

· 基础研究 ·

衰老心肌中Omi/HtrA2表达增加可促进心肌细胞自噬

徐海波¹, 王 可¹, 杜芸辉², 白克华¹, 张苏丽¹, 李 笑¹, 刘 腾¹, 马新亮^{1*}, 刘慧荣^{1,3*}(首都医科大学生理与病理生理学教研室, 北京 100069; ²山东大学海洋学院海洋生物工程教研室, 威海 264209; ³山西医科大学生理学教研室, 太原 030001)

【摘要】目的 探讨衰老心肌中增加的Omi/HtrA2在心肌细胞自噬中的作用。**方法** 用D-半乳糖干预胎鼠心肌细胞系H9c2建立衰老细胞模型, β -半乳糖苷酶染色观察细胞的衰老情况, cck8试剂盒检测细胞存活率, 并以分析细胞乳酸脱氢酶(Lactic Dehydrogenase, LDH)水平反映其活性; 给予Omi/HtrA2特异性抑制剂ucf-101降低Omi/HtrA2活性, 构建稳转Omi/HtrA2的H9c2细胞株过表达Omi/HtrA2; 采用western blot法测定心肌细胞中Omi/HtrA2、beclin1及LC3-II蛋白的表达。**结果** (1)与H9c2心肌细胞相比, D-半乳糖诱导的H9c2心肌细胞内 β -半乳糖苷酶染色阳性率显著升高[(87.7 $\pm$ 3.6%) vs (18.3 $\pm$ 2.8%), $P < 0.01$]; cck8结果显示, 两组之间无显著性差异($P > 0.05$), 但D-半乳糖诱导的H9c2心肌细胞中LDH活性明显升高(7.07 $\pm$ 0.65 vs 5.93 $\pm$ 0.34, $P < 0.01$)。(2)与H9c2细胞相比, D-半乳糖诱导的H9c2心肌细胞中Omi/HtrA2蛋白表达升高($P < 0.05$), 而beclin1表达下降($P < 0.01$); 给予ucf-101后, 衰老细胞中Omi/HtrA2蛋白表达明显下降($P < 0.05$), 而beclin1表达则进一步降低($P < 0.01$)。(3)与H9c2细胞相比, 过表达Omi/HtrA2的H9c2心肌细胞Omi/HtrA2蛋白表达增高, LC3-II蛋白表达也增高($P < 0.05$); 给予过表达Omi/HtrA2的H9c2心肌细胞ucf-101后, LC3-II表达下降($P < 0.05$)。**结论** 衰老心肌细胞中Omi/HtrA2的表达增加可促进心肌细胞自噬。

【关键词】衰老; Omi/HtrA2; 自噬; 心肌细胞**【中图分类号】** R331.3⁺6**【文献标识码】** A**【DOI】** 10.3724/SP.J.1264.2013.00014

Increased expression of Omi/HtrA2 promotes myocardial autophagy in aging myocardiocytes

XU Haibo¹, WANG Ke¹, DU Yunhui², BAI Kehua¹, ZHANG Suli¹, LI Xiao¹, LIU Teng¹, MA Xinliang^{1*}, LIU Huirong^{1,3*}

(1Department of Physiology and Pathophysiology, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2Department of Marine Bioengineering, Marine College, Shandong University, Weihai 264209, China; 3Department of Physiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of increased expression of Omi/HtrA2 on myocardial autophagy in aging myocardiocytes. **Methods** The rat embryonic myocardial cell line H9c2 was induced by D-galactose (8g/L) to establish aging model. Cell aging was detected by β -galactosidase staining. Cell viability was detected by CCK8 kits and lactic dehydrogenase (LDH) activity analysis. Ucf-101, a specific inhibitor of Omi/HtrA2, was used to inhibit the activity of Omi/HtrA2, and the H9c2 cells with stable transfection of Omi/HtrA2 was constructed to increase the expression of Omi/HtrA2. The expression of Omi/HtrA2, beclin1 and LC3-II were detected by Western blotting. **Results** (1) D-galactose resulted in a significant increase in positive staining to β -galactosidase in the induced cardiomyocytes than the H9c2 cells [(87.7 $\pm$ 3.60)% vs (18.3 $\pm$ 2.80)%, $P < 0.01$]. The cck8 results showed that there was no significant difference between the cells with and without D-galactose inducement ($P > 0.05$). LDH activity was increased in the induced H9c2 cells than those without (7.07 $\pm$ 0.65 vs 5.93 $\pm$ 0.36, $P < 0.01$). (2) The expression of Omi/HtrA2 was increased ($P < 0.05$), but the expression of beclin1 was decreased ($P < 0.01$) in cells induced by D-galactose, as compared with H9c2 cells. In cells treated with ucf-101, the expression of Omi/HtrA2 was significantly decreased ($P < 0.05$), but the expression of

