

[文章编号] 1007-3949(2004)12-02-0125-06

• 实验研究 •

热休克预处理抑制过氧化氢所致 C2C12 肌原细胞释放天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶激活物及细胞凋亡

蒋碧梅, 肖卫民, 石永忠, 刘梅冬, 唐道林, 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] 病理学与病理生理学; 肌原细胞内源性保护机制; 热休克预处理; 热休克蛋白; 凋亡, 肌原细胞; 第二种线粒体; 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶激活物; 过氧化氢

[摘要] 为探讨热休克预处理对过氧化氢所致 C2C12 肌原细胞凋亡和第二种线粒体释放的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶激活物从线粒体释放的影响, 采用 0.5 mmol/L 过氧化氢作用于 C2C12 肌原细胞。Hoechst33258 荧光染色, 观察细胞形态学改变并计算凋亡百分率, 抽提 DNA 作琼脂糖电泳, 以确定细胞凋亡情况。采用天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶活性定量检测试剂盒及蛋白质印迹观察天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 9 的活化情况。采用免疫荧光及细胞成分分离后蛋白质印迹检测第二种线粒体释放的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶激活物从线粒体的释放。结果发现, 过氧化氢处理 1~2 h, 第二种线粒体释放的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶激活物逐渐从线粒体释放入胞浆; 处理 4 h 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 9 活性升高, 12 h 达高峰; 处理 24 h 细胞明显出现凋亡, 凋亡百分率明显升高。热休克预处理可诱导 C2C12 肌原细胞中热休克蛋白 90, 热休克蛋白 70 及 α B 晶状体蛋白的表达增高; 抑制第二种线粒体释放的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶激活物释放、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 9 的活化及细胞凋亡的发生。结果提示, 线粒体信号通路在过氧化氢所致的心肌细胞凋亡中发挥重要作用; 热休克预处理通过抑制上述通路而减轻过氧化氢所致的细胞凋亡, 其机制与其诱导热休克蛋白表达、阻断第二种线粒体释放的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶激活物从线粒体向胞浆释放、从而抑制天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 9 的活化有关。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

Heat Shock Pretreatment Inhibits the Second Mitochondria-derived Activator of Caspases Release from Mitochondria and Apoptosis of C2C12 Myogenic Cells Induced by Hydrogen Peroxide

JINAG Bi-Mei, XIAO Wei-Min, SHI Yong-Zhong, LIU Mei-Dong, TANG Dao-Lin, and XIAO Xian-Zhong

(Department of Pathophysiology, Xiangya Medical College, Central-south University, Changsha, Hunan 410078, China)

[KEY WORDS] The Second Mitochondria-derived Activator of Caspases; Apoptosis; C2C12 Myogenic Cells; Heat Shock Pretreatment; Hydrogen Peroxide; Caspases; Heat Shock Protein

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of heat shock pretreatment on hydrogen peroxide (H_2O_2)-induced apoptosis and the second mitochondria-derived activator of caspases (Smac) release from mitochondria in C2C12 myogenic cells. **Methods**

After heat shock pretreatment (42 °C 1 h, recover 12 h), C2C12 myogenic cells were exposed to H_2O_2 (0.5 mmol/L) for 6 h, 12 h, 24 h, and 36 h respectively. The apoptotic morphological changes and percentage of apoptotic nuclei of C2C12 myogenic cells were analyzed. Caspase-3, Caspase-9 activities were assayed by caspase colorimetric assay kit and Western blot. Inducible heat shock proteins were detected using Western blot analysis. The release of Smac from mitochondria to cytoplasm was observed by Western blot and immunofluorescence analysis. **Results** After treated with H_2O_2 (0.5 mmol/L), a marked increase of mitochondrial Smac release, activation of caspase-9, caspase-3 and apoptosis were observed respectively in C2C12 myogenic cells.

