

# 短暂缺血再灌注对大鼠心肌 Kr $\bullet$ ppel 样因子 4 表达的影响

王浩<sup>1</sup>, 刘瑛<sup>1</sup>, 刘俊文<sup>1</sup>, 张华莉<sup>1</sup>, 周新民<sup>2</sup>, 肖献忠<sup>1</sup>

(中南大学 1. 湘雅医学院病理生理学教研室, 2. 湘雅二医院心胸外科, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 病理学与病理生理学; 缺血再灌注; Kr $\bullet$ ppel 样因子 4; 氧化应激反应

[摘要] 目的 观察大鼠心肌短暂缺血再灌注及相应的细胞氧化应激反应对 Kr $\bullet$ ppel 样因子 4 表达的影响。方法 采用短时间结扎及松解左冠状动脉前降支法构建大鼠心肌短暂缺血再灌注动物模型; 采用过氧化氢(1 mmol/L)处理 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 肌原细胞法复制相应的氧化应激细胞模型; 采用逆转录聚合酶链反应检测 Kr $\bullet$ ppel 样因子 4 mRNA 的表达; 采用蛋白免疫印迹法检测 Kr $\bullet$ ppel 样因子 4 蛋白的表达。结果 短暂缺血再灌注后, 大鼠心肌组织中 Kr $\bullet$ ppel 样因子 4 mRNA 的水平明显增加; 过氧化氢处理 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 肌原细胞后, Kr $\bullet$ ppel 样因子 4 mRNA 和蛋白的水平均明显增加。结论 大鼠心肌短暂缺血再灌注及相应的细胞氧化应激反应均能显著诱导 Kr $\bullet$ ppel 样因子 4 的高表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Transient Myocardial Ischemia-Reperfusion Induced High Expression of Kr $\bullet$ ppel-Like Factor 4 in Rats

WANG Hao<sup>1</sup>, LIU Ying<sup>1</sup>, LIU Jun Wen<sup>1</sup>, ZHANG Hua Li<sup>1</sup>, ZHOU Xin Min<sup>2</sup>, and XIAO Xian Zhong<sup>1</sup>

(1. Department of Pathophysiology, Xiangya Medical College; 2. Department of Chest and Heart Surgery, the Second Hospital of Xiangya, Central South University, Changsha 410078, Hunan, China)

[KEY WORDS] Ischemia-Reperfusion; Kr $\bullet$ ppel-Like Factor 4; Oxidative Stress

[ABSTRACT] Aim To study the effect of rat transient myocardial ischemia/reperfusion and the oxidative stress of C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells on the expression of Kr $\bullet$ ppel-like factor 4 (KLF 4) gene. Methods Rat model of transient myocardial ischemia/reperfusion was established by occluding and relaxing of left coronary artery. C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mmol/L) to build the oxidative stress model. RT-PCR and Western blotting were performed to determine the changes of KLF 4 expression.

Results Transient myocardial ischemia/reperfusion induced obvious accumulation of KLF 4 mRNA in rat. Oxidative stress distinctly raised the KLF 4 mRNA and protein levels in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells. Conclusion High expression of KLF 4 gene was induced by rat transient myocardial ischemia/reperfusion and the oxidative stress of C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells.

短暂的心肌缺血再灌注可同时导致两种现象: 心肌顿抑和缺血预适应<sup>[1,2]</sup>。心肌顿抑是指短暂的缺血再灌注使心功能和心肌代谢在一段时间内持续异常的现象。缺血预适应是指短时间的缺血再灌注可直接增强心肌对随后较长时间缺血损伤的耐受性现象。这两种现象的存在表明, 短暂缺血再灌注的刺激既有可能造成心肌组织的损伤, 还有可能调动机体自身内源性保护系统, 增强心肌对损伤的抵抗性。因此, 揭示短暂心肌缺血再灌注的分子机制, 对于充分调动机体内源性保护机制, 防治缺血导致的心肌损伤具有重要意义。

