

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.21.001

细胞穿透肽 4 介导的 Cu/Zn SOD 对缺氧复氧损伤心肌细胞的影响*

王 宇, 李 清, 曾文静, 陈靖宜, 刘菊英[△]

(十堰市太和医院/湖北医药学院附属医院麻醉科, 湖北十堰 442000)

[摘要] **目的** 评价细胞穿透肽 4(又称为蛋白转导结构域 4, PTD4)介导的铜锌超氧化物歧化酶(Cu/Zn SOD)对大鼠心肌细胞缺氧复氧损伤(HRI)的影响。**方法** 用厌氧培养箱[85%氮气(N₂), 10%氢气(H₂), 5% CO₂]制作大鼠心肌细胞(H9c2)HRI模型, 设置 HRI 组(HRI 的细胞培养液中不加任何处理因素), HRI+Cu/Zn SOD 组(加入 10 μmol/L Cu/Zn SOD)、HRI+PTD4-Cu/Zn SOD 组(加入 10 μmol/L PTD4-Cu/Zn SOD), 另外以正常培养心肌细胞作为正常对照组, 孵育 30 min 后, 透射电镜观察心肌线粒体超微结构, JC-1 试剂盒检测线粒体膜电位, 末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)介导的 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)技术检测心肌细胞凋亡。**结果** PTD4-Cu/Zn SOD 组线粒体损伤程度较 HRI 组有明显改善。与正常对照组比较, HRI 组线粒体膜电位明显下降, PTD4-Cu/Zn SOD 组线粒体膜电位低于正常对照组, 但与 HRI 组比较明显恢复。HRI+PTD4-Cu/Zn SOD 组心肌细胞凋亡指数[(10.20±2.77)%]较 HRI 组[(28.40±2.41)%]明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** PTD4 介导的 Cu/Zn SOD 可以减轻大鼠心肌细胞的 HRI。

[关键词] 超氧化物歧化酶; 细胞穿透肽; 缺氧; 损伤; 心肌**[中图分类号]** R363**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)21-2881-03

Effects of Cu/Zn SOD mediated by cell penetrating peptide 4 on hypoxia/reoxygenation injury in myocardial cells*

Wang Yu, Li Qing, Zeng Wenjing, Chen Jingyi, Liu Juying[△]

(Department of Anesthesiology, Taihe Hospital/Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the effect of cell-penetrating peptide (protein transduction domain 4, PTD4) mediated copper-zinc superoxide dismutase (Cu/Zn SOD) on hypoxia/reoxygenation injury (HRI) in rat myocardial cells. **Methods** Rat myocardial cell H9c2 HRI model was prepared by using the anaerobic incubator (85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂). The HRI group (without adding any treating factor in HRI cell culture fluid), HRI+Cu/Zn SOD group (adding 10 μmol/L Cu/Zn SOD) and HRI+PTD4-Cu/Zn SOD group (10 μmol/L PTD4-Cu/Zn SOD) were set up. In addition, normally cultured myocardial cells served as the normal control group. After incubating for 30 min, the ultra microstructure of mitochondria was observed under transmission electron microscope. The mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 kit. The myocardial cell apoptosis was detected by TdT mediated dUTP nick end labeling TUNEL technique. **Results** The mitochondria injury degree after 30 min incubation in the PTD4-Cu/Zn SOD group was significantly improved compared with the HRI group. Compared with the normal control group, the mitochondrial membrane potential in the HRI group was significantly decreased, while the mitochondrial membrane potential in the PTD4-Cu/Zn SOD group was lower than that in the normal control group, but compared with the HRI group, which was obviously recovered. The cardiomyocyte apoptosis in the HRI+PTD4-Cu/Zn SOD group was (10.20±2.77)%, which was significantly decreased compared with (28.40±2.41)% in the HRI group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** PTD4 mediated Cu/Zn SOD can attenuate HRI in rat myocardial cells.

