

Kruppel样因子 4对阿霉素诱导大鼠心肌细胞 H₉C₂ 凋亡的影响

杨涛^{1,2}, 屈顺林³, 伍赶球¹, 文建国¹, 刘俊文¹

(1. 中南大学湘雅医学院组织学与胚胎学系, 湖南省长沙市 410083; 2. 长沙理工大学化学与生物工程学院, 湖南省长沙市 410013; 3. 南华大学医学院病理生理学教研室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 心肌细胞; 细胞凋亡; Kruppel样因子 4

[摘要] 目的 探讨阿霉素对大鼠心肌细胞 H₉C₂ 凋亡的影响及 Kruppel样因子 4过表达对阿霉素所致 H₉C₂ 细胞凋亡的影响。方法 采用台盼蓝染色检测细胞存活率, 流式细胞术检测细胞凋亡率, 采用 Western blotting 检测 Kruppel样因子 4及凋亡相关基因多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶的表达。结果 阿霉素能够诱导 H₉C₂ 细胞凋亡, 采用 5 μmol/L阿霉素处理时, 24 h变化最为明显; Kruppel样因子 4过表达之后, 细胞凋亡率较转空载体组更高, 达 87.90%。阿霉素能够诱导 Kruppel样因子 4在 H₉C₂ 细胞中表达增加; Kruppel样因子 4过表达组多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶裂解片段的表达水平明显上调。结论 Kruppel样因子 4能够促进阿霉素诱导的大鼠心肌细胞 H₉C₂ 凋亡, 其作用机制与多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶有关。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

Effect of Kruppel-like Factor 4 on Doxorubicin-Induced Apoptosis of Rat Myocardocytes H₉C₂

YANG Tao^{1,2}, QU Shun-Lin³, WU Gan-Qiu¹, WEN Jian-Guo¹, and LU Jun-Wen¹

(1. Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Central South University, Changsha, Hunan 410083 China; 2. College of Chemistry and Bioengineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha, Hunan 410013 China; 3. Department of Pathophysiology, Medical School of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Myocardocyte; Cell Apoptosis; Kruppel-like Factor 4

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of Kruppel-like factor 4 (KLF4) overexpression on doxorubicin-induced apoptosis of rat myocardocytes H₉C₂. **Methods** Trypan blue staining and cytometry were applied to detect apoptosis. Western blotting was applied to determine expressions of KLF4 and apoptosis-related gene poly ADP-ribose polymerase (PARP). **Results** Trypan blue staining and cytometry results showed that doxorubicin could induce apoptosis of H₉C₂, and the apoptosis rate in KLF4-overexpression group was much higher than that of vector control group which was 87.90%. Western blotting results showed that doxorubicin treatment could promote KLF4 expression in H₉C₂ cells and the expression of PARP fragment was also up-regulated dramatically in KLF4-overexpression group. **Conclusion** KLF4 could promote doxorubicin-induced apoptosis of H₉C₂ cells which potential mechanism may be involved with PARP.

阿霉素具有抗癌谱广, 抗癌活性强的特点, 临床上广泛用于多种恶性肿瘤的治疗。但临床研究发现, 该化疗药物可导致严重的心肌损伤, 具体表现为早期出现各种心律失常, 晚期出现剂量相关性充血性心力衰竭。Kruppel样因子 4 (Kruppel-like factor 4, KLF4) 是细胞内的一种转录因子, 广泛参与调控细胞增殖分化、胚胎发育等重要生命过程, 并与多种

恶性肿瘤如结肠癌、乳腺癌等的发生发展有关。本研究拟观察 KLF4过表达对阿霉素所致大鼠心肌细胞 H₉C₂ 凋亡的影响, 以进一步揭示阿霉素造成心肌损伤的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

大鼠心肌细胞 H₉C₂ 由本校细胞中心提供; DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 无支原体小牛血清购自杭州四季青生物工程公司; 阿霉素购自 Sigma 公司; 脂质体购自 Invitrogen 公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG、DAB 显色试剂盒购自武汉博士德公司; 硝酸纤维素膜购自 Promega 公司;

