测心肌细胞培养48 h后绿色荧光蛋白表达。1A: 心衰组心肌细胞 (×100); 1B: 心衰转染EGFP组 (×100); 1C: 心衰转染β2-AR-EGFP组 (×100)

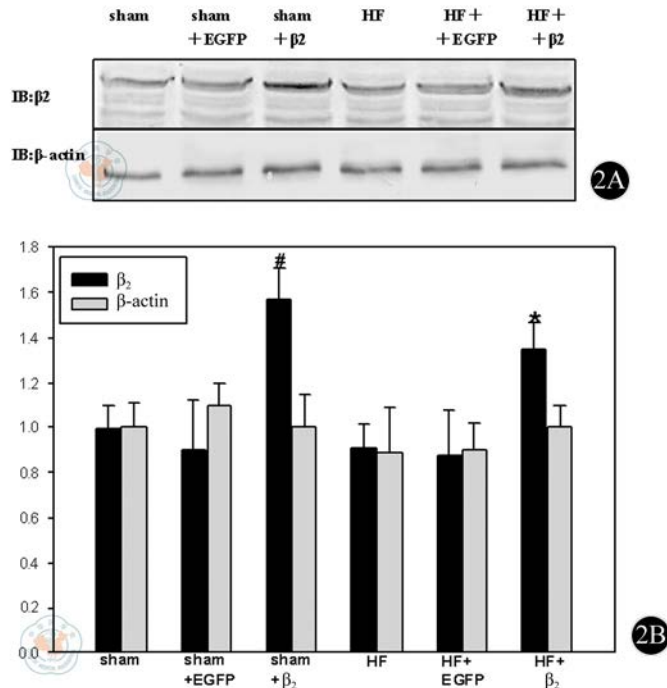


图2 Western blot检测各组心肌细胞培养48 h后β2-AR蛋白表达。与sham组比较, #*P*<0.05; 与HF组比较, **P*<0.05

的发展; 我们通过基因转染技术使心肌细胞表面表达β2-AR 增加, 心衰转染 β2-AR 组心肌细胞分泌 IL-18 水平较心衰对照组明显降低, 而假手术转染 β2-AR 组心肌细胞分泌 IL-18 水平较假手术对照组无明显降低, 这表明增加 β2-AR 的表达能降低心衰大鼠心肌细胞 IL-18 水平, 而对正常大鼠心肌细胞 IL-18 水平无明显影响。这就提示我们利用基因转染将 β2-AR 导入心肌细胞内, 还可通过降低心肌细胞炎症因子 IL-18 水平, 减轻心衰炎症反应来发挥心肌保护作用, 有可能为心衰提供新的治疗思路。

本实验排除了神经和体液等全身因素的影响, 在离体细胞水平观察 β2-AR 过表达对心衰大鼠心肌细胞 IL-18 分泌的影响, 但如果能同时采用大鼠直接心内注射方式研究在体水平 β2-AR 对 IL-18 的影响, 将离体细胞水平及在体组织水平结合起来有助于更全面了解两者之间的关系。另外, 本实验选择促炎因子 IL-18

作为研究对象来了解其与 β2-AR 的关系, 后期我们可能选取其他促炎因子(如 IL-6)及抗炎因子(如 IL-10)作为研究对象, 以期更全面了解心衰时 β2-AR 与炎症反应网络之间的关系。

参 考 文 献

- [1] Lamba S, Abraham WT. Alterations in adrenergic receptor signaling in heart failure. *Heart Fail Rev*, 2000, 5: 7-16.
- [2] Communal C, Colucci WS. The control of cardiomyocyte apoptosis via the beta adrenergic signaling pathways. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 2005, 98: 236-241.
- [3] Gullestad L, Ueland T, Vinge LE, et al. Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers. *Cardiology*, 2012, 122: 23-35.
- [4] Vistnes M, Waehre A, Nygård S, et al. Circulating cytokine levels in mice with heart failure are etiology dependent. *J Appl Physiol*, 2010, 108: 1357-1364.
- [5] Kumar V, Sharma A. Is neuroimmunomodulation a future therapeutic approach for sepsis? *Int Immunopharmacol*, 2010, 10: 9-17.
- [6] Szelényi J, Vizi ES. The catecholamine cytokine balance: interaction between the brain and the immune system. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1113: 311-324.

- [7] Hirota H, Izumi M, Hamaguchi T, et al. Circulating interleukin-6 family cytokines and their receptors in patients with congestive heart failure. *Heart Vessels*, 2004, 19: 237-241.
- [8] Kurdi M, Booz GW. Can the protective actions of JAK-STAT in the heart be exploited therapeutically? Parsing the regulation of interleukin-6-type cytokine signaling. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007, 50: 126-141.
- [9] 胡有东, 赵庆娜, 李侠. 不同程度老年冠心病慢性左心心力衰竭患者细胞间粘附分子-1、CD14⁺CD16⁺单核细胞、肿瘤坏死因子- α 和可溶性肿瘤坏死因子受体-1、2水平分析[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7: 1991-1994.
- [10] Yu Q, Vazquez R, Khojeini EV, et al. IL-18 induction of osteopontin mediates cardiac fibrosis and diastolic dysfunction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 297: H76-85.
- [11] Colston JT, Boylston WH, Feldman MD, et al. Interleukin-18 knockout mice display maladaptive cardiac hypertrophy in response to pressure overload. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 354: 552-558.
- [12] Dong H, Chen Q, Sun S, et al. Overexpression of beta(2)AR improves contractile function and cellular survival in rabbit cardiomyocytes under chronic hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398: 383-388.
- [13] 宫海滨, 吕茜, 王雷, 等. 心衰大鼠心肌细胞 β 2-AR 的表达与心功能改变的关系及机制. *现代生物医学进展*, 2009, 9: 1024-1027.
- [14] Mizuno K, Takahashi HK, Iwagaki H, et al. Beta2-adrenergic receptor stimulation inhibits LPS-induced IL-18 and IL-12 production in monocytes. *Immunol Lett*, 2005, 101: 168-172.
- [15] Murray DR, Mummidi S, Valente AJ, et al. β 2 adrenergic activation induces the expression of IL-18 binding protein, a potent inhibitor of isoproterenol induced cardiomyocyte hypertrophy in vitro and myocardial hypertrophy in vivo. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52: 206-218.

(收稿日期: 2013-07-05)

(本文编辑: 张岚)

林艳, 刘颖, 彭珍, 等. 腺病毒介导的 β 2-AR 过表达对心力衰竭大鼠心肌细胞 IL-18 分泌的影响 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7 (16): 7458-7462.

