

转染 HO-1 基因的巨噬细胞减轻急性心肌梗死区炎症和氧化应激损伤

李 谔^{1,2}, 黄维义¹

(1.西南医科大学附属医院心内科,四川省泸州市 646000;2.重庆市渝北区人民医院心内科,重庆市 401120)

[关键词] 腺病毒转染; 巨噬细胞; 血红素氧合酶 1; 急性心肌梗死; 炎症和氧化应激

[摘要] 目的 探讨移植转染血红素氧合酶 1(HO-1)基因的巨噬细胞在减轻大鼠急性心肌梗死(AMI)区炎症和氧化应激损伤中的作用与机制。方法 体外培养大鼠肺泡巨噬细胞(M ϕ)并分为对照组、腺病毒(Ad)空载体转染巨噬细胞组(Ad-M ϕ 组)、含 HO-1 基因的 Ad 转染巨噬细胞组(Ad-HO-1-M ϕ 组)。检测各组的细胞增殖活力、HO-1 蛋白表达量及培养液中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6)、IL-10 等细胞因子表达量。另以冠状动脉结扎法建立 SD 大鼠 AMI 模型并随机分为对照组、Ad-M ϕ 移植组和 Ad-HO-1-M ϕ 移植组,分别于心肌梗死区多点注射磷酸缓冲液(PBS)、含 Ad-M ϕ (2×10^9 /L)的 PBS 液、含 Ad-HO-1-M ϕ (2×10^9 /L)的 PBS 液各 100 μ L,5 天后处死各组大鼠,取梗死区心肌组织检测 HO-1 蛋白及 IL-12、TNF- α 、IL-10、单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)等表达量,同时检测总抗氧化能力(T-AOC)和丙二醛(MDA)含量。结果 腺病毒转染本身不影响巨噬细胞活力,但却能将 HO-1 基因转入巨噬细胞并获得高效表达($P < 0.05$),转染 HO-1 基因的巨噬细胞可明显降低促炎因子 TNF- α 、IL-6 表达并升高抗炎因子 IL-10 的表达(均为 $P < 0.05$)。与对照组及 Ad-M ϕ 移植组比较,Ad-HO-1-M ϕ 移植组心肌梗死区 HO-1 蛋白表达明显升高($P < 0.05$),促炎因子 TNF- α 、IL-12、MCP-1 表达减少而抗炎因子 IL-10 表达增加,对应的 T-AOC 升高而 MDA 显著降低(均为 $P < 0.05$)。结论 Ad-HO-1-M ϕ 能够高表达 HO-1 蛋白并向具有抗炎特性的 M2 型极化。将 Ad-HO-1-M ϕ 移植到大鼠急性心肌梗死区仍能高表达 HO-1 蛋白并显著减轻梗死区的炎症和氧化应激水平。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Macrophages transfected with heme oxygenase-1 gene reduce the inflammation and oxidative stress in acute myocardial infarction area

LI Chen^{1,2}, HUANG Wei-Yi¹

(1. The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. The People's Hospital of Yubei District of Chongqing, Chongqing 401120, China)

[KEY WORDS] Adenovirus transfection; Macrophages; Heme oxygenase-1; Acute myocardial infarction; Inflammation and oxidative stress

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects and mechanisms of transplantation of macrophages transfected with heme oxygenase-1 (HO-1) gene by adenovirus vectors on inflammation, oxidative stress in acute myocardial infarction (AMI) area. **Methods** Rat alveolar macrophages were cultured in vitro and divided into three groups and treated differently: control group, the cells were not transfected with adenovirus; Ad-M ϕ group, the cells were transfected with blank adenovirus vector; Ad-HO-1-M ϕ group, the cells were transfected with adenovirus carrying the HO-1 gene. The proliferative activity of macrophages and the expression of HO-1 protein as well as the inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-10 in the supernatant were detected. In addition, The AMI model in rats were established by ligating coronary artery and randomly divided into three groups: the simple AMI group, the Ad-M ϕ transplantation group and the Ad-HO-1-M ϕ transplantation group. PBS, PBS containing 2×10^5 Ad-M ϕ and PBS containing 2×10^5

[收稿日期] 2017-07-14

[修回日期] 2017-12-01

[基金项目] 泸州市科技局项目(2013LZLY-J15)

[作者简介] 李谔,硕士研究生,研究方向为介入心脏病学,E-mail 为 465464814@qq.com。通讯作者黄维义,主任医师,教授,硕士研究生导师,研究方向为介入心脏病学,E-mail 为 hwy6881@126.com。

