

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.07.006
文章编号: 1005-8982 (2018) 07-0030-06

FGF-1 对 TGF- β_1 诱导的 H9c2 心肌细胞 凋亡与 Caspase-3, Caspase-8 和 Caspase-9 表达的关系研究 *

李厚忠¹, 郭金兴², 张胜强², 张羽飞¹

(1. 牡丹江医学院, 黑龙江 牡丹江 157011; 2. 牡丹江医学院附属红旗医院,
黑龙江 牡丹江 157011)

摘要: 目的 观察酸性成纤维细胞生长因子 (FGF-1) 对转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡作用及对半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3), 半胱氨酸蛋白酶-8 (Caspase-8) 和半胱氨酸蛋白酶-9 (Caspase-9) 表达的影响, 并探讨可能机制。**方法** 体外培养 H9c2 细胞, 随机分为 5 组: 模型组, 肝素 (Heparin) 组、FGF-1 组、FGF-1/Heparin 组和正常对照组。采用 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT) 比色分析检测 H9c2 细胞的存活率, TUNEL 染色检测 H9c2 细胞凋亡指数和 Western blot 分析检测 H9c2 细胞 Caspase-3, Caspase-8 和 Caspase-9 的表达。**结果** 模型组 H9c2 细胞存活率与正常对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 模型组降低; FGF-1 组和 FGF-1/Heparin 组 H9c2 细胞存活率与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), FGF-1 组和 FGF-1/Heparin 组均升高。模型组 H9c2 细胞凋亡指数, Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 的表达与正常对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 模型组升高; FGF-1 组和 FGF-1/Heparin 组 H9c2 细胞凋亡指数, Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 的表达与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), FGF-1 组和 FGF-1/Heparin 组降低。**结论** FGF-1 对 TGF- β_1 诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡具有抑制作用, 其机制可能与抑制 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 的表达有关。

关键词: 酸性成纤维细胞生长因子; H9c2 心肌细胞; 半胱氨酸蛋白酶-3; 半胱氨酸蛋白酶-8; 半胱氨酸蛋白酶-9

中图分类号: R654.2

文献标识码: A

Effect of FGF-1 on caspase-3, caspase-8 and caspase-9 expressions and apoptosis of myocardial H9c2 cells induced by TGF- β_1 *

Hou-zhong Li¹, Jin-xing Guo², Sheng-qiang Zhang², Yu-fei Zhang¹

(1. Mudanjiang Medical University, Mudanjiang, Heilongjiang 157011, China; 2. Hongqi Hospital of
Mudanjiang Medical University, Mudanjiang, Heilongjiang 157011, China)

Abstract: Objective To observe the effect of acidic fibroblast growth factor (FGF-1) on the apoptosis of myocardial H9c2 cells induced by transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and the expressions of cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (caspase-3), caspase-8 and caspase-9 and to discuss its possible mechanisms. **Methods** H9c2

收稿日期: 2016-12-13

* 基金项目: 黑龙江省卫生计生委科研课题 (NO: 2014-215); 牡丹江医学院科学技术研究项目 (NO: ZS201518); 黑龙江省大学生创新创业训练计划项目 (NO: 201410229021)

[通信作者] 张羽飞, E-mail: yufeizhang@foxmail.com; Tel: 0453-6984647

cells were cultured and randomly divided into 5 groups, i.e. model group, Heparin group, FGF-1 group, FGF-1/Heparin group and normal control group. The survival rate of H9c2 cells was measured by 3-(4,5-dimethylthiazole-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay. The apoptotic index of H9c2 cells was observed by TUNEL staining. The expression levels of caspase-3, caspase-8 and caspase-9 were detected by Western blot. **Results** Compared with the normal control group, the survival rate of H9c2 cells was significantly decreased in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the survival rate of H9c2 cells was significantly increased in the FGF-1 group and the FGF-1/Heparin group ($P < 0.05$). Compared with the normal control group, the apoptosis index and the expressions of caspase-3, caspase-8 and caspase-9 of H9c2 cells in the model group were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the apoptosis index and the expressions of caspase-3, caspase-8 and caspase-9 of H9c2 cells were significantly decreased in the FGF-1 group and the FGF-1/Heparin group ($P < 0.05$). **Conclusions** FGF-1 could obviously inhibit the apoptosis of H9c2 cells induced by TGF- β_1 and its possible mechanism may be related to decrease of the expression level of caspase-3, caspase-8 and caspase-9.

