文章编号:1000-5404(2005)03-0185-04

论著

Caspase-3、-9表达上调参与缺氧诱导心肌细胞凋亡

周 舟,王小华,朱光旭,余争平 (第三军医大学预防医学院劳动卫生学教研室,重庆 400038)

提 要: 目的 研究缺氧对心肌细胞天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶(caspase)的激活效应。**方法** 培养的心肌细胞分别缺氧0、3、6、12、24 h后,Hoechst 33342染色法检测细胞凋亡,MTT法检测细胞存活率,Western blot、RT-PCR方法分别检测细胞线粒体与胞浆中细胞色素c(Cyt c)蛋白的变化以及caspase-9,-3 mRNA表达的改变。**结果** 缺氧24 h心肌细胞出现典型的凋亡,细胞存活率显著降低;缺氧3 h线粒体Cyt c未见显著变化,而胞浆中Cyt c开始增多,缺氧24 h线粒体中已不能检测到Cyt c,胞浆中维持在峰值水平。缺氧可上调心肌细胞caspase-9,-3基因表达,两者表达变化趋势一致,缺氧3 h即开始明显增高,在观察的24 h内持续处于高表达状态。**结论** 缺氧可致心肌细胞线粒体Cyt c大量释放至胞浆中,caspase-9基因表达增高,并进一步导致caspase-3激活,从而证明缺氧可诱导心肌细胞中线粒体依赖的caspases途径激活,从而导致细胞凋亡。

关键词: 缺氧;凋亡;caspase;细胞色素c;心肌细胞
中图法分类号: R322.11; R329.25; R345 **文献标识码**: A

Up-regulation of caspase-3, -9 expressions participates in hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis

ZHOU Zhou, WANG Xiao-hua, ZHU Guang-xu, YU Zheng-ping (Department of Occupational Health, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of hypoxia on the activation of caspases in cardiomyocytes. **Methods** At 0, 3, 6, 12, and 24 h after hypoxia, cell apoptosis and viability were determined with Hoechst 33342 staining and MTT method, respectively. Expressions of caspase-3, -9 mRNA and release of mitochondrial cytochrome c in primary culture of cardiomyocytes were determined by RT-PCR and Western blotting, respectively. **Results** Typical cell apoptosis was induced in cardiomyocytes at 24 h after hypoxia and cell viability decreased significantly. Elevation of Cyt c in cytosol was in accordance with the decline in mitochondrial Cyt c content. Significant increase in Cyt c in cytosol appeared at 12 h after hypoxia and peaked at 24 h while Cyt c in mitochondria could not be detected at 24 h after hypoxia. Hypoxia could up-regulate the caspase-3, -9 mRNA expressions at 3 h after exposure. Up-regulation of caspase-3, -9 mRNA expressions was maintained during 24 h hypoxic insult. **Conclusion** Hypoxia can induce mitochodrial Cyt c release into cytosol and up-regulate caspase-3, -9 mRNA expressions. These results demonstrate that hypoxia can induce mitochondrium-dependent caspase-3 activation in cardiomyocytes, resulting in cell apoptosis.

Key words: hypoxia; apoptosis; caspases; cytochrome c; cardiomyocyte

心肌细胞缺氧不仅是严重创伤后心功能衰竭的重要原因,也是启动和诱发其它脏器损伤形成多脏器功能不全/衰竭的重要始动因素[1]。近年来研究表明,缺氧导致细胞死亡的主要方式是通过诱导细胞凋亡而产生的[2]。研究表明在哺乳动物细胞凋亡过程中天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(称为caspases)家族的激活起关键作用。Caspases家族成员在正常细胞中以无活性的前体形式合成与储存,根据其在级联反应中的位置及N端序列上的特点不同,可将其分为两类:上游caspases(起始caspases,包括caspase-1,2,4,5,8,9,10,11,12,13)和下游caspases(效应caspases,包括caspase-3,6,7)[3]。凋亡信号可激活caspase级联反应:上游caspase-8,-9,-10等激活下游caspase-3,-6,-7,激活的效应caspases再作用于细胞骨架蛋白、DNA修复调节因子、细胞周期调节成分及Bcl-2家族的某些成员,使之

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054202)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, G1999054202)
作者简介:周 舟(1975-),女,湖南省新化县人,博士研究生,助教,主要从事缺氧诱导心肌细胞凋亡信号传导方面的研究。电话:(023)68752289
通讯作者:余争平,电话:(023)68752290
收稿日期:2004-09-17;修回日期:2004-12-23