Ad-HO-1-M ϕ were injected into the myocardial infarction area of rats in each group respectively. 5 days later, the expression of HO-1 protein and the inflammatory cytokines such as IL-12, TNF- α , IL-10, monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) as well as the total antioxidant capacity (T-AOC) and malondialdehyde (MDA) content in infarcted myocardium were detected. **Results** Adenovirus transfection itself did not affect macrophage proliferation activity, but could transfer HO-1 gene into macrophage and obtain high expression. Ad-HO-1-M ϕ could significantly reduce the expression of pro-inflammatory cytokine TNF- α , IL-6 and increase the expression of anti-inflammatory factor IL-10 ($P < 0.05$). Compared with the simple AMI group and the Ad-M ϕ transplantation group, the infarcted area of Ad-HO-1-M ϕ transplantation group showed much more expression of HO-1 protein and IL-10 and less expression of TNF- α , IL-12, MCP-1 while T-AOC increased and MDA content decreased significantly ($P < 0.05$ respectively). **Conclusion** Ad-HO-1-M ϕ could overexpress HO-1 protein and polarize into M2 phenotype which has powerful anti-inflammatory properties. After being transplanted into myocardial infarcted area, the Ad-HO-1-M ϕ could still overexpress HO-1 protein and significantly reduce the inflammation and oxidative stress levels in myocardial infarcted area.

近年来在冠心病治疗领域不断取得进步,特别是溶栓、急诊 PCI 等血运重建措施使急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 患者预后大为改善,但针对大量已经梗死及后续凋亡心肌细胞的再生与修复仍未获得重大突破,由此导致的左心室重构与心力衰竭将显著增加患者死亡风险。理论上干细胞移植可为心肌细胞再生带来希望,然急性心肌梗死区内存在着严重的炎症与氧化应激环境,成为阻止干细胞存活、增殖、分化的重要不利因素^[1]。可见,设法抑制心肌梗死区早期的炎症和氧化应激不仅能直接减轻心肌细胞损伤,也有利于自体干细胞或移植干细胞的生存,更好的发挥心肌再生与修复作用^[2]。血红素氧合酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 是近年发现的一个可诱导的细胞内源性保护酶,在拮抗组织细胞炎症与氧化应激损伤中起着不可或缺的作用^[3-4]。尤其是近年研究发现,上调单核巨噬细胞中 HO-1 表达可使其由促炎作用转变成具有抗炎作用的细胞,若借助其炎症趋化特性则很容易进入炎症区域,从而成为防治炎症损伤最具吸引力的候选细胞^[5]。Ferenbach 等^[6]报道,给肾缺血再灌注损伤模型大鼠经外周静脉注入转染 HO-1 基因的巨噬细胞后,发现这些 HO-1-M ϕ 能快速趋化募集于缺血肾组织中并持续高表达 HO-1 蛋白,有效发挥限制局部组织炎症损伤的效果。受此启发,本文拟探讨转染 HO-1 基因对巨噬细胞 (M ϕ) 特性的影响及移植高表达 HO-1 蛋白的巨噬细胞在减轻大鼠急性心肌梗死区炎症和氧化应激损伤中的作用与机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及材料

内毒素购自 Sigma 公司, F12-K 培养基、胎牛血

清购自上海碧云天生物公司, 装载 HO-1 基因的腺病毒 (Ad-HO-1) 购自上海汉恒生物, PBS 粉剂、大鼠白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、IL-12、IL-10、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α)、单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1) ELISA 试剂盒购自重庆海韵生物公司, 总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC) 检测试剂盒、脂质氧化丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。大鼠肺泡巨噬细胞株 (NR8383) 购自中国科学院细胞库。9 周龄清洁级雄性 SD 大鼠由西南医科大学动物实验中心提供, 体重 250~300 g。水与饲料由动物随意摄取, 动物实验依照西南医科大学动物实验委员会许可协议进行。

1.2 巨噬细胞的培养

NR8383 复苏后置于含 10% 小牛血清及 1% 青、链霉素的 F12-K 培养基中在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养, 2~3 天换液一次, 至细胞融合率大于 80% 时即可进行传代培养。

