

[文章编号] 1007-3949(2011)19-07-0565-05

• 实验研究 •

N-乙酰半胱氨酸保护心肌细胞对抗化学性低氧诱导的内质网应激反应

郑东诞¹, 兰爱平², 莫利求³, 杨战利², 杨春涛², 王秀玉², 郭润民², 陈培熹², 冯鉴强²

(中山大学 1. 附属第一医院黄埔院区心血管内科, 2. 中山医学院生理学教研室,

3. 附属第一医院黄埔院区麻醉科, 广东省广州市 510080)

[关键词] 心肌保护; 活性氧清除剂; 化学性低氧; 内质网应激; 氧化应激

[摘要] 目的 探讨活性氧清除剂 N-乙酰半胱氨酸能否保护 H9c2 心肌细胞对抗化学性低氧引起的内质网应激。方法 应用化学性低氧模拟物氯化钴处理 H9c2 心肌细胞, 建立化学性低氧损伤心肌细胞的实验模型。在氯化钴处理 H9c2 心肌细胞前 60 min 把 N-乙酰半胱氨酸加入培养基中, 作为预处理。应用 CCK-8 比色法检测细胞存活率; Hoechst33258 染色荧光显微镜照相检测凋亡心肌细胞的形态学改变; 双氯荧光素染色荧光显微镜照相检测细胞内活性氧水平; 免疫印迹法检测内质网应激蛋白葡萄糖调节蛋白 78 的表达。结果 在 100 ~ 2 000 $\mu\text{mol/L}$ 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 12 ~ 48 h 时间范围内, 800 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴处理 H9c2 心肌细胞呈时间依赖性地抑制细胞存活率。在氯化钴处理 H9c2 心肌细胞前 60 min, 应用 2 000 $\mu\text{mol/L}$ 的 N-乙酰半胱氨酸不仅能抑制氯化钴对活性氧生成的促进作用, 也能明显的抑制氯化钴诱导的细胞凋亡。不同浓度的氯化钴处理 H9c2 心肌细胞 24 h, 可使葡萄糖调节蛋白 78 表达增多, 其中 800 $\mu\text{mol/L}$ 的氯化钴处理 H9c2 心肌细胞 24 h 时, 葡萄糖调节蛋白 78 表达最多, 800 $\mu\text{mol/L}$ 的氯化钴处理 H9c2 心肌细胞不同时间, 9 h 时葡萄糖调节蛋白 78 表达最多。在氯化钴处理 H9c2 心肌细胞前 60 min, 应用 2 000 $\mu\text{mol/L}$ 的 N-乙酰半胱氨酸能明显的抑制氯化钴诱导的葡萄糖调节蛋白 78 的表达。结论 N-乙酰半胱氨酸能显著地对抗化学性低氧诱导的心肌细胞损伤, 此心肌细胞保护作用可能与其对抗化学性低氧引起的内质网应激有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

N-acetyl-L-cysteine Protects Cardiac Cells Against Endoplasmic Reticulum Stress Induced by Chemical Hypoxia

ZHENG Dong-Dan¹, LAN Ai-Ping², MO Li-Qiu³, YANG Zhan-Li², YANG Chun-Tao², WANG Xiu-Yu², GUO Run-Min², CHEN Pei-Xi², and FENG Jian-Qiang²

(1. Department of Cardiology, Region of Huang Pu, the First Affiliated Hospital, 2. Department of Physiology, Zhongshan Medical College, 3. Department of Anesthesia, Region of Huang Pu, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[KEY WORDS] Cardioprotection; N-acetyl-L-cysteine; Cobalt Chloride; Endoplasmic Reticulum Stress; Oxidative Stress

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protective effect of reactive oxygen species (ROS) scavenger, N-acetyl-L-cysteine (NAC), against endoplasmic reticulum stress (ERS) induced by chemical hypoxia in H9c2 cardiomyocytes.

