

视神经萎缩相关蛋白 A1 在缺氧心肌细胞凋亡中的抑制作用

西安市第九医院 翟春丽*, 西安 710054

摘要 目的:探讨视神经萎缩相关蛋白 A1(OPA1)在缺氧心肌细胞凋亡中的保护作用。方法:利用小干扰 RNA (siRNA)在体外下调 OPA1 表达后,采用流式检测下调 OPA1 对缺氧心肌细胞凋亡的影响;用 Western blot 检测下调 OPA1 对缺氧心肌细胞线粒体细胞色素 C 释放及含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 Caspase-3 与 Caspase-9 活性的影响;用流式分析下调 OPA1 对缺氧心肌细胞活性氧(ROS)产生的影响。结果:下调 OPA1 可明显加重缺氧诱导的心肌细胞凋亡,诱导线粒体细胞色素 C 释放并激活 Caspase-3 与 Caspase-9 活性,诱导心肌细胞中 ROS 产生。结论:OPA1 分子具有抑制缺氧心肌细胞凋亡的作用,其机制可能是 OPA1 介导的线粒体融合抑制了线粒体中细胞色素 C 的释放与 ROS 的生成。

关键词 心肌细胞;视神经萎缩相关蛋白 A1;线粒体融合;活性氧;凋亡

中图分类号 R542.2

文献标识码 A

DOI 10.11768/nkjwzzzz20190616

Protective role of optic atrophy type 1 in apoptosis of cardiomyocytes during hypoxia ZHAI Chun-li. The Ninth Hospital of Xi'an, Xi'an 710054, China

Abstract Objective: To explore the protective role of optic atrophy type 1 (OPA1) in apoptosis of cardiomyocytes during hypoxia. Methods: Cell apoptosis was evaluated by flow cytometry after knocking down OPA1 with siRNA in cardiomyocytes during hypoxia; Cytochrome C release and activities of caspase-3 and caspase-9 were evaluated by Western blot analysis after knocking down OPA1 with siRNA in cardiomyocytes during hypoxia; Reactive oxygen species (ROS) production was determined by flow cytometry after knocking down OPA1 with siRNA in cardiomyocytes during hypoxia. Results: Knockdown of OPA1 significantly aggravated hypoxia-induced apoptosis of cardiomyocytes; significantly increased hypoxia-induced cytochrome C release from mitochondria, and activities of caspase-3 and caspase-9; significantly increased hypoxia-induced ROS production. Conclusion: OPA1-regulated mitochondrial fusion may play an important protective role in cardiomyocytes from hypoxia-induced cell apoptosis mainly through inhibition of cytochrome C release and ROS production.

Key words Cardiomyocytes; Optic atrophy type 1; Mitochondrial fusion; Reactive oxygen species; Apoptosis

急性心肌梗死是心血管疾病所致死亡中最主要的原因,主要表现为冠状动脉急性或持续性缺血缺氧引起的心肌凋亡与坏死^[1]。提高心肌细胞在缺血缺氧时的抗凋亡能力是预防心肌梗死发生及改善心肌梗死患者预后的重要策略^[2]。线粒体在细胞能量代谢、氧化还原与凋亡调控中发挥重要作用^[3],其生理功能的调节与个体间高度频繁的分裂与融合密切相关^[4-7]。本研究旨在探讨线粒体融合蛋白视神经萎缩相关蛋白 A1 (optic atrophy 1, OPA1)在缺氧心肌细胞凋亡中的保护作用,并对其机制进行初步探讨。

材料与方法

实验材料 大鼠心肌细胞 H9C2 购自 ATCC 细胞库;DMEM 培养液与胎牛血清分别购自 Gibco 与四季青生物公司;siRNA 干涉片段由上海吉玛公司

合成;lip2000 购自 invitrogen 生物公司;线粒体分离试剂盒与活性氧(ROS)检测试剂盒均购自碧云天生物公司。细胞色素 C (Cytochrome C)、Caspase-3、Caspase-9、COX IV (cytochrome C oxidase subunit IV) 及 β -actin 抗体均购自 abcam 抗体公司。小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 靶向的 OPA1 序列为: 5'-AAGTTATCAGTCTGAGCCAGGTT-3'。