④Heat shock pretreatment induced expression of HSP70, HSP90, α B-crystallin and inhibited H_2O_2 -mediated Smac release from mitochondria, and inhibited the activation of caspase-9, caspase-3 and subsequent apoptosis. **Conclusions** Heat shock pretreatment could protect C2C12 myogenic cells against H_2O_2 -induced apoptosis, and its mechanism might involve heat shock proteins expression and inhibition of Smac release from mitochondria.

[收稿日期] 2003-04-14 [修回日期] 2004-01-07

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

[作者简介] 蒋碧梅, 硕士, 主要从事心血管内源性保护机制及凋亡机制方面的研究, 联系电话为 0731-2355906; E-mail 为 jiangbimei@163.com。肖卫民, 博士, 讲师, 主要从事心血管内源性保护机制及凋亡机制方面的研究。肖献忠, 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, 联系电话为 0731-2355019, E-mail 为 xianzhongxiao@hotmail.com。

心肌细胞凋亡可见于多种心血管疾病的病理过程,如心肌缺血、再灌注损伤、心肌病、心力衰竭等。不少研究表明,活性氧的产生是导致心肌细胞凋亡的重要原因之一^[1]。探讨心肌凋亡的发生机制及干预措施可能为上述疾病的防治提供新的思路。近年来研究发现,热休克预处理(heat shock pretreatment, HS)可通过诱导热休克蛋白(heat shock protein, HSP)的表达,从而调动心肌内源性保护潜能,明显减轻多种损伤所致心肌细胞的凋亡,但对其作用机制仍未完全明了。第二种线粒体释放的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶激活物(second mitochondria derived activator of caspases, Smac)^[2,3]是2000年新发现的一种促凋亡分子。在正常状态下,Smac位于线粒体膜间隙。在凋亡发生过程中,Smac由线粒体释放入胞浆,与细胞中的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)结合并解除其对天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(aspartate-specific cysteinyl proteinase, Caspase)的抑制作用,从而使Caspase-3和Caspase-9活性增强,促进细胞凋亡发生^[4]。Smac在心肌组织中含丰富,但它是否参与活性氧所致的心肌细胞凋亡以及HS是否通过干预Smac在过氧化氢(H₂O₂)所致C2C12肌原细胞凋亡中的作用,并探讨HS对Smac从线粒体释放、Caspase-3和Caspase-9活化及心肌细胞凋亡的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

C2C12肌原细胞由本校细胞中心提供。DMEM培养基为Gibco公司产品;无支原体小牛血清为杭州四季青生物工程公司产品;十二烷基磺酸钠、琼脂糖、Hoechst3258、辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠IgG或羊抗兔IgG均为Sigma公司产品;蛋白酶K为生命技术公司产品;丙烯酰胺、N-N'-亚甲基双丙烯酰胺为Fluka公司产品;鼠抗HSP70多克隆抗体、鼠抗HSP90多克隆抗体和兔抗αB-晶状体蛋白多克隆抗体均为Stressgen公司产品;兔抗Caspase-3、Caspase-9多克隆抗体、兔抗Smac多克隆抗体和Caspase活性定量检测试剂盒均为R&D公司产品;二硫苏糖醇、过硫酸胺、TEMED和硝酸纤维膜均为Promega公司产品;SABC免疫荧光染色试剂盒和DAB显色试剂盒为博士德生物工程公司产品;DNA“梯状”条带试剂盒为BD Biosciences公司产品。

1.2 C2C12肌原细胞培养

用含15%小牛血清的DMEM,在37℃、5%CO₂

细胞培养箱中培养。

1.3 H₂O₂浓度测定

按Spitz等^[5]报道的方法,在紫外分光光度计测A240值后,按公式:H₂O₂(mmol/L) = A240 × 1000/39.4计算。

1.4 细胞热休克预处理

将细胞置42℃水浴中1h,再放37℃、5%CO₂细胞培养箱中恢复12h后用于实验。

1.5 凋亡特征形态学观察及凋亡百分率计算

常规细胞涂片、固定,Hoechst33258染色后封片,荧光显微镜下,正常细胞核呈弥散均匀荧光,凋亡细胞则表现为浓染致密的颗粒块状荧光。观察后进行显微照相并计数500个细胞核,计算凋亡核百分率:凋亡核百分率 = 凋亡细胞核数/500 × 100%。