Methods H9c2 cells were treated with cobalt chloride (CoCl_2), a chemical hypoxia-mimetic agent, to establish the chemical hypoxia-induced cardiomyocyte injury model. NAC was added into cell medium 60 min prior to CoCl_2 exposure. The cell viability was evaluated using cell counter kit (CCK-8). Morphological changes in apoptotic cardiomyocytes were detected by Hoechst 33258 staining and photofluorography, and the intracellular ROS level was measured by 2', 7'-dichloro

[收稿日期] 2011-05-20

[基金项目] 广东省科技计划项目(2010B080701035;2008B080703053)

[作者简介] 郑东诞, 医学硕士, 主治医师, 研究方向为心血管疾病的基础与临床, E-mail 为 yunsenzheng@live.cn。兰爱平, 博士研究生, 研究方向为神经保护与心肌保护, E-mail 为 lanaiping1981@163.com。通讯作者冯鉴强, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心脑血管保护, E-mail 为 fengjq-sums@163.com。

lorfluorescein-diacetate (DCFH-DA) staining and photofluorography. The expression of glucose regulated protein 78 (GRP78) was evaluated by Western blot assay. **Results** H9c2 cell viability was inhibited by cobalt chloride at the concentrations from 100 to 2 000 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h in a dose-dependent manner. At the time from 12 h to 48 h, H9c2 cell viability was inhibited by 800 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 in a time-dependent manner. Pretreatment with 2 000 $\mu\text{mol/L}$ NAC 60 min before exposure to CoCl_2 significantly inhibited not only CoCl_2 -induced overproduction of ROS, but also the apoptosis induced by CoCl_2 . GRP78 expression was upregulated after treatment with different concentrations of CoCl_2 for 24 h, peaking at 800 $\mu\text{mol/L}$. Furthermore, GRP78 expression was upregulated after treatment with 800 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 at different time (3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 24 h), peaking at 9 h. In addition, 2 000 $\mu\text{mol/L}$ NAC preconditioning obviously blocked the upregulation of GRP78 expression induced by 800 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 for 9 h. **Conclusion** NAC protects H9c2 cardiomyocytes against injury induced by chemical hypoxia, which may be associated with its inhibitory effect on ERS induced by chemical hypoxia.

氯化钴 (cobalt chloride, CoCl_2) 是一种化学性低氧模拟剂,能在多种细胞,例如 PC12 细胞、H9c2 心肌细胞等模拟低氧/缺血性损伤,包括增加活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成、诱发细胞毒性、细胞凋亡及线粒体损伤等^[1-3]。但是, CoCl_2 能否诱导心肌细胞产生内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 尚未明瞭。

内质网是真核细胞钙储存、脂类合成、蛋白折叠和修饰的重要细胞器,任何影响内质网功能的因素均可诱发内质网内非折叠蛋白反应,引起 ERS。有研究指出 ERS 与众多导致心力衰竭的心血管疾病如动脉粥样硬化、心肌缺血和扩张型心肌病等密切相关^[4,5]。葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78, GRP78) 是内质网上的一种应激蛋白,是 ERS 的标志^[6]。因此,我们推测,ERS 可能与 CoCl_2 诱导的氧化应激反应存在一定的相关性,并可能参与 CoCl_2 诱导的 H9c2 心肌细胞的损伤。为了探讨上述问题,本文应用 CoCl_2 损伤来源于大鼠胚胎期心脏的 H9c2 细胞以建立化学性低氧心肌损伤模型,重点探讨:(1) CoCl_2 能否影响 H9c2 心肌细胞内的 GRP78 表达?(2) ROS 清除剂 N-乙酰半胱氨酸能否抑制 CoCl_2 对 GRP78 的上调作用,为深入阐明化学性低氧引起的心肌细胞损伤机制提供新颖的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

N-乙酰半胱氨酸 (N-acetyl-L-cysteine, NAC)、 CoCl_2 、双氯荧光素 (2', 7'-dichlorfluorescein-diacetate, DCFH-DA)、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 Gibico 公司。GRP78 抗体购自 Bioworld 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°C、5% CO_2 条件下培养于含 15% 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,当细胞生长到培养孔的 80% 面积时,根据实验要求进行处理:800 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 培养 24 h, 2 000 $\mu\text{mol/L}$ NAC 提前 60 min 加入培养基做预处理,然后更换成 800 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 ,继续培养 24 h,每组设 4 个复孔。作用完后,每孔加入 10 μL CCK-8,轻摇,37°C 孵育 3 h,用酶标仪 (450 nm) 记录各孔的吸光度 (optical density, OD)。取 4 孔 OD 值的平均数,按公式计算细胞存活率,细胞存活率 (%) = (处理组 OD / 对照组 OD) \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,用磷酸盐缓冲液洗一遍,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 细胞内活性氧含量的检测