收稿日期: 2012-09-18; 修回日期: 2012-11-21

基金项目: 国家自然科学基金(No.81270283; No.30973163); 北京市属高等学校人才强教深化计划“学校创新团队建设计划”项目(PHR201106112)

通讯作者: 刘慧荣, Tel: 010-83911830, E-mail: liuhr2000@126.com; 马新亮, Tel: 010-83911862, E-mail: xinma2006@gmail.com

beclin1 was further decreased ($P < 0.01$). (3) The expression of LC3- II was significantly increased in Omi/HtrA2-overexpressed cells, as compared with H9c2 cells ($P < 0.05$). But, ucf-101 resulted in the expression of LC3- II decreased in the Omi/HtrA2-overexpressed cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Increased expression of Omi/HtrA2 promotes autophagy in aging myocardiocytes.

【Key words】 aging; Omi/HtrA2; autophagy; cardiomyocytes

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81270283; No.30973163) and the Project for Innovation Team Construction From Higher School Talents Education and Enhancement Plan of Beijing (PHR201106112).

衰老是机体随年龄改变而发生的所有现象的集中体现。在衰老过程中,机体各组织器官的功能逐渐降低,最终导致机体死亡。因此,可以把衰老定义为机体对内、外环境改变的、年龄依赖性的易损性增加,而心脏的衰老本身可明显增加心脏疾病发生的危险,但病因还不清楚。研究表明,生理情况下,心脏存在低水平的自噬,用于维持正常的心脏结构和功能^[1];随着年龄的增长,心肌细胞内自噬功能逐渐降低^[2,3]。而在一定程度上诱导心肌细胞自噬,则可以明显改善衰老心脏功能,降低心脏衰老标志物的生成,如 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -gal)^[4]。此外,LC3- II是检测哺乳动物自噬体激活公认的生物标记物^[5,6],而Beclin1是介导自噬的特异性基因,在自噬发生时起正调控作用,是调控自噬的一个关键因子^[7]。已知Omi是大肠埃希氏杆菌热休克诱导蛋白HtrA的人类同源物,又称Omi/HtrA2,属于丝氨酸蛋白水解酶家族^[8]。已有研究发现,衰老大鼠心肌组织中Omi/HtrA2蛋白水平增加^[9],自噬水平下降^[10],然而这一现象不足以证实在衰老大鼠心肌组织中表达增加的Omi/HtrA2与心肌细胞自噬下降的因果关系。因此,本研究通过建立H9c2心肌细胞衰老模型,分别下调和上调H9c2细胞中Omi/HtrA2的水平,观察心肌细胞自噬水平,进而明确衰老心肌中增加的Omi/HtrA2与心肌细胞自噬的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

H9c2(2-1)大鼠胚胎心肌细胞系,由中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心提供。乳酸脱氢酶检测试剂盒(lactic dehydrogenase, LDH, 瑞士Roche公司); 0.05%胰酶-EDTA(美国Invitrogen公司); D-半乳糖(D-galactose, D-gal, Sigma公司); β -半乳糖苷酶染色试剂盒(β -galactosidase Assay Kit, Cell Signaling公司); 胎牛血清(杭州四季青公司); Cell Counting Kit-8 (CCK-8, 日本同仁化学公司); 丝氨酸蛋白酶Omi/HtrA2一抗(High Temperature

