

重组 *nkx2.5* 腺病毒抑制过氧化氢诱导的 H9c2 细胞凋亡

李涛¹, 姜科声¹, 阮琴², 刘志强³

1 浙江师范大学 化学与生命科学学院, 浙江 金华 321004

2 浙江师范大学 行知学院, 浙江 金华 321004

3 Department of Lymphoma and Myeloma, Division of Cancer Medicine, Center for Cancer Immunology Research, the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas 77030, USA

李涛, 姜科声, 阮琴, 等. 重组 *nkx2.5* 腺病毒抑制过氧化氢诱导的 H9c2 细胞凋亡. 生物工程学报, 2012, 28(10): 1253–1264.
Li T, Jiang KS, Ruan Q, et al. Recombinant adenovirus overexpressing *nkx2.5* protects H9c2 cells against H₂O₂-induced apoptosis. Chin J Biotech, 2012, 28(10): 1253–1264.

摘要: 为研究心脏发育关键基因 *nkx2.5* 的功能及应用价值, 构建 Ad-Nkx2.5 重组腺病毒, 并检测 *nkx2.5* 过表达拮抗氧化应激损伤的效应及机制。采用 AdEasy 腺病毒表达系统构建 Ad-Nkx2.5 重组腺病毒, 建立 H₂O₂ 诱导 H9c2 心肌细胞凋亡模型, 分别用 Ad-Nkx2.5 重组病毒或对照病毒感染细胞, 采用 Hoechst33342 染色观察细胞形态变化、MTT 法检测细胞存活率, 免疫印迹检测 caspase-3 活化、细胞色素 C 的胞浆含量。并通过 Real-time PCR 检测凋亡相关基因 *bcl-2* 和 *bax* 表达。结果发现, *nkx2.5* 过表达促进 H9c2 细胞存活, 抑制 H₂O₂ 诱导的 caspase-3 活化及线粒体细胞色素 C 的释放。Nkx2.5 过表达上调 *bcl-2* 表达, 显著下调 H₂O₂ 诱导的 *bax* 表达。并发现 H₂O₂ 对 Nkx2.5 核定位无明显影响。结果显示重组腺病毒介导的 Nkx2.5 过表达可通过调控凋亡相关基因表达, 抑制线粒体凋亡途径, 保护心肌细胞抗氧化损伤。

关键词: Nkx2.5, 重组腺病毒, 过氧化氢, 氧化应激, H9c2 细胞, 凋亡

Received: April 1, 2012; **Accepted:** June 8, 2012

Supported by: National Natural Sciences Foundation of China (No. 31101057), Youth Foundation of Zhejiang Normal University (No. KYJ06Y10191).

Corresponding author: Tao Li. Tel/ Fax: +86-579-82282269; E-mail: litao@zjnu.cn

国家自然科学基金 (No. 31101057), 浙江师范大学青年基金 (No. KYJ06Y10191) 资助。

Recombinant adenovirus overexpressing *nkx2.5* protects H9c2 cells against H₂O₂-induced apoptosis

Tao Li¹, Kesheng Jiang¹, Qin Ruan², and Zhiqiang Liu³

¹ Chemistry and Life Science College, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China

² Xingzhi College, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China

³ Department of Lymphoma and Myeloma, Division of Cancer Medicine, Center for Cancer Immunology Research, the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas 77030, USA

Abstract: To study the function and potential application of *nkx2.5*, a critical gene for heart development, we constructed a recombinant adenovirus overexpressing *nkx2.5* gene (Ad-Nkx2.5) with the AdEasy system. To evaluate the effect and mechanism of Ad-Nkx2.5 against oxidative injury, the H9c2 myocardial cells were infected with the recombinant adenoviruses Ad-Nkx2.5 or Ad-EGFP, and subsequently exposed to H₂O₂ to induce apoptosis. The anti-apoptotic potential of Ad-Nkx2.5 was validated by MTT assay for cell viability, Hoechst33342 staining for cellular morphology, and immunoblotting for caspase-3 activity. Ad-Nkx2.5 infection led to an increased survival rate of H9c2 cells and decreased the amount of caspase-3 in an active form. Additionally, overexpression of *Nkx2.5* inhibited the release of cytochrome C from the mitochondria into the cytosol. Mechanistic studies showed that *Nkx2.5* upregulated *bcl-2* gene expression and significantly repressed H₂O₂-induced expression of *bax* detected by Real-time PCR. Additionally, H₂O₂ treatment did not affect the nuclear localization of *Nkx2.5*. These findings indicate that adenovirus-mediated *nkx2.5* gene transfer exerted a protective effect on H9c2 cells against H₂O₂-induced apoptosis via mitochondrial pathway, and the *Nkx2.5*-mediated expression modulation of apoptosis-associated genes could be involved in this event.

Keywords: *Nkx2.5*, recombinant adenovirus, hydrogen peroxide, oxidative stress, H9c2 cells, apoptosis

转录因子 *Nkx2.5* 是关键的心肌发育调控因子,能够激活大量心肌特异性功能基因表达,参与心脏前体细胞的增殖、心脏的环化、房室分隔、房室流出道和传导系统的形成及成熟心脏正常功能的维持^[1-2]。*nkx2.5* 突变或表达异常将导致严重的心脏发育异常^[3]。*Nkx2.5* 另一重要功能为维持心肌细胞存活,抗缺血及凋亡^[4-6]。研究发现野生型 *nkx2.5* 能够稳定乳鼠心肌细胞内稳态、拮抗过氧化氢和阿霉素引发的凋亡。当注射阿霉素以后,失活型 *nkx2.5* 的转基因小鼠出现严重的心脏功能异常,发生凋亡的心肌细胞明显增多;野生型 *nkx2.5* 基因转染后,能减轻阿霉素诱导的心肌损伤。

