

氧化应激所致 C2C12 肌源细胞核仁损伤的分子机制

王慷慨, 邓恭华, 刘可, 易宇欣, 鄂顺梅, 张玲莉, 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; 过氧化氢; 核仁; 核仁素(C23); C2C12 肌源细胞; 反义核酸

[摘要] 目的 探讨氧化应激诱导细胞核仁损伤的分子机制。方法 向传代培养的 C2C12 肌源细胞中加入 0.5 mmol/L 过氧化氢以模拟氧化应激。结果 甲苯胺兰染色发现正常 C2C12 细胞可见一个位于中央的, 浓染致密的核仁颗粒。过氧化氢处理后 3 h, 可见明显的核仁分离, 处理 6 h 最为明显。细胞总蛋白质合成能力分析发现过氧化氢处理后 6 h 细胞总蛋白质合成能力显著下降(与正常对照比 $P < 0.05$), 并持续至 24 h。免疫印迹检测核仁素(又称 C23)发现, 过氧化氢处理 1 h 后可见一 80 kDa 条带, 而其 110 kDa 主带明显减弱, 过氧化氢处理 6 h 和 12 h 最为明显。用脂质体将核仁素反义核酸导入细胞后 24 h, 免疫印迹发现核仁素表达明显被抑制, 同时也可观察到细胞总蛋白合成能力下降及明显的核仁分离。结论 氧化应激通过诱导核仁蛋白质核仁素的裂解并使其 110 kDa 全长分子的数量减少, 而导致 C2C12 细胞核仁损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Molecular Mechanism of Nucleolar Impairment Induced by Peroxide Hydrogen in C2C12 Myogenic Cells

WANG Kang-Kai, DENG Gong-Hua, LIU Ke, YI Yu-Xin, E Shun-Mei, ZHANG Ling-Li, and XIAO Xian-Zhong

(Department of Pathophysiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

[KEY WORDS] Hydrogen Peroxide (H_2O_2); Nucleolus; Nucleolin/C23; C2C12 Myogenic Cells; Antisense Oligonucleotide

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of oxidative stress on nucleolar impairment in C2C12 and clarify the possible molecular mechanism. **Methods** 0.5 mmol/L peroxide hydrogen (H_2O_2) were added into the cultured C2C12 cell lines to mimic oxidative stress. Toluidine Blue staining and total protein synthesis analysis were performed to assess H_2O_2 -induced nucleolar structural and functional injury respectively. Immunoblotting and antisense oligonucleotide were used to detect the changes of nucleolar protein nucleolin (also named C23). **Results** Toluidine Blue staining showed predominantly compact, centrally localized nucleoli in intact control cells, but in H_2O_2 -treated cells, an early onset of nucleolar segregation could be found after 3 h and 6 h. Total protein synthesis analysis revealed that compared with normal cells, the capability of cellular protein synthesis is significantly decreased after 6 h treatment with H_2O_2 ($P < 0.05$), and lasted for 24 h. Moreover, an 80 kDa band of nucleolin was found by using immunoblotting after 1 h treatment with H_2O_2 , and accompanied by down-regulation of its primary 110 kDa band. The 110 kDa band decreased remarkably after 6 h and 12 h treatment with H_2O_2 . After transfected nucleolin antisense oligonucleotides for 24 h and 48 h, expression of nucleolin was down-regulated significantly, and nucleolar segregation and inhibition of total protein synthesis could be observed. **Conclusion** The molecular mechanism of oxidative stress-mediated nucleolar impairment is related to cleavage and down-regulation of intact nucleolin.