1.3 腺病毒转染巨噬细胞

选择处于对数生长期的巨噬细胞进行转染, 巨噬细胞分为 3 组, 对照组: 不行腺病毒转染的巨噬细胞; Ad-M ϕ : 仅以腺病毒空载体转染巨噬细胞; Ad-HO-1-M ϕ 组: 以装载 HO-1 基因的腺病毒转染巨噬细胞。其中, 对照组细胞仅换液处理, 另两组则用加入预先稀释并分装好的 Ad 与 Ad-HO-1 液 (1×10^{12} PFU/L) 以感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 100 进行转染并继续培养, 2 天后通过荧光显微镜观察各组巨噬细胞转染情况 (图 1), 计算巨噬细胞转染率 (转染率 = 带荧光巨噬细胞个数/细胞总数 $\times 100\%$) 后备用。

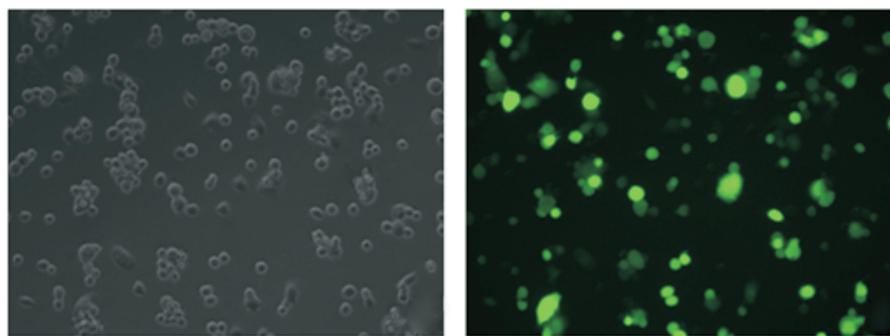


图 1. 荧光显微镜下观察腺病毒转染的巨噬细胞(200×) 左为无荧光视野,右为有荧光视野。可见,Ad-HO-1 转染巨噬细胞的成功率达到 85%以上。

Figure 1. Adenovirus transfected macrophages observed by fluorescence microscope(200×)

1.4 MTT 法检测腺病毒转染对巨噬细胞活力的影响

各组取细胞在 96 孔板中以 1×10^3 个/孔细胞接种,每组 15 孔,在 37℃ 恒温培养箱中培养 48 h 后,每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 g/L),继续培养 4 h。将每孔细胞吸出离心去除上清后再种回原孔,向每孔加入 100 μL 二甲基亚砜,在 490 nm 波长经酶联免疫检测仪测定各孔吸光度值(OD 值)。

1.5 ELISA 检测细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-6、IL-10 表达水平

各组均加入终浓度为 1 mg/L 的 LPS 孵育以活化巨噬细胞,24 h 后取上清液用 ELISA 法检测 TNF- α 、IL-6、IL-10。具体操作按说明书完成,用酶标仪在 450 nm 波长将空白对照孔调零以后测其余反应孔的 OD 值。将 OD 值代入标准曲线,得出样品浓度。

1.6 Western blot 法测定巨噬细胞中 HO-1 蛋白表达

各组细胞弃上清,用 PBS 清洗 3 次后使之裂解,离心后取上清液。用二喹啉甲酸(BCA)法测各组细胞蛋白浓度。将各组蛋白经凝胶电泳分离,在恒压状态下,100 V 转膜 1 h,封闭 1 h 后加入稀释后的一抗,4℃ 过夜,用抗体稀释液稀释 HRP-二抗,将膜在二抗中 25℃ 下孵育 1 h 后,用 TBST 漂洗 30 min,用 TBST 洗涤 PVDF 膜 15 min。用增强化学发光法使 PVDF 膜显色,置于成像系统曝光,获取目的条带图像。通过图像扫描仪扫描胶片,图像条带灰度值的测定采用 Image-pro plus 软件分析,并以每份样本 HO-1/GAPDH 灰度值的比值代表 HO-1 相对表达量。

1.7 大鼠 AMI 模型建立及细胞移植

大鼠术前禁食 12 h,以腹腔注射戊巴比妥钠

(30 mg/kg)麻醉后行气管切开插管,呼吸机辅助通气,连接心电生理记录仪,开胸后根据文献^[7-8]于肺动脉圆锥和右心耳连线中点下 2~4 mm 进针,深度约 3 mm,观察到大鼠心电图有 ST 段抬高(图 2),表示大鼠 AMI 模型建立成功。AMI 模型大鼠随机分为 3 组(每组 6 只)分别行不同的细胞移植操作。对照组:向左心室前壁扇形缺血区域与正常心肌组织交界处 4 点注射纯 PBS 液共 100 μL ; Ad-M ϕ 移植组:同上法注射含 Ad-M ϕ (2×10^9 /L)的 PBS 液共 100 μL ; Ad-HO-1-M ϕ 移植组:同上法注射含 Ad-HO-1-M ϕ (2×10^9 /L)的 PBS 液共 100 μL 。术后每只大鼠每天予以青霉素 1 万 U 腹腔注射抗感染,连续 5 天。

