

[文章编号] 1007-3949(2003)11-03-0185-04

• 实验研究 •

过氧化氢通过线粒体通路和死亡受体通路 诱导心肌细胞凋亡

肖卫民, 蒋碧梅, 石永忠, 刘梅冬, 唐道林, 王慷慨, 张华莉, 邓恭华, 肖献忠

(中南大学湘雅医学院病理生理学教研室, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 病理生理学; 心肌细胞内源性保护机制; 末端标记; 过氧化氢; 细胞凋亡; 线粒体信号通路; 死亡受体通路

[摘要] 为探讨氧化应激诱导心肌细胞凋亡的分子机制, 采用 0.5 mmol/L 过氧化氢作用于原代培养的新生大鼠心肌细胞。末端标记发现过氧化氢明显诱导心肌细胞凋亡; Caspase 活性定量检测及 Western-blot 发现 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 同时被激活; 而 Western-blot 及间接免疫荧光发现细胞色素 C 从线粒体释放入胞浆。以上结果提示, 氧化应激通过同时激活线粒体通路与死亡受体通路导致心肌细胞凋亡, 从而为临床防治与细胞凋亡相关的心血管疾病提供了新的信息。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Hydrogen Peroxide Induces Cardiomyocyte Apoptosis through both Mitochondria and Death Receptor Pathways

XIAO Wei-Min, JIANG Bi-Mei, SHI Yong-Zhong, LIU Mei-Dong, TANG Dao-Lin, WANG Kang-Kai, ZHANG Hua-Li, DENG Gong-Hua, and XIAO Xian-Zhong

(Department of Pathophysiology, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410078, China)

[KEY WORDS] Cardiomyocytes; Hydrogen Peroxide; Apoptosis; Mitochondria Pathway; Death Receptor Pathway; Caspase; Cytochrome C

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the mechanisms of cardiomyocyte apoptosis during the oxidative stress. **Methods** Apoptosis of neonatal rat cardiomyocytes was induced by exposure to 0.5 mmol/L hydrogen peroxide (H_2O_2) for different durations and apoptosis was determined by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotin dUTP nick-end labeling (TUNEL). The activities of caspase-3, 8, 9 were assayed by caspase colorimetric assay kit and Western blot. The release of cytochrome C from mitochondria was observed by indirect immunofluorescence and Western blot. **Results** Exposure to 0.5 mmol/L hydrogen peroxide for 24 h resulted in neonatal rat cardiomyocyte apoptosis as shown by TUNEL positivity. The activities of caspase-3, 8, 9 were significantly increased after 4 h of hydrogen peroxide treatment, and reached peak at 8~12 h. The release of cytochrome C from mitochondria to cytoplasm was observed after 1~2 h treatment of hydrogen peroxide. **Conclusions** Hydrogen peroxide could induce the release of cytochrome C from mitochondria to cytoplasm, the activation of caspase-3, 8, 9 and subsequent apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes, which means mitochondria and death receptor signal pathways are both involved in cardiomyocyte apoptosis induced by H_2O_2 .

活性氧在心肌缺血及缺血/再灌注损伤中的作用已受到广泛肯定^[1,2], 近年发现, 除了坏死, 细胞凋亡亦是心肌缺血及缺血/再灌注损伤时心肌细胞死亡的主要方式^[3]。细胞凋亡的发生机制目前认为主要有两条信号通路介导其发生, 一条是通过 Fas/FasL 及 TNF/TNFR 依次激活 Caspase-8 和 Caspase-3

的死亡受体通路; 另一条是通过线粒体的信号通路^[4], 即各种损伤因素通过促进线粒体释放细胞色素 C (cytochrome C) 等信号分子, 然后激活 Caspase-9 和 Caspase-3 而介导细胞凋亡的发生^[5]。该机制因细胞类型及损伤因素而异, 某些细胞可仅通过激活死亡受体信号通路而导致细胞凋亡(称为 iv 型细胞); 另一些细胞(如肝细胞), 由死亡受体激活的凋亡信号必须经过线粒体通路的放大, 才能导致细胞凋亡(称为 c^{c} 型细胞)^[6]。然而, 对于分化程度很高、线粒体含量十分丰富的心肌细胞, 在活性氧作用下凋亡如何发生, 目前所知甚少。本研究拟采用体外培养的新生大鼠心肌细胞为模型, 观察过氧化氢 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 作用下心肌细胞凋亡的发