1.6 Western-blot

用SDS加样缓冲液裂解细胞,收集细胞蛋白质,采用Bradford法进行蛋白定量,制备好的蛋白样品置-80℃冰箱保存备用。以每泳道20μg蛋白上样,经电泳后,电转膜至硝酸纤维膜。先后加入羊抗HSP70多克隆抗体,或兔抗αB-晶状体蛋白抗体,或羊抗HSP90抗体,或兔抗Caspase-3、Caspase-9多克隆抗体,或兔抗Smac多克隆抗体,及辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠或羊抗兔IgG孵育。DAB显色试剂盒进行显色,拍摄照片,记录实验结果。

1.7 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3和9活性检测

按照Caspase活性定量检测试剂盒说明书进行。每1 × 10⁶个细胞加裂解液50μL在冰上裂解10min,在4℃12000g离心1min,取5μL上清液进行蛋白定量,测定A595值;另45μL加50μL2倍稀释的反应缓冲液及5μL反应底物,37℃孵育1h,分光光度计测吸光度值(A405),再计算Caspase-3和Caspase-9活性(活性 = A405值/A595值)。

1.8 细胞线粒体及胞浆组分分离

将细胞用冰冷的PSB洗2次,用3倍体积的缓冲液A悬浮细胞,冰上放置10min,匀浆30次,先将匀浆液在4℃用750g离心2次,每次10min,取上清液,将上清液在4℃用10000g离心15min,所得沉淀为线粒体组分,上清液为胞浆组分,贮存于-70℃备用。

1.9 Smac免疫荧光法检测

按照博士德生物工程公司提供的SABC-CY3免疫荧光染色试剂盒说明书进行。细胞用4℃预冷的4%多聚甲醛固定20min,用封闭液封闭过夜。加一抗2h后用PBS漂洗3次,每次5min,加二抗1h,再

用 PBS 漂洗,方法同前,加 SABC 30 min,用 PBS 漂洗干净后封片,于荧光显微镜下观察并拍照。

1.10 DNA“梯状”条带检测

按照 BD Biosciences 公司提供的操作说明书进行。收集细胞后,用细胞裂解液裂解细胞,抽提基因组 DNA,于分光光度计定量。取 0.5 μ g 基因组 DNA,加入 35 μ L 连接缓冲液,16 $^{\circ}$ C 反应 14 h。再取含 150 ng 基因组 DNA 的连接混合液置聚合酶链反应专用管中,加入反应缓冲液及酶,进行 DNA 扩增。取 10~15 μ L/孔的聚合酶链反应产物进行 1% 琼脂糖电泳,观察是否出现 DNA“梯状”条带。

1.11 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 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 热休克预处理诱导 C2C12 肌原细胞表达热休克蛋白 70、热休克蛋白 90 和 α B-晶状体蛋白

当 C2C12 肌原细胞经 HS(42 $^{\circ}$ C, 1 h) 后,4 h 即可检测到 HSP70、HSP90 和 α B-晶状体蛋白的表达,8 h 表达进一步升高,12 h 达高峰,且一直持续至 36 h (图 1, Figure 1)。

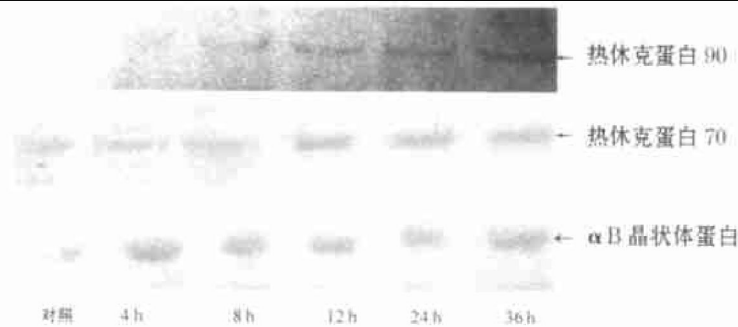


图 1. 热休克预处理对 C2C12 细胞热休克蛋白 70、热休克蛋白 90 和 α B-晶状体蛋白合成的影响 4 h、8 h、12 h 和 24 h 为细胞热休克预处理(42 $^{\circ}$ C, 1 h) 后恢复的时间。

