

血清-葡萄糖剥夺抑制热休克蛋白 90 致心肌细胞损伤

张莉莉¹, 董 硕², 张 梅³, 郭 施², 郭润民⁴, 王秀玉⁴, 冯鉴强⁴, 杨春涛²

(1. 广东省医学科学院 广东省人民医院 广东省老年医学研究所肾内科, 广东省广州市 510080;

2. 广州医学院生理学教研室, 广东省广州市 510182; 3. 广州医学院药理学教研室,

广东省广州市 510182; 4. 中山大学中山医学院生理学教研室, 广东省广州市 510080)

[关键词] 热休克蛋白 90; 血清-葡萄糖剥夺; H9c2 心肌细胞; 内质网应激; 钙超载

[摘 要] 目的 探讨热休克蛋白 90(HSP90)表达下调是否参与血清-葡萄糖剥夺(SGD)引起的心肌细胞损伤。

方法 用血清-葡萄糖剥夺处理 H9c2 心肌细胞,建立缺血性心肌细胞损伤的体外模型;在血清-葡萄糖剥夺处理前,应用 HSP90 选择性抑制剂 17-AAG 预处理心肌细胞 60 min;CCK-8 比色法检测细胞存活率;Fluo-3AM 染色结合荧光显微镜照相术检测细胞内游离钙水平;Western blot 检测 HSP90 和葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)的表达。结果 血清-葡萄糖剥夺处理 24 h 可明显抑制 H9c2 心肌细胞内 HSP90 的表达,诱导细胞内钙超载及上调内质网应激蛋白 GRP78 的表达。选择性 HSP90 抑制剂 17-AAG 预处理不仅可以加重血清-葡萄糖剥夺引起的心肌细胞存活率降低,而且进一步加重血清-葡萄糖剥夺引起的 H9c2 心肌细胞内钙超载及内质网应激蛋白 GRP78 的表达上调。结论 抑制 HSP90 可能是血清-葡萄糖剥夺损伤心肌细胞的重要机制之一。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

Serum-Glucose Deprivation Damaged H9c2 Cardiomyocytes by Inhibiting Heat Shock Protein 90

ZHANG Li-Li¹, DONG Qi², ZHANG Mei³, GUO Shi², GUO Run-Min⁴, WANG Xiu-Yu⁴, FENG Jian-Qiang⁴, and YANG Chun-Tao²

(1. Guangdong Academy of Medical Sciences & Guangdong General Hospital & Department of Nephrology, Gerontology Institute, Guangzhou, Guangdong 510080, China; 2. Department of Physiology, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510182, China; 3. Department of Pharmacology, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510182, China; 4. Department of Physiology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[KEY WORDS] Heat Shock Protein 90; Serum-Glucose Deprivation; H9c2 Cardiomyocytes; Endoplasmic Reticulum Stress; Calcium Overload

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether the downregulation of heat shock protein 90 (HSP90) was involved in cardiac cell injury induced by serum-glucose deprivation (SGD). **Methods** H9c2 cardiomyocytes (H9c2 cells) were treated with SGD to establish an in vitro model of ischemic cardiac cell injury. H9c2 cells were pretreated with 17-AAG (a selective inhibitor of HSP90) for 60 min before exposure of cells to SGD. Cell viability was detected by CCK-8. The intracellular level of free calcium was measured by Fluo-3AM staining and photofluorography. The expressions of HSP90 and glucose-regulated protein 78 (GRP78) were tested by Western blot assay. **Results** Treatment of H9c2 cells with SGD for 24 h significantly induced downregulation of HSP90 expression, overload of intracellular calcium, and upregulation of GRP78 expression, which is a marker of endoplasmic reticulum stress. Pretreatment with 17-AAG, a selective HSP90 inhibitor, not only aggravated SGD-induced decrease in the viability of H9c2 cells, but also enhanced SGD-induced overload of intracellular calcium and upregulation of GRP78 expression in H9c2 cells. **Conclusion** Inhibition of HSP90 may be one of the key mechanisms, by which H9c2 cells were damaged by SGD.