Requirement, Cell Signaling公司); Omi/HtrA2的特异性抑制剂ucf-101(Merck公司); β -actin一抗(β -actin, 美国Santa Cruz公司); beclin1一抗(Cell Signaling公司); LC3- II一抗(Cell Signaling公司); 山羊抗兔IgG/生物素标记、辣根酶标记链亲合素(北京中杉金桥公司); ChemiScope Mini系列化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 按照预实验结果选择各药物相应剂量和时间,将H9c2心肌细胞消化后得到的单细胞悬液,调节细胞密度至($5 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$ 个/ml)后,接种于6孔板中。实验分组:(1)H9c2心肌细胞对照组;(2)D-半乳糖干预衰老组:D-半乳糖(8g/L)诱导H9c2心肌细胞衰老组;(3)ucf-101组: 10^{-5} mol/L ucf-101作用组^[11];(4)H9c2心肌细胞Omi/HtrA2过表达组:利用慢病毒载体转染使H9c2细胞过表达Omi/HtrA2;H9c2诱导衰老实验处理时间为5d,其余指标为72h,各处理组n值均为6。

1.2.2 β -半乳糖苷酶染色 β -半乳糖苷酶染色参考试剂盒说明书操作步骤,光学显微镜下观察H9c2细胞的染色情况,并计算 β -半乳糖苷酶阳性细胞的个数。

1.2.3 cck-8法检测H9c2存活率 将H9c2细胞以每孔 5×10^3 个接种于96孔培养板,待生长至单层融合后,加用不同药物处理72h。更换新鲜的培养基后,每孔加入cck-8试剂10 μ l,继续培养4h;用酶标仪测定450nm波长各孔吸光度(OD)值。细胞存活率=处理组细胞OD值/正常对照组细胞OD值 $\times 100\%$ 。

1.2.4 LDH活性测定 将H9c2细胞以每孔 3×10^4 个接种于24孔培养板,待生长至80%~90%融合后,加用不同药物处理72h。吸取上清液,参照Korzeniewski等^[12]的方法,用分光光度计测定各孔OD值,计算LDH活性。

1.2.5 Western blot检测Omi/HtrA2、beclin1和LC3- II表达 将H9c2细胞以每孔 10^5 个接种于6孔培养板,待生长至80%~90%融合后,加用不同药物处理72h。加

入细胞裂解液冰上裂解15min, 12000r/min离心10min, 收集细胞裂解物, BCA法蛋白定量。取各组样品蛋白100 μ g进行SDS-PAGE电泳, 然后电转移至硝酸纤维素膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭1h; 用含Tween-20的Tris缓冲盐溶液(TBST)洗膜10min $\times$ 3次; 分别加以下一抗: Omi/HtrA2 (1:1000稀释)、beclin1 (1:1000稀释)、LC3-II (1:1000稀释)、 β -actin (1:1000稀释) 4 $^{\circ}$ C过夜; TBST洗膜10min $\times$ 3次, 再与生物素标记的二抗孵育1h, TBST洗膜10min $\times$ 3次, 与辣根酶标记链霉卵白素孵育1h, TBST洗膜10min $\times$ 3次, ChemiScope发光成像。

1.3 统计学处理

数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用SPSS13.0软件进行统计学分析, 多组间比较单因素方差分析(one-way ANOVA), 两组之间采用t检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建立衰老H9c2心肌细胞模型

2.1.1 H9c2心肌细胞衰老模型鉴定 各组细胞分别进行 β -半乳糖苷酶染色, 结果显示: 与H9c2心肌细胞对照组比较, D-半乳糖干预衰老组 β -半乳糖苷酶染色阳性率显著升高[(87.7% $\pm$ 3.6%) vs (18.3% $\pm$ 2.8%), $P<0.01$; 图1]。