[Key words] superoxide dismutase; cell penetrating peptide; anoxia; injuries; myocardium

研究发现心肌缺血再灌注损伤的发病机制反映了复合通路的汇集, 包括氧自由基、离子通道、炎性反应和内皮功能障碍等, 其中再灌注后初始几分钟内氧自由基大量产生及钙超载最为显著^[1]。铜锌超氧化物歧化酶(Gu/Zn superoxide dismutase, Gu/Zn SOD)是一种特异性内源性自由基清除剂, 在清除机体氧自由基(ROS)的抗氧化反应过程中最早发挥作用^[2]。但是, 由于 Gu/Zn SOD 在哺乳动物细胞膜上没有专一受体或通道, 外源性的 Gu/Zn SOD 很难进入细胞和组织内发挥生物学作用。目前, 可采用细胞穿透肽 4(又称为蛋白转导结构域 4, PTD4)作为载体, 介导外源性 Gu/Zn SOD 进入细胞发挥作

用。前期研究表明, PTD4 可将 Gu/Zn SOD 导入大鼠心肌细胞, 且具有生物活性。本研究拟评价 PTD4 介导的 Cu/Zn SOD(PTD4-Cu/Zn SOD)对大鼠心肌细胞缺氧复氧损伤(HRI)的影响。

1 材料与方法**1.1 细胞来源** 大鼠心肌细胞 H9c2, 购自美国 ATCC 公司。**1.2 方法****1.2.1 PTD4-Cu/Zn SOD 的制备** 参考文献[3]制备融合蛋白 PTD4-Cu/Zn SOD。具体方法如下: 合成细胞穿透肽 PTD4 基因片段, 将其与具有相同酶切位点的载体质粒 PET16b 连接, 得到重组质粒 PET16b-PTD4。提取胚胎肝脏组织的总

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81171783)。 作者简介: 王宇(1982-), 主治医师, 硕士, 主要从事围术期器官保护方面的研究。

[△] 通信作者, E-mail: liu6119@163.com。

RNA,以其为模板用于 Cu/Zn SOD 全长 CDs 的反转录和扩增,将获得的 Cu/Zn SOD 全长 CDs 片段与线性化的载体质粒 PET16b-PTD4 进行重组,获得含有 Cu/Zn SOD 基因片段的重组质粒 pET16b-PTD4-Cu/Zn SOD(CDs)。将获得的 pET16b-PTD4-Cu/Zn SOD(CDs)原核表达载体导入感受态大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)中,进行扩增培养,收集菌体,将其裂解离心,镍离子(Ni^{2+})亲和层析柱层析,收集目的蛋白,定量后分别储存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内备用。

1.2.2 HRI 模型的构建 6孔板中的细胞在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中培养 24 h 后换液,细胞长满至 80% 后,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,再加入不含血清的低糖 DMEM,置入含 85% 氮气(N_2)、10% 氢气(H_2)、5% CO_2 的 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 饱和湿度厌氧培养箱,培养 4 h 后取出,完成缺氧。缺氧后,加入新鲜含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基,置入 CO_2 培养箱中继续培养 2 h,完成复氧。

1.2.3 细胞分组 将培养的细胞分为 4 组,正常对照组:正常培养的心肌细胞;HRI 组:在 HRI 的细胞培养液中不加任何处理因素;HRI+PTD4-Gu/Zn SOD 组:在 HRI 的细胞培养液中加入 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ PTD4-Gu/Zn SOD 融合蛋白;HRI+Gu/Zn SOD 组:在 HRI 的细胞培养液中加入 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ Gu/Zn SOD 融合蛋白,然后共同孵育 30 min。