心肌缺血及再灌注过程中会产生大量氧自由基,造成心肌不可逆性的凋亡或坏死,并进一步演化为心力衰竭^[7]。目前,正在探索通过干细胞移植治疗梗死性心脏病^[8]。体外干细胞转入 *nkx2.5* 基因不仅有利于其特异性的向心肌诱导分化,也有利于提高移植细胞的存活率,改善心肌细胞功能^[6]。*nkx2.5* 有望成为心肌梗死等疾病的基因治疗分子。

但是 *Nkx2.5* 拮抗心肌细胞凋亡的机制依然并不十分明确。本课题通过构建 *Nkx2.5* 过表达的重组腺病毒,包装病毒感染 H9c2 大鼠心肌细胞,并通过过氧化氢诱导凋亡模型,进一步研究阐释 *Nkx2.5* 拮抗心肌凋亡的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

pFLAG-Nkx2.5 质粒由 Harvey RP 教授 (Victor Chang Cardiac Research Institute, Sydney, Australia) 惠赠。腺病毒穿梭质粒 pAdTrackcmv、骨架质粒 pAdEasy-1、JM109 及 BJ5183 菌、HeLa 及 H9c2 细胞均为本实验室保存。Pme I 及 Pac I (NEB), Lipofectamine 2000 (Invitrogen), 质粒大量提取试剂盒 (Vigorous)。MMLV 反转录酶、T4 DNA 连接酶、T4 多聚核苷酸激酶 (PNK) 均购自 Promega 公司; Taq DNA 聚合酶和限制性内切酶购自 New England Biolabs 公司; 蛋白酶 K 和 DNA marker 购自北京 TIANGEN 公司; Hoechst33342 和 G418 购自 Sigma 公司。抗 Nkx2.5、细胞色素 C、GAPDH 抗体购自 Santa Cruz 公司, 抗 caspase-3 抗体购自 Cell signaling 公司。[γ -³²P] ATP 购自北京亚辉生物医学工程公司。

1.2 质粒构建及腺病毒包装鉴定

腺病毒质粒构建及包装方法按文献报道^[9]。将 pFLAG-Nkx2.5 和腺病毒穿梭质粒 pAdtrackcmv 用 Bgl II 和 Sal I 进行大量双酶切, 建立 Nkx2.5、pAdtrackcmv 定向连接反应体系。重组 pAdtrackcmv-Nkx2.5 质粒经 Pme I 线性化后热休克转化含腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态菌进行同源重组、卡那霉素筛选。经 Pac I 酶切鉴定正确重组的 pAd-Nkx2.5 腺病毒质粒。pAd-Nkx2.5 质粒 DNA 经 Pac I 酶切线性化后, 按照 Lipofectamine 2000 说明书, 转入 293A 细胞中进行病毒包装, 倒置荧光显微镜下观察病毒噬斑的变化。待 14 d 后所有细胞感染病

毒, 变圆漂浮后, 离心收集细胞, PBS 漂洗后液氮反复冻融细胞 3 次, 1000 r/min 离心 10 min 后收集上清。倍比稀释后感染 293A 细胞, 24 h 后荧光显微镜观察, 按公式: 发荧光细胞数×稀释度/病毒液体积计算病毒滴度。对照空病毒为既往保存。

采用 PCR 法构建 pEGFP-Nkx2.5 质粒, 使用引物如下: forward primer: 5'-GCCGAATTCATGTTCCCCAGCCCTG-3', reverse primer: 5'-TAGGATCCCAAGGCTCGGATGCCGTGC-3'。扩增片段插入 pEGFP-N1 质粒, 测序正确后大提纯化。瞬转 H9c2 细胞后, 加入 G418 (400 mg/L) 筛选稳定克隆。

1.3 Western blotting 检测蛋白表达

HeLa 细胞或 H9c2 细胞接种于 6 孔板上, 培养过夜后分别加入不同感染复数 (Multiplicity of infection, MOI) 的病毒液。经不同处理后弃培养液, 提取蛋白, BCA 法蛋白定量。30 μ g 蛋白煮沸后, 12% SDS-PAGE 电泳转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后加入抗 Nkx2.5、caspase-3、细胞色素 C (Cytochrome C) 或 GAPDH 抗体进行杂交, 漂洗后辣根过氧化物酶标记的二抗孵育, 化学发光法进行显色反应。

1.4 凝胶阻滞 (EMSA) 检测 Nkx2.5 表达

按文献方法提取 HeLa 细胞核蛋白, 建立体外反应体系^[10]。北京奥科公司合成 Nkx2.5 特异识别的双链探针, 正链序列如下: 5'-TCTTCTCACACCTTTGAAGTGGGGCCTCT-3'。T4 多聚核苷酸激酶对探针进行末端 ³²P 标记。在每组反应混合物中, 核蛋白用量为 10 μ g, 用 6% 的非变性 PAGE 胶电泳, 放射自显影显示 Nkx2.5 蛋白与探

针 DNA 结合条带。

1.5 噻唑蓝 (MTT) 法检测 H9c2 相对活力

将 H9c2 细胞以 1×10^5 /孔接种至 96 孔板, 以含 100 mL/L 胎牛血清, 100 U/mL 氨苄青霉素和 100 mg/L 链霉素的改良 DMEM 培养基培养。加入不同 MOI 的重组病毒感染细胞, 24 h 后加入 H_2O_2 至终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 诱导细胞, 于作用后 0、1、2、3、4、6、8、10 和 12 h 加入 10% 5 g/L MTT。37 $^\circ\text{C}$ 孵育 4 h 后, 终止培养, 弃去孔内培养液。每孔加入 150 μL DMSO, 低速振荡 10 min, 使结晶充分溶解。在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔吸光值 (OD)。按下列公式计算细胞存活率: 细胞存活率 (%) = H_2O_2 处理组 OD 值/非处理组 OD 值 $\times 100\%$ 。每组设 4 个复孔, 实验重复 3 次。 H_2O_2 处理组与对照组相比, 用配对 *t* 检验进行统计分析。

