

氯化钴对 H9c2 心肌细胞新基因 Mip1 表达的影响 *

雷 坚¹ 王慷慨^{2△} 刘小柳² 王桂良¹ 刘 瑛² 刘梅冬² 肖献忠²

(1 中南大学湘雅医学院病理生理学系 湖南 长沙 410078 萍乡市人民医院 江西 萍乡 337000 ;

2 中南大学湘雅医学院病理生理学系 湖南 长沙 410078)

摘要 目的 研究氯化钴 (CoCl₂) 对大鼠胚胎心脏来源的 H9c2 心肌细胞中新基因 Mip1 表达的影响。**方法** 利用不同浓度的 CoCl₂ (0、100、200、300、400、500 μmol/L) 处理 H9c2 细胞 9h, 及 200 μmol/L CoCl₂ 处理 H9c2 细胞不同的时间 (0、6、9、12、24h) 后, 用 RT-PCR 和 Western Blot 分别观察 H9c2 细胞 Mip1 mRNA 和蛋白的表达情况。**结果** CoCl₂ 可以诱导 H9c2 细胞中 Mip1 mRNA 和蛋白表达升高, 200 μM CoCl₂ 处理组的 Mip1 的表达水平高于 100 μM CoCl₂ 处理组, 但是更高浓度的 CoCl₂ (>200 μM) 不能使 Mip1 的表达进一步升高。随着 CoCl₂ 作用时间的延长, Mip1 的表达逐步升高, 在 12h 达到高峰, 但是在 24h 后下降。**结论** : CoCl₂ 能够促进 H9c2 细胞新基因 Mip1 的表达, 并且具有一定的剂量和时间依赖性。

关键词 氯化钴; Mip1; H9c2; 心肌保护

中图分类号 Q95-3, R54 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 01-30-03

Effects of Cobalt Chloride on the Expression of a Novel Gene Mip1 in H9c2 Cardiomyoblast*

LEI Jian¹, WANG Kang-ka^{2△}, LIU Xiao-liu², WANG Gui-liang¹, LIU Ying², LIU Mei-dong², XIAO Xian-zhong²

(1 Department of Pathophysiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Hunan Changsha, 410078, Pingxiang People's Hospital, Jiangxi Pingxiang, 337000; 2 Department of Pathophysiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Hunan Changsha, 410078)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of Cobalt chloride (CoCl₂) on the expression of a novel gene Mip1 in H9c2 rat cardiomyocytes. **Methods:** Various concentration of CoCl₂ (0, 100, 200, 300, 400, 500 μmol/L) was used to treat H9c2 cells for 9h, and 200 μmol/L CoCl₂ was used to treat H9c2 cells for various periods of time (0, 6, 9, 12, 24h), then RT-PCR and Western Blot were used to observe the expression of Mip1 in H9c2 cells. **Results:** The expression of Mip1 mRNA and protein was enhanced by CoCl₂ in H9c2 cells. Compared with the group of 100 μmol/L CoCl₂, the expression of Mip1 was higher in the group of 200 μmol/L CoCl₂. However, the expression of Mip1 did not improve treated by more higher concentration of CoCl₂ (>200 μM). With the time of CoCl₂ treatment extending, the expression of Mip1 gradually increased, and reached peak at 12h, but decreased at 24h. **Conclusion:** Treatment of H9c2 rat cardiomyocytes with CoCl₂ resulted in a limitedly dose-and time-dependent increase in a novel gene Mip1 expression.

Key words: Cobalt chloride; Mip1; H9c2; myocardium protection

Chinese Library Classification: Q95-3, R54 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)01-30-03

前言

Mip1 是本实验室采用大鼠心肌缺血预适应动物模型, 运用抑制消减杂交和 cDNA 芯片相结合技术筛选到的一个新基因, 命名为心肌缺血预适应表达上调蛋白 (Myocardial ischemic preconditioning upregulated protein 1, Mip1, 又名 Mip1、Znf667), 该基因的 GenBank 登录号为 AY221750, 为一典型的 KRAB-C2H2 型锌指蛋白。多组织膜 RNA 印迹显示, Mip1 在心脑表达较高, 在其他组织表达很少^[1]。初步功能研究显示 Mip1 是一个锌指型核转录抑制因子^[2], 可抑制 MAPK 信号途径中的 AP-1 和 SRE 的转录活性^[3], 抑制促凋亡基因 Bid 的转

