

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.09.011

MFN1 介导的线粒体融合在心肌细胞凋亡中的作用研究 *

支伟伟^{1#} 陈丽娜^{2#} 李 凯¹ 雷 鸣¹ 梁宏亮^{1,2Δ}

(1 西安市第三人民医院心血管外科 陕西 西安 710021; 2 第四军医大学西京医院心血管外科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨线粒体融合关键蛋白 MFN1 介导的线粒体融合在调控心肌细胞凋亡中的作用。**方法:**通过 siRNA 降低体外培养 H9C2 心肌细胞中 MFN1 的表达后,采用 Western blot 检测线粒体细胞色素 c (Cyto c) 释放及其下游凋亡效应分子 Caspase9 与 Caspase3 活性,流式细胞术检测细胞内活性氧(ROS)的产生情况,流式细胞术检测细胞凋亡的情况。**结果:**干扰 MFN1 可显著促进 H9C2 心肌细胞内细胞色素 c 由线粒体释放至胞浆,促进 Caspase9 与 Caspase3 的激活,增加细胞内活性氧 ROS 产生并提高细胞凋亡率(均 $P<0.05$)。**结论:**MFN1 介导的线粒体融合可保护心肌细胞凋亡,其机制可能与抑制 ROS 产生与细胞色素 C 释放有关。

关键词:MFN1; 线粒体融合; 心肌细胞; 凋亡

中图分类号:R-33; Q244; R54 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)09-1654-04

Effect of MFN1 Mediated Mitochondrial Fusion on the Apoptosis of H9C2 Cardiomyocytes*

ZHI Wei-wei^{1#}, CHEN Li-na^{2#}, LI Kai¹, LEI Ming¹, LIANG Hong-liang^{1,2Δ}

(1 Department of Cardiovascular Surgery, Xi'an No. 3 Peoples Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710021, China;

2 Department of Cardiovascular Surgery, Xijing Hospital, The Forth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the role of MFN1-mediated mitochondrial fusion in the regulation of cardiomyocyte apoptosis.

Methods: After knocking down of MFN1 with siRNA in H9C2 cardiomyocytes, cytochrome c release, caspase9 and caspase3 activation, intracellular ROS and cell apoptosis were evaluated by western blotting and flow cytometry. **Results:** 1). MFN1 significantly promoted the release of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol, activation of caspase9 and caspase3 ROS production and apoptosis of H9C2 cardiomyocytes (all $P<0.05$). **Conclusion:** MFN1-mediated mitochondrial fusion protects cardiomyocyte from apoptosis, which could be partially explained by the inhibition of ROS production and cytochrome c release.

Key words: MFN1; Mitochondrial fusion; Cardiomyocytes; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q244; R54 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)09-1654-04

前言

致心肌损伤中,细胞凋亡是心肌细胞死亡的重要方式之一^[1]。大量研究已证实多种心脏疾病如心律失常、心衰、缺血性心脏病和部分先天性心脏病的发生发展均与细胞凋亡密切相关^[2]。因此,增强心肌细胞抗凋亡能力是减少心肌损伤的有效途径。线粒体是细胞内参与能量代谢、凋亡及氧化还原稳态调控的重要细胞器^[3]。细胞内线粒体并非以单个游离形式存在,而是通过不断的分裂与融合调控自身大小与形态,进而对线粒体生理功能发挥调控作用^[4]。心肌细胞具有高密度的线粒体分布,以往研究显示心肌细胞线粒体分裂融合异常活跃^[5]。然而,线粒体分裂融合在心肌细胞凋亡中的作用目前尚不十分清楚。本研究旨在探讨 MFN1 介导的线粒体融合在心肌细胞凋亡中的调控作用,并对其调控机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 主要材料

H9C2 心肌细胞购自中科院上海生命细胞所。细胞培养液 DMEM、胎牛血清与胰蛋白酶均购自 Hyclone 公司。脂质体 lip2000 购自 invitrogen(货号 11668-019),活性氧检测试剂盒、线粒体分裂试剂盒、RIPA 裂解液与 BAC 蛋白定量试剂盒均购自碧云天生物科技公司(货号分别为 S0033, C3601, P0013B 与 P0009)。细胞色素 c、Caspase-9、Caspase- 与内参 β -actin 抗体均购自武汉三鹰生物公司(货号分别为 10993-1-AP、66169-1-Ig、25546-1-AP 与 60008-1-Ig),线粒体内参 COX I 抗体购自 AB-GENT(货号 AP9153a)。