[收稿日期] 2002-10-28 [修回日期] 2003-04-20

[基金项目] 国家自然科学基金(30000069; 30270533)、国家 973 重点项目(G2000056908)及教育部博士点专项基金(20020533032)资助

[作者简介] 肖卫民, 男, 1971 年出生, 湖南省辰溪县人, 讲师, 病理生理学博士研究生, 研究方向为心肌细胞内源性保护机制。肖献忠, 男, 1956 年出生, 湖南省新化县人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事分子心血管病学及败血症休克的机理研究, 为本文通讯作者, 联系电话: 0731-4805491, E-mail: xianzhongxiao@hotmail.com。

生及其主要凋亡信号通路的激活,从分子水平揭示活性氧所致心肌细胞凋亡的发生机制。

1 材料与方法

1.1 材料

新生 Wistar 大鼠由本校动物中心提供。TUNEL 试剂盒、各种二抗、免疫荧光试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自武汉博士德公司。Caspase 活化检测试剂盒、兔抗 Caspase-3、-8、-9 和兔抗细胞色素 C 购自 R&D 公司。各种细胞培养试剂购自 Gibco 公司。其他分子生物学试剂购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 心肌细胞培养和分组

无菌条件下取出新生大鼠(出生后 1~4 天)心脏,剪碎后用 0.1% 胰蛋白酶多次消化,制备成心肌细胞悬液,经贴壁 2 h 后分离纯化心肌细胞,将细胞浓度用含 18% 小牛血清的 DMEM 培养基调整为 $0.6 \times 10^6/L$ 后接种于细胞培养瓶,取生长 2 天的原代细胞进行实验。

实验随机分为 2 组(每组 2 瓶细胞,每个实验重复 3 次):正常对照组,心肌细胞中加入无血清 DMEM 培养基,置于 37℃、5% CO_2 培养箱中 4 h、8 h、12 h、18 h 和 24 h;④ H_2O_2 损伤组,心肌细胞中加入含 0.5 mmol/L H_2O_2 的无血清 DMEM 培养基,置于 37℃、5% CO_2 培养箱中 4 h、8 h、12 h、18 h 和 24 h。

1.3 Caspase 活性的定量检测

按试剂盒说明进行:收集细胞,每份样本加入 50 μL 细胞裂解液,冰上孵育 10 min,离心(10 000 r/min, 4℃, 5 min),取上清(其中 5 μL 用 Bradford 法作蛋白定量,读取 595 nm 吸光度值),再加入 50 μL 反应缓冲液和 5 μL Caspase 底物,37℃孵育 1.5 h,读取 405 nm 吸光度值。Caspase 活性 = $A_{405 nm}/A_{595 nm}$ 。

1.4 细胞线粒体及胞浆的分离

收集细胞(以下实验均在冰上操作),加入含 250 mmol/L 蔗糖的细胞裂解液,用匀浆器进一步裂解细胞,匀浆液于 4℃下 750 g 离心 10 min,取上清,再于 4℃下 10 000 g 离心 15 min,所得沉淀部分即为线粒体;上清继续于 4℃下 100 000 g 离心 1 h,所得上清即为胞浆。

1.5 免疫荧光细胞化学技术观察细胞色素 C 在细胞内的分布

细胞用 4% 多聚甲醛固定,0.1% Triton X-100 在膜上打孔,加入兔抗细胞色素 C 孵育 3 h,生物素标记的羊抗兔二抗孵育 1 h, Cy3(红色荧光)标记的链亲和素孵育 0.5 h,水溶性封片剂封片后在荧光显微

镜下观察细胞色素 C 在细胞内的分布。

1.6 末端标记

将培养在载玻片上的心肌细胞用 10% 中性福尔马林室温下固定 15 min,加蛋白酶 K 50 μL /片, 20℃~37℃消化 15 min;标本片加标记缓冲液 10 μL /片,室温放置 1 min。冰上取 TdT 和 DIG-dUTP 各 1 μL ,加入 8 μL 标记缓冲液中,混匀后加至标本片上, 10 μL /片, 37℃标记 1~2 h;加封闭液 50 μL /片,室温 20 min,加 Anti-DIG-AP 50 μL /片, 37℃ 30 min, BCIP/NBT 避光显色 10~30 min,用水溶性封片剂封片,镜检。细胞核中有蓝色颗粒者为阳性细胞,即凋亡的细胞。

