

[文章编号] 1007-3949(2010)18-08-0621-04

• 实验研究 •

热休克蛋白 70通过 Bcl-2抑制氧化应激所致 C2C12细胞凋亡

张彬^{1,2}, 邓红兵², 周斌², 谭斯品², 蒋碧梅²

(中南大学湘雅医学院 1. 组织学与胚胎学系, 2. 病理生理学系, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] C2C12肌原细胞; 热休克蛋白 70 Bcl-2 H₂O₂; 细胞凋亡

[摘要] 目的 探讨 C2C12肌原细胞内热休克蛋白 70对 Bcl-2表达的影响及 Bcl-2对热休克蛋白 70抗细胞凋亡作用的影响。方法 应用 Western Blotting观察 Bcl-2在转染热休克蛋白 70真核表达质粒 (pcDNA3.1-HSP70)或其反义寡核苷酸 C2C12肌原细胞中的表达;采用基因瞬时转染技术使热休克蛋白 70过表达的 C2C12肌原细胞内 Bcl-2表达抑制,应用流式细胞术检测 H₂O₂处理所致细胞凋亡的发生情况。结果 转染热休克蛋白 70真核表达质粒的 C2C12肌原细胞中,热休克蛋白 70和 Bcl-2的表达明显高于空载体转染组 ($P < 0.01$);而转染热休克蛋白 70反义寡核苷酸后,热休克蛋白 70和 Bcl-2的表达明显低于随机寡核苷酸转染组 ($P < 0.01$);热休克蛋白 70过表达的 C2C12肌原细胞分别转染 Bcl-2反义寡核苷酸及随机寡核苷酸, 0.5 mmol/L H₂O₂处理 24 h, Bcl-2反义寡核苷酸转染组的细胞凋亡率明显高于随机寡核苷酸转染细胞组。结论 热休克蛋白 70能上调 C2C12肌原细胞内 Bcl-2的表达;热休克蛋白 70的抗细胞凋亡功能可能与其上调 Bcl-2表达相关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Heat Shock Protein 70 Protected Against Oxidative Stress-Induced Apoptosis in C2C12 Myogenic Cells by Upregulation of Bcl-2

ZHANG Bin¹, DENG Hong-Bing², ZHOU Bin², TAN Sipin², and JIANG Bimei²

(1 Department of Histology and Embryology, 2 Department of Pathophysiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China)

[KEY WORDS] C2C12 Myogenic Cells Heat Shock Protein 70 Bcl-2 H₂O₂; Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of heat shock protein 70(HSP70) on Bcl-2 expression and investigate the role of Bcl-2 in HSP70's antiapoptosis in C2C12 cells. **Methods** Western Blotting were used to identify the expression of Bcl-2 in the C2C12 cells transfected with pcDNA3.1-HSP70 or HSP70's antisense oligonucleotide. The apoptosis were analysed by flow cytometry in the HSP70-overexpressed C2C12 cells which were transfected with Bcl-2's antisense oligonucleotide and then treated with H₂O₂ (0.5 mmol/L). **Results** The expression of HSP70 and Bcl-2 was increased in the C2C12 cells transfected with pcDNA3.1-HSP70, but the expression of HSP70 and Bcl-2 was decreased in the C2C12 cells transfected with HSP70's antisense oligonucleotide. In the HSP70-overexpressed C2C12 cells transfected with Bcl-2's antisense oligonucleotide, H₂O₂-induced apoptosis rate was higher than that in the cells transfected with Bcl-2's scramble oligonucleotide. **Conclusion** HSP70 contributed to the upregulation of Bcl-2 expression, Bcl-2 played an important role in HSP70-mediated protection against H₂O₂-induced apoptosis.

