

[5] 何志捷, 黄子通, 邹子俊, 等. 心肺复苏大鼠脑组织基质金属蛋白酶与血脑屏障的变化及其抑制剂的作用 [J]. 中华急诊医学杂志, 2009, 18 (1): 17-21.

[6] Seok SM, Kim JM, Park TY, et al. Fructose-1, 6-bisphosphate ameliorates lipopolysaccharide-induced dysfunction of blood-brain barrier [J]. Arch Pharm Res, 2013, 36 (9): 1149-1159.

[7] Jangula A, Murphy EJ. Lipopolysaccharide-induced blood brain barrier permeability is enhanced by alpha-synuclein expression [J]. Neurosci Lett, 2013, 551: 23-27.

[8] 詹佳, 张宗泽, 陈畅王, 等. 盐酸戊乙奎醚对脂多糖诱导的内

皮细胞损伤的保护作用 [J]. 中华急诊医学杂志, 2011, 20 (6): 619-621.

[9] Nishioku T, Matsumoto J, Dohgu S, et al. Tumor necrosis factor-alpha mediates the blood-brain barrier dysfunction induced by activated microglia in mouse brain microvascular endothelial cells [J]. J Pharmacol Sci, 2010, 112 (2): 251-254.

(收稿日期: 2014-11-22)

(本文编辑: 邵菊芳)

转染 HO-1 对酒精诱导的成骨细胞损伤的保护作用

李杰 张丰泉 刘涛 杜振宁 蔡腾

血红素加氧酶 1 (HO-1) 属于一种热休克蛋白, 是血红素分解的限速酶, 能将血红素分解为胆绿素、CO 和 NO 等, 能够被多种氧化应激因素和细胞因子激活, 在体内具有抗氧化、抗炎症反应和免疫调节等重要作用^[1], 对动植物均具有保护作用。大量临床研究证实长期过量酒精暴露的人群, 其发生骨代谢紊乱、骨质疏松或股骨头坏死的概率明显高于正常人群^[2-3]。另有研究发现酒精能够增加骨折发生的风险并且减缓骨折的愈合^[4]。近年有研究发现酒精对骨代谢的影响与酒精引起的氧化应激反应^[5-6]有密切关系。因而本次研究尝试将人 HO-1 转染进入体外培养的人成骨细胞中, 观察转染 HO-1 基因后人成骨细胞对酒精的耐受性及细胞分泌 BMP-2 和 TGF-β1 水平的影响, 从而为 HO-1 能否用作治疗酒精性骨代谢疾病的生物制剂提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂和仪器

脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司)、MTT (Sigma 公司), Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (碧云天), HO-1 真核表达质粒 (Biovector Science Lab), MDA、ROS 检和 SOD 检测试剂盒 (碧云天), BMP-2 和 TGF-β1 ELISA 检测试剂盒 (R&D Systems, Inc.), Accuri C6 流式细胞仪 (BD Biosciences), 723 分光光度计 (上海光谱仪器有限公司), Sunrise 酶标仪 (Tecan 公司), 930A 荧光分光光度计 (上海三科仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 人成骨细胞的分离培养 参照杨玉生等^[7]的方法分离培养正常人成骨细胞。将分离的成骨细胞充分打散后悬于 DMEM 培养液 (含 10% 胎牛血清) 中置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 隔天换液。

1.2.2 人成骨细胞 HO-1 转染和实验分组 取对数生长期细胞, 调整细胞浓度为 1 × 10⁴/mL 接种于 96 孔板中, 当细胞铺满 >80% 时, 按照 Lipofectamine 2000 质粒转染试剂盒说明进行操作, 设置空白对照组 (未转染)、100 nmol/L HO-1 质粒转染组, 每组设 6 个平行样。转染 24 h 后, 荧光显微镜下观察转染效果。实验中设置阴性对照组 (不加酒精、未转染 HO-1), 阳性对照组 (加 100 mmol/L 酒精、未转染 HO-1) 和 HO-1 转染组 (加 100 mmol/L 酒精、转染 HO-1), 实验中酒精浓度参考文献^[5]。