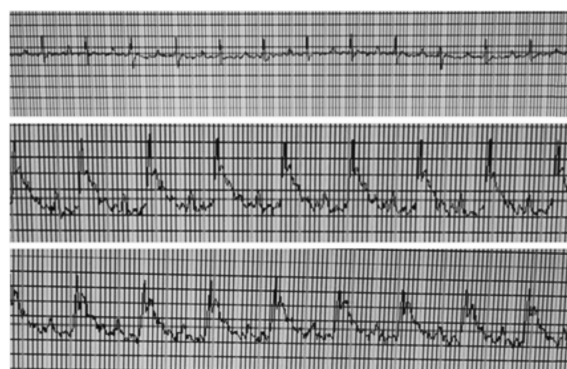


图 2. 大鼠冠状动脉前降支结扎前、后的心电图变化 从上至下依次为前降支结扎前、前降支结扎后 10 min 及前降支结扎后 30 min。

Figure 2. Electrocardiogram of each group before and after AMI

1.8 梗死区心肌组织内各项生化指标及被标记细胞的归巢情况检测

移植后 24 h 再次麻醉处死大鼠,取各组大鼠心肌梗死区组织约 150 mg 行组织匀浆,用 ELISA 法测

TNF- α 、IL-12、IL-10、MCP-1 等的表达量(同 1.5);用 Western blot 检测 HO-1 蛋白表达量(同 1.6);用 FRAP 法检测 T-AOC,并用硫代巴比妥酸显色法检测 MDA,具体操作均按试剂盒说明书进行。

另取梗死区组织切片在荧光显微镜下观察标记的细胞,每个心脏随机标本选定 10 个高倍视野进行荧光细胞计数,取平均数并以 $\bar{x}\pm s$ 表示,以比较两组标记细胞的归巢情况。

1.9 统计学方法

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 SPSS19.0 统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)及 LSD 法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 腺病毒转染对巨噬细胞活性的影响

比较各组巨噬细胞 MTT 法测定的 OD 值均无统计学差异($P>0.05$),说明腺病毒转染对巨噬细胞活力没有明显影响(表 1)。

表 1. 各组细胞 MTT 测定结果($\bar{x}\pm s, n=15$)

Table 1. The results of MTT in each group($\bar{x}\pm s, n=15$)

分组	OD 值
对照组	0.144 \pm 0.035
Ad-M ϕ 组	0.150 \pm 0.031
Ad-HO-1-M ϕ 组	0.160 \pm 0.037

2.2 腺病毒转染 HO-1 基因入巨噬细胞的效果

与 Ad-M ϕ 组(0.107 \pm 0.060)比较,Ad-HO-1-M ϕ 组 HO-1 蛋白表达(0.908 \pm 0.055)明显增多($P<0.05$),说明以腺病毒为载体能够将 HO-1 基因高效转染给巨噬细胞并实现目的基因的表达(图 3)。

2.3 脂多糖处理各组巨噬细胞后 IL-6、TNF- α 及 IL-10 的表达

与对照组比较,Ad-M ϕ 组 IL-10、IL-6、TNF- α 的表达量均无明显差异($P>0.05$),但与对照组及 Ad-M ϕ 组相比,Ad-HO-1-M ϕ 组 IL-6、TNF- α 的表达明显降低($P<0.05$),IL-10 表达则明显升高($P<0.05$),表明腺病毒空载体转染并不影响巨噬细胞的原有特性,但用腺病毒将 HO-1 基因转染到巨噬细胞内并高效表达 HO-1 蛋白后,即可降低促炎因子 IL-6、TNF- α 的表达而增加抗炎因子 IL-10 的表达,表明 Ad-HO-1-M ϕ 已由经典的促炎特性转变为抗炎特性(表 2)。

