

[文章编号] 1007-3949(2003)11-04-0283-04

•实验研究•

从凋亡信号通路探讨热休克蛋白保护过氧化氢所致心肌细胞凋亡的机制

肖卫民, 蒋碧梅, 石永忠, 刘梅冬, 唐道林, 夏珂, 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; Western blot; 热休克蛋白; 过氧化氢; 细胞凋亡; 线粒体信号通路

[摘要] 为探讨热休克蛋白保护过氧化氢所致心肌细胞凋亡的分子机制, 采用热休克对原代培养的新生大鼠心肌细胞进行预处理, 以诱导热休克蛋白的表达, 观察热休克蛋白对过氧化氢所致心肌细胞凋亡的保护作用。结果发现, 热休克预处理导致心肌细胞热休克蛋白 70 及 α B-晶状体蛋白表达明显增加, 同时显著抑制过氧化氢所致细胞色素 C 从线粒体释放, 抑制 Caspase-8、Caspase-9 和 Caspase-3 活化及随后的心肌细胞凋亡。以上结果提示, 热休克蛋白通过抑制线粒体信号通路与死亡受体通路的活化保护过氧化氢导致的心肌细胞凋亡, 为临床防治心血管疾病提供了新的信息。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Heat Shock Proteins Protect Cardiomyocytes against Apoptosis Induced by Hydrogen Peroxide through Interference with Two Signal Transduction Pathways

XIAO Wei-Min, JIANG Bi-Mei, SHI Yong-Zhong, LIU Mei-Dong, TANG Dao-Lin, XIA Ke, 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] Heat Shock Proteins; Hydrogen Peroxide; Apoptosis; Mitochondria Pathway; Cardiomyocytes; Death Receptor Pathway; Western blot

[ABSTRACT] **Aim** To explore the mechanisms that heat shock proteins protected cardiomyocytes against apoptosis induced by hydrogen peroxide (H_2O_2). **Methods** The expression of heat shock protein 70 and α B-crystallin in neonatal rat cardiomyocytes were induced by heat shock response (42 °C, 1 h, and recovery for different durations). Cardiomyocyte apoptosis induced by 0.5 mmol/L hydrogen peroxide (H_2O_2) was determined by flow cytometric analysis. The activities of caspase-3, caspase-8, caspase-9 were assayed by caspase colorimetric assay kit and Western blot. The release of cytochrome C from mitochondria was observed by isolation of cellular components and Western blot. **Results** The expression of HSP70 and α B-crystallin in neonatal rat cardiomyocytes significantly increased at 3 h and reached peak at 6~12 h after heat shock response. Heat shock response could inhibit H_2O_2 -induced release of cytochrome c from mitochondria to cytoplasm, activation of caspase-3, caspase-8, caspase-9, and subsequent apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes. **Conclusions** HSPs protected cardiomyocytes from apoptosis by inhibiting the activation of both mitochondrial and death receptor pathways.

我室最近研究证明, 在过氧化氢所致的原代培养大鼠心肌细胞凋亡中, 以 Caspase-8 活化为代表的死亡受体通路与以细胞色素 C 释放及 Caspase-9 活化为代表的线粒体信号通路均同时被激活^[1]。热休克蛋白(heat shock protein, HSP) 是细胞在生理状态下必需而在应激状态(特别是热应激)时表达增多的

一类保护性蛋白质。近年的研究表明, 采用各种因素诱导 HSP 表达增加后可抑制细胞凋亡的发生^[2]。我室肖献忠等^[3]采用热休克转录因子 1 基因剔除小鼠胚胎成纤维细胞, 证明 HSP 具有明显保护细胞凋亡的作用。然而, HSP 保护细胞凋亡的机制尚不清楚, 是否通过干预死亡受体通路或线粒体信号通路而抑制细胞凋亡的发生尚有待于进一步证实。本研究拟通过热休克诱导新生大鼠心肌细胞热休克蛋白的表达, 在此基础上观察热休克蛋白对过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)所致心肌细胞凋亡的保护作用并探讨其与死亡受体信号通路及线粒体信号通路的关系。