1.6 Hoechst33342 染色及荧光观察

H9c2 细胞加入终浓度为 1 mg/L 的 Hoechst33342 避光染色 30 min, PBS 漂洗 3 次, 细胞继续培养并进行下一步 H_2O_2 处理。 H_2O_2 处理 6 h 后在倒置荧光显微镜下观察各组细胞核形态变化, 并结合 EGFP 染色观察细胞形态变化, 拍照。

1.7 DNA ladder 法检测 DNA 片段化

参照文献进行^[11], 简述如下。 1×10^7 个 H9c2 细胞接种至培养皿中, 以 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 诱导细胞。作用 12 h 收集全部细胞 (贴壁和非贴壁), 以细胞裂解液裂解细胞。0.1 g/L RNase A 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 h, 0.2 g/L 蛋白酶 K 56 $^\circ\text{C}$ 孵育 3 h。以酚/氯仿法抽提基因组 DNA 后溶解于 TE 缓冲液中,

1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

1.8 线粒体提取与细胞色素 C 检测

线粒体提取采用 Pierce 公司试剂盒 (Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells, 89874), 简述如下。H9c2 细胞 (1×10^7) 经 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 6 h 后, 离心收集所有细胞。加入 400 μL buffer A, 涡旋振荡 5 s, 冰浴 2 min, 加入 5 μL buffer B 振荡, 冰浴 5 min。加入 400 μL buffer C 颠倒混匀, 700 \times g 低温离心 10 min, 取上清。12 000 \times g 低温离心 15 min, 取上清即为胞浆蛋白。再将沉淀加入 250 μL 缓冲液 C 漂洗, 12 000 \times g 离心 5 min, 取沉淀即为线粒体, 沉淀加入蛋白裂解液裂解得线粒体蛋白。BCA 法测定各组分的蛋白浓度, Western blotting 检测细胞色素 c 的含量。

1.9 Real-time PCR 及 RT-PCR

参照文献进行 Real-time PCR^[12]。H9c2 细胞经 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 6 h 后, 收集所有细胞。按 Trizol 法提取细胞总 RNA, 随机引物法逆转录合成 cDNA 第一条链。采用 TOYOBO 公司的 SYBR Green Real-time PCR Master Mix 在 ABI7700 型定量 PCR 仪上进行 PCR 反应。测定样品的 Ct 值 (Cycle threshold, 循环阈值) 通过计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来比较不同样品之间特定基因的表达差异。每个样本组均设定 3 个平行复孔, 实验至少重复 3 次, 以平均值 \pm 标准差的形式在柱状图中显示。RT-PCR 在 T-gradientTM PCR 仪 (Biometra) 进行, 引物退火温度为 58 $^\circ\text{C}$, 循环数 25~30。用于 Real-time PCR 及 RT-PCR 的引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 及 RT-PCR 使用引物

Table 1 Primer sequences for Real-time PCR and RT-PCR

Methods	Genes		Primer sequences (5'-3')	Products (bp)
Real-time PCR	<i>gapdh</i>	Forward	GTGGACCTCATGGCCTACAT	148
		Reverse	TGTGAGGGAGATGCTCAGTG	
	<i>bcl-2</i>	Forward	GGGATGCCTTTGTGGAACTA	138
		Reverse	CTCACTTGTGGCCAGGTAT	
	<i>bax</i>	Forward	TGCAGAGGATGATTGCTGAC	173
		Reverse	GATCAGCTCGGGCACTTTAG	
RT-PCR	<i>nkx2.5</i>	Forward	AGCAACTTCGTGAACTTTG	344
		Reverse	CCGGTCCTAGTGTGGA	
	<i>gapdh</i>	Forward	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	394
		Reverse	AGGGGAGATTCAGTGTGGTG	

1.10 统计方法

数据以均值±标准差表示, 采用 SPSS13.0 统计软件进行 *t* 检验和单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示有显著性差异, $P < 0.01$ 表示有非常显著性差异。

2 结果与分析

2.1 重组 *Nkx2.5* 腺病毒质粒的构建及鉴定

pFLAG-*Nkx2.5* 质粒经 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切后, 释放约 1.1 kb 的 *nkx2.5* 表达片段, 再连入双酶切的 pAdtrackcmv 骨架质粒, 克隆成功后酶切鉴定结果如图 1A 所示。pAdtrackcmv-*Nkx2.5* 质粒经 *Pme* I 线性化, 转入事先转入腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 的 BJ5183 菌, 进行同源重组, 经卡那霉素筛选, 重组克隆经 *Pac* I 酶切鉴定。正确重组的质粒约 33 kb, 可切出约 30 kb 的片段及一个 3.0 或 4.5 kb 大小的片段。结果如图 1B 所示, 可以发现重组体可切出一个 4.5 kb 大小的片段, pAd-*Nkx2.5* 重组成功。

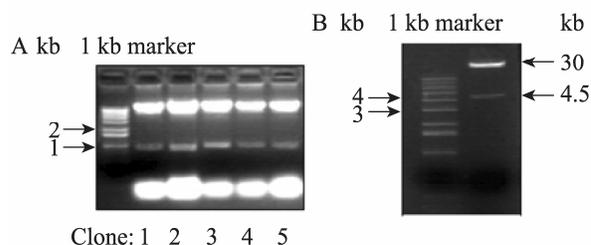
图 1 pAd-*Nkx2.5* 质粒的构建及鉴定

Fig.1 Construction and identification of pAd-*Nkx2.5* plasmid. (A) Identification of pAdtrackcmv-*Nkx2.5* plasmid by *Bgl* II and *Sal* I digestion. (B) Identification of pAd-*Nkx2.5* plasmid by *Pac* I digestion.

