

Kr \cdot ppel 样因子 4 过表达对热应激所致 C2C12 细胞凋亡的影响

刘梅冬, 刘 瑛, 刘俊文, 张华莉, 肖献忠

(中南大学湘雅医学院病理生理学系, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 病理学与病理生理学; Kr \cdot ppel 样因子 4; 基因转染; C2C12 细胞; 细胞凋亡

[摘要] 目的 探讨 Kr \cdot ppel 样因子 4 对热应激所致 C2C12 小鼠肌原细胞凋亡的影响。方法 采用热应激(42.5℃)处理 Kr \cdot ppel 样因子 4 过表达的 C2C12 细胞 1 h, 37℃恢复 12 h; 采用流式细胞术、Hoechst33258 染色检测细胞凋亡; 采用 Western blot 检测凋亡相关蛋白 bcl-2、bax 的表达。结果 流式细胞术结果发现, 两组细胞凋亡百分率较热应激前均升高, 但与转空载体组相比较 Kr \cdot ppel 样因子 4 过表达组升高更明显, 凋亡百分率达 19.6%; 荧光染色可见细胞出现核固缩、凋亡小体等凋亡形态学改变; Kr \cdot ppel 样因子 4 组细胞经 Western blot 能检测到 bcl-2、bax 蛋白明显改变。结论 Kr \cdot ppel 样因子 4 可以诱导热应激所致 C2C12 小鼠肌原细胞凋亡。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Kr \cdot ppel-Like Factor 4 Overexpression on Heat Stress-Induced Apoptosis of C2C12 Cells

LIU Mei-Dong, LIU Ying, LIU Jun-Wen, ZHANG Hua-Li, and XIAO Xian-Zhong

(Department of Pathophysiology, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410078, China)

[KEY WORDS] Kr \cdot ppel-Like Factor 4; Transfection; C2C12 Cells; Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of Kr \cdot ppel-like factor 4 (KLF4) overexpression on heat stress-induced apoptosis of C2C12 cells. **Methods** C2C12 cells transfected with pcDNA3.1 or pcDNA3.1-KLF4 plasmids were exposed to heat stress (42.5℃) for 1 h and recovered at 37℃ for 12 h. Flow cytometry (FCM) and Hoechst33258 staining assays were performed to assess the apoptosis; the expression of Bcl-2 and Bax was detected by Western blots. **Results** After heat stress, FCM showed that apoptotic cells significantly increased and the percent of apoptosis was 19.6% in the cells overexpressed with KLF4.

It was determined were characterized with classical morphologic changes including apoptotic body and nuclear condensation in the cells overexpressed with KLF4. And the expression of Bcl-2 and Bax also significantly changed in the cells overexpressed with KLF4. **Conclusion** KLF4 overexpression promoted the apoptosis of C2C12 cells.

Kr \cdot ppel 样因子 4(Kr \cdot ppel-like factor 4, KLF4) 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。最近, 本实验室研究人员发现, 热应激能够诱导 C2C12 细胞中 KLF4 蛋白和 mRNA 的表达显著上调^[1], 且上调水平呈时间依赖性。本研究拟观察 KLF4 过表达对热应激所致 C2C12 小鼠肌原细胞凋亡的影响, 以进一步揭示机体应激反应的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

C2C12 小鼠肌原细胞由本校细胞中心提供;

[收稿日期] 2007-04-20 [修回日期] 2008-03-02

[基金项目] 国家自然科学基金(30400169, 30470851)

[作者简介] 刘梅冬, 实验师, 主要从事心血管内源性保护的机制研究, 联系电话 0731-2355022, E-mail 为 LiuMD2005@126.com。通讯作者刘瑛, 博士, 讲师, 主要从事心血管内源性保护的机制研究, E-mail 为 liu1977ying@126.com。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。

