

热休克蛋白 90在硫化氢对抗化学性缺氧引起的心肌细胞损伤中的作用

李建平¹, 杨战利², 杨春涛², 廖新学^{3,4}, 黄雪³, 王礼春³, 陈培熹², 冯鉴强²

(1 惠东县人民医院内科, 广东省惠东县 516300; 2 中山大学中山医学院生理教研室,

3 中山大学附属第一医院心血管内科, 4 高血压血管病科, 广东省广州市 510080)

[关键词] 硫化氢; 缺氧; 氯化钴; 细胞保护; 热休克蛋白; 凋亡

[摘要] 目的 探讨热休克蛋白 90在硫化氢保护 H9C2心肌细胞对抗氯化钴诱导的损伤中的作用。方法 应用不同浓度的氯化钴处理 H9C2心肌细胞, 建立化学性缺氧诱导心肌细胞损伤的实验模型。硫化氢钠(硫化氢的供体)在氯化钴处理 H9C2心肌细胞前 30 min 加入培养基中, 作为预处理。应用细胞计数试剂盒 8 检测细胞存活率; Hoechst 33258 染色荧光显微镜照相术检测凋亡心肌细胞的形态学改变; 免疫印迹法检测热休克蛋白 90 的表达。结果 在 600~1000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, 氯化钴处理 H9C2心肌细胞 24 h 呈剂量依赖性地抑制细胞存活率。在应用不同浓度氯化钴处理 H9C2心肌细胞前 30 min, 应用 400 $\mu\text{mol/L}$ 硫化氢钠可分别显著地抑制 600、800、1000 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴对心肌细胞的损伤作用, 使细胞存活率明显升高。400 $\mu\text{mol/L}$ 硫化氢钠可促进 H9C2心肌细胞的 HSP90 表达, 在硫化氢作用 6~9 h 时, HSP90 表达最多, 作用 18 h 时表达恢复到基础水平。2 $\mu\text{mol/L}$ 热休克蛋白 90 抑制剂 17-烯胺基-17-去甲基格尔德霉素自身对 H9C2心肌细胞无损伤作用, 但是能加重氯化钴对心肌细胞的损伤作用, 并能明显地阻断硫化氢抑制氯化钴对心肌细胞的损伤作用, 使 H9C2心肌细胞存活率降低, 凋亡细胞数量增多。结论 硫化氢能保护心肌细胞对抗氯化钴诱导的损伤作用, 并能上调热休克蛋白 90 表达。热休克蛋白 90 介导硫化氢的心肌细胞保护作用。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Role of Heat-Shock Protein90 in Hydrogen Sulfide-induced Protection Against Cardiac Myocytes Injuries Elicited by Chemical Hypoxia

LI Jian-Ping¹, YANG Zhan-Li², YANG Chun-Tao², LIAO Xin-Xue^{3,4}, HUANG Xue³, WANG Li-Chun³, CHEN Pei-Xi², and FENG Jian-Qiang²

(1 Department of Internal Medicine, Huidong People's Hospital, Huidong 516300 China; 2 Department of Physiology, Zhongshan Medical College; 3 Department of Cardiology; 4 Department of Hypertension and Vascular Disease, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510080 China)

[KEY WORDS] Hydrogen Sulfide; Hypoxia; Cobalt Chloride; Cytoprotection; Heat-Shock Proteins; Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To explore the role of heat-shock protein 90 in protective effect of hydrogen sulfide against H9C2 cardiac cells injuries induced by cobalt chloride. **Methods** H9C2 cells were exposed to cobalt chloride at different doses to set up the chemical hypoxia-induced cardiomyocyte injury model. Sodium hydrosulfide (a hydrogen sulfide donor) was added into cell medium for 30 min before cobalt chloride treatment. Cell viability was tested by using cell counter kit-8. Morphological changes in apoptotic cardiomyocytes were detected by Hoechst 33258 staining and photofluorography. The expression of heat-shock protein 90 was evaluated by Western blot. **Results** H9C2 cell viability was inhibited by cobalt chloride at the concentrations from 600 to 1000 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h in a dose-dependent manner. Pretreatment with 400 $\mu\text{mol/L}$ sodium hydrosulfide 30 min before exposure to cobalt chloride significantly blocked the cardiomyocyte cell injuries induced by cobalt chloride at 600, 800 and 1000 $\mu\text{mol/L}$ respectively, leading to an increase in cell viability. Heat-shock protein 90 expression was upregulated after treatment with 400 $\mu\text{mol/L}$ sodium hydrosulfide for 30 min, peaking at 6 h to 9 h, returning to the basal level at 18 h. 17-allyl amino-17-demethoxygeldanamycin (2 $\mu\text{mol/L}$), an inhibitor of heat-shock protein 90, not only enhanced H9C2 cells injury induced by cobalt chloride, but also obviously blocked the inhibition of hydrogen sulfide on cobalt chloride-induced cardiomyocyte damage, reducing viability of H9C2.

