

· 基础研究 ·

Jagged1 蛋白对乳鼠心肌细胞缺氧复氧损伤的作用

杨 阳,段维勋,梁振兴,王 宁,姜 鹏,金振晓,易定华

[摘要]:目的 研究 Jagged1 蛋白(Ja1)对乳鼠心肌细胞缺氧复氧损伤(SI/RI)的作用,为探明 Notch 信号通路在心肌缺血再灌注损伤(I/RI)中的作用提供理论依据。**方法** 实验分为 5 组,分别为正常对照组、SI/RI 组、缺氧复氧 + 不同浓度 Ja1 组(5、10、20 μ M),四氮唑盐比色(MTT)法测定各组细胞存活率;缺口末端标记(TUNEL)法测定各组细胞凋亡率;专用试剂盒检测培养液中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量。**结果** 与对照组相比,SI/RI 组细胞活力明显下降($P < 0.01$),凋亡率明显上升($P < 0.01$),同时期培养液中 SOD 水平明显降低($P < 0.01$),MDA 水平显著升高($P < 0.01$);不同浓度 Ja1 可以使上述指标明显改善($P < 0.01$),并呈浓度依赖性。**结论** Ja1 蛋白对 SI/RI 造成的心肌细胞损伤具有保护作用,作用机制与增强细胞抗凋亡、抗氧化以及减轻脂质过氧化物导致的细胞膜损伤有关,Notch 信号通路可能在心肌缺血再灌注损伤中发挥重要的调控作用。

[关键词]: Jagged1 蛋白;新生大鼠心肌细胞;缺血再灌注损伤模型;心肌保护

[中图分类号]:R654.1 **[文献标识码]:** A **[文章编号]:**1672-1403(2012)04-0235-04

Effects of Jagged1 protein on neonatal rat cardiomyocytes induced by simulated ischemia reperfusion injury

Yang Yang, Duan Wei-xun, Liang Zhen-xing, Wang Ning, Jiang Peng, Jin Zhen-xiao, Yi Ding-hua
Department of Cardiovascular Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Shaanxi Xi'an 710032, China

[Abstract]: Objective To investigate the effects of Jagged1 protein (Ja1) on neonatal rat cardiomyocytes induced by simulated ischemia reperfusion injury (SI/RI), and to explore the role of Notch signaling pathway in myocardial ischemia reperfusion injury (I/RI). **Methods** The cardiomyocytes were divided into 5 groups: Control, SI/RI, SI/RI + Ja1 (5, 10, 20 μ M). MTT method used to determine the survival rate of cells; TUNEL used to detect the apoptotic rate of cells; The special kits were used to detect the levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in the culture medium. **Results** Comparing with the Control group, the cell survival rate in the SI/RI group decreased significantly, and the apoptotic rate increased significantly, while the SOD level in the culture medium decreased significantly, and the MDA level increased significantly. The above parameters of cells were improved significantly when treated by Ja1 on concentration-dependent manner. **Conclusion** Jagged1 protein has the protective effect on the neonatal rat cardiomyocytes induced by SI/RI, this special mechanisms includes: anti-oxidation, anti-apoptosis, and alleviate the cell membrane damage induced by lipid peroxides. Notch signaling pathway may play a vital regulatory role in the myocardial reperfusion injury.

[Key words]: Jagged1 protein; Neonatal rat cardiomyocytes; Simulated ischemia reperfusion injury; Myocardial protection

心肌缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, I/RI)是缺血性心肌病和体外循环心脏手术过程中十分常见的病症,其病理机制复杂,有很多信号通路和细胞因子参与其中^[1-2]。Notch 信号通路在心血管系统的发生、发育、病理和生理过程中发挥着重要作用^[3]。研究提示 Notch 信号通路可能在心肌梗死后心肌保护中发挥调控作用^[4-5],但其在心肌

急性 I/RI 中的研究尚无报道。Jagged1 蛋白(Ja1)是 Notch 信号通路重要的配体,研究显示 Ja1 可以有有效的激活 Notch 信号通路^[6]。有研究指出细胞凋亡和氧化应激损伤是 I/RI 的重要的病理特征^[7-8]。因此,目前抗心肌 I/RI 药物治疗多集中在增强细胞抗凋亡、抗氧化、减轻自由基和脂质过氧化物导致的细胞膜损伤等方面^[9]。本研究将以 SD 大鼠乳鼠心肌细胞作为研究对象,观察不同浓度 Ja1 对心肌细胞缺氧复氧损伤(simulated ischemia reperfusion injury, SI/RI)的作用,为探明 Notch 信号通路在心肌 I/RI 中的作用提供理论依据。