DCFH-DA 本身没有荧光,可以自由穿过细胞膜。进入细胞后,可被细胞内的酯酶水解成 DCFH,而 DCFH 不能自由通透细胞膜,从而将探针装载到细胞内。细胞内的 ROS 可将无荧光的 DCFH 氧化成发出绿色荧光的 DCF。绿色荧光的强弱可以间接反映细胞内 ROS 的水平。将赖氨酸包被的盖玻片至于 6 孔培养板内, H9c2 心肌细胞被均匀的接种在盖玻片上。当细胞生长到培养孔的约 80% 面积

时,根据实验需要给予相应的处理:800 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 3 h;2 000 $\mu\text{mol/L}$ NAC 处理 60 min,每组包括 3 个复孔。处理完后,用 PBS 漂洗 2 次,用 10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 染液于 37°C 孵育 30 min。在荧光显微镜下随机选取 5 个不重复区摄片,用 ImageJ 1.41 软件分析 5 个视野绿色荧光强度的平均值,再对每组的各样本进行统计分析。

1.6 Western blot 法检测葡萄糖调节蛋白 78 的表达

H9c2 心肌细胞接种于 35 mm 培养皿内,培养至 80% 满时,按本文的实验要求处理 H9c2 心肌细胞后,用预冷的 PBS 洗 2 次,加入细胞裂解液,4°C 静置 30 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清,采用 BCA 法进行蛋白定量。总蛋白经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离后,转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h,随后加入 GRP78 抗体(1:1 500)4°C 过夜,用 TBST 洗 3 次,每次 10 min。将 PVDF 膜用发光试剂 ECL 显色,暗室曝光到 X 光片上,凝胶成像系统扫描分析结果。

1.7 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 氯化钴抑制 H9c2 细胞的存活率

在 100 ~ 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内, CoCl_2 作用细胞 24 h 呈浓度依赖性地抑制 H9c2 细胞的存活率($r = 50\%$),其中 1 000 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 可使细胞存活率降低至对照组的 $22.1\% \pm 1.2\%$ ($P < 0.01$)。2 000 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 虽然使细胞存活率进一步降低,但是与 1 000 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 的细胞毒性作用比较,没有明显的差异($P > 0.05$)。下述实验应用 800 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作为有效损伤浓度观察其在不同处理时间对 H9c2 细胞的毒性作用(图 1A)。

在 12 ~ 48 h 的时间范围内,800 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 呈时间依赖性地抑制 H9c2 细胞的存活率,其中 CoCl_2 处理细胞 24 h 可使 H9c2 细胞的存活率降低至对照组的 $50.0\% \pm 2.1\%$ ($P < 0.01$; 图 1B)。

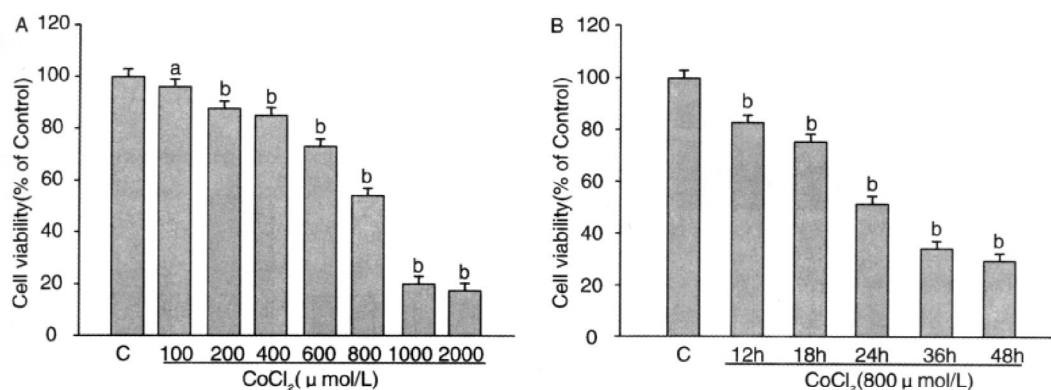


图 1. CoCl_2 对 H9c2 心肌细胞存活率的影响 A 为不同浓度的 CoCl_2 对 H9c2 心肌细胞存活率的影响, B 为 800 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用不同时间对 H9c2 心肌细胞存活率的影响。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

Figure 1. Effect of CoCl_2 on cell viability of H9c2 cells

2.2 氯化钴促进 H9c2 细胞内葡萄糖调节蛋白 78 的表达

在 200 ~ 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内, CoCl_2 作用细胞 24 h 呈浓度依赖性地促进 GRP78 表达,其中 800 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 对 GRP78 表达的上调作用最大,与对照组比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。1 000 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 虽然仍然能明显地促进 GRP78 表达($P < 0.05$),但是其促进作用已明显减弱(图 2A、B)。另一方面,在 3 ~ 24 h 的时间范围