[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, 为本文通讯联系人, 联系电话: 0731-4805491, E-mail: xianzhongxiao@hotmail.com。

1 材料与方法

1.1 材料

新生 Wistar 大鼠(出生后 1~4 天),雌雄不限,由本校动物中心提供。 H_2O_2 由上海桃浦化学试剂厂产;各种二抗和 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。兔抗 HSP70 和 αB -晶状体蛋白购自 Stressgen 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 细胞热休克预处理

将细胞培养瓶塞紧,用塑料袋将其密封后置于 42°C 超级恒温器中 1 h,取出后置于 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中分别恢复 3 h、6 h、12 h、18 h 和 24 h 后用于实验。

1.3 实验分组

体外培养的大鼠心肌细胞随机分为 3 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°C 、5% CO_2 培养箱中培养 4 h、8 h、12 h、18 h 和 24 h; ④ H_2O_2 损伤组(H_2O_2 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°C 、5% CO_2 培养箱中培养 4 h、8 h、12 h、18 h 和 24 h; ④热休克预处理后 H_2O_2 损伤组(HSR+ H_2O_2 组),培养的心肌细胞置于 42°C 超级恒温器中 1 h,然后在 37°C 、5% CO_2 培养箱中恢复 12 h,然后同 H_2O_2 损伤组处理步骤。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡

收集细胞, PBS 洗一次,于 4°C 75% 乙醇中固定。1 000 g 离心 10 min,弃乙醇,用 PBS 洗 2 次,加入终浓度为 100 mg/L 的 RNA 酶,于 37°C 孵育 1 h。加入终浓度为 5 mg/L 的溴化乙锭,冰浴中避光染色 30 min,在流式细胞仪上分析。

1.5 其他

新生 Wistar 大鼠心肌细胞培养、Caspase 活性的定量检测、细胞线粒体和胞浆的分离以及 Western blot 等按本实验室常规方法进行^[1]。

1.6 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 热休克预处理对原代培养的大鼠心肌细胞热

休克蛋白合成的影响

Western blot 显示心肌细胞经热休克预处理并恢复 3 h 后,热休克蛋白 70 和 αB -晶状体蛋白即有明显增加,6~12 h 达高峰,持续至 24 h(图 1, Figure 1)。

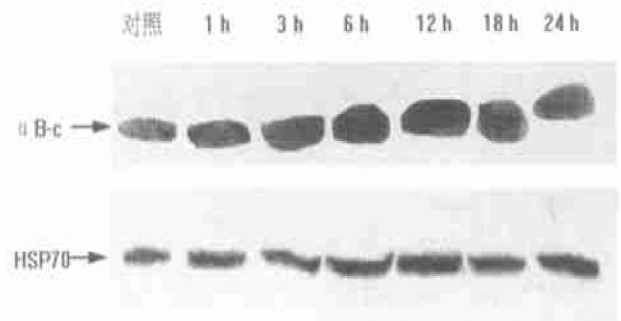


图 1. 热休克预处理对大鼠心肌细胞 αB -晶状体蛋白和热休克蛋白 70 合成的影响 细胞于 42°C 热休克预处理 1 h 后分别恢复 1 h、3 h、6 h、12 h、18 h 和 24 h。 αB -c: αB -晶状体蛋白。

Figure 1. Western blot showed the expression of αB -crystallin and HSP70 in neonatal rat cardiomyocytes induced by heat shock response

2.2 热休克预处理保护过氧化氢所致的大鼠心肌细胞凋亡

图 2(Figure 2) 为流式细胞术检测心肌细胞凋亡结果,其中横坐标代表 DNA 相对含量,纵坐标代表细胞数。图中最高峰为 G1 期。当细胞凋亡时,由于 DNA 降解,在图 2 中出现低于 G1 期 DNA 含量的凋亡峰(箭头所指),它的高低代表凋亡细胞的多寡。正常心肌细胞几乎不见凋亡峰,0.5 mmol/L H_2O_2 处理 24 h 则出现明显的凋亡峰,而热休克预处理后再加 H_2O_2 ,则凋亡峰又明显减低。统计学处理显示,正常心肌细胞的凋亡百分率为 $2.03\% \pm 0.58\%$, H_2O_2 损伤组心肌细胞凋亡百分率为 $9.82\% \pm 1.09\%$,较正常对照组明显增高($P < 0.01$);而热休克预处理组心肌细胞凋亡百分率为 $5.48\% \pm 2.43\%$,较 H_2O_2 损伤组明显减少($P < 0.01$)。