失活破坏，从而导致细胞 DNA 修复功能丧失，失去正常增殖分化能力形成凋亡[4]。但缺氧是否可以直接诱导心肌细胞 caspases 家族的激活导致细胞凋亡以及相关信号传导机制尚未完全阐明。我们应用离体原代培养的新生大鼠心肌细胞复制缺氧损伤模型，探讨缺氧诱导心肌细胞 caspases 家族信号途径的激活及其分子机制，旨在探讨缺氧所致心肌细胞损害发生机制的同时，为临床防治缺血/缺氧性心肌损害提供线索。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及器材

DMEM 培养基（Sigma-Aldrich, USA）；Hoechst 33342；MTT；Cyt c 兔单抗（Santa Crus, USA）；生物素标记的山羊抗兔二抗（Santa Crus, USA）；Tripure（BM, USA）。

二氧化碳培养箱（Harris, USA）；荧光显微镜（Olympus, Japan）；PCR 仪（MJ, USA）；蛋白凝胶电泳及转膜系统（Bio-Rad, USA）；凝胶扫描仪（Doc Gel200, Bio-Rad, USA）。

1.2 心肌细胞培养及缺氧

1～3 d 龄健康 Wistar 大鼠乳鼠（由第三军医大学实验动物中心提供），无菌取左心室，剪碎心肌组织成 1 mm^3 的组织块，加入 0.25% 胰蛋白酶，37 ℃消化 30 min。细胞悬液过滤，离心；以含 15% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基混悬沉淀细胞，制备 1×10^6/ml单细胞悬液，差速贴壁法将未贴壁心肌细胞移入另一培养瓶中培养。按文献[5]的方法，将培养的心肌细胞分别进行 0、3、6、12、24 h 不同时相缺氧后，进行各指标的检测。

1.3 细胞凋亡检测

Hoechst 33342 染色法检测细胞凋亡[6]。将不同缺氧处理的细胞制备成 5×10^3/ml 的细胞悬液，按每毫升细胞悬液加入 5 nmol/L Hoechst 33342 荧光染料液 5 μl 混匀，室温放置 10 min，将负载荧光染料的细胞转移至洁净的载玻璃片，盖上盖玻片，每个样本在荧光显微镜下观察计数 500 个细胞内所含凋亡细胞数，选择典型核固缩和碎裂的凋亡细胞拍照。

1.4 细胞存活率测定

用 MTT 法测定细胞存活率。将纯化的培养新生鼠心肌细胞以 1×10^4/ml 接种于 96 孔细胞培养板，经不同时相缺氧处理的细胞加入 MTT 溶液（5 mg/ml），HT-7000 Plus 多孔读数仪 492 nm 处读取光密度值，以含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液作空白对照。

1.5 心肌细胞线粒体与胞浆 Cyt c 蛋白 Western blot 测定

心肌细胞缺氧后，加入细胞裂解液按文献[7]方法分别提取细胞线粒体与胞浆 Cyt c 蛋白，将收集的两种蛋白成分，100 ℃ 煮沸 5 min，用 Lowry 法测蛋白质含量，以 20 μg 蛋白上样进行 SDS-PAGE 电泳，PVDF 膜进行蛋白转印，然后进行免疫印迹，ECL 显色剂显色后用 Hyperfilm 曝光 30 s 显示结果。

1.6 RT-PCR 检测不同程度缺氧后心肌细胞 caspase-9, -3 mRNA 的表达

Tripure 提取细胞总 RNA，用总 RNA 4.0 μg 进行逆转录，合成的 cDNA 直接用于 PCR 扩增反应，按 caspase-3 引物序列：上游：5′-ATGGACAACAACGAAACCTCCGTG-3′，下游：5′-CCACTCCCAGTCATTCCTTTAGTG-3′，caspase-9 引物序列：上游：5′-GGCCCTTCCTCGCTTCATCTC-3′，下游：5′-GGTCCTTGGGCCTTCCTGGTAT-3′，在 β-actin 作内参照条件下，检测 caspase-9，3 mRNA 的表达。

1.7 统计学分析

对计量资料作双因素方差分析（Two-way ANOVA），组间差别作 student's t 检验，上述统计分析均用 Minitab 1.0 统计软件（Minitab INC, USA）。

2 结果

2.1 缺氧诱导的心肌细胞凋亡与细胞存活率的变化

应用荧光染料 Hoechst 33342 染色，正常心肌细胞呈均一的淡染，未见异常核（图 1）。缺氧 24 h 心肌细胞呈现典型的凋亡形态学变化，镜下可见典型的染色质浓集、核固缩、核碎裂、胞膜外突小泡形成等多种凋亡形态学特征（图 2）。