[收稿日期] 2011-12-27

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81200606);广东省科技计划项目(2012B031800313;2012B031800358);广州医学院科学研究基金项目(2011C23)

[作者简介] 张莉莉,主治医师,研究方向为组织细胞的缺血性损伤与保护。董硕,博士,副教授,研究方向为心肌肥大的发病机制。通讯作者杨春涛,博士,讲师,研究方向为心血管的损伤与保护机制,E-mail 为 yang-chuntao@163.com。

热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP90) 是一种具有 ATPase 活性的分子伴侣, 在胞质内含量极其丰富^[1]。在非应激状态下, 其表达量约占胞内总蛋白量的 1% ~ 2%。HSP90 具有多种生理功能, 如信号转导、蛋白降解及蛋白折叠等^[2,3]。最近, 本组研究证实, 上调 HSP90 能保护心肌细胞对抗化学性缺氧引起的损伤^[4]。Taiyab 等^[5]报道, 选择性 HSP90 抑制剂 17-丙烯胺基-17-去甲氧基格尔德霉素 (17-allylamino-17-demethoxygeldana, 17-AAG) 抑制 HSP90 的作用后, 可引起内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS), 从而引起胞内钙超载, 线粒体功能受损以及细胞色素 C 释放等, 最后导致凋亡性细胞死亡。但是, 抑制 HSP90 对缺血性心肌细胞损伤有何影响? 迄今尚未明瞭。

缺血性心肌细胞损伤是临床上多种心脏疾病常见的病理生理过程, 深入探讨其损伤机制, 有助于防治各种类型的缺血性心肌疾病。目前, 不少学者在体外研究中通过血清-葡萄糖剥夺 (serum-glucose deprivation, SGD) 的方法损伤心肌细胞来模拟缺血性心肌损伤^[6]。例如, Troncso 等^[7]在心肌细胞上发现, SGD 处理可诱导自噬性心肌损伤。H9c2 心肌细胞来源于大鼠胚胎期的心脏组织, 具有心肌细胞的许多重要特性和功能, 是研究心肌细胞损伤与保护机制的常用体外模型。

为了探讨抑制 HSP90 在缺血性心肌细胞损伤中的作用, 本研究应用 SGD 处理 H9c2 心肌细胞模拟缺血性心肌细胞损伤。重点探讨 SGD 对心肌细胞内 HSP90 表达的影响; SGD 对心肌细胞的损伤作用, 包括 ERS、胞内游离钙离子的水平及细胞毒性; HSP90 抑制剂对 SGD 引起的心肌细胞损伤有何影响?

1 材料和方法

1.1 材料

17-AAG 和 Fluo-3AM 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 细胞计数试剂盒 (cell counter kit, CCK)-8 购自日本 Dojindo Lab; DMEM-F12 培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司; 兔抗大鼠 HSP90 和 GRP78 抗体购自美国 Bio-World 公司; 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养和处理

H9c2 心肌细胞由中山大学实验动物中心提供, 该细胞来源于大鼠胚胎期心脏组织, 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养于含有 15% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基中。SGD 处理: 将 H9c2 心肌细胞培养于不含葡萄糖的培养基中, 且不加血清。17-AAG 预处

理: 在用 SGD 处理 H9c2 心肌细胞前, 先用 17-AAG 与细胞共培养 60 min, 以抑制 HSP90 的作用。

1.3 细胞存活率检测

将 H9c2 心肌细胞接种于 96 孔培养板中, 培养至 80% 汇合时, 给予 SGD 处理和/或 17-AAG 预处理, 每组设 4 个复孔。作用完成后, 每孔加 100 μL (1:10 稀释) 的 CCK-8 溶液, 轻摇, 37℃ 孵育 3 h, 用酶标仪 (λ = 450 nm) 记录各孔的吸光度 OD 值。取 4 个复孔 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 值/对照组 OD 值 × 100%, 重复 3 次。

1.4 胞内游离钙检测

将 H9c2 心肌细胞接种于 24 孔培养板中, 培养至 80% 汇合时, 给予 SGD 处理和/或 17-AAG 预处理。作用完成后, 小心弃去培养基, 用 D-hank's 液漂洗 2 遍, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 再次漂洗后, 加入 10 μmol/L Fluo-3AM, 室温避光轻摇 30 min。在荧光显微镜 (TE-2000, Nikon, Japan) 下随机选取 3 个视野摄片, 绿色荧光即为胞内的游离钙离子。用 Image J 1.410 软件对绿色荧光强度进行半定量分析。

