

尾加压素 II 对心肌细胞氧化应激反应及 NADPH 氧化酶亚单位 p22^{phox} 表达的影响

邵志凌¹, 向谨逸²

(1. 武汉铁路局社会保险管理处, 430071; 2. 华中科技大学同济医学院分子生物学系, 武汉 430030)

摘要 目的 观察尾加压素 II (U II) 对心肌细胞氧化应激反应的影响及其机制。方法 体外培养新生 SD 乳鼠心肌细胞, 建立尾加压素 II 诱导心肌细胞氧化应激反应模型。用活性氧 (ROS) 敏感的 DCFH-DA 探针测定胞内 ROS 水平。以细胞存活率、丙二醛 (MDA) 含量、上清液乳酸脱氢酶 (LDH) 活性、胞内超氧化物歧化酶 (SOD) 活性作为心肌细胞损伤的指标, 免疫印迹法测定 NADPH 氧化酶亚单位 p22^{phox} 表达情况。**结果** U II 可显著提高胞内二氯荧光黄 (DCF) 荧光信号强度, 降低细胞存活率及 SOD 活性, 上调 LDH 活性及 MDA 含量。U II 能上调 NADPH 氧化酶亚单位 p22^{phox} 表达。**结论** U II 可诱导心肌细胞氧化应激损伤反应, 机制可能与增强 NADPH 氧化酶亚单位 p22^{phox} 表达有关。

关键词 尾加压素 II; 心肌细胞; 活性氧

中图分类号 R966 文献标识码 A 文章编号 1004-0781(2012)10-1282-03

Effects of Urotensin II on Cardiomyocyte Oxidative Stress and NADPH Oxidase p22^{phox} Expression

SHAO Zhi-ling¹, XIANG Jin-yi² (1. Department of Social Insurance Management, Railroad Bureau of Wuhan, Wuhan 430071, China; 2. Department of Molecular Biology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Objective To investigate the effects and mechanism of urotensin II (U II) on cardiomyocyte oxidative stress. **Methods** The model of cardiomyocyte oxidative stress induced by U II was established in the primary culture of neonatal rat cardiomyocytes. The content of reactive oxygen species (ROS) was measured by ROS sensitive 2, 7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) probe. As indexes of cardiomyocyte oxidative stress, the cell viability, cellular contents of MDA, SOD, and LDH were tested. The expression of NADPH oxidase p22^{phox} was assessed by Western blot. **Results** Urotensin II significantly enhanced the intracellular dichlorofluorescein (DCF) signal, inhibited cell survival and SOD activity, upregulated LDH and MDA, and increased the p22^{phox} expression. **Conclusion** The stimulation of urotensin II for cardiomyocyte oxidative stress may be associated with upregulation of p22^{phox} expression.

KEY WORDS Urotensin II; Cardiomyocyte; Reactive oxygen species

尾加压素 II (urotensin II, U II) 是一种生长抑素样环肽, 属神经肽范畴^[1]。其受体在心血管系统广泛表达^[2]。目前研究发现 U II 与心肌肥厚及充血性心力衰竭密切相关^[3], 其能诱导培养的新生乳鼠心肌细胞肥大^[4-5]。心肌细胞的肥大反应需要氧化应激反应的激活。作为一种新的心肌肥大诱导剂, U II 对心肌细胞氧化应激反应的作用笔者尚未见报道。本实验中以培养的新生乳鼠心肌细胞为实验模型, 观察 U II 对心肌细胞氧化应激反应的影响, 并观察其对还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide 3-phosphate, NADPH) 氧化酶 p22^{phox} 亚单位表达的影响, 以进一步探讨 U II 的心血