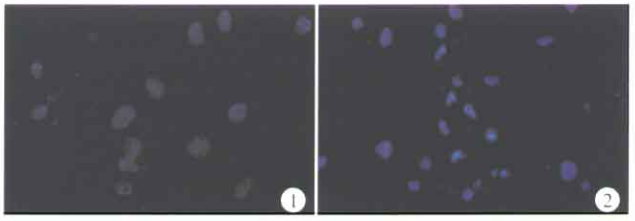


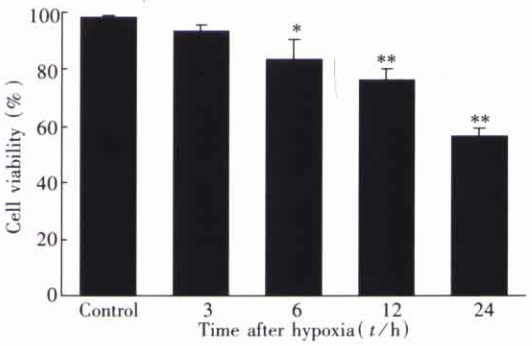
图 1 正常心肌细胞，荧光染色均匀 （Hoechst 33342 染色 × 200）

Fig 1 Normal cardiomyocytes （Hoechst 33342 × 200）

图 2 缺氧 24 h 心肌细胞，可见核固缩与破碎 （Hoechst 33342 染色 × 200）

Fig 2 Nuclear condensation and debris in apoptotic cardiomyocytes at 24 h after hypoxia （Hoechst 33342 × 200）

缺氧 6 h 心肌细胞存活率开始降低，12 h 细胞存活率显著低于对照值，至 24 h，细胞存活率下降约 42%，非常显著地低于对照值（图 3）。



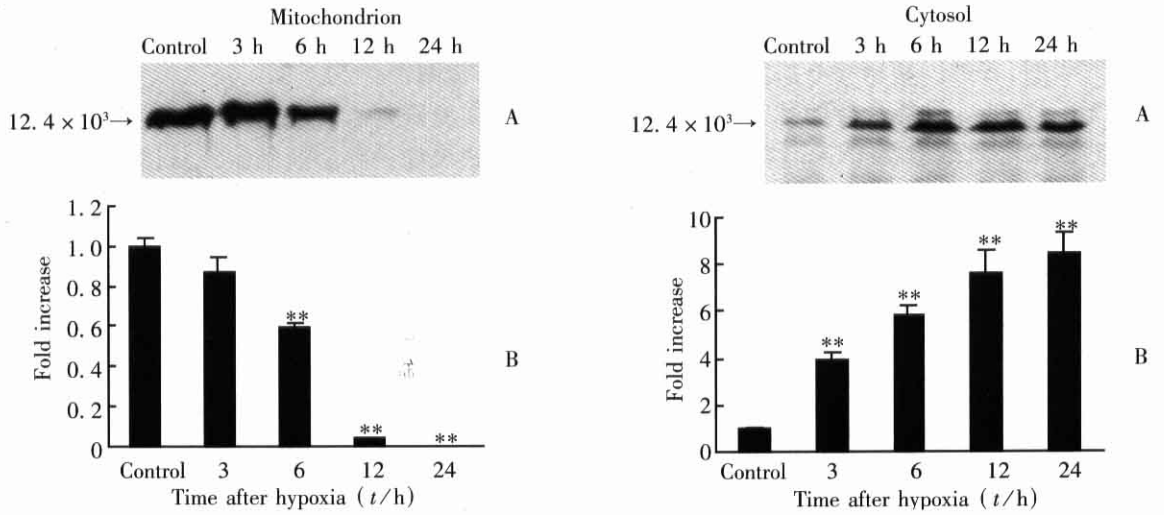
*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* control

图 3 缺氧对心肌细胞存活率的影响

Fig 3 Effects of hypoxia on cell viability in cardiomyocytes

2.2　Western blot 检测心肌细胞线粒体与胞浆蛋白中 Cyt c 的变化

正常心肌细胞线粒体 Cyt c 蛋白在 12.4×10^3 处出现一强阳性条带，而胞浆蛋白中 Cyt c 蛋白含量甚微，呈一弱阳性条带。缺氧 3 h 线粒体 Cyt c 未见显著变化，而胞浆成分中开始增多，至缺氧 12 h，线粒体中大部分 Cyt c 已释放至胞浆中，此时线粒体仅见一弱阳性条带，而胞浆达到峰值水平，呈强阳性反应，缺氧 24 h Western blot 方法在线粒体中已不能检测到 Cyt c，胞浆中维持在峰值水平(图 4)。上述结果表明缺氧可致心肌细胞线粒体 Cyt c 大量释放至胞浆中。