作者单位: 710032 西安,第四军医大学西京医院心血管外科(杨 阳、段维勋、梁振兴、王 宁、金振晓、易定华);223100 淮安,中国人民解放军第 82 医院骨科(姜 鹏)

1 材料和方法

1.1 研究对象 新生 Sprague - Dawley 大鼠,雌雄不拘,1~2 d,由第四军医大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂和仪器 Ja1 (R&D 公司,美国),胶原酶 I (Sigma 公司美国),二甲基亚砜(Sigma 公司,美国),DMEM 培养基(Gibco 公司,美国),胰蛋白酶(Gibco 公司,美国),胎牛血清(Gibco 公司,美国),SOD 和 MDA 检测试剂盒(南京建成公司,中国),脱氧葡萄糖(Alpha 公司,美国),亚硫酸钠(Sigma 公司,美国),乳酸钠(Sigma 公司,美国),TUNEL 凋亡检测试剂盒(Roche 公司,美国)。

细胞培养箱(Thermo 公司,美国),倒置荧光显微镜(OLYMPUS 公司,日本),酶标仪(Biotek 公司,美国),低速离心机(Beckman Coulter 公司,美国),超净无菌工作台(富康生物技术公司,中国)。

1.3 乳鼠原代心肌细胞的培养及实验分组 根据文献所述^[10],出生 1~2 d 的 SD 大鼠,75%酒精消毒两次,在超净台内无菌条件下迅速取下心脏,在无血清 DMEM 培养基中剪碎。用含胶原酶 I 的 HEPES 液 (mmol/L: MgSO₄ 0.8、NaCl 116.0、KCl 5.4、NaH₂PO₄ 10.0、Glucose 5.1、HEPES 20.0, pH 7.3) 重复消化 3 次,每次 3 min。细胞悬液置于含 10% 血清的 DMEM 培养液中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。用含血清培养基(DMEM 培养基,10% 新生牛血清,青霉素 100 U/ml,链霉素 100 U/ml)重悬细胞,用差数贴壁分离法将细胞置于培养箱中孵育 1~1.5 h,纯化心肌细胞。将未贴壁细胞经 200 目筛网过滤,去除未消化组织块。轻轻收集细胞悬液,进行细胞计数,加入 0.01 mmol/L 的 5-溴脱氧尿苷(5-BrdU),接种至 96 孔或 24 孔培养板,接种密度为 5 × 10⁵ 个细胞/孔。细胞于 37℃,5% CO₂,91% 湿度环境培养,每 24 h 换 1 次液,培养 3~4 d 后使用。缺氧复氧模型采用文献所述方法^[11],实验时换高浓度氮气饱和的缺氧液 (mmol/L: NaCl 137, KCl 12, MgCl₂ 0.49, CaCl₂ · 2H₂O 0.9, HEPES 4, 脱氧葡萄糖 10, 亚硫酸钠 0.75, 乳酸钠 20, pH 6.5), 培养板置于 95% N₂ 和 5% CO₂, 持续通气的缺氧密闭容器中(37℃)2 h,再更换先用纯氧饱和的复氧液,以 95% O₂ 和 5% CO₂ 复氧孵育 4 h。实验分为 5 组:正常对照组(Control);缺氧复氧组(SI/RI);浓度分别为 5 μmol/L、10 μmol/L 和 20 μmol/L 的 Ja1 + SI/RI 组(缺氧前用不同浓度 Ja1 孵育 2 h)。

1.4 MTT 法检测 根据文献所述^[12],各组心肌细胞处理完后,弃去培养液,加入 DMEM 培养液(100

μl)和含 0.5% MTT 的培养液(10 μl),37℃、5% CO₂ 培养箱内孵育 4 h 后,弃培养液,加入 100 μl 的 DM-SO 原液,振荡 10 min,待结晶完全溶解后拍照,同时用酶标仪于 490 nm 波长处测定吸光值(OD 值),实验重复 3 次。