2.2 重组 *Nkx2.5* 腺病毒的包装及鉴定

将经过 *Pac* I 线性化的 pAd-*Nkx2.5* 质粒转染 293A 细胞进行包装。荧光显微镜观察病毒噬斑, 2 d 起逐步出现噬斑, 14 d 左右有大量的病毒噬斑形成 (图 2A), 细胞大量表达 EGFP, 形态变圆并且呈漂浮状态。收获细胞裂解释放病毒, 倍比稀释法测定病毒滴度, 重组 Ad-*Nkx2.5* 滴度为 5×10^{11} efu/mL (efu: expression-forming units)。按

MOI=100 感染 HeLa 细胞。并提取 RNA 进行 RT-PCR 检测 *nkx2.5* 表达,并通过 Western blotting 检测蛋白表达。结果如图 2B 和 C 所示,感染 Ad-Nkx2.5 的 HeLa 细胞存在 Nkx2.5 的 mRNA 及蛋白表达,而感染对照病毒的细胞未检测到 Nkx2.5 表达。为了鉴定腺病毒载体表达的 Nkx2.5 蛋白是否具备完整的蛋白功能,又进行了 EMSA 实验。通过合成 Nkx2.5 特异结合的 DNA 探针(含保守结合序列 TNNAGTG),体外同位素标记后与感染病毒后提前的细胞核蛋白孵育,非变性 PAGE 分离后压片曝光。结果如图 2D 所示,感染 Ad-Nkx2.5 的 HeLa 细胞核蛋白能够与 DNA 探针结合,而对照病毒组无特异条带。这表明重组腺病毒所表达的 Nkx2.5 蛋白具有正常的 DNA 结合能力。

2.3 Nkx2.5 过表达保护 H9c2 细胞抗氧化损伤

Nkx2.5 是重要的心肌调控转录因子。为了进一步研究 Nkx2.5 的分子功能,我们运用

Ad-Nkx2.5 腺病毒感染大鼠心肌细胞系 H9c2 细胞,检测 *nkx2.5* 过表达对 H9c2 细胞凋亡的影响。H9c2 细胞是来源于大鼠心室肌的心肌细胞系,在 H_2O_2 等氧化刺激下能表现出典型的凋亡特征。H9c2 细胞分别感染不同滴度 Nkx2.5 腺病毒(MOI 分别为 0、25、50、100), $200 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理细胞后通过 MTT 法检测细胞活力。结果显示如图 3A 所示,随着 Nkx2.5 腺病毒滴度增高,显著提高了细胞存活率。其中 H_2O_2 诱导 12 h 后,Ad-Nkx2.5 最高剂量组(MOI=100)细胞损失率为 24.6%,Ad-Nkx2.5 最低剂量组(MOI=0)细胞损失率则达 83.9% ($P<0.01$, $n=4$)。因此,后续实验均选择 MOI=100 的 Ad-Nkx2.5 病毒作为感染浓度。并以 Ad-EGFP 感染组为对照,其 H_2O_2 诱导 12 h 后细胞存活率为 21.3%,而 Ad-Nkx2.5 组细胞存活率为 72.9% ($P<0.01$, $n=4$) (图 3B)。结果提示 Nkx2.5 过表达可以保护 H9c2 细胞拮抗 H_2O_2 诱导的氧化损伤。

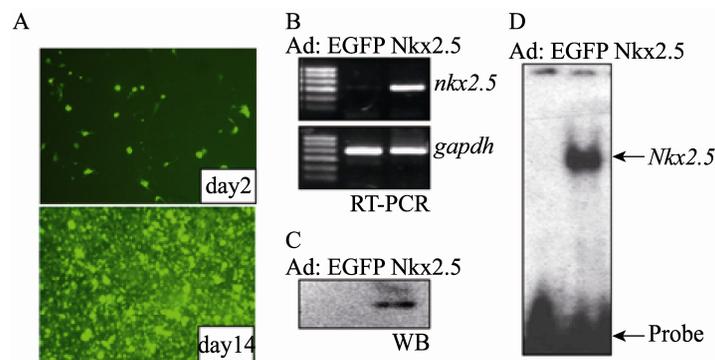


图 2 重组 Nkx2.5 腺病毒的包装及鉴定

Fig. 2 Packaging and identification of recombinant adenovirus overexpressing Nkx2.5. (A) Adenovirus plaque was monitored by fluorescence microscopy (100 \times). (B, C) Identification of Nkx2.5 expression in HeLa cells by RT-PCR (B) and Western blotting (C). (D) Overexpressed Nkx2.5 from HeLa cells infected with Ad-Nkx2.5 bound with specific DNA probes in EMSA assay.