1.5 Western blot 检测蛋白表达

H9c2 心肌细胞接种于 35 mm 培养皿内, 培养至 80% 汇合时, 给予不同的条件培养基。处理结束后, 用预冷的 PBS 洗 2 次, 加入细胞裂解液, 4℃ 静置 30 min。10000 r/min 离心 15 min, 取上清, 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 2 h。随后加入兔抗大鼠的 HSP90 抗体 (1:2000) 或 GRP78 抗体, 4℃ 轻摇、过夜。经 TBS-T 漂洗 3 次后, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗, 室温孵育 1 h, TBS-T 漂洗 3 次。ECL 显色后, 用 Image J 1.41o 软件进行分析, 重复 3 次。

1.6 统计学方法

实验数据用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 One-way ANOVA 及 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SGD 抑制 H9c2 心肌细胞内 HSP90 的表达

正常 H9c2 心肌细胞内存在一定水平的 HSP90 表达。但是, 经 SGD 作用 6 ~ 24 h 后, HSP90 的表达水平明显降低, 与正常对照组比较, HSP90 的表达变化具有统计学意义 (表 1 和图 1)。

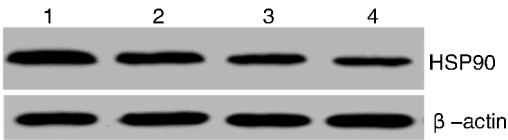


图 1. SGD 对 H9c2 心肌细胞内 HSP90 表达的影响 1 为正常对照组,2 为 SGD 处理 6 h 组,3 为 SGD 处理 12 h 组,4 为 SGD 处理 24 h 组。

Figure 1. Effect of SGD on the expression of HSP90 in H9c2 cardiomyocytes

表 1. SGD 对 H9c2 心肌细胞内 HSP90 表达的影响

Table 1. Effect of SGD on the expression of HSP90 in H9c2 cardiomyocytes

分 组	HSP90/β-actin
正常对照组	1. 2 ± 0. 1
SGD 处理 6 h 组	0. 8 ± 0. 1 ^a
SGD 处理 12 h 组	0. 5 ± 0. 2 ^b
SGD 处理 24 h 组	0. 3 ± 0. 1 ^b

a 为 $P < 0. 05$,b 为 $P < 0. 01$,与正常对照组比较。

2. 2 抑制 HSP90 加重 SGD 对 H9c2 心肌细胞的毒性损伤作用

SGD 处理 6 ~ 36 h 对 H9c2 心肌细胞具有明显的毒性损伤作用,使细胞存活率呈时间依赖性降低。在 SGD 处理前,应用 2 μmol/L 17-AAG 预处理 60 min 可显著加重 SGD 对细胞的毒性作用,使细胞存活率进一步降低,与单独 SGD 处理 24 h 组比较差异具有统计学意义 ($P < 0. 05$),而 17-AAG 本身对 H9c2 细胞没有毒性损伤作用(表 2)。

表 2. 不同处理因素对 H9c2 心肌细胞存活率的影响

Table 2. Effects of the indicated treatments on cell viability of H9c2 cardiomyocytes

分 组	细胞存活率
正常对照组	100%
SGD 处理 6 h 组	87. 3% ± 3. 8% ^a
SGD 处理 12 h 组	75. 5% ± 5. 3% ^b
SGD 处理 24 h 组	57. 6% ± 3. 2% ^b
SGD 处理 36 h 组	38. 6% ± 5. 3% ^b
17-AAG + SGD 处理 24 h 组	35. 2% ± 7. 8% ^c
17-AAG 组	98. 6% ± 7. 3%

a 为 $P < 0. 05$,b 为 $P < 0. 01$,与正常对照组比较;c 为 $P < 0. 05$,与 SGD 处理 24 h 组比较。

2. 3 HSP90 抑制剂加重 SGD 引起的心肌细胞内钙超载

正常 H9c2 心肌细胞内存在一定水平的游离钙

离子。当 SGD 处理 24 h 后,胞内游离钙离子 水平明显升高,约为正常对照组的 1. 8 倍。在 SGD 作用前,应用 2 μmol/L 17-AAG 预处理 H9c2 心肌细胞 60 min 可使胞内游离钙离子的水平进一步升高,与单纯 SGD 组比较差异具有统计学意义 ($P < 0. 05$)。17-AAG 本身对胞内钙离子水平无明显的影响(图 2 和表 3)。