1.2.3 MTT 检测细胞活性 各组细胞酒精暴露 24 h 后, 每孔加入 20 μL 5 mg/mL MTT, 继续培养 4 h, 弃上清液, 加 150 μL DMSO, 室温下震荡 10 min, 用酶标仪于 490 nm 测定各孔的吸光度值 (OD 值)。细胞活性 = (实验组 OD 值/阴性对照组 OD 值) × 100%。

1.2.4 细胞中 ROS 测定 调整细胞浓度至 2 × 10⁵/mL, 接种于已放有灭菌盖玻片的 6 孔板中, 细胞转染及分组情况同 1.2.2。酒精作用 24 h 后, PBS 缓冲液漂洗盖玻片 2 次, 按照 ROS 检测试剂盒说明进行操作, 荧光分光光度计测定各组细胞的荧光强度。

1.2.5 细胞中 MDA 和 SOD 含量的测定 调整细胞浓度至 1 × 10⁶/mL, 接种于 6 孔板中, 细胞转染和分组同 1.2.2。酒精作用 24 h 后, 首先收集细胞培养液上清液用于 BMP-2 和 TGF-β1 的检测, 然后收集细胞并超声粉碎细胞, 提取细胞蛋白。按照 MDA 和 SOD 试剂盒说明分别检测细胞中 MDA 和 SOD 的含量。

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1671-0282. 2015. 05. 014

作者单位: 450003 郑州, 河南省人民医院急诊科 (李杰、刘涛、杜振宁、蔡腾); 新乡医学院公共卫生学院 (张丰泉)

通信作者: 张丰泉, Email: zhangfengquan29@126. com

1.2.6 ELISA 法检测细胞上清液中 BMP-2 和 TGF- β 1 将 1.2.5 中收集的细胞上清液采用双抗体夹心酶联免疫法检测细胞分泌的 BMP-2 和 TGF- β 1。严格按照试剂盒说明配制标准品及样品,用酶标仪测定各样品的吸光度值,并计算细胞中 BMP-2 和 TGF- β 1 相应的含量。

1.3 统计学方法

计量资料均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS 13.0 进行统计学分析,多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA),两组间比较时,方差齐采用 SNK 法,方差不齐采用 Games-Howell 法。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 转染 HO-1 后成骨细胞形态

转染 HO-1 质粒 24 h 后,荧光显微镜下观察成骨细胞形态,可见成骨细胞正常贴壁生长,细胞呈多边形,四周有多个突起,荧光物质均匀分布于成骨细胞胞浆中,见图 1。

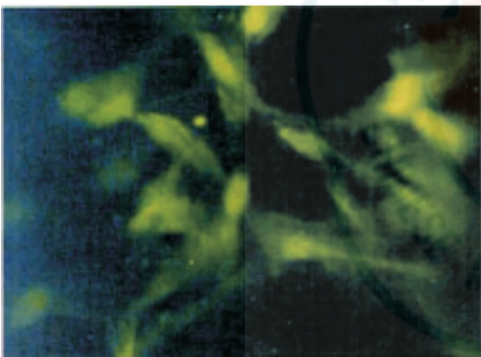
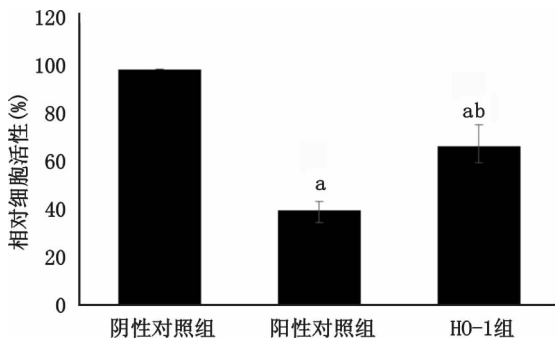


图 1 转染 HO-1 成骨细胞形态 ($\times 200$)

2.2 细胞活性检测结果

100 mmol/L 酒精作用 24 h,阳性对照组和 HO-1 转染组的相对细胞活性为 $(40.33 \pm 9.18)\%$ 和 $(67.35 \pm 6.90)\%$ 。与阴性对照组相比,酒精作用后阳性对照组和 HO-1 转染组细胞活性均明显降低 ($P < 0.05$)。但 HO-1 转染组相对细胞活性明显高于阳性对照组细胞活性,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 2。