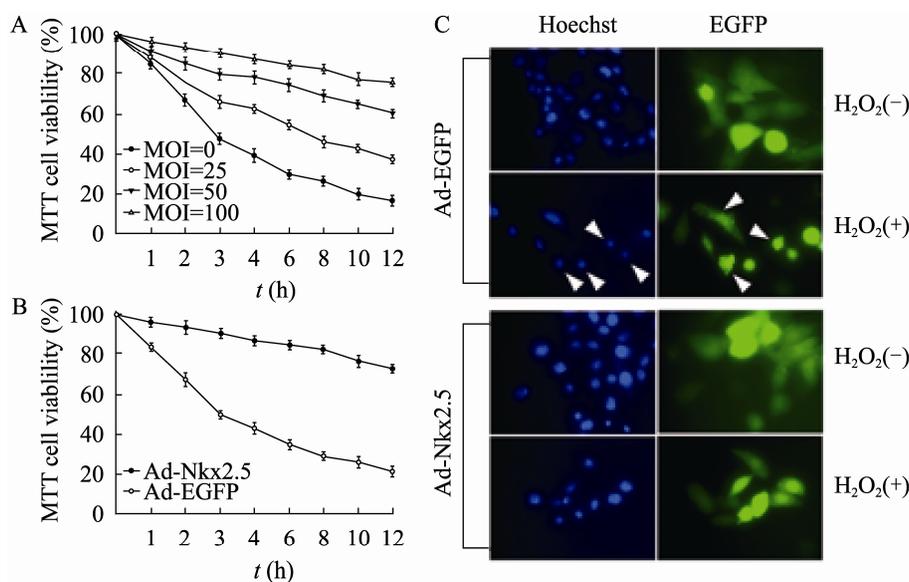


图3 Nkx2.5 过表达保护 H9c2 细胞抗氧化损伤

Fig. 3 Overexpression of Nkx2.5 protects H9c2 cells against H₂O₂-induced oxidative injury. (A) H9c2 cell viability was evaluated by MTT assay after Ad-Nkx2.5 infection and subsequently H₂O₂ (200 μmol/L) treatment. (B) Comparisons of cell viability between Ad-Nkx2.5 and Ad-EGFP groups. (C) Morphological changes were examined in H9c2 cells treated with H₂O₂ (200 μmol/L) for 6 h. Arrows indicated typical apoptotic change, including cell shrinkage, blebbing, nuclear condensation and fragmentation (400×).

Ad-Easy 腺病毒系统自带 *EGFP* 基因, 细胞形态结构会被绿色荧光显色, 同时采用 Hoechst33342 对细胞核荧光染色, 即可对细胞凋亡时形态变化进行检测。结果可见, Ad-EGFP 感染组在 H₂O₂ 处理 6 h 后, 即出现典型的凋亡表现: 细胞皱缩变圆, 细胞间连接消失, 部分细胞发生脱落飘浮, 细胞表面出现发芽起泡等形式的球形突起 (即凋亡小体), 核皱缩变小, 密度增加, 并发生浓缩碎裂 (图 3C)。随着时间推延, 绿色荧光逐步消失, 细胞崩解。而 Ad-Nkx2.5 感染组细胞形态及核形态大部分呈现正常状态, 说明 Nkx2.5 过表达可抑制 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞凋亡。

2.4 Nkx2.5 过表达拮抗线粒体凋亡途径

细胞凋亡有 3 种途径: 线粒体途径, 死亡受体途径和内质网途径。一般认为 H₂O₂ 所介导的氧化损伤激活线粒体凋亡途径。我们进一步验证 Ad-Nkx2.5 腺病毒感染拮抗 H₂O₂ 所介导的 H9c2 细胞凋亡的相关机制。利用 DNA ladder 实验分析发现, H₂O₂ 诱导对照组细胞发生 DNA 片段化降解, 形成以单个核小体和寡聚核小体为基础的梯形 DNA 条带, 间距大小约为 180~200 bp, 为典型的凋亡特征 (图 4A)。而感染 Ad-Nkx2.5 腺病毒的细胞未发现明显 DNA ladder 条带, 表明 Nkx2.5 能够抑制 H₂O₂ 诱导细胞凋亡 (图 4A)。caspase-3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切

酶, 无活性的 procaspase-3 以酶原 (32 kDa) 的形式存在于胞浆中, 凋亡时切割为分子量分别为 17 kDa 和 12 kDa 的亚基而活化, 进一步切割多聚 ADP-核糖聚合酶等底物蛋白。通过 Western blotting 检测发现, Ad-Nkx2.5 腺病毒感染拮抗 H_2O_2 所介导 caspase-3 剪切活化 (图 4B)。为了判断 Ad-Nkx2.5 腺病毒能否抑制线粒体途径介导的

凋亡, 我们分别提取胞浆和线粒体蛋白进行 Western blotting 检测。结果如图 4C 所示, H_2O_2 诱导对照组细胞线粒体功能障碍, 细胞色素 C 由线粒体释放进入胞浆, 而 Nkx2.5 的过表达则稳定了线粒体功能, 抑制细胞色素 C 释放。这些实验证据表明 Nkx2.5 的过表达能够抑制线粒体途径介导的凋亡。

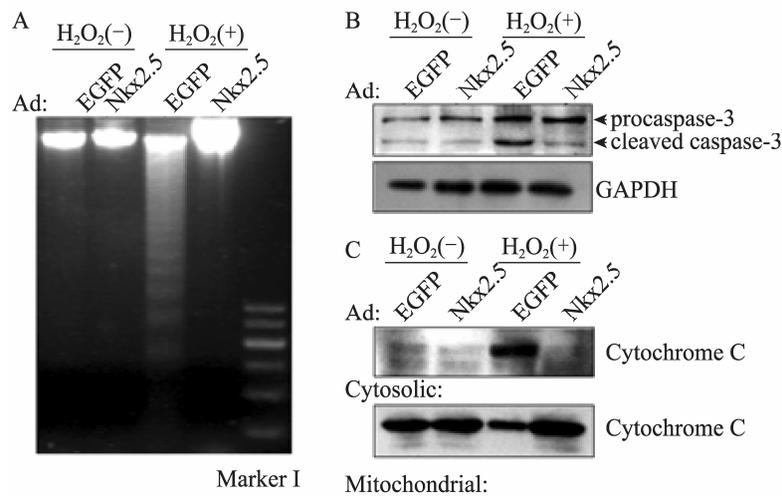


图 4 Nkx2.5 过表达抑制线粒体途径介导的 H9c2 细胞凋亡

Fig. 4 Overexpression of Nkx2.5 inhibits mitochondria-dependent apoptosis in H9c2 cells. (A) Overexpression of Nkx2.5 inhibited apoptotic DNA fragmentation (H_2O_2 treatment for 12 h). (B, C) Overexpression of Nkx2.5 inhibited the caspase-3 activation (B) and release of cytochrome C from the mitochondria (C) (H_2O_2 treatment for 6 h).

