

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.16.003

eNOS 在 EPO 调节慢性缺氧心肌细胞线粒体生物合成中的作用机制研究*

秦川, 陈林, 肖颖彬

(第三军医大学新桥医院全军心血管外科研究所, 重庆 400037)

[摘要] **目的** 探讨内皮型一氧化氮合酶(eNOS)在促红细胞生成素(EPO)调节慢性缺氧环境中心肌细胞线粒体生物合成中的作用及其机制。**方法** 采用 H9c2 心肌细胞, 将其于缺氧环境下培养 7 d (94% N₂, 5% O₂), 建立心肌细胞慢性缺氧模型。将心肌细胞根据不同处理分为缺氧对照组(HC), 20 U/mL 重组人 EPO(rhEPO)处理缺氧组(HE)和 20 U/mL rhEPO+eNOS shRNA 干扰处理缺氧组(HR)。以荧光探针检测线粒体数量变化; RT-PCR 检测线粒体 DNA 相对表达量; Western blot 检测 eNOS 总蛋白表达及磷酸化水平(p-eNOS)变化。**结果** rhEPO 显著增强 eNOS 磷酸化水平, 增加线粒体数量及其 DNA 相对拷贝数($P < 0.05$); 而同时采用 shRNA 干扰 eNOS 后, HR 组 eNOS 总蛋白表达及磷酸化水平较 HE 组降低($P < 0.05$), 同时线粒体数量及其 DNA 相对拷贝数较 HE 组减少($P < 0.05$)。**结论** eNOS 的磷酸化激活是 EPO 增强慢性缺氧心肌细胞线粒体生物合成的重要信号转导机制。

[关键词] 促红细胞生成素; 线粒体生物合成; 慢性缺氧; 心肌细胞; 内皮型一氧化氮合酶

[中图分类号] R541

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)16-2167-03

The role of eNOS on the regulatory effects of EPO on mitochondrial biogenesis in cardiomyocytes exposed to chronic hypoxia*

Qin Chuan, Chen Lin, Xiao Yinbing

(The PLA Institute of Cardiovascular Surgery, Daping Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[Abstract] **Objective** To explore the role of endothelial nitric oxide synthase(eNOS) in the regulatory effects of erythropoietin (EPO) on mitochondrial biogenesis in cardiomyocytes exposed to chronic hypoxia. **Methods** H9c2 cardiomyocytes were cultured in the environment of hypoxia for 1 week (94% N₂, 5% O₂), establishing the chronic hypoxic cardiomyocyte model. All the cells were divided into 3 groups: HC (chronic hypoxic control), HE [treated with chronic hypoxia and 20 U/mL recombinant human EPO (rhEPO)] and HR (cells transfected with eNOS shRNA plasmid and treated with 20 U/mL rhEPO and chronic hypoxia). Fluorescent probe was used to detect the changes of mitochondrial number. Mitochondrial DNA (mtDNA) relative express level was assayed by RT-PCR. The expression and phosphorylation of eNOS protein were analyzed with Western blot. **Results** rhEPO significantly increased the phosphorylation of eNOS and elevated the mitochondrial number and mtDNA ($P < 0.05$). shRNA interference on eNOS significantly blocked all the above changes induced by rhEPO ($P < 0.05$). **Conclusion** Phosphorylation of eNOS is the important signalling pathway for the enhanced mitochondrial biogenesis in cardiomyocytes exposed to chronic hypoxia by EPO.

[Key words] erythropoietin; mitochondrial biogenesis; chronic hypoxia; cardiomyocyte; endothelial nitric oxide synthase

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是机体遭遇缺氧时为缺氧诱导因子(hypoxia inducible factors, HIFs)激活后上调表达的重要细胞因子^[1], 其促进红系祖细胞增殖及分化为成熟红细胞, 以增加循环血液中红细胞数量及血红蛋白含量, 提高血液携氧能力应对缺氧。但近年研究证实, 促红细胞生成素受体(erythropoietin receptor, EPOR)能够表达于心肌细胞, 提示 EPO 能够直接作用于心肌细胞 EPOR 产生相关生物学效应。本实验前期研究发现 EPO 能够显著增强慢性缺氧环境下培养的 H9c2 心肌细胞的线粒体生物合成水平, 因而可能影响线粒体的能量代谢功能而参与心肌细胞对慢性缺氧的适应过程^[2], 然而其信号转导机制仍有待阐明。一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)是 NO 合成的主要调节蛋白, 通过