1.7 Western blot

细胞先经冷 PBS 冲洗 3 遍,用加样缓冲液裂解细胞,100℃水浴 10 min 后,离心(10 000 g \times 10 min),收集上清,采用考马斯亮蓝法进行蛋白定量,制备好的蛋白样品置 -80℃冰箱保存备用。以 20 μg 蛋白/泳道上样,经 12% 聚丙烯酰胺凝胶 SDS-PAGE 电泳后,电转膜至硝酸纤维素膜。室温封闭 3 h,加一抗,室温下孵育 2 h,再加 HRP 标记的二抗,室温下孵育 1 h,采用 DAB 显色试剂盒进行显色约 2~5 min,待蛋白条带显色清晰时,中止反应,拍摄照片,记录实验结果。

1.8 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用 t 检验,多组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 过氧化氢诱导新生大鼠心肌细胞凋亡

正常心肌细胞的胞核未被染色,而 H_2O_2 (0.5 mmol/L) 损伤 24 h 可见许多心肌细胞的体积缩小,核固缩且被蓝色深染(即凋亡细胞)(图 1, Figure 1)。且 H_2O_2 损伤组的凋亡百分率(9.82% \pm 1.08%)明显高于正常对照组(2.03% \pm 0.58%)。

2.2 线粒体通路及死亡受体通路在过氧化氢所致心肌细胞凋亡中的作用

Caspase 活性定量检测发现,0.5 mmol/L H_2O_2 作用心肌细胞 4 h 后, Caspase-3、-8 和 -9 的活性均明显增高,其中 12 h 时达高峰,持续至 24 h 以上(表 1, Table 1)。

Western blot 发现,正常时心肌细胞中的 Caspase-3、-8 和 -9 均以无活性的前体形式存在。0.5 mmol/L H_2O_2 作用 4 h 后,分别形成 11、20 和 10 kDa 的片段,表明它们均被激活,12 h 形成的活性片段条

带最明显,持续至 24 h,与 Caspase 活性定量检测的结果一致。

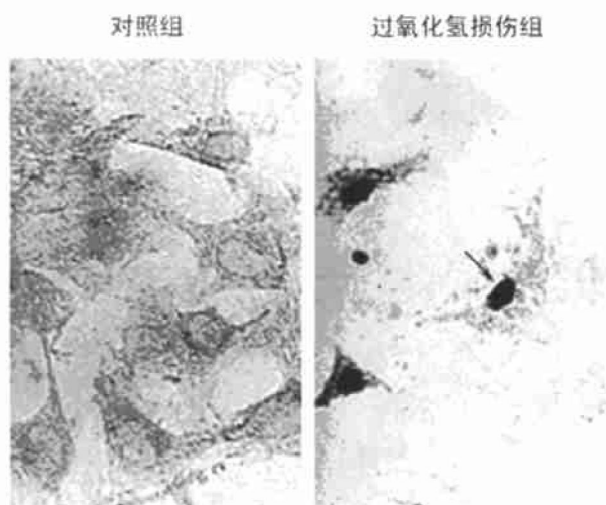


图 1. TUNEL 发现过氧化氢(0.5 mmol/L, 24 h)诱导原代培养大鼠心肌细胞凋亡 →: 所指为阳性细胞。

Figure 1. TUNEL showed neonatal rat cardiomyocyte apoptosis induced by H_2O_2 (0.5 mmol/L, 24 h)

表 1. 过氧化氢(0.5 mmol/L)作用原代培养大鼠心肌细胞不同时间 Caspase-3、-8 和-9 活化情况 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 1. H_2O_2 (0.5 mmol/L) induced the activation of Caspase-3, 8, 9 in neonatal rat cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

作用时间	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9
0 h	1.02 ± 0.02	0.97 ± 0.04	1.04 ± 0.03
4 h	2.09 ± 0.24 ^a	1.46 ± 0.13 ^a	1.59 ± 0.18 ^a
8 h	2.08 ± 0.28 ^a	1.91 ± 0.21 ^a	1.56 ± 0.15 ^a
12 h	2.23 ± 0.32 ^a	1.92 ± 0.19 ^a	2.09 ± 0.22 ^a
18 h	1.70 ± 0.15 ^a	1.78 ± 0.17 ^a	1.67 ± 0.11 ^a
24 h	1.62 ± 0.11 ^a	2.66 ± 0.33 ^a	1.11 ± 0.09 ^a