2.5 Nkx2.5 过表达调控 *bcl-2* 和 *bax* 表达

Bcl-2 与 Bax 共存于线粒体, 组成离子通道, 决定线粒体的通透性和功能稳定性。但 Bcl-2 是重要的抗凋亡蛋白, 而 Bax 是促凋亡蛋白, 二者的相对比值对决定细胞是否凋亡起关键作用。为了进一步揭示 Nkx2.5 过表达抗凋亡的分子机制, 提取 RNA 进行对 *bcl-2* 和 *bax* 基因表达进行 Real-time PCR 检测。结果发现, Ad-Nkx2.5 感染组与 Ad-EGFP 感染组比较, *bcl-2* 基因表达水平增加了 1.59 倍 ($P < 0.05$), 同时 *bax* 基因表达水

平则被抑制了 44% ($P < 0.01$)。但加入 H_2O_2 处理后, Ad-EGFP 组 *bcl-2* 基因上调 1.35 倍, Ad-Nkx2.5 组 *bcl-2* 基因上调 1.80 倍 ($P < 0.01$); 同时 Ad-EGFP 组 *bax* 基因上调 7.39 倍 ($P < 0.01$), Ad-Nkx2.5 组 *bax* 基因上调 1.58 倍 ($P < 0.01$) (图 5A 和 B)。说明 Nkx2.5 过表达可以显著抑制 Bax 基因高表达, 从而抑制 *bcl-2/bax* 比值颠倒。同时 Nkx2.5 过表达对 *bcl-2* 基因表达具有一个弱的上调作用。这可能是 Nkx2.5 过表达保护 H9c2 细胞抗氧化损伤的分子机制之一。

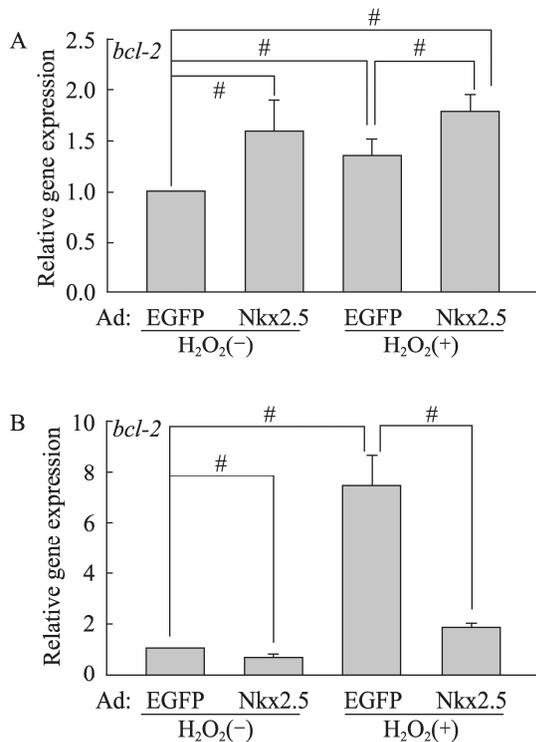


图5 *Nkx2.5* 过表达调控 *bcl-2* 和 *bax* 表达

Fig. 5 Overexpression of *Nkx2.5* regulates the expression of *bcl-2* and *bax* genes. (A and B) Real-time PCR was performed to assess the expression of *bcl-2* (A) and *bax* (B) genes, when H9c2 cells were incubated with 200 μ mol/L H₂O₂ for 6 h. Untreated cells infected with Ad-EGFP were used as control group. All data were normalized to *gapdh* mRNA level and showed with relative quantification. Each bar represents $\bar{x} \pm s$ from three independent experiments. * $P < 0.05$, # $P < 0.01$ vs Ad-EGFP group (with or without H₂O₂ treatment).

2.6 *Nkx2.5* 核定位不受氧化应激干扰

Nkx2.5 是否正确定位与其抗凋亡功能密切相关, 为了解 H₂O₂ 诱导是否影响 *Nkx2.5* 定位, 我们构建了表达 *Nkx2.5*-EGFP 融合蛋白的质粒, 稳定转染 H9c2 细胞。结果发现 *Nkx2.5*-EGFP 蛋白定位于细胞核, 并在 H₂O₂ 处理后 5 min 至 24 h 内仍基本定位于核, 未出现明显的核浆转运。但

在已凋亡细胞的固缩核中, *Nkx2.5*-EGFP 蛋白从弥散分布转为聚集散点状分布 (图 6)。该结果显示 *Nkx2.5* 蛋白在氧化应激刺激下, 核定位稳定, 可能与其抗凋亡功能相关。

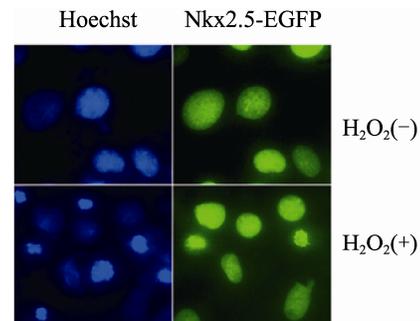


图6 H₂O₂ 对 *Nkx2.5* 核定位的影响

Fig. 6 The nuclear localization of *Nkx2.5* in the absence and presence of H₂O₂. H9c2 cells stable-transfected with pEGFP-*Nkx2.5* were incubated with 200 μ mol/L H₂O₂ for 24 h. The subcellular distribution of *Nkx2.5*-EGFP in H9c2 cells was analysed by fluorescence microscopy (400 \times). Hoechst staining indicated the morphological changes of cell nucleus during apoptosis.

