

Kruppel 样因子 4 过表达对 C₂C₁₂ 肌原细胞中热休克蛋白 25 表达的影响

王 婧^{1,2}, 刘 瑛¹, 易宇欣¹, 张华莉¹, 刘梅冬¹, 肖献忠¹, 邓恭华¹

(1. 中南大学湘雅医学院病理生理学教研室, 湖南省长沙市 410078; 2. 南华大学公共卫生学院, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; Kruppel 样因子 4; 热休克蛋白 25; 稳定转染; C₂C₁₂ 肌原细胞; 过表达; 空载体

[摘要] 目的 观察 Kruppel 样因子 4 过表达对热休克蛋白 25 表达的影响。方法 运用稳定转染 pcDNA3.1/mycHis(-) 和 Kruppel 样因子 4 pcDNA3.1/mycHis(-) 两种细胞株, 采用逆转录聚合酶链反应观察 Kruppel 样因子 4 在生理状态和热休克反应时对热休克蛋白 25 mRNA 表达的影响; 采用 Western blot 观察 Kruppel 样因子 4 在生理状态和热休克反应时对热休克蛋白 25 蛋白表达的影响。结果 在正常状态下, 两种细胞热休克蛋白 25 mRNA 及蛋白表达水平均较低。生理状态下, 热休克恢复 1 h 及 3 h Kruppel 样因子 4 过表达细胞株热休克蛋白 25 mRNA 表达水平明显高于转空载体细胞; 至热休克恢复 6 h 后两组细胞热休克蛋白 25 mRNA 表达无明显差异。在生理状态及热休克恢复不同时间后, Kruppel 样因子 4 过表达细胞热休克蛋白 25 蛋白表达水平均较空载体组明显增加。结论 在生理状态和热休克反应中, Kruppel 样因子 4 过表达均能够促进 C₂C₁₂ 肌原细胞中热休克蛋白 25 高表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of the Overexpression of Kruppel-Like Factor 4 on the Expression of Heat Shock Protein25 in C₂C₁₂ Cell

WANG Jing^{1,2}, LIU Ying¹, YI Yu Xin¹, ZHANG Hua Li¹, LIU Mei Dong¹, XIAO Xian Zhong¹, and DENG Gong Hua¹

(1. Department of Pathophysiology, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410078; 2. School of Public Health, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Kruppel-Like Factor 4; Heat Shock Protein25; Stable Transformation; Myogenic C₂C₁₂ Cell; Overexpression; Empty Vector

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of Kruppel-like factor 4(KLF4) overexpression on the expression of heat shock protein25 (HSP25). **Methods** Two stable cell lines were made by transforming pcDNA3.1/MycHis(-) or pcDNA3.1/MycHis-KLF4 into C₂C₁₂ cell. Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) and Western Blot were employed to study the influence of KLF4 on the expression of HSP25 mRNA and protein respectively under normal physiological and heat shock conditions. **Results** Under normal physiological condition, the expression of HSP25 mRNA and protein in these two cell lines are relatively low. However, HSP25 mRNA level in KLF4 over expressed cell was significantly higher than that of empty vector cell lines not only under normal conditions but when recovered one hour and three hours after heat shock. Six hours after heat shock, the levels of HSP25 mRNA showed no significant difference between these two cell lines. Under both normal physiological conditions and different time intervals during the recovery of heat shock, the HSP25 protein level was higher in KLF4 over expressed cell line than that in the vector line. **Conclusions** Under both physiological and heat shock conditions, KLF4 over expression can enhance the expression of HSP25 in the myogenic C₂C₁₂ cell.

热休克蛋白(heat shock protein, HSP) 25 是小分子 HSP 家族主要成员之一, 近年来对 HSP25 功能和机制的研究已成为心血管、肌肉和神经系统等领域的热点之一。Kruppel 样因子 4(kruppel-like factor 4,

KLF4) 是一个核转录因子, 其基本生物学功能是对下游基因的调控, KLF4 是 Sp/Kruppel 样锌指转录因子家族的成员之一。这个家族目前至少已发现 20 个成员, 如 Sp1-4 和 KLF1-7 等。其中 Sp1 能够直接诱导 HSP70 的表达; 而 KLF6、Sp2 和 Sp3 能够共同诱导 HSP47 的表达。但 KLF4 是否能够调控热休克蛋白的表达目前尚未见报道。因此, 在本室以往研究的基础上, 本研究采用 KLF4 过表达细胞株从 mRNA 水平及蛋白水平探讨 KLF4 在生理状态下和热休克反应中是否影响 HSP25 的表达。

