论著

文章编号:1000-5404(2006)17-1738-04

GSK3β激活参与缺氧诱导心肌细胞凋亡

周 舟[1],余晓东[2],张 蕾[1],李茂全[1],张广斌[1],余争平[1] ([1]第三军医大学军事预防医学院劳动卫生学教研室,重庆 400038;[2]重庆师范大学生物系,重庆 400030)

提 要:目的 研究缺氧对心肌细胞糖原合成酶激酶-3β(glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β)及其偶联的信号转导分子激活的影响。**方法** 将培养的心肌细胞暴露于含1%氧的混合气体中,造成缺氧0、3、6、12、24 h后,用Hoechst 33342染色法检测细胞凋亡;MTT法检测细胞存活率;RT-PCR、Western blot方法分别检测心肌细胞GSK-3β mRNA及蛋白磷酸化的变化;RT-PCR法检测caspase-9、-3 mRNA表达的改变,分光法检测caspase-9酶活性。**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3~24 h GSK-3β mRNA表达高于对照组,而Ser9位点磷酸化水平在缺氧6~24 h明显低于对照组;caspase-9 mRNA表达在缺氧3 h即开始增高,在随后观察的时相点内持续处于高表达状态,caspase-9酶活性变化趋势与其mRNA表达一致,在缺氧3 h开始增高,并在缺氧6~24 h逐渐升高;caspase-3 mRNA表达在缺氧12 h、24 h明显高于对照组。**结论** 缺氧可以激活GSK3β,并进一步激活GSK3β下游介导的与细胞凋亡相关的蛋白激酶家族成员caspase-9、-3,从而导致心肌细胞凋亡。

关键词:缺氧;心肌细胞;GSK3β;caspase-9;caspase-3
中图法分类号:R322.11;R329.25;R345 **文献标识码**:A

Activation of GSK3β participates hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis

ZHOU Zhou[1], YU Xiao-dong[2], ZHANG Lei[1], LI Mao-quan[1], ZHANG Guang-bin[1], YU Zheng-ping[1] ([1]Department of Occupational Health, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 400030, China)

Abstract: Objective To explore the effect of hypoxia on activation of GSK3β coupled signal transduction pathway in cardiomyocytes. Methods After exposed to hypoxia for 0, 3, 6, 12, 24 h, the cell apoptosis and viability were determined with Hoechst 33342 staining and MTT respectively. The expressions of GSK3β, caspases-9, -3 mRNA and phosphorylation of GSK3β protein in primary culture of cardiomyocytes were determined by RT-PCR and Western blotting respectively. The changes of caspase-9 enzyme activity were assessed via a colorimetric assay. Results Typical cell apoptosis was induced in cardiomyocytes and cell viability significantly decreased after 24-hour hypoxia. Hypoxia for 3 to 24 h induced the increase of GSK3β mRNA expression. The levels of phosphorylated form of GSK3β obviously decreased after hypoxia for 6 to 24 h. Caspase-9 mRNA expression increased after hypoxia for 3 to 24 h and caspase-3 mRNA expression increased after hypoxia for 12 or 24 h. In consistent with the expression of caspase-9 mRNA, caspase-9 activity was markedly elevated after hypoxia for 3 to 24 h. Conclusion Hypoxia could induce cardiomyocyte apoptosis. Hypoxia can activate GSK3β and caspase-9, -3. These results demonstrate the activation of GSK3β signal transduction pathway participates hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis.

Key words: hypoxia; cardiomyocyte; GSK3β; caspase-9; caspase-3

心肌细胞缺氧不仅是严重创伤后心功能衰竭的重要原因,也是启动和诱发其他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]。糖原合成酶激酶-3β(glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β)新近被发现在细胞的生长、分化、突变、细胞凋亡和信号转导等生命活动中具有重要的调控作用[3]。GSK-3β广泛地表达于机体的各种组织和细胞中,其肽链结构中富含丝氨酸/苏氨酸残基,Tyr216残基被磷酸化后其活性被激活,而Ser9残基被磷酸化后其活性被抑制[4]。研究表明,在多种正常组

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,讲师,主要从事缺氧诱导心肌细胞凋亡信号传导方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68752289, E-mail: lunazhou00@yahoo.com
通讯作者:余争平,电话:(023)68752290
收稿日期:2005-10-08;**修回日期**:2006-01-19

织细胞以及多数类型的肿瘤细胞中，GSK-3β 的激活可以进一步激活细胞凋亡的相关蛋白激酶半胱氨酸特异的天门冬氨酸蛋白酶（cysteine proteinases with specificity for aspartic acid residues，caspase）caspase 家族的 caspase-3、caspase-9，造成核蛋白的分解与 DNA 链的剪切断裂，从而诱导细胞凋亡[5]，但缺氧造成的心肌细胞损伤过程中是否有 GSK-3β 及偶联的信号转导分子的参与以及相关的信号转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 GSK-3β 信号转导途径的激活在缺氧诱导心肌细胞凋亡过程中的作用，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实验线索。