录表达^[4], 并能抵抗去血清对 C2C12 小鼠肌原细胞生长的抑制作用^[5]。王桂良发现, 在大鼠心肌缺血 - 再灌注的模型中, Mip1 在心肌缺血 30min 再灌注 3h 后表达上调, 6h 后达到高峰并持续至 12h; 并且用过氧化氢处理 H9c2 心肌细胞, 也可以使 Mip1 的表达升高。由此推断, Mip1 可能在心肌细胞应对缺血及氧化应激过程中起着重要作用^[6]。然而 Mip1 作为新基因, 其表达受何种因素影响, 以及相关的表达调控机制, 目前尚不清楚。

已知 CoCl₂ 可以模拟细胞缺氧的环境^[7,8], 而在心肌组织缺血的同时也伴随着细胞缺氧, 因此本研究用 CoCl₂ 处理 H9c2 大鼠心肌细胞, 体外观察心肌细胞缺氧时 Mip1 表达的时空变

* 基金项目 国家自然科学基金面上项目 (30770855)

作者简介 雷坚, (1983), 男, 硕士研究生, 主要研究方向 心血管病理生理,

电话 15107998533, E-mail: lejian_2006@sina.com

△通讯作者 王慷慨, E-mail: kangkaiwang@yahoo.com

(收稿日期 2010-10-08 接受日期 2010-10-31)

化模式。

1 材料与方法

1.1 材料

H9c2 大鼠心肌细胞株购自美国 ATCC, CoCl₂、小鼠抗 β -actin 单克隆抗体购自 Sigma 公司, M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司, Trizol 购自 Invitrogen, 兔抗 Mipul1 多克隆抗体为本实验室自己制备, DAB 显色试剂盒、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 / 羊抗小鼠 IgG 购自博士德公司, 引物为上海博尚生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和 CoCl₂ 处理 H9c2 大鼠心肌细胞株用含 10% 的新生牛血清 (杭州四季青) 的 DMEM 培养基 (Gibco) 于 37℃, 5% CO₂ 细胞培养箱中孵育。按实验分组在细胞瓶中加入 CoCl₂ 至所需的浓度, 放入培养箱中孵育一定的时间后收集细胞。

1.2.2 RT-PCR 法检测 Mipul1 及 β -actin mRNA 的表达 Trizol 试剂抽提细胞总 RNA, 紫外分光光度计测样品浓度及纯度。取 1 μ g 总 RNA, 用 M-MLV 逆转录酶逆转录合成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR 反应。利用 Primer5 自行设计引物 Mipul1 (AY221750) 上游引物 5'-CTCATCGAGTGCAAGGAATG-3', 下游引物 5'-TGCTGAGCAAGATGAGCACT-3', 扩增长度 311bp, 反应条件为 94℃ 变性 40s, 64℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 32 个循环 β -actin (NM_031144) 上游引物 5'-TGAGACCTTCAACACCCCAG-3', 下游引物 5'-GCCATCTCTTGCTC-

GAAGTC-3', 扩增长度 312bp。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 凝胶成像分析系统分析并拍照, 以目的基因与 β -actin 电泳带的荧光强度比值作为目的基因的相对表达量。

1.2.3 Western Blot 检测 Mipul1 及 β -actin 蛋白的表达 2 × SDS 加样缓冲液裂解细胞, 收集裂解液, 超声三次, 每次 5s, 14,000g 离心 10min 收集上清总蛋白, 采用 Bradford 法进行蛋白定量后, 取 50 μ g 样品经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离, 60V, 4℃ 转膜过夜, 2%BSA 室温封闭 4h, 加入一抗 (兔抗 Mipul1 多克隆抗体 1:200 稀释, 小鼠抗 β -actin 单克隆抗体 1:1000 稀释), 4℃ 过夜, 洗去一抗后, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的二抗 (1:1000 稀释), 室温孵育 1h, DAB 显色, 图像分析软件对 Mipul1 进行半定量分析。