内,800 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 H9c2 细胞能明显地促进 GRP78 表达,其中 9 h 时表达最多(图 2C、D)。

2.3 活性氧清除剂 N-乙酰半胱氨酸拮抗氯化钴对葡萄糖调节蛋白 78 表达的上调作用

为了探讨氧化应激与 ERS 的相关性,本文在 CoCl_2 处理 H9c2 细胞前,应用 ROS 清除剂 2 000 $\mu\text{mol/L}$ NAC 预处理细胞 60 min,以观察 NAC 对 CoCl_2 上调 GRP78 表达的影响。800 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用 H9c2 细胞 9 h 可使 GRP78 表达明显增多,是

对照组的 3.8 倍 ($P < 0.01$)。NAC 预处理可显著地拮抗 CoCl_2 对 GRP78 表达的上调作用,与 800 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理组比较,差异有统计学意义 ($P <$

0.01)。2 000 $\mu\text{mol/L}$ NAC 本身对 H9c2 细胞 GRP78 的基础表达无明显影响。结果提示 ROS 可促进 GRP78 表达 (图 3)。

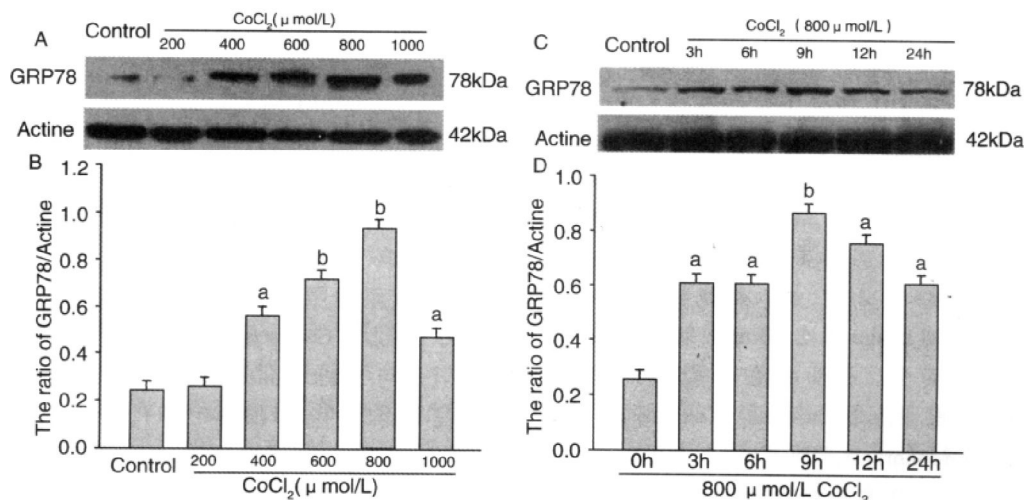


图 2. CoCl_2 对 H9c2 心肌细胞内 GRP78 表达的影响 A 和 B 为不同浓度的 CoCl_2 作用 H9c2 心肌细胞 24 h 对 GRP78 表达的影响, C 和 D 为 800 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理不同时间对 GRP78 表达的影响。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

Figure 2. Effect of CoCl_2 on expression of GRP78 in H9c2 cells

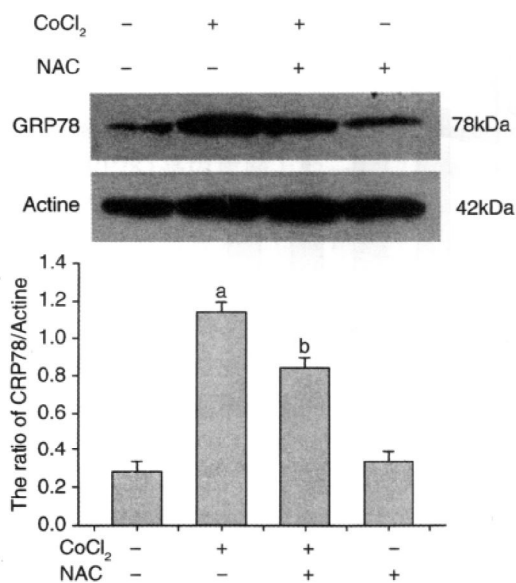


图 3. NAC 预处理抑制 CoCl_2 诱导的 GRP78 过表达 a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 CoCl_2 组比较。

Figure 3. NAC preconditioning inhibited CoCl_2 -induced overexpression of GRP78 in H9c2 cells

