

DIDS对十字孢碱诱导心肌细胞凋亡中磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B信号转导的影响

刘安恒^{1,2}, 曹亚南¹, 张卫卫¹, 师堂旺¹, 刘艳¹, 王晓明¹

(1. 中国人民解放军第四军医大学西京医院老年病科, 陕西省西安市 710032)

2. 军事医学科学院附属 307医院心内科, 北京市 100071)

[关键词] 生理学; 心肌细胞; 凋亡; 氯离子通道阻断剂; 十字孢碱; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B

[摘要] 目的 探讨氯离子通道阻断剂 DIDS对十字孢碱诱导心肌细胞凋亡与磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B信号及其下游分子一氧化氮合酶/一氧化氮的关系。方法 实验分为对照组、十字孢碱组、DIDS组、LY294002(特异性磷脂酰肌醇 3-激酶抑制剂)组和 L-NAME(非特异性一氧化氮合酶抑制剂)组。在十字孢碱诱导心肌细胞凋亡模型上, 观察 DIDS对心肌细胞存活率、凋亡和磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B及其下游分子一氧化氮合酶/一氧化氮的影响。结果 与十字孢碱组比, DIDS明显改善细胞存活率, 提高了细胞磷酸化蛋白激酶 B活性 2.1倍 ($P < 0.01$), 增加了一氧化氮合酶和磷酸化一氧化氮合酶的水平和一氧化氮水平 ($P < 0.01$); LY294002预处理完全抑制了磷酸化蛋白激酶 B、一氧化氮合酶和磷酸化一氧化氮合酶水平的升高及升高的一氧化氮, 完全阻断了 DIDS的抗细胞凋亡作用; L-NAME预处理也使升高的一氧化氮水平下降, 但仅部分阻断了 DIDS的细胞保护作用。结论 DIDS通过激活磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B信号通路发挥其抑制十字孢碱诱导的心肌细胞凋亡作用。

[中图分类号] Q4

[文献标识码] A

The Effect of DIDS on Phosphatidylinositol 3'-Kinase/Proteinase B Signal Transduction of Staurosporine-Induced Cardiomyocyte Apoptosis

LIU An-Heng^{1,2}, CAO Ya-Nan¹, ZHANG Wei-Wei¹, SHI Tang-Wang¹, LIU Yan¹, and WANG Xiao-Ming¹

(1. Department of Geriatrics, Xijing Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Department of Cardiology, 307 Hospital of PLA, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

[KEY WORDS] Cardiomyocyte Apoptosis Chloride Channel Blockers Staurosporine Phosphatidylinositol 3'-Kinase/Proteinase B

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of chloride channel blocker DIDS on cell signaling pathway phosphatidylinositol 3'-kinase/proteinase B (PI3K/Akt) and its downstream molecules endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and nitric oxide (NO) in staurosporine (STS)-treated cardiomyocyte apoptosis. **Methods** Neonatal rat cardiomyocytes were exposed to STS in the presence or absence of DIDS. Cell viability, apoptosis and expressions of Akt, phospho-Akt (p-Akt), eNOS, phospho-eNOS (p-eNOS) and NO production were determined. **Results** DIDS markedly improved cell viability on STS-exposed cardiomyocytes. DIDS resulted in a 2.1-fold increase of p-Akt over control levels, prevented the reduction in eNOS expression and phospho-eNOS levels induced by STS and significantly increased NO production (all $P < 0.01$). Pretreatment with LY294002, a selective PI3K inhibitor, abolished DIDS-induced increases in p-Akt, eNOS, p-eNOS and NO production, and completely abrogated the DIDS-induced anti-apoptotic effect ($P < 0.01$). Pretreatment with L-NAME, a non-selective NOS inhibitor, similarly inhibited the increased NO but only partly abolished protective effects of DIDS ($P < 0.05$). **Conclusion** DIDS inhibits STS-induced cardiomyocyte apoptosis via activating PI3K/Akt signaling pathway.