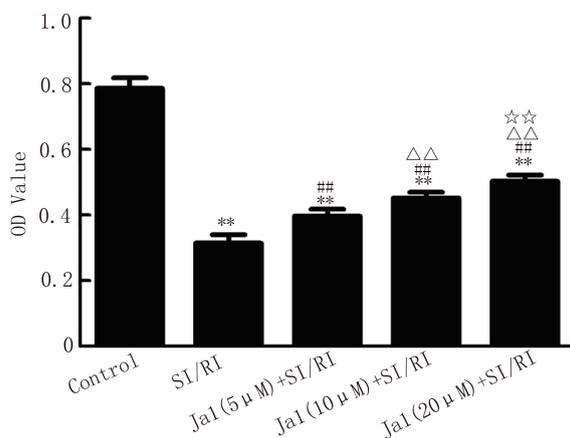
1.5 TUNEL 法检测 制作各组心肌细胞爬片,处理结束后用 40 g/L 多聚甲醛固定 15 min。PBS 洗涤 3 min 1 次,滴加 0.1% 的 Triton X-100 穿孔 3 min,再 PBS 洗涤 3 min 3 次。严格按照试剂盒说明书操作,最后用 50% 石蜡封片后荧光显微镜下观察,其中凋亡细胞为绿色荧光,细胞核为蓝色荧光,随意选取 10 个视野计数。凋亡率为:凋亡细胞数/总细胞数 × 100%。

1.6 细胞培养液中 SOD 和 MDA 检测 各组细胞处理结束后留取细胞培养液,-20℃保存。严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.7 统计分析方法 数据用 SPSS 12.0 软件进行分析,检测结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用 *t* 检验,*P* < 0.05 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞活力检测结果 与对照组相比,SI/RI 组细胞存活率显著下降 (*P* < 0.01),而 Ja1 各浓度干预组细胞存活率较 SI/RI 组明显上升 (*P* < 0.01),并呈浓度依赖性,见图 1。



注 与 Control 比较 ***P* < 0.01;

与 SI/R 组比较 ###*P* < 0.01;

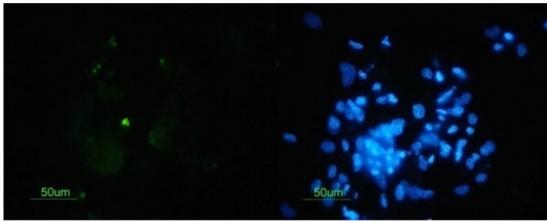
与 Ja1 (5 μmol/L) + SI/RI 组比较 △△*P* < 0.01;

与 Ja1 (10 μmol/L) + SI/RI 组比较 ☆☆*P* < 0.01。

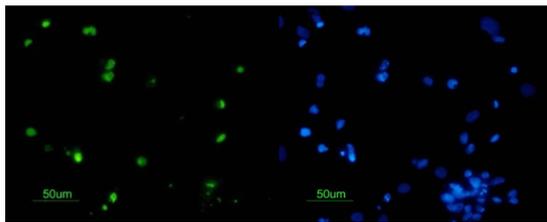
图 1 MTT 法检测 Ja1 对心肌细胞 SI/RI 损伤后活力的影响

2.2 各组细胞凋亡率检测结果 与对照组相比, SI/RI 组细胞凋亡率显著上升 ($P < 0.01$), 而 Ja1 各浓度干预组细胞凋亡率较 SI/RI 组明显下降 ($P < 0.01$), 并呈浓度依赖性, 见图 2。

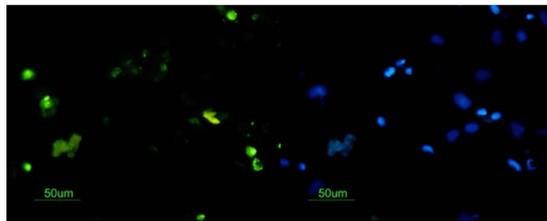
2.3 各组细胞 SOD 和 MDA 检测结果 与对照组相比, SI/RI 组细胞培养液中 SOD 水平明显降低 ($P < 0.01$), MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$); 不同浓度 Ja1 可以使上述指标明显改善 ($P < 0.01$), 并呈浓度依赖性, 见图 3。