DMEM 培养基购自 Gibco 公司; G418 购自 Promega; 无支原体小牛血清杭州四季青生物工程公司产; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗鼠 IgG 或抗兔 IgG 购自 Sigma 公司硝酸纤维素膜购自 Promega 公司; DAB 显色试剂盒购自博士德生物工程有限公司; 真核表达载体质粒 pcDNA3.1/myc-his (-) B、Hoechst33258 购自 Invitrogen life technologies (ILT) 公司; pcDNA3.1-KLF4 重组质粒, 本室构建; 兔抗 KLF4 多克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology; 鼠抗 bcl-2 抗体为 Stressgen 产品; 鼠抗 bax 单克隆抗体为 BD Pharmingen 产品。

1.2 pcDNA3.1-KLF4 转染 C2C12 小鼠肌原细胞株

按照 ILT 公司提供的转染操作说明书, 将空载体载体 pcDNA3.1 和重组质粒 pcDNA3.1-KLF4 导入 C2C12 细胞中, 根据本室以往所建立的方法筛选过表达细胞株^[2]。

1.3 细胞热处理

将细胞置 42.5℃恒温循环水浴锅中孵育 1 h,

然后放入 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中继续培养 12 h 后, 进行后续实验。

1.4 流式细胞术

本实验由北京鼎国生物技术公司协助完成。参考该公司流式细胞检测说明收集细胞。分别在细胞热应激处理后恢复 12 h 刮下细胞并收集于 10 mL 离心管中, 1 kr/min 常温下离心 8 min, 弃上清, 用冷的 PBS 液重悬细胞, 同上离心后弃上清。用 70% 乙醇重悬并固定细胞, 力求单细胞化。

1.5 Hoechst33258 染色荧光显微镜观察

分别在热应激处理前和继续培养 12 h 后刮下细胞, 离心收集细胞 (1 kr/min, 8 min), PBS 洗涤一遍, 用 4% 多聚甲醛固定。常规细胞涂片, Hoechst 33258 常温染色 2~3 min 后封片, 荧光显微镜下观察照相。

1.6 免疫印迹分析

按《分子克隆实验指南》所载方法进行。用 1× 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。每泳道上样 30 μg 蛋白, 经 10% SDS-PAGE (70 V 和 120 V 分别电泳 2 h 和 4 h) 电泳后, 电转膜至硝酸纤维素膜, 室温封闭后, 先后加入兔抗 KLF4 多克隆抗体, 或鼠抗 bcl-2 单克隆抗体, 或鼠抗 bax 单克隆抗体, 及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 或兔抗鼠 IgG 孵育, DAB 显色试剂盒进行显色 (内标采用检测 GAPDH 或 TUBULIN)。

1.7 统计处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用 *t* 检验分析。以 *P* < 0.05 判断为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 筛选高表达 Kr^{ppel} 样因子 4 的细胞克隆

采用脂质体法分别转染 KLF4 的真核表达质粒 pcDNA3.1-KLF4 和空载体 pcDNA3.1 至 C2C12 细胞后。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 1)。

2.2 Kr^{ppel} 样因子 4 影响热应激所致细胞凋亡

流式细胞术检测结果发现, 转入 pcDNA3.1 和转 pcDNA3.1-KLF4 两种细胞正常时细胞凋亡百分率分别为 1.78% ± 1.21% 和 9.05% ± 1.52%, 热应激处理后分别为 12.7% ± 1.67% 和 19.6% ± 1.71%, 均出现凋亡峰, 但转 pcDNA3.1-KLF4 组较转空载体 pcDNA3.1 组明显升高。

Hoechst33258 染色后于荧光显微镜下可见, 热

处理前细胞核呈均匀弥散荧光, 而经热应激处理后细胞出现凋亡核形态学改变, 而 pcDNA3.1-KLF4 组较转空载体 pcDNA3.1 组表现更明显, 出现体积缩小, 核碎裂, 核固缩, 致密浓染的颗粒状荧光等典型的凋亡形态学改变 (图 2)。