1.2.4 心肌细胞线粒体膜电位检测 JC-1 是近年来发现的一种具有高度特异性,能快速灵敏地检测细胞线粒体膜电位的线粒体荧光探针^[4]。在线粒体膜电位较高时,JC-1 聚集在线粒体基质中,形成聚合物,产生红色荧光;在线粒体膜电位较低时,JC-1 不能聚集在线粒体基质中,此时 JC-1 为单体,产生绿色荧光,这样即可通过荧光颜色的转变来检测线粒体膜电位的变化。吸出每孔的培养液,PBS 洗涤细胞 1 次,再加入 1 mL 培养液。再加入 1 mL JC-1 染色工液,充分混匀, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min,吸去上清液,用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次(冰浴)。荧光显微镜下观察。

1.2.5 细胞凋亡检测 采用末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT)介导的 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)技术检测细胞凋亡,4% 多聚甲醛固定细胞 30~60 min,随后用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。加入含 0.2% TritonX-100 的 PBS,冰浴 5 min。PBS 洗涤 2 次,每次 5 min。滴加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 平衡缓冲液(Equilibration Buffer)于样品区域上,室温平衡 5~10 min。滴加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的 TdT 反应液于样品区域上,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 湿盒中孵育 60 min。样品放入 $20\times\text{SSC}$ 溶液的染色缸中终止反应,加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 链霉亲和素-辣根过氧化物酶(Streptavidin-HRP)室温孵育 30 min。室温显色 30 s 至 5 min,最后用蒸馏水冲洗终止显色。苏木精复染 30 s 至 1 min,脱水后封片。显微镜下观察,凋亡的细胞显

色为棕褐色。每份标本选取 400 倍视野 5 个,每个视野数 100 个心肌细胞,计数各视野阳性凋亡细胞数,各视野凋亡指数(AI)=各视野凋亡细胞数/100,每张片子的 AI 等于各视野 AI 的平均值(单个周围无明显炎症反应)。

1.2.6 心肌细胞及线粒体超微结构观察 使用细胞刮刮下细胞, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ PBS 离心漂洗后,贴壁加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2.5% 戊二醛,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置 3 d,透射电镜下观察心肌细胞及线粒体超微结构改变。

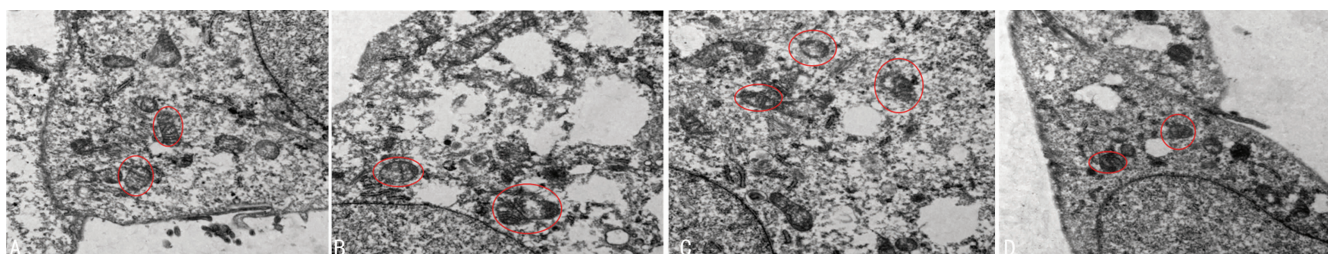
1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组心肌细胞超微结构观察 正常对照组:细胞结构形态正常,线粒体无肿胀,膜结构完整,嵴紧密整齐排列,细胞核染色质均匀。HRI 组:细胞结构不清晰,线粒体明显肿胀,膜结构模糊不清,部分发生断裂,嵴疏松溶解排列紊乱,有明显的空泡形成,细胞核染色质减少。HRI+Cu/Zn SOD 组:线粒体肿胀,膜结构模糊不清,嵴排列紊乱,部分断裂溶解,部分空泡形成,出现细胞核染色质边集。HRI+PTD4-Cu/Zn SOD 组:细胞形态基本正常,线粒体轻度肿胀,膜基本完整,线粒体嵴密集,部分溶解,没有明显空泡形成,胞核染色质均匀,边集少见。HRI+PTD4-Cu/Zn SOD 组线粒体损伤程度明显低于 HRI 组,HRI+Cu/Zn SOD 组线粒体损伤程度与 HRI 组相比无明显差别,见图 1。