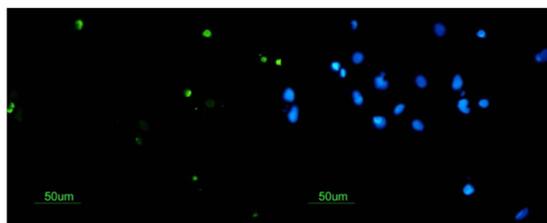
Control组



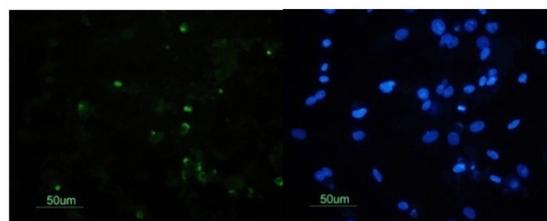
SI/RI组



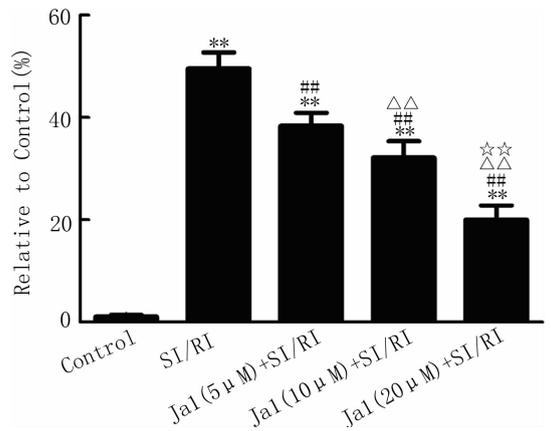
Ja1 (5 μM) + SI/RI组



Ja1 (10 μM) + SI/RI组

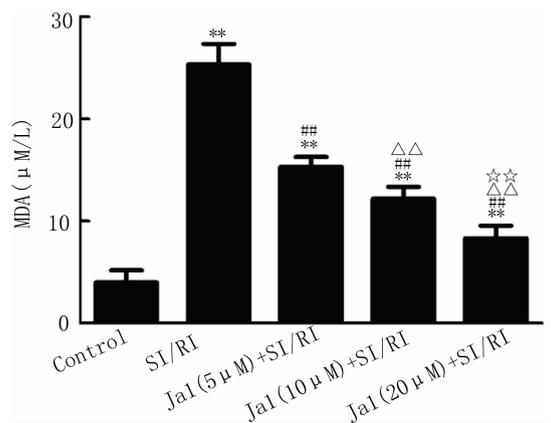
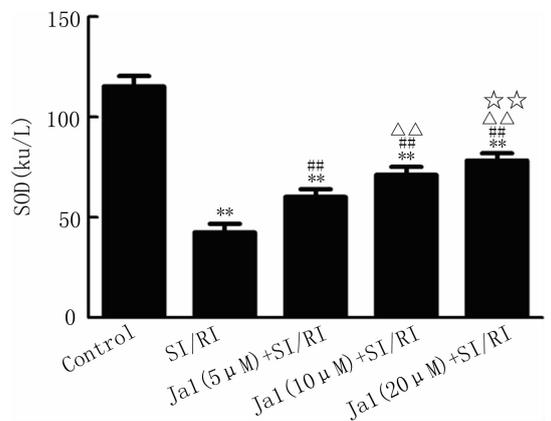


Ja1 (20 μM) + SI/RI组



注 与 Control 比较** $P < 0.01$;
与 SI/R 组比较### $P < 0.01$;
与 Ja1 (5 μmol/L) + SI/RI 组比较△△ $P < 0.01$;
与 Ja1 (10 μmol/L) + SI/RI 组比较☆☆ $P < 0.01$ 。

图 2 TUNEL 法检测 Ja1 对心肌细胞 SI/RI 损伤后凋亡的影响



注 与 Control 比较** $P < 0.01$;
与 SI/R 组比较### $P < 0.01$;
与 Ja1 (5 μmol/L) + SI/RI 组比较△△ $P < 0.01$;
与 Ja1 (10 μmol/L) + SI/RI 组比较☆☆ $P < 0.01$ 。

图 3 Ja1 对心肌细胞 SI/RI 损伤培养液中 SOD 和 MDA 的影响

3 讨 论

缺血性心脏病 (ischemic heart disease, IHD) 是危害人类健康的第一杀手,我国现有患者超过 2 000 万人,且每年新增 100 万人左右,其治疗的核心就是重新恢复心肌血液供应,但缺血心肌组织重新恢复血液供应(再灌注)后常继发和加重心肌组织损伤,即心肌 I/RI^[1],常导致患者死亡、预后不良、严重并发症发生,是 IHD 临床治疗效果不佳的主要原因之一。心肌 I/RI 的病理机制复杂,有很多信号通路和细胞因子参与其中^[1-2]。研究提示 Notch 信号通路可能在心肌梗死后心肌保护中发挥调控作用^[4-5],而 Notch 信号通路在心肌急性 I/RI 中的研究尚无报道。Notch 信号通路有 5 种配体,包括 Ja1、Jagged2、Delta1、Delta3、Delta4,其中 Ja1 是 Notch 信号通路重要的配体,研究显示 Ja1 可以有效的激活 Notch 信号通路^[6]。