氯离子通道阻断剂可以抑制多种刺激导致的细胞凋亡^[1,2], 我们前期的研究证实氯离子通道参与了心肌细胞的凋亡过程, 阻断其通道能够有效抑制

心肌细胞凋亡的发生。但是关于通道阻断与存活信号通路之间的关系仍不清楚。磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3'-kinase/proteinase B, PI3K/Akt)信号通路在细胞的生存中起重要作用, 多种抗凋亡因子可通过调节 Akt活性发挥其抗凋亡作用^[3]。在低渗性肿胀细胞, 激活的 PI3K及其下游分子可通过调节氯电流, 参与细胞体积的调节, 促进细胞存活^[4]。在细胞凋亡的情况下, 也伴有细胞体积的变化及激活的氯电流, 而且抑制氯

[收稿日期] 2008-07-29 [修回日期] 2008-10-05

[基金项目] 国家自然科学基金 (30570758 和 30770847)

[作者简介] 刘安恒, 博士, 主治医师, 研究方向为心血管疾病的临床与基础研究, E-mail为 doctorlah@126.com。曹亚南, 硕士, 医师, 研究方向为心血管疾病的临床与基础研究。通讯作者王晓明, 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管疾病的临床与基础研究, E-mail为 xmwang@fmmu.edu.cn。

电流可以抑制细胞的凋亡,为了解 PI3K/Akt 信号通路是否参与氯离子通道阻断剂的抗凋亡作用,我们探讨了非特异性氯离子通道阻断剂 DIDS 的抗凋亡作用与 PI3K/Akt 信号通路及下游相关分子的关系。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

胶原酶 ①购自 Gibco DIDS、十字孢碱 (STS)、LY294002 和 L-NAME 购自 Sigma 兔抗 Akt 磷酸化 Akt (p-Akt)、内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 和磷酸化 eNOS (p-eNOS) 抗体购自 Cell signaling。

1.2 原代心肌细胞培养及实验分组

取新生 1 天 SD 大鼠心脏, D-Hank's 液清洗、剪碎组织。0.1% 胶原酶 ①的 HEPES 液反复消化 6~8 次。收集细胞悬液置于含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用含 10% 新生牛血清培养基重悬, 37℃ 差速贴壁约 1 h, 使成纤维细胞贴壁后, 细胞悬液经 200 目网过滤, 加入 10 mmol/L 5-溴-2-脱氧尿苷 (5-bromo-2'-deoxyuridine, Brdu) 母液, 使其终浓度为 0.1 mmol/L, 37℃、CO₂ 细胞培养箱孵育 24 h 后更换含 Brdu 新的 DMEM 培养基, 37℃ 继续孵育培养 48 h 后, 随机将其分为 5 组, 分别给予以下处理: (1) 对照组: 正常无血清 DMEM 培养液继续培养; (2) STS 组: 含有 4 μmol/L STS 的无血清 DMEM 培养液培养 8 h; (3) DIDS 组: 含有 4 μmol/L STS 和 250 μmol/L DIDS 的无血清 DMEM 培养液共同培养 8 h; (4) LY294002 组: 20 μmol/L 的特异性 PI3K 阻断剂 LY294002 预处理 1 h 后, 用含有 4 μmol/L STS、250 μmol/L DIDS 和 20 μmol/L LY294002 的无血清 DMEM 培养液处理 8 h; (5) L-NAME 组: 100 μmol/L 的非特异性 eNOS 阻断剂 L-NAME 预处理 1 h 后, 用含有 4 μmol/L STS、250 μmol/L DIDS 和 100 μmol/L L-NAME 的无血清 DMEM 培养液处理 8 h。

1.3 细胞存活率检测

按照实验方案处理后的 96 孔板培养心肌细胞, 每 100 μL 培养基加入 10 μL 的 5 g/L MTT 继续孵化 2 h, 用分光光度计进行检测, 实验结果以细胞存活率表示, 细胞存活率 = 试验组 / 对照组 × 100%。

1.4 Caspase-3 活性测定

用 Apo-ONETM Homogeneous Caspase-3 试剂盒 (美国 Promega 公司) 检测 Caspase-3 活性。含有 100 μL 培养基的实验细胞中, 加入 100 μL 的混合

Caspase-3 底物 Z-DEVD-R110 和缓冲液, 在室温下轻微摇动孵化 6~8 h, 用荧光检测仪于激发波长为 485 nm, 散发波长 538 nm 处, 读取检测荧光值。酶相对活性水平用实验组与对照组吸收比表示, 设定对照组活性为 100%。

1.5 免疫印迹法检测蛋白激酶 B、磷酸化蛋白激酶 B、一氧化氮合酶和磷酸化一氧化氮合酶水平

处理细胞后弃上清, 冰 PBS 清洗, 加入适量细胞裂解液 (20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L Na₂P₂O₇, 5 mmol/L NaF, 1 mmol/L Na₃VO₄, 0.5% Triton X-100, 1% SDS 及 1% 蛋白酶抑制剂混合物; pH 7.4), 冰上裂解 30 min, 充分吹打后收集, 4℃ 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清, -80℃ 保存。BCA 法蛋白定量, 50 μg 上样行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转移蛋白至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉 37℃ 封闭 1 h, 加入兔抗 Akt p-Akt, eNOS 和 p-eNOS 一抗 4℃ 过夜, 加入羊抗兔二抗 37℃ 孵育 1 h, 凝胶成像系统 ECL 发光成像, Lab Image 软件分析。