[收稿日期] 2009-11-16 [修回日期] 2010-01-05

[基金项目] 国家自然科学基金 (30900623) 和湖南省科技计划 (2009FJ3169) 基金资助

[作者简介] 杨涛, 博士, 副教授, 主要从事心肌细胞凋亡机制研究, Email 为 yangtao807@163.com。屈顺林, 博士研究生, 讲师, 主要从事心血管疾病分子机制研究。通讯作者刘俊文, 博士, 讲师, 主要从事心血管疾病分子机制研究, Email 为 liujunwenyng@163.com。

pcDNA3 1-KLF4重组质粒由本室构建;兔抗 KLF4多克隆抗体购自 Santa Cruz公司;兔抗多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase, PARP)多克隆抗体购自 Cell Signaling公司;HRP标记的鼠抗 GAPDH多克隆抗体购自康成公司。其余试剂均为分析纯以上试剂。

1.2 pcDNA3 1-KLF4转染大鼠心肌细胞株 H₉C₂

pcDNA3 1-KLF4表达质粒由实验室自行构建^[1]。按照脂质体转染说明书,将空载体 pcDNA3 1和重组质粒 pcDNA3 1-KLF4转染入 H₉C₂细胞中,24 h后进行各种处理与检测。

1.3 台盼蓝染色

细胞进行相应处理之后,从培养箱取出并收集至 EP管中,制成单细胞悬液。吸取 100 μL 细胞悬液到 EP管内,加入台盼蓝染色液 100 μL,轻轻吹打混匀,3~5 min后滴板计数,于大方格内分别计数细胞总数和蓝染细胞数,计算细胞存活率。

1.4 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,即在进行处理之后,将各组细胞刮下并收集于 10 mL离心管中,1 kr/min 常温下离心 8 min,弃上清,用冷磷酸盐缓冲液 (PBS)重悬细胞,离心后弃上清。70%乙醇重悬并固定细胞,力求单细胞化,送至检测。

1.5 免疫印迹分析

用 1×SDS 加样缓冲液裂解细胞,收集细胞蛋白质,采用 Bradford法进行蛋白定量,制备好的蛋白样品置 -80℃冰箱保存备用。每泳道上样 30 μg蛋白,经 10% SDS-PAGE (70 V 和 120 V 分别电泳 2 h 和 4 h)电泳后,电转膜至硝酸纤维素膜,室温封闭后,加入兔抗 KLF4多克隆抗体或兔抗 PARP多克隆抗体(一抗),孵育 2 h洗膜,加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG(二抗),孵育 1 h洗膜,DAB显色,将膜扫描以分析结果,以 HRP 标记的鼠抗 GAPDH 为内参。

1.6 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 阿霉素对大鼠心肌细胞 H₉C₂ 凋亡的影响

不同浓度阿霉素 (0、1、5 及 10 μmol/L) 处理 H₉C₂ 细胞 24 h,台盼蓝染色显示,5 μmol/L阿霉素处理组细胞存活率已明显降低,10 μmol/L阿霉素处理组细胞存活率降低更明显。流式细胞术检测显示,10 μmol/L阿霉素处理组细胞凋亡率最高(表

1)。5 μmol/L阿霉素处理 H₉C₂ 细胞不同时间 (0、6、12 及 24 h),台盼蓝染色显示,阿霉素处理细胞 12 h细胞存活率已明显降低,处理 24 h则细胞存活率降低更明显。流式细胞术检测显示,阿霉素处理 24 h组细胞凋亡率最高(表 2)。

表 1 不同浓度阿霉素处理细胞 24 h 细胞存活率与细胞凋亡率 ($\bar{x} \pm s$)

阿霉素浓度 (μmol/L)	细胞存活率	细胞凋亡率
0	89.90% ± 4.77%	12.30% ± 1.49%
1	78.10% ± 5.16%	19.60% ± 4.24%
5	50.20% ± 9.97% ^a	54.70% ± 10.77% ^a
10	21.10% ± 2.21% ^a	77.50% ± 14.64% ^a

a为 $P < 0.05$ 与 0 μmol/L阿霉素组比较。

表 2 5 μmol/L阿霉素处理不同时间后细胞存活率与细胞凋亡率 ($\bar{x} \pm s$)