3 讨论

Nkx2.5 是重要的心肌分化和功能调控因子。本实验成功包装重组 *Nkx2.5* 腺病毒, 可应用于多个研究领域, 如干细胞向心肌细胞的诱导分化、先天性心脏病及心律失常发病机制、抗心肌梗死、*Nkx2.5* 分子功能研究等。

在探索提高体外不同来源的干细胞向心肌诱导分化效率时, 证明了 *Nkx2.5* 对于心肌的高效特异诱导。在 P19 畸胎瘤细胞中发现, 过表达 *Nkx2.5* 可以让细胞摆脱对外源诱导剂 (DMSO) 的依赖, 细胞只要悬浮培养形成拟胚体即可高效

率的分化为跳动的心肌细胞^[1]。研究亦表明, Nkx2.5 转染的骨髓干细胞能表现出部分心肌表型^[6,13]。此外, 筛选 Nkx2.5 表达阳性的心肌前体细胞加以扩增和诱导分化, 也是目前研究热点之一^[14-16]。通过 *nkx2.5* 转基因诱导干细胞向心肌分化, 将为临床上先天性心脏病、心肌梗死、心功能不全等患者提供新的治疗手段, 改善心功能。

同时, *nkx2.5* 是第一个被检测出的法乐氏四联症及房室传导紊乱的致病相关基因。在人类的先天性心脏病图谱内, 有数十种与 *nkx2.5* 突变相关的疾病, 常见的表现型有房室间隔缺损、室间隔缺损、法乐氏四联症、右心室双出口, 以及三尖瓣畸形导致的 Ebstein 氏畸形等^[2,17-18]。*nkx2.5* 突变还与房室传导阻滞等先天性畸形有关: *nkx2.5* 单倍剂量不足使 QRS 波时限明显延长, 增强了心律失常易感性; 而 *nkx2.5* 单等位基因敲除或心室部位特异性 *nkx2.5* 基因沉默则会导致由于房室结或房室束发育不足引起的房室传导缺陷^[2]。通过 *nkx2.5* 转基因可能为部分房室传导阻滞患者提供基因补偿。

此外, *nkx2.5* 转基因治疗亦可应用于心肌细胞缺损性疾病的治疗。心肌细胞凋亡可见于各种心脏疾病, 如缺血性心肌梗死、高糖性心肌重构、葱环类抗癌剂致心肌毒性。Nkx2.5 能够稳定心肌细胞内稳态、拮抗过氧化氢、阿霉素诱导的超氧化物损伤和凋亡^[4-6]。同时, 研究显示 Nkx2.5 保持完整的结构对其介导抗凋亡作用是必需的。过表达 Nkx2.5 删除 C 端的突变体, 发现抗凋亡的 Bcl-xl 蛋白表达下降, 促凋亡的 CAS 蛋白增多, 细胞更易受到如 H₂O₂、毒素或者营养缺乏导致的细胞损伤^[5]。

但是 Nkx2.5 抗凋亡的具体机制目前仍不是十分清楚。就另一心肌发育关键基因 *gata4* 而言, *gata4* 能够直接上调抗凋亡基因 *bcl-2* 和 *bcl-xL* 表达^[19-20], 而 *nkx2.5* 抗凋亡的下游靶基因则仍然未知。由于缺血性心肌梗死、高糖性心肌重构、葱环类抗癌剂致心肌毒性, 主要通过介导钙超载、氧自由基产生, 经线粒体途径引发细胞凋亡。我们探讨了 Nkx2.5 拮抗线粒体途径凋亡的分子机制。在本实验中, 通过建立 H₂O₂ 诱导的 H9c2 心肌细胞系凋亡模型, 我们发现 Ad-Nkx2.5 感染显著提高了细胞存活率, 抑制了 DNA 片段化和 caspase-3 的酶切活化。在线粒体途径介导的凋亡中, 线粒体膜电位消失、通透性增加、细胞色素 C 释放是引发 caspase-3 活化的起始因素。我们的研究发现 Nkx2.5 过表达抑制了细胞色素 C 从线粒体的溢出, 表明 Nkx2.5 具有稳定线粒体通透性和功能的作用。因此推测 Nkx2.5 的下游靶基因可能与线粒体膜电位和通透性维持相关。

线粒体外膜的通透性主要受 Bcl-2 蛋白家族调控^[12]。根据其功能可分为两大类: 介导抗凋亡作用的 *bcl-2*、*bcl-xL*、*bcl-w* 等基因, 及介导凋亡作用的 *bax*、*bad*、*bid*、*bnip3* 等基因。细胞接受凋亡信号后, Bax 从胞浆转移到线粒体外膜, 导致细胞色素 C 释放。而 Bcl-2 通过与 Bax 结合成异二聚体, 阻止 Bax 的促凋亡作用。本研究发现, Nkx2.5 能够上调 *bcl-2* 基因表达, 下调 *Bax* 基因表达, 特别是能够抑制氧化刺激引发的 *Bax* 基因超表达。提示 *bcl-2*、*bax* 基因可能是 Nkx2.5 的下游靶基因。但 Nkx2.5 是否直接结合二者的