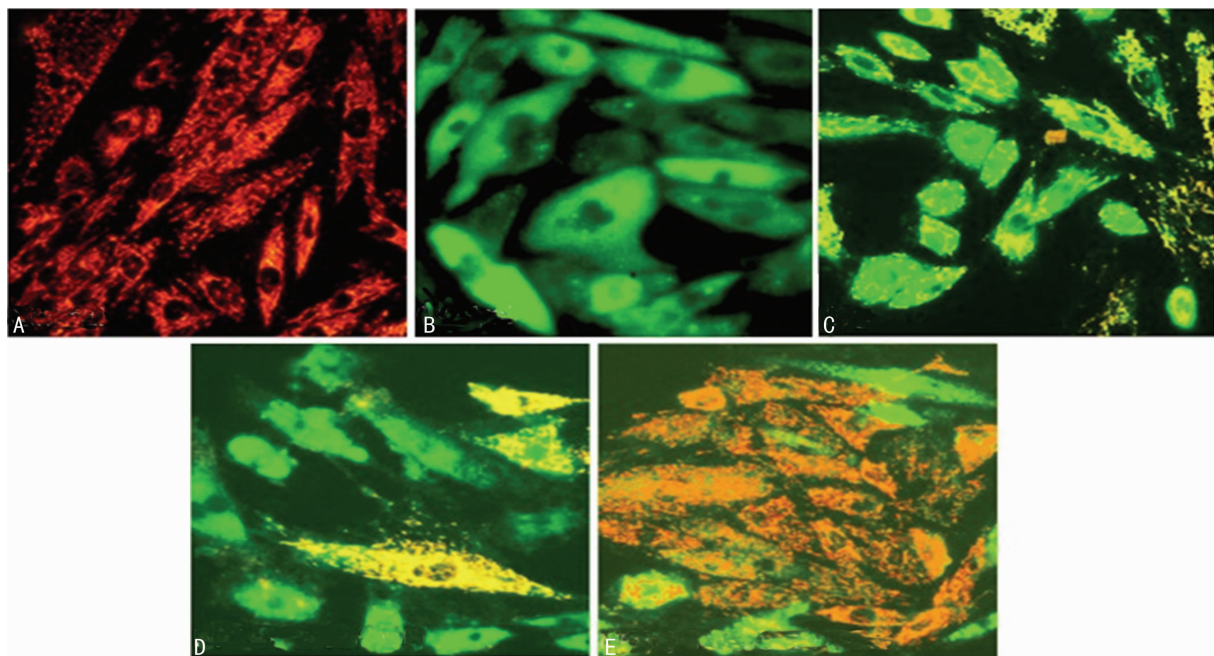
2.2 心肌细胞线粒体膜电位检测 正常心肌细胞呈现红色荧光,没有绿色荧光(没有线粒体膜电位下降),正常对照中细胞均呈现绿色荧光(线粒体膜电位下降明显)。与 HRI 组、HRI+Cu/Zn SOD 组相比,HRI+PTD4-Cu/Zn SOD 组红色荧光明显增强。HRI+Cu/Zn SOD 组与 HRI 组相比较,红色荧光增强不明显,见图 2。