Figure 1. The effect of heat shock pretreatment on the expression of HSP70, HSP90 and α B-crystallin in C2C12 myogenic cells

2.2 热休克预处理对 H_2O_2 所致 C2C12 肌原细胞凋亡的影响

用 42 $^{\circ}$ C 预处理 1 h, 然后恢复 12 h 能明显减轻 H_2O_2 (0.5 mmol/L) 所致的 C2C12 肌原细胞凋亡。表现为: 形态学上发现, Hoechst 33258 染色显示, 正常对照组细胞核呈弥漫均匀荧光; H_2O_2 损伤组则出现许多凋亡细胞, 即细胞核表现为浓染致密的颗粒块状荧光; 而 HS+ H_2O_2 损伤组凋亡细胞比 H_2O_2 损

伤组少, 凋亡核百分率也比 H_2O_2 损伤组明显是降低 (图 2, Figure 2)。④DNA“梯状”条带检测发现 H_2O_2 损伤组于损伤 24 h 和 36 h 后细胞 DNA 电泳出现典型的“梯状”条带; 而 HS+ H_2O_2 损伤组于损伤 24 h 和 36 h 后细胞 DNA 电泳未出现明显的“梯状”条带 (图 3, Figure 3)。内对照实验证实各泳道用于 PCR 的 DNA 量是均等的。

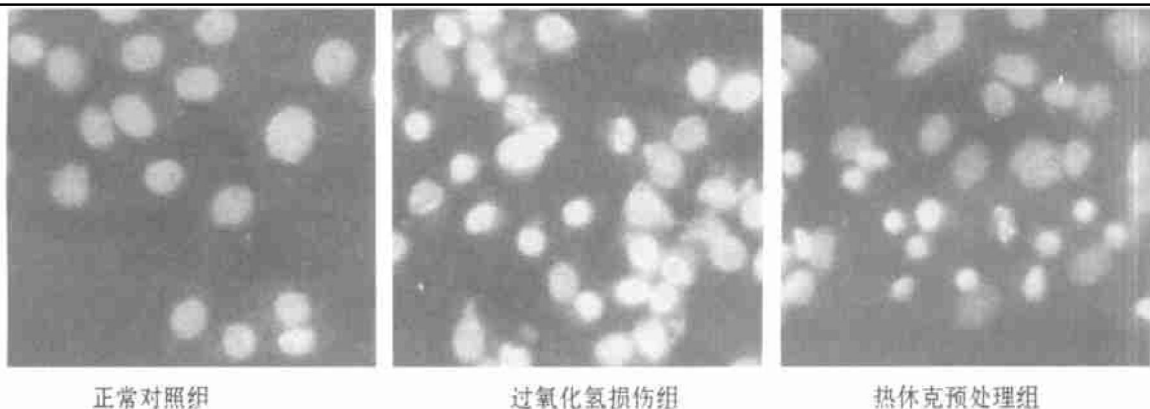


图 2. 热休克预处理 (42 $^{\circ}$ C, 1 h, 恢复 12 h) 对过氧化氢 (0.5 mmol/L) 所致 C2C12 细胞凋亡的影响 (40 \times 10)

Figure 2. Effect of heat shock pretreatment (42 $^{\circ}$ C, 1 h, recover for 12 h) on the changes of apoptotic morphology in C2C12 cells exposed to H_2O_2 (0.5 mmol/L) for 24 h