1.6 一氧化氮含量检测

用硝酸还原酶法检测无酚红细胞培养上清亚硝酸盐和硝酸盐 (NO₂⁻/NO₃⁻) 含量, 间接反映一氧化氮 (nitric oxide, NO) 水平。将离心后细胞培养上清 0.1 mL 去细胞后按试剂盒说明书操作, 计算 NO 含量。NO 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供, 分光光度计进行比色法测定。

1.7 统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用 one-way ANOVA 分析, 两组比较采用 LSD-t 检验。双侧 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 DIDS 对十字孢碱诱导心肌细胞存活率的影响

STS 使细胞存活率明显下降 ($P < 0.01$), 而 DIDS 处理能升高细胞存活率 ($P < 0.01$), LY294002 预处理后, 可以完全阻断 DIDS 升高细胞存活率的效应 ($P < 0.01$), 而 L-NAME 预处理仅部分阻断 DIDS 对细胞存活率的影响 ($P < 0.05$ 表 1)。

2.2 DIDS 对十字孢碱对心肌细胞 Caspase-3 活性的影响

STS 组细胞内 Caspase-3 活性较对照组升高约 4 倍 ($P < 0.01$); 加入 DIDS 后, Caspase-3 活性较 STS 组明显下降 ($P < 0.01$); LY294002 预处理完全清除了 DIDS 降低 STS 处理细胞 Caspase-3 活性的作用,

而 L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$) 预处理心肌细胞仅部分清除了 DIDS 抑制 STS 处理细胞 Caspase-3 活性的作用 (表 1)。

表 1 LY294002 及 L-NAME 预处理对 DIDS 细胞保护作用的影响

分 组	细胞存活率	Caspase-3 活性
对照组	100.0% \pm 4.4%	1.00 \pm 0.35
STS 组	42.9% \pm 3.4% ^a	4.10 \pm 0.46 ^a
DIDS 组	77.4% \pm 6.8% ^b	1.60 \pm 0.28 ^b
LY294002 组	32.0% \pm 5.7% ^d	4.70 \pm 0.31 ^d
L-NAME 组	54.7% \pm 6.3% ^c	3.20 \pm 0.22 ^c

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比; b 为 $P < 0.01$, 与 STS 组比; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 DIDS 组比。

2.3 DIDS 对十字孢碱诱导心肌细胞蛋白激酶 B 及磷酸化蛋白激酶 B 水平的影响

各实验组之间细胞内总 Akt 表达水平无明显差异。观察活性形式的 p-Akt, 对照组与 STS 组之间细胞内 p-Akt 水平无明显差异, 加入 DIDS 后 p-Akt 明显升高, 为 STS 组的 2.1 倍 ($P < 0.01$); LY294002 预处理细胞完全阻断了 DIDS 激活的 p-Akt ($P < 0.01$); 而 L-NAME 预处理则对 DIDS 升高 STS 处理细胞 p-Akt 的效应无显著影响 (表 2 和图 1)。同时发现, DIDS 单独作用 2 h (1.16 \pm 0.11)、4 h (1.02 \pm 0.13) 和 8 h (1.09 \pm 0.20) 后心肌细胞 p-Akt 水平与对照组 (1.00 \pm 0.06) 比较无明显变化, 说明 DIDS 并不直接激活正常心肌细胞 PI3K/Akt 信号通路。

2.4 DIDS 对十字孢碱诱导心肌细胞一氧化氮合酶和磷酸化一氧化氮合酶水平的影响

STS 组中 eNOS 及 p-eNOS 均较对照组明显降低 ($P < 0.01$); 加入 DIDS 后 eNOS 和 p-eNOS 水平较 STS 组明显升高 ($P < 0.01$); LY294002 预处理完全阻断了 DIDS 对 eNOS 和 p-eNOS 的影响, 而 L-NAME 预处理则对 DIDS 升高 STS 处理细胞 eNOS