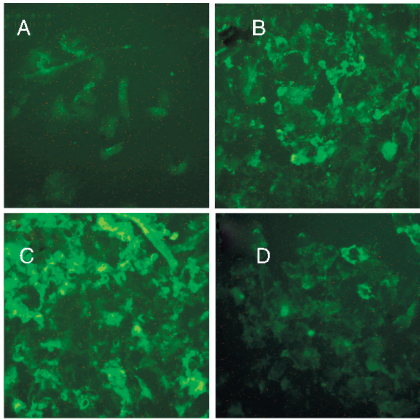


图 2. 不同处理因素对 H9c2 心肌细胞内游离钙离子水平的影响(× 200) A 为正常对照组,B 为 SGD 处理 24 h 组,C 为 17-AAG + SGD 处理 24 h 组,D 为 17-AAG 组。

Figure 2. Effects of the indicated treatments on intracellular free Ca^{2+} in H9c2 cardiomyocytes

表 3. 不同处理因素对 H9c2 心肌细胞内游离钙离子水平的影响

Table 3. Effects of the indicated treatments on intracellular free Ca^{2+} in H9c2 cardiomyocytes

分 组	相对 Fluo-3AM 荧光强度
正常对照组	26. 3 ± 7. 2
SGD 处理 24 h 组	47. 6 ± 5. 8 ^a
17-AAG + SGD 处理 24 h 组	63. 5 ± 8. 3 ^b
17-AAG 组	25. 9 ± 6. 1

a 为 $P < 0. 05$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0. 05$,与 SGD 处理 24 h 组比较。

2. 4 抑制 HSP90 促进 SGD 对 GRP78 表达的上调作用

正常 H9c2 心肌细胞内存在一定水平的 GRP78 蛋白表达。当 SGD 处理 24 h 后,可使胞内 GRP78 的表达水平明显升高,约为正常对照组的 1. 6 倍。在 SGD 处理前,应用 2 μmol/L 17-AAG 预处理 H9c2 心肌细胞 60 min 可使 GRP78 的表达进一步增加,与单纯应用 SGD 组比较差异具有统计学意义 ($P < 0. 05$)。17-AAG 本身不影响 H9c2 心肌细胞内 GRP78 的基础表达(图 3 和表 4)。

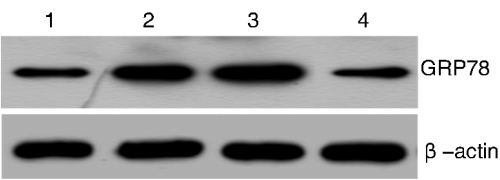


图 3. 不同处理因素对 H9c2 心肌细胞内 GRP78 表达的影响
1 为正常对照组,2 为 SGD 处理 24 h 组,3 为 17-AAG + SGD 处理 24 h 组,4 为 17-AAG 组。

Figure 3. Effects of the indicated treatments on the expression of GRP78 in H9c2 cardiomyocytes

表 4. 不同处理因素对 H9c2 心肌细胞内 GRP78 表达的影响
Table 4. Effects of the indicated treatments on the expression of GRP78 in H9c2 cardiomyocytes

分 组	GRP78/β-actin
正常对照组	0.5 ± 0.1
SGD 处理 24 h 组	0.8 ± 0.1 ^a
17-AAG + SGD 处理 24 h 组	1.2 ± 0.2 ^b
17-AAG 组	0.4 ± 0.1

a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 SGD 处理 24 h 组比较。

3 讨 论

在本研究中,SGD 可通过 4 个方面损伤 H9c2 心肌细胞。首先,SGD 明显地抑制 HSP90 表达;其次,SGD 能显著降低细胞的存活率;再次,SGD 能上调 GRP78 的表达,而 GRP78 是内质网上的一种应激蛋白,是 ERS 的重要标志^[8]。GRP78 既可作为一种分子伴侣参与蛋白质的折叠和转运,也参与 ERS。在低糖低氧等应激状态下,GRP78 的大量表达可维持内质网的稳定,但是当 ERS 持续存在时则导致细胞损伤。最后,SGD 能引起心肌细胞内游离钙的水平明显升高。有报道指出,ERS 性损伤与胞内游离钙离子水平升高有关,其机制可能是由于胞内游离钙离子增多并转移到线粒体继而降低线粒体膜电位^[5, 9]。

