

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.08.016

论著 · 实验研究

UCP2 基因 siRNA 转染对脓毒症血清诱导 心肌细胞炎症反应的影响

陈志江¹ 宋远斌¹ 王惠丽² 王阳¹ 吕娟娟¹ 车顿¹ 曾其毅¹

(1. 南方医科大学珠江医院儿科中心, 广东 广州 510280;
2. 广东省妇幼保健院检验科, 广东 广州 510010)

[摘要] **目的** 研究解偶联蛋白 2 基因 (uncoupling protein 2, UCP2) siRNA 干扰大鼠 H9C2 心肌细胞株后对脓毒症血清诱导炎症反应的影响, 探讨 UCP2 在脓毒症心肌病可能的机制。**方法** 制备正常大鼠血清和脓毒症大鼠血清。体外培养大鼠心肌细胞株 (H9C2), 随机分为空白对照组、正常大鼠血清、10% 脓毒症大鼠血清刺激 12 h 组 (脓毒症血清组)、UCP2-siRNA 干扰 +10% 脓毒症大鼠血清刺激 12 h 组 (UCP2-siRNA+ 脓毒症血清组)、阴性 siRNA 转染 +10% 脓毒症大鼠血清刺激 12 h 组 (阴性 siRNA+ 脓毒症血清组)。RT-PCR 检测各组 TNF- α mRNA, IL-1 β mRNA 表达; 免疫印迹法检测磷酸化 p38MAPK (p-p38MAPK) 表达和核转录因子 (NF- κ B) 的表达。**结果** UCP2-siRNA+ 脓毒症血清组 p-p38、NF- κ B 表达量均较脓毒症血清组明显增高 ($P < 0.05$); UCP2-siRNA+ 脓毒症血清组 TNF- α mRNA 表达量与脓毒症血清组相比明显增加 ($P < 0.01$), IL-1 β mRNA 表达量与脓毒症血清组比较差异无统计学意义。**结论** UCP2 参与脓毒症血清诱导的 H9C2 心肌细胞 p38MAPK 活性和 NF- κ B 与下游炎症介质的表达调控。 [中国当代儿科杂志, 2014, 16(8): 851-855]

[关键词] 解偶联蛋白 2; 炎症; 心肌细胞

Effect of UCP2-siRNA on inflammatory response of cardiomyocytes induced by septic serum

CHEN Zhi-Jiang, SONG Yuan-Bin, WANG Hui-Li, WANG Yang, LV Juan-Juan, CHE Di, ZENG Qi-Yi. Pediatric Center of Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China (Zeng Q-Y, Email: zqy_88@163.com)

Abstract: Objective To study the effect of uncoupling protein 2 (UCP2)-siRNA on the inflammatory response of rat cardiomyocytes (H9C2) induced by septic serum and to investigate the possible role of UCP2 in the development of septic cardiomyopathy. **Methods** Serum samples were separately collected from normal rats and septic rats. Cultured rat cardiac cells (H9C2) were randomly divided into blank control, normal serum, 10% septic serum, UCP2-siRNA+10% septic serum and negative siRNA+10% septic serum groups. Stimulation with 10% septic serum was performed for 12 hours in relevant groups. The mRNA expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 beta (IL-1 β) was measured by RT-PCR. The expression of phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38 MAPK) and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) was measured by Western blot. **Results** The expression levels of p-p38 and NF- κ B in the UCP2-siRNA+10% septic serum group were significantly higher than in the 10% septic serum group ($P < 0.05$). The UCP2-siRNA+10% septic serum group had a significantly higher TNF- α mRNA expression than the 10% septic serum group ($P < 0.01$), but IL-1 β mRNA expression showed no significant difference between the two groups. **Conclusions** UCP2 plays a regulatory role in the activation of p38 MAPK and NF- κ B and the expression of downstream inflammatory mediators in H9C2 cells stimulated with septic serum. [Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(8): 851-855]