氧化应激损伤常见于诸如组织缺血、再灌注损伤、败血症休克和多器官功能衰竭等, 其发生机制是活性氧对组织细胞的损伤。活性氧不但可以攻击细胞膜和细胞器, 还可以破坏蛋白质、膜磷脂、核酸等, 最终导致细胞坏死或凋亡^[1,2]。核仁是位于细胞核

中的一个非膜性细胞器, 是核糖体生物合成的场所, 在细胞蛋白质的合成以及细胞的增殖、分化与衰老等生命活动中发挥重要作用^[3,4]。研究表明, 热应激^[5]、肿瘤坏死因子 α ^[6] 和顺铂^[7] 等可诱导细胞核仁结构发生改变。我室证实过氧化氢可导致原代培养的新生大鼠心肌细胞核仁结构碎裂^[8]。但有关核仁结构受损的分子机理以及其对功能有何影响, 仍有待进一步研究。本研究在我室以往工作的基础上, 采用过氧化氢模拟氧化应激, 观察其对 C2C12 肌源细胞核仁结构与功能的影响, 并从核仁蛋白质水平探讨过氧化氢所致核仁损伤的分子机制。

[收稿日期] 2004-11-01

[修回日期] 2005-02-26

[基金项目] 国家自然科学基金(30300177, 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] 王慷慨, 讲师, 主要从事心血管病理生理研究, E-mail 为 kangkaiwang@sina.com.cn。邓恭华, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事心血管病理生理及败血症休克的分子机理研究。通讯作者肖献忠, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管病理生理及败血症休克的分子机理研究, E-mail 为 xiaoxianzhong@xysm.net。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM 培养基、脂质体转染试剂盒系生命技术公司产品;无支原体小牛血清系杭州四季青生物工程有限公司产品;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG、兔抗山羊 IgG 及 DAB 显色试剂盒系武汉博士德生物技术公司产品;兔抗核仁素、抗 β -actin 多克隆抗体系 Santa Cruz 公司产品;胰蛋白酶为北京鼎国公司产品;反义、正义及随机核酸系上海博亚生物技术公司合成(表 1)。

表 1. 核仁素反义、正义和随机寡核苷酸序列

名称	碱基序列	修饰类型
正义(S)	5'-ATG GTG AAG CTC GCA AAG GCT GGC-3'	硫代修饰
随机(R)	5'-CAG CCG TAC ATC GCT GTC ACT TCG -3'	硫代修饰
反义(AS)	5'-GCC AGC CTT TGC GAG CTT CAC CAT-3'	硫代修饰

1.2 细胞培养及分组

C2C12 肌源细胞按常规方法培养。简述如下:用含 15% 新生小牛血清的 DMEM 培养基于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞生长至约 85% 融合时传代。H₂O₂ 损伤实验随机分为 2 组(每个实验重复 3 次): 正常对照组加入无血清 DMEM 培养基;④H₂O₂ 损伤组加入含 0.5 mmol/L H₂O₂ 的无血清 DMEM 培养基。分别置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 30 min、1 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h。核仁素寡核苷酸处理实验分为 4 组(每个实验重复 3 次): 正常对照组;④反义核酸处理组;④正义核酸处理组; 随机核酸处理组。

1.3 核仁染色

培养在载玻片上的细胞用无菌预冷的磷酸盐缓冲液漂洗 2 次,4% 多聚甲醛/磷酸盐缓冲液室温固定 30 min,磷酸盐缓冲液漂洗 2 遍;再用 0.1% 曲拉通 X-100/磷酸盐缓冲液室温处理细胞 15 min,磷酸盐缓冲液荡洗 2 遍;1% 甲苯胺兰/1% 四硼酸钠染色液染色 2 min,磷酸盐缓冲液反复荡洗,甩干、封片,观察并拍照。

1.4 免疫印迹分析

按实验室常规方法进行。简言之,用 1×SDS 加样缓冲液裂解细胞,收集细胞蛋白质,100℃煮沸 10 min,12 kr/min 离心 5 min,收集上清。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。30 μ g 总蛋白经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后 6 h 后,电转膜(4℃过夜)至硝酸纤维素膜,2% 牛血清白蛋白室温封闭 3 h,先后加入兔抗核仁素和羊