与阴性对照组相比较,^a $P < 0.05$;与阳性对照组相比较,^b $P < 0.05$

图 2 细胞活性检测结果

2.3 细胞中 ROS、SOD 和 MDA 检测结果

酒精作用成骨细胞 24 h,细胞中 ROS、SOD 和 MDA 的含量变化见表 1。100 mmol/L 酒精作用于成骨细胞后,ROS 和 MDA 含量均较阴性对照组明显升高 ($P < 0.05$),而 SOD 活力单位比阴性对照组明显降低 ($P < 0.05$)。

当酒精作用于转染 HO-1 成骨细胞后,虽然 ROS、SOD 和 MDA 变化与阳性对照组相似 (与阴性对照组相比),但与阳性对照组相比,ROS 和 MDA 升高量明显降低, SOD 活力明显升高 ($P < 0.05$)。

表 1 酒精作用后细胞中 ROS、SOD 和 MDA 的含量 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	ROS ($\mu\text{mol/L}$)	SOD (U/mg prot)	MDA (mol/mg prot)
阴性对照组	0.13 \pm 0.01	17.52 \pm 0.53	0.10 \pm 0.02
阳性对照组	0.71 \pm 0.02 ^a	6.06 \pm 0.42 ^a	0.70 \pm 0.16 ^a
HO-1 组	0.43 \pm 0.13 ^{ab}	11.59 \pm 1.06 ^{ab}	0.41 \pm 0.08 ^{ab}

注:与阴性对照组比较,^a $P < 0.05$;与阳性对照组比较,^b $P < 0.05$

2.4 细胞中 BMP-2 和 TGF-1 含量检测结果

与阴性对照组相比,阳性对照组和 HO-1 转染组酒精作用 24 h,细胞中 BMP-2 和 TGF- β 1 水平均升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与阳性对照组相比,酒精作用后 HO-1 转染组细胞中 BMP-2 和 TGF- β 1 水平明显降低 ($P < 0.05$),见表 2。

表 2 细胞中 BMP-2 和 TGF- β 1 含量 (ng/L, $n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	BMP-2	TGF- β 1
阴性对照组	68.50 \pm 4.12	451.83 \pm 6.44
阳性对照组	23.20 \pm 5.79 ^a	217.52 \pm 3.98 ^a
HO-1 组	47.41 \pm 3.58 ^{ab}	355.62 \pm 7.07 ^{ab}

注:与阴性对照组比较,^a $P < 0.05$;与阳性对照组比较,^b $P < 0.05$

3 讨论

虽然适量的饮酒对骨代谢是有益处的^[8],但长期过量饮酒则能引起机体骨质丢失,且研究证实饮酒已成为骨质疏松和股骨头坏死的重要危险因素^[2]。酒精对骨代谢的机制主要包括:(1)酒精能够抑制成骨细胞的活性和增殖,同时还能抑制其前体细胞形成^[9];(2)酒精能诱导骨髓基质细胞分化为脂肪细胞,减少成骨细胞的分化^[10],即酒精致骨髓基质细胞成脂化学说;(3)酒精能干扰体内其他激素的活性,如 PTH、糖皮质激素等。

HO 是广泛存在于动植物体内的微粒体酶系统,参与多种生理病理过程,包括三种同工酶 HO-1、HO-2 和 HO-3。HO-1 为诱导性,能被氧化应激和炎症反应因子等激活,具有非常强的抗氧化损伤、抗炎反应和免疫调节能力^[1]。有研究发现 HO-1 不仅能够诱导骨髓基质细胞分化为成骨