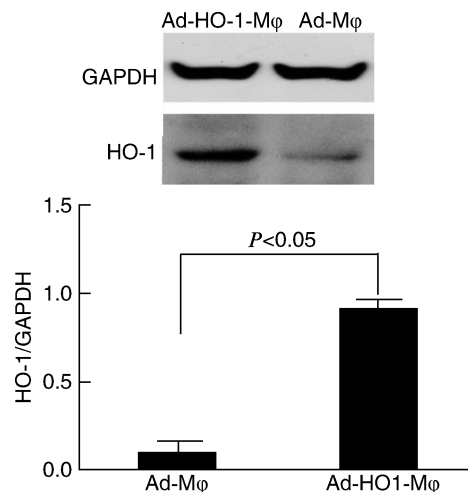


图 3. Western blot 检测 Ad-M ϕ 组与 Ad-HO-1-M ϕ 组 HO-1 蛋白表达

Figure 3. Detection of HO-1 protein expression in Ad-M ϕ group and Ad-HO-1-M ϕ group by Western blot

表 2. 各组细胞 IL-6、TNF- α 和 IL-10 的表达($\bar{x}\pm s, ng/L, n=6$)

Table 2. The results of IL-6, TNF- α and IL-10 expression in each group($\bar{x}\pm s, ng/L, n=6$)

分组	IL-6	TNF- α	IL-10
对照组	41.85 \pm 4.13	63.61 \pm 7.60	43.53 \pm 12.75
Ad-M ϕ 组	44.05 \pm 5.24	66.09 \pm 6.24	39.63 \pm 17.70
Ad-HO-1-M ϕ 组	13.55 \pm 4.10 ^a	34.00 \pm 7.05 ^a	101.02 \pm 16.68 ^a

a 为 $P<0.05$,与对照组和 Ad-M ϕ 组比较。

2.4 巨噬细胞移植对梗死区心肌组织 HO-1 蛋白表达的影响

在 AMI 模型大鼠梗死区行不同的巨噬细胞移植,24 h 后检查发现,Ad-M ϕ 移植组梗死区心肌组织内 HO-1 蛋白表达与对照组之间差异无显著性($P>0.05$),但相比对照组及 Ad-M ϕ 移植组,Ad-HO-1-M ϕ 移植组梗死区心肌组织内 HO-1 蛋白表达则明显升高($P<0.05$),表明移植携带有 HO-1 基因的巨噬细胞能够在急性心肌梗死区募集、存活并高效表达 HO-1 蛋白,但移植未携带 HO-1 基因的巨噬细胞则不会对 HO-1 的表达产生明显影响(图 4)。

2.5 巨噬细胞移植对梗死区心肌组织炎症与氧化应激损伤等指标的影响

在模型大鼠心肌梗死区行不同的巨噬细胞移植,24 h 后检查发现:与对照组比较,Ad-M ϕ 移植组梗死区心肌组织中除 IL-12 的表达量更高之外,其余炎症、氧化应激损伤指标均无明显差异($P>0.05$)。但相比于对照组及 Ad-M ϕ 移植组,Ad-HO-1-M ϕ 移植组梗死区心肌组织中抗炎因子 IL-10 的

表达及 T-AOC 水平明显升高 ($P < 0.05$), 而 TNF- α 、MCP-1、IL-12 等促炎因子的表达和 MDA 水平则明显降低 ($P < 0.05$)。表明移植携带 HO-1 基因的巨噬细胞能显著抑制梗死区早期的炎症反应及氧化应激, 而移植未携带 HO-1 基因的巨噬细胞对梗死区早期的炎症反应及氧化应激无明显影响 (表 3)。

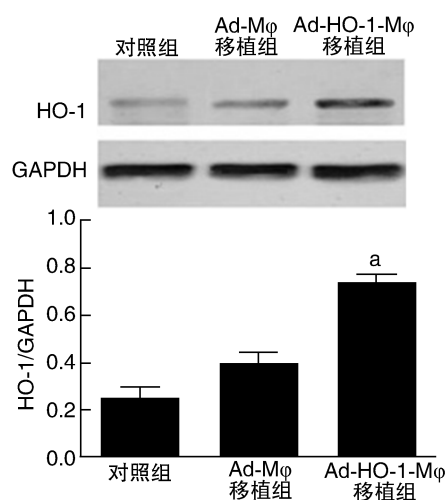


图 4. 巨噬细胞移植 24 h 后各组梗死区心肌组织 HO-1 的表达 a 为 $P < 0.05$, 与对照组和 Ad-M ϕ 移植组比较。

Figure 4. The expression of HO-1 in each group

表 3. 巨噬细胞移植后各组梗死区心肌组织中炎症与氧化应激损伤指标的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3. The change of indexes of inflammatory and oxidative stress damage in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