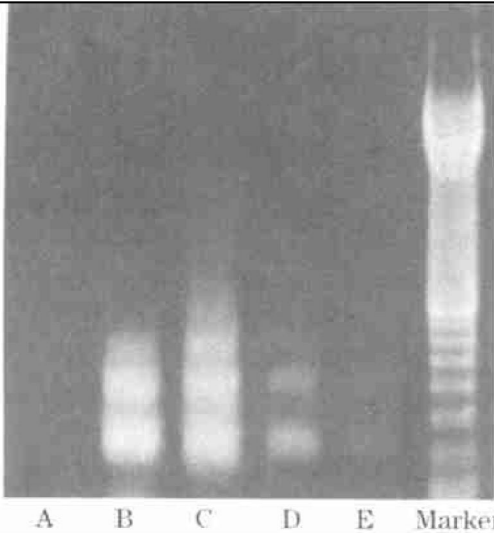


图 3. 琼脂糖电泳示热休克预处理对过氧化氢所致 C2C12 细胞 DNA “梯状”条带的影响 A 为正常对照组; B 和 C 分别为 H₂O₂ 损伤 24 h 和 36 h; D 和 E 分别为热休克预处理后 H₂O₂ 损伤 24 h 和 36 h。

Figure 3. Photograph of a 1.2% agarose gel electrophoresis of DNA extracted from normal or H₂O₂ treated or HS+ H₂O₂ treated C2C12 cells

2.3 热休克预处理抑制 H₂O₂ 所致 C2C12 肌原细胞天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 和 9 的活化

天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(Caspase)活性测定发现, H₂O₂(0.5 mmol/L) 处理 C2C12 肌原细胞 4 h 后, Caspase-3 和 Caspase-9 均开始活化, 处理 12 h

后, Caspase-3 和 Caspase-9 的活性明显升高, 24 h 后有所减少; 而 HS 可明显抑制其活性的增高(表 1, Table 1)。

表 1. 热休克预处理对过氧化氢所致 C2C12 肌原细胞 Caspase-3 和 Caspase-9 活化的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1. Effect of heat shock pretreatment on the activation of caspase-3 and caspase-9 induced by H₂O₂ in C2C12 cells

损伤时间	Caspase-3		Caspase-9	
	H ₂ O ₂ 损伤	HS+ H ₂ O ₂ 损伤	H ₂ O ₂ 损伤	HS+ H ₂ O ₂ 损伤
0 h	1.00 ± 0.08	1.08 ± 0.11	1.00 ± 0.09	1.01 ± 0.12
4 h	1.88 ± 0.21 ^a	1.25 ± 0.13 ^b	1.23 ± 0.11	1.07 ± 0.13
8 h	2.35 ± 0.18 ^a	1.32 ± 0.15 ^b	1.56 ± 0.13 ^a	1.17 ± 0.11 ^b
12 h	2.48 ± 0.22 ^a	1.31 ± 0.14 ^b	2.21 ± 0.17 ^a	1.34 ± 0.09 ^b
18 h	2.36 ± 0.19 ^a	1.67 ± 0.18 ^b	1.58 ± 0.24 ^a	0.88 ± 0.08 ^b
24 h	2.16 ± 0.20 ^a	1.37 ± 0.14 ^b	1.49 ± 0.15 ^a	0.90 ± 0.06 ^b

a: P < 0.01, 与 0 h 比较; b: P < 0.01, 与 H₂O₂ 损伤组比较。

Western blot 分析也表明, 正常 C2C12 肌原细胞 Caspase-3 和 Caspase-9 均以无活性的前体形式存在(分别为 P31 和 P45)。H₂O₂(0.5 mmol/L) 处理 4 h 后, 即可见其裂解片段(分别为 P11 和 P10), 在 12 h 达高峰, 24 h 后有所减少。若细胞经 HS 并恢复 12 h 后, 再用 H₂O₂(0.5 mmol/L) 处理, 则 Caspase-3 和 Caspase-9 的活化明显受抑制(图 4, Figure 4)。