热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)可通过多种途径如与凋亡诱导因子、凋亡蛋白酶活化因子 1 结合,抑制细胞凋亡的发生^[1,2]。Bcl-2 是一重要的抗凋亡蛋白,在细胞中通过与 Bax 等结合而抑制凋亡发生^[3]。近年研究发现 HSP70 与 Bcl-2 之间存在密切关系。HSP72 基因转染能提高神经元细胞 Bcl-2 的表达水平^[4]。HSP70 过表达能减少中风所致的脑细胞凋亡并增加细胞内 Bcl-2 的表

达^[5]。以上研究提示, HSP70 的抗凋亡作用可能与 Bcl-2 的作用有关。但是, HSP70 能否影响肌细胞内 Bcl-2 的表达, 并是否通过增加肌细胞内 Bcl-2 的表达而发挥抗凋亡作用, 目前国内外文献尚未见类似报道。因此, 本课题拟采用 C2C12 肌原细胞株, 运用 H₂O₂ 处理构建细胞凋亡模型, 探讨 HSP70 对 Bcl-2 表达的影响以及 Bcl-2 在 HSP70 抗细胞凋亡中的作用, 以揭示 HSP 抗细胞凋亡的分子机制, 为临床防治与凋亡相关的心血管疾病提供新的思路。

[收稿日期] 2010-06-10 [修回日期] 2010-07-15

[基金项目] 湖南省科技厅科技计划项目 (2007JT3022)

[作者简介] 张彬, 博士, 讲师, 主要研究方向为心血管内源性保护机制, E-mail 为 cool_zhangbin22@yahoo.com.cn。谭斯品, 博士, 副教授, 主要研究方向为心血管内源性保护机制。蒋碧梅, 博士, 讲师, 主要研究方向为心血管内源性保护机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

C2C12 肌原细胞株由本校细胞中心提供; 稳定

转染 pcDNA3.1、pcDNA3.1-HSP70 的 C2C12 肌原细胞株由本室蒋碧梅博士构建。HSP70 特异性的反义寡核苷酸序列 (As-HSP70 5'-XTG TTT TCT TGG CCA T-3')、对照的随机寡核苷酸序列 (Scr-HSP70 5'-GAT TAT CGT GTT ACT-3') 以及 Bcl-2 的特异反义寡核苷酸序列 (As-Bcl-2 5'-TCT CCC GGC TTG CGC CAT-3') 和对照的随机寡核苷酸序列 (Scr-Bcl-2 5'-TCC CTC ACC GTT GCG CTG-3') 由上海博亚生物工程技术公司合成。Bcl-2、HSP70 和 GAPDH 鼠源性多抗购自 Stressgen 公司; 十二烷基磺酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)、琼脂糖、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的兔抗鼠 IgG 或羊抗兔 IgG 购自 Sigma 公司, DAB 显色试剂盒购自武汉博士德公司; Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司; 改良 Eagle 培养基 (DMEM)、G418 购自 Gibco 公司; 丙烯酰胺、N, N 亚甲基双丙烯酰胺购自 Fluka 公司; 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT)、过硫酸胺、硝酸纤维素膜购自 Promega 公司。

1.2 细胞株传代培养

C2C12 肌原细胞用含 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养基培养。将细胞放置于 37℃、5% CO₂ 浓度的条件下培养, 待细胞生长至约 85% 汇合状态用于实验。

1.3 H₂O₂ 浓度测定

紫外分光光度计测 OD₂₄₀ 值后, 按公式 “H₂O₂ (mmol/L) = OD₂₄₀ × 1 000 / 3 914” 计算。

1.4 Western Blotting 分析

细胞先经冷 PBS 冲洗 3 遍, 用 2 × SDS 裂解缓冲液裂解细胞, 100℃ 水浴 10 min 后, 离心 (10 000 g × 10 min), 收集上清, 采用考马斯亮蓝法进行蛋白质定量, 制备好的蛋白样品置 -80℃ 冰箱保存备用。以 20 μg 蛋白/泳道上样, 经 12% SDS-PAGE 后, 电转膜至硝酸纤维素膜, 室温封闭 3 h 加一抗, 室温孵育 2 h 再加 HRP 标记的二抗, 室温下孵育 1 h 采用 DAB 显色试剂盒进行显色约 2~5 min 待蛋白条带显色清晰时, 终止反应, 拍摄照片, 记录实验结果。