抗 β -actin 多克隆抗体及 HRP 标记的羊抗兔和兔抗羊 IgG,室温分别孵育 1 h 和 0.5 h, DAB 显色试剂盒进行显色。

1.5 细胞总蛋白质合成能力的分析

依据 Choukroun 等^[9]建立的方法进行。收集每组细胞后,用磷酸盐缓冲液重悬并等体积分为两份。按常规方法分别收集全细胞蛋白质产物和基因组 DNA 并定量。按公式计算:细胞总蛋白质合成能力 = 细胞总蛋白质(μ g)/基因组 DNA(μ g)。

1.6 反义寡核苷酸转染 C2C12 细胞

根据生命技术公司提供的转染操作说明书及本室所建立的方法^[8,10]进行。用 660 μ L 无血清 DMEM 培养基溶解核仁素蛋白反义、正义及随机寡核苷酸后,各取 40 μ L 分别与 12 μ L 脂质体混匀后加无血清 DMEM 培养基至 0.5 mL,室温放置 30 min。另用无血清 DMEM 培养基洗涤细胞 3 遍后,加入 1.5 mL 无血清 DMEM 培养基,然后分别加入上述反义、正义、随机寡核苷酸与脂质体的混合物。4 h 后再加入 2 mL 含 20% 小牛血清的 DMEM 培养基,并于 24 h 或 48 h 后收集蛋白检测核仁素蛋白的表达、甲苯胺兰染色以及总蛋白合成能力分析。

1.7 统计处理

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。以 $P < 0.05$ 判断为有统计学差异。

2 结果

2.1 过氧化氢所致 C2C12 细胞核仁的损伤

甲苯胺兰染色结果发现,正常 C2C12 细胞一般有 1~2 个浓染、致密的位于中央的核仁颗粒。过氧化氢处理后 3 h,染色的核仁颗粒显著增多,达 5~7 个,处理 6 h 更为明显,此时被染的核仁颗粒多达 10 个左右(图 1 和表 2, Figure 1 and Table 2)。

总蛋白合成分析结果发现,H₂O₂ 处理 6 h 后,与对照组相比,细胞合成蛋白的能力下降了约 50% ($P < 0.05$) (图 2, Figure 2), 24 h 后,细胞合成蛋白能力仅为对照组细胞的 25% 左右 ($P < 0.01$)。

表 2. H₂O₂ 所致 C2C12 细胞核仁结构的损伤($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Statistic analysis of stained nucleoli after 0.5 mmol/L H₂O₂-induced nucleolar impairment

分 组	核仁颗粒数
正常对照	1.5 \pm 0.6
H ₂ O ₂ 3 h	5.9 \pm 0.7 ^a
H ₂ O ₂ 6 h	10.3 \pm 1.3 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与正常对照组比较。



图 1. H₂O₂ 对 C2C12 肌源细胞核仁结构的影响(20×10)
Figure 1. Effect of 0.5 mmol/ L hydrogen peroxide on nucleolar structure in C2C12 (20×10).

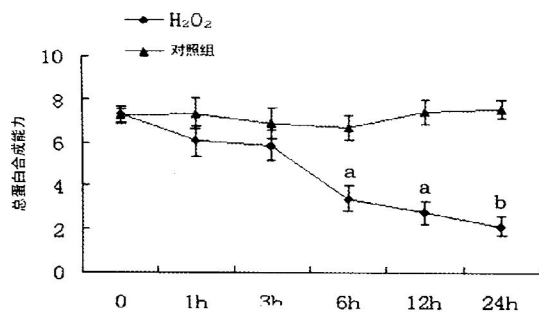


图 2. H₂O₂ 对 C2C12 肌源细胞总蛋白合成能力的影响
a: $P < 0.05$, *b*: $P < 0.01$, 与正常对照组比较。

Figure 2. Effect of 0.5 mmol/L hydrogen peroxide on cellular protein synthesis in C2C12