2.3 各组心肌细胞凋亡情况 TUNEL 染色结果显示:与正常对照组相比,HRI 组心肌细胞可见大量棕褐色的凋亡细胞。HRI+Cu/Zn SOD 组与 HRI 组相比,心肌凋亡细胞没有明显减少。HRI+PTD4-Cu/Zn SOD 组棕褐色凋亡细胞较 HRI 组明显减少,见图 3。与正常对照组[(2.40 ± 1.14)%]比较,HRI 组[(28.40 ± 2.41)%],HRI+Cu/Zn SOD 组[(25.80 ± 2.17)%],HRI+PTD4-Cu/Zn SOD 组[(10.20 ± 2.77)%]的 AI 均明显升高,差异均有统计学意义($P<0.01$);HRI+Cu/Zn SOD 组与 HRI 组 AI 比较,差异无统计学意义($P>0.05$);HRI+PTD4-Cu/Zn SOD 组与 HRI 组、HRI+Cu/Zn SOD 组 AI 比较,差异均有统计学意义($P<0.01$)。



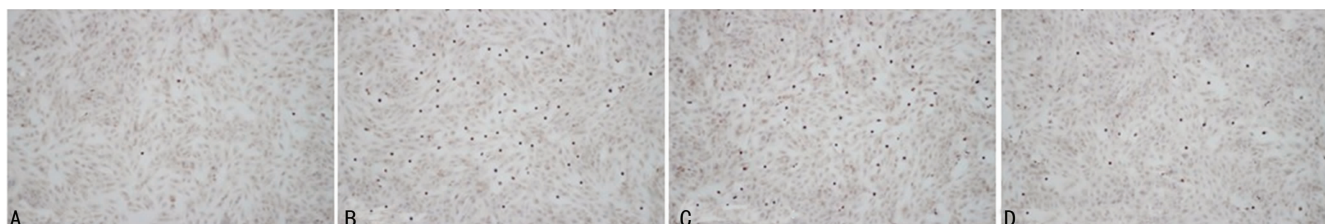
A: 正常对照组;B: HRI 组;C: HRI+Cu/Zn SOD 组;D: HRI+PTD4-Cu/Zn SOD

图 1 各组心肌细胞线粒体超微结构的观察($\times 4\ 000$)



A: 正常心肌细胞; B: 正常对照组; C: HRI 组; D: HRI+Cu/Zn SOD 组; E: HRI+PTD4-Cu/Zn SOD

图 2 各组心肌细胞线粒体膜电位的变化



A: 正常对照组; B: HRI 组; C: HRI+Cu/Zn SOD 组; D: HRI+PTD4-Cu/Zn SOD

图 3 TUNEL 法检测各组心肌细胞中细胞凋亡情况(×100)

3 讨论

50 年前已有学者描述心肌缺血再灌注损伤现象,通过不断深入的探索,对其潜在机制的理解也显著增加,主要包括 ROS 爆发式生成、钙离子(Ca²⁺)超载、内皮细胞功能障碍、炎症反应等,最终导致以心肌细胞凋亡为主要特征的不可逆损伤^[5]。心肌缺血再灌注后最初数分钟内 ROS 的爆发式生成被认为是心肌损伤的始动因素和重要机制。本研究利用 PTD4 携带缺乏内源性受体的自由基清除剂 Cu/Zn SOD,在再灌注损伤早期进入心肌细胞内,以期在 ROS 生成早期就大量清除,从而改善心肌细胞的再灌注损伤。

线粒体作为能量代谢的主要场所,与再灌注损伤各个环节密切相关,成为心肌细胞凋亡等损伤环节的重要保护靶点^[6]。线粒体的完整性对心肌细胞的存活至关重要,心肌 HRI 与线粒体形态变化相关,HRI 过程中线粒体趋向于分裂或片段化^[6]。本研究透射电镜观察发现,HRI 组细胞结构不清晰,线粒体明显肿胀,膜结构模糊不清,部分发生断裂,嵴疏松溶解排列紊乱,有明显的空泡形成,细胞核染色质减少。而 PTD4-Cu/Zn SOD 融合蛋白组细胞形态基本正常,线粒体轻度肿胀,膜基本完整,线粒体嵴密集,部分溶解,没有明显空泡形成,细胞核染色质均匀,边集少见。直观上可以观察到 PTD4-Cu/Zn SOD 融合蛋白,减轻了心肌细胞线粒体的 HRI。