时间 (h)	细胞存活率	细胞凋亡率
0	87.30% ± 2.45%	10.30% ± 0.27%
6	79.90% ± 3.42%	15.60% ± 1.93%
12	63.20% ± 8.24% ^a	33.70% ± 9.06% ^a
24	51.10% ± 3.39% ^a	53.20% ± 12.31% ^a

a为 $P < 0.05$ 与 0 h组比较。

2.2 阿霉素对 H₉C₂ 细胞 KLF4 表达的影响

5 μmol/L阿霉素处理 H₉C₂ 细胞不同时间 (0、12 及 24 h),KLF4蛋白水平随阿霉素处理时间持续上升,24 h 仍明显上升,与对照组相比具有显著性差异(图 1)。

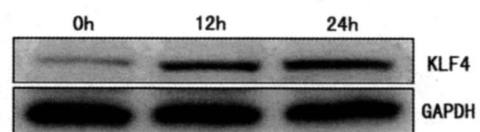


图 1 阿霉素处理后细胞 Kruppel 样因子 4 蛋白的表达

2.3 过表达 KLF4 对阿霉素诱导 H₉C₂ 细胞凋亡的影响

5 μmol/L阿霉素处理 H₉C₂ 细胞 24 h 与空载体组细胞相比,过表达 KLF4 组细胞存活率明显降低,而细胞凋亡率明显增高(表 3)。

2.4 过表达 KLF4 对 H₉C₂ 细胞凋亡过程中 PARP 表达的影响

转染 KLF4 表达质粒后,过表达 KLF4 组 KLF4 表达明显增加。未经处理的两组细胞中 PARP 的裂

解片段较少。5 $\mu\text{mol/L}$ 阿霉素处理 H_9C_2 细胞 24 h 与转空载体组相比, 过表达 KLF4 组 PARP 裂解片段 (89 kDa) 进一步增多 (图 2)。

表 3 过表达 Kruppel 样因子 4 后 H_9C_2 细胞存活率与细胞凋亡率 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	细胞存活率	细胞凋亡率
转空载体组	90.10% \pm 7.72%	8.70% \pm 0.25%
KLF4 过表达组	89.70% \pm 2.84%	9.60% \pm 0.13%
转空载体 + 阿霉素组	57.90% \pm 5.06%	50.20% \pm 10.08%
KLF4 过表达 + 阿霉素组	14.40% \pm 3.48% ^a	87.90% \pm 10.93% ^a

a 为 $P < 0.05$ 与转空载体组比较。

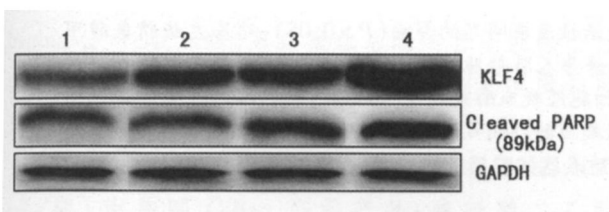


图 2 过表达 Kruppel 样因子 4 后 H_9C_2 细胞凋亡过程中 PARP 的表达 1~4 分别为转空载体组、KLF4 过表达组、转空载体 + 阿霉素组和 KLF4 过表达 + 阿霉素组。

3 讨论

阿霉素属蒽环类抗生素, 临床上广泛应用于治疗恶性肿瘤, 疗效显著, 但该药对心脏存在毒性损害。阿霉素与心肌细胞的亲和力明显高于其他细胞, 这种特性使得心肌更易受到阿霉素的损伤^[2]。阿霉素引起心肌损伤的确切机制仍不十分清楚^[3], 如何在充分发挥药物抗癌作用的前提下, 尽可能减轻心脏损伤, 对于该药物的临床应用具有重要的意义^[4]。本研究中阿霉素能够诱导 H_9C_2 细胞凋亡, 且呈剂量与时间依赖性。5 $\mu\text{mol/L}$ 阿霉素处理 H_9C_2 细胞 24 h 该浓度阿霉素对细胞造成了一定的损伤, 该浓度恰恰是临床患者应用标准阿霉素化疗方案时的血浆峰值浓度^[5]。同时我们发现, 5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度阿霉素处理 H_9C_2 细胞之后, KLF4 蛋白水平随阿霉素处理时间而持续上升, 24 h 时仍明显上升。