委托上海吉玛公司合成靶向 MFN1 的 siRNA 干扰片段 (si-MFN1): 正义序列为:5'-GGAUCACAUUUUGUUGAAGTT

* 基金项目:陕西省创新能力支撑计划 -- 青年科技新星项目(2017KJXX-05)

作者简介:支伟伟(1980-),男,硕士,主治医师,主要研究方向:心血管疾病,E-mail: zweiwei0331@sina.com

陈丽娜(1983-),女,硕士,住院医师,主要研究方向:心血管疾病,E-mail: linachen0@163.com

为共同第一作者

Δ 通讯作者:梁宏亮(1982-),男,博士,副教授,主要研究方向:心血管疾病,E-mail: lianghongliang001@163.com,电话:(029)84775307

(收稿日期:2017-11-14 接受日期:2017-12-10)

-3',反义序列为:5'-CUUCAACAAAAUGUGAUCCTT -3'。无关对照干扰片段(si-Ctrl):正义序列为:5'-UUCUCCGAACGUGU-CACGUTT-3'。反义序列为:5'-ACGUGACACGUUCGGA-GAATT-3'。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 细胞培养与 siRNA 干扰处理 用含 10 %胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素的 DMEM 培养基培养 H9C2 心肌细胞,于 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 培养。每隔 2 天更换培养基一次,细胞长至对数期后接种至 6 孔板中(2×10^5 个 / 孔),过夜培养后进行 siRNA 干扰处理。采用脂质体法进行 siRNA 干扰处理,操作步骤严格按 lip2000 说明书进行:首先,在干净的 EP 管中分别用不含血清的 DMEM 培养基稀释 siRNA 与 lip2000,于室温下放置 5 min,接着用移液器将二者轻柔混匀并置于室温下放置 30 min,随后将 100 μ L 的 siRNA 与 lip2000 混合物加入 6 孔板中,培养 5 h 后更换新鲜的含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养 24 h,用胰酶消化收集细胞用于后续实验。

1.2.2 细胞总蛋白、线粒体蛋白及胞浆蛋白提取 细胞干扰处理后,弃去培养基并用预冷过的 PBS 清洗两次,之后用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞并提取细胞总蛋白(12000 $\times$ g,4 °C 离心 25 min),用 BAC 法对各组细胞蛋白浓度测定后加入上样缓冲液煮沸 5 min,样品保存于 -20 °C 冰箱备用。

线粒体蛋白及胞浆蛋白提取:首先,利用线粒体分离试剂盒离心分离线粒体,操作步骤严格按试剂盒说明书进行。当离心得到线粒体后(沉淀为线粒体,上清中蛋白为去除线粒体的胞浆蛋白),加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解 30 min,之后 12000 $\times$ g 于 4 °C 下离心 25 min。最后,用 BAC 法对各组蛋白浓度测定后加入上样缓冲液煮沸 5 min,样品保存于 -20 °C 冰箱备用。

1.2.3 Western Blot 按 BCA 蛋白定量结果将各组蛋白稀释至相同浓度,随后上样并电泳(上下层胶分别用 80 V 与 120 V 恒压电泳),电泳结束后将凝胶中蛋白转移至 PVDF 膜 (100 V 恒压),随后用 5 %脱脂奶粉封闭 1 h,分别加入一抗与二抗进行反应,一抗反应条件为 4 °C 过夜,二抗为 28 °C 孵育 2 h。一二抗孵育结束后均用含 0.1 %吐温的 PBS 清洗 3 次(每次 5 min)。最后,用 ECL 化学发光系统对结果进行检测与分析。

1.2.4 细胞活性氧水平检测 采用荧光探针 DCFH-DA 对细胞内活性氧(ROS)水平进行检测,实验操作严格按试剂说明进行,主要步骤包括:首先,用胰酶消化并收集各组细胞,之后用无血清 DMEM 培养液稀释过终浓度为 10 mM 的 DCFH-DA 重悬细胞并置于 37 °C 孵育 20 min(每隔 5 min 轻柔颠倒混匀一次)。最后用流式细胞仪对结果进行检测。

1.2.5 细胞凋亡检测 心肌细胞中 MFN1 表达进行干扰处理后,用不含 EDTA 的胰酶消化并收集细胞并用 PBS 洗两次,随后加入 500 μ L 的 Binding Buffer 重悬浮细胞,之后加入 Annexin V 与 PI 染液,室温避光反应 20 min。最后,用流式细胞术进行检测。

