

· 基础论著 ·

2类多巴胺受体激活对细胞凋亡的影响 及与 MAPK 通路的关系

高君 魏臻 陈爱东 李梅秀 邵洪江 彭雪 柳磊 徐长庆 李鸿珠

【摘要】 目的 观察2类多巴胺受体(DR2)激活对乳鼠心肌细胞凋亡的影响及其与 MAPK 通路的关系。**方法** 通过原代培养乳鼠心肌细胞缺氧-复氧模拟缺血-再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤模型。心肌细胞随机分为4组:正常对照组(Control, C group),缺血-再灌注组(I/R group), 10 μmol/L Bromocriptine (DR2 激动剂)组(Bro group), 10 μmol/L Haloperidol (DR2 抑制剂)组(Hal group)。Hoechst33342 染色观察细胞凋亡情况;免疫荧光检测心肌细胞促凋亡因子(caspase-3、caspase-9)和抑凋亡因子(Bcl-2)蛋白的表达;Western blot 方法检测 MAPK 通路相关因子 p-ERK、p-p38 及 p-JNK 活性变化。**结果** 与 Control 组相比, I/R 组凋亡细胞增加, p-p38、p-JNK、促凋亡因子及抑凋亡因子表达均增加, 唯有 p-ERK 蛋白表达减少;与 I/R 组比较, Bro 可减轻心肌细胞凋亡, 下调促凋亡因子的蛋白表达和 p-p38、p-JNK 的活性, 上调抑凋亡因子的蛋白表达和 p-ERK 活性; Hal 则对上述指标影响不明显。**结论** DR2 的激活可抑制乳鼠心肌细胞凋亡, 其机制与 MAPK 通路相关。

【关键词】 受体, 多巴胺; 细胞凋亡; 再灌注损伤; MAPK 通路

Effect of DR2 activation on apoptosis and the relationship with MAPK pathways GAO Jun, WEI Can, CHEN Ai-dong, LI Mei-xiu, SHAO Hong-jiang, PENG Xue, LIU Lei, XU Chang-qing, LI Hong-zhu. The First Department of Orthopedic, The First Hospital of Harbin, Harbin 150010, China
Corresponding author: LI Hong-zhu, Email: lihongzhu19780308@126.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of DR2 activation on cell apoptosis in the neonatal rat cardiomyocytes, and to explore the relationship with MAPK pathways. **Methods** The ischemia/reperfusion (I/R) injury model was established in primarily cultured neonatal rat cardiomyocytes by anoxia-reoxygenation, and randomly assigned: Control, I/R, Bro and Hal groups. The cell apoptosis was detected using Hoechst 33342 dye. The expression of protein of caspase-3, caspase-9 and Bcl-2 was detected by immunofluorescence. The activity of MAPK-related factors as p-ERK, p-p38 and p-JNK was detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, apoptosis rate, the activity of p-p38 and p-JNK and expression of pro-apoptotic factors and anti-apoptotic factors were increased, but p-ERK activity was decreased. Compared with the I/R group, all index above-mentioned were down-regulated or reversed in Bro-group, and had no obvious differences in Hal group. **Conclusion** DR2 activation inhibit apoptosis of the neonatal rat cardiomyocytes apoptosis, which mechanism is related to MAPK pathways.

【Key words】 Receptors, Dopamine; Apoptosis; Reperfusion injury; MAPK pathways

近年来, 心肌缺血-再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)已成为心血管研究的热点问题, 发生机制尚不清楚。大量的动物实验研究指出, MIRI 的发生与细胞凋亡关系密切^[1], MIRI 使心肌细胞凋亡明显增加, 减少心肌细胞凋亡对减轻心肌损伤有

重要的保护意义。

多巴胺受体(Dopamine Receptor, DR)是七跨膜区域所组成的G蛋白偶联受体^[2]。根据其药理作用和结构特征将其分为2类:1类多巴胺受体(DR1)和2类多巴胺受体(DR2)。DR主要分布于中枢神经系统, 少量分布于外周, 如肾脏、肠系膜、心脏、血管等^[2]。当今国内外对于DR的研究主要集中在帕金森氏病、精神分裂症等, 其对MIRI的影响, 国内外鲜有报道。本研究的前期工作已证明, 在大鼠心肌缺血-再灌注损伤过程中, DR2表达增加^[3], 并且DR2激活可通过下调线粒体途径和死亡受体途径减轻心肌缺血-再灌注损伤及细胞凋亡^[4], 但是, 其激活与MAPK通路的关系, 尚未见报道。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.11.118

基金项目: 国家自然科学基金(81000059, 81270273, 81270311, 81070123); 黑龙江省博士后科研启动基金资助项目(LBH-Q11054)