指标	对照组	Ad-M ϕ 移植组	Ad-HO-1-M ϕ 移植组
TNF- α (mmol/g)	283.34 \pm 27.75	301.03 \pm 28.78	236.72 \pm 23.03 ^{ab}
MCP-1 (mmol/g)	222.72 \pm 22.24	232.94 \pm 26.00	151.50 \pm 22.24 ^{ab}
IL-12 (mmol/g)	271.43 \pm 38.05	316.12 \pm 32.23 ^a	201.00 \pm 30.94 ^{ab}
IL-10 (mmol/g)	277.25 \pm 22.07	269.77 \pm 25.32	393.08 \pm 31.34 ^{ab}
MDA (mmol/g)	2.31 \pm 0.41	2.54 \pm 0.38	1.32 \pm 0.32 ^{ab}
T-AOC (kU/g)	0.40 \pm 0.04	0.41 \pm 0.03	0.88 \pm 0.04 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 Ad-M ϕ 移植组相比。

2.6 经心肌注射后组织内的巨噬细胞归巢情况

对经巨噬细胞移植后的心肌梗死模型大鼠于 24 h 后观察两组细胞归巢情况, 发现 Ad-HO-1-M ϕ 移植组 (68.10 ± 9.18) 与 Ad-M ϕ 移植组 (73.00 ± 7.57) 心肌梗死区巨噬细胞归巢无明显差异 ($P > 0.05$), 说明经心肌注射移植短期内可使巨噬细胞准确募集在梗死区 (图 5)。

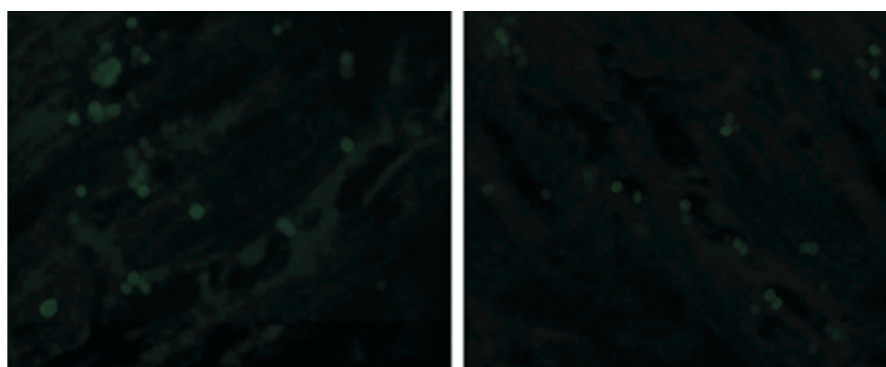


图 5. 细胞移植 24 h 后心肌梗死区的细胞归巢结果 (200 \times) 左为 Ad-M ϕ 移植组, 右为 Ad-HO-1-M ϕ 移植组。

Figure 5. The results of cell homing of myocardial infarction area in each group (200 \times)

2.7 细胞移植 4 周后梗死区心肌组织病理学检测结果

在模型大鼠心肌梗死区行巨噬细胞移植 4 周后, 取梗死区心肌组织行病理切片, HE 染色, 低倍镜下观察大体图像。发现对照组及 Ad-M ϕ 移植组梗死边缘区心肌纤维染色不均匀, 心肌细胞紊乱排列, 大量肌纤维断裂, 心肌细胞呈现大片状坏死, 细胞核有破裂、溶解现象, 呈典型的凝固性坏死表现,

心肌梗死中心区域着色少, 少量肉芽组织被大量瘢痕组织分割成团, 并伴有大量炎症细胞浸润。Ad-HO-1-M ϕ 移植组梗死边缘区心肌纤维染色欠均匀, 排列紊乱, 肌束间隙增宽, 细胞有空泡、水肿样改变, 梗死范围较其他两组小, 且肉芽组织成片增生, 组织之间可见炎症细胞及少量瘢痕组织填充 (图 6)。