KLF4 是 Sp/Kruppel 样转录因子家族的成员之一, 在胃肠道上皮细胞、皮肤、血管内皮细胞表达丰富, 含有 3 个 C_2H_2 锌指结构域, 具有促进表皮增殖分化, 抑制结肠癌、膀胱癌等恶性肿瘤发生等多种功能^[6,7]。虽然与恶性肿瘤的发生有关, 但 KLF4

在肿瘤化疗特别是对药物引致心肌损伤的过程中是否担当重要角色仍未见报道。最近的研究表明, KLF4 在炎症、热应激、缺血再灌注等过程中被诱导表达, 并且通过调控某些相关基因的表达来影响相应的病理生理过程^[8,9]。既然 KLF4 在阿霉素血浆峰值浓度下有诱导表达, 我们推测其在阿霉素诱导心肌细胞凋亡的过程中具有一定的作用, 从而进一步观察了 KLF4 对阿霉素诱导 H_9C_2 细胞凋亡的影响。结果表明过表达 KLF4 的细胞存活率明显降低, 而细胞凋亡率明显增高, 并且 PARP 的表达明显增高。PARP 是细胞凋亡核心成员 Caspase 的切割底物, 在 DNA 损伤修复与细胞凋亡中发挥着重要作用。在细胞凋亡时, PARP 作为 Caspase 的底物被裂解成 89 kDa 裂解片段的增多则预示着细胞凋亡。本研究中 PARP 裂解片的变化提示 KLF4 对阿霉素诱导 H_9C_2 细胞凋亡的促进作用与 PARP 相关信号通路有关, 深入研究相关信号通路如 Caspase 的改变, 将有助于进一步机制的阐明。

综上所述, KLF4 能够促进阿霉素诱导的大鼠心肌细胞 H_9C_2 凋亡, 其作用机制与 PARP 有关。研究 KLF4 在阿霉素致心肌损伤过程中的作用有助于阐明化疗药物对心肌损伤的分子机制, 对于其副作用的预防和治疗具有积极的作用。

[参考文献]

- [1] 刘梅冬, 刘瑛, 刘俊文, 等. KLF4 过表达对热应激所致 Raw264.7 巨噬细胞凋亡的影响 [J]. 中南大学学报 (医学版), 2007, 32 (6): 1002-006
- [2] Tokarska-Schlattner M, Wallmann T, Schlattner U. Alterations in myocardial energy metabolism induced by the anti-cancer drug doxorubicin [J]. *Comptes Rendus Biologies*, 2006, 329 (9): 657-668
- [3] Muraoka S, Mura T. Free radical-mediated cardiac toxicity induced by adriamycin [J]. *J Pharm Soc Jap*, 2003, 123 (10): 855-866
- [4] 徐久宏, 张三典, 高耀明, 等. 阿霉素对心肌细胞损伤的实验研究 [J]. 苏州大学学报 (医学版), 2008, 28 (1): 47-49
- [5] Cianni L, Vignani L, Locatelli A, et al. Human pharmacokinetic characterization and in vitro study of the interaction between doxorubicin and paclitaxel in patients with breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 1997, 15: 1906-915
- [6] Zhao W, Hisamuddin M, Nandan MO, et al. Identification of Kruppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer [J]. *Oncogene*, 2004, 23 (2): 395-402
- [7] Ohnishi S, Ohnami S, Laub F, et al. Downregulation and growth inhibitory effect of epithelial-type Kruppel-like transcription factor KLF4, but not KLF5, in bladder cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 308 (2): 251-256
- [8] Liu Y, Wang J, Yi Y, et al. Induction of KLF4 in response to heat stress [J]. *Cell Stress Chaperon*, 2006, 11 (4): 379-389
- [9] 王浩, 刘瑛, 刘俊文, 等. 短暂缺血再灌注对大鼠心肌 Kruppel 样因子 4 表达的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15 (11): 813-815

(此文编辑 文玉珊)