Keywords: acidic fibroblast growth factor; H9c2 cardiomyocyte; cysteinyl aspartate specific proteinase-3; cysteinyl aspartate specific proteinase-8; cysteinyl aspartate specific proteinase-9

酸性成纤维细胞生长因子 (acidic fibroblast growth factor, FGF-1) 是一种广泛存在于人体各组织中的具有多方面功能的生物活性蛋白, 其在组织形态的发生、发展, 血管生成以及创伤愈合等诸多方面发挥着十分重要的作用^[1]。同时, FGF-1也是成纤维细胞、血管内皮细胞、角膜细胞、心肌细胞、星形胶质细胞及神经细胞等生长的刺激因子^[2]。研究表明^[3], FGF-1可缓解心肌短暂缺血引起的心肌梗死和心律失常等临床症状。也有研究表明^[4], 对于由缺血造成心肌的损伤(缺血-再灌注损伤), FGF-1可通过增加血管生成发挥心肌保护作用。但是, 有关于FGF-1是否具有抗心肌细胞凋亡作用, 国内外鲜见报道。本研究采用体外培养心肌H9c2细胞, 建立转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 诱导的H9c2细胞凋亡模型, 观察FGF-1对H9c2细胞存活率, 凋亡指数以及凋亡相关酶半胱氨酸蛋白酶-3 (cysteinyl aspartate specific proteinase-3, Caspase-3), 半胱氨酸蛋白酶-8 (cysteinyl aspartate specific proteinase-8, Caspase-8) 和半胱氨酸蛋白酶-9 (cysteinyl aspartate specific proteinase-9, Caspase-9) 表达的影响, 探讨FGF-1抗H9c2细胞凋亡作用及可能的作用机制, 为其进一步研究开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

心肌细胞株H9c2 (中科院上海细胞研究所细胞库), FGF-1 (美国R&D system公司), 肝素 (Heparin,

美国Sigma公司), TGF- β_1 (美国PEPROTECH公司), 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT, 美国Amresco公司), DMEM培养液和胎牛血清 (美国Gibco公司), TUNEL细胞凋亡原位检测试剂盒 (南京凯基生物有限公司), DAPI (上海碧云天公司), 兔抗人caspase-3单克隆抗体、兔抗人caspase-8单克隆抗体和兔抗人caspase-9单克隆抗体 (美国Santa Cruz公司), HRP标记抗鼠IgG二抗 (上海碧云天公司), 其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 H9c2细胞培养在DMEM培养基(含10%胎牛血清、200 mmol/L L-谷氨酰胺、100 μ g/ml硫酸链霉素、100 u/ml青霉素钠)中, 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂及饱和湿度培养箱中培养3~5 d, 待细胞达80%汇合度时, 传代。收集对数生长期细胞, 制成单细胞悬液用于进一步实验。

1.2.2 MTT比色分析检测H9c2细胞存活率 取对数生长期H9c2细胞, 调节细胞密度为 1×10^5 个细胞/ml细胞悬液, 接种于96孔板中, 每孔200 μ l, 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂及饱和湿度下培养。待细胞贴壁后弃上清, 参照文献[5]及预实验结果, TGF- β_1 模型组每孔加入DMEM培养基, Heparin组每孔加入100 μ g/ml Heparin, FGF-1组每孔加入20 ng/ml FGF-1, FGF-1/Heparin组每孔加入20 ng/ml FGF-1和100 μ g/ml Heparin, 正常对照组每孔加入DMEM培养基, 每组设6个平行孔。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂及饱和湿度下分别培养12 h, 弃上清。正常对照组每孔加入DMEM培养

基, 其余各组均每孔加入 20 ng/ml TGF- β_1 , 继续培养 12 h 后, 各组每孔加入 MTT 溶液 (0.5 mg/ml) 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 及饱和湿度下继续培养 4 h, 弃去上清液, 每孔加入 DMSO 150 μ l, 振荡 10 min。Rayto RT-6100 酶标仪于 490 nm 波长处测定 A 值。计算细胞存活率。存活率 (%) = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$, 取 6 孔平均值。