2.3 热休克蛋白对过氧化氢所致心肌细胞 Caspase 活化的影响

当 0.5 mmol/L H_2O_2 作用 12 h, Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 活性较正常心肌细胞明显增高($P < 0.01$);当心肌细胞经热休克预处理后再暴露于 H_2O_2 时,上述 Caspase 活性与 H_2O_2 组比较明显降低($P < 0.01$)(表 1, Table 1)。

Western blot 显示,正常对照组心肌细胞中的 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 均以无活性的前体

形式存在。0.5 mmol/L H₂O₂ 作用 4 h 后, 分别形成 11 kDa、20 kDa 和 10 kDa 的片段, 表明它们均被激活。至 12 h 形成的活性片段条带最明显, 持续至 24

h。而热休克预处理组形成的活性片段在各个时间点均较 H₂O₂ 组明显减少, 与 Caspase 活性定量检测的结果一致。

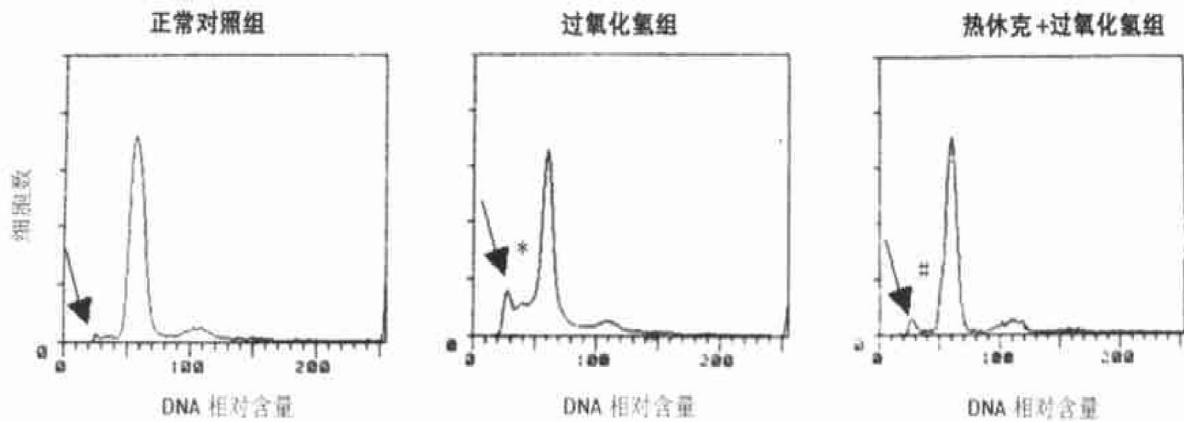


图 2. 流式细胞术显示热休克预处理保护过氧化氢(0.5 mmol/L, 24 h)所致的大鼠心肌细胞凋亡 (n=6) →: 所指为凋亡峰。
*: P < 0.01, 与对照组比较; #: P < 0.01, 与过氧化氢组比较。

Figure 2. Flow cytometry demonstrated the protective role of heat shock response against neonatal rat cardiomyocyte apoptosis induced by H₂O₂ (0.5 mmol/L, 24 h) (n=6) →: the number of apoptotic cells

表 1. 热休克预处理抑制过氧化氢所致原代培养大鼠心肌细胞 Caspase 3、8 和 9 活化 (x̄ ± s, n=5)

Table 1. Heat shock response inhibited the activation of Caspase 3, 8, 9 in neonatal rat cardiomyocytes induced by H₂O₂ (x̄ ± s, n=5)