2.1.2 D-半乳糖对H9c2心肌细胞存活率和LDH活性的影响 cck8和LDH检测结果显示: 与H9c2心肌细胞对照组比较, D-半乳糖干预衰老组细胞存活率略有上升, 与H9c2心肌细胞对照组相比差异无统计学意义[(116.58% $\pm$ 12.95%) vs (100.00% $\pm$ 6.81%); $P>0.05$], 但LDH活性则显著升高[(7.07 $\pm$ 0.65) vs (5.93 $\pm$ 0.34), $P<0.01$]。

2.2 衰老H9c2心肌细胞Omi/HtrA2表达增加, beclin1表达下降

利用Western blot方法测定细胞中Omi/HtrA2和beclin1蛋白的表达, 结果显示: 与H9c2心肌细胞相比, 衰老的H9c2心肌细胞Omi/HtrA2表达显著升高, 而beclin1表达下降($P<0.05$; 图2)。给予Omi/HtrA2特异性抑制剂ucf-101之后, 与衰老H9c2细胞比较, beclin1表达进一步下降, 差异有统计学意义($P<0.05$; 图2)。

2.3 H9c2细胞过表达Omi/HtrA2, 自噬水平上升

利用western blot方法测定细胞中Omi/HtrA2和

LC3-II蛋白的表达, 结果显示: 与H9c2心肌细胞相比, 慢病毒稳转H9c2细胞中Omi/HtrA2及LC3-II蛋白水平均显著升高($P<0.05$; 图3); 给予ucf-101抑制Omi/HtrA2后, LC3-II蛋白表达下降, 两组相比, 差异具有统计学意义($P<0.05$; 图3)。

3 讨论

衰老是一系列复杂生理及病理生理变化的过程, 心脏衰老是心血管系统及其它器官衰老相关变化的集中体现, 随着衰老的进程, 这些病理改变均是各种衰老心脏疾病的病理基础。已有文献报道, 细胞自噬水平下调是衰老心脏功能下降的重要原因, 当自噬缺陷或自噬下降时, 细胞通过自噬降解消化受损、变性、衰老和失去功能的细胞、细胞器和变性生物大分子的能力下降, 因此不能维持正常的心脏结构和功能^[1]。而在很多病理情况下, 都有明显的自噬活动的增加, 过多的自噬导致心肌细胞发生自噬性细胞死亡, 加重心脏的损伤^[10,13,14]。Beclin1基因也称BECN1基因, 是酵母ATG6的同系物, 也是哺乳动物参与自噬的特异性基因, 而上调beclin1蛋白在哺乳动物细胞中的表达能够刺激自噬的发生^[7,15]。目前所知丝氨酸蛋白酶Omi

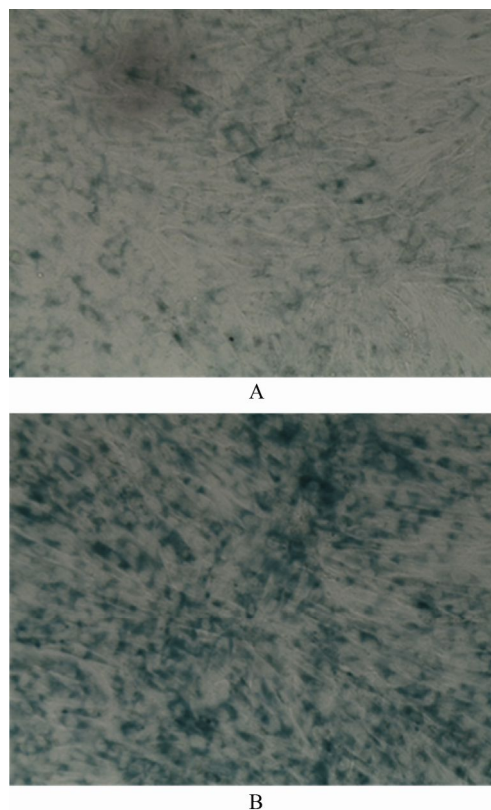


图1 H9c2心肌细胞 β -半乳糖苷酶染色鉴定结果
Figure 1 β -galactosidase staining of H9c2 myocardiocytes ($\times 100$)
A: H9c2心肌细胞对照组; B: D-半乳糖干预衰老组