1.2.3 TUNEL 染色检测 H9c2 细胞凋亡 使用 TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒检测 FGF-1 对 TGF- β_1 诱导的 H9c2 细胞凋亡的影响。给药及分组方法同“1.2.2”, PBS 冲洗 2 次, 每次 3 min, 然后 -20 $^{\circ}$ C 甲醇固定 15 min。PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, 加入 50 μ l TUNEL 反应液, 避光 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。PBS 冲洗 2 次, 每次 3 min, Hoechst 33258 染料 37 $^{\circ}$ C 避光染色 10 min。Olympus BX43 荧光显微镜观察细胞核的形态。每个图片随机选取 6 个高倍视野, 计算凋亡指数 (apoptotic index, AI), AI (%) = TUNEL 阳性细胞数 / 细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.2.4 Western blot 检测 给药及分组方法同“1.2.2”, 加入含有 25 mmol/L HEPES、1% Tris-HCl、50 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L EGTA、1 mmol/L PMSF 和 1 μ g/ml 亮氨酸的冰冷的裂解缓冲液 (pH=7.4), 10 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 弃沉渣, 收集上清液, BCA 法测定总蛋白浓度。取 30 μ g 蛋白上样后进行 10%SDS-PAGE 凝胶电泳。当电泳完成后, 电转至 0.45 μ m PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉 PBST 4 $^{\circ}$ C 封闭 2 h。然后加入兔抗人 caspase-3 单克隆抗体, 兔抗人 caspase-8 单克隆抗体, 兔抗人 caspase-9 单克隆抗体 (1 : 1 000 稀释) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBST 洗涤后, 加入生物素标记的山羊抗兔第二抗体 (1 : 500 稀释) 室温孵育 2 h。PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, ECL 化学发光试剂显色, Bio-Rad 凝胶成像系统对各组条带进行计值及统计学分析。 β -actin 抗体孵育方法与上述方法相同, 蛋白的相对表达水平 = 目标蛋白表达水平 / β -actin 蛋白表达水平。每份样品检测 6 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件进行统计分析, 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较, 采用单因素方差分析, 组间两两比较, 采用 SNK 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FGF-1 对 TGF- β_1 诱导的 H9c2 细胞存活率的影响

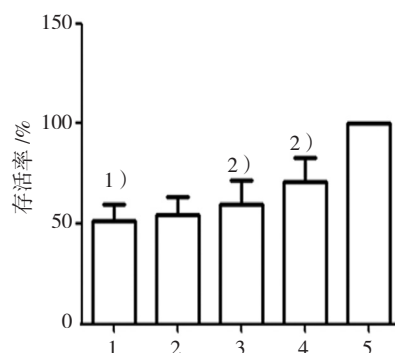
MTT 比色分析结果显示, 模型组 H9c2 细胞存活率降低, 与正常对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); FGF-1 组和 FGF-1/Heparin 组 H9c2 细胞存活率升高, 与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。以上结果表明, FGF-1 对 TGF- β_1 诱导的 H9c2 细胞损伤具有保护作用。见图 1。

2.2 FGF-1 对 TGF- β_1 诱导的 H9c2 细胞凋亡的影响

TUNEL 染色结果显示, 模型组 H9c2 细胞凋亡指数升高, 与正常对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); FGF-1 组和 FGF-1/Heparin 组 H9c2 细胞凋亡指数降低, 与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。以上结果表明, FGF-1 对 TGF- β_1 诱导的 H9c2 细胞凋亡具有抑制作用。见图 2。