Key words: Uncoupling protein 2; Inflammation; Cardiomyocyte

[收稿日期] 2013-12-17; [接受日期] 2014-04-18

[基金项目] 2012 国家自然科学基金项目 (81272070); 广东省科技计划项目 (2010B031600238); 广州市医药卫生科技重大项目 (201102A211007); 南方医科大学科研启动计划青年科技人员培育启动计划 (B1012039)。

[作者简介] 陈志江, 男, 住院医师。

[通信作者] 曾其毅, 男, 主任医师。

解偶联蛋白2 (uncoupling protein 2, UCP2) 是存在于线粒体内膜的质子转运体, 广泛表达于各种器官组织中, 包括脾、肺、肠、脑、心肌、胰岛细胞和白色脂肪组织^[1]。UCP2在限制线粒体活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生和能量生成调控方面具有关键作用。UCP2可参与各种病理生理过程, 包括胰岛素的分泌、肥胖、糖尿病或神经细胞的活动及缺血再灌注损伤等^[2]。最新研究发现UCP2可以通过介导ROS的产生参与细胞内炎症反应的调控^[3]。炎症损伤是脓毒症心肌损伤的重要病理生理机制, 目前对于UCP2在脓毒症心肌病的具体作用机制国内还尚未有报道, 为了探索UCP2参与脓毒症心肌病的可能发病机制, 本研究拟运用脓毒症大鼠血清诱导刺激大鼠心肌细胞株H9C2细胞建立脓毒症心肌损伤体外模型, 通过RNA干扰技术影响UCP2基因的表达, 探讨UCP2对脓毒症心肌损伤MAPK、NF- κ B炎症通路以及炎症因子TNF- α 、IL-1 β 的影响。

1 材料与方法

1.1 动物与材料

健康成年清洁级 (SPF) 雄性 Sprague-Dawley 大鼠 30 只 (广东省医学实验动物中心提供), 体重 250~300 g; 大肠埃希菌脂多糖 (LPS, Escherichiacoli0111: 134, 美国 Sigma 公司); UCP2 多克隆羊抗体, β -actin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc); 磷酸化 p38MAPK (p-p38MAPK) 和核转录因子 (NF- κ B) 抗体 (购于 Cell Signaling Technology, Inc.); Trizol, PrimeScriptTM RT reagent Kit, SYBR[®] Premix Ex TaqTM (大连宝生生物公司); ABI 7500 荧光定量 PCR 仪、ABI9700PCR 仪 (美国应用生物公司); 阳离子脂质体 hilymax (同仁化学公司)。根据 GenBank 的 UCP2 基因序列 (NM_019354.2), 由广州锐博公司设计并合成 3 对 siRNA 并设计阴性对照 siRNA。UCP2-siRNA1 上游 GCACUGUCGAAGCCUACAAAdTdT, 下游 dTdTTCGUGACAGCUUCGGAUGUU; UCP2-siRNA2 上游 CCUCAUGACAGACGACCUCdTdT, 下游 dTdT GGAGUACUGUCUGCUGGAG; UCP2-siRNA3 上游 CCUGGAACGUAGUAAUGUUdTdT, 下游 dTdT GGACCUUGCAUCAUUAACAA。

UCP2、 β -actin、TNF- α 、IL-1 β 引物由上海英伟捷基公司设计并合成。UCP2 引物序列: 上游 ACCATTGCACGAGAGGAAGG, 下游 TCTTGACCACATCAACGGGG; β -actin 引物序列: 上游 GCAGGAGTACGATGAGTCCG, 下游 ACGCAGCTCAGTAACAGT; TNF- α 引物序列: 上游 AACACACGAGACGCTGAAGT, 下游 TCCAGTGAGTTCCGAAAGCC; IL-1 β 引物序列: 上游 CCTGTCTCGAGAATGGGCAGT, 下游 TTCTGTCTCGACAATGCTGCCT。

1.2 脓毒症大鼠和正常大鼠血清制备

实验前大鼠禁食 12 h, 自由饮水。脓毒症大鼠血清制备参照文献方法^[4], 内毒素 (大肠埃希菌脂多糖, LPS) 10 mg/kg 腹腔注射, 6 h 后无菌心脏穿刺采血, 4 $^{\circ}$ C 静置 30 min, 800 r/min 离心后生物安全柜内收集上清液。-80 $^{\circ}$ C 保存待用。正常大鼠血清取自不经任何干预大鼠, 方法同上。