2.2 过氧化氢对 C2C12 细胞核仁素的影响

免疫印迹分析发现, 正常对照组全细胞提取物中仅发现一条 110 kDa 的核仁素条带, 0.5 mmol/L H₂O₂ 处理 C2C12 细胞 1 h, 用核仁素多克隆抗体可检测到另一条分子质量约为 80 kDa 的裂解带(图 3, Figure 3), H₂O₂ 处理 6 h 和 12 h 最为明显, 此时 110 kDa 条带明显减弱, 而 80 kDa 条带则显著增强(表 3, Table 3)。

2.3 核仁素表达下调对核仁结构与功能的影响

利用脂质体将反义核酸导入 C2C12 细胞 24 h 后收集细胞总蛋白质, 免疫印迹分析发现反义核酸能明显抑制核仁素蛋白的表达, 而正义和随机核酸对核仁素蛋白的表达并无影响(图 4, Figure 4), 灰度扫描分析发现, 反义核酸处理后 24 h, 细胞核仁素蛋白的表达量约为正常对照组、正义与随机核酸处理组表达量的 1/3 ($P < 0.05$), 而正义及随机核酸处理组与正常对照组比较没有统计学差异 ($P > 0.05$, 表 4, Table 4)。

表 3. H₂O₂ 使 C2C12 肌源细胞核仁素蛋白裂解的灰度值
Table 3. Density of 0.5mmol/ L hydrogen peroxide on cleavage of nucleolin in C2C12

作用时间	110 kDa 条带	80 kDa 条带
0	1.42 ±0.19	0.00 ±0.00
0.5 h	1.27 ±0.23	0.29 ±0.10 ^b
1 h	1.04 ±0.18	0.39 ±0.09 ^b
3 h	0.82 ±0.21 ^a	0.51 ±0.12 ^b
6 h	0.53 ±0.17 ^a	0.86 ±0.22 ^b
12 h	0.39 ±0.15 ^b	0.97 ±0.21 ^b

a: $P < 0.05$, *b*: $P < 0.01$, 与作用 0 时间(正常对照)组比较。

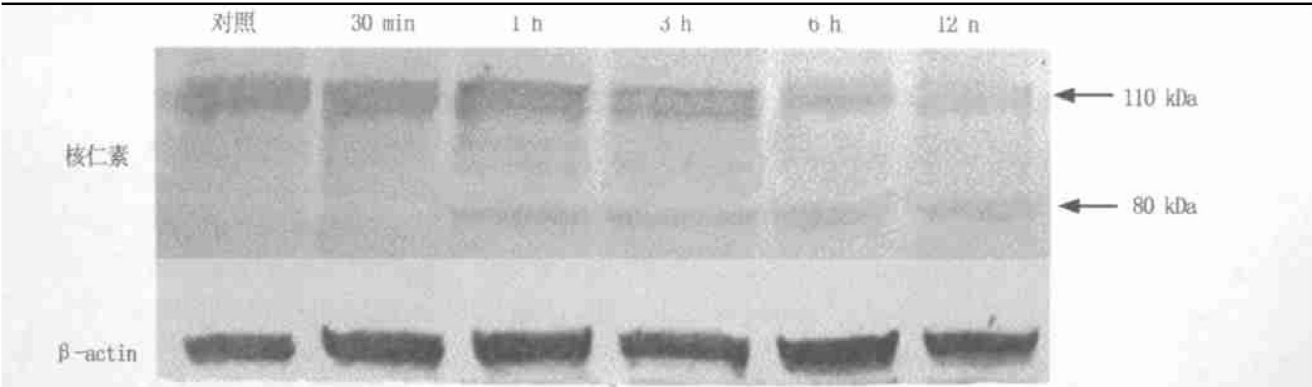


图 3. H₂O₂ 对 C2C12 肌源细胞核仁素蛋白裂解的影响
Figure 3. Effect of 0.5 mmol/ L hydrogen peroxide on cleavage of nucleolar protein nucleolin in C2C12