2.4 N-乙酰半胱氨酸抑制氯化钴对活性氧生成的促进作用

800 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用 H9c2 细胞 3 h 能使细胞内 ROS 水平升高 1.8 倍。在 CoCl_2 作用 H9c2 细胞前 60 min, 应用 2 000 $\mu\text{mol/L}$ NAC 预处理细胞能

显著减少 CoCl_2 诱导的胞内 ROS 的生成, 使 ROS 水平从 37.1 ± 4.4 降至 25.2 ± 3.1 (图 4)。

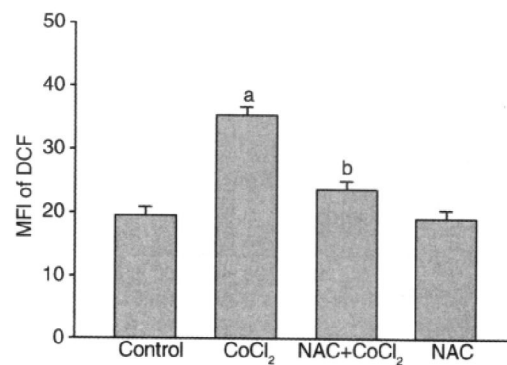


图 4. NAC 抑制 CoCl_2 对 ROS 生成的促进作用 a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 CoCl_2 组比较。

Figure 4. NAC preconditioning inhibited CoCl_2 -induced intracellular ROS generation in H9c2 cells

2.5 N-乙酰半胱氨酸抑制氯化钴诱导的 H9c2 细胞凋亡

800 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用 H9c2 细胞 24 h 可使凋亡细胞数目增多, 应用 2 000 $\mu\text{mol/L}$ NAC 预处理细胞 60 min 能对抗 CoCl_2 的致凋亡作用, 使凋亡细胞数目明显减少。2 000 $\mu\text{mol/L}$ NAC 本身不引起 H9c2 细胞凋亡 (图 5)。

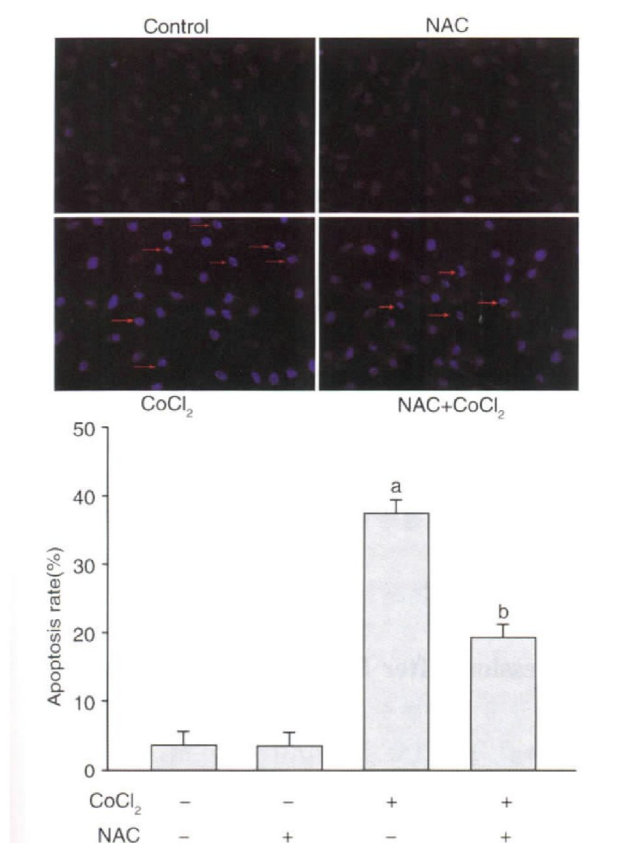


图 5. NAC 预处理保护 H9c2 心肌细胞对抗 CoCl₂ 诱导的细胞凋亡 a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 CoCl₂ 组比较。

Figure 5. NAC preconditioning protected H9c2 cells against CoCl₂-induced apoptosis

3 讨论

本文再次证实化学性低氧模拟剂 CoCl₂ 对 H9c2 心肌细胞具有明显的损伤作用, 表现为细胞存活率降低, 凋亡细胞数目增多及 ROS 生成明显增多, 这与以前的报道^[3,7] 相一致。本文还进一步证实, ROS 清除剂 NAC 能保护 H9c2 心肌细胞对抗 CoCl₂ 的细胞毒性作用及致凋亡作用, 使细胞存活率升高及凋亡细胞数目减少, 提示 ROS 介导 CoCl₂ 诱导的心肌细胞损伤作用。