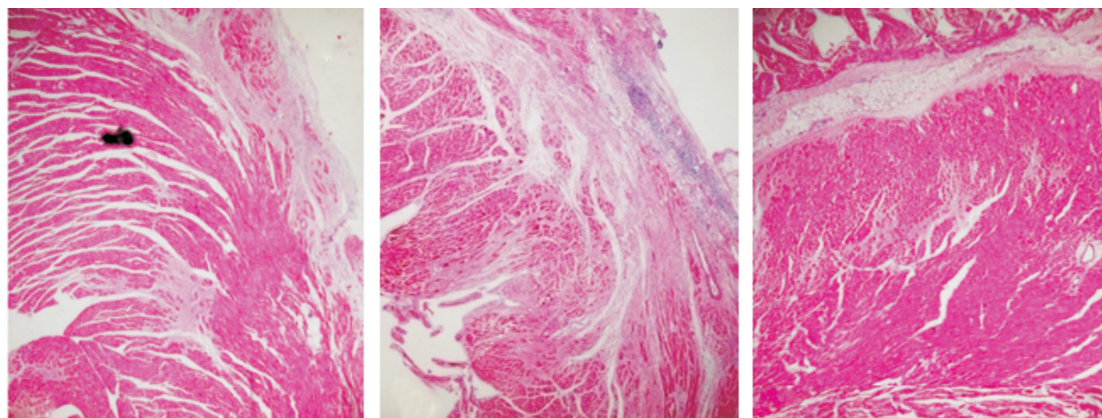


图 6. 细胞移植 4 周后心肌梗死区组织病理学检测结果(100×) 左为对照组, 中为 Ad-M ϕ 移植组, 右为 Ad-HO-1-M ϕ 移植组。

Figure 6. The results of histopathological examination for myocardial infarction area in each group(100×)

3 讨论

已知单核巨噬细胞具有很强的炎症趋化特性,能快速募集于炎症及缺血坏死组织中,参与异物吞噬、抗原提呈及免疫调节等作用。有研究揭示,巨噬细胞在不同刺激因素与信号途径诱导激活下可极化为生物学特性截然不同的两种类型,即经典激活的 M1 型和替代激活的 M2 型,其中, M1 型又称促炎型巨噬细胞,主要是通过 γ 干扰素 (INF- γ)、TNF- α 等信号诱导激活,分泌大量 IL-12、TNF- α 等促炎细胞因子,发挥促进炎症损伤、吞噬和参与特异性免疫应答等作用; M2 型又称抗炎型巨噬细胞,主要通过 IL-4、IL-10、IL-13 等诱导激活,稳定表达 IL-10 的同时还能通过其自噬作用抑制凋亡细胞因破裂而向外周释放的毒性蛋白、细胞内氧化物、细胞器等物质所致的炎症反应,从而发挥抗炎作用^[9-10]。Mia 等^[11]报道,加用 IL-4/IL-10/TGF- β 等细胞因子可诱导体外培养的单核巨噬细胞向 M2 型极化,在高效、稳定表达抗炎因子 IL-10 并下调 TNF- α 、IL-6 等促炎细胞因子表达的同时,尚能抑制 M1 型巨噬细胞刺激的炎症反应,从而发挥强有力的抗炎作用。本研究以腺病毒为载体成功为体外培养的巨噬细胞转染 HO-1 基因并获得 HO-1 蛋白的高效表达,与未转染或仅转染空载体的巨噬细胞相比, Ad-HO-1-M ϕ 能显著增加抗炎因子 IL-10 表达并抑制促炎因子 IL-6、TNF- α 等表达,提示通过基因转染高表达 HO-1 蛋白可使巨噬细胞向具有抗炎作用的 M2 型极化,这与 Wenzel 等^[5]的研究结果是一致的。