细胞^[11], 而且 HO-1 能够通过抑制巨噬细胞集落刺激因子受体 c-fms 而抑制破骨细胞前体细胞分化为破骨细胞, 从而减少骨吸收^[12]。本实验中, 笔者利用基因转染技术将 HO-1 转染到人成骨细胞中, 使细胞中 HO-1 特异性高表达, 从而观察其对酒精损伤作用的耐受性, 研究特异转染 HO-1 是否能够对酒精诱导的成骨细胞损伤有抑制作用。本次研究中 MTT 结果显示, 与阴性对照组细胞相比, 虽然 HO-1 转染组细胞活性也明显降低, 其细胞活性却明显高于阳性对照组细胞活性。由此可见, 当人成骨细胞转染 HO-1 后, 细胞抵抗酒精损伤的能力明显增强。据此笔者推测, HO-1 特异性高表达后能够有效抑制酒精对成骨细胞的损伤作用, 对成骨细胞起到保护作用。

成骨细胞能够分泌骨形成蛋白 (BMP) 和转化生长因子- β (TGF- β), 在骨的形成和修复中起重要作用^[13]。其中 TGF- β 1 与骨的代谢关系最密切, 调控骨髓间充质干细胞的增殖并诱导其向成骨细胞分化。BMP-2 具有较强的诱导成骨细胞分化能力, 也能够诱导骨髓间充质干细胞成骨分化, 是公认的高效的成骨诱导因子^[14]。有研究发现骨折 4 周后, 骨痂中 BMP-2 和 TGF- β 的表达量均已明显降低, 进而延缓骨折的修复和愈合, 由此可见骨折后, BMP-2 和 TGF- β 表达过低是导致骨质疏松骨折愈合缓慢的可能原因之一^[15]。本次实验结果显示, 转染 HO-1 组成骨细胞中的 BMP-2 和 TGF- β 1 表达量明显高于阳性对照组。这一结果表明, 转染 HO-1 不仅可以增强酒精作用后成骨细胞的活性, 同时还能使成骨细胞中 BMP-2 和 TGF- β 1 增加。笔者推测转染 HO-1 可以加速酒精诱导的骨质疏松和骨折的愈合, 但还有待进一步的实验证明。

氧化应激是机体内氧化与抗氧化作用的失衡, 能够对机体造成脂质过氧化、DNA 氧化损伤等危害。ROS 是引起机体发生氧化应激的重要氧化物质, MDA 则是脂质过氧化的终产物, 而 SOD 则是机体重要的抗氧化酶。这些物质的变化能够直接反映机体氧化平衡状态。已有的研究表明大量的酒精能够使机体氧化水平升高, 而抗氧化能力下降, 当抑制体内氧化物质形成时, 则能改善酒精引起的骨损伤作用^[3]。HO 具有较强的抗氧化作用, 因而当机体内发生氧化应激反应时, HO 系统被激活而发挥抗氧化作用, 减少氧化应激反应对机体的损伤。本次研究结果显示, 当酒精作用于成骨细胞后, 阳性对照组成骨细胞中的 ROS 和 MDA 含量明显高于阴性对照组, 本次实验结果证实酒精能够诱导成骨细胞发生氧化应激反应, 与以往的研究相一致^[5]。但本次实验中 HO-1 转染组成骨细胞中 ROS 和 MDA 含量明显低于阳性对照组, 而 SOD 含量则明显高于阳性对照组, 由此可见转染 HO-1 能够明显地抑制酒精诱导的成骨细胞氧化应激反应, 对成骨细胞起到保护作用。

总之, 本次实验结果表明, 转染 HO-1 能够增强酒精作用后成骨细胞的活性, 对成骨细胞有保护作用。其保护作用机制可能与 HO-1 抑制酒精诱导的成骨细胞氧化应激

反应有关。另外 HO-1 转染后成骨细胞 BMP-2 和 TGF- β 1 的分泌的量明显增加, 增强间充质细胞成骨分化, 进而提高机体对酒精造成的骨损伤的修复能力。