实验方法

细胞培养:采用含 10% 胎牛血清的杜尔贝科改良伊格尔培养基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM) 培养液对 H9C2 细胞进行培养,为防止细胞污染,另在培养液中加入 100 U/mL 的青霉素和 0.1 mg/mL 的链霉素,细胞置于 5% CO₂ 的细胞培养箱中 37℃ 培养。

siRNA 转染:细胞长至对数期时进行 6 孔板接种,密度为 2×10^5 个/孔,待细胞贴壁后即可进行 siRNA 转染,严格按脂质体 lip2000 说明书操作,用

* 通信作者:翟春丽, E-mail: 1046228564@qq.com

不含血清的 DMEM 培养液分别稀释 siRNA 与脂质体 lip2000, 静置 5 min 后将二者混合并继续静置 30 min。随后, 用移液器将 100 μ L 上述混合液加入 6 孔板细胞中, 培养 6 h 后进行换液, 置入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中继续培养, 24 h 后即可用于凋亡等其它后续实验。

细胞总蛋白提取:按上述方法对 H9C2 细胞中 OPA1 表达进行 siRNA 干扰处理, 随后用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 清洗细胞 2 次, 加入 100 μ L 的蛋白裂解液后将 6 孔板置于冰上裂解 20 min 后, 裂解液转移至离心管并于 4℃ 离心机中 12 000 转/min 离心 20 min, 吸取上清即为细胞总蛋白。

胞浆与线粒体蛋白提取:用线粒体分离试剂盒对细胞中线粒体进行分离, 离心所得沉淀为线粒体, 上清为胞浆蛋白。随后在分离所得线粒体中继续加入蛋白裂解液进行 30 min 裂解, 于 4℃ 离心机中 12 000 转/min 离心 25 min, 吸取上清即获得线粒体蛋白。最后, 用二辛可酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量法分别对胞浆与线粒体蛋白进行浓度测定, 加入上样缓冲液煮沸 5 min 后即可用于电泳分离。

Western Blot:事先配制适宜浓度的分离胶, 随后将蛋白样品加入凝胶各孔并开始电泳, 蛋白在上层胶中时的电压设为 90V, 待进入下层分离胶后即可加大电压至 120V, 电泳结束后将凝胶中蛋白转印至二氟化树脂膜 (polyvinylidene fluoride membrane, PVDF), 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后即可加入一抗进行孵育, 4℃ 孵育过夜后用 PBS 清洗 3 次 (每次 5 min), 加入二抗室温孵育 2 h, PBS 清洗 3 次 (每次 5 min) 后即可对结果进行拍照分析。

细胞 ROS 水平检测:细胞内 ROS 检测采用 DCFH-DA 荧光探针 (购自碧云天生物公司), 实验流程按试剂盒说明书进行。用胰酶消化各组细胞并用 PBS 清洗 2 次, 随后用 DMEM 稀释过的 DCFH-DA 探针 (10 mM) 重悬细胞并在 37℃ 条件下孵育

20 min, 孵育结束后上流式进行结果分析。

细胞凋亡检测:预先对 H9C2 心肌细胞进行 OPA1 表达干扰与缺氧处理, 随后用胰酶 (不含 EDTA) 消化各组细胞并用 PBS 清洗 2 次, 结合缓冲液 500 μ L 重悬细胞后分别加入膜联蛋白 Annexin V 与碘化丙啶 (propidium iodide, PI), 暗室反应 20 min 后上流式进行结果分析。

统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计学软件, 计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用非配对 *t* 检验进行组间差异比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

下调 OPA1 对缺氧诱导的心肌细胞凋亡的影响 我们首先设计合成靶向 OPA1 的 siRNA 片段, 并对 siRNA 在 H9C2 细胞中下调 OPA1 的效率进行实时定量 PCR (qPCR) 与 western blot 分析, 结果表明, 该 siRNA 片段可显著下调 H9C2 中 OPA1 的表达, 见图 1。