1.5 脂质体介导寡核苷酸转染

根据 Invitrogen 公司提供的转染操作说明书以及本室以往所建立的方法进行转染。用 0.25 mL 无血清 DMEM 培养基溶解 20 μg 人工合成的反义及随机寡核苷酸, 并将它们分别与 0.25 mL 含 12 μL 脂质体的无血清 DMEM 培养基充分混匀, 室温放置 30 min。C2C12 肌原细胞用无血清 DMEM 培养基洗涤 3 遍后, 加入 1.5 mL 无血清 DMEM 培养基, 然后

加入上述寡核苷酸与脂质体的混合物, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。6 h 后加入 2 mL 含 20% 小牛血清的 DMEM 培养基, 于 36 h 后收集细胞, 进行后续实验。

1.6 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, 细胞处理完毕后, 刮下细胞并收集于 10 mL 离心管中, 1 000 r/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。

1.7 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用 *t* 检验, 多组间比较用单因素方差分析, 以 *P* < 0.05 判断差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HSP70 对 C2C12 肌原细胞 Bcl-2 表达的影响

2.1.1 HSP70 过表达对 Bcl-2 表达的影响 与正常及空载体转染细胞株比较, 在稳定转染 HSP70 的 C2C12 肌原细胞株 (包括 HSP70-1 和 HSP70-2) 中, 随着 HSP70 表达的增高 (HSP70-2 组 HSP70 表达较 HSP70-1 组更高, 因此后续实验均采用 HSP70-2 细胞株), Bcl-2 的表达也明显升高 (图 1 和表 1)。

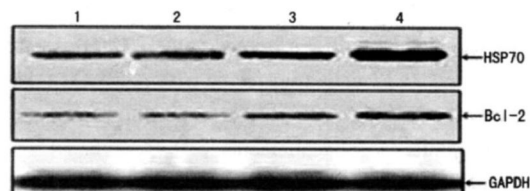


图 1 Western Blotting 检测 HSP70 过表达对 Bcl-2 表达的影响 1 为正常对照组, 2 为空载体 (pcDNA3.1) 转染组, 3 为 HSP70-1 转染组, 4 为 HSP70-2 转染组。

表 1 HSP70 过表达对 Bcl-2 表达的影响 (*n* = 3)

分 组	HSP70/GAPDH	Bcl-2/GAPDH
正常对照组	0.48 ± 0.03	0.37 ± 0.05
空载体转染组	0.45 ± 0.11	0.42 ± 0.07
HSP70-1 转染组	1.56 ± 0.33 ^a	0.73 ± 0.09 ^a
HSP70-2 转染组	2.15 ± 0.41 ^a	0.91 ± 0.12 ^a

^a为 *P* < 0.01, 与空载体转染组比较。

2.1.2 HSP70 反义寡核苷酸对 Bcl-2 表达的影响

C2C12 肌原细胞株瞬时转染 HSP70 特异性反义寡核苷酸 (As-HSP70)、随机寡核苷酸 (Scr-

HSP70)及单纯脂质体 36 h后, Western Blotting结果表明, 转染 Scr-HSP70、单纯脂质体对 HSP70及 Bcl-2的表达与正常对照组相比无明显差异, 而瞬时转染 As-HSP70可使 HSP70的表达下降 75% 以上, 进一步研究发现, As-HSP70也可使 Bcl-2的表达下降约 50% 左右(图 2和表 2)。

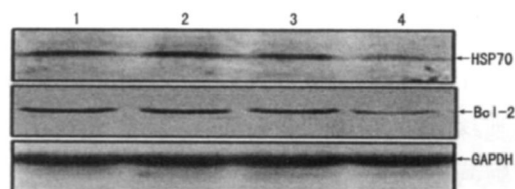


图 2 Western Blotting检测 HSP70反义寡核苷酸对 Bcl-2表达的影响 1为正常对照组, 2为单纯脂质体转染组, 3为 Scr-HSP70转染组, 4为 As-HSP70转染组。

表 2 HSP70反义寡核苷酸对 Bcl-2表达的影响 ($n = 3$)