参考文献

- [1] Araujo JA, Zhang M, Yin F. Heme oxygenase-1, oxidation, inflammation, and atherosclerosis [J]. *Front Pharmacol*, 2012, 3: 119.
- [2] Chakkalakal DA. Alcohol-induced bone loss and deficient bone repair [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2005, 29 (12): 2077-2090.
- [3] 王义生, 毛克亚, 李月白, 等. 酒精性股骨头缺血性坏死发病机理的实验研究 [J]. *中华骨科杂志*, 1998, 18 (4): 231-233.
- [4] Clark MK, Sowers MF, Dekordi F, et al. Bone mineral density and fractures among alcohol-dependent women in treatment and in recovery [J]. *Osteoporos Int*, 2003, 14 (5): 396-403.
- [5] Chen JR, Shankar K, Nagarajan S, et al. Protective effects of estradiol on ethanol-induced bone loss involve inhibition of reactive oxygen species generation in osteoblasts and downstream activation of the extracellular signal-regulated kinase/signal transducer and activator of transcription 3/receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand signaling cascade [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, 324 (1): 50-59.
- [6] 陆继收, 陈增刚, 孙成铭, 等. 阿托伐他汀对股骨头缺血性坏死患者血清 SOD、MDA 和 OX-LDL 的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2008, 24 (5): 733-735.
- [7] 杨玉生, 孙俊英, 朱伟, 等. 松质骨源性人成骨细胞的分离培养 and 细胞密度效应 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11 (3): 431-434.
- [8] Jonsson IM, Verdrengh M, Brisslert M, et al. Ethanol prevents development of destructive arthritis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104 (1): 258-263.
- [9] Giuliani N, Girasole G, Vescovi PP, et al. Ethanol and acetaldehyde inhibit the formation of early osteoblast progenitors in murine and human bone marrow cultures [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 1999, 23 (2): 381-385.
- [10] Cui Q, Wang Y, Saleh KJ, et al. Alcohol-induced adipogenesis in a cloned bone-marrow stem cell [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2006, 88 Suppl 3: 148-154.
- [11] Vanella L, Kim DH, Asprinio D, et al. HO-1 expression increases mesenchymal stem cell-derived osteoblasts but decreases adipocyte lineage [J]. *Bone*, 2010, 46 (1): 236-243.
- [12] Zwerina J, Tzima S, Hayer S, et al. Heme oxygenase 1 (HO-1) regulates osteoclastogenesis and bone resorption [J]. *FASEB J*, 2005, 19 (14): 2011-2013.
- [13] Chen D, Zhao M, Harris SE, et al. Signal transduction and biological functions of bone morphogenetic proteins [J]. *Front Biosci*, 2004, 9: 349-358.
- [14] Kanazawa I, Canaff L, Abi Rafef J, et al. Osteoblast menin regulates bone mass in vivo [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290

(7): 3910-3924.

(收稿日期: 2015-02-24)

[15] 李伟, 赵光锋, 喻任. 转移生长因子-β1、碱性成纤维细胞生长因子、骨形态发生蛋白-2 在大鼠骨质疏松骨折愈合骨痂中的表达 [J]. 中华急诊医学杂志, 2003, 12 (8): 530-532.

(本文编辑: 邵菊芳)