[收稿日期] 2009-02-26 [修回日期] 2009-04-10

[基金项目] 广东省科技计划项目 (No 2008B080703053, No 2007B080701030)

[作者简介] 李建平, 副主任医师, 主要从事心血管基础与临床研究, Email 为 master0@126.com。杨战利, 博士研究生, 主要从事细胞生理、心血管生理研究, Email 为 yangzhli68@163.com。通讯作者冯鉴强, 博士研究生导师, 主要从事细胞保护的基础与临床研究, Email 为 fengjq-sum@163.com。

cells increasing number of apoptotic cells which didn't damage H9C2 cells alone. **Conclusion** Hydrogen sulfide can protect H9C2 cells against cobalt chloride-induced injury and upregulate expression of heat-shock protein 90. 17-allyl- α -amino-17-demethoxygeldanamycin not only increases cobalt chloride-induced H9C2 cell injury, but also significantly inhibits the cardioprotection of hydrogen sulfide, suggesting that heat-shock protein 90 may mediate the cardioprotective effect afforded by hydrogen sulfide.

近年,被称为是体内第三种气体信号分子——硫化氢在心血管系统中的生理功能日益受到重视^[1]。硫化氢除了能舒张血管、调节血压^[2]及心肌收缩力^[3]、介导胰岛素抵抗^[4],在多种心血管疾病动物模型中发现,硫化氢具有心血管保护作用。硫化氢的供体硫氢化钠(sodium hydrosulfide, NaHS)能抑制低氧引起的肺血管收缩反应^[5]。在心肌缺血再灌注损伤的在体模型中,硫化氢能剂量依赖性地减少心肌梗死面积,并改善左心室的结构和功能^[6]。当小鼠吸入硫化氢后能降低体内代谢约90%,然后进入“假死”状态,由此保护小鼠对抗致命的缺氧损伤^[7]。

热休克蛋白(heat-shock proteins, HSP)是保护性蛋白,可被高温、缺血和缺氧等多种刺激诱导产生^[8-9]。当HSP90表达增多时,可抑制输尿管阻塞引起的新生大鼠肾皮质细胞凋亡^[10],也能抑制缺血再灌注引起的心肌损伤^[11]。本文应用氯化钴损伤来源于大鼠胚胎期心脏的H9C2细胞以建立化学性缺氧诱导的细胞损伤模型,拟探讨硫化氢能否对抗氯化钴引起的心肌细胞损伤。

1 材料和方法

1.1 材料

NaHS、氯化钴、17-丙烯胺基-17-去甲氧基格尔德霉素(17-allyl- α -amino-17-demethoxygeldanamycin, 17-AAG)、Hoechst 33258购自美国Sigma-Aldrich公司, CCK-8试剂盒购自日本Dojindo Lab, DMEM-F12培养基购自Gibco公司。H9C2心肌细胞由中山大学实验动物中心提供。

1.2 细胞培养

H9C2心肌细胞株来源于大鼠胚胎期心脏组织,在37℃, 5% CO₂条件下培养于含有20%胎牛血清的DMEM-F12培养基中。

1.3 细胞存活率的检测

H9C2心肌细胞接种于96孔培养板中,培养至80%满时,更换为含有不同处理因素的培养基,每组设5个复孔。作用完成后,每孔加10 μ L CCK-8轻摇,37℃孵育3 h,用酶标仪(λ =450 nm)记录各孔的吸光度(OD)。取5孔OD值的平均数,按公式计算细胞存活率,细胞存活率(%) = $OD_{\text{处理组}} /$

$OD_{\text{对照组}} \times 100\%$,重复3次。

1.4 Hoechst 33258核染色法检测细胞凋亡

H9C2心肌细胞经不同因素处理后,小心弃去培养基, PBS洗1遍, 4%多聚甲醛固定10 min, PBS漂洗后,加入5 mg/L Hoechst 33258试剂,室温轻摇30 min。在荧光显微镜(TE-2000 Nikon Japan)下摄片,染色质均匀分布,核被染成均匀蓝色的细胞认为是正常细胞,核呈浓缩、碎裂的明亮蓝色细胞认为是凋亡细胞,随机选取视野在荧光显微镜下摄片。