分 组	HSP70/GAPDH	Bcl-2/GAPDH
正常对照组	0.58 ± 0.05	0.54 ± 0.04
单纯脂质体转染组	0.53 ± 0.11	0.49 ± 0.07
Scr-HSP70转染组	0.54 ± 0.13	0.51 ± 0.10
As-HSP70转染组	0.18 ± 0.03 ^a	0.26 ± 0.06 ^a

a为 $P < 0.01$, 与 Scr-HSP70转染组比较。

2.2 Bcl-2反义寡核苷酸对 HSP70抑制 H_2O_2 所致细胞凋亡的影响

2.2.1 Bcl-2反义寡核苷酸对 C2C12肌原细胞中 Bcl-2表达的影响 C2C12肌原细胞株瞬时转染 Bcl-2特异性反义寡核苷酸 (As-Bcl-2) 及随机寡核苷酸 (Scr-Bcl-2) 36 h后, Western Blotting结果表明, 与正常对照组比较, 转染 As-Bcl-2可使 Bcl-2蛋白表达下降 75% 以上, 而转染 Scr-Bcl-2没有改变 Bcl-2的表达含量(图 3和表 3)。

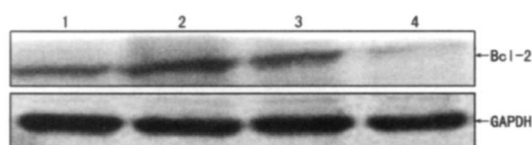


图 3 Western Blotting检测 Bcl-2反义寡核苷酸对 Bcl-2表达的影响 1为正常对照组, 2为单纯脂质体转染组, 3为 Scr-Bcl-2转染组, 4为 As-Bcl-2转染组。

2.2.2 Bcl-2反义寡核苷酸对 HSP70诱导 Bcl-2表达的影响 稳定转染 HSP70的 C2C12肌原细胞株, 分别瞬时转染 As-Bcl-2及 Scr-Bcl-2后, Western Blotting结果表明, 与单纯 HSP70转染组比较, As-Bcl-2转染明显减少 HSP70诱导的 Bcl-2表达, 而

Scr-Bcl-2转染对 HSP70诱导的 Bcl-2表达无明显影响(图 4和表 4)。

表 3 Bcl-2反义寡核苷酸对 Bcl-2表达的影响 ($n = 3$)

分 组	Bcl-2/GAPDH
正常对照组	0.42 ± 0.19
单纯脂质体转染组	0.47 ± 0.11
Scr-Bcl-2转染组	0.45 ± 0.13
As-Bcl-2转染组	0.16 ± 0.04 ^a

a为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较。

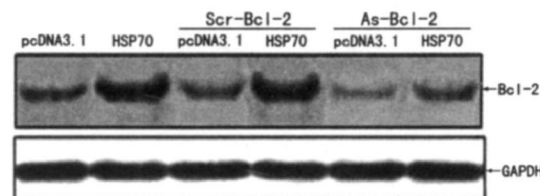


图 4 Western Blotting检测 Bcl-2反义寡核苷酸对 HSP70诱导的 Bcl-2表达的影响

表 4 Bcl-2反义寡核苷酸对 HSP70诱导的 Bcl-2表达的影响 ($n = 3$)

分 组	Bcl-2/GAPDH
pcDNA3.1(空载体)组	0.42 ± 0.04
pcDNA3.1-HSP70转染组	0.95 ± 0.16
pcDNA3.1+ Scr-Bcl-2转染组	0.47 ± 0.10
pcDNA3.1-HSP70+ Scr-Bcl-2转染组	0.92 ± 0.25 ^a
pcDNA3.1+ As-Bcl-2转染组	0.21 ± 0.03
pcDNA3.1-HSP70+ As-Bcl-2转染组	0.35 ± 0.05 ^b