重要的是,本研究证实,HSP90 抑制剂 17-AAG 能加重上述 SGD 的心肌细胞损伤作用。17-AAG 能在 HSP90 上与 ATP 竞争结合位点并抑制 HSP90 的 ATPase 活性^[10]。由于 17-AAG 能促进 SGD 对心肌细胞 GRP78 表达的上调作用,提示 HSP90 的功能性抑制加重了 ERS 性损伤。Taiyab 等^[5]报道,17-AAG 能使大鼠组织细胞瘤细胞株(BC-8)产生 ERS,这为本研究提供了有力的支持。另一方面,本研究发现,17-AAG 能加重 SGD 引起的胞内钙超载,提示 HSP90 可能参与调节胞内钙稳态。由于 SGD 处理本身已明显抑制了 H9c2 心肌细胞内 HSP90 的表

达,使胞内游离钙离子水平升高,在此基础上,17-AAG 对 HSP90 的功能性抑制可进一步增加胞内游离钙离子水平,这与 Taiyab 等^[5]的结果类似。由于 HSP90 已被认为与多种细胞存活过程信号通路密切相关(如细胞外信号调节激酶 1/2^[11]),因此,在以后的实验中将进一步探讨抑制 HSP90 后对这些相关的细胞存活通路的影响。

综上所述,本研究在 H9c2 心肌细胞证实,SGD 能抑制 HSP90 表达,增加内质网应激蛋白 GRP78 表达及胞内游离钙离子水平,并降低细胞存活率。HSP90 抑制剂能加重上述 SGD 对心肌细胞的损伤作用,提示 HSP90 可能是心肌细胞对抗缺血性损伤的内在防御机制之一。

[参考文献]

[1] Krukenberg KA, Street TO, Lavery LA, et al. Conformational dynamics of the molecular chaperone HSP90 [J]. Q Rev Biophys, 2011, 44 (2): 229-255.

[2] Zhao R, Houry WA. HSP90: a chaperone for protein folding and gene regulation [J]. Biochem Cell Biol, 2005, 83 (6): 703-710.

[3] Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, et al. A high-affinity conformation of HSP90 confers tumour selectivity on HSP90 inhibitors [J]. Nature, 2003, 425 (6956): 407-410.

[4] 李建平, 杨战利, 杨春涛, 等. 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[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17 (4): 265-268.

[5] Taiyab A, Sreedhar AS, Rao Ch M. HSP90 inhibitors, GA and 17AAG, lead to ER stress-induced apoptosis in rat histiocytoma [J]. Biochem Pharmacol, 2009, 78 (2): 142-152.

[6] Mousavi SH, Tayarani-Najaran Z, Asghari M, et al. Protective effect of Nigella sativa extract and thymoquinone on serum/glucose deprivation-induced PC12 cells death [J]. Cell Mol Neurobiol, 2010, 30 (4): 591-598.

[7] Troncoso R, Vicencio JM, Parra V, et al. Energy-preserving effects of IGF-1 antagonize starvation-induced cardiac autophagy[J]. Cardiovasc Res, 2012, 93 (2): 320-329.

[8] Yin XL, Shen H, Zhang W, et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress by anisodamine protects against myocardial injury after cardiac arrest and resuscitation in rats[J]. Am J Chin Med, 2011, 39 (5): 853-866.

[9] Tan Y, Dourdin N, Wu C, et al. Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. J Biol Chem, 2006, 281 (23): 16 016-024.

[10] Stebbins CE, Russo AA, Schneider C, et al. Crystal structure of an HSP90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent[J]. Cell, 1997, 89 (2): 239-250.

[11] 刘代华, 朱炳阳, 黄红林, 等. 热休克蛋白 90 对氧化应激激活的大鼠血管平滑肌细胞细胞外信号调节激酶的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (11): 925-929.