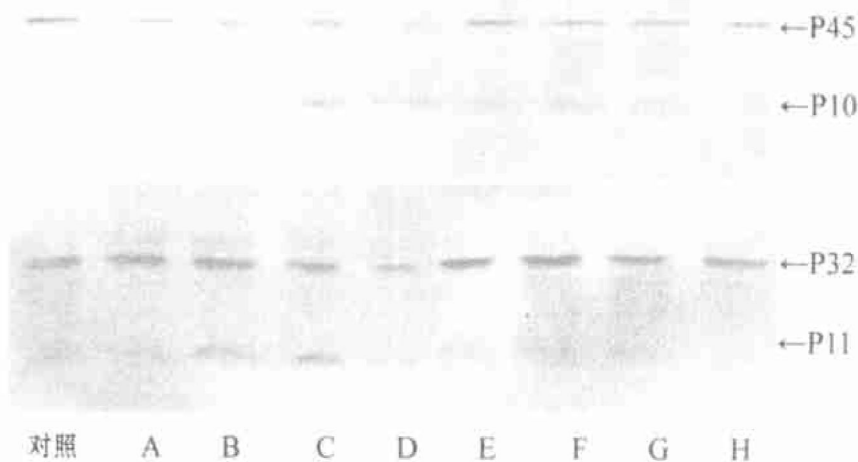


图 4. 热休克预处理对过氧化氢所致 C2C12 细胞天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 和 9 活化的影响 A、B、C 和 D 分别为 H₂O₂ 损伤 4 h、8 h、12 h 和 24 h; E、F、G 和 H 分别为热休克预处理后 H₂O₂ 损伤 4 h、8 h、12 h 和 24 h。P45 和 P32 分别为 Caspase-9 和 Caspase-3 前体; P10 和 P11 分别为活化的 Caspase-9 和 Caspase-3。

Figure 4. The effect of heat shock pretreatment on H₂O₂-mediated activation of Caspase-3, Caspase-9 in C2C12 cells. Representative of 3 separate experiments

2.4 热休克预处理抑制 H₂O₂ 所致 C2C12 肌原细胞第二种线粒体释放天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶激活物

差速离心法将线粒体及胞浆组分分离后进行 Western-bolt 分析发现, 正常 C2C12 肌原细胞 Smac 主要位于线粒体, 胞浆中含量很少。H₂O₂ 处理 C2C12

肌原细胞 1 h 后可见线粒体中 Smac 减少, 而胞浆中 Smac 增多, 2 h 后进一步增多。而 HS 可明显抑制

Smac 从线粒体释放(图 5, Figure 5)。



图 5. 热休克预处理对过氧化氢所致 C2C12 细胞第二种线粒体释放天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶激活物的影响 A 和 B 分别为正常细胞胞浆与线粒体, C 和 D 分别为 H_2O_2 损伤 1 h 后细胞胞浆与线粒体, E 和 F 分别为 H_2O_2 损伤 2 h 后细胞胞浆与线粒体, G 和 H 分别为热休克预处理后 H_2O_2 损伤 1 h 细胞胞浆与线粒体, J 和 K 分别为热休克预处理后 H_2O_2 损伤 2 h 细胞胞浆与线粒体。

Figure 5. The effect of heat shock pretreatment on H_2O_2 -mediated the release of Smac from mitochondria in C2C12 cells (Representative of 3 separate experiments)

免疫荧光法发现, Smac 在正常 C2C12 肌原细胞中呈点状分布, 经 H_2O_2 处理 2 h 后, Smac 呈均匀弥散分布, 表明 H_2O_2 导致 Smac 从线粒体释放入胞浆。

而 HS 细胞经 H_2O_2 处理 2 h 后细胞中荧光物质大部分仍呈点状分布, 说明 HS 可显著抑制 H_2O_2 所致的 Smac 从线粒全释放(图 6, Figure 6)。