1.3 细胞培养转染

H9C2 细胞由南方医科大学珠江医院心内科保存, 转染前 1 d 将大约 4×10^5 个细胞接种于 6 孔板中, 当细胞覆盖达 60%~80% 时采用阳离子脂质体分别转染 siRNA。转染方法参照 hilymax 说明书, 转染后 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养, 4~6 h 后换含血清培养液继续培养, 先从由锐博公司合成的 siRNA1、siRNA2、siRNA3 序列筛选出有效干扰序列, 转染后进行后续实验。

1.4 细胞分组及处理

体外培养大鼠心肌细胞株 (H9C2) 随机分为 5 组: 空白对照组、正常血清组、10% 脓毒症血清刺激 12 h 组 (脓毒症血清组)、UCP2-siRNA 干扰 +10% 脓毒症血清刺激 12 h 组 (UCP2-siRNA+ 脓毒症血清组)、阴性 siRNA 转染 +10% 脓毒症血清刺激 12 h 组 (阴性 siRNA + 脓毒症血清组), 每组设 3 个复孔。(1) 空白对照组不经处理, 大鼠 H9C2 心肌细胞株在含 10% 胎牛血清 DEME- 高糖培养基下培养箱培养; (2) 正常血清处理组: 待当细胞生长至 70%~80% 密度时, 加入 10% 正常大鼠血清培养 12 h; (3) 10% 脓毒症血清刺激 12 h 组: 待当细胞生长至 70%~80% 密度时加入 10% 脓毒症大鼠血清培养 12 h; (4) 阴性 siRNA 转染 +10% 脓毒症血清刺激 12 h 组: 待细胞生长至 70%~80% 密度时先行阴性 si-RNA 转染, 转

染24 h后加入10%脓毒症大鼠血清培养12 h;
(5) UCP2-siRNA 干扰+10%脓毒症血清刺激12 h组:待细胞生长至70%~80%密度时先行UCP2siRNA 转染,转染24 h后加入10%脓毒症大鼠血清培养12 h。

1.5 RT-PCR 检测 UCP2、TNF- α 、IL-1 β mRNA 的表达

采用TRizol 试剂提取H9C2 心肌细胞总RNA,ND-100 分光光度计测得RNA 的纯度和含量。取500 ng RNA 进行逆转录反应合成cDNA。然后以20 μ L 反应体系 SyberGreen 荧光定量PCR 检测。PCR 热循环参数:95 $^{\circ}$ C 预变性30 s,95 $^{\circ}$ C 变性5 s,60 $^{\circ}$ C 退火34 s,40 个循环。用 $\Delta\Delta$ Ct 法计算mRNA 的变化。

1.6 Western blot 检测 UCP2、p-p38MAPK、NF- κ B 蛋白表达

采用全蛋白提取试剂盒提取H9C2 心肌细胞总蛋白,BCA 法测蛋白浓度。用凝胶加样缓冲液将各管蛋白样品煮沸5 min。按每孔20 μ g 蛋白量加样SDS-PAGE 电泳,电泳结束后将凝胶取出,根据Marker 切胶、转膜,丽春红预染。5%脱脂奶粉的TBST 封闭室温2 h,TBST 漂洗3次,每次10 min,羊抗UCP2 (1:500)、兔抗beta-actin (1:1000)、兔抗磷酸化p38MAPK (1:1000)和核转录因子NF- κ B (1:1000) 抗体孵育,4 $^{\circ}$ C 摇床过夜,TBST 洗3次,每次10 min,(1:7500) 二抗室温孵育1 h,TBST 洗3次,每次10 min后使用ECL 发光法暗室显影,扫描分析。以 β -actin 作为内参照,分析UCP2、p-p38MAPK、NF- κ B 条带灰度变化。