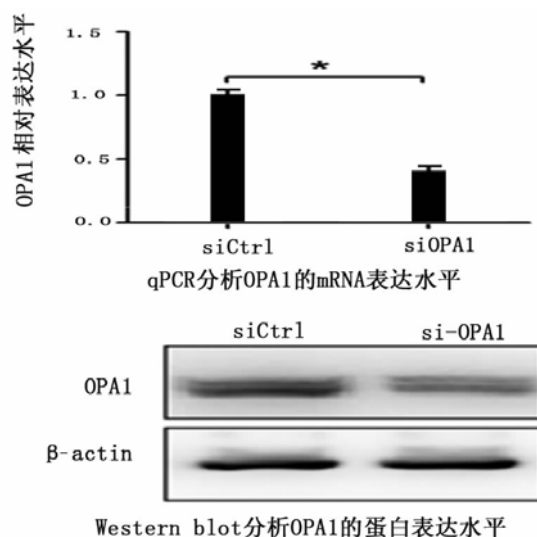


图1 siRNA 下调 H9C2 细胞中 OPA1 表达的效率分析

流式分析结果显示, 缺氧 (氧气浓度 1%, 缺氧时长 6 h) 可显著诱导 H9C2 细胞发生凋亡, 而下调 OPA1 后, 缺氧诱导的 H9C2 细胞凋亡更加明显, 表明下调 OPA1 可加重缺氧时心肌细胞的凋亡, 见图 2。

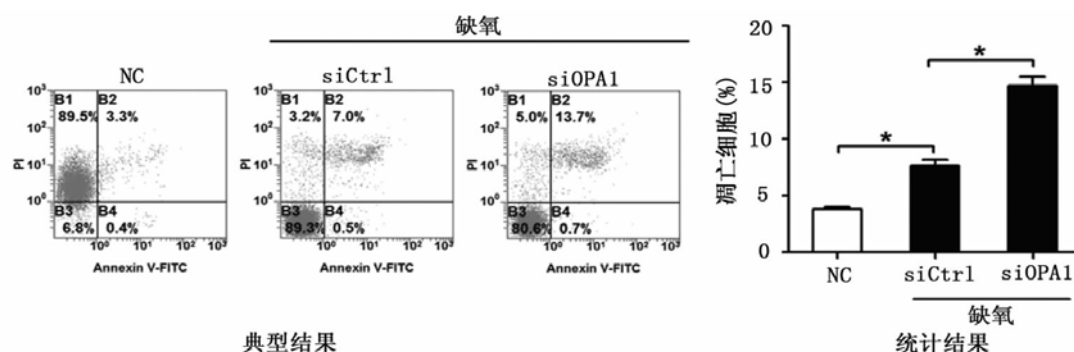


图2 流式分析 OPA1 对缺氧环境下心肌细胞凋亡的影响

下调 OPA1 对缺氧环境下线粒体细胞色素 C 释放及 Caspase-3 与 Caspase-9 活性的影响 缺氧(氧气浓度 1%, 缺氧时长 6 h)可促进细胞色素 C 由线粒体释放进入胞浆,同时可激活细胞凋亡执行蛋白 Caspase-3 与 Caspase-9 的活性。而下调 OPA1 可进一步增强缺氧诱导的细胞色素 C 释放及 Caspase-3 与 Caspase-9 的活性,见图 3。

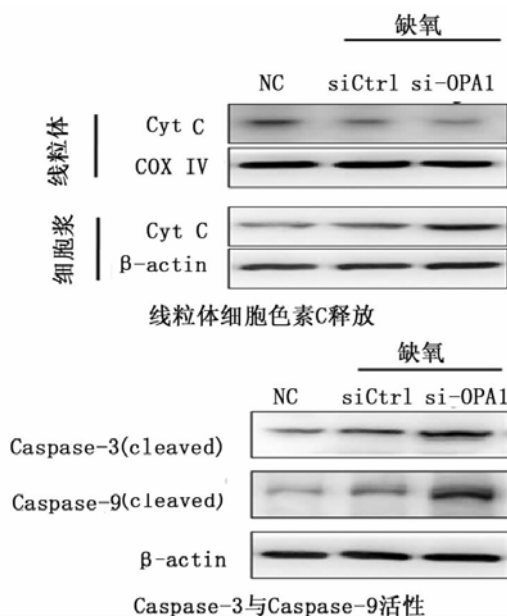


图3 下调 OPA1 对缺氧环境下细胞色素 C 释放及 Caspase-3 与 Caspase-9 活性的影响

下调 OPA1 对心肌细胞中 ROS 的影响 缺氧(氧气浓度 1%, 缺氧时长 6 h)可显著诱导 H9C2 细胞内活性 ROS 的产生,而下调 OPA1 则可进一步增加缺氧诱导的 ROS 产生,见图 4。