1.3 统计学处理

用 SPSS 16.0 统计软件对结果进行分析,采用单因素方差分析比较多组间差异,进一步采用 SNK-q 检验比较两组间差

异,以 P 值小于 0.05 定义为差异具统计学意义。

2 结果

2.1 干扰 MFN1 促进 H9C2 心肌细胞线粒体中细胞色素 c 的释放

为研究 MFN1 介导的线粒体融合在心肌细胞凋亡中作用,我们首先合成了靶向 MFN1 的 siRNA 片段,并对其干扰效率进行 western blot 验证,结果如图 1 所示,si-MFN1 可显著抑制大鼠心肌细胞 H9C2 中 MFN1 的表达。

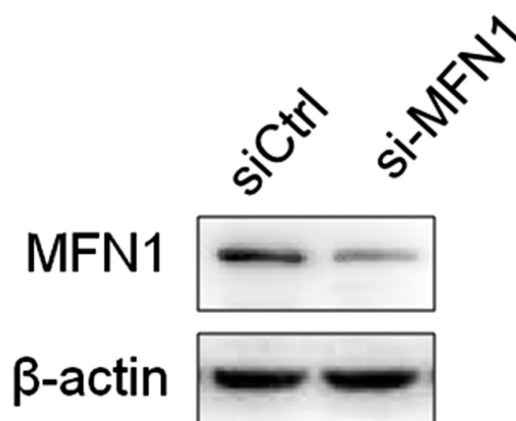


图 1 H9C2 细胞中 si-MFN1 干扰效率的 Western blot 分析

Fig. 1 Western blot analysis for RNA interference efficiency of MFN1 in H9C2 cells

以往研究证实线粒体融合可通过使嵴形态重塑阻碍线粒体内膜中细胞色素 C(Cyt c)释放至胞浆中,进而抑制下游 Caspase 9 及 Caspase 3 等凋亡执行蛋白的激活,最终抑制细胞凋亡^[6]。为分析心肌细胞中 MFN1 介导的线粒体融合对上述凋亡关键因子的调控作用,我们在干扰 MFN1 后,用 Western blot 对线粒体及胞浆中 Cyt c 水平及细胞内 Caspase 9 与 Caspase 3 活性进行分析,结果显示干扰 MFN1 后,胞浆中 Cyt c 水平显著增加,活化的 Caspase 9 与 Caspase 3 水平均升高(见图 2)。由此证明 MFN1 介导的线粒体融合可阻碍心肌细胞线粒体 Cyt c 释放,进而抑制下游凋亡效应分子 Caspase 9 与 Caspase 3 剪切与激活。

2.2 干扰 MFN1 促进 H9C2 心肌细胞中活性氧产生

活性氧是心肌细胞内源性损伤的主要因素之一^[7,8]。以往研究证实线粒体分裂增强可促进 ROS 产生增加^[9,10]。为分析 MFN1 介导的线粒体融合对心肌细胞内活性氧产生的影响。我们在干扰 MFN1 后对 H9C2 细胞中活性氧水平进行了流式分析,结果显示:干扰 MFN1 后,H9C2 细胞中活性氧 ROS 水平显著升高(见图 3)。由此证明 MFN1 介导的线粒体融合抑制细胞内活性氧 ROS 的产生。

2.3 干扰 MFN1 的表达促进 H9C2 心肌细胞凋亡

前部分研究已证实 MFN1 介导的线粒体融合抑制线粒体细胞色素 c 释放及凋亡效应分子激活,同时抑制 ROS 产生,提示线粒体 MFN1 介导的线粒体融合极可能参与心肌细胞凋亡调控。为进一步证实 MFN1 介导的线粒体融合是否抑制心肌细胞凋亡,我们在干扰 MFN1 后,用流式细胞仪对细胞凋亡进行了分析,结果显示:干扰 MFN1 后,心肌细胞凋亡率显著增加