1　材料与方法

1.1　主要试剂及器材

试剂：DMEM 培养基（Sigma-Aldrich，USA）；Hoechst 33342；MTT；抗磷酸化 Ser9 位点 GSK3β 单克隆抗体（Santa Cruz，USA）；Tripure（BM，USA）。

器材：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，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 个/ 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]报道的方法，将培养的心肌细胞放入密闭容器中，充入 95% N_2：5% CO_2 混合气体，至容器内氧终浓度为 1%，造成缺氧环境。在此环境中，将心肌细胞分别缺氧 0、3、6、12、24 h 后，进行各指标的检测。

1.3　细胞凋亡检测

用 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 个/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　细胞活性测定

用 MTT 法测定细胞活性。将纯化的培养新生鼠心肌细胞以 1×10^4 个/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　RT-PCR 检测 GSK3β、Akt、caspase-9 和 caspase-3 mRNA 表达

用 Tripure 提取心肌细胞总 RNA；取样本总 RNA 5.0 μg 逆转录制备 cDNA；合成的 cDNA 直接用于 PCR 扩增反应。各引物序列分别为：GSK3β 基因上游引物 5′-CCTTAACCTGGTGCTGGACT-3′，下游引物 5′-AGCTCTGGTGCCCTGTAGTA-3′；Caspase-9 基因上游引物 5′-GTGGACTGTGAGAAGCTTCA-3′，下游引物 5′-GATGAAGAACAGCTTGGGCT-3′；Caspase-3 基因上游引物 5′-TCTTCAGAGGCGACTACTGC-3′，下游引物 5′-TCCGGTTAACACGAGTGAGG-3′；β-actin 基因上游引物 5′-CATTGTCACCAACTGGGACG-3′，下游引物 5′-CATAGCTCTTCTCCAGGGAG-3′。其中 GSK3β 和 caspase-3 PCR 扩增条件为：94 ℃×30 s，58 ℃×30 s，72 ℃×1 min，共进行 38 个循环，最后 72 ℃ 10 min。Caspase-9 PCR 扩增条件为：94 ℃×30 s，55 ℃×30 s，72 ℃×1 min，共进行 38 个循环，最后 72 ℃ 10 min。产物长度为 300 bp。

扩增产物电泳凝胶置于 Gel Doc 2000 图像分析系统中进行灰度分析，用目的基因 PCR 产物扫描值/对应的 β-actin 表达产物扫描值比值表示基因表达水平。

1.6　Western-blot 检测心肌细胞 GSK3β 蛋白质磷酸化水平

提取心肌细胞胞浆蛋白，Lowry 法测蛋白质含量，用抗磷酸化 Ser9 位点 GSK3β 单克隆抗体 1∶1 000 进行免疫印迹。DAB 显色，将显色清晰条带的 PVDF 膜置 Gel Doc2000 凝胶扫描系统上分析，以样本扫描值/对照扫描值的比值进行统计分析。

1.7　Caspase-9 酶活性的检测

样本分析蛋白含量后，caspase-9 colorimetric 分析试剂盒（CALBIOCHEM，USA）的每孔上样量为 150 μg 蛋白，按试剂盒说明进行操作，400～405 nm 处，用分光光度仪（TECAN，Austria）扫描出结果，以细胞裂解液和试剂作为空白对照值，计算 caspase-9 酶活性时，先从样本读数中减去空白对照读数，然后以样本/对照的比值进行统计分析。

1.8　统计学分析

对计量资料做双因素方差分析，组间比较采用 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活性的变化

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。缺氧 24 h 心肌细胞呈现典型的凋亡形态学变化，镜下可见典型的核固缩、核碎裂、细胞膜外突小泡形成（bubbling）等多种凋亡形态学特征（图 1）。



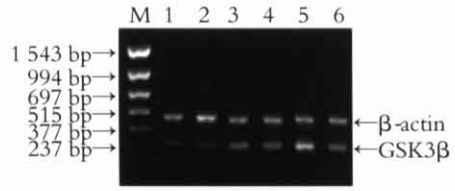
图 1　缺氧 24 h 心肌细胞凋亡　（荧光显微镜×200）

MTT 法检测细胞存活率结果表明，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38%，非常显著地低于对照值。