随后,我们通过直接注射的方式将 Ad-HO-1-M ϕ 移植到 AMI 模型大鼠的心肌梗死区内,结果与未移植巨噬细胞的对照组或仅移植 Ad-M ϕ 组相比,

Ad-HO-1-M ϕ 移植组心肌梗死区组织内的 HO-1 蛋白表达显著升高,表明移植的 Ad-HO-1-M ϕ 能够在急性心肌梗死区内存活并高效表达 HO-1 蛋白。此外,我们还测得 Ad-HO-1-M ϕ 移植组心肌梗死区内炎症指标中的 TNF- α 、IL-6、MCP-1 等明显降低,而 IL-10 明显升高,表明 Ad-HO-1-M ϕ 移植有效减轻了急性心肌梗死区的炎症,与此同时, Ad-HO-1-M ϕ 移植组心肌梗死区 T-AOC 明显升高,MDA 生成显著减少,提示移植 Ad-HO-1-M ϕ 也能同步减轻急性心肌梗死区的氧化应激水平。鉴于心肌梗死后心肌坏死与损伤相关分子的释放必然引发局部的炎症反应,导致循环中的单核细胞、嗜中性粒细胞等大量浸润并驻留于心脏缺血与梗死区,产生的过量促炎细胞因子、游离血红素及活性氧等将进一步促进炎症与氧化应激损伤,加重心肌细胞损伤与凋亡,扩大梗死面积,促进左心室重构^[12-14]。我们早期移植的 Ad-HO-1-M ϕ 不仅自身发挥着抗炎作用,通过改变炎症性细胞因子的分泌还可能抑制循环中的单核细胞大量涌入心肌梗死区并通过抑制 JNK 通路、PI3K-Akt 通路等的活化而有效阻止浸润的单核细胞向 M1 型巨噬细胞极化^[15]发挥抗炎作用。此外, Ad-HO-1-M ϕ 在心肌梗死区过表达的 HO-1 蛋白,无论在巨噬细胞内还是通过溢出效应作用于周围的其他组织细胞,均能高效催化具有促氧化作用的游离血红素降解并生成 CO 和胆红素等重要终产物,其中,CO 是一个作用广泛的细胞信号分子,尤其在调节免疫、抑制炎症中发挥重要作用^[16],而胆红素则是机体最强的内源性抗氧化剂之一,可有效清除多种形式的自由基,在拮抗组织细胞氧化应激损伤中发挥着不可或缺的作用^[17]。可见, Ad-HO-1-M ϕ 移植可经由上述多重机制参与对急性心肌梗死区

炎症和氧化应激的抑制,未来有可能成为改善急性心肌梗死预后的重要细胞学治疗措施。

[参考文献]

- [1] Westman PC, Lipinski MJ, Luger D, et al. Inflammation as a driver of adverse left ventricular remodeling after acute myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 67(17): 2 050-060.
- [2] Lu W, Tang Y, Zhang Z, et al. Inhibiting the mobilization of Ly6C(high) monocytes after acute myocardial infarction enhances the efficiency of mesenchymalstromal cell transplantation and curbs myocardial remodeling [J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(3): 587-597.
- [3] Motterlini R, Foresti R. Heme oxygenase-1 as a target for drug discovery [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(11): 1 810-826.
- [4] Haines DD, Lekli I, Teissier P, et al. Role of heme oxygenase-1 in resolution of oxidative stress-related pathologies: focus on cardiovascular, lung, neurological and kidney disorders [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2012, 204(4): 487-501.
- [5] Wenzel P, Rossmann H, Müller C, et al. Heme oxygenase-1 suppresses a pro-inflammatory phenotype in monocytes and determines endothelial function and arterial hypertension in mice and humans [J]. *Eur Heart J*, 2015, 36(48): 3 437-446.
- [6] Ferencik DA, Ramdas V, Spencer N, et al. Macrophages expressing heme oxygenase-1 improve renal function in ischemia/reperfusion injury [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(9): 1 706-713.
- [7] 向平, 宋银子, 陈沅, 等. 提高大鼠心肌梗死模型成功率及存活率的研究[J]. *第三军医大学学报*, 2008, 30(4): 329-332.
- [8] 任宁, 周欣, 李贺, 等. 激活的巨噬细胞心肌移植改善大鼠缺血再灌注引起的心肌梗死后心室重塑作用[J]. *基础医学与临床*, 2011, 31(11): 1 267-272.
- [9] 谭艳美, 孟磊, 汪江波, 等. 巨噬细胞极化与动脉粥样硬化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(2): 207-212.
- [10] 许秋莲, 杨阳, 田野. 巨噬细胞自噬在动脉粥样硬化中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(1): 97-100.
- [11] Mia S, Warnecke A, Zhang XM, et al. An optimized protocol for human M2 macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF- β yields a dominant immunosuppressive phenotype [J]. *Scand J Immunol*, 2014, 79(5): 305-314.
- [12] Epelman S, Liu PP, Mann DL. Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15: 117-129.
- [13] Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages [J]. *Immunity*, 2014, 41: 21-35.
- [14] Frangogiannis N G. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair [J]. *Circ Res*, 2012, 110(1): 159-173.
- [15] Xu F, Kang Y, Zhang H, et al. Akt1-mediated regulation of macrophage polarization in a murine model of staphylococcus aureus pulmonary infection [J]. *J Infect Dis*, 2013, 208(3): 528-538.
- [16] Ryter SW, Choi AM. Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation [J]. *Transl Res*, 2016, 167(1): 7-34.
- [17] Gazzin S, Vitek L, Watchko J, et al. A novel perspective on the biology of bilirubin in health and disease [J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22(9): 758-768.

(此文编辑 许雪梅)