A: A representative of three independent experiments; B: Quantitative analysis of Western blot results. **: $P<0.01$, *vs* control

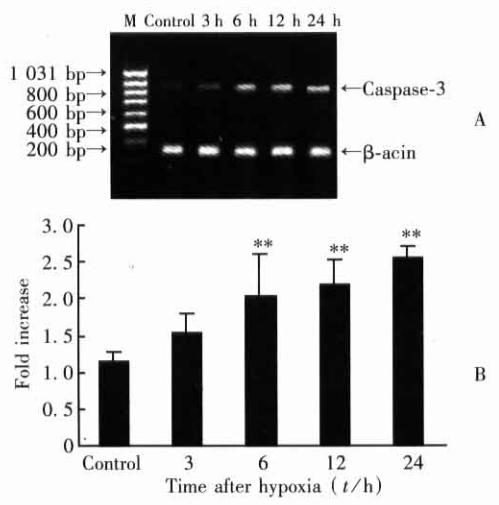
图 4　缺氧对心肌细胞线粒体和胞浆中细胞色素 c 的影响

Fig 4　Effects of hypoxia on mitochondrial and cytosol cytochrome c in cardiomyocytes

2.3　缺氧对心肌细胞 caspase-3,-9 mRNA 表达的影响

2.3.1　缺氧对心肌细胞 caspase-3 mRNA 表达的影响　正常心肌细胞 caspase-3 mRNA 表达在 857 bp 处出现一弱阳性条带，提示正常情况下心肌细胞 caspase-3 表达水平低下，缺氧 3 h caspase-3 表达开始增高，至 6 h 达到峰值水平，24 h 仍维持在峰值状态(图 5)。

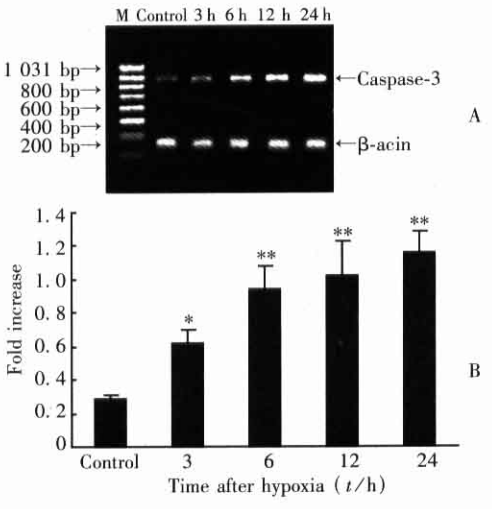
2.3.2　缺氧对心肌细胞 caspase-9 mRNA 表达的影响　正常心肌细胞 caspase-9 mRNA 表达在 885 bp 处出现一弱阳性条带，缺氧 3 h caspase-9 表达开始增高，至 6 h 达到峰值水平，24 h 仍维持在峰值状态(图 6)。结果表明缺氧可以显著上调心肌细胞 caspase-9 mRNA 表达。



A: A representative of three independent experiments; B: Quantitative analysis of RT-PCR results; **: $P<0.01$, *vs* control

图 5　缺氧对心肌细胞 caspase-3 mRNA 表达的影响

Fig 5　Effects of hypoxia on caspase-3 mRNA expression in cardiomyocytes



A: A representative of three independent experiments; B: Quantitative analysis of Western blot results; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control

图 6　缺氧对心肌细胞 caspase-9 mRNA 表达的影响

Fig 6　Effects of hypoxia on caspase-9 mRNA expression in cardiomyocytes

3 讨论

心肌细胞的功能与代谢特点决定了心肌细胞对缺氧特别敏感。成年的心肌细胞分裂增殖能力低下，损伤后常替以纤维组织增生来修复，严重影响了心肌功能，因此，研究缺氧诱导心肌细胞损害的机制在防治心肌缺氧性损害方面有其特殊的重要意义。