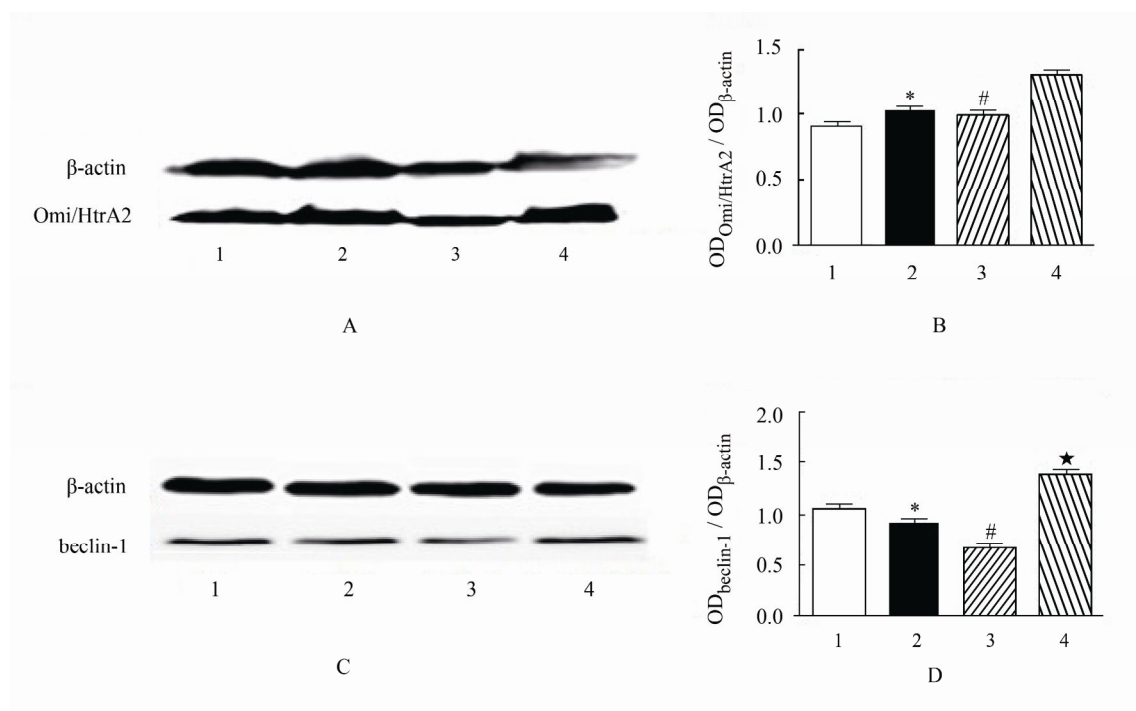


图2 Omi/HtrA2和beclin1在H9c2心肌细胞中的表达

Figure 2 Expression of Omi/HtrA2 and beclin1 in H9c2 myocardiocytes

1: 对照组; 2: D-半乳糖干预衰老组; 3: ucf-101组; 4: Omi/HtrA2过表达组; A, C: Western blot结果; B, D: 灰度扫描分析结果。与对照组比较, * $P<0.05$; 与D-半乳糖干预衰老组比较, # $P<0.05$