[收稿日期] 2006-10-30 [修回日期] 2006-09-30

[基金项目] 国家自然科学基金(30400169, 30571746, 30571846) 及国家 973 重点项目(G2000056900) 资助

[作者简介] 王婧, 硕士, 现工作于南华大学公共卫生学院, 研究方向为心血管内源性保护机制, 联系电话为 0734-7122886, E-mail 为 wjj006@hotmail.com。通讯作者邓恭华, 博士, 硕士研究生导师, 研究方向为败血症休克发生机制和心血管内源性保护机制, 联系电话为 0731-2355020, E-mail 为 dengonghua@xysm.net。

2.2 Kruppel 样因子 4 稳定转染细胞株中 Kruppel 样因子 4 蛋白的表达

采用脂质体法分别转染 KLF4 的真核表达质粒 KLF4-pcDNA3.1/myc-His(-) 和空载体 pcDNA3.1/myc-His(-) 至 C₂C₁₂ 细胞中, 经 G418 筛选 4 周后进行 Western 印迹分析。结果发现, 在此细胞株中 KLF4 蛋白表达量较转空载体组明显增加 (图 2)。

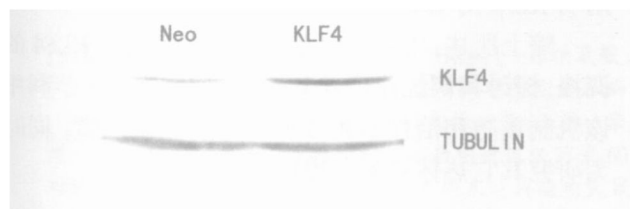


图 2. Western 印迹分析 Kruppel 样因子 4 稳定转染细胞株中 Kruppel 样因子 4 蛋白表达 Neo 为转染空载体 pcDNA3.1(-) 组, KLF4 为转染 pcDNA3.1-KLF4 组, TUBULIN 为内对照。

2.3 Kruppel 样因子 4 过表达对热休克蛋白 25 基因 mRNA 表达水平的影响

正常状态下, 转空载体组细胞及稳定转染 KLF4 组细胞 HSP25 mRNA 表达水平均较低, 热休克处理恢复不同时间后, 两组细胞 HSP25 表达均增加。在正常状态下及热休克恢复 1 h 及 3 h 后, 稳定转染 KLF4 组细胞 HSP25 mRNA 表达水平较空载体组均明显增加, 至热休克恢复 6 h 后两组细胞 HSP25 mRNA 表达无明显差异 (图 3)。

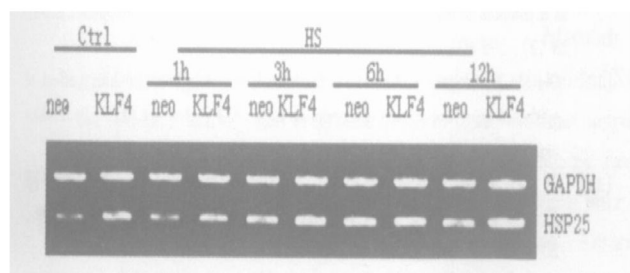


图 3. 采用逆转录聚合酶链反应检测 Kruppel 样因子 4 过表达对热休克蛋白 25 基因 mRNA 表达水平的影响 Ctrl 为未经热休克处理组, HS 为热休克处理组, Neo 为转染空载体 pcDNA3.1(-) 组, KLF4 为转染 pcDNA3.1-KLF4 组, GAPDH 为内对照。1 h、3 h、6 h 和 12 h 分别代表热休克后恢复 1 h、3 h、6 h 和 12 h。

2.4 Kruppel 样因子 4 过表达对热休克蛋白 25 基因蛋白表达水平的影响

正常状态下, 转空载体组细胞及稳定转染 KLF4 组细胞 HSP25 蛋白表达水平均较低, 热休克处理恢

复不同时间后, 两组细胞 HSP25 表达均增加。在正常状态及热休克恢复不同时间后, 稳定转染 KLF4 组细胞 HSP25 蛋白表达水平均较空载体组明显增加 (图 4)。