a为 $P < 0.01$, 与 pcDNA3.1+ Scr-Bcl-2转染组比较; b为 $P < 0.01$, 与 pcDNA3.1-HSP70转染组比较。

2.2.3 Bcl-2反义寡核苷酸对 HSP70抑制 H_2O_2 所致细胞凋亡的影响 HSP70及 pcDNA3.1稳定转染的 C2C12肌原细胞株, 分别瞬时转染 Scr-Bcl-2或 As-Bcl-2后, 用 0.5 mmol/L H_2O_2 处理 24 h 细胞凋亡率明显高于相应的 H_2O_2 未处理组; 且转染 pcDNA3.1-HSP70+ Scr-Bcl-2后 H_2O_2 处理, 其细胞凋亡率显著低于 pcDNA3.1+ Scr-Bcl-2后 H_2O_2 处理组; 而转染 pcDNA3.1-HSP70+ As-Bcl-2后 H_2O_2 处理, 其细胞凋亡率与转染 pcDNA3.1+ As-Bcl-2后 H_2O_2 处理组比无明显差异, 但显著高于 pcDNA3.1-HSP70+ Scr-Bcl-2+ H_2O_2 组(图 5和表 5)。

3 讨论

HSP70是热休克蛋白家族的重要成员, 通过多种途径抑制凋亡的发生, 对许多细胞内应激起保护作用^[6,7]。Bcl-2是 Bcl-2家族的重要成员, 也是最

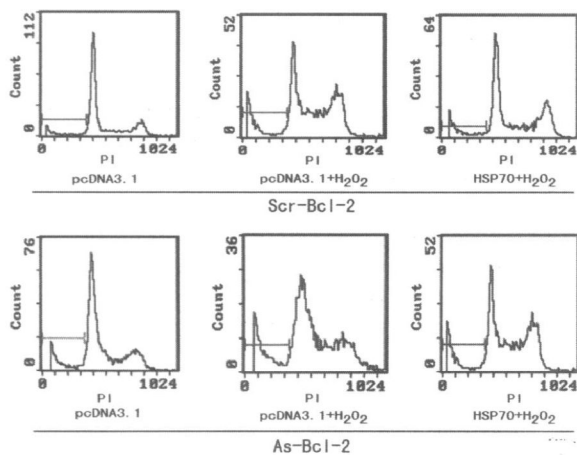


图 5 流式细胞术检测 Bcl-2 反义寡核苷酸对 HSP70 抑制 H_2O_2 所致细胞凋亡的影响

表 5 Bcl-2 反义寡核苷酸对 HSP70 抑制 H_2O_2 所致细胞凋亡的影响 ($n=4$)

分 组	细胞凋亡率
pcDNA3.1 + Scr-Bcl-2 组	5.10% \pm 3.30%
pcDNA3.1 + Scr-Bcl-2 + H_2O_2 组	46.07% \pm 5.53% ^a
pcDNA3.1 + HSP70 + Scr-Bcl-2 + H_2O_2 组	21.23% \pm 5.58% ^b
pcDNA3.1 + As-Bcl-2 组	12.53% \pm 3.31%
pcDNA3.1 + As-Bcl-2 + H_2O_2 组	52.10% \pm 4.77% ^c
pcDNA3.1 + HSP70 + As-Bcl-2 + H_2O_2 组	45.67% \pm 4.77% ^d

a 为 $P < 0.05$ 与 pcDNA3.1 + Scr-Bcl-2 组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 pcDNA3.1 + Scr-Bcl-2 + H_2O_2 组比较; c 为 $P < 0.05$ 与 pcDNA3.1 + As-Bcl-2 组比较; d 为 $P < 0.05$ 与 pcDNA3.1 + HSP70 + Scr-Bcl-2 + H_2O_2 组比较。

早发现的抗凋亡蛋白,在调控细胞凋亡的线粒体信号途径中发挥重要作用。最近研究发现 HSP70 在一些细胞如神经元中的细胞保护作用可能与 Bcl-2 有关^[4,5,8],因此本研究以 C2C12 肌原细胞为研究对象,来探讨 Bcl-2 对 HSP70 抗凋亡作用的影响。研究发现在 HSP70 过表达的 C2C12 肌原细胞中,随着 HSP70 表达的升高, Bcl-2 的表达也升高,抑制 HSP70 的表达后, Bcl-2 的表达也明显降低。这从正反两方面证明了 HSP70 能上调 Bcl-2 的表达。但 HSP70 怎样影响 Bcl-2 的表达呢? HSP70 作为一重要的分子伴侣,能与未折叠的(新生的)和错误折叠的(变性的)蛋白中的短肽段相互作用,通过屏蔽裸露的疏水基团来阻止它们相互聚集^[9]。研究发现在海马 CA1 神经元, HSP70 过表达能减少蛋白的聚集,神经元存活的数量增加^[10]。这些结果表明 HSP70 也许通过减少蛋白的降解来上调 Bcl-2 的表达。另外,本研究室发现 HSP70 过表达可有效促进