1.7 统计学分析

应用SPSS 18.0 软件对数据进行分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组样本之间比较采取方差分析,方差不齐时用Welch 校正检验。多个样本均数间的多重比较采用LSD 法或Dunnetts T3 法检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blot 和 RT-PCR 筛选最有效的 siRNA

siRNA1、siRNA2、siRNA3 等3 对干扰序列进

行干扰,3 对序列均可以明显沉默UCP2 mRNA 表达($P<0.01$),其中siRNA2 序列对UCP2 mRNA 抑制效果最强,即siRNA2 干扰H9C2 心肌细胞后,干扰效果最强。荧光定量PCR 结果显示siRNA 2 组序列UCP2 相对表达为(0.286 ± 0.010),明显低于对照组(1.038 ± 0.044),差异有统计学意义($F=97.86, P<0.01$)。同时蛋白水平显示siRNA 2 序列最有效,故后续实验均以siRNA 2 为靶序列进行。见图1,2。

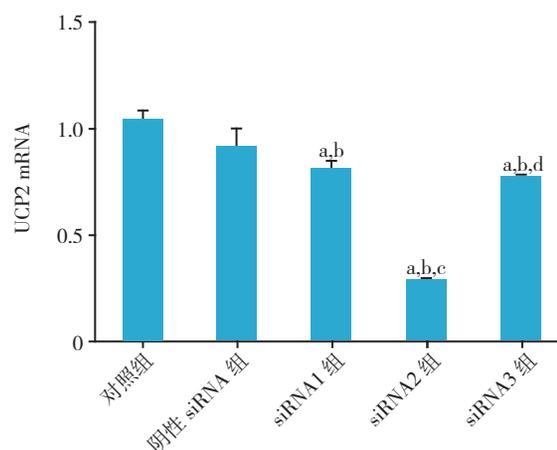


图1 荧光定量PCR 检测各组细胞UCP2 mRNA 沉默效率($n=3$) 注:a 示与对照组相比, $P<0.01$; b 示与阴性siRNA 组比较, $P<0.01$; c 示与siRNA1 组比较, $P<0.01$; d 示与siRNA2 组比较, $P<0.01$ 。

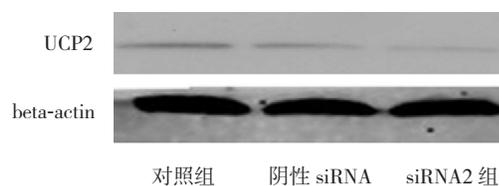


图2 UCP2 siRNA2 序列干扰效果 Western blot 验证图

2.2 各组 p-p38MAPK、NF- κ B 蛋白表达的变化

脓毒症血清刺激H9C2 心肌细胞株后细胞p-p38、NF- κ B 蛋白表达与对照组和正常血清组相比均明显增加($P<0.05$),其中UCP2-siRNA+脓毒症血清组表达较脓毒症大鼠血清组更加显著($P<0.05$),见表1,图3。

表 1 各组细胞 p-p38 和 NF-κB 蛋白表达的变化

($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	p-p38	NF-κB
空白对照组	0.031 ± 0.003	0.041 ± 0.004
正常血清组	0.033 ± 0.002	0.043 ± 0.002
脓毒症血清组	0.128 ± 0.013 ^{a,b}	0.153 ± 0.010 ^{a,b}
阴性 siRNA + 脓毒症血清组	0.115 ± 0.011 ^{a,b}	0.161 ± 0.010 ^{a,b}
UCP2-siRNA + 脓毒症血清组	0.157 ± 0.009 ^{a,b,c,d}	0.212 ± 0.017 ^{a,b,c,d}
F 值	118.406	156.981
P 值	<0.05	<0.05

注: a 示与空白对照组比较, $P < 0.05$; b 示与正常血清组比较, $P < 0.05$; c 示与脓毒症血清组比较, $P < 0.05$; d 示与阴性 siRNA + 脓毒症血清组比较, $P < 0.05$ 。