Kr $\bullet$ ppel 样因子 4 (Kr $\bullet$ ppel-like factor 4, KLF 4),

又称为肠道内富含的 Kr $\bullet$ ppel 样因子 (gut-enriched Kr $\bullet$ ppel-like factor, GKLF) 和上皮锌指蛋白 (epithelial zinc finger, EZF), 它是一个在机体中具有广泛生物学作用的核转录因子<sup>[3]</sup>; 但其在短暂心肌缺血再灌注过程中的表达情况目前尚不清楚。本研究采用大鼠心肌短暂缺血再灌注模型和相应的细胞氧化应激模型, 探讨 KLF 4 在短暂心肌缺血再灌注中的表达模式, 为进一步探讨 KLF 4 在短暂心肌缺血再灌注过程中的作用及机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

体重约 250 g 的 Wistar 雄性大鼠由本校实验动物中心提供; 小鼠 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 肌原细胞株购自中南大学细胞中心; 兔抗 KLF 4 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; 小鼠抗  $\beta$ -actin 单克隆抗体购自 Sigma 公司; 辣根过氧化物酶标记的抗小鼠和抗兔 IgG、DAB 显色试剂盒购自博士德公司; DMEM 培养基购自 Gibco 公

[收稿日期] 2007-03-07 [修回日期] 2007-09-10

[基金项目] 国家自然科学基金 (30400169; 30571746; 30571846; 30330280); 国家 973 重点项目 (G2000056908)

[作者简介] 王浩, 硕士研究生, 研究方向为心血管内源性保护机制的研究, E-mail 为 ewhen@126.com。刘瑛, 博士, 研究方向为心血管内源性保护机制的研究。通讯作者肖献忠, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为败血症休克的分子机制与防治以及心血管内源性保护的分子机制。

司;无支原体小牛血清购自杭州四季青生物工程公司;G418、二硫苏糖醇(DTT)、过硫酸胺、TEMED、硝酸纤维素膜购自 Promega 公司;十二烷基磺酸钠(SDS)、琼脂糖、蛋白酶 K 购自 Invitrogen 公司;丙烯酰胺、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺购自 Fluka 公司;Taq DNA Polymerase、dNTP、AMV 逆转录酶购自大连宝生物工程有限公司;PCR 引物由上海英骏公司合成。

## 1.2 大鼠心肌短暂缺血再灌注动物模型的建立

将 Wistar 大鼠采用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,在小动物人工呼吸机维持通气下行胸骨正中切开,短暂缺血再灌注组(10 只,雌雄各半)结扎左冠状动脉前降支,根据左心室壁颜色变灰白和心电图 ST 段抬高判断结扎完全,10 min 后松解结扎线,再灌 1、3、6、12 及 24 h,分别取左心室游离壁,立即置液氮中冷冻并置 -80℃ 保存<sup>[4]</sup>;对照组(2 只,雌雄各半)不结扎左冠状动脉前降支,取左心室游离壁,立即置液氮中冷冻并置 -80℃ 保存。

## 1.3 细胞氧化应激模型的复制

将细胞按  $1 \times 10^6$ /每瓶的密度接种在  $25 \text{ cm}^2$  培养瓶中,用 5 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养。氧化应激组 24 h 后替换为含过氧化氢(1 mmol/L)的无血清培养基,置 37℃、CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,在 1、4、8、12 和 16 h 时间点收集标本;对照组 24 h 后用无血清培养基,置 37℃、CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 16 h 收集标本。

## 1.4 总 RNA 提取

用 Trizol 试剂抽提细胞和组织的总 RNA,并用 DNA 酶 1 消化除去总 RNA 中的痕量 DNA;1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA。紫外分光光度计测量  $A_{260}/A_{280}$  比值。

## 1.5 逆转录聚合酶链反应

采用 Primer3 软件设计 KLF 4 基因引物,序列为 5'-GCC GGA AGG GAG AAG ACA C-3' 和 5'-GGG GAA GAC GAG GAT GAA GC-3',以细胞和组织的总 RNA 为模板进行 RT-PCR 反应,以 GAPDH 为内对照,经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭染色后于紫外透射仪摄像。

## 1.6 免疫印迹分析

用  $2 \times \text{SDS}$  加样缓冲液裂解细胞,收集蛋白,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。经 10% SDS-PAGE 电泳分离、转膜和 2% 白蛋白 4℃ 封闭过夜后,依次加入特异性一抗、辣根过氧化物酶偶联的二抗,25℃ 孵育 1 h, DAB 显色。