讨论

有报道线粒体分裂可促进心肌缺血再灌注导致的心脏损伤。Yang 等^[8]发现,心肌缺血再灌注损伤

过程中,心肌细胞中动力相关蛋白 1(dynamin-related protein 1, DRP1)表达显著上调,提示 DRP1 调控的线粒体分裂可能与缺血再灌注时的心肌损伤相关。Maneechote 等^[9]研究证实,靶向线粒体分裂蛋白 DRP1 的抑制剂 Mdivi-1 对缺血再灌注心肌损伤有良好的保护作用。同样,Dong 等^[10]证实,线粒体分裂可促进心肌缺血再灌注导致的心肌细胞凋亡与坏死,缺血前进行抑制线粒体分裂的预处理,可通过抑制心肌细胞凋亡而发挥心脏保护作用。上述研究提示,线粒体分裂融合可能调控应激状态下心肌细胞的凋亡。本研究表明,下调线粒体融合蛋白 OPA1 可显著加重缺氧时心肌细胞凋亡,提示 OPA1 介导的线粒体融合对缺氧诱导的心肌细胞凋亡具有保护作用。

细胞色素 C 主要通过由线粒体释放进入胞浆并进一步激活 Caspase-3 与 Caspase-9 等凋亡执行蛋白而发挥凋亡调控作用。考虑到细胞色素 C 主要定位于线粒体内膜,而 OPA1 主要参与线粒体内膜融合的调控,因此推测 OPA1 极可能通过调控细胞色素 C 释放而参与细胞凋亡调控。本研究发现,下调 OPA1 可显著促进缺氧诱导的细胞色素 C 释放与 Caspase-3/9 的活性。这与 Varanita 等^[11]结果一致,表明 OPA1 可通过调控线粒体内膜形态而抑制细胞色素 C 释放。除细胞色素 C 外,氧化呼吸电子传递链复合体是另一具有重要功能的分子,该复合体不但参与细胞中绝大部分能量 ATP 的产生,也参与了细胞内 ROS 的生成。ROS 是导致心、肺、肾等重要脏器损伤的主要原因之一^[12~14]。本研究发现,下调 OPA1 可显著促进缺氧诱导的 ROS 产生,提示 ROS 与细胞色素 C 可能同时参与了 OPA1 对缺氧时心肌细胞凋亡的抑制作用。