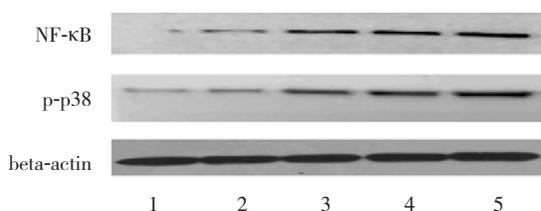


图 3 各组细胞 p-p38 和 NF-κB 蛋白表达 1: 空白对照组; 2: 正常大鼠血清组; 3: 脓毒症血清组; 4: 阴性 siRNA 转染 + 脓毒症血清组; 5: UCP2-siRNA 干扰 + 脓毒症血清组。

2.3 各组 TNF-α 和 IL-1 β mRNA 的表达

荧光定量 PCR 检测显示, 脓毒症大鼠血清刺激后各组细胞 TNF-α、IL-1 β mRNA 表达均明显上调。与正常对照、正常血清组相比, 脓毒症血清组、阴性 siRNA + 脓毒症血清组、UCP2-siRNA + 脓毒症血清组 TNF-α mRNA 相对表达 ($2.74 \pm 0.29, 2.81 \pm 0.39, 4.72 \pm 0.27$) 均明显增高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 其中 UCP2-siRNA + 脓毒症血清组与脓毒症血清组和阴性 siRNA + 脓毒症血清组比较有明显增高, 差异统计学意义 ($P < 0.01$)。脓毒症血清组、阴性 siRNA + 脓毒症血清组、UCP2-siRNA + 脓毒症血清组 IL-1 β mRNA 相对表达分别为 ($11.8 \pm 1.6, 12.8 \pm 2.6, 13.2 \pm 0.5$) 均明显高于正常对照组和正常血清组 ($P < 0.01$), 脓毒症血清组、阴性 siRNA + 脓毒症血清组与 UCP2-siRNA + 脓毒症血清组之间相比差异均无统计学意义。见图 4。

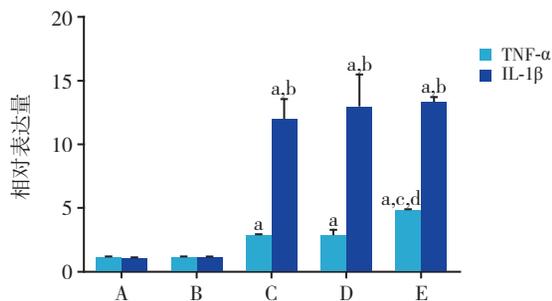


图 4 荧光定量 PCR 各组 TNF-α、IL-1 β mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$) A: 正常对照组; B: 正常大鼠血清组; C: 脓毒症血清组; D: 阴性 siRNA + 脓毒症血清组; E: UCP2-siRNA + 脓毒症血清组。注: a 示与对照组相比, $P < 0.01$, b 示与正常血清组比较, $P < 0.01$ 。c 示与脓毒症血清组比较, $P < 0.01$; d 示与阴性 siRNA + 脓毒症血清组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

脓毒症心肌病是脓毒症的严重并发症之一, 其主要表现包括有可逆性的双心室扩张、心肌射血分数下降, 对液体复苏和正性肌力药物的反应下降, 同时出现血液中肌钙蛋白、BNP 酶学等心肌标记物上升^[5]。目前关于脓毒症心肌病的病理生理机制仍不明确, 有研究认为一氧化氮、线粒体功能障碍、循环补体和细胞因子在其中发挥关键作用^[6]。当细菌所致脓毒症时, G⁻ 菌的 LPS 或 G⁺ 菌的肽聚糖和磷壁酸通过与模式识别受体 (PRRs) 识别, 进而激活单核-巨噬细胞系统 NF-κB 和丝裂原激活的蛋白激酶 MAPK 等炎症通路, 随之大量炎症介质和细胞因子释放 (如 IL-6、TNF-α、IL-1 等)^[7-9]。血液循环中的内毒素、炎症介质和细胞因子, 一方面可以直接对心肌细胞造成损害, 另外可以激活心肌细胞内 MAPK, NF-κB 等炎症通路, 影响心肌功能^[10]。既往研究结果显示, p38MAPK, NF-κB 信号转导通路在脓毒症心肌组织中激活, 并促发 TNF-α 和 IL-1 β 等炎症介质的释放, 阻断两者信号转导通路可改善心肌损伤^[11]。本研究也发现, 在脓毒症大鼠血清刺激作用下, H9C2 心肌细胞株内 p-p38MAPK 和 NF-κB 表达发生上调; TNF-α mRNA、IL-1 β mRNA 也发生上调。