分 组	Caspase 3	Caspase 8	Caspase 9
正常对照组	0.63 ± 0.12	0.88 ± 0.10	0.70 ± 0.06
过氧化氢组	1.54 ± 0.13 ^a	1.86 ± 0.19 ^a	1.61 ± 0.07 ^a
热休克预处理组	1.04 ± 0.14 ^b	1.19 ± 0.00 ^b	0.98 ± 0.03 ^b

P < 0.01, a: 与正常对照组比较; b: 与过氧化氢组比较。

2.4 热休克蛋白对过氧化氢所致心肌细胞线粒体细胞色素 C 释放的影响

Western blot 检测发现, 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 H₂O₂ 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, 而在线粒体中的含量则明显减少, 2 h 后细胞色素 C 主要位于胞浆中; 热休克预处理则可明显抑制细胞色素 C 从线粒体向胞浆的移位(图 3, Figure 3)。

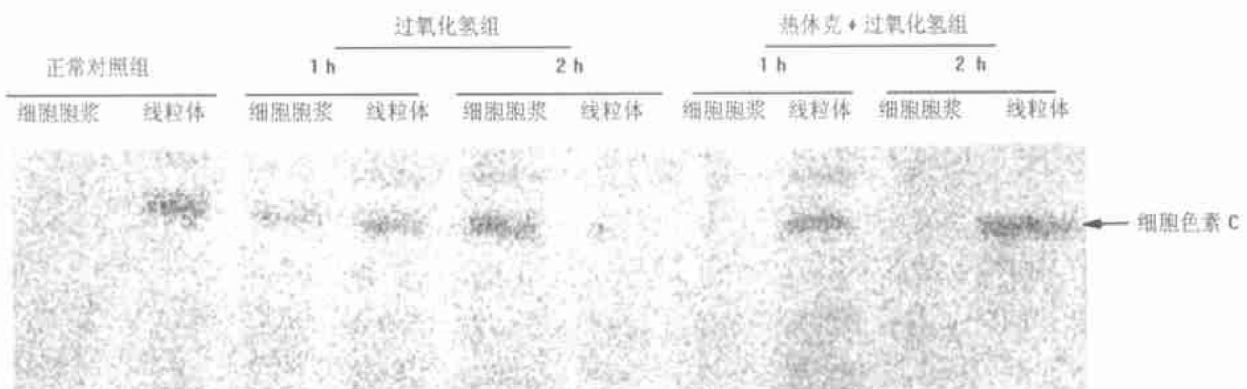


图 3. Western blot 结果显示热休克预处理抑制过氧化氢(0.5 mmol/L)所致大鼠心肌细胞线粒体细胞色素 C 的释放

Figure 3. Western blot demonstrated that heat shock response inhibited the release of cytochrome C from neonatal rat cardiomyocytes induced by H₂O₂ (0.5 mmol/L)

3 讨论

热休克蛋白是细胞在高温、多种物理化学及生物应激原作用下表达增多的一组蛋白质,它广泛存在,结构保守,具有重要的分子伴侣(molecular chaperone)功能,即能帮助蛋白质折叠及移位,防止蛋白质聚集,帮助变性蛋白质的解聚及复性,促进严重受损蛋白质的降解等,因而在细胞保护中具有重要的作用^[4]。

我室以往的研究证明,通过热休克预处理诱导热休克蛋白表达,可抑制过氧化氢所致心肌细胞的坏死^[5]。我室最近的工作揭示,死亡受体信号通路 & 线粒体信号通路均参与了过氧化氢所致的心肌细胞凋亡^[11],本实验在此基础上,通过流式细胞术检测发现,热休克预处理在诱导热休克蛋白 70 及 α B-晶状体蛋白表达的同时,抑制了过氧化氢所致的心肌细胞凋亡;通过 Caspase 活性定量检测及 Western blot 发现,热休克预处理抑制过氧化氢对 Caspase-3、-8 和 -9 的活化及线粒体中细胞色素 C 的释放。由于死亡受体通路的激活是通过肿瘤坏死因子超家族的受体(如 TNF 受体和 Fas 等)与其相应的配体结合,然后活化 Caspase-8 完成的;而线粒体信号通路的激活是通过线粒体释放细胞色素 C 等促凋亡蛋白,然后活化 Caspase-9 完成的,两条通路均通过激活 Caspase-3 导致细胞凋亡^[6]。因此,本实验的结果说明,热休克蛋白通过抑制上述 2 条通路的活化而保护过氧化氢所致的心肌细胞凋亡。