和 p-eNOS 的作用无明显影响 (表 2 和图 2)。提示 DIDS 抑制心肌细胞凋亡可能与调节 PI3K/Akt 的下游分子 eNOS 有关。

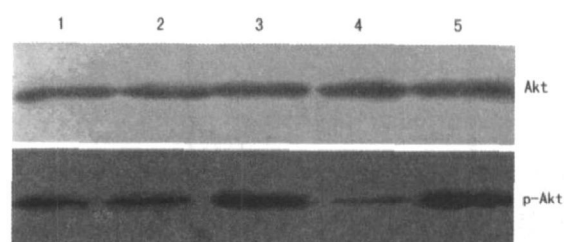


图 1 DIDS 对十字孢碱诱导心肌细胞蛋白激酶 B 和磷酸化蛋白激酶 B 水平的影响 1 为对照组, 2 为 STS 组, 3 为 DIDS 组, 4 为 LY294002 组, 5 为 L-NAME 组。

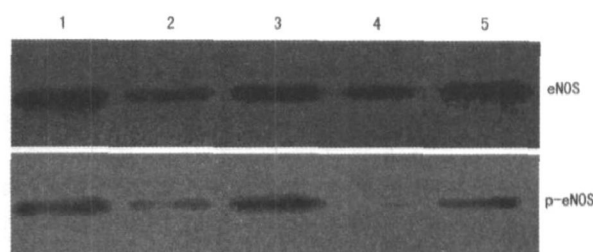


图 2 DIDS 对十字孢碱诱导心肌细胞一氧化氮合酶及磷酸化一氧化氮合酶水平的影响 1 为对照组, 2 为 STS 组, 3 为 DIDS 组, 4 为 LY294002 组, 5 为 L-NAME 组。

2.5 DIDS 对十字孢碱诱导心肌细胞一氧化氮水平的影响

与对照组比, STS 培养心肌细胞上清 NO 水平明显降低 ($P < 0.01$), 加入 DIDS 可以明显恢复 STS 处理心肌细胞 NO 含量 ($P < 0.01$); LY294002 及 L-NAME 预处理细胞均可完全阻断 DIDS 升高细胞 NO 含量的作用 ($P < 0.01$, 表 2)。

表 2 DIDS 对十字孢碱诱导心肌细胞蛋白激酶 B、一氧化氮合酶和一氧化氮水平的影响

指 标	对照组	STS 组	DIDS 组	LY294002 组	L-NAME 组
Akt	1.00 \pm 0.15	0.95 \pm 0.24	0.99 \pm 0.16	1.04 \pm 0.09	0.91 \pm 0.22
p-Akt	1.00 \pm 0.10	0.90 \pm 0.19	2.10 \pm 0.15 ^b	0.80 \pm 0.12 ^c	1.90 \pm 0.21
eNOS	1.00 \pm 0.02	0.50 \pm 0.05 ^a	0.80 \pm 0.03 ^b	0.40 \pm 0.06 ^c	0.80 \pm 0.01
p-eNOS	1.00 \pm 0.05	0.40 \pm 0.03 ^a	0.90 \pm 0.03 ^b	0.20 \pm 0.02 ^c	0.90 \pm 0.06
NO ($\mu\text{mol/L}$)	28.70 \pm 1.36	14.90 \pm 0.64 ^a	25.30 \pm 2.31 ^b	13.00 \pm 1.66 ^c	8.80 \pm 1.33 ^c

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比; b 为 $P < 0.01$, 与 STS 组比; c 为 $P < 0.01$, 与 DIDS 组比。

3 讨论

细胞的自稳态对于细胞的生存及正常功能有重要的意义。氯离子是机体内最为丰富的阴离子,近年来,大量研究显示氯离子外流参与了多种细胞凋亡过程,阻断激活的氯离子电流能减轻细胞凋亡。但阻断氯离子通道抗凋亡的分子机制仍不清楚。本实验观察了氯离子通道阻断剂 DIDS 对心肌细胞凋亡的影响及其与细胞内促存活信号通路 PI3K/Akt 及下游分子 eNOS/NO 的关系。

PI3K/Akt 是一条重要的促存活信号通路^[5]。胰岛素、胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF)、血清、促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 和 17 β 雌二醇等均被证明能够在某些情况下激活 PI3K/Akt 发挥细胞保护作用^[3]。Akt 是 PI3K 下游一个重要的活性靶激酶,可以作用于一系列凋亡相关基因或蛋白底物发挥抗细胞凋亡作用:磷酸化 Bad 使其与 Bcl-2 或 Bcl-xL 解离;使糖原合成激酶 3 β (glycogen synthase kinase, Gsk-3 β) 失活;直接磷酸化 Caspase-9, 促进凋亡抑制蛋白和凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 的表达^[3]。本研究发现 DIDS 使凋亡细胞 Akt (Ser473) 磷酸化水平比对照组及 STS 组细胞明显升高, 特异性 PI3K 抑制剂 LY294002 预处理可明显抑制激活的 p-Akt 而且能抑制 DIDS 对细胞存活率、Caspase-3 活性和细胞凋亡的影响。说明 DIDS 可能通过激活 PI3K/Akt 信号转导通路发挥其抗凋亡作用。