## 2 结果

### 2.1 短暂缺血再灌注模型的鉴定

短暂缺血再灌注组缺血期 ST 段抬高,而假手术组无 ST 段抬高,说明缺血再灌注组左冠状动脉主支结扎完全。缺血再灌注组在再灌期有 38.4% 发生了室性心动过速、心率不齐等心电图异常改变,而假手术组则无心电图异常现象,说明大鼠心肌短暂缺血再灌注模型复制成功。

### 2.2 短暂缺血再灌注对大鼠心肌 Kr<sup>ppel</sup> 样因子 4 mRNA 表达的影响

KLF 4 mRNA 在大鼠心肌短暂缺血再灌注后 1、3、6、12 及 24 h 表达均增高(图 1)。

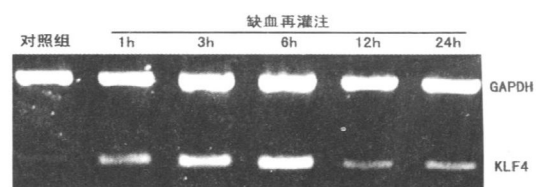


图 1. Kr<sup>ppel</sup> 样因子 4 mRNA 在大鼠心肌缺血再灌后不同时间点的表达

### 2.3 氧化应激反应 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 细胞 Kr<sup>ppel</sup> 样因子 4 mRNA 的表达

在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 1、4、8、12 和 16 h 时, C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 肌原细胞株中 KLF 4 mRNA 表达显著增高,随着处理时间的延长, KLF 4 mRNA 表达量不断增加,具有时间依赖性(图 2)。

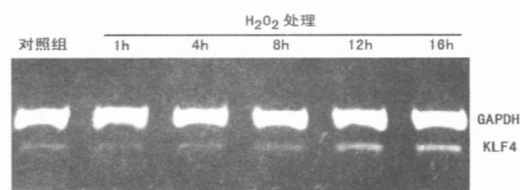


图 2. Kr<sup>ppel</sup> 样因子 4 mRNA 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理的 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 细胞中的表达

### 2.4 氧化应激反应 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 细胞 Kr<sup>ppel</sup> 样因子 4 蛋白的表达

在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 6、12、18 和 24 h 时, C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 肌原细胞株中 KLF 4 蛋白的表达显著增高(图 3)。

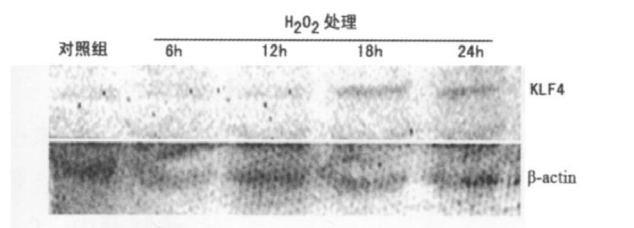


图 3. Kruppel 样因子 4 蛋白在过氧化氢处理的 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 细胞中的表达

### 3 讨论

心肌缺血在临床上非常常见,如冠状动脉粥样硬化引起的冠状动脉阻塞,冠状动脉痉挛以及心脏移植供体心的缺血等。缺血心肌在形态、功能和代谢等方面可呈现诸多形式的损伤。损伤的发生是多种因素共同作用的结果,如酸中毒、钙超载、能量匮乏、自由基产生等<sup>[5,6]</sup>。但短暂的心肌缺血再灌注过程既可能造成心肌损伤(如心肌顿抑),又可能导致机体内源性保护系统的激活(如心肌缺血预适应)。因此,除单纯恢复血流外,阐明短暂心肌缺血再灌注的分子机制,调动机体自身的内源性保护系统,同时采取细胞保护措施防止短暂缺血再灌注造成的损伤,是心血管系统研究的热点方向之一。