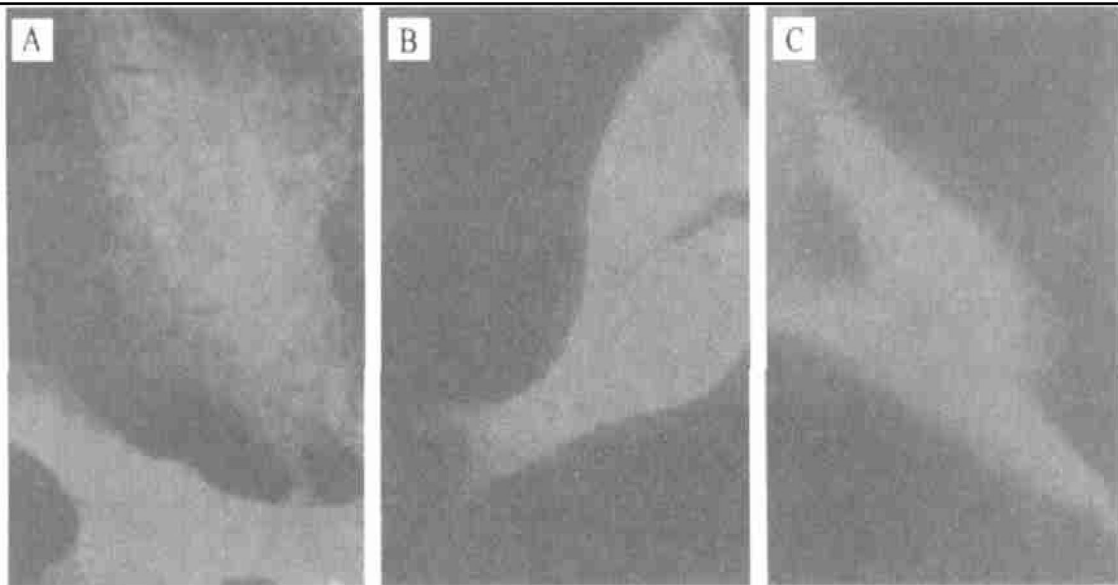


图 6. 免疫荧光化学染色法示热休克预处理对过氧化氢所致 C2C12 细胞第二种线粒体释放天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶激活物的影响 A 为正常对照组, B 为过氧化氢损伤 2 h, C 为热休克预处理+ 过氧化氢处理 2 h。

Figure 6. Immunofluorescenes analysis demonstrating the effect of heat shock pretreatment on H_2O_2 -mediated release of Smac from mitochondria to cytoplasm in C2C12 cells

3 讨论

越来越多的证据表明, 心力衰竭、缺血一再灌注损伤、心肌梗死等心脏疾病的发生、发展与细胞凋亡有着密切的关系^[6]。本实验发现, C2C12 肌原细胞经 H_2O_2 损伤后可出现凋亡, 表现为细胞凋亡核百分率明显 DNA 电泳展示明显“梯状”条带。如先经 HS 再暴露于 H_2O_2 , 则细胞形态学变化较轻, 凋亡核百分率显著下降, 说明热休克预处理能减轻 H_2O_2 所致

C2C12 肌原细胞凋亡。

细胞凋亡信号的传递途径及调控机制复杂。近来研究表明, 线粒体在凋亡信号的传递中起重要作用。在凋亡诱导因素的作用下, 线粒体结构和功能破坏, 可引起细胞色素 C、凋亡诱导因子 (apoptosis-inducing factor, AIF) 等促凋亡分子从线粒体释放入胞浆, 进一步激活天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 9, 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, 最终引起细

胞凋亡^[7,8]。本实验结果发现, H₂O₂ 所致 C2C12 肌原细胞凋亡中有线粒体释放 Smac, 以及 Caspase-3 和 Caspase-9 的活化, 这说明线粒体通路参与了 H₂O₂ 所致的 C2C12 肌原细胞凋亡; 也进一步说明了线粒体在凋亡中的重要作用。