管药理作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 清洁级新生 SD 乳鼠购于华中科技大学同济医学院实验动物中心, 许可证号: SYXK(鄂)2008-0008。U II、达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)、胰蛋白酶和胎牛血清购于美国 Gibco 公司, 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malonaldehyde, MDA)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。DMEM 干粉培养基、胰蛋白酶、胎牛血清 (Gibco 公司), PMSF、小鼠抗大鼠 p22^{phox} 单克隆抗体 (Sigma 公司)。其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和试验分组 1 d 龄新生 SD 乳鼠, 无菌条件下开胸取左心室, 剪碎后置于预热的 0.125% 胰蛋白酶液 37 °C 水浴反复消化 6 次, 每次 10 min 直

收稿日期 2011-12-09 修回日期 2012-01-15

作者简介 邵志凌 (1974-), 男, 湖北仙桃人, 主管药师, 主要研究方向: 药理学。电话: (0) 13886168406, E-mail: shaozhiling99@yahoo.com.cn。

至组织块消化完全,收集上清液,1 000 r·min⁻¹离心 10 min,加入培养基制成细胞悬液,接种于培养瓶,二氧化碳培养箱静置培养 90 min 后行差速贴壁以去除成纤维细胞。收集未贴壁细胞接种于 6 孔板,置于 37 ℃、5% 二氧化碳(CO₂)培养箱中培养 2 d,然后换正常培养基。根据所加试剂分为对照组及试验组:①对照组,给予等体积培养液;②U II 低、中、高剂量组(10⁻¹⁰,10⁻⁹,10⁻⁸ mol·L⁻¹)。

1.2.2 活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平变化的检测 培养第 4 天,培养液中加入乙酰乙酸二氯氢化荧光素二酯(chlormethy-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate,DCFH-DA),终浓度为 5 μmol·L⁻¹,细胞内生成的 ROS 可将其氧化为二氯荧光黄(dichlorofluorescein,DCF)而被检测。置于 37 ℃避光孵育 30 min 后,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 遍,加入胰酶消化细胞,再用含 10% 胎牛血清终止消化。荧光光度计在激发光波长 485 nm、发射光波长 535 nm 下观察胞内产生荧光强度的变化,反映细胞内 ROS 水平。

1.2.3 细胞存活率 细胞存活率用锥虫蓝拒染实验测定。用 0.125% 胰酶消化分离贴壁心肌细胞,制成单细胞悬液,取各组细胞悬液 450 μL 移入试管中,加 0.04% 锥虫蓝溶液 50 μL 混匀。用细胞计数板在光镜下分别计数活细胞和死细胞(蓝染细胞)。细胞存活率(%)=未蓝染细胞/(蓝染细胞+未蓝染细胞)×100%。

1.2.4 胞内 MDA 含量、培养液中 LDH 活性和 SOD 活性 LDH 能催化乳酸生成丙酮酸,后者与 2,4-二硝基苯-肼反应生成的丙酮酸二硝基苯腙,在碱性溶液中呈棕红色,通过比色法可反映 LDH 活力。各组细胞经处理后,取其培养液,根据试剂盒步骤,在酶标仪上测定 LDH 活性。各组细胞经处理后,吸弃原培养液。用 PBS 洗 2 次,置低温冰箱(-70 ℃)反复冻融,取上清液,按试剂盒使用说明测定 MDA 含量和 SOD 活力。

1.2.5 NADPH 氧化酶亚单位 p22^{phox}表达 细胞先经冷 PBS 冲洗 3 遍,裂解细胞,100 ℃水浴 10 min 后,10 000×g 离心 10 min,收集上清液,采用考马斯亮蓝法进行蛋白定量,制备好的蛋白样品置-80 ℃冰箱保存备用。以 20 μg 蛋白/泳道上样,经聚丙烯酰胺凝胶 SDS/PAGE 电泳后,电转膜至硝酸纤维素膜。室温封闭 3 h,加一抗,室温下孵育 2 h,再加 1:10 000 稀释的二抗室温下孵育 1 h,采用 DAB 显色试剂盒进行显色 2~5 min,待蛋白条带显色清晰时,中止反应,拍摄照片,对结果进行吸光度扫描分析。