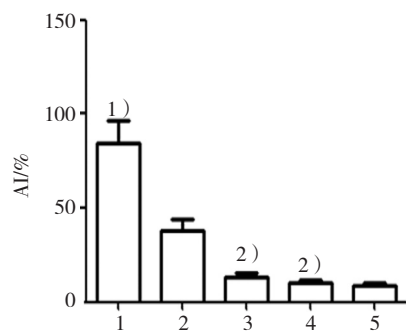
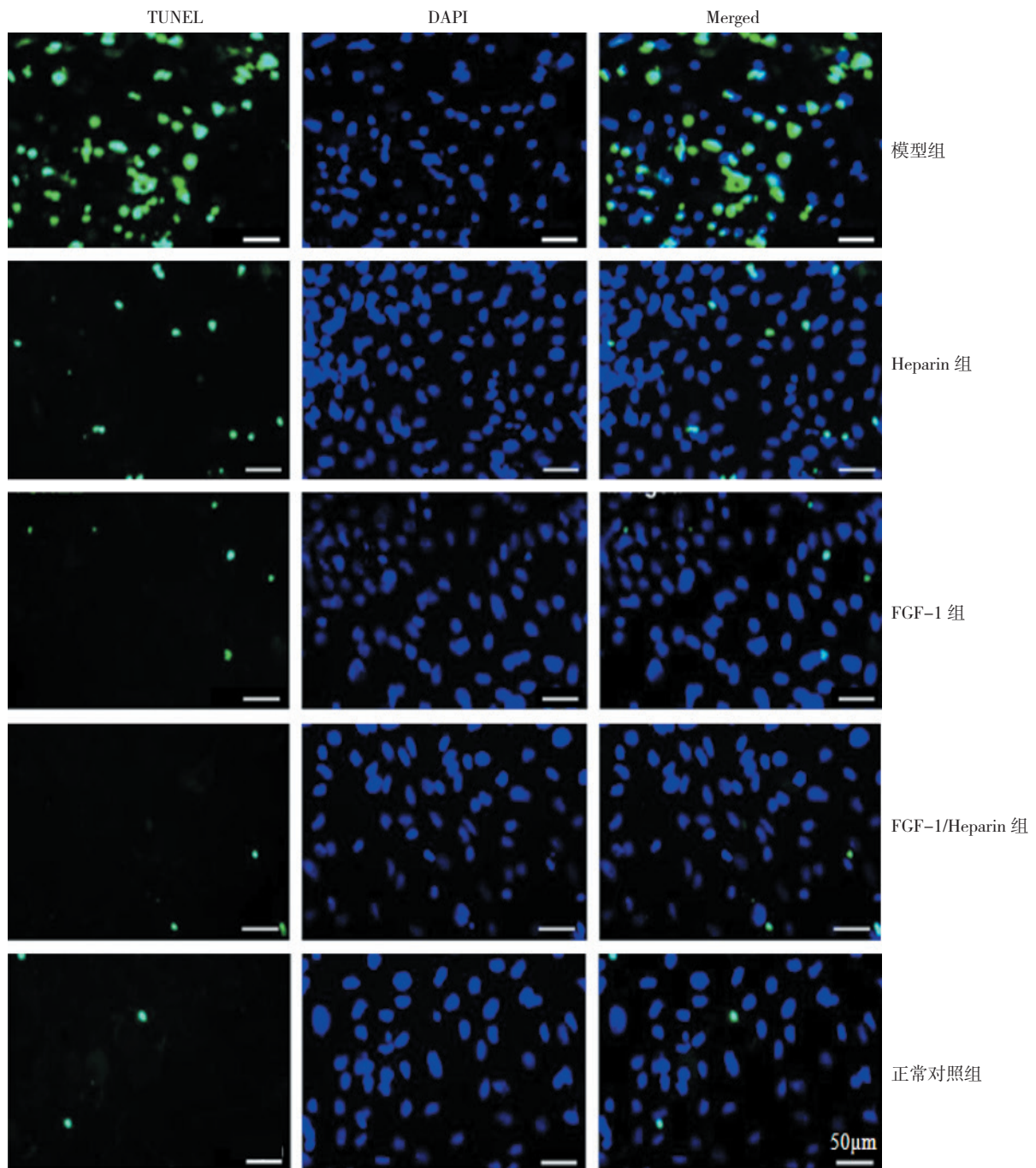
2.3 FGF-1 对 TGF- β_1 诱导的 H9c2 细胞 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 表达的影响

Western blot 结果显示, 模型组 H9c2 细胞 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 表达升高, 与正常对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); FGF-1 组和 FGF-1/Heparin 组 H9c2 细胞 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 表达降低, 与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。以上结果表明, FGF-1 对 TGF- β_1 诱导的 H9c2 细胞 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 表达具有抑制作用。见图 3。