图 1. Western blot 检测 KLF4 稳定转染 C2C12 细胞株中 KLF4 蛋白表达情况

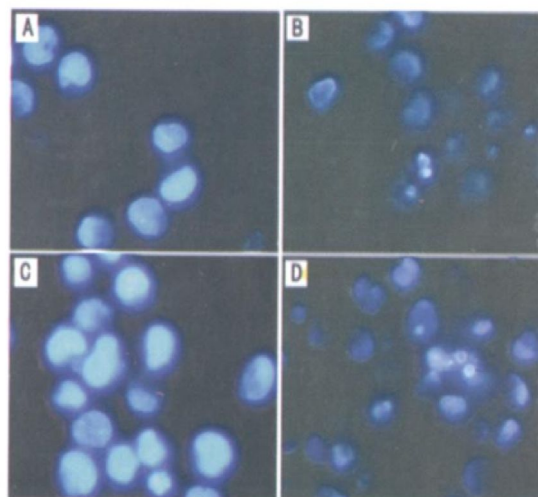


图 2. Hoechst 荧光染色发现 Kr^{ppel} 样因子 4 对热应激 (42.5℃, 1 h) 所致的细胞凋亡。上为热应激处理前 (A) 后 (B) 转空载体组 C2C12 细胞荧光染色细胞核, 下为热应激处理前 (C) 后 (D) 转 KLF4 组 C2C12 细胞荧光染色细胞核。

2.3 Kr^{ppel} 样因子 4 过表达对 Bcl-2 及 Bax 基因蛋白水平表达的影响

Western blot 结果发现, 热应激处理后 pcDNA3.1 组细胞 bcl-2、bax 蛋白无明显改变, 而 KLF4 过表达组细胞 bcl-2 蛋白明显降低, Bax 蛋白表达明显升高 (图 3)。

3 讨论

热应激是自然界一种常见的应激反应。它能够诱导机体中多种蛋白的表达, 从而进一步调节机体的生理状态。其中, 一部分蛋白的诱导表达对机体具有重要的保护作用, 例如热休克蛋白。研究者发现, 热休克蛋白在机体中具有很强的细胞保护功

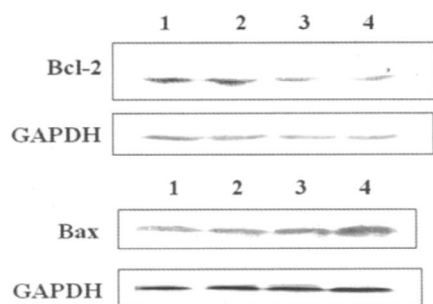


图 3. Kr μ pel 样因子 4 过表达对热应激(42.5 $^{\circ}$ C, 1 h) 所致细胞 Bcl-2 和 Bax 基因蛋白水平表达的影响 1 和 2 为正常转空载体和转 KLF4 细胞蛋白, 3 和 4 为热应激处理转空载体和转 KLF4 细胞恢复 12 h 时细胞蛋白。

能^[3];作为分子伴侣,它们参与多种信号通路的调节。而另一些蛋白质的诱导表达则能够导致细胞损伤。例如, E-64 和胃蛋白酶抑制剂 A 的诱导表达能够促进热刺激所导致的细胞周期加速,从而加速细胞死亡^[4];精子细胞在热应激早期发生凋亡,该凋亡过程是由 Fas-FasL 系统来介导的^[5];此外,在 BC-8 肿瘤细胞中,热应激能导致 CD95 抗原基因的表达,该基因的表达能启动热休克所导致的细胞凋亡^[6]。但是,热应激损伤的分子机制尚不完全清楚。

Kr μ pel 样因子 4KLF4 是 Sp/Kr μ pel 样转录因子家族的重要成员。SP/Kr μ pel 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。KLF4 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,从而调控这些基因转录。研究表明, KLF4 能对角蛋白 4、肠碱性磷酸酶、鸟氨酸脱羧酶、 β 链蛋白、细胞周期蛋白 D1 和组胺酸脱羧酶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^[7,8]。Segre 等^[9]发现 KLF4 基因敲除小鼠由于表皮发育障碍,出生后很快便因外部有害物质的渗透和体液的快速丢失而死亡。但是, KLF4 是否对 C2C12 细胞的增殖和凋亡有影响,目前尚不清楚。