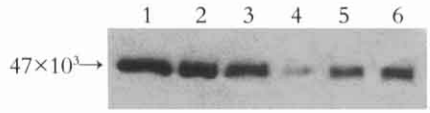
2.2 缺氧对心肌细胞 GSK3β mRNA 表达和蛋白质 Ser 9 磷酸化水平变化的影响

GSK3β mRNA 含量于缺氧 3 h 开始升高，并随时间的延长表达水平呈上升趋势，6～24 h 均呈高表达状态（图 2）；GSK3β 蛋白质磷酸化水平含量于缺氧 3 h 开始降低，缺氧 6 h 降至最低，缺氧 12、24 h，GSK3β 蛋白质磷酸化水平均显著低于对照组水平（图 3）。



M：标准；1：对照组；2：0 h；3：3 h；4：6 h；5：12 h；6：24 h

图 2 缺氧对心肌细胞 GSK3β mRNA 表达的影响

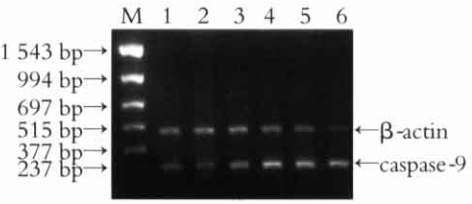


1：对照组；2：0 h；3：3 h；4：6 h；5：12 h；6：24 h

图 3 缺氧对心肌细胞 GSK3β 蛋白 Ser9 位点磷酸化水平变化的影响

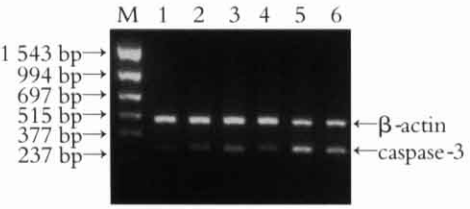
2.3 缺氧对心肌细胞 caspase-9、-3 mRNA 表达的影响

Caspase-9 mRNA 表达在缺氧 3 h 开始升高，并在随后所观察的时相点都显著高于对照组（图 4）；caspase-3 mRNA 含量于缺氧 12 h、24 h 显著高于对照组（图 5）。



M：标准；1：对照组；2：0 h；3：3 h；4：6 h；5：12 h；6：24 h

图 4 缺氧对心肌细胞 caspase-9 mRNA 表达的影响



M：标准；1：对照组；2：0 h；3：3 h；4：6 h；5：12 h；6：24 h

图 5 缺氧对心肌细胞 caspase-3 mRNA 表达的影响

2.4 缺氧对心肌细胞中 caspase-9 酶活性的影响

大鼠心肌细胞 caspase-9 酶活性变化趋势与其 mRNA 表达一致，在缺氧 3 h 开始增高，并在缺氧 6～24 h 持续升高（表 1）。

表 1 缺氧对心肌细胞 caspase-9 酶活性的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

缺氧时间（t/h）	吸光度值	倍数
正常对照	0.173±0.06	1
0	0.270±0.08	1.56±0.17
3	0.329±0.09[a]	1.90±0.18[a]
6	0.402±0.15[a]	2.32±0.25[a]
12	0.459±0.14[b]	2.65±0.28[b]
24	0.496±0.18[b]	2.86±0.21[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

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。

近年来，GSK3β 被发现是在多种重要信号转导过程中起关键作用的酶，其功能与在信号转导过程中的作用引起越来越广泛的关注，GSK3β 磷酸化是研究最深入的调控机制。GSK3β 上游的蛋白激酶可以通过磷酸化其丝氨酸 9 抑制 GSK3β 的活性[7]。本研究所用抗 GSK3β 磷酸化丝氨酸 9 位点单克隆抗体，特异地检测 GSK3β 肽链结构中 Ser 9 磷酸化状态，western blot 检测的 GSK3β 蛋白分子杂交条带为 Ser 9 磷酸化的 GSK3β，而对被去磷酸化激活的 GSK3β 不能结合。在本实验中，首先我们观察到缺氧诱导心肌细胞凋亡并导致细胞存活率下降，随后，我们进一步研究发现缺氧可上调心肌细胞 GSK3β 基因表达，同时使其蛋白磷酸化水平降低，因此缺氧诱导了 GSK3β 蛋白的去磷酸化，解除了磷酸化对其活性的抑制，从而激活了 GSK3β，参与了缺氧诱导心肌细胞凋亡的启动。