大量的研究表明，各种因素诱导心肌细胞凋亡主要存在3条途径：①TNF-α受体介导的死亡途径。该途径主要是通过激活心肌细胞膜TNF-αⅠ型受体(TNFR1)和下游的效应分子caspase-2,-8，导致细胞凋亡。这一途径是研究颇为透彻的死亡途径，是炎性细胞因子、活性氧代谢产物以及血管紧张素Ⅱ介导的心肌细胞损害的主要途径；②线粒体依赖的caspases激活途径。这一途径的激活依赖于线粒体Cyt c释放到胞浆[8]，触发caspases的级联效应，首先激活caspase-9，而后caspase-9进一步激活下游效应分子caspase-3,6,7，导致细胞凋亡。③MAPKs激活途径。多种细胞损伤因素(如射线照射、DNA烷化剂损伤等)可以激活MAPKs家族的JNK/SAPK与p38MAPK，这两种激酶的激活促进多种转录因子的激活，从而上调某些细胞损伤性基因(如*Bad*、*Bax*等)的表达和下调某些细胞应激保护性基因(如*Bcl*-2、*HSP*27等)的表达，导致细胞凋亡。至于缺氧究竟激活哪一条细胞信号传导途径造成心肌细胞凋亡，目前仍有争议，可能存在三条途径的共激活，一条途径激活对另一条途径的交叉激活(crosstalk)或者是线粒体依赖的caspases途径激活在先。

本实验首先观察到缺氧诱导心肌细胞凋亡并导致细胞存活率下降，进而观察到缺氧诱导的心肌细胞线粒体与胞浆中Cyt c变化的消长关系，缺氧6 h，胞浆中Cyt c含量即达到峰值水平，而线粒体中则明显减少，至缺氧24 h线粒体中已不能检测到Cyt c，这一结果提示缺氧致线粒体Cyt c大量释放至胞浆中；随后，我们进一步研究发现缺氧可上调心肌细胞caspase-3,-9的基因表达，这一效应在缺氧3 h出现，并在随后的观察时间内维持高表达状态。Caspase-9以酶原(procaspase-9)的形式存在于胞浆中，受Cyt c与凋亡蛋白酶激活因子1(apoptotic protease activating factor-1，Apaf-1)结合形成的凋亡复合体(apoptosome)催化激活，激活的caspase-9将32×10^3的caspase-3剪切为17×10^3和12×10^3的活化caspase-3。Caspase-3是凋亡的执行者，其作用主要包括：① 消化破坏细胞内多种蛋白酶复合体；② 激活核内核酸酶，如激活DNA片段因子45等，造成DNA裂解破坏形成DNA片段[9]；③ 通过特异地消化ATPase 4b亚基，破坏细胞的钙泵功能，造成细胞内钙超载。上述作用的综合结果是造成细胞不可逆性损伤，形成凋亡。

本实验研究结果，在培养的心肌细胞模型上直接证实了缺氧能诱导心肌细胞线粒体释放细胞色素c，并上调在激活caspases家族中起关键作用的上游的caspase-9及其下游的效应分子caspase-3的表达，引起心肌细胞凋亡，从而证明线粒体依赖的caspase-3激活信号传导途径在缺氧诱导心肌细胞凋亡过程中起重要作用，为阐明缺氧所致心肌细胞损害的分子机制提供了实验依据。

参考文献：

[1] Kang P M, Haunstetter A, Aoki H, *et al*. Morphological and molecular characterization of adult cardiomyocyte apoptosis during hypoxia and reoxygenation[J]. Circ Res, 2000, 87(2): 118-125.

[2] Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, *et al*. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999, 15: 269-290.

[3] Boatright K M, Salvesen G S. Caspase activation[J]. Biochem Soc Symp, 2003, 70(3): 233-242.

[4] Laugwitz K L, Moretti A, Weig H J, *et al*. Blocking caspase-activated apoptosis improves contractility in failing myocardium[J]. Hum Gene Ther, 2001, 12(17): 2051-2063.

[5] 王培勇，许蜀敏，刘 健. 一种简易实用的缺氧培养细胞装置[J]. 第三军医大学学报，1997，19(2)：S 88-89.

[6] 大山依势，王 冰. 细胞凋亡的检测方法(日文)[M]. 东京：医学书院出版社，1999. 80-95.

[7] Xu M, Wang Y, Hirai K, *et al*. Calcium preconditioning inhibits mitochondrial permeability transition and apoptosis[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 280(2): H899-908.

[8] de Moissac D, Gurevich R M, Zheng H, *et al*. Caspase activation and mitochondrial cytochrome c release during hypoxia-mediated apoptosis of adult ventricular myocytes[J]. J Mol Cell Cardiol, 2000, 32(1): 53-63.

[9] Donovan M, Cotter T G. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death [J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1644(2-3): 133-147.

(编辑 陈聪连)