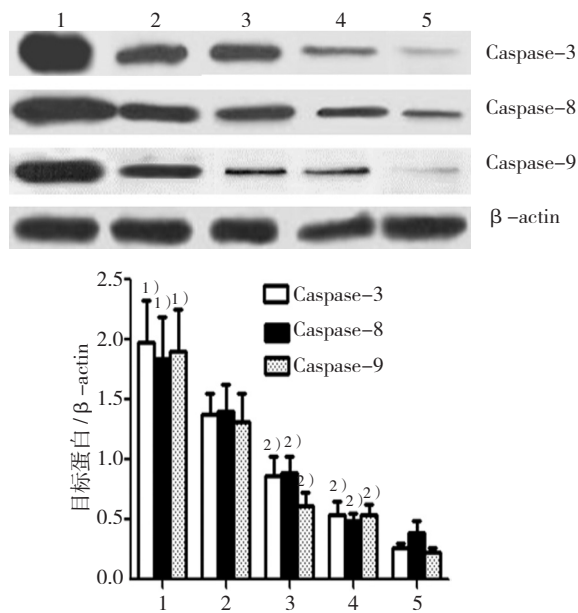
1: 模型组; 2: Heparin 组; 3: FGF-1 组; 4: FGF-1/Heparin 组; 5: 正常对照组。1) 与正常对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

图 1 FGF-1 对 TGF- β_1 诱导的 H9c2 细胞存活率的影响



1: 模型组; 2: Heparin 组; 3: FGF-1 组; 4: FGF-1/Heparin 组; 5: 正常对照组; 1) 与正常对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

图 2 FGF-1 对 TGF- β_1 诱导的 H9c2 细胞凋亡的影响



1: 模型组; 2: Heparin 组; 3: FGF-1 组; 4: FGF-1/Heparin 组; 5: 正常对照组。1) 与正常对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

图 3 FGF-1 对 TGF- β_1 诱导的 H9c2 细胞 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 表达的影响

3 讨论

FGF 是一类多肽类物质, 其中大多数成员可与肝素结合发挥作用, 单独作用对细胞效果一般。因此, 一般使用肝素与 FGF-1 一起作用, 提高 FGF-1 的药效^[6]。本研究结果发现, FGF-1 可提高 H9c2 细胞的存活率, FGF-1 对 H9c2 细胞具有明显的保护作用。

细胞凋亡是指发生在生理状态下的细胞程序性死亡, 其特点是不发生炎症反应。本研究 TUNEL 染色发现, FGF-1 对 TGF- β_1 诱导的 H9c2 细胞凋亡具有抑制作用。细胞凋亡受分子水平的调控^[7], 为探讨 FGF-1 对 TGF- β_1 诱导的 H9c2 细胞抗凋亡的可能机制, 本研究对 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 进行了检测。Caspases 是在细胞凋亡中起关键作用的酶家族, 是细胞凋亡的介导者和执行者, 激活或超量表达均会引起细胞凋亡, 又称凋亡蛋白酶, 对凋亡起关键作用^[8]。有研究表明^[9], 细胞的凋亡是由于 Caspase 逐步发生级联反应引起的。Caspase-3 位于 Caspases 级联反应的下游, 被认为是诱导细胞凋亡真正的实施者^[10]。经典的细胞凋亡途径分为 2 条, 包括细胞外途径和细胞内凋亡途径^[11]。在细胞外途径过程中, 死亡配体和相对应的受体结合形成死亡信号, 接着再与信号传导分子相连接, 进一步和

Caspase-8 结合, 形成死亡诱导信号复合物, 从而使 Caspase-8 活化, 当 Caspase-8 直接与 Caspase-3 发生作用, Caspase-3 被激活, 进而诱导细胞凋亡^[12]。而细胞内途径也称为线粒体途径, 在此途径中, 凋亡刺激因子与凋亡蛋白酶激活因子 1 (apoptotic protease activating factor 1, APAF1) 形成多聚复合物, 然后胞质中的 Caspase-9 前体结合, 形成巨大复合物, 巨大复合物引起 Caspase-9 前体活化, Caspase-9 再激活下游的 Caspase-3, 从而发生级联反应, 最后诱导细胞凋亡^[13]。心肌细胞的凋亡作用可能是非缺血和 / 或缺血性心脏病患者心肌细胞死亡的一种形式。一旦心肌细胞发生凋亡, 原有的心肌即被胶原纤维所取代, 继而心肌就会进一步发生纤维化、肥厚、心室重构等, 最终发展至心力衰竭^[14]。因此, 有关于心肌细胞的凋亡作用及机制越来越受到国内外学者的广泛重视。研究表明, TGF- β_1 是在 HF 过程中急剧增加的细胞因子中的一员, 心肌细胞在 TGF- β_1 的刺激下可发生细胞凋亡, TGF- β_1 作为导致心肌纤维化诸多因素最后的共同中介之一, 被认为是影响心肌纤维化最直接, 也是最重要的细胞因子^[15]。本研究 Western blot 结果显示, FGF-1 对 TGF- β_1 诱导的 H9c2 细胞 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 表达也具有抑制作用。以上结果提示, FGF-1 可能通过抑制 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 的表达从而对 TGF- β_1 诱导的 H9c2 心肌细胞具有抗凋亡作用。