催化 L-精氨酸合成 NO, 从而启动线粒体生物合成^[3]。为此, 本研究拟通过采用 shRNA 干扰 eNOS 基因表达的方法观察干预 eNOS 后对 EPO 调节心肌细胞线粒体生物合成作用的影响, 从而探讨其可能的信号转导机制。

1 材料与方法

1.1 材料 H9c2 心肌细胞(ATCC 细胞库); 蛋白磷酸酶抑制剂(普利莱); eNOS、p-eNOS(ser117)抗体(兔抗大鼠; Cell Signaling Technology 公司); 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳液、BCA 试剂盒、SDS 裂解液、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(碧云天公司); DMEM 高糖培养基、胎牛血清(Gibco 公司); MitoTracker 线粒体绿色荧光探针(Invitrogen 公司); 基因组 DNA 提取试剂盒、SYBR[®] Ex Taq[™] II

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81100120)。 作者简介: 秦川(1976-), 讲师、主治医师, 博士, 主要从事心肌慢性缺氧适应机制研究。

试剂盒(TaKaRa 公司);rhEPO(沈阳三生公司);eNOS shRNA 质粒[Nos3-RNAi(2984-1)]由吉凯公司构建。

1.2 方法

1.2.1 心肌细胞慢性缺氧模型建立 采用缺氧培养箱,将 H9c2 心肌细胞于缺氧环境中(94% N₂, 5% CO₂, 1% O₂)培养,2 d 换含 10% 胎牛血清的培养液 1 次,培养 1 周建立慢性缺氧模型。将慢性缺氧 H9c2 细胞转移至 6 孔板,细胞数量为 5×10^5 个,制作细胞爬片。

1.2.2 eNOS 的特异性 RNA 干扰 eNOS 的特异性 shRNA 质粒靶序列为:5'-GCG TGG AGT GTT TGG ACA AGT CC-3'。质粒内含有抗新霉素基因用于药物筛选,也含有 GFP 基因可用于流式细胞仪进一步筛选。采用脂质体法转染细胞,具体如下:当细胞在 6 孔板内生长至融合率达 90% 以上时,于每孔加入 150 μ L 无血清培养基稀释的 12 μ g 质粒 DNA(包括空白对照质粒和目的质粒)以及无血清培养基 138 μ L 稀释的转染试剂 Lipofectamine 2000 12 μ L,再加入无血清培养基 700 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,荧光显微镜观察转染率为 30%~40%。进一步采用流式细胞仪筛选,观察发现转染率升至约 70%,改用含新霉素的培养基培养,维持转染率。

1.2.3 分组 未加入 rhEPO 的慢性缺氧细胞为缺氧对照组(HC 组),以 20 U/mL 的 rhEPO 处理的慢性缺氧细胞为 HE 组,以 20 U/mL rhEPO 处理转染了 eNOS 的特异 shRNA 质粒的慢性缺氧细胞为 HR 组。

1.2.4 线粒体荧光探针染色 细胞于缺氧培养 1 周后,细胞爬片以 PBS 漂洗 3 次。将线粒体绿色荧光探针用二甲亚砜(DMSO)稀释为 1 mmol/L,再用 DMEM 稀释至 100 mmol/L。将制备好的工作液与细胞爬片于室温孵育 25 min 后,以激光共聚焦显微镜观察,线粒体数量以绿色荧光光密度值计算。