细胞凋亡是在生物进化过程中形成的一种调节生命活动过程的重要机制，哺乳动物细胞凋亡过程中起关键作用的是 caspases 家族成员。近年来研究表明多种细胞内外环境刺激因素激活 caspase-3 的同时也发现有 GSK3β 的激活，当 GSK3β 上游的信号转导分子受到抑制导致 GSK3β 激活时，就会促进 caspase 家族的蛋白酶激活，而造成细胞凋亡[8]。因此本研究进一步探讨了缺氧诱导 GSK3β 的激活与 caspase-9、3 变化的关系。本研究表明缺氧后 caspase-9 和 caspase-3 mRNA 表达均较正常状态明显增高，且随时间的延长表达水平呈上升趋势，并在本实验所观察的时间内维持峰值水平，说明缺氧可使大鼠心肌细胞中的凋亡相关蛋白激酶 caspase-9 和 caspase-3 基因表达上调，从而造成大鼠心肌细胞凋亡过程的启动，并存在一定的时效反应关系。Caspase-9 蛋白酶活性分析结果表明

caspase-9的活性增高变化过程与mRNA的表达上调的变化过程一致，进一步说明缺氧可以诱导caspase-9激活。缺氧致caspase-3 mRNA表达增加比caspase-9 mRNA表达增加出现的时间晚，可能的机制是损伤先通过激活caspase-9，再进一步激活下游的效应caspase-3[9]。因此，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激活心肌细胞GSK3β，进一步激活凋亡相关蛋白激酶caspase-9和caspase-3，诱导心肌细胞的凋亡，这些结果证明GSK3β偶联的信号转导途径的激活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全新的实验依据。

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] CROSS D A, CULBERT A A, CHALMERS K A, *et al*. Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death[J]. J Neurochem, 2001, 77(1): 94-102.
[4] HETMAN W, CAVANAUGH J E, KIMELMAN D, *et al*. Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal[J]. J Neurosci, 2000, 20(7): 2567-2574.
[5] BIJUR G N, JOPE R S. Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta[J]. J Biol Chem, 2001, 276(40): 37436-37442.
[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] ETIENNE-MANNEVILLE S, HALL A. Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity[J]. Nature, 2003, 421(6924): 753-756.
[8] DE-LAURENZI V, MELINO G. Apoptosis. The little devil of death[J]. Nature, 2000, 406(6792): 135-136.
[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 张大春)

文章编号：1000-5404(2006)17-1741-01

个案与短篇

血小板直方图在判断血小板计数结果中的可靠性评价

雷晓田 (青海大学附属医院检验科，西宁 810000)

鉴于目前临床对血小板计数结果不稳定反应较大，本研究利用SF-3000血细胞分析仪所提供的血小板计数结果和手工显微镜法结果作对照，对血小板直方图在判断血小板计数结果中的作用进行了探讨。

1 材料与方法

收集青海大学附属医院住院患者血样308例，标本均为EDTA-K2抗凝静脉血。对308例血样标本分别用SF-3000血液分析仪和显微镜进行检测对照，再从中根据血小板直方图和mcv、mpv参数筛选出血小板直方图正常者(对照组)247例，血小板直方图异常者61例。

2 结果与讨论

对247例血小板直方图正常组分析显示，当血小板直方图分布正常时，无论血小板计数值正常、减少还是增高，仪器法(均值169)与手工法(均值165)无显著性差异($P>0.05$)。而血小板直方图异常时，手工法和仪器法结果有差异(P值均<0.01)。26例小红细胞组分析结果显示，若红细胞的体积在25 fl左右，会被仪器误认为是血小板，导致仪器法偏高(均值187/158)。28例大血小板组显示，由于仪器是通过电子拟合曲线估计计入，故对于以大血小板为主的标本，由于临界值的限制，漏掉了部分异常大的血小板，导致计数结果偏低(均值82/98.5)[1]。7例血小板聚集组显示，从血片上可以看到5-10个聚集成堆的血小板。由于血小板易于黏附，聚集的生理特性，当抽血不顺或与抗凝剂混合不充分时，多个集聚的血小板会被仪器当作一个血小板进行计数，导致大计数结果低于实际值(均值56/86)。

综上所述，仪器法计数血小板易受许多因素干扰[2]，但我们可以通过血小板直方图及相关参数的变化，来判断计数结果的可靠性，必要时应该作手工显微镜法计数以获得更加准确的结果。

关键词：血小板直方图；SF-3000血细胞分析仪
中图法分类号：R446.113 文献标识码：B

参考文献：

[1] 庞 容. Coulter MAXM血细胞分析仪测定血小板结果偏低的原因分析[J]. 中华医学实践杂志，2005，4(12)：1289.
[2] 戴 隽. 血小板检测的影响因素探讨[J]. 中华医药杂志，2006，6(1)：88.

(编辑 王 红)

作者简介：雷晓田(1963-)，男，山西省平遥市人，主管检验师，主要从事血液细胞方面的研究。电话：(0971)6162532

收稿日期：2006-03-31；修回日期：2006-05-12