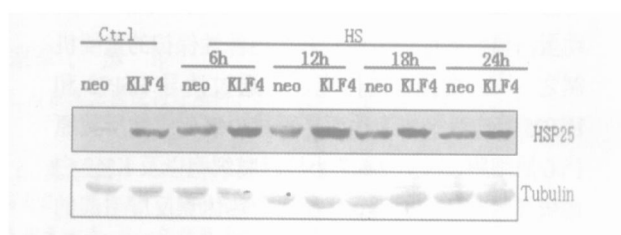


图 4. 采用 Western blot 检测 Kruppel 样因子 4 过表达对热休克蛋白 25 基因蛋白表达水平的影响 Ctrl 为未经热休克处理组, HS 为热休克处理组, Neo 为转染空载体 pcDNA3.1(-) 组, KLF4 为转染 pcDNA3.1-KLF4 组, Tubulin 为内对照。6 h、12 h、18 h 和 24 h 分别代表热休克后恢复 6 h、12 h、18 h 和 24 h。

2.5 小鼠热休克蛋白 25 基因启动子的分析

在 GenBank 中搜索到小鼠 HSP25 基因外显子序列, 登录号为 AH001918, 用 TESS 程序分析其启动子区长 2 000 bp 序列, 在 -688 bp 至 -675 bp 和 -837 bp 至 -824 bp (转录起始位点为 1) 分别找到一个 KLF4 结合元件, 即 AAA^G/A AAA^G/A^G/A AAGGG。

3 讨论

热休克蛋白 25(HSP25) 是普遍表达于啮齿动物类的小分子热休克蛋白(人类同源体为 HSP27), 在心肌和脑组织含量相对较为丰富。近几年来人们对其基因定位与调控、蛋白质表达与修饰、组织分布与细胞内定位、功能及其机制进行了多方面的研究。

在非应激状态下 HSP 有一定的基础表达, 在应激状态下 HSP 可迅速合成并成倍增加, 以帮助维护细胞正常的新陈代谢及结构完整。本试验也证实了这一点, KLF4 过表达细胞株及转空载体细胞株热休克处理后 HSP 表达水平都较非应激状态明显增高, HSP25 含有一个对氧化应激高度敏感的半胱氨酸残基, 此基团通过抑制 HSP25 二聚体的形成而发挥其细胞保护性^[1]。HSP25 可减少蛋白激酶 C δ 的表达, 从而减轻因辐射等诱导的细胞凋亡^[2,3]。HSP25 的高表达在急性缺血肾损伤时对机体起内源性保护作用。热休克预处理可以诱导 HSP25 等的产生, 明显减轻肾缺血再灌注所致血清尿素氮及血清肌酐浓度的升高^[4,5]。Sch B 通过诱导 HSP25 及

HSP70的活化而保护缺血再灌注损伤后的大鼠心肌^[6]。本室研究发现,小鼠心肌缺血再灌注损伤时HSP25表达增加,并可明显减轻缺血再灌注所致的肌动蛋白损伤;蛋白质体外实验证实外源性HSP25可使H₂O₂所致肌动蛋白变性沉淀重新解聚复性为可溶性蛋白质。证实HSP25对缺血再灌注所致肌动蛋白损伤的保护可能是心肌内源性保护的重要机制之一^[7]。此外,热休克反应通过诱导HSP70和HSP25等应激蛋白表达而显著减少氧化应激所致原代心肌细胞、RAW 264.7小鼠巨噬细胞以及K562白血病细胞C23的裂解,从而保护热休克反应引起的核仁损伤^[8]。近年来的研究揭示了HSP25在保护细胞骨架、抗应激损伤、抗凋亡及其他方面的功能,发现其与肌肉、神经系统等多种疾病有重要关系。因此对HSP25调控机制的研究有助于更好认识其生物学特性以及相关疾病的防治。

Kruppel样因子4(KLF4)是一个核转录因子,其基本生物学功能是对下游基因的调控。研究表明,KLF4能够对角蛋白4(keratin 4)、肠碱性磷酸酶(intestinal alkaline phosphatase, IAP)、鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase, ODC)、 β 链蛋白(β -catenin)、细胞周期蛋白D1(cyclin D1)和组胺酸脱羧酶(histidine decarboxylase, HDC)等多个基因启动子的转录活性进行调控。它具有促进表皮正常增殖分化,抑制结肠癌、膀胱癌等恶性肿瘤发生等多种功能^[9,10]。我室研究人员发现在热应激时小鼠心肌组织、肺组织以及小鼠RAW264.7细胞中KLF4的mRNA与蛋白表达也显著增高^[11,12]。