1.2.5 实时-PCR(RT-PCR) 首先提取处理后的细胞总 DNA,以细胞核基因组的 β -actin 作为参照基因,细胞色素 c(Cyt)作为目的基因。采用 Primer Premier 5.0 软件对以上基因 PCR 引物进行设计,由上海生工合成。Cyt:上游引物 5'-CCG GAG CAA TCC AGG TCG GTT-3';下游引物 5'-TGG TTG GGA GCA CTT ATG GTA AGG A-3'; β -actin:上游引物 5'-TCC CGG CCC CTA GGG TGT AGA-3';下游引物 5'-GCC GCA CCG GCT CTC CAA AT-3'。采用 SYBR Green 染色法,于 7500 Fast RT-PCR 系统上进行反应:94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,共 40 个循环。所有的 RT-PCR 至少重复 3

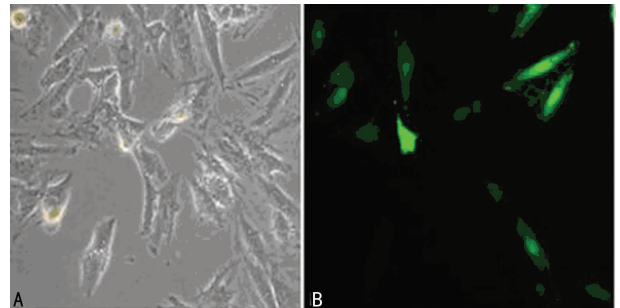
次,溶解曲线验证扩增产物特异性,Cyt 为 97 bp 片段, β -actin 为 136 bp 片段。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[4]计算线粒体相对拷贝数。

1.2.6 Western blot 收集处理过的细胞,加入 1 mL SDS 细胞裂解液,同时加入 10 μ L PMSF 及 1 μ L 磷酸化蛋白降解抑制剂,于 0 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,超声破碎,12 000 r/min 离心 5 min 提取总蛋白。考马斯亮蓝法进行蛋白定量后,将其于 8% 的 SDS-PAGE 在 100 V 下电泳 2 h。再于 250 mA 恒流下 100 min 电转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜。封闭液于室温封闭 2 h,加入一抗体(1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,加入二抗(1:5 000),室温下空气摇床中摇动 100 min。采用 ECL 化学发光法显影,采集图片后以 Quantity One 软件进行分析,灰度值表示蛋白表达量,以 β -actin 为参照基因。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行数据分析,RT-PCR,Western blot 结果采用单因素方差分析,结果均满足方差齐性检验,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用 LSD-*q* 法。线粒体数量采用平均光密度值计算,用单因素方差分析为方差不齐,改用独立样本的 Kruskal-Wallis 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

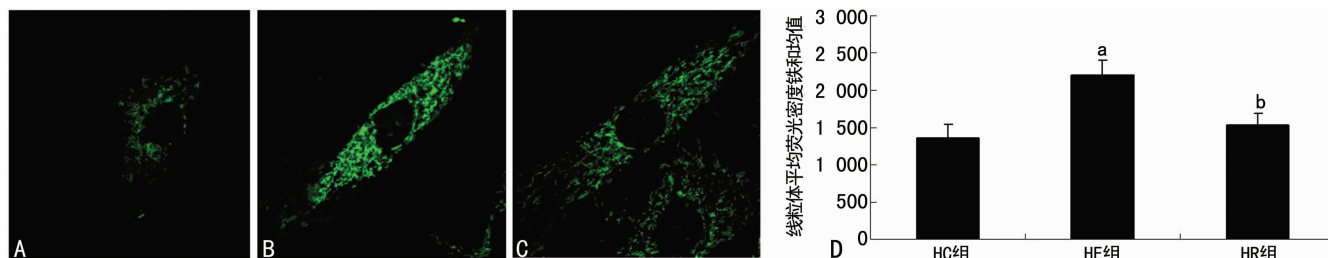
2.1 eNOS 的特异性 shRNA 干扰 经过特异性 shRNA 质粒转染处理,并经过流式细胞仪筛选,转染率由 30%~40% 升至约 70%。见图 1。



A:普通光学显微镜;B:荧光显微镜。

图 1 eNOS 特异性 shRNA 质粒转染后的 H9c2 心肌细胞($\times 200$)