激活的 Akt 又是通过哪些分子实现其抗凋亡作用的呢? eNOS 是心血管系统的重要保护分子, 很多证据支持 eNOS 是 Akt 的一个重要底物, Akt 可以磷酸化 eNOS (Serine 1177), 调节其活性, 促进细胞 NO 生成^[6]。在多种心血管疾病, eNOS 磷酸化介导的 NO 生成是多种有效干预治疗的最终共同通路^[7-8]。NO 通过多种生物学效应发挥抗细胞凋亡作用^[9-10]: 亚硝基化修饰凋亡启动子 Caspase-8 和 9, 也可亚硝基化修饰凋亡效应子 Caspase-3、6 和 7^[11]; 抑制 Bcl-2 裂解, 进而抑制细胞色素 C 的释放^[12]; 也有证据表明其可作为清除剂清除心肌缺血再灌注产生的

氧自由基^[13]。本研究证实了在 STS 诱导的心肌细胞凋亡过程中伴有 eNOS、p-eNOS 和 NO 水平显著降低。在 STS 诱导细胞凋亡的同时, 加入 DIDS 可以恢复细胞内 eNOS 水平及 p-eNOS 活性, 促进 NO 的生成, 应用非特异性 NOS 抑制剂 L-NAME 预处理可以部分清除 DIDS 的抗凋亡效应, 提示激活 PI3K/Akt 信号通路, 促进 NO 升高是 DIDS 抑制细胞凋亡的重要机制, 为氯离子通道阻断剂保护受损细胞免于凋亡发生提供了新的实验依据。

[参考文献]

- [1] Wang X, Takahashi N, Uramoto H, et al. Chloride channel inhibition prevents ROS-dependent apoptosis induced by ischemia-reperfusion in mouse cardiomyocytes [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2005 **16** (4-6): 147-154.
- [2] Okada Y, Shinizu T, Maeno E, et al. Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death [J]. *J Membr Biol*, 2006 **209** (1): 21-29.
- [3] Sugden PH. Ras, Akt, and mechanotransduction in the cardiac myocyte [J]. *Circ Res*, 2003 **93** (12): 1179-1192.
- [4] Wang GX, McCudden C, Dai YP, et al. Hypotonic activation of volume-sensitive outwardly rectifying chloride channels in cultured PAMCs is modulated by SGK [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004 **287** (2): H533-544.
- [5] Sugden PH, Clerk A. Akt like a woman: gender differences in susceptibility to cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 2001 **88** (10): 975-977.
- [6] Kukreja RC, Xi L. eNOS phosphorylation: a pivotal molecular switch in vasodilation and cardioprotection [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007 **42** (2): 280-282.
- [7] Di Napoli P, Antonio Taccardi A, Grilli A, et al. Simvastatin reduces reperfusion injury by modulating nitric oxide synthase expression: an ex vivo study in isolated working rat hearts [J]. *Cardiovasc Res*, 2001 **51** (2): 283-293.
- [8] Seddon M, Shah AM, Casadei B. Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling [J]. *Cardiovasc Res*, 2007 **75** (2): 315-326.
- [9] He SY, Tan B, Deng HW, et al. Role of nitric oxide in the cardioprotection of heat stress-induced delayed preconditioning in rats [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001 **9** (5): 369-372.
- [10] 张梅, 黄铁钢, 周丽娟. 一氧化氮在乳鼠心肌细胞缺氧-复氧预处理延迟保护效应中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004 **12** (5): 545-548.
- [11] Kim YM, Bombeck CA, Billiar TR. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis [J]. *Circ Res*, 1999 **84** (3): 253-256.
- [12] Kim YM, Kim TH, Seol DW, et al. Nitric oxide suppression of apoptosis occurs in association with an inhibition of Bcl-2 cleavage and cytochrome c release [J]. *J Biol Chem*, 1998 **273** (47): 31437-441.
- [13] Li CQ, Wogan GN. Nitric oxide as a modulator of apoptosis [J]. *Cancer Lett*, 2005 **226** (1): 1-15.

(此文编辑 许雪梅)