值得注意的是, 本文观察到 CoCl₂ 在引起氧化应激反应 (ROS 升高)、细胞毒性及细胞凋亡的同时, 能浓度依赖性及时间依赖性地促进 H9c2 心肌细胞内 GRP78 表达。GRP78 是内质网上的一种应激蛋白, 是 ERS 的标志之一^[6], 也可作为一种分子伴侣参与蛋白质的折叠和转运, 在低糖、低氧、低钙等应激状态下大量表达以维持内质网功能的稳定。但是当 ERS 持续存在时则会损伤细胞。本实验室最近证实, β_1 -肾上腺素受体激动剂异丙肾上腺素

(isoprenaline, ISO) 可促进 H9c2 心肌细胞 GRP78 表达持续增多, 并引起心肌细胞损伤^[8]。Shimazaki 等人在大鼠自身免疫性心肌炎模型观察到, ERS 介导心肌细胞凋亡^[9]。本文证实 CoCl₂ 可引起 H9c2 心肌细胞 GRP78 表达持续增多, 提示 GRP78 可能介导 CoCl₂ 对心肌细胞的损伤作用, 这与前文的报道^[8,9] 相似。

另一方面, 本文进一步证实了氧化应激与 ERS 的关系。内质网腔是一个独特的应激环境, 对蛋白质的折叠及二硫化物 (disulfide) 键的形成非常重要^[10]。当细胞内氧化还原改变、葡萄糖剥夺 (glucose deprivation)、钙调节异常及病毒感染时可引起非折叠蛋白在内质网内堆积^[10], 最终导致与 ERS 相关的通路激活 (例如 GRP78)。本文观察到 ROS 清除剂 NAC 能明显地抑制 CoCl₂ 对 GRP78 表达的上调作用, 提示 CoCl₂ 可通过增加 ROS 生成, 从而促进 GRP78 持续表达, 最终引起 ERS 及心肌细胞损伤。但是 ROS 通过什么机制来促进 ERS 尚需进一步研究。

综上所述, 本文证实, 化学性低氧模拟剂 CoCl₂ 可诱发 H9c2 心肌细胞产生氧化应激及 ERS, ROS 清除剂 NAC 不仅保护心肌细胞对抗化学性低氧引起的损伤, 并能拮抗 CoCl₂ 对 GRP78 表达的上调作用, 这可能是 NAC 对抗 CoCl₂ 引起的心肌损伤机制之一。

【参考文献】

- [1] Zou W, Yan M, Xu W, et al. Cobalt chloride induces PC12 cells apoptosis through reactive oxygen species and accompanied by AP-1 activation [J]. J Neurosci Res, 2001, 64 (6): 646-653.
- [2] Chen SL, Yang CT, Yang ZL, et al. Hydrogen sulphide protects H9C2 cells against chemical hypoxia-induced injury [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010, 37 (3): 316-321.
- [3] 李建平, 心可舒. 卡托普利对高血压病伴心肌缺血型左室肥厚的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17 (4): 265-268.
- [4] 周昌清, 倪黎, 关红箐, 等. β_1 -AR 持久兴奋通过 CaMKII δ -内质网应激凋亡通路导致心力衰竭的通路 [J]. 中国分子心脏病学杂志, 2008, 8 (6): 319-327.
- [5] 滕旭, 齐永芬, 唐朝枢, 等. 内质网应激与心脏疾病 [J]. 生理科学进展, 2009, 40 (02): 106-110.
- [6] Lee AS. Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family [J]. Curr Opin Cell Biol, 1992, 4 (2): 267-273.
- [7] 吴强, 陈吉. 氧化应激与心肌细胞凋亡 [J]. 中国心血管病研究杂志, 2004, 2 (7): 570-573.
- [8] 黄涌, 阮经文, 杨春涛, 等. 依达拉奉保护 H9c2 心肌细胞对抗异丙肾上腺素诱导的氧化应激及内质网应激反应 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27 (3): 415-418.
- [9] Shimazaki H, Watanabe K, Veeraveedu PT, et al. The antioxidant edaravone attenuates ER-stress-mediated cardiac apoptosis and dysfunction in rats with autoimmune myocarditis [J]. Free Radic Res, 2010, 44 (9): 1082-090.
- [10] Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC, et al. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions [J]. J Clin Invest, 2005, 115 (10): 2656-664.

(此文编辑 曾学清)