1.3 统计学分析

用 SPSS13.0 软件处理数据, 各组数据描述以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 表示, 两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 有意义。

2 结果

2.1 不同浓度的 CoCl₂ 对 H9c2 细胞 Mipul1 表达的影响

如图 1A 所示, 100 μ M 的 CoCl₂ 预处理 H9c2 细胞 9h 后, 即可以诱导 Mipul1 mRNA 的表达, 200 μ M 的 CoCl₂ 处理可以进一步促进 Mipul1 的表达, 增加 CoCl₂ 的浓度 (一直到 500 μ M), 不能使 Mipul1 进一步升高, 各处理组与对照组相比有统计学意义。Western Blot 观察到 Mipul1 蛋白表达的变化与 mRNA 表达的变化趋势基本一致 (图 1B)。

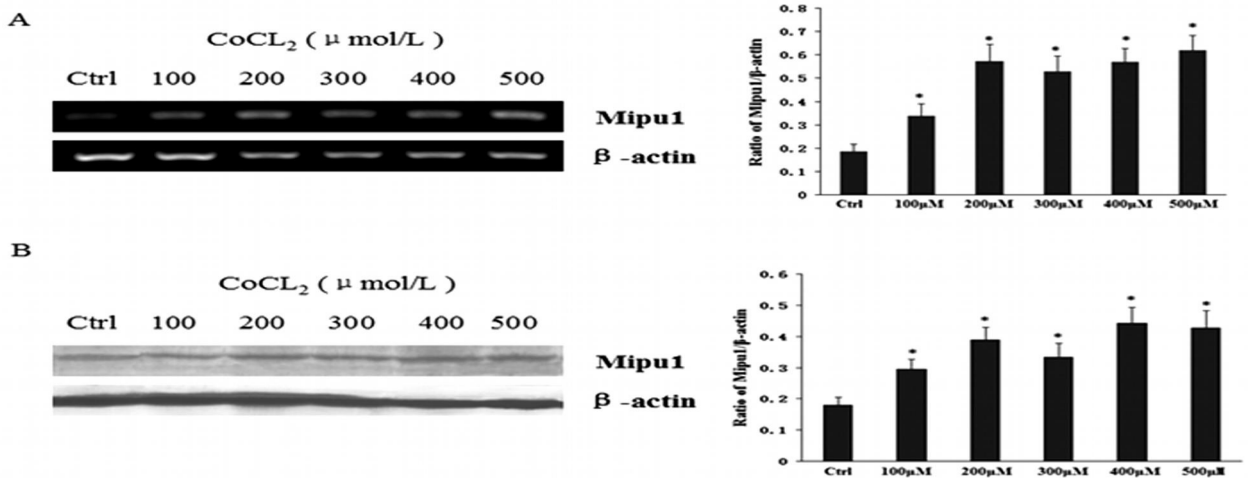


图 1 RT-PCR 和 Western Blot 观察不同浓度的 CoCl₂ 对 Mipul1 表达的影响 $\times$ Ctrl 对照组, 细胞不做任何处理; * $p < 0.05$ 与对照组相比 ($n=3$)

Figure 1 The effect of various concentration of CoCl₂ on expression of Mipul1 was observed by RT-PCR and Western Blot $\times$ Ctrl: cells without treatment;

* vs control group, $P < 0.05$ ($n=3$)

2.2 CoCl₂ 处理 H9c2 细胞不同的时间 Mipul1 表达情况

如图 2A 所示, 200 μ M 的 CoCl₂ 预处理细胞 6h 后, 即可以诱导 Mipul1 mRNA 的表达, 延长 CoCl₂ 处理的时间, 在 9h, 12h 后 Mipul1 mRNA 的表达仍持续升高, 但是在 24h 后下降。Western Blot 观察到 Mipul1 蛋白表达的变化与 mRNA 表达的变化趋势基本一致 (图 2B)。