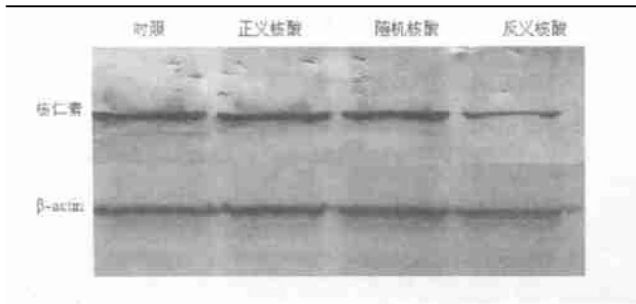


图 4. 反义核酸对 C2C12 细胞核仁素蛋白表达的影响
Figure 4. Effect of antisense on the expression of nucleolin in C2C12 cells.

利用脂质体将反义核酸导入 C2C12 细胞 24 h 后, 甲苯胺兰染色核仁发现, 反义核酸转染组细胞核仁染色颗粒显著多于正常对照和正义与随机核酸转染组($P < 0.05$, 图 5 和表 5, Figure 5 and Table 5)。

总蛋白合成能力分析发现, 转染核仁素反义核酸 24 h 和 48 h 后细胞蛋白质合成较正常对照组及正义和随机核酸转染组低($P < 0.05$); 而正义和随机核酸转染组与正常对照组相比没有统计学差异($P > 0.05$, 表 5, Table 5)。

表 4. 反义寡核苷酸影响 C2C12 细胞核仁素蛋白的表达
Table 4. Density of antisense oligonucleotides on the expression of nucleolin in C2C12 cells

分 组	灰度值
正常对照组	1.06 ± 0.14
正义核酸	0.90 ± 0.10
随机核酸	0.90 ± 0.09
反义核酸	0.48 ± 0.08 ^a

a: $P < 0.05$, 与正常对照组比较。

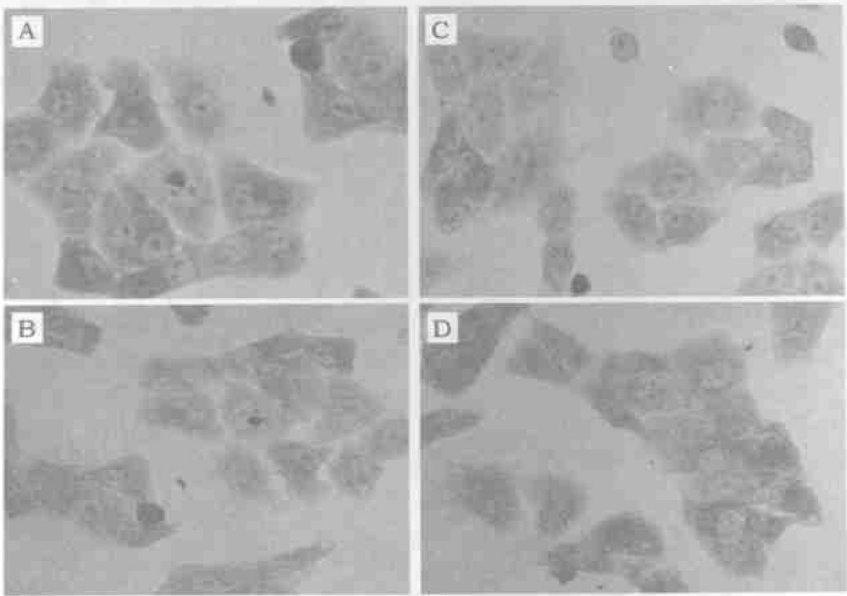


图 5. 核仁素反义核酸对 C2C12 细胞核仁结构的影响(20 × 10) A 为对照组, B 为随机核酸组, C 为正义核酸组, D 为反义核酸组。
Figure 5. Effect of nucleolin anti-sense on nucleolar structure in C2C12 cells

表 5. 核仁素反义寡核苷酸对 C2C12 细胞核仁结构及总蛋白合成能力的影响

Table 5. Effect of nucleolin anti-sense oligonucleotides on nucleolar structure and total protein synthesis in C2C12 cells