1.5 Western blot法检测热休克蛋白90的表达

H9C2心肌细胞接种于35 mm培养皿内,培养至80%满时,更换为含有400 μ mol/L NaHS的培养基培养30 min,再换为正常培养基继续培养。分别在更换培养基后0.5、3、6、9、18 h收集细胞。用预冷的PBS洗2次,加入细胞裂解液,4℃静置30 min, 12 kr/min离心10 min,取上清,采用BCA法进行蛋白定量。总蛋白经SDS-PAGE分离后,转移至PVDF膜上。用5%脱脂奶粉封闭1.5 h,随后加入HSP90抗体(1:1 000),室温孵育2 h,用TBST洗3次,加入相应的二抗,孵育1 h,漂洗3次。ECL显色后,用ImageJ 1.41o进行灰度分析,每样本重复3次。

1.6 统计学处理

统计方法采用单因素方差分析及LSD-t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 硫化氢抑制氯化钴对心肌细胞的毒性损伤作用

应用600、800和1000 μ mol/L氯化钴分别作用H9C2心肌细胞24 h,可使细胞存活率明显降低,呈剂量依赖关系($r = -0.97$)。在不同浓度氯化钴处理H9C2心肌细胞前,给予400 μ mol/L NaHS预处理30 min,可显著对抗氯化钴对细胞存活率的抑制作用。400 μ mol/L NaHS也能提高H9C2心肌细胞的存活率(表1)。

2.2 硫化氢上调心肌细胞热休克蛋白90的表达

Western blot检测显示400 μ mol/L NaHS能促进H9C2心肌细胞HSP90的表达。NaHS作用H9C2心肌细胞3 h可使HSP90表达开始升高;在

作用 6 h 和 9 h, HSP90 表达达到高峰; 作用 18 h, HSP90 表达回复到对照水平 (图 1; 表 2)。

表 1 硫化氢对氯化钴诱导的 H9C2 心肌细胞存活率降低的影响

分 组	细胞存活率	
	无 NaHS	400μmol/L NaHS
对照组	100%	114.0% ±2.1% ^a
600 μmol/L 氯化钴组	82.1% ±1.5% ^a	92.2% ±3.9% ^c
800 μmol/L 氯化钴组	64.8% ±0.9% ^b	86.9% ±4.4% ^d
1 000 μmol/L 氯化钴组	36.3% ±0.7% ^b	52.8% ±4.3% ^c

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组无 NaHS 比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与相同浓度的氯化钴组无 NaHS 比较。

表 3 热休克蛋白 90 抑制剂对氯化钴损伤 H9C2 心肌细胞的影响

分 组	细胞存活率
对照组	100.00%
氯化钴组	65.8% ±5.3% ^a
氯化钴 + 17-AAG 组	48.1% ±2.9% ^{ab}
17-AAG 组	97.9% ±2.5%

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与氯化钴处理组比较。

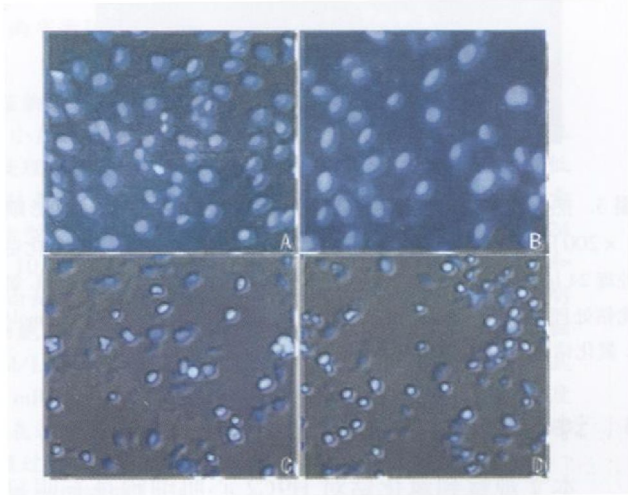


图 2 热休克蛋白 90 抑制剂对氯化钴诱导的 H9C2 心肌细胞凋亡的影响 (×200) A 为正常培养的 H9C2 细胞, B 为 2 μmol/L 17 AAG 处理 24 h C 为 800 μmol/L 氯化钴处理 24 h D 为 2 μmol/L 17 AAG 与 800 μmol/L 氯化钴共同处理 24 h