当线粒体受损时,线粒体膜通透性增加,线粒体膜电位下降。因此,将线粒体膜电位改变作为判断线粒体膜通透性改变

的指标,线粒体膜电位下降则标志着线粒体受损及细胞凋亡的开始^[7]。ROS 可导致线粒体跨膜电位崩解,呼吸链解耦联,线粒体基质渗透压升高,内膜肿胀,最终可引起细胞的凋亡。在本实验中观察到,心肌细胞 HRI 引起线粒体膜电位的显著下降,而 PTD4-Cu/Zn SOD 融合蛋白的干预显著减轻线粒体膜电位的下降。在细胞凋亡的检测中,这一趋势得到进一步证实,PTD4-Cu/Zn SOD 融合蛋白处理明显减少了因 HRI 导致的心肌细胞凋亡数目。证实 PTD4-Cu/Zn SOD 融合蛋白能够有效地抑制线粒体膜电位的降低,从而减少 HRI 引起的心肌细胞凋亡。

本研究依赖于生物信息学蛋白结构和跨膜蛋白结构的原理,设计合成具有高效穿膜活性的 PTD 穿透肽结构和融合表达的 Cu/Zn SOD^[8],且经过实验显示出良好的穿膜特性。研究表明,PTD4-Cu/Zn SOD 融合蛋白转导后进入 HRI 大鼠 H9C2 心肌细胞内,减轻了线粒体的形态和结构的损伤,抑制了线粒体膜电位的降低,最终减少了心肌细胞的凋亡。

综上所述,细胞穿透肽 PTD4 介导的 Cu/Zn SOD 可以减轻大鼠心肌细胞 HRI。

参考文献

[1] Talukder MA, Zweier JL, Periasamy M. Targeting calcium transport in ischaemic heart disease[J]. Cardiovasc Res, 2009, 84(3): 345-352. (下转第 2888 页)