分 组	核仁计数	总蛋白合成	
		转染 24 h	转染 48 h
正常对照	1.45 ± 0.43	5.91 ± 0.28	5.98 ± 0.41
正义核酸	2.01 ± 0.97	6.02 ± 0.49	5.97 ± 0.32
随机核酸	1.67 ± 0.66	5.89 ± 0.36	5.86 ± 0.34
反义核酸	6.75 ± 0.59 ^a	3.91 ± 0.33 ^a	3.31 ± 0.25 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与正常对照组比较。

3 讨论

作为核糖体生物合成的场所, 核仁在细胞蛋白质的合成, 乃至细胞的正常增殖与分化中发挥了重要作用^[3, 4, 11, 12]。近来研究表明, 核仁在多种应激原如热应激^[5]、顺铂^[7]等的作用下, 可发生组分的分离。我室以往的研究^[8]亦表明氧化应激也可引起心肌细胞核仁组分分离。核仁分离主要表现为: 1~2 个位于中央、致密的核仁颗粒变为多个松散的且边集的核仁颗粒。但目前对氧化应激所致核仁结构改变的分子基础及其生物学意义, 仍不清楚。本研究在以往的基础上, 进一步采用 0.5 mmol/L 过氧化氢

模拟的氧化应激细胞模型,观察了 C2C12 肌源细胞核仁结构与功能的改变,结果发现:氧化应激同样能引起 C2C12 细胞核仁组分分离,甲苯胺兰染色可见过氧化氢损伤 3 h 后,细胞核仁有多个松散的染色颗粒,而正常组细胞则仅有 1~2 个。细胞总蛋白合成能力分析发现过氧化氢损伤 6 h 后细胞总蛋白质的合成明显下降,并持续至 24 h,而且蛋白质合成能力下降(6 h)滞后于核仁结构改变(3 h)。

为了进一步诠释氧化应激所致核仁损伤的分子机理。本研究采用免疫印迹技术,从蛋白质水平观察了多种核仁蛋白质的表达及其分子的变化。这些蛋白包括 RNA 聚合酶大亚基、Nopp140、Nucleophosmin、Fibrillarin 以及核仁素(Nucleolin)等。结果发现,核仁素蛋白正常时其分子质量为 110 kDa。在过氧化氢处理后 1 h,除其 110 kDa 主带外,还可检测到一条 80 kDa 的显色带,并随着过氧化氢处理时间的延长,该 80 kDa 带逐渐加深,而 110 kDa 主带则逐渐减弱。此结果与 Kito 等^[13]在大田酸诱导的 Saos-2 和 MG63 细胞凋亡中发现的核仁素断裂相同。上述结果充分提示,氧化应激可以快速引起核仁蛋白--核仁素蛋白分子发生断裂,而同时使其 110 kDa 全长分子的量减少。除此之外,其他核仁蛋白质均无表达水平的改变,也没发生蛋白分子的断裂(结果未发现)。

尽管本研究先后发现了两个现象:过氧化氢引起的核仁结构功能损害与核仁素的断裂及其 110 kDa 完整分子的量减少,而且这两个现象的发生在时间关系上也存在一定的序惯性,即过氧化氢先引起核仁素断裂(H_2O_2 处理 1 h)及其完整分子 110 kDa 的量减少,然后导致核仁损伤(H_2O_2 处理 3 h 最为明显),但两者之间是否确实存在有某种因果关系尚不得而知。为此本研究进一步采用反义技术,观察核仁素对核仁结构与功能的影响。结果发现,本研究中所使用的核仁素反义核酸特异性地结合^[10,14]核仁素 mRNA,并促进其降解后,能显著阻断核仁素蛋白的表达。而同时也能使核仁染色颗粒增多及抑制细胞总蛋白质的合成。这提示:核仁素全长分子质量的减少确实可以导致核仁结构功能受损。