1.3 统计学方法 所有数据均采用均数±标准差

($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS 12.0 统计软件包进行单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 U II 对心肌细胞 ROS 的产生的影响 免疫荧光法显示,对照组心肌细胞内荧光信号较低,各浓度 U II 处理后,心肌细胞内 ROS 明显聚集,荧光信号显著增强,差异有统计学意义。见图 1。

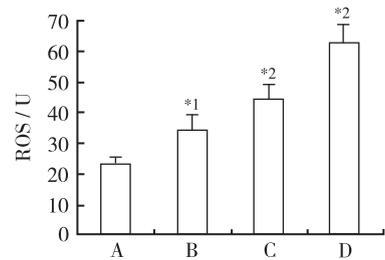


图 1 4 组 ROS 水平的检测值

A. 对照组;B. 10⁻¹⁰ mol·L⁻¹ U II 组;C. 10⁻⁹ mol·L⁻¹ U II 组;D. 10⁻⁸ mol·L⁻¹ U II 组;与对照组比较,*¹ $P<0.05$,*² $P<0.01$

Fig. 1 The ROS levels in 4 groups

A. control group; B. 10⁻¹⁰ mol·L⁻¹ U II group; C. 10⁻⁹ mol·L⁻¹ U II group; D. 10⁻⁸ mol·L⁻¹ U II group; Compared with control group, *¹ $P<0.05$, *² $P<0.01$

2.2 U II 对心肌细胞氧化应激损伤的影响 锥虫蓝摄取实验显示,对照组细胞生长状态良好,存活率(91.39±9.28)%;各浓度 U II 处理后,心肌细胞存活率较对照组明显下降,同时 MDA 含量和 LDH 活性明显上调,而 SOD 活性明显下降,差异有统计学意义。见表 1。

2.3 U II 对心肌细胞 NADPH 氧化酶亚单位 p22^{phox}表达的影响 结果显示,对照组心肌细胞 p22^{phox}表达较低,各浓度 U II 处理后,p22^{phox}表达显著增加,差异有统计学意义。见图 2。

3 讨论

心室重塑是心肌梗死、高血压等疾病的重要病理生理过程,包括心肌细胞肥大,促进进行性心室扩大和心力衰竭^[6]。在心室重塑过程中,氧化应激起重要作用。NADPH 氧化酶在心肌细胞是超氧阴离子的主要来源。调控氧化应激是临床上治疗心肌损伤的重要途径^[7]。

MDA 是 ROS 引发脂质过氧化反应的终产物,它可损伤生物膜脂质双分子层结构,其浓度增高反映了细胞膜上脂质过氧化反应增强。SOD 是内源性抗氧化系统的重要抗氧化酶之一,能保护心肌细胞免受氧

表1 U II对心肌细胞存活率、MDA含量、LDH活性及SOD活性的影响

Tab.1 Effects of U II on cell survival rate,MDA content,LDH activity and SOD activity of myocytes

$\bar{x} \pm s$

组别	细胞存活率/%	MDA/(mmol · L ⁻¹)	LDH		SOD	
			(U · L ⁻¹)			
U II (10 ⁻¹⁰ mol · L ⁻¹)	82.25±8.78 ^{*1}	0.612±0.078 ^{*1}	42.97±9.12 ^{*1}	48.22±5.12 ^{*1}		
U II (10 ⁻⁹ mol · L ⁻¹)	72.86±9.57 ^{*2}	0.786±0.092 ^{*2}	57.46±6.88 ^{*2}	39.67±4.01 ^{*2}		
U II (10 ⁻⁸ mol · L ⁻¹)	60.55±7.21 ^{*2}	0.903±0.103 ^{*2}	60.56±4.18 ^{*2}	29.96±3.02 ^{*2}		
对照组	91.39±9.28	0.580±0.090	31.16±5.78	53.87±7.22		