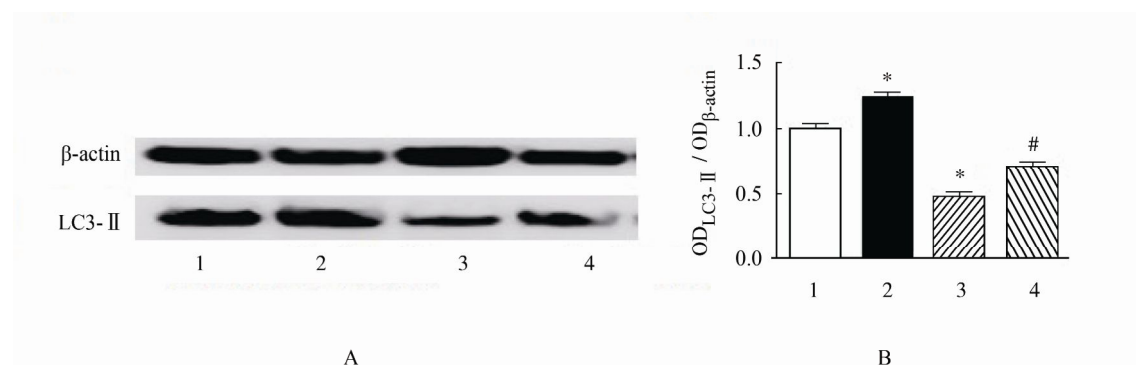


图3 LC3-II 在过表达Omi/HtrA2正常H9c2心肌细胞中的表达

Figure 3 Expression of LC3-II in over expressed Omi/HtrA2 H9c2 myocardiocytes

1: 对照组; 2: Omi/HtrA2过表达组; 3: ucf-101作用的对照组; 4: ucf-101作用的Omi/HtrA2过表达组; A: Western blot结果; B: 灰度扫描分析结果。与对照组比较, * $P<0.05$; 与Omi/HtrA2过表达组比较, # $P<0.05$

(又称HtrA2)是一个主要定位于真核生物线粒体的丝氨酸蛋白酶,隶属于HtrA(High Temperature Requirement)家族,具有修复、降解线粒体中折叠错误的蛋白质的作用^[8]。研究发现Omi/HtrA2功能缺失动物表现出剧烈的神经退行性病变症状^[16],与自噬基因(Atg5/Atg7)神经元条件性敲除的小鼠的性状有高度的相似。本研究结果显示:与H9c2心肌细胞对照组比较,D-半乳糖干预衰老组 β -半乳糖苷酶染色阳性率显著升高,表明衰老细胞模型建立成功。与H9c2心肌细

胞比较,D-半乳糖干预衰老组细胞中Omi/HtrA2蛋白表达增高,beclin1表达下降,这与文献报道的结果一致;但给予D-半乳糖干预衰老组细胞Omi/HtrA2的特异性抑制剂ucf-101后,衰老细胞中Omi/HtrA2蛋白表达明显下降,而beclin1表达进一步下降。但beclin1表达进一步下降的机制并不十分清楚,可能原因是自噬水平下降,或Omi/HtrA2蛋白表达下降^[17]。

目前已知LC3是哺乳动物细胞中酵母ATG8(Aut7/Apg8)基因的同源物,定位于前自噬泡和自

噬泡膜表面,参与自噬体的形成。LC3有两种分子存在形式,即LC3-I和LC3-II。未发生自噬时,细胞内合成的LC3经过加工,成为胞质可溶性的I型LC3,常规表达。当自体吞噬发生时,I型LC3经泛素样加工修饰过程,与自噬膜表面的磷脂酰乙醇胺结合,形成II型。LC3-II始终位于自噬体膜上,使之成为自噬体的标志分子,当自噬体与溶酶体融合,自噬体内的LC3-II即被溶酶体中的水解酶降解。因此,LC3-II含量的多少与自噬泡数量的多少成正比,是细胞自噬体膜的通用标记物^[18]。在免疫印记试验中,LC3-II较LC3-I更加敏感。因此LC3-II与 β -actin的比值被认为是自噬的精确指标^[6]。研究发现Omi/HtrA2在胚胎成纤维细胞及非神经组织自噬的调控过程中发挥了重要的作用,Omi/HtrA2可以促进细胞自噬的发生^[17,19]。本研究结果显示:与H9c2心肌细胞比较,慢病毒稳转H9c2细胞中Omi/HtrA2表达升高,LC3-II表达升高,即自噬水平升高;给予Omi/HtrA2的特异性抑制剂ucf-101后,LC3-II蛋白表达下降,自噬水平下降,直接证实Omi/HtrA2促进了H9c2心肌细胞自噬。