2.2 线粒体数量变化 同 HC 组比较,HE 组绿色荧光强度显著增强,即 rhEPO 能显著增加慢性缺氧心肌细胞线粒体数量($P < 0.05$),但 HR 组线粒体数量较 HE 组显著减少($P < 0.05$)。见图 2。

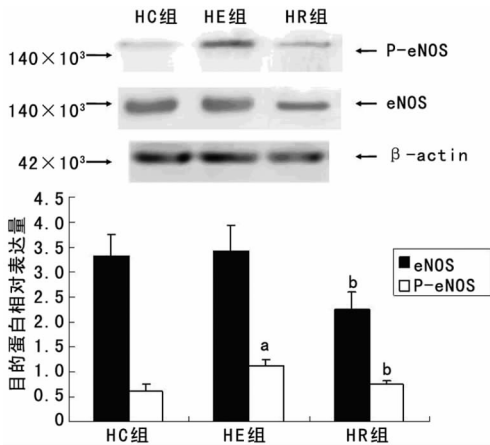


A:HC 组;B:HE 组;C:HR 组;D:线粒体荧光密度分析图。^a: $P < 0.05$,与 HC 组比较;^b: $P < 0.05$,与 HE 组比较。

图 2 线粒体荧光探针检测线粒体数量(激光共聚焦显微镜 $\times 1 000$)

2.3 eNOS 蛋白表达及磷酸化变化 同 HC 组比较,HE 组细胞经 rhEPO 处理后 eNOS 总蛋白表达无影响,但显著促进其

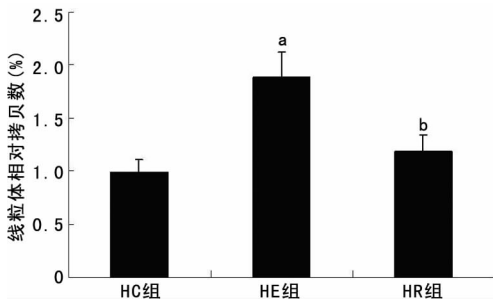
磷酸化($P < 0.05$),HR 组心肌细胞 eNOS 的特异 RNA 干扰显著降低 eNOS 蛋白表达及磷酸化水平($P < 0.05$)。见图 3。



a: $P < 0.05$, 与 HC 组比较; b: $P < 0.05$, 与 HE 组比较。

图 3 Western blot 检测 eNOS 蛋白及磷酸化表达水平变化

2.4 线粒体相对拷贝数变化 HE 组线粒体相对拷贝数较 HC 组增加($P < 0.05$),但在 HR 组较 HE 组减少($P < 0.05$)。见图 4。



a: $P < 0.05$, 与 HC 组比较; b: $P < 0.05$, 与 HE 组比较。

图 4 RT-PCR 检测线粒体相对拷贝数变化

3 讨 论

先天性心脏病的发病率约为 4/1 000~50/1 000^[4-5],其中紫绀型先天性心脏病对儿童健康乃至生命的威胁更为明显。尽管在我国越来越多的紫绀型先心病患者已得到了及时正确的治疗,然而其病死率仍较高,远期疗效也不确定。还有部分患者可能终身无法接受根治手术。慢性缺氧是此类患者的共同病理生理过程。由于心脏高度需氧,因此对缺氧也极为敏感。然而,紫绀型先心病患者的心脏却能够耐受缺氧,生存并发挥功能,其机制亟待研究。缺氧时会造成能量应激,慢性缺氧时,心肌细胞必然发生一系列分子生物学变化,进而适应并生存,其中线粒体作为心肌细胞关键的能量来源,其适应性的变化尤为重要。研究已证实紫绀型先天性心脏病患者的心肌细胞出现了线粒体生物合成显著增强的现象,线粒体生物合成作为线粒体自我复制和更新的重要过程,在慢性缺氧的心肌中出现,提示线粒体生物合成的增强可能是心肌细胞对慢性缺氧适应的重要机制。然而,其调控机制尚不清楚。

EPO 是经典的造血细胞因子,主要用于治疗贫血。近年发现,心肌细胞表达 EPOR,提示 EPO 可以直接作用于心肌细胞并产生生物学效应,多项研究也对此进行了报道^[6-8]。由于