启动子发挥转录调控作用,其具体结合位点等问题都有待进一步研究。特别值得指出的是,*Nkx2.5* 通常作为一个转录激活因子而非抑制因子,其通过何种方式抑制 *bax* 基因表达将是一个有趣的问题。

此外,我们观察到 *Nkx2.5* 的核定位性质相当稳定,即使细胞遭受 H_2O_2 刺激,其核内 *Nkx2.5* 蛋白仍基本定位于核,并未出现显著地出核现象。这一性质可能与其抗凋亡能力相关,能保证 *Nkx2.5* 蛋白在适量氧化刺激下仍正常执行转录调控功能而不会轻易失活。这也显示了其作为基因治疗候选分子的另一优势。

REFERENCES

- [1] Jamali M, Rogerson PJ, Wilton S, et al. *Nkx2-5* activity is essential for cardiomyogenesis. *J Biol Chem*, 2001, 276(45): 42252–42258.
- [2] Akazawa H, Komuro I. Cardiac transcription factor *Csx/Nkx2-5*: its role in cardiac development and diseases. *Pharmacol Ther*, 2005, 107(2): 252–268.
- [3] Lyons I, Parsons LM, Hartley L, et al. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*. *Genes Dev*, 1995, 9(13): 1654–1666.
- [4] Toko H, Zhu WD, Takimoto E, et al. *Csx/Nkx2-5* is required for homeostasis and survival of cardiac myocytes in the adult heart. *J Biol Chem*, 2002, 277(27): 24735–24743.
- [5] Monzen K, Zhu WD, Kasai H, et al. Dual effects of the homeobox transcription factor *Csx/Nkx2-5* on cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 298(4): 493–500.
- [6] Gao XR, Tan YZ, Wang HJ. Overexpression of *Csx/Nkx2.5* and *GATA-4* enhances the efficacy of mesenchymal stem cell transplantation after myocardial infarction. *Circ J*, 2011, 75(11): 2683–2691.
- [7] Gustafsson ÅB, Gottlieb RA. Mechanisms of apoptosis in the heart. *J Clin Immunol*, 2003, 23(6): 447–459.
- [8] Yi BA, Wernet O, Chien KR. Regenerative medicine: developmental paradigms in the biology of cardiovascular regeneration. *J Clin Invest*, 2010, 120(1): 20–28.
- [9] Li T, Hu XQ, Jiang KS, et al. Construction of recombinant adenovirus overexpressing *GATA4* and its infection in cardiac myocytes. *J Zhejiang Normal Univ: Nat Sci*, 2011, 34(2): 191–196.
李涛, 胡晓青, 姜科声, 等. 重组 *GATA4* 腺病毒的构建及心肌细胞感染. *浙江师范大学学报: 自然科学版*, 2011, 34(2): 191–196.
- [10] Ding ZZ, Zhang L, Li T. Prokaryotic expression, purification and activity identification of redox factor. *J Zhejiang Normal Univ: Nat Sci*, 2011, 34(3): 333–338.
丁正中, 张璐, 李涛. 氧化还原因子-1 的原核表达纯化及其活性鉴定. *浙江师范大学学报: 自然科学版*, 2011, 34(3): 333–338.
- [11] Wang ZY, Cui M, Sun LJ, et al. Angiotensin-1 protects H9c2 cells from H_2O_2 -induced apoptosis through AKT signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 359(3): 685–690.
- [12] Liu YN, Wang WP, Jia ZQ, et al. Protection of α -lipoic acid against H_2O_2 -induced oxidative stress in H9c2 cells. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2012, 28(3): 227–233.
刘羿男, 王卫平, 贾竹青, 等. α -硫辛酸对 H9c2 细胞在 H_2O_2 导致的氧化应激损伤中的保护作用. *中国生物化学与分子生物学报*, 2012, 28(3): 227–233.
- [13] Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, et al. Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing *Csx/Nkx2.5* and *GATA4* undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like

- transient amplifying cells. *Exp Cell Res*, 2007, 313(4): 698–706.
- [14] Zhang X, Zhang CS, Liu YC, et al. Isolation, culture and characterization of cardiac progenitor cells derived from human embryonic heart tubes. *Cells Tissues Organs*, 2009, 190(4): 194–208.
- [15] Kim JH, Oh AY, Choi YM, et al. Isoflurane decreases death of human embryonic stem cell-derived, transcriptional marker Nkx2.5(+) cardiac progenitor cells. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2011, 55(9): 1124–1131.
- [16] Armiñán A, Gandía C, Bartual M, et al. Cardiac differentiation is driven by NKX2.5 and GATA4 nuclear translocation in tissue-specific mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(6): 907–918.
- [17] Pashmforoush M, Lu JT, Chen HY, et al. Nkx2-5 pathways and congenital heart disease: loss of ventricular myocyte lineage specification leads to progressive cardiomyopathy and complete heart block. *Cell*, 2004, 117(3): 373–386.
- [18] McCulley DJ, Black BL. Transcription factor pathways and congenital heart disease. *Curr Top Dev Biol*, 2012, 100: 253–277.
- [19] Suzuki YJ, Evans T. Regulation of cardiac myocyte apoptosis by the GATA-4 transcription factor. *Life Sci*, 2004, 74(15): 1829–1838.
- [20] Kobayashi S, Lackey T, Huang Y, et al. Transcription factor *gata4* regulates cardiac *BCL2* gene expression *in vitro* and *in vivo*. *FASEB J*, 2006, 20(6): 800–802.