与 0 h 比较, a: $P < 0.01$ 。

2.3 过氧化氢对大鼠心肌细胞中细胞色素 C 释放的影响

通过差速离心法分离心肌细胞胞浆和线粒体成分作 Western blot 检测显示,细胞色素 C 在正常心肌细胞中主要分布于线粒体,胞浆中未检测到。而 0.5 mmol/L H_2O_2 处理心肌细胞 1 h,即可见胞浆中细胞色素 C 的含量明显增多,而线粒体中细胞色素 C 则明显减少。2 h 后细胞色素 C 主要位于胞浆中(图 2, Figure 2)。

间接免疫荧光观察发现,正常状态下,心肌细胞中的细胞色素 C 主要以点状形式分布,表明它主要分布于细胞器中。0.5 mmol/L H_2O_2 处理 2 h 后,细胞色素 C 则均匀分布于整个细胞中,表明它向细胞胞浆移位(图 3, Figure 3),与上述 Western blot 的结果一致。

3 讨论

缺血性心脏病、心肌缺血/再灌注损伤、心肌炎、心肌病和慢性心力衰竭等心脏疾病引起心功能下降的主要原因包括 2 个方面:一方面是由于心肌细胞数目减少(由心肌细胞死亡引起),另一方面是由于残存的心肌细胞功能下降^[7]。由于长期以来认为心肌细胞是终末分化细胞,既不再生,亦无凋亡,因此以往的研究常常只强调心肌细胞坏死导致的心肌细胞数目下降在上述心脏疾病发生中的重要性,而忽视了细胞凋亡的作用。直到九十年代中期才发现心肌细胞凋亡亦是导致心功能下降的主要原因之一^[8]。本实验采用 H_2O_2 处理培养的新生大鼠心肌细胞,通过 TUNEL 观察到大量细胞凋亡,进一步证实了心肌氧化应激损伤中细胞凋亡的发生。

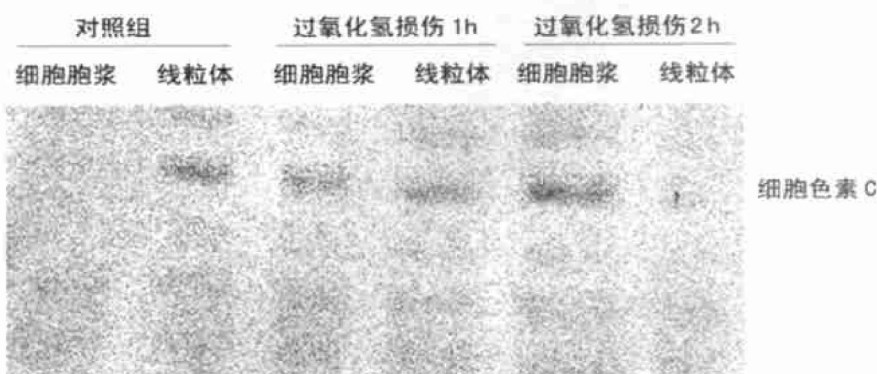


图 2. Western blot 示过氧化氢(0.5 mmol/L)所致原代培养大鼠心肌细胞线粒体细胞色素 C 释放

Figure 2. Western blot demonstrated the release of cytochrome C from neonatal rat cardiomyocyte induced by H_2O_2 (0.5 mmol/L)

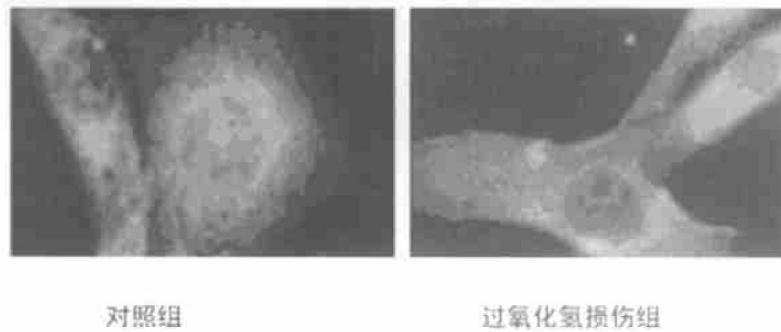


图 3. 间接免疫荧光示过氧化氢(0.5 mmol/L, 2 h)导致心肌细胞线粒体细胞色素 C 的释放

Figure 3. Indirect immunofluorescence demonstrated the release of cytochrome C from mitochondria to cytosol in neonatal rat cardiomyocytes induced by H_2O_2 (0.5 mmol/L, 2 h)