研究证实 UCP2 可以调控细胞内炎症反应, UCP2 基因敲除小鼠在 LPS 作用下其血清 TNF 和干扰素 α 的水平较野生型小鼠更高, 同时巨噬细胞的 NF- κ B 表达也更高, 这可能与 UCP2 通过影响细胞内 ROS 的产生起作用的^[12]。最近 Chul 等^[13]研究发现, 能够有效下调细胞内炎症反应的一个细胞内信号分子细胞核孤儿受体—微小异源二聚体伴侣基因 (small heterodimer partner, SHP) 是通过 UCP2 影响细胞内氧化应激信号起作用的。UCP2 基因对于脓毒症心肌病作用的研究还未见报道。在脓毒症血清诱导刺激下大鼠心肌细胞株细胞内炎症通路被激活, 并且炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 在 mRNA 水平上表达上调。进一步研究发现 RNA 干扰技术沉默 H9C2 细胞 UCP2 基因后, 细胞内 p38MAPK 活性和 NF- κ B 激活加强, TNF- α 转录增强。提示 UCP2siRNA 转染可以促进心肌细胞内炎症反应, 因此推测, UCP2 在脓毒症心肌组织表达可能能够反馈下调心肌细胞内炎症通路和氧化应激损伤。但是本研究未能验证 UCP2 如何影响炎症通路的形成。在细胞模型方面, 本研究只选用单一的基因干扰, 严格来说需同时使用过表达技术双方面验证甚至需要使用基因敲除或转基因动物进一步验证。所以就 UCP2 在脓毒症心肌病的具体机制还有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Donadelli M, Dando I, Fiorini C, et al. UCP2, a mitochondrial protein regulated at multiple levels[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(7): 1171-1190.
- [2] Azzu V, Jastroch M, Divakaruni AS, et al. The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1797(6-7): 785-791.
- [3] Emre Y, Nübel T. Uncoupling protein UCP2: When mitochondrial activity meets immunity[J]. *FEBS Letters*, 2010, 584(8): 1437-1442.
- [4] Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock[J]. *J Surg Res*, 1990, 49(2): 186-196.
- [5] Vieillard-Baron A. Septic cardiomyopathy[J]. *Annals of Intensive Care*, 2011, 1(1): 6.
- [6] Flynn A, Chokkalingam Mani B, Mather PJ. Sepsis-induced cardiomyopathy: a review of pathophysiologic mechanisms[J]. *Heart Fail Rev*, 2010, 5(6): 605-611.
- [7] Shimaoka M, Park EJ. Advances in understanding sepsis[J]. *Eur J Anaesthesiol Suppl*, 2008, 42(25): 146-153.
- [8] Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(10): 776-787.
- [9] 黄卫东, 郭景涛, 刘喜, 等. 全身炎症反应综合征患儿中性粒细胞淋巴细胞 CD11b 表达意义 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2009, 11(7): 541-542.
- [10] Zhang T, Feng Q. Nitric oxide and calcium signaling regulate myocardial tumor necrosis factor- α expression and cardiac function in sepsis[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(2): 92-104.
- [11] Yang M, Wu J, Martin CM, et al. Important role of p38 MAP kinase/NF- κ B signaling pathway in the sepsis-induced conversion of cardiac myocytes to a proinflammatory phenotype[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(2): H994-H1001.
- [12] Yushi B, Hiroki O, Xu B, et al. Persistent Nuclear Factor- κ B Activation in Ucp2^{-/-} Mice Leads to Enhanced Nitric Oxide and Inflammatory Cytokine Production[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(19): 19062-19069.
- [13] Chul SY, Jae MY, Jwa JK, et al. Small heterodimer partner-targeting therapy inhibits systemic inflammatory responses through mitochondrial uncoupling protein 2[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(5): e63435.

(本文编辑: 王庆红)