最近,本实验室研究人员发现,热应激和氧化应激均能够诱导 C2C12 细胞中 KLF4 蛋白和 mRNA 的表达显著上调^[1,10],且上调水平呈时间依赖性。为了进一步研究 KLF4 在热应激状态下对 C2C12 细胞增殖和凋亡的影响,本研究采用 KLF4 过表达的 C2C12 细胞株,用流式细胞术、Hoechst33258 染色两个指标来检测 KLF4 过表达对 C2C12 细胞凋亡的影响。结果发现, KLF4 过表达能显著提高热应激所致的 C2C12 细胞凋亡率,由此可见, KLF4 可能是热应

激的细胞损伤机制之一,能够促进热应激所导致的细胞损伤、生长抑制和凋亡。为了进一步探讨 KLF4 过表达促进热应激所致 C2C12 细胞凋亡的机制,本研究采用 Western blot 检测了 KLF4 过表达对凋亡相关蛋白 bcl-2 和 bax 表达的影响。结果发现, KLF4 过表达能够抑制 bcl-2 的表达,而促进 bax 的表达。bcl-2 是一个机体中重要的凋亡调控基因,它能够抑制细胞凋亡。bax 与 bcl-2 具有 40% 同源性,但作用却完全相反,起着加速细胞凋亡的作用。在机体中, bax 蛋白能够形成同源二聚体,可诱导细胞凋亡;但 bcl-2 能够与 bax 形成比 bax/bax 同源二聚体更稳定的 bax/bcl-2 异源二聚体,抑制 bax 诱导的细胞凋亡。因此, bcl-2 与 bax 的比例决定了细胞对凋亡信号敏感性^[11]。当 bcl-2 表达下调而 bax 表达上调时,细胞的凋亡率即随之增高。结合本研究的发现,我们认为 KLF4 过表达能够通过调节凋亡相关蛋白 bcl-2 与 bax 的比例来促进热应激所致的 C2C12 细胞凋亡。

综上所述, KLF4 过表达能够明显促进热应激所致的 C2C12 细胞凋亡,深入探讨其分子机制,有助于全面系统地揭示机体应激反应机制,并为进一步利用该机制预防和治疗相关疾病提供线索。

[参考文献]

- [1] Liu Y, Wang J, Xiao XZ, et al. Induction of KLF4 in response to heat stress [J]. *Cell Stress Chaperon*, 2006, **11** (4): 379-389.
- [2] 易宇欣, 刘瑛, 刘俊文, 等. 采用 cDNA 芯片检测 Kr μ pel 样因子 4 过表达对 C2C12 细胞基因表达谱的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (8): 585-590.
- [3] Hendrick JP, Hartl FU. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins [J]. *Annu Rev Biochem*, 1993, **62**: 349-384.
- [4] Zhu WG, Aramki R, Cai Y, et al. Promotion of heat-induced apoptosis in FM3A cells by protease inhibitors [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **225** (3): 924-931.
- [5] Hikim AP, Lue Y, Yamamoto CM, et al. Key apoptotic pathways for heat-induced programmed germ cell death in the testis [J]. *Endocrinology*, 2003, **144** (7): 3 167-175.
- [6] Sreedhar AS, Pardhasaradhi BV, Khar A, et al. Heat induced expression of CD95 and its correlation with the activation of apoptosis upon heat shock in rat histiocytic tumor cells [J]. *FEBS Lett*, 2000, **472** (2-3): 271-275.
- [7] Zhao W, Hisamuddin IM, Nandan MO, et al. Identification of Kruppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer [J]. *Oncogene*, 2004, **23** (2): 395-402.
- [8] Ohnishi S, Ohnami S, Laub F, 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** (2): 251-256.
- [9] Segre JA, Bauer C, Fuchs E. KLF4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin [J]. *Nat Genet*, 1999, **22** (4): 356-360.
- [10] 王浩, 刘瑛, 刘俊文, 等. 短暂缺血再灌注对大鼠心肌 Kr μ pel 样因子 4 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (11): 813-815.
- [11] Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, et al. Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction [J]. *Circulation*, 1996, **94** (7): 1 506-512.

(此文编辑 胡必利)