热休克预处理抑制心肌细胞凋亡的机制尚不清楚。1996 年, Polla 等^[9] 发现热休克所诱导的抗氧化应激损伤是通过线粒体起作用的。热休克可诱导热休克蛋白表达, 抑制 H₂O₂ 所致的线粒体膜电位的下降, 减轻线粒体外膜损伤及基质肿胀, 进而抑制线粒体促凋亡蛋白质的释放。1998 年 Mcmillan 等^[10] 发现在热休克转录因子 1 (heat shock transcription factor 1, HSF1) 基因敲除小鼠的胚胎成纤维细胞中, 各种 HSP 诱导表在被废除, 致死性高温导致的细胞凋亡明显增多。我室以往的研究工作^[11] 也表明, HS 所诱导的 HSP70、αB-晶状体蛋白对 H₂O₂ 所致的心肌细胞损伤具有保护作用。已有报道, HSP70 可在细胞色素 C 释放的下游和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 活化的上游起作用抑制凋亡的发生^[12]。HSP27 在 U937 细胞凋亡中可抑制细胞色素 C 依赖性的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 9 前体的活化^[13]。近年来还发现 HSP70 不仅可结合凋亡蛋白酶活化因子 1 使凋亡复合体不能形成, 而且能与凋亡抑制因子相互作用, 从而抑制凋亡^[14]。小分子热休克蛋白 αB-晶状体蛋白也可抑制细胞色素 C 及天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 8 依赖的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 的活化^[15]。本实验发现, 心肌细胞经热休克预处理后, 4 h 即可检测到 HSP70、HSP90、αB-晶状体蛋白的表达增加, 并持续至 36 h。与 H₂O₂ 损伤组细胞相比, 热休克预处理明显抑制了 H₂O₂ 所致的 Smac 从线粒体向胞质的移位及天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 9 的活化, 从而抑制细胞凋亡发生。上述结果说明, HS 可能是通过抑制线粒体释放 Smac 而发挥抑凋亡作用, 而且是在天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 9, 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 活化的上游发挥作用。但热休克预处理是如何抑制

Smac 的释放以及通过哪种或哪些热休克蛋白起作用? 目前还不清楚。

心肌细胞凋亡在缺血、心肌梗死、慢性心力衰竭等疾病过程中起着重要作用。深入研究 HS 对心肌细胞凋亡的影响及其机制对心血管疾病及病理过程的防治具有非常重要的意义。

[参考文献]

- [1] Brown JM, Terada LS, Grosso MA, Whitmann GI, Velasco SE, Patt A, et al. Xanthin oxidase produces hydrogen peroxide which contributes to reperfusion injury of ischemic, isolated, perfused rat hearts. *J Clin Invest*, 1998, **81**: 1 297-301
- [2] Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 2000, **102** (7): 33-42
- [3] Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 2000, **102** (7): 43-53
- [4] Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, et al. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, 2001, **410**: 112-116
- [5] Spitz DR, Dewey WC, Li GC. Hydrogen peroxide or heat shock induces resistance to hydrogen peroxide in Chinese hamster fibroblasts. *J Cell Physiol*, 1989, **131**: 363-368
- [6] 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
- [7] 肖卫民, 蒋碧梅, 石永忠, 刘梅冬, 唐道林, 王慷慨. 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
- [8] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998, **281**: 1 309-312
- [9] Polla BS, Kantengwa S, Francois D, Salvioli S, Franceschi C, Marsac C, et al. Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 6 458-463
- [10] McMillan DR, Xiao X, Shao L, Graves K, Benjamin JJ. Tatteted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J Biol Chem*, 1998, **273** (13): 7 523-528
- [11] 肖卫民, 袁开宇, 肖献忠. 热休克对心肌细胞中晶状体蛋白移位及表达的影响. *湖南医科大学学报*, 2001, **26** (1): 1-3
- [12] Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem*, 2000, **275** (33): 25 665-671
- [13] Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, et al. The chaperone function of HSP70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 2000, **20** (19): 7 146-159
- [14] Garrido C, Bruey JM, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Solary E. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J*, 1999, **13**: 2 061-070
- [15] Kamradt MC, Chen F, Sam S, Cryns VL, et al. The small heat shock protein αB-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 曾学清, 胡必利)