关于热休克蛋白保护细胞凋亡的研究,国外有学者分别采用肿瘤细胞、淋巴细胞及胚胎成纤维细胞等哺乳动物细胞为模型,发现热休克蛋白可干扰多个凋亡相关信号分子,特别是干预线粒体信号通路而抑制细胞凋亡发生。如 Mosser 等^[7]发现,热休克蛋白 70 可抑制热应激所致的细胞色素 C 从线粒体的释放,并能与凋亡蛋白酶活化因子 1 (apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1) 的 Caspase 募集结构域直接结合,抑制凋亡蛋白酶活化因子 1 的寡聚化及 Caspase-9 的活化^[8]。热休克蛋白 70 还可与线粒体释放的凋亡诱导因子 (apoptosis-inducing factor, AIF) 直接结合,抑制其介导的 Caspase 非依赖性细胞

凋亡^[9]。热休克蛋白 90 能与凋亡蛋白酶活化因子 1 结合并形成复合物,从而抑制细胞色素 C 介导的凋亡蛋白酶活化因子 1 寡聚化及 Caspase-9 的活化^[10]。热休克蛋白 27/25 可与从线粒体释放的细胞色素 C 结合,防止 Caspase-9 的活化,并与 Caspase-3 直接结合而抑制其活化^[11]。另一种小分子热休克蛋白 α B-晶状体蛋白可与 Caspase-3 活化中间产物 P24 结合而抑制后者的活化^[12]。

本实验发现,热休克蛋白通过同时抑制线粒体信号通路 & 死亡受体通路而保护过氧化氢所致的心肌细胞凋亡,在国际上尚属首次报道,具有重要的理论意义。

[参考文献]

- [1] 肖卫民, 蒋碧梅, 石永忠, 刘梅冬, 唐道林, 肖献忠, 等. 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. 中国动脉硬化杂志, 2003, **11** (3): 185-188
- [2] Samali A, Orrenius S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress & Chaperones*, 1998, **3** (4): 228-236
- [3] McMillan DR, Xiao X, Shao L, Graves K, Benjamin JJ. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J Biol Chem*, 1998, **273** (13): 7 523-528
- [4] 工慷慨, 邓恭华, 肖卫民, 赵振宇, 蒋磊, 肖献忠, 等. 热休克蛋白 70 对过氧化氢所致心肌细胞核仁损伤的保护作用. 中国动脉硬化杂志, 2002, **10** (5): 384-388
- [5] 肖卫民, 袁开宇, 肖献忠. α B-晶状体蛋白在保护过氧化氢损伤所致心肌细胞损伤中的作用. 湖南医科大学学报, 2000, **25** (3): 223-226
- [6] Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 2001, **15** (22): 2 922-933
- [7] Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI. The chaperone function of HSP70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 2000, **20** (19): 7 146-159
- [8] Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by HSP70. *Nat Cell Biol*, 2000, **2** (8): 476-483
- [9] Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maisse C, Daugas E, Zamzami N. Heat shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol*, 2001, **3** (9): 839-843
- [10] Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J*, 2000, **19** (16): 4 310-322
- [11] Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome C. *Nat Cell Biol*, 2000, **2** (9): 645-652
- [12] Kamradt MC, Chen F, Cryns VL. The small heat shock protein α B-crystallin negatively regulates cytochrome c and caspase-8-dependent activation of caspase-3 by inhibiting its autoproteolytic maturation. *J Biol Chem*, 2001, **276** (19): 16 059-063

(此文编辑 朱雯霞)