综上所述,在衰老心肌细胞中Omi/HtrA2表达增加,自噬水平下降;给予Omi/HtrA2的特异性抑制剂ucf-101后,衰老心肌细胞自噬水平进一步下降;H9c2心肌细胞过表达Omi/HtrA2,自噬水平上升,给予Omi/HtrA2的特异性抑制剂ucf-101后,自噬水平下降。以上提示衰老心肌中增加的Omi/HtrA2对细胞自噬具有促进作用。这将加深对衰老心肌细胞自噬机制的理解,延缓心肌衰老提供新的实验依据。

【参考文献】

- [1] De Meyer GRY, Martinet W. Autophagy in the cardiovascular system[J]. *Biochem Biophys Acta*, 2009, 1793(9): 1485-1495.
- [2] Terman A, Brunk UT. Autophagy in cardiac myocyte homeostasis aging, and pathology[J]. *Cardiovas Res*, 2005, 68(3): 355-365.
- [3] Cuervo A M. Autophagy and aging: keeping that old broom working[J]. *Trends Genet*, 2008, 24(12): 604-612.
- [4] Inuzuka Y, Okuda J, Kawashima T, *et al*. Suppression of phosphoinositide 3-kinase prevents cardiac aging in mice[J]. *Circulation*, 2009, 120(17): 1695-1703.
- [5] Mizushima N. Methods for monitoring autophagy[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12): 2491-2502.
- [6] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, *et al*. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing[J]. *EMBO*, 2000, 19(21): 5720-5728.
- [7] Liang XH, Jackson S, Seaman M, *et al*. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1[J]. *Nature*, 1999, 402(6762): 672-676.
- [8] Vande Walle L, Lamkanfi M, Vandenabeele P, *et al*. The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview[J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(3): 453-460.
- [9] Wang K, Zhang J, Liu J, *et al*. Variations in the protein level of Omi/HtrA2 in the heart of aged rats may contribute to the increased susceptibility of cardiomyocytes to ischemia/reperfusion injury and cell death: Omi/HtrA2 and aged heart injury[J]. *Age*, 2012, 10. 1007/s11357-012-9406-x.
- [10] De Meyer GR, De Keulenaer GW, Martinet W. Role of autophagy in heart failure associated with aging[J]. *Heart Fail Rev*, 2010, 15(5): 423-430.
- [11] Liu Q, Liu L, Lu Y, *et al*. The induction of reactive oxygen species and loss of mitochondrial Omi/HtrA2 is associated with S-nitrosoglutathione-induced apoptosis in human endothelial cells[J]. *Toxicol Applied Pharmacol*, 2010, 224(3): 374-384.
- [12] Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity[J]. *Imm Methods*, 1983, 64(3): 313-320.
- [13] Xiao R, Teng M, Zhang Q, *et al*. Myocardial autophagy after severe burn in rats[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39488.
- [14] Rifki OF, Hill JA. Cardiac autophagy: good with the bad[J]. *Cardiovasc Pharmacol*, 2012, 60(3): 248-252.
- [15] Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, *et al*. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network[J]. *EMBO*, 2001, 2(4): 330-335.
- [16] Hara T, Nakamura K, Matsui M, *et al*. Suppression of basal autophagy in neural cells cause neuro-degenerative disease in mice[J]. *Nature*, 2006, 441(7095): 885-889.
- [17] Li B, Hu Q, Wang H, *et al*. Omi/HtrA2 is a positive regulator of autophagy that facilitates the degradation of mutant proteins involved in neurodegenerative disease[J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(11): 1773-1784.
- [18] Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict[J]? *Clin Invest* 2005, 115(10): 2679-2688.
- [19] Kang S, Louboutin JP, Datta P, *et al*. Loss of HtrA2/Omi activity in non-neuronal tissues of adult mice causes premature aging[J]. *Cell Death Differ*, 2012, 10.1038/cdd. 2012. 117.

(编辑:王雪萍)