图 1 硫化氢对热休克蛋白 90 表达的影响 1 为对照组, 2~6 分别为 NaHS 处理 30 min 后 0、5、3、6、9、18 h 组。

表 2 硫化氢对热休克蛋白 90 表达的的影响

分 组	HSP90/β-actin
对照组	0.70 ±0.02
0.5 h 组	0.74 ±0.16
3 h 组	0.82 ±0.15 ^a
6 h 组	1.07 ±0.17 ^b
9 h 组	1.06 ±0.11 ^a
18 h 组	0.69 ±0.18

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.3 热休克蛋白 90 抑制剂加重氯化钴对心肌细胞的损伤作用

2 μmol/L 17-AAG (HSP90 的抑制剂) 本身不影响 H9C2 心肌细胞的存活率。但是当 2 μmol/L 17-AAG 与 800 μmol/L 氯化钴共同作用 H9C2 心肌细胞 24 h, 可使氯化钴的毒性损伤作用进一步增加 (表 3)。正常的 H9C2 心肌细胞核呈现弥漫均匀的低强度荧光; 2 μmol/L 17-AAG 不引起 H9C2 心肌细胞发生凋亡; 800 μmol/L 氯化钴处理 H9C2 心肌细胞 24 h 后, 很多 H9C2 心肌细胞呈现凋亡, 细胞核呈浓染致密的固缩形态或颗粒状荧光; 2 μmol/L 17-AAG 与 800 μmol/L 氯化钴共同处理 H9C2 心肌细胞 24 h 后, 凋亡细胞的数量进一步增多 (图 2)。

2.4 热休克蛋白 90 抑制剂阻断硫化氢的心肌细胞保护作用

800 μmol/L 氯化钴引起 H9C2 心肌细胞的存活率明显降低及凋亡数目明显增多; 400 μmol/L NaHS 预处理明显地对抗氯化钴对 H9C2 心肌细胞的损伤作用, 使细胞存活率显著升高, 使凋亡细胞数量明显减少; 17-AAG 明显地阻断硫化氢的心肌细胞保护作用, 使 H9C2 心肌细胞的存活率明显降低, 凋亡细胞数量增多 (表 4 图 3)。

表 4 热休克蛋白 90 抑制剂对硫化氢抗 H9C2 心肌细胞损伤作用的影响

分 组	细胞存活率
对照组	100%
氯化钴组	65.8% ±9.0% ^a
NaHS+ 氯化钴组	79.4% ±8.6% ^b
NaHS+ 氯化钴 + 17-AAG 组	48.8% ±13.5% ^c
NaHS+ 17-AAG 组	104.9% ±12.8%
NaHS 组	114.2% ±10.6% ^a
17-AAG 组	97.9% ±4.2%

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较, b 为 $P < 0.05$ 与氯化钴组比较, c 为 $P < 0.05$ NaHS+ 氯化钴组比较。

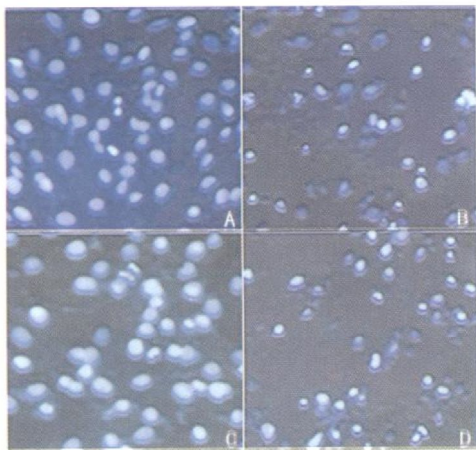


图3 热休克蛋白90抑制剂对硫化氢的抗凋亡作用的影响 ($\times 200$) A为正常培养的H9C2细胞, B为800 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴处理24 h, C为400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS预处理30 min结合800 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴处理24 h, D为400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS预处理30 min结合800 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴和2 $\mu\text{mol/L}$ 17-AAG共同处理24 h。