SOD 是生物体内清除活性氧自由基的重要酶类,也是自然界惟一的以氧自由基为底物的酶,SOD 活力的高低可以间接反应机体清除氧自由基的能力^[13]。MDA 是脂质过氧化的终产物,为研究抗氧化功能的常用检测指标之一^[14]。正常情况下,机体通过抗氧化系统的正常工作,体内氧自由基和脂质过氧化物的产生与清除保持动态平衡^[15]。心肌 I/RI 发生后,体内异常代谢过程中产生的氧自由基通过攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸而引发脂质过氧化作用,产生一系列反应,导致生物膜损伤而引发细胞组织的病理改变^[16]。

本研究结果显示:Ja1 可以有效对抗心肌细胞 SI/RI,减少细胞凋亡率,增加 SOD 水平同时降低 MDA 水平,且其保护效果呈浓度依赖性(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)。由此,我们分析 Ja1 的作用机制与增强细胞抗凋亡、抗氧化能力以及减轻脂质过氧化物导致的细胞膜损伤有关。本研究为 Notch 信号通路参与调控心肌 I/RI 过程提供了理论依据,有利于寻找全新药物作用靶点对心肌 I/RI 的主要作用环节进行干预,对于获得全新的心肌保护方法提供了新的思路。

参考文献:

[1] Botker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, *et al.* Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage inpatients with acute myocardial infarction: a randomised trial [J]. *Lancet*, 2010, 375(9716):727-734.

[2] Kleinbongard P, Schulz R, Heusch G. TNF α in myocardial ischemia/reperfusion, remodeling and heart failure [J]. *Heart*

Fail Rev, 2011, 16(1):49-69.

[3] Nemir M, Pedrazzini T. Functional role of Notch signaling in the developing and postnatal heart [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 45(4):495-504.

[4] Gude NA, Emmanuel G, Wu W, *et al.* Activation of Notch - Mediated Protective Signaling in the Myocardium [J]. *Circ Res*, 2008, 102(9):1025-1035.

[5] Oie E, Sandberg WJ, Ahmed MS, *et al.* Activation of Notch signaling in cardiomyocytes during post - infarction remodeling [J]. *Scand Cardiovasc J*. 2010, 44(6):359-366.

[6] Xia Y, Bhattacharyya A, Roszell EE, *et al.* The role of endothelial cell - bound Jagged1 in Notch3 - induced human coronary artery smooth muscle cell differentiation [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(8):2462-2472.

[7] Lv L, Jiang SS, Xu J, *et al.* Protective effect of ligustrazine against myocardial ischaemia reperfusion in rats: the role of endothelial nitric oxide synthase [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39(1):20-27.

[8] Rashikh A, Ahmad SJ, Pillai KK, *et al.* Aliskiren attenuates myocardial apoptosis and oxidative stress in chronic murine model of cardiomyopathy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2012, 66(2):138-143.

[9] Shaheen M, Cheema Y, Shahbaz AU, *et al.* Intracellular calcium overloading and oxidative stress in cardiomyocyte necrosis via a mitochondriocentric signal - transducer - effector pathway [J]. *Exp Clin Cardiol*, 2011, 16(4):109-115.

[10] 杨阳,段维勋,周京军,等. γ - 分泌酶抑制剂对正常乳鼠心肌细胞的影响 [J]. *中国体外循环杂志*, 2011, 9(2):89-92.

[11] Esumi K, Nishida M, Shaw D, *et al.* NADH measurements in adult rat myocytes during simulated ischemia [J]. *Am J Physiol*, 1991, 260(6 Pt 2):1743-1752.

[12] 杨阳,段维勋,金振晓,等. 姜黄素对血管内皮细胞过氧化氢损伤的保护作用及其机制研究 [J]. *中国体外循环杂志*, 2011, 9(4):239-242.

[13] Yang J, Li J, Lu J, *et al.* Synergistic protective effect of astragaloside IV - tetramethylpyrazine against cerebral ischemic - reperfusion injury induced by transient focal ischemia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 140(1):64-72.

[14] He L, Liu B, Dai Z, *et al.* Alpha lipoic acid protects heart against myocardial ischemia - reperfusion injury through a mechanism involving aldehyde dehydrogenase 2 activation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 678(1-3):32-38.

[15] Horstkotte J, Perisic T, Schneider M, *et al.* Mitochondrial thioredoxin reductase is essential for early postischemic myocardial protection [J]. *Circulation*, 2011, 124(25):2892-2902.

[16] Raedschelders K, Ansley DM, Chen DD. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion [J]. *Pharmacol Ther*, 2012, 133(2):230-255.

(收稿日期:2012-04-10)

(修订日期:2012-06-04)