Kruppel样因子4是Sp/Kruppel样锌指转录因子家族的成员之一。这个家族目前至少已发现20个成员,如Sp1-4、KLF1-7等。Sp/Kruppel样因子是机体内一类具有重要功能的蛋白质,它们参与调控细胞增殖、分化、胚胎发育等重要生命过程,并与肿瘤等多种疾病有关。研究表明,Sp/Kruppel样因子能够诱导多种热休克蛋白的表达。例如,Sp1能够直接诱导HSP70的表达^[13];而KLF6、Sp2和Sp3能够共同诱导HSP47的表达^[14]。但KLF4是否能够诱导热休克蛋白的表达目前尚未见报道。

本试验采用稳定转染pcDNA3.1/myc-His(-)和KLF4-pcDNA3.1/myc-His(-)两种不同C₂C₁₂细胞株,

分别从mRNA水平和蛋白水平探讨KLF4在生理状态和热休克反应时对HSP25表达的影响,发现KLF4过表达促进C₂C₁₂肌原细胞中HSP25高表达。用生物信息学分析方法在小鼠HSP25基因的启动子区找到2个KLF4结合元件,说明KLF4可能通过与HSP25基因启动子区的结合元件相结合而诱导HSP25的表达,从而发挥作用。我室研究人员将运用凝胶滞留试验及荧光素酶报告基因等方法进一步阐明KLF4对HSP25基因表达的调控机制。

综上所述,HSP25的表达可能受核因子KLF4的调控,探讨其调控作用及其作用机制,为进一步利用该机制预防和治疗HSP25相关疾病提供线索,同时为研究其它热休克蛋白提供新的实验思路。

[参考文献]

- [1] Diaz-Latoud C, Buache E. Substitution of the unique cysteine residue of murine Hsp25 interferes with the protective activity of this stress protein through inhibition of dimer formation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(3-4): 436-445
- [2] Lee YJ, Lee DH. HSP25 inhibits radiation-induced apoptosis through reduction of PKC delta-mediated ROS production[J]. *Oncogene*, 2005, 24(23): 3 715-725
- [3] Lee YJ, Lee DH. HSP25 inhibits protein kinase C delta-mediated cell death through direct interaction[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(18): 18 108-119
- [4] Kelly KJ. Heat shock (stress response) proteins and renal ischemia/reperfusion injury[J]. *Contrib Nephrol*, 2005, 148: 86-106
- [5] 左晓霞, 肖献忠. 诱导型热休克蛋白对小鼠缺血性急性肾衰的保护作用[J]. *湖南医学*, 2001, 4: 241-243
- [6] Chiu PY, Ko KM. Schisandrin B protects myocardial ischemia/reperfusion injury partly by inducing Hsp25 and Hsp70 expression in rats[J]. *Mol Cell Biochem*, 2004, 266(1-2): 139-144
- [7] 刘双, 刘梅冬, 邓恭华. HSP25对小鼠心肌缺血一再灌注所致肌动蛋白损伤的保护作用[J]. *中国现代医学杂志*, 2002, 12(16): 29-31
- [8] 王慷慨, 蒋磊, 邓恭华. 热休克反应对氧化应激所致nucleolin裂解的影响[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2004, 29(5): 504-508
- [9] Zhao W, Hisamuddin IM, Nandan MO. Identification of Kruppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer[J]. *Oncogene*, 2004, 23(2): 395-402
- [10] Ohnishi S, Ohnami S, Laub F. Downregulation and growth inhibitory effect of epithelial-type Kruppel-like transcription factor KLF4, but not KLF5, in bladder cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 308(2): 251-256
- [11] 刘瑛, 袁灿, 张华莉, 肖献忠. 从HSF1基因敲除小鼠心肌组织中筛选热休克反应中受HSF1调控的靶基因[J]. *湖南医科大学学报*, 2004, 29(1): 46-50
- [12] 刘瑛, 张华莉, 袁灿, 王秋鹏, 刘梅冬, 涂自智, 等. HSF1诱导KLF4基因在热休克反应中的高表达[J]. *医学临床研究*, 2004, 21(10): 1 095-099
- [13] Bevilacqua A, Fiorenza MT, Mangia F. Developmental activation of an episomic hsp70 gene promoter in two-cell mouse embryos by transcription factor Sp1[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(7): 1 333-338
- [14] Yasuda K, Hirayoshi K, Hirata H. The Kruppel-like factor Zf9 and proteins in the Sp1 family regulate the expression of HSP47, a collagen-specific molecular chaperone[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(47): 44 613-622

(此文编辑 朱雯霞)