3 讨论

根据文献报道, CoCl₂ 预处理小鼠可以通过上调 HIF-1 α 、

AP-1 和 iNOS 的表达, 减少心肌梗死面积, 产生延迟的心肌缺血预适应似的保护作用^[8]。更早期的报道还表明, CoCl₂ 或原卟啉钴预处理可以明显抑制大鼠心肌缺血 - 再灌注后的心肌细胞和内皮细胞的凋亡^[9], 减少心肌梗死面积, 促进大鼠心肌的血管生成^[10], 提高缺血后心室的功能^[11]和移植心的存活率^[10]。以上的研究说明, CoCl₂ 具有一定的心肌保护的作用。Mipul1 在心肌缺血预适应时表达上调, 而缺血预适应 (IP) 被认为是最为有效的内源性保护机制^[12], 结合目前 Mipul1 的研究基础, 推测 Mipul1 也可能具有心肌保护的作用。

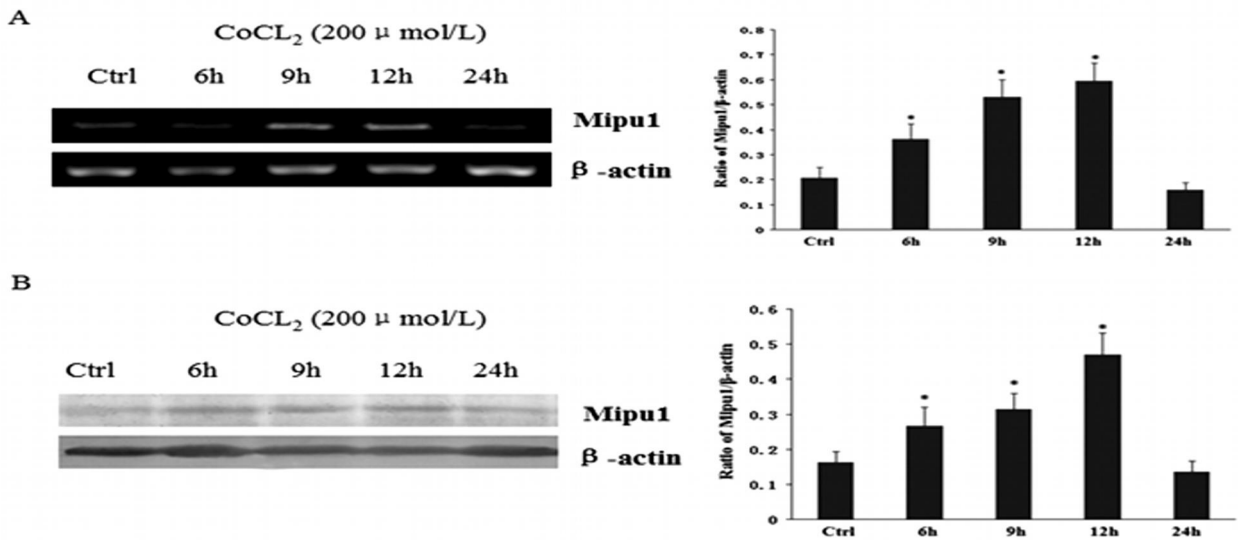


图2 RT-PCR 和 Western Blot 观察 CoCl₂ 处理 H9c2 细胞不同时间后对 Mip1 表达的影响 Ctrl 对照组,细胞不做任何处理; * $p < 0.05$ 与对照组相比 (n=3)

Figure 2 The effect of CoCl₂ treating H9c2 cells for various time on expression of Mip1 was observed by RT-PCR and Western Blot Ctrl: cells without treatment; * vs control group, $P < 0.05$ (n=3)