与对照组比较, ^{*1}P<0.05, ^{*2}P<0.01

Compared with control group, ^{*1}P<0.05, ^{*2}P<0.01

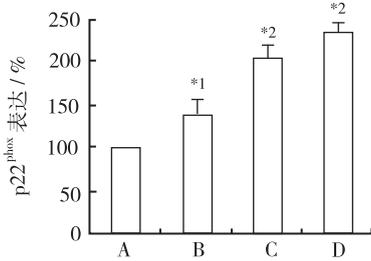


图2 U II对p22^{phox}表达的影响

A. 对照组; B. 10⁻¹⁰ mol · L⁻¹ U II组; C. 10⁻⁹ mol · L⁻¹ U II组; D. 10⁻⁸ mol · L⁻¹ U II组; 与对照组比较, ^{*1}P<0.05, ^{*2}P<0.01

Fig.2 Effects of U II on p22^{phox} expression

A. control group; B. 10⁻¹⁰ mol · L⁻¹ U II group; C. 10⁻⁹ mol · L⁻¹ U II group; D. 10⁻⁸ mol · L⁻¹ U II group; Compared with control group, ^{*1}P<0.05, ^{*2}P<0.01

自由基的破坏并有效地清除氧自由基,使心肌细胞内线粒体的膜磷脂免遭破坏。本研究发现,U II显著提高胞内DCF荧光信号强度,降低细胞存活率及SOD活性,上调LDH活性及MDA含量。提示U II确能诱导心肌氧化应激反应,促使心肌损伤。

此外,本实验还发现U II可上调NADPH氧化酶亚单位p22^{phox}表达。NADPH氧化酶由多种亚单位构成,包括存在于胞浆膜上的p22^{phox}和gp91^{phox}构成的异源二聚体以及存在于胞浆中的p47^{phox}、p67^{phox}、p40^{phox}、Rac2等几种胞浆蛋白成分^[8]。p22^{phox}是细胞色素b558的异构体,作为最终的电子传递体从NADPH传递电子到氧产生O₂⁻。另有研究表明p22^{phox}基因多态性是冠心病独立危险因素^[9]。

综上所述,本研究提示U II可诱导体外培养的乳鼠心肌细胞氧化应激反应,机制可能与上调NADPH氧化酶亚单位p22^{phox}表达有关。

参考文献

- [1] COULOUARN Y, LIHRMANN I, JEGOU S, et al. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(26): 15803-15808.
- [2] VAUDRY H, DO REGO J C, LE MEVEL J C, et al. Urotensin II, from fish to human[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1200: 53-66.
- [3] WATANABE T, ARITA S, SHIRAIISHI Y, et al. Human urotensin II promotes hypertension and atherosclerotic cardiovascular diseases[J]. Curr Med Chem, 2009, 16(5): 550-563.
- [4] 邵志凌, 何学心, 向谨逸. 尾加压素II对心肌成纤维细胞表型转换的影响[J]. 医药导报, 2011, 30(10): 1275-1278.
- [5] 邵志凌, 何学心, 向谨逸. 尾加压素II诱导心肌细胞肥大及对ERK/NF-κB通路的影响[J]. 医药导报, 2011, 30(5): 566-570.
- [6] WILLIAMS A R, HARE J M. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease[J]. Circ Res. 2011, 109(8): 923-940.
- [7] MURDOCH C E, ALOM-RUIZ S P, WANG M, et al. Role of endothelial Nox2 NADPH oxidase in angiotensin II-induced hypertension and vasomotor dysfunction[J]. Basic Res Cardiol, 2011, 106(4): 527-538.
- [8] NABEEBACCUS A, ZHANG M, SHAH A M. NADPH oxidases and cardiac remodeling[J]. Heart Fail Rev, 2011, 16(1): 5-12.
- [9] LEOPOLD J A, LOSCALZO J. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease[J]. Free Radic Biol Med, 2009, 47(12): 1673-1706.

DOI 10.3870/ydyb.2012.10.010