(见图 4), 提示 MFN1 介导的线粒体融合具有抑制心肌细胞凋亡的作用。

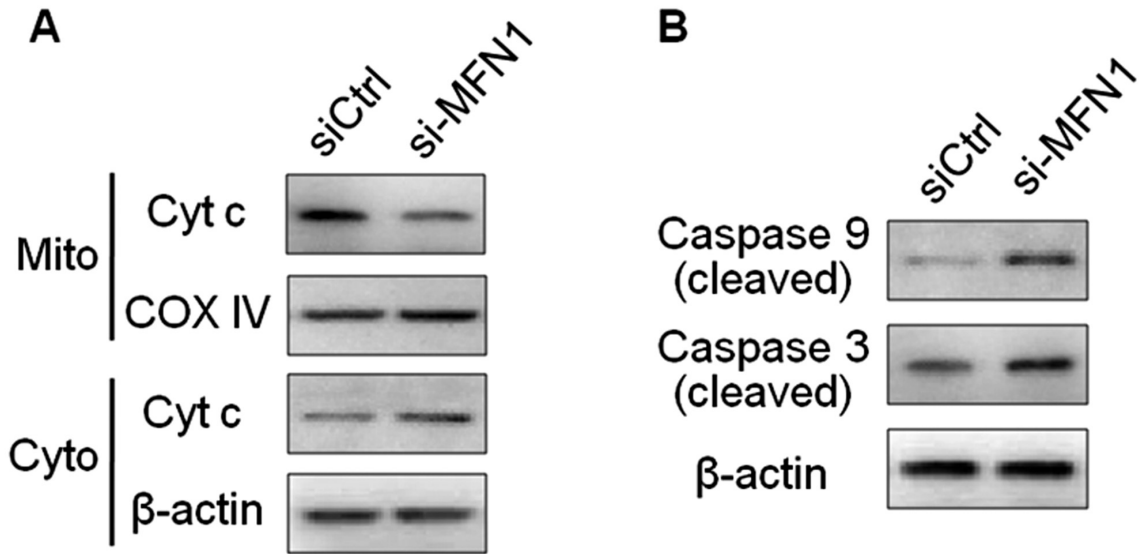


图 2 干扰 MFN1 对凋亡相关分子定位与活性的影响

A. 线粒体 Cyt c 释放 B. Caspase 9/3 活性

Fig. 2 Effects of MFN1 knocking down on the location and activity of key regulators in apoptosis. (A). Release of Cyt c from Mitochondrial (Mito) to Cytoplasm (Cyto). (B) Caspase 9/3 activity.

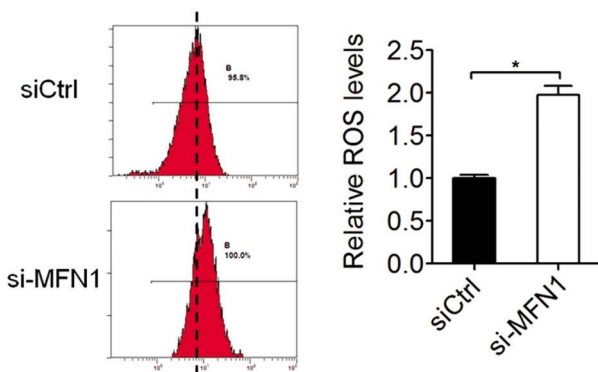


图 3 干扰 MFN1 对 H9C2 细胞活性氧产生的影响

Fig.3 Effects of MFN1 knocking down on the production of reactive oxygen species in H9C2 cells

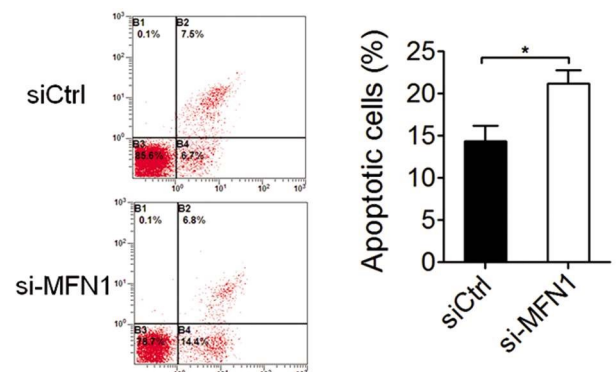


图 4 干扰 MFN1 对 H9C2 细胞凋亡的影响

Fig.4 Effects of MFN1 knocking down on the apoptosis of H9C2 cells

3 讨论

细胞凋亡是心肌细胞死亡的重要方式之一, 包括心律失常、心衰、缺血性心脏病在内的多种心脏病的发生与发展均与心肌细胞凋亡相关^[11,12]。线粒体在细胞能量代谢^[13]、细胞凋亡^[14]及氧化还原稳态^[15]调控中发挥关键作用。线粒体通过不断的分裂与融合调控自身形态与功能^[16], 该过程异常与多种疾病的发生进展密切相关^[17]。因不停地收缩运动需要消耗大量能量, 心肌细胞内含数目较多的线粒体^[18]。以往研究发现心肌细胞线粒体分裂融合异常活跃^[19]。然而, 线粒体分裂融合在心肌细胞凋亡中的作用却不十分清楚。