综上所述, FGF-1 对 TGF- β_1 诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡具有抑制作用, 其机制可能与抑制 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 的表达有关。

参考文献:

- [1] SANTIAGO J J, DANGERFIELD A L, RATTAN S G, et al. Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in vitro: expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts[J]. Dev Dyn, 2010, 239(6): 1573-1584.
- [2] LECHT S, FOERSTER C, ARIEN-ZAKAY H, et al. Cardiac microvascular endothelial cells express and release nerve growth factor but not fibroblast growth factor-2[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2010, 46(5): 469-476.
- [3] XIAO J, LV Y, LIN S, et al. Cardiac protection by basic fibroblast growth factor from ischemia / reperfusion-induced injury in diabetic rats[J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(3): 444-449.
- [4] FERRARO B, CRUZ Y L, BALDWIN M, et al. Increased perfusion and angiogenesis in a hindlimb ischemia model with plasmid FGF-2 delivered by noninvasive electroporation[J]. Gene Ther, 2010,

- 17(6): 763-769.
- [5] RAMOS C I, MONTAÑO M, BECERRIL C, et al. Acidic fibroblast growth factor decreases α -smooth muscle actin expression and induces apoptosis in human normal lung fibroblasts[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 291(5): L871-L879.
- [6] CARLOS R, CARINA B, MARTHA M, et al. FGF-1 reverts epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 through MAPK / ERK kinase pathway[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 299(2): L222-L231.
- [7] EMOTO Y, YOSHIZAWA K, KINOSHITA Y, et al. Green tea extract attenuates MNU-induced photoreceptor cell apoptosis via suppression of heme oxygenase-1[J]. *J Toxicol Pathol*, 2016, 29(1): 61-65.
- [8] 张巍, 金瑛, 朱文赫, 等. 肽基脯氨酰顺反异构酶抑制剂胡桃醌对宫颈鳞癌 SiHa 细胞凋亡的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(3): 543-546.
- [9] 石元英, 邓立东, 饶伟文, 等. 牡荆素对人肝细胞癌 SMMC-7721 细胞的增殖抑制作用及其机制的影响 [J]. *中国医院药学杂志*, 2016, 36(5): 366-371.
- [10] LANGFORD M P, MCGEE D J, TA K H, et al. Multiple caspases mediate acute renal cell apoptosis induced by bacterial cell wall components[J]. *Ren Fail*, 2011, 33(2): 192-206.
- [11] WALTHER U, EMMRICH K, RAMER R, et al. Lovastatin lactone elicits human lung cancer cell apoptosis via a COX-2 / PPAR γ -dependent pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(9): 10345-10362.
- [12] BRASSEUR K, AUGER P, ASSELIN E, et al. Parasporin-2 from a new bacillus thuringiensis 4R2 strain induces caspases activation and apoptosis in human cancer cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0135106.
- [13] MEANS J C, VENKATESAN A, GERDES B, et al. Drosophila spaghetti and doubletime link the circadian clock and light to caspases, apoptosis and tauopathy[J]. *PLoS Genet*, 2015, 11(5): e1005171.
- [14] 许闪, 王靓, 黄金玲, 等. 苓桂术甘汤含药血清对 TGF- β 1 诱导的大鼠心肌细胞株 H9c2 凋亡的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(3): 5-8.
- [15] SCHNEIDERS D, HEGER J, BEST P, et al. SMAD proteins are involved in apoptosis Induction in ventricular cardiomyocytes[J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 67(1): 87-96.

(张蕾 编辑)