3 讨论

本文观察到氯化钴对H9C2心肌细胞具有明显的损伤作用,呈剂量依赖性地抑制H9C2心肌细胞的存活率,并能引起H9C2心肌细胞凋亡,应用氯化钴处理H9C2心肌细胞可有效地建立化学性缺氧损伤心肌细胞的实验模型,这与Shu等^[12]的实验结果相似。内源性硫化氢在哺乳动物组织内由胱硫醚 β -合成酶和胱硫醚 γ -裂解酶合成。其中胱硫醚 γ -裂解酶存在于心血管系统及平滑肌细胞。现已认为,硫化氢是一种能够调节多种心血管功能^[2,3]的重要生理调质。在离体和在体的心肌缺血再灌注损伤实验模型,硫化氢均能抑制心肌细胞凋亡^[6],提示硫化氢具有心肌细胞保护作用。本文证实,硫化氢的供体NaHS能保护H9C2心肌细胞对抗氯化钴引起的化学性缺氧损伤作用,提高心肌细胞存活率及减少细胞凋亡。Zhu等^[13]报道支持本文的实验结果。硫化氢(包括内源性或外源性)可作为一种对抗多种类型缺氧损伤心肌细胞的有效物质,具有一定的应用前景。

本研究证实,硫化氢能上调H9C2心肌细胞HSP90的表达。HSP是体内的自我保护机制之一^[14],HSP90表达增多能对抗缺血再灌注引起的心肌损伤^[11]。硫化氢能抑制缺血再灌注引起的肝损伤,并增加HSP90和抗凋亡蛋白Bcl-2的表达,提示硫化氢可通过上调HSP90表达来保护肝细胞对抗缺血再灌注损伤^[15]。为进一步阐明HSP90在硫化氢对抗化学性缺氧引起的心肌细胞损伤中的作

用,本文应用了HSP90抑制剂17-AAG。结果表明17-AAG能显著地阻断硫化氢的心肌细胞保护作用,使H9C2心肌细胞的存活率降低,凋亡细胞增多,证明了HSP90介导硫化氢的心肌细胞保护作用,为深入阐明硫化氢的心肌细胞保护作用机制提供了新颖的实验依据。

本文也观察到17-AAG能加重氯化钴对H9C2心肌细胞的损伤作用,提示H9C2心肌细胞本身可通过增加HSP90表达来对抗氯化钴诱导的损伤,HSP90表达上调可能是H9C2心肌细胞的自身防御机制之一。相关的机制尚需进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter [J]. *FASEB J*, 2002, **16** (13): 1792-798.
- [2] Geng B, Chang L, Pan C, et al. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **318** (3): 756-763.
- [3] Zhao W, Zhang J, Lu Y, et al. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener [J]. *EMBO J*, 2001, **20** (21): 6008-016.
- [4] 冯雪娟, 姜志胜, 陈瑜, 等. 脂肪组织内源性产生的硫化氢是胰岛素抵抗发病的重要因素 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (5): 328-328.
- [5] Zhang Q, Du J, Zhou W, et al. Impact of hydrogen sulfide on carbon monoxide/heme oxygenase pathway in the pathogenesis of hypoxic pulmonary hypertension [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **317** (1): 30-37.
- [6] Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, et al. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104** (39): 15560-565.
- [7] Blackstone E, Roth MB. Suspended animation-like state protects mice from lethal hypoxia [J]. *Shock*, 2007, **27** (4): 370-372.
- [8] Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators [J]. *Genes Dev*, 1998, **12** (24): 3788-796.
- [9] 肖卫民, 蒋碧梅, 石永忠, 等. 从凋亡信号通路探讨热休克蛋白保护过氧化氢所致心肌细胞凋亡的机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (4): 283-286.
- [10] Manucha W, Valles PC. Cytoprotective role of nitric oxide associated with Hsp70 expression in neonatal obstructive nephropathy [J]. *Nitric Oxide*, 2008, **18** (3): 204-215.
- [11] Kupatt C, Dessy C, Hinkel R, et al. Heat shock protein 90 transfection reduces ischemia-reperfusion-induced myocardial dysfunction via reciprocal endothelial NO synthase serine 1177 phosphorylation and threonine 495 dephosphorylation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (8): 1435-441.
- [12] Shu B, Yang WW, Yang HT. Expression pattern of E2F6 in physical and chemical hypoxia-induced apoptosis [J]. *Sheng Li Xue Bao*, 2008, **60** (1): 1-10.
- [13] Zhu YZ, Wang ZJ, Ho P, et al. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats [J]. *J Appl Physiol*, 2007, **102** (1): 261-268.
- [14] 王慷慨, 邓恭华, 肖卫民, 等. 热休克蛋白70对过氧化氢所致小鼠心肌细胞核仁损伤的保护作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (5): 384-388.
- [15] Jha S, Calvert JW, Duranski MR, et al. Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signaling [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, **295** (2): H801-806.

(此文编辑 李玲玲)