Kruppel 样因子 4(KLF 4)是一个核转录因子。它能够与下游基因启动子区的 GC 盒、CACCC 盒和基础转录元件三种结合元件相结合,从而调控这些基因的转录。研究表明,KLF 4 能够对角蛋白 4、肠碱性磷酸酶(intestinal alkaline phosphatase, IAP)<sup>[7]</sup>、鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase, ODC)、β 链蛋白、细胞周期蛋白 D1 和组胺酸脱羧酶(histidine decarboxylase, HDC)<sup>[8]</sup>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,抑制结肠癌、膀胱癌等恶性肿瘤发生等多种功能<sup>[9,10]</sup>。KLF 4 是 Sp/Kruppel 样锌指转录因子家族的成员之一。Sp/Kruppel 样因子是机体内一类具有重要功能的蛋白质。研究表明,该转录因子家族中的多个成员对心血管系统具有重要影响。例如,KLF 5 是心血管重构的关键调控因子,它能够诱导转化生长因子 β(transforming growth factor-β, TGF-β)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)等基因表达增高,从而促进心血管重建<sup>[11]</sup>。Liu 等<sup>[12]</sup>发现 KLF 4 可能在颈动脉的损伤修复过程中发挥重要作用。

本研究采用大鼠短暂心肌缺血再灌注整体动物

模型探讨了 KLF 4 基因的表达模式,发现 KLF 4 mRNA 在大鼠心肌缺血再灌注时表达显著增高,且其表达水平呈时间依赖性。由于氧化应激是缺血再灌注过程中的一个重要反应,本研究进一步在细胞水平复制了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致的 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 细胞氧化应激模型并探讨氧化应激对 KLF4 表达的影响,结果发现氧化应激使 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 细胞中 KLF 4 的 mRNA 与蛋白表达均显著增高。提示 KLF 4 能在短暂心肌缺血再灌注过程中表达显著增高。由此可见,KLF 4 作为机体中的一个具有广泛功能的转录因子,可能在短暂心肌缺血再灌注过程中也具有重要作用。深入探讨其在短暂心肌缺血再灌注过程中的功能及其机制,为揭示心肌的内源性保护分子机制以及防治心肌缺血再灌注损伤提供重要线索和思路。

### [参考文献]

- [1] Bellefroid EJ, Poncelet DA, Lecocq PJ, Revelant O, Martial JA. The evolutionarily conserved Kruppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (9): 3 608-612.
- [2] Ryan RF, Schultz DC, Ayyanathan K, Singh PB, Friedman JR, Fredericks WJ, et al. KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing [J]. *Molecular Cellular Biology*, 1999, **19** (6): 4 366-378.
- [3] Kaczynski J, Cook T, Urrutia R. Sp1 and Kruppel-like transcription factors [J]. *Genome Biol*, 2003, **4** (2): 206.
- [4] 王尧玲,王建设,刘双,袁灿,吕青兰,刘梅冬,等.大鼠心肌缺血预适应延迟相的差异蛋白质的分离及鉴定[J].中国动脉硬化杂志,2005, **13** (4): 456-460.
- [5] Laity JH, Lee BM, Wright PE. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, **11** (1): 39-46.
- [6] Mackay JP, Crossley M. Zinc fingers are sticking together [J]. *Trends Biochem Sci*, 1998, **23** (1): 1-4.
- [7] Okano J, Opitz OG, Nakagawa H, Jenkins TD, Friedman SL, Rustgi AK. The Kruppel-like transcriptional factors ZF9 and GKLF coactivate the human keratin 4 promoter and physically interact [J]. *FEBS Lett*, 2000, **473**: 95-100.
- [8] Ohnishi S, Ohnami S, Laub F, Aoki K, Suzuki K, Kanai Y, et al. 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**: 251-256.
- [9] Shie JL, Chen ZY, Fu M, Pestell RG, Tseng CC. Gut-enriched Kruppel-like factor represses cyclin D1 promoter activity through Sp1 motif [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**: 2 969-976.
- [10] Ai W, Liu Y, Langlois M, Wang TC. Kruppel-like factor 4 (KLF 4) represses histidine decarboxylase (HDC) gene expression through an upstream Sp1 site and downstream gastrin responsive elements [J]. *J Biol Chem*, 2003, [Epub ahead of print].
- [11] Shindo T, Manabe I, Fukushima Y, Tobe K, Aizawa K, Miyamoto S, et al. Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling [J]. *Nat Med*, 2002, **8**: 856-863.
- [12] Liu Y, Sinha S, McDonald OG, Shang Y, Hoofnagle MH, Owens GK. Kruppel-like factor 4 abrogates myocardium-induced activation of smooth muscle gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2005, **280**: 9 719-727.

(此文编辑 文玉珊)