在慢性缺氧时循环血液中 EPO 的浓度显著升高^[9],同时心肌中的 EPOR 表达也显著增加^[10-11],提示心肌细胞 EPO-EPOR 信号增强,然而其生物学效应尚不明确。本实验前期对 EPO 调节慢性缺氧心肌细胞线粒体生物合成的作用进行了研究,发现 EPO 显著增强慢性缺氧心肌细胞线粒体生物合成水平,且呈剂量依赖性。

在本研究中,通过采用 eNOS 的特异性 RNA 干扰,首先发现 EPO 对慢性缺氧心肌细胞 eNOS 的总蛋白表达水平没有显著影响,但却显著增强其磷酸化,提示 EPO 可以通过使 eNOS 磷酸化的途径使之激活,推测这一作用与 Akt 的活化有关,因为 eNOS 的 1177Ser 为 Akt 磷酸化位点^[12]。进一步的研究发现,RNA 干扰使 eNOS 的蛋白表达及磷酸化水平显著降低,同时,也使 EPO 增强慢性缺氧心肌细胞线粒体生物合成的作用显著减弱,证实了 eNOS 通过磷酸化活化参与了 EPO 调节慢性心肌细胞线粒体生物合成的效应。

通过本研究,作者进一步深入探讨了 EPO 调节慢性缺氧心肌细胞线粒体生物合成的作用机制,对深入阐释增强的 EPO-EPOR 信号在心肌细胞对慢性缺氧适应中作用以及心肌对慢性缺氧环境适应机制具有一定的意义。

参考文献

- [1] Hewitson KS, McNeill LA, Schofield CJ. Modulating the hypoxia-inducible factor signalling pathway: applications from cardiovascular disease to cancer [J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(8): 821-833.
- [2] 周胜凯,秦川,陈林,等. EPO 对慢性缺氧心肌细胞线粒体生物合成的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2013, 35(12): 1192-1196.
- [3] Nisoli E, Clementi E, Moncada S, et al. Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 67(1): 1-15.
- [4] Trinei M, Berniakovich I, Ppelicci PC, et al. Mitochondrial DNA copy number is regulated by cellular proliferation: a role for Ras and p66 (Shc) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1757(5/6): 624-630.
- [5] Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39(12): 1890-1900.
- [6] Fu P, Arcasoy MO. Erythropoietin protects cardiac myocytes against anthracycline-induced apoptosis [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2007, 354(2): 372-378.
- [7] Mao W, Iwai C, Liu J, et al. Darbepoietin alfa exerts a cardioprotective effect in autoimmune cardiomyopathy via reduction of ER stress and activation of PI3K/Akt and STAT3 pathways [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 45(2): 250-260.
- [8] Yamada Y, Kobayashi H, Iwasa M, et al. Postinfarct active cardiac-targeted delivery of erythropoietin by liposomes with sialyl Lewis X repairs infarcted myocardium in rabbits [J]. *Am J Physiol-Heart C*, 2013, 304(8): H1124-1133.

究认为 RhoA/ROCK 通路关键因子 ROCK1 和 ROCK2 在骨肉瘤组织中高表达并与骨肉瘤的侵袭转移相关,抑制 ROCK1 和 ROCK2 表达使骨肉瘤侵袭转移能力下降,也就是说 RhoA/ROCK 通路中的某些关键因子如 ROCK1 可以作为抑制骨肉瘤侵袭转移的潜在靶点。进一步通过生物学信息预测的方式发现 miR-335 与 ROCK1 mRNA 3'UTR 区存在一段 7 个碱基互补配对区,那么 miR-335 与 ROCK1 是否存在靶向作用,其具体机制如何? 接下来作者将通过进一步荧光素酶报告基因实验验证 miR-335 与 ROCK1 可能存在的靶向关系并通过 Transwell 侵袭实验检测 miR-335 靶向 ROCK1 对骨肉瘤侵袭转移的影响。

miR-335 作为一种肿瘤抑制小分子 miRNA,其作用可能通过调控许多重要细胞信号转导通路内的目标靶基因引起整个信号通路活性的改变,从而调控整个细胞的生物学行为,而 miR-335 与 ROCK1 间的负相关性及可能存在的 miR-335 负性调控 ROCK1 机制可能是上述多个通路多个靶基因中的与其转移侵袭相关的一个,对其进行研究可进一步阐明肿瘤发生的机制,相信随着研究的进一步深入,miR-335 调控 ROCK1 表达可能会成为治疗骨肉瘤的一个新策略。