以往在多个非心肌细胞中的研究证实线粒体分裂融合在细胞凋亡中发挥调控作用。如 Ryan J 等在在肺动脉高压模型中研究证实线粒体分裂与融合在血管内皮细胞凋亡调控中发挥重要作用^[20]。Lee WC 等发现线粒体分裂可促进近端肾小管上皮细胞凋亡^[21]。Li X 等研究证实 cAMP 介导的 PKA 与线粒

体融合可保护足细胞免于凋亡^[22]。此外, 多个研究均证实线粒体分裂在心肌缺血再灌所致的心肌细胞凋亡中发挥重要的调控作用。Dong Y 等研究发现 DRP1(线粒体分裂关键调控蛋白)介导的线粒体分裂促进了心肌缺血再灌时心肌细胞的凋亡, 缺血前抑制 DRP1 介导的线粒体分裂具有心脏保护作用^[23]。Yang Y 等的研究也证实心肌缺血再灌损伤导致心肌细胞大量凋亡, 伴随线粒体分裂蛋白 DRP1 表达的显著上调^[24]。Sharp WW 等也证实心肌缺血再灌注模型中线粒体分裂异常活跃, 导致线粒体片段化和代谢功能障碍, 抑制线粒体分裂可恢复损伤线粒体功能^[25]。上述研究均表明线粒体分裂增强是缺血缺氧等压力条件下心肌细胞凋亡发生的重要机制, 提示抑制线粒体分裂可能具有保护压力环境下心肌细胞凋亡。然而, 线粒体融合是否参与心肌细胞凋亡调控目前尚不清楚。本研究结果显示干预 MFN1 介导的线粒体融合可促进心肌细胞凋亡, 提示与线粒体分裂发挥的促凋亡作用相反, 线粒体融合发挥保护心肌细胞凋亡的作用。

MFN1 介导的线粒体融合发挥保护心肌细胞凋亡作用的

机制可能是:一方面 MFN1 介导线粒体融合可通过抑制线粒体 ROS 产生,减少氧自由基对心肌细胞的损伤;另一方面, MFN1 介导线粒体融合通过调控线粒体嵴形态重塑抑制细胞色素 C (Cyt c) 释放进入胞浆, 导致其下游凋亡效应分子 Caspase9 与 Caspase3 激活,进而促进心肌细胞凋亡。大量研究已证实线粒体外膜融合主要受 MFN1 与 MFN1 的调控, 而内膜融合则主要受 OPA1 的调控^[20]。Varanita T 等研究证实线粒体内膜融合关键分子 OPA1 介导线粒体融合可通过调控线粒体嵴形态重塑,从而抑制活性氧 ROS 产生与 cyt c 释放,最终促进小鼠胚胎成纤维(MEF)细胞的存活^[6]。本研究结果显示线粒体外膜融合关键分子 MFN1 介导的线粒体融合同样具有抑制细胞活性氧 ROS 产生与 cyt c 释放的作用, 最终抑制心肌细胞凋亡,提示线粒体内外膜融合均可通过嵴形态重塑抑制活性氧产生与 cyt c 释放,进而抑制细胞凋亡。此外, Cogliati S 等研究发现线粒体融合介导嵴形态重塑还可通过调控内膜上氧化呼吸链复合体的组装而参与细胞氧化磷酸化调控^[27]。该研究提示除通过调控线粒体 ROS 产生与 Cyt C 释放外, 对线粒体氧化磷酸化的调控可能是 MFN1 保护心肌细胞凋亡的另一重要机制,这将是我們下一步研究关注的重点。

参考文献(References)