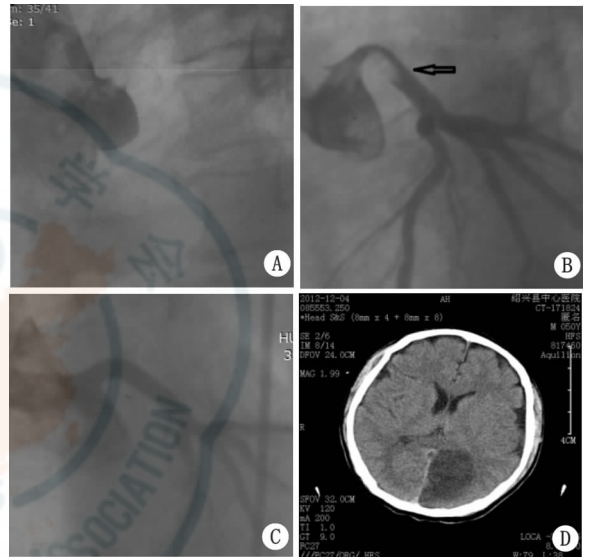
· 病例报告 ·

左主干血栓逸出致脑梗死一例

任品芳 王翔 张志诚 王超权 沈建耀 王黎

患者男性, 50 岁, 因“胸痛 2 h”入院于 2012 年 11 月 30 日。2 h 前在活动出现胸前区疼痛, 呈持续性, 伴头晕, 出汗, 无恶心、呕吐等, 急呼 120 送当地中医院, 当时查心电图示急性前壁心肌梗死, 予以口服阿司匹林、氯吡格雷片各 300 mg 后, 转送本院。有 20 年喝酒及抽烟史。烟约每日 1 包, 酒每日 500 mL。否认有高血压病、糖尿病、心脏病及脑梗死病史, 从事体力劳动; 否认家属中有类似病史。入院查体: T 35.0 °C, P 102 次/min, R 33 次/min, BP 96/58 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa), 意识尚清, 精神软弱, 口唇轻度发绀, 两肺呼吸音对称, 未及干湿性啰音, 心率 102 次/min, 律不齐, 闻及早搏, 约 5 次/min, 未及杂音, 腹平软, 肝脾肋下未触及, 两下肢浮肿阴性, 神经系统未见阳性体征。考虑: 急性广泛前壁心肌梗死。同家属商量后, 决定行急诊 PCI 术, 术中所见: 右冠未见明显狭窄, 左主干开口后全闭 (图 1A), 决定行左冠 PCI 术。顺利通过导丝到前降支远端, 重复造影显示左主干开口巨大血栓, 送入抽吸导管抽出红色血栓, 后重复造影显示左主干近端仍见血栓, 但血栓随着造影剂返流逸出冠脉口 (图 1B、C), 进入主动脉, 冠脉血流恢复通畅, 未见明显狭窄, 术中出现恶性心律失常, 反复除颤 16 次, 并持续胸外按摩近 30 min, 予以机械呼吸, 因血压偏低, 术中予以 IABP 植入, 于入院第 4 天在减少镇静剂用量时, 发现有烦躁, 查病理征阴性, 为排除脑血管意外可能, 行头颅 CT 检查示左顶枕叶脑梗 (图 1D)。住院半个月, 顺利康复出院。

讨论 心源性脑梗死约占全部脑梗死的 15% ~ 30%^[1]。许多心脏疾病可引发脑梗死, 其最常见原因包括房颤、近期心肌梗死、扩张型心肌病、风湿性心脏病、心内膜炎, 而由于冠状动脉左主干血栓脱落导致脑梗死患者未见报道。冠状动脉血栓形成是急性心肌梗死 (AMI) 的主要原因, 急诊冠状动脉介入治疗 (PCI) 是治疗 AMI 的首选治疗措施。血栓抽吸在介入治疗当中已经越来越扮演重要角色, 可以明显地降低介入治疗中的无复流的发生率,



A: 左主干全闭; B: 左主干内可能巨大血栓; C: 血栓被造影剂冲出后冠脉正常; D: 头颅 CT 示顶枕叶脑梗

图 1 患者造影及 CT 结果

提高再灌注成功率, 减少梗死面积及提高无事件存活率, 改善临床预后^[2]。血栓抽吸一般没有明显并发症, 本例出现血栓脱落可能原因是: ①本例血栓在第一次抽吸后, 出现血栓遗留, 导致血栓的不稳定, 在再次造影时, 出现血栓被返流造影剂冲出冠脉口, 返流入主动脉; ②是血栓发生在左主干起始部, 造影时基本上没有看到左主干, 血栓直接在开口位置, 发生血栓移位, 导致脑梗死的发生。因此, 在血栓抽吸后重复造影时, 应注意造影剂的速度与剂量, 尤其是在左主干及右冠开口等位置, 从而避免不良事件的发生。

参考文献

- [1] MacDougall NJ, Amarasinghe S, Muir KW. Secondary prevention of stroke [J]. Expert Rev cardiovasc Ther, 2009, 7 (9): 1103-1115.
- [2] Svilaas T, Vlaar PJ, van der Horst IC, et al. Thrombus aspiration during primary percutaneous coronary intervention [J]. N Engl J Med, 2008, 358 (6): 557-567.

(收稿日期: 2014-10-27)

(本文编辑: 何小军)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2015.05.015

作者单位: 312030 浙江省绍兴, 中国医科大学绍兴医院 绍兴市中心医院心内科

通信作者: 任品芳, Email: renpinfang@sina.com