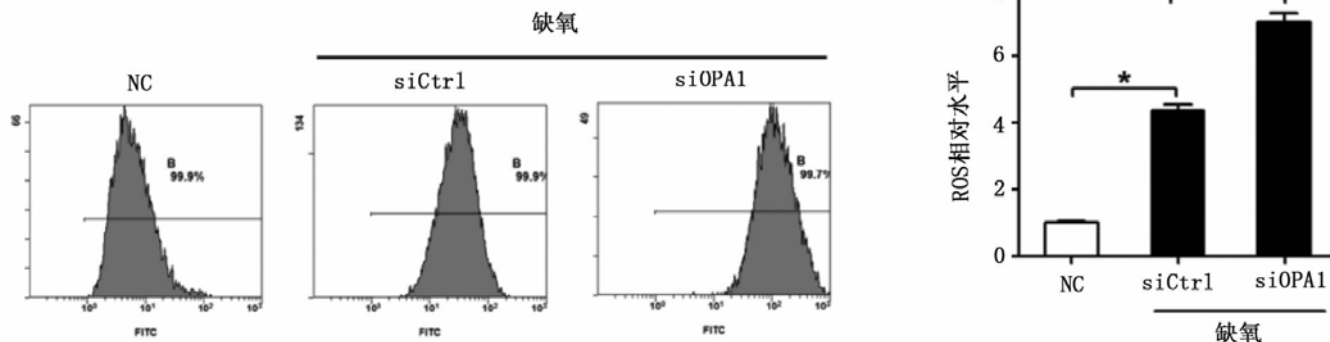


图4 下调 OPA1 对缺氧环境下 H9C2 细胞 ROS 生成的影响

参考文献

- Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018) [J]. Glob Heart, 2018, 13(4): 305-338.
- Prabhu SD, Frangogiannis NG. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: from inflammation to fibrosis [J]. Circ Res, 2016, 119(1): 91-112.
- Milane L, Trivedi M, Singh A, et al. Mitochondrial biology targets, and drug delivery [J]. J Control Release, 2015, 207(10): 40-58.
- Ni HM, Williams JA, Ding WX. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control [J]. Redox Biol, 2015, 4(1): 6-13.
- Ito YA, Di Polo A. Mitochondrial dynamics, transport, and quality control: A bottleneck for retinal ganglion cell viability in optic neuropathies [J]. Mitochondrion, 2017, 36: 186-192.
- Otera H, Mihara K. Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics [J]. J Biochem, 2011, 149(3): 241-251.
- Lee H, Yoon Y. Mitochondrial fission and fusion [J]. Biochem Soc Trans, 2016, 44(6): 1725-1735.
- Yang YL, Zhao LY, Ma J. Penhyclidine hydrochloride preconditioning provides cardiac protection in a rat model of myocardial ischemia/reperfusion injury via the mechanism of mitochondrial dynamics mechanism [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 813: 130-139.
- Maneechote C, Palee S, Kerdphoo S, et al. Differential temporal inhibition of mitochondrial fission by Mdivi-1 exerts effective cardioprotection in cardiac ischemia/reperfusion injury [J]. Clin Sci (Lond), 2018, 132(15): 1669-1683.
- Dong Y, Undyala VVR, Przyklenk K. Inhibition of mitochondrial fission as a molecular target for cardioprotection: critical importance of the timing of treatment [J]. Basic Res Cardiol, 2016, 111(5): 59.
- Varanita T, Soriano ME, Romanello V, et al. The OPA1-dependent mitochondrial cristae remodeling pathway controls atrophic, apoptotic, and ischemic tissue damage [J]. Cell Metab, 2015, 21(6): 834-844.
- Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 301(6): H2181-H2190.
- 武小杰, 倪望. 外周血活性氧作为标记物评估慢性阻塞性肺疾病中肺组织的氧化应激程度 [J]. 内科急危重症杂志, 2017, 23(3): 197-200.
- 陈芳, 胡韬韬, 陈丹等. 抗霉素诱导肾小管上皮细胞铁死亡的实验研究 [J]. 内科急危重症杂志, 2018, 24(4): 320-323.

(2018-10-26 收稿 2019-04-25 修回)

(上接第 488 页)

病情复杂等特点,救治人员要有扎实的急救知识、娴熟的技能、默契的团队意识。本次研究分层次、分对象、分阶段培训,集培训、考核、演练、实战为一体的培训模式,最终形成 ACLS、BLS、协助急救人员(行政、后勤人员等)的不同标准,各级人员考核合格方可参与急救。培训后干预组成绩优于对照组,说明培训有效。2017 年 AHA 指南更新进一步提升尽早实施高质量 CPR 的可行性,推荐分级分层的 CPR 实施方案,依据 CPR 培训及熟练程度对施救者实施 CPR 的方式进行区分,在不影响救助质量的前提下,提升了施救者的可操作性^[7]。培养一支技术过硬的急救队伍可提高心脏骤停患者的救治成功率。

参考文献

- 金友红,吴晓东,曹艳春等. JCI 标准下院内急救体系的构建与应用 [J]. 中国医院管理, 2018, 38(9): 54-55.
- Neumar RW, Shester M, Callaway CW, et al. Part 1: Executive Summary: 2015 American Heart Association Guidelines Update for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care [J]. Circulation, 2015, 132(18 Suppl 2): S315-S367.
- Johnson K, Geis G, Oehler J, et al. Simulation to implement a novel system of care for pediatric critical airway obstruction [J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2012, 138(10): 907-911.
- 魏捷, 胡念丹. 《2015 年美国心脏协会心肺复苏及心血管急救指南更新》解读之急救系统和持续质量改进 [J]. 临床急诊杂志, 2016, 17(1): 1-2.
- Kronick SL, Kurz MC, Lin S, et al. Part 4: systems of Care and Continuous Quality Improvement: 2015 American Heart Association Guidelines Update for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care [J]. Circulation, 2015, 132(18 Suppl 2): S397-S413.
- 王丹, 吴惠静, 雯婷等. 综合性医院医疗应急响应体系构建 [J]. 中国医院, 2018, 1(22): 33-35.
- Kleinman ME, Goldberger ZD, Rea T, et al. 2017 American Heart Association focused Update on adult life support and cardiopulmonary resuscitation quality: an update to the American Heart Association Guidelines Update for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care [J]. Circulation, 2017, 137(1): e7-e13.

(2019-01-02 收稿 2019-07-30 修回)