- [1] Marunouchi T, Tanonaka K. Cell Death in the Cardiac Myocyte[J]. Biological & pharmaceutical bulletin, 2015, 38(8): 1094-1097
- [2] Jose Corbalan J, Vatner DE, Vatner SF. Myocardial apoptosis in heart disease: does the emperor have clothes? [J]. Basic research in cardiology, 2016, 111(3): 31
- [3] Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function [J]. Nature, 2014, 505(7483): 335-343
- [4] Lee H, Yoon Y. Mitochondrial fission and fusion [J]. Biochemical Society transactions, 2016, 44(6): 1725-1735
- [5] Marin-Garcia J, Akhmedov AT. Mitochondrial dynamics and cell death in heart failure[J]. Heart failure reviews, 2016, 21(2): 123-136
- [6] Varanita T, Soriano ME, Romanello V, et al. The OPA1-dependent mitochondrial cristae remodeling pathway controls atrophic, apoptotic, and ischemic tissue damage[J]. Cell metabolism, 2015, 21(6): 834-844
- [7] Sugamura K, Keaney JF, Jr. Reactive oxygen species in cardiovascular disease[J]. Free radical biology & medicine, 2011, 51(5): 978-992
- [8] Molavi B, Mehta JL. Oxidative stress in cardiovascular disease: molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations[J]. Current opinion in cardiology, 2004, 19(5): 488-493
- [9] Zhang L, Gan X, He Y, et al. Drp1-dependent mitochondrial fission mediates osteogenic dysfunction in inflammation through elevated production of reactive oxygen species [J]. PloS one, 2017, 12(4): e0175262
- [10] Gan X, Huang S, Yu Q, et al. Blockade of Drp1 rescues oxidative stress-induced osteoblast dysfunction[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2015, 468(4): 719-725
- [11] Van Empel VP, Bertrand AT, Hofstra L, et al. Myocyte apoptosis in heart failure[J]. Cardiovascular research, 2005, 67(1): 21-29
- [12] Lee Y, Gustafsson AB. Role of apoptosis in cardiovascular disease[J]. Apoptosis: an international journal on programmed cell death, 2009, 14(4): 536-548
- [13] Vakifahmetoglu-Norberg H, Ouchida AT, Norberg E. The role of mitochondria in metabolism and cell death[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2017, 482(3): 426-431
- [14] Karbowski M. Mitochondria on guard: role of mitochondrial fusion and fission in the regulation of apoptosis [J]. Advances in experimental medicine and biology, 2010, 687: 131-142
- [15] Kang J, Pervaiz S. Mitochondria: redox metabolism and dysfunction [J]. Biochemistry research international, 2012, 2012: 896751
- [16] Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress [J]. Science, 2012, 337(6098): 1062-1065
- [17] Suarez-Rivero JM, Villanueva-Paz M, de la Cruz-Ojeda P, et al. Mitochondrial Dynamics in Mitochondrial Diseases [J]. Diseases, 2016 Dec 23; 5(1)
- [18] Facundo H, Brainard RE, Caldas FRL, et al. Mitochondria and Cardiac Hypertrophy[J]. Advances in experimental medicine and biology, 2017, 982: 203-226
- [19] Kane LA, Youle RJ. Mitochondrial fission and fusion and their roles in the heart[J]. Journal of molecular medicine, 2010, 88(10): 971-979.
- [20] Ryan J, Dasgupta A, Huston J, et al. Mitochondrial dynamics in pulmonary arterial hypertension[J]. Journal of molecular medicine, 2015, 93(3): 229-242
- [21] Lee WC, Chiu CH, Chen JB, et al. Mitochondrial Fission Increases Apoptosis and Decreases Autophagy in Renal Proximal Tubular Epithelial Cells Treated with High Glucose [J]. DNA and cell biology, 2016, 35(11): 657-665
- [22] Li X, Tao H, Xie K, et al. cAMP signaling prevents podocyte apoptosis via activation of protein kinase A and mitochondrial fusion [J]. PloS one, 2014, 9(3): e92003
- [23] Dong Y, Undyala VVR, Przyklenk K. Inhibition of mitochondrial fission as a molecular target for cardioprotection: critical importance of the timing of treatment[J]. Basic research in cardiology, 2016, 111(5): 59
- [24] Yang Y, Zhao L, Ma J. Penicillamine hydrochloride preconditioning provides cardiac protection in a rat model of myocardial ischemia/reperfusion injury via the mechanism of mitochondrial dynamics mechanism[J]. European journal of pharmacology, 2017, 813: 130-139
- [25] Sharp WW, Fang YH, Han M, et al. Dynamin-related protein 1 (Drp1)-mediated diastolic dysfunction in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic benefits of Drp1 inhibition to reduce mitochondrial fission [J]. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2014, 28(1): 316-326
- [26] Van der Bliek AM, Shen Q, Kawajiri S. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion [J]. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2013, 5: a011072
- [27] DI Cogliati S, Frezza C, Soriano ME, et al. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency[J]. Cell, 2013, 155(1): 160-171