核仁素是一种定位于核仁的磷酸蛋白,是核仁蛋白质中含量最多的一种,约占核仁蛋白质总量的 10%。其功能涉及核糖体的生物合成、细胞增殖、生

长、胚胎发生、胞质分裂、染色质复制与核仁的发生等过程的调控^[15-17]。由此可见,核仁素是核仁中一种非常重要的多功能磷酸蛋白质。本研究首次证实核仁素蛋白的断裂及其完整分子 110 kDa 的量减少参与了氧化应激所致核仁损伤。由于核仁是核糖体生物合成的场所,是细胞蛋白质的合成,乃至细胞正常增殖、分裂所必需的重要细胞器^[3,4,11]。核仁损伤后细胞的命运如何,是凋亡还是坏死?核仁素断裂在细胞凋亡或坏死中有何作用等问题仍有待深入研究。

[参考文献]

- [1] Bandyopadhyay D, Chattopadhyay A, Ghosh G, Datta AG. Oxidative stress-induced ischemic heart disease: protection by antioxidants. *Curr Med Chem*, 2004, **11** (3): 369-387
- [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] 王慷慨, 邓恭华, 肖献忠. 核仁应激损伤与热休克蛋白研究. *生理科学进展*, 2003, **34** (2): 175-177
- [4] Hernandez VD, Louvet E. The nucleolus: structure, functions, and associated diseases. *Med Sci*, 2004, **20** (1): 37-44
- [5] Morcillo G, Gorab E. Special intranucleolar distribution of HSP70 during heat shock in polytene cells. *Exp Cell Res*, 1997, **236**: 361-370.
- [6] Nadano D, Sato TA. Caspase-3 dependent and independent degradation of 28S rRNA may be involved in the inhibition of protein synthesis during apoptosis initiated by death receptor engagement. *J Biol Chem*, 2000, **275** (18): 13 967-973
- [7] Horky M, Wurzer G, Kotala V, Anton M, Vojtesek B, Vacha J, et al. Segregation of nucleolar components coincides with caspase-3 activation in cisplatin-treated HeLa cells. *J Cell Sci*, 2001, **114** (Pt 4): 663-670
- [8] 王慷慨, 邓恭华, 肖卫民, 赵振宇, 蒋磊, 肖献忠, 等. 热休克蛋白 70 对过氧化氢所致乳鼠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
- [9] Choukroun G, Hajjar R, Kyriakis JM. Role of the stress activated protein kinases in endothelial induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest*, 1998, **102** (8): 1 311-320
- [10] Wang K-K, Deng G-H, Tu Z-Z, Yi Y-X, Wang H, Liu K, et al. Study of effect of HSP70 on acute injury of cardiomyocyte induced by hydrogen peroxide using antisense oligonucleotides. *中国现代医学杂志*, 2004, **14** (1): 12-16
- [11] Horky M, Kotala V, Anton M, Gadek WJ. Nucleolus and apoptosis. *Ann NY Acad Sci*, 2002, **973**: 258-264
- [12] Leung AK, Lamond AI. The dynamics of the nucleolus. *Crit Rev Eukaryot Gene Exp*, 2003, **13** (1): 39-54
- [13] Kito S, Shimizu K, Okamura H, Yoshida K, Morimoto H, Fujita M, et al. Cleavage of nucleolin and argyrophilic nucleolar organizer region associated proteins in apoptosis-induced cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **300** (4): 950-956.
- [14] Myers KJ, Dean NM. Sensible use of antisense: how to use oligonucleotides as research tools. *TIPS J*, 2000, **21**: 19-23
- [15] Srivastava M, Pollard HB. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J*, 1999, **13** (14): 1 911-922
- [16] Andersen JS, Lyon CE, Fox AH. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol*, 2002, **12** (1): 1-11
- [17] Daniely Y, Dimitrova DD, Borowiec JA. Stress-dependent nucleolin mobilization mediated by p53-nucleolin complex formation. *Mol Cell Biol*, 2002, **22** (16): 6 014-022.

(此文编辑 胡必利)