参考文献

- [1] Berman SD, Calo E, Landman AS, et al. Metastatic osteosarcoma induced by inactivation of Rb and p53 in the osteoblast lineage[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(33):11851-11856.
- [2] Sarasin-Filipowicz M, Krol J, Markiewicz IH, et al. Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy[J]. Nat Med, 2009, 15(1):31-33.
- [3] Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis[J]. Nature, 2008, 451(7175):147-152.
- [4] Xu Y, Zhao F, Wang Z. MicroRNA-335 acts as a metastasis suppressor in gastric cancer by targeting Bel-7 and specificity protein 1[J]. Oncogene, 2012, 31(11):1398-1407.
- [5] Shu M, Zhou Y, Zhu W, Zhang H, et al. MicroRNA-335 is

required for differentiation of malignant glioma cells induced by activation of cAMP/protein kinase A pathway[J]. Mol Pharmacol, 2012, 81:292-298.

- [6] Wang F, Zheng Z, Guo J, et al. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor[J]. Gynecol Oncol, 2010, 119:586-593.
- [7] Xiong SW, Lin TX, Xu KW, et al. MicroRNA-335 Acts as a Candidate Tumor Suppressor in Prostate Cancer[J]. Pathol Oncol Res, 2012, (15):156-159.
- [8] Yan Z, Xiong Y, Xu W, et al. Identification of hsa-miR-335 as a prognostic signature in gastric cancer[J]. PLoS One, 2012, 7(7):e40037.
- [9] Shu M, Zheng X, Wu S, et al. Targeting oncogenic miR-335 inhibits growth and invasion of malignant astrocytoma cells[J]. Mol Cancer, 2011, 10:59.
- [10] Shi L, Jiang D, Sun G, et al. miR-335 promotes cell proliferation by directly targeting Rb1 in meningiomas[J]. Neurooncol, 2012, 110(2):155-162.
- [11] Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion[J]. Cancer Metastasis, 2011, 28(1/2):65-76.
- [12] Liu S. The ROCK signaling and breast cancer metastasis[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(2):1363-1366.
- [13] Oellers P, Schroer U, Senner V, et al. ROCKs are expressed in brain tumors and are required for glioma cell migration on myelinated axons[J]. Glia, 2011, 57(5):499-509.
- [14] Liu X, Choy E, Hornicek FJ. ROCK1 as a potential therapeutic target in osteosarcoma[J]. J Orthop Res, 2011, 29(8):1259-1266.
- [15] Zucchini C, Manara MC, Pinca RS. CD99 suppresses osteosarcoma cell migration through inhibition of ROCK2 activity[J]. Oncogene, 2013, 152(10):1038-1041.

(收稿日期:2014-10-28 修回日期:2015-01-16)

(上接第 2169 页)

- erythropoietin production; a paradigm for oxygen-regulated gene expression[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006, 33(10):968-979.
- [10] Hasnaoui-Saadani RE, Marchant D, Pichon A, et al. Epo deficiency alters cardiac adaptation to chronic hypoxia[J]. Respir Physiol Neurobiol, 2013, 186(2):146-154.
 - [11] Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, et al. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-

1alpha target gene in Hep3B and Kelly cells[J]. FASEB J, 2004, 18(12):1462-1464.

- [12] Liang C, Ren Y, Tan H, et al. Rosiglitazone via upregulation of Akt/eNOS pathways attenuates dysfunction of endothelial progenitor cells, induced by advanced glycation end products[J]. Br J Pharmacol, 2009, 158(8):1865-1873.

(收稿日期:2014-11-28 修回日期:2015-02-16)