参考文献

- [1] Peng B, Wu W, Li Z, et al. Chemical radiculitis[J]. Pain, 2007, 127(1/2): 11-16.
- [2] Schilling LS, Markman JD. Corticosteroids for pain of spinal origin: epidural and intraarticular administration[J]. Rheum Dis Clin North Am, 2016, 42(1): 137-155.
- [3] 高元朝, 赵志斌, 支满霞, 等. 脉络宁注射液与激素对脊神经根炎所致脊髓损伤保护作用的比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(21): 187-192.
- [4] Shi Y, Zong M, Xu XQ, et al. Diffusion tensor imaging with quantitative evaluation and fiber tractography of lumbar nerve roots in sciatica[J]. Eur J Radiol, 2015, 84(4): 690-695.
- [5] 张劲军, 魏明, 赖英荣, 等. 非压迫性髓核导致大鼠背根神经节的病理变化[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2009, 35(5): 280-284.
- [6] Dallaudiere B, Lincot J, Hess A, et al. Clinical relevance of diffusion tensor imaging parameters in lumbar discoradicular conflict[J]. Diagn Interv Imaging, 2014, 95(1): 63-68.
- [7] Zhang JJ, Song W, Luo WY, et al. Autologous nucleus pulposus transplantation to lumbar 5 dorsal root ganglion after epineurium dissection in rats; a modified model of non-compressive lumbar herniated intervertebral disc[J]. Chin Med J(Engl), 2011, 124(13): 2009-2014.
- [8] Aoki Y, Nakajima A, Ohtori S, et al. Increase of nerve growth factor levels in the human herniated intervertebral disc: can annular rupture trigger discogenic back pain? [J]. Arthritis Res Ther, 2014, 16(4): R159.
- [9] Handa J, Sekiguchi M, Krupkova O, et al. The effect of serotonin-noradrenaline reuptake inhibitor duloxetine on the intervertebral disk-related radiculopathy in rats[J]. Eur Spine J, 2016, 25(3): 877-887.
- [10] Mulleman D, Mammou S, Griffoul I, et al. Pathophysiology of disk-related sciatica. I - Evidence supporting a chemical component[J]. Joint Bone Spine, 2006, 73(2): 151-158.
- [11] Li B, Xu XX, Du Y, et al. CT-Guided chemonucleolysis combined with psoas compartment block in lumbar disc herniation: a randomized controlled study[J]. Pain Med, 2014, 15(9): 1470-1476.
- [12] 马丽虹, 李可建. 系统评价脉络宁注射液治疗缺血性脑卒中急性期的临床疗效[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(22): 6258-6260.
- [13] 刘宏斌, 陈丽莉, 孙兴元, 等. 脉络宁注射液治疗不同中医证型急性缺血性脑血管病[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14): 298-300.
- [14] 杨丽丽, 支满霞. 脉络宁复合液治疗膝关节骨性关节炎疗效观察[J]. 中国疼痛医学杂志, 2013, 19(9): 527-529.
- [15] 陈斌, 蔡巍, 刘芳, 等. 脉络宁注射液的化学成分研究(I)[J]. 中南药学, 2016, 14(3): 239-242.
- [16] 王丽, 吴红星, 徐素琴. 脉络宁联合丁苯酞对急性脑梗死患者血清 Chemerin, TNF- α 的影响[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(22): 3886-3888.
- [17] Chuanting L, Qingzheng W, Wenfeng X, et al. 3.0T MRI tractography of lumbar nerve roots in disc herniation[J]. Acta Radiol, 2014, 55(8): 969-975.
- [18] Takagi T, Nakamura M, Yamada M, et al. Visualization of peripheral nerve degeneration and regeneration: Monitoring with diffusion tensor tractography[J]. Neuroimage, 2009, 44(3): 884-892.
- [19] Morisaki S, Kawai Y, Umeda M, et al. In vivo assessment of peripheral nerve regeneration by diffusion tensor imaging[J]. J Magn Reson Imaging, 2011, 33(3): 535-542.
- [20] Sakai T, Miyagi R, Yamabe E, et al. Diffusion-weighted imaging and diffusion tensor imaging of asymptomatic lumbar disc herniation[J]. J Med Invest, 2014, 61(1/2): 197-203.
- (收稿日期: 2017-02-09 修回日期: 2017-04-14)
- (上接第 2883 页)
- [2] Reddi AR, Jensen LT, Naranuntarat A, et al. The overlapping roles of manganese and Cu/Zn SOD in oxidative stress protection[J]. Free Radic Biol Med, 2009, 46(2): 154-162.
- [3] Liu J, Hou J, Xia ZY, et al. Recombinant PTD-Cu/Zn SOD attenuates hypoxia-reoxygenation injury in cardiomyocytes[J]. Free Radic Res, 2013, 47(5): 386-393.
- [4] 安冉, 董强. 凋亡过程中线粒体膜通透化的常用检测方法[J/CD]. 中华脑血管病杂志(电子版), 2009, 3(1): 33-37.
- [5] 杨一萍, 骆媛, 范礼斌, 等. 线粒体在心肌缺血再灌注损伤中的作用研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(4): 577-580.
- [6] 李雪丽, 刘建勋. 线粒体与心肌缺血/再灌注损伤[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(12): 1633-1635.
- [7] Perry SW, Norman JP, Barbieri J, et al. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide[J]. Biotechniques, 2011, 50(2): 98-115.
- [8] 刘莲, 余榕捷, 戴云, 等. 重组蛋白 PTD-HSP27 的制备及其穿细胞膜和角膜组织的功能研究[J]. 中国病理生理学杂志, 2015, 31(1): 135-140.
- (收稿日期: 2017-02-03 修回日期: 2017-04-08)