本实验通过以 CoCl₂ 处理 H9c2 大鼠心肌细胞,首次发现 Mip1 蛋白不仅在整体动物心肌缺血预适应时表达上调^[1],而且在心肌细胞化学性缺氧时,同样表达上调,并且 CoCl₂ 能够诱导 Mip1 mRNA 水平升高。CoCl₂ 诱导 Mip1 的表达还存在一定的剂量和时间依赖性,然而更高浓度的 CoCl₂ (>200 μM) 不能促进 Mip1 的表达进一步升高,CoCl₂ 长时间的作用(>12h),还可能致 Mip1 的表达下调。本室的研究人员利用生物信息学发现,在 Mip1 启动子区存在一个缺氧诱导因子-1(HIF-1)保守的缺氧反应元件(HRE) 5'-RCGTG-3',提示 HIF-1 可能是 Mip1 的上游调控因子,而 CoCl₂ 可以通过阻止 HIF-1 的活性亚单位 HIF-1α 降解,促进 HIF-1 对靶基因的转录调控^[13]。由此,可以推测,CoCl₂ 促进 Mip1 表达的机制可能是通过增强 HIF-1α 与 Mip1 启动子的 HRE 结合来促进该新基因的转录和表达。然而,其确切的机制还需要我们进一步的研究加以证实。开展本课题有助于研究 Mip1 与 HIF-1 在心肌缺血缺氧病理生理过程中的联系,并有利于进一步探讨 Mip1 在心肌缺血预适应中的心肌保护作用机制,为心肌缺血性疾病的防治研究提供一定的实验依据。

参考文献(References)

- [1] 袁灿,张华莉,刘瑛,等. 一个大鼠心肌缺血-再灌注诱导表达上调的新基因 MIP1 的克隆和特性分析 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(3):231-236
Yuan Can, Zhang Hua-Li, Liu Yin, et al. Cloning and characterization of a new gene Mip1 up-regulated during myocardial ischemia-reperfusion [J]. Prog.Biochem.Bio phys, 2004,31 (3):231-236
- [2] Jiang L, Tang DL, Xiao XZ, et al. Functional analysis of a novel KRAB/C2H2 zinc finger protein Mip1 [J]. Biochem. Biophys. Res. Commun, 2007, 345(4): 829-835
- [3] Wang GL, Zuo XX, Yuan C, et al. Mip1, a novel rat zinc-finger protein, inhibits transcriptional activities of AP-1 and SRE in mitogen-activated protein kinase signaling pathway [J]. Mol Cell Biochem,2009,322:93-102
- [4] 刘小柳,邓恭华,雷坚,等. Mip1 对大鼠心肌细胞凋亡基因 Bid 转录调控作用的初探[J].现代生物医学进展, 2009, 9(7):1230-1232

- Liu Xiao-liu, Deng Gong-hua, Lei Jian, et al. Study on Transcriptional Regulation Role of Mip1 on Apoptosis-related Gene Bid in H9C2 Cells[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009, 9(7):1230-1232
- [5] 袁灿,王秋鹏,刘瑛,等. 新基因 Mip1 的过表达对去血清培养条件下 C2C12 细胞生长周期的影响 [J]. 医学临床研究, 2004, 21(8): 837-839
Yuan Can, Liu Ying, Wang Qiu-peng, et al. Effects of new gene Mip1 over-expression on the cell growth cycle of C2C12 cells cultured under condition of serum withdrawal [J]. J Clin Res, 2004, 21(8): 837-839
- [6] Guiliang Wang, Xiaoxia Zuo, Xianzhong Xiao, et al. Expression of Mip1 in Response to Myocardial Infarction in Rats [J]. Int. J. Mol. Sci. 2009, 10, 492-506
- [7] Piret JP, Mottet D, Raes M, et al. CoCl₂, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2[J]. Ann NY Acad Sci, 2002,973: 443-447
- [8] Xi L, Taher M, Yin C. Cobalt chloride induces delayed cardiac preconditioning in mice through selective activation of HIF-1α and AP-1 and iNOS signaling [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287: 2369-2375
- [9] Katori M, Buelow R, Ke B, et al. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an anti-apoptotic pathway[J]. Transplantation,2002, 73: 287-292
- [10] Rakusan K, Cicutti N, Kolar F. Cardiac function, microvascular structure, and capillary hematocrit in hearts of polycythemic rats [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001,281: 2425-2431
- [11] Endoh H, Kaneko T, Nakamura H, et al. Improved cardiac contractile functions in hypoxia-reoxygenation in rats treated with low concentration Co²⁺[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 279: 2713-2719
- [12] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.Circulation 1986; 74: 1124-1136
- [13] Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, et al. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 alpha by the ubiquitin-proteasome pathway [J]. J Biol Chem, 1999, 274 :6519-6525