对于细胞凋亡的机制研究, 目前提出了 2 条信号通路, 即线粒体信号通路与死亡受体通路^[2]。缺血/再灌注损伤所致的心肌细胞凋亡中上述通路发挥何种作用, 目前仍不清楚。以往的研究仅从线粒体信号通路^[9]或死亡受体通路^[10]分别进行探讨, 而未阐明它们是同时还是分别起作用, 本实验通过 H_2O_2 作用培养的新生大鼠心肌细胞, 观察到代表线粒体信号通路的 Caspase-9 与代表死亡受体通路的 Caspase-8 均被同时激活, 说明这两条通路都参与 H_2O_2 所致的心肌细胞凋亡, 据此可将心肌细胞归为 $\text{C}\text{--}\text{E}$ 型细胞。至于氧化应激如何激活线粒体信号通路, Wei 等^[11]证明, 它可使线粒体膜通透性转换孔开放, 从而导致位于线粒膜间的细胞色素 C 等促凋亡因子释放, 后者与凋亡蛋白酶活化因子 1 (apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1) 结合, 并募集 Caspase-9 形成凋亡复合物, 再激活下游的 Caspase-3, 引起细胞凋亡^[12]。本实验通过动态观察发现, 在 H_2O_2 所致的线粒体信号通路激活中, 细胞色素 C 从线粒体释放 (2 h) 早于 Caspase-9 和 3 的活化 (4 h), 即细胞色素 C 的释放导致了 Caspase-9, 3 的依次活化, 从而在心肌细胞中揭示了氧化应激激活线粒体信号通路的分子机制。关于氧化应激对死亡受体通路的活化, Facchinetti 等^[13]证明, H_2O_2 是通过诱导 Fas 及其配体的表达增高而实现的。至于在细胞凋亡中, 线粒体信号通路与死亡受体通路之间是否有联系, Luo 等^[14]于 1998 年发现了一种新的促凋亡 Bcl-2 家族成员 Bid, 当死亡受体通路中的 Caspase-8 活化时可切断胞浆中的 Bid 形成 tBid, 后者向线粒体移位, 引起细胞色素 C 等的释放, 从而将死亡受体通路与线粒体通路联系起来。但在氧化应激所致

的心肌细胞凋亡中, 尚未见这方面的报道, 因此, 阐明氧化应激所致心肌细胞凋亡这两条通路的相互关系, 是我们今后的努力方向。

[参考文献]

- [1] Lefer DJ, Granger DN. Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med*, 2000, **109** (4): 315-323
- [2] 丁志山, 沃兴德. 细胞凋亡与动脉粥样硬化. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6** (1): 69-72
- [3] Bromme HJ, Holtz J. Apoptosis in the heart: when and why? *Mol Cell Biochem*, 1996, **163/164**: 261-275
- [4] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000, **407** (12): 770-776
- [5] Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 2001, **15** (22): 2 922-933
- [6] Honglin Li, Hong Zhou, Chirjie Xu, Yuan J. Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 1998, **94**: 491-501
- [7] Hinescu ME. Cardiac apoptosis: from organ failure to allograft rejection. *J Cell Mol Med*, 2001, **5** (2): 143-152
- [8] Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa T, Kasajima T, et al. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res*, 1994, **75** (3): 426-433
- [9] Crow MT. Hypoxia, Bnip3 proteins, and the mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circ Res*, 2002, **91** (3): 183-185
- [10] Das DK. Redox regulation of cardiomyocyte survival and death. *Antioxid Redox Signal*, 2001, **3** (1): 23-37
- [11] Wei YH, Lee HC. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med*, 2002, **227** (9): 671-682
- [12] Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 1997, **91** (4): 479-489
- [13] Facchinetti F, Furegato S, Terrazzino S, Leon A. H_2O_2 induces upregulation of Fas and Fas ligand expression in NGF-differentiated PC12 cells: modulation by cAMP. *J Neurosci Res*, 2002, **69** (2): 178-188
- [14] Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 1998, **94** (4): 481-490

(此文编辑 朱雯霞)