核仁素的表达上调,核仁素能与 Bcl-2 mRNA 相结合,通过稳定 Bcl-2 mRNA 而促进 Bcl-2 的表达^[11]。因此, HSP70 也许通过上调核仁素而间接促进 Bcl-2 的表达。

本研究结果表明 HSP70 可上调 Bcl-2 的表达,但 Bcl-2 在 HSP70 抑制 Caspase 活性及细胞凋亡中的作用如何呢?为此我们采用了 Bcl-2 反义寡核苷酸技术,在 Bcl-2 被特异性抑制的情况下,观察 HSP70 的抗凋亡作用。结果发现在 HSP70 过表达的细胞株, Bcl-2 表达也上调, HSP70 抗氧化应激所致细胞凋亡能力得以正常发挥,当 Bcl-2 的表达被特异性抑制后, HSP70 抗细胞凋亡的能力被明显削弱,即使 HSP70 过表达也是如此。上述结果表明 HSP70 的抗凋亡作用可能与其上调 Bcl-2 的表达有关, Bcl-2 作为 HSP70 的下游效应分子,可能通过稳定线粒体膜,抑制凋亡相关因子释放及 Caspase-3 活化而在 HSP70 抗凋亡过程中发挥重要作用。由于在心肌缺血等病理情况下,存在线粒体途径 Caspase 的大量异常活化,那么通过 HSP70 上调 Bcl-2 的表达来稳定线粒体膜治疗某些心脏疾患,也许具有潜在的价值。

[参考文献]

- [1] Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor [J]. *Nat Cell Biol* 2001; **3**: 839-843.
- [2] Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, et al. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by HSP70 [J]. *Nat Cell Biol* 2000; **2**: 476-483.
- [3] Chao DT, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family: regulators of cell death [J]. *Annu Rev Immunol* 1998; **16**: 395-419.
- [4] Kelly S, Zhang ZJ, Zhao H, et al. Gene transfer of HSP72 protects neurons in the hippocampus from global ischemia: influence of Bcl-2 [J]. *Ann Neurol* 2002; **52**: 162-167.
- [5] Yenari MA, Liu J, Zheng Z, et al. Antiapoptotic and anti-inflammatory mechanisms of heat-shock protein protection [J]. *Ann N Y Acad Sci* 2005; **1053**: 74-83.
- [6] 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机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003; **11** (4): 283-286.
- [7] 王慷慨, 邓恭华, 肖卫民, 等. 热休克蛋白 70 对过氧化氢所致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.
- [8] Setrom R, Wierenga PK, van Waarde MA, et al. Heat shock proteins and Bcl-2 expression and function in relation to the differential hyperthermic sensitivity between leukemic and normal hematopoietic cells [J]. *Cell Stress Chaperones* 2007; **12**: 320-330.
- [9] Gossau A, Ruoff P, Mohsenzadeh S, et al. Heat shock and oxidative stress-induced exposure of hydrophobic protein domains as common signal in the induction of HSP68 [J]. *J Biol Chem*, 2001; **276**: 1814-1821.
- [10] Ge PF, Luo TF, Zhang JZ, et al. Ischemic preconditioning induces chaperone HSP70 expression and inhibits protein aggregation in the CA1 neurons of rats [J]. *Neurosci Bull* 2008; **24**: 288-296.
- [11] Otake Y, Soundararajan S, Sengupta TK, et al. Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA [J]. *Blood*, 2007; **109**: 3069-3075.

(此文编辑 许雪梅)