作者单位: 150010 哈尔滨市第一医院骨一科(高君); 哈尔滨医科大学基础医学院病理生理学(魏臻、李梅秀、邵洪江、彭雪、柳磊、徐长庆、李鸿珠); 牡丹江医学院红旗医院消化科(陈爱东)

通讯作者: 李鸿珠, Email: lihongzhu19780308@126.com

故本实验旨在以 MAPK 通路为切入点,探讨 DR2 活性变化对乳鼠心肌细胞凋亡的影响及其与 MAPK 通路的关系。

材料与amp;方法

一、实验动物

健康 Wistar 乳鼠(2~3 d),雌雄不拘,由哈尔滨医科大学附属二院动物研究所提供。

二、主要试剂

DR2 受体激动剂 Bromocriptine 和抑制剂 Haloperidol (Sigma); Bcl-2, caspase-3 和 caspase-9 单克隆抗体 (Santa); p-ERK/t-ERK、p-p38/t-p38、p-JNK/t-JNK (Cell Signaling Technology); 高糖和低糖 DMEM 培养基、10% 胎牛血清、胰蛋白酶 (Hyclone); 其他试剂为国产分析纯。

三、主要器材

高速低温离心机 (Beckman), 荧光显微镜 (德国 Leica), Western blot 电泳槽 (美国 BIO-RAD), 培养箱 MCO-17AICO2 (SANYO), S-1300-U 净化工作台等。

四、原代心肌细胞培养

1. 乳鼠心肌细胞的培养:将出生 1~3 d 的 Wistar 乳鼠浸泡 70% 的酒精中消毒,开胸后取心室肌,用 Hank 液清洗 2 次,剪碎,放入 10 ml 离心管中;离心管中装有 5 倍体积的 0.25% 胰酶,37 °C 消化 10 min 后,加等体积高糖 DMEM 培养液终止消化,自然沉淀;取出沉淀物,放入另一盛有胰酶的离心管中,重复上述消化过程 4 次,每次 37 °C 20 min;收集除第一次以外的上清液,1500 r/min 离心 15 min,弃上清,用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液充分而轻柔地吹打成单细胞悬液,经 200 目筛网过滤去除未消化组织块。然后按差速贴壁分离法 37 °C、5% CO₂ 孵育 1~1.5 h,纯化心肌细胞。细胞计数,相同密度接种于培养瓶中,37 °C、5% CO₂ 条件下培养。于培养后 12 h 即可见部分细胞收缩,24 h 后换液,此时心肌细胞约 90% 以上都在收缩,速率达 96~120/min。以后每 3 d 换 1 次液,取第 4 小时的细胞进行实验研究。

2. 心肌细胞缺氧-复氧模型复制:参照文献建立细胞缺氧-复氧模型^[4-5]。细胞缺氧:首先将高纯度氮气 (N₂) 通入低糖 DMEM 饱和 30 min,以驱除氧气。取生长 4 d 的单层心肌细胞,换用 N₂ 饱和的低糖 DMEM,放入 37 °C、5% CO₂ 及 95% N₂ 孵箱中培养。细胞复氧:将缺氧心肌细胞的培养液换成含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液常规培养。

五、实验分组

培养的乳鼠心肌细胞随机分为四组 ($n = 10$):(1)

正常对照组 (Control, C):正常细胞培养,不做任何处理;(2)模拟缺血-再灌注组 (I/R):按照上述方法缺氧 2 h,复氧 24 h;(3)激动剂干预组 (Bro):在复氧时加入 Bro (10 μmol/L),其余方法同 I/R 组;(4)抑制剂干预组 (Hal):复氧时加入 Hal (10 μmol/L),其余方法同 I/R 组。

六、Hoechst33342 染色观察细胞凋亡

用 PBS 制备 10~50 μmol/L Hoechst33342 染料,将 1/10 细胞培养基体积的 Hoechst 染料溶液加入细胞培养物中,37 °C 培养细胞 10~20 min,再用 PBS 或合适的缓冲液洗细胞 2 次。用带有 350 nm 激发波长,460 nm 发射波长的滤光片的荧光显微镜观察细胞,可数 200 个细胞,计算凋亡率。

七、免疫荧光检测 Bcl-2、caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达水平

细胞在经 4% 多聚赖氨酸预处理的盖玻片 (放置于 6 孔培养板内)上培养,用预冷的 0.1 mol/L PBS 冲洗,4% 的多聚甲醛固定 30 min,山羊血清 37 °C 下封闭 30 min;抗鼠 Bcl-2、caspase-3 和 caspase-9 单克隆抗体 (1:200)孵育,4 °C 过夜,阴性对照用 0.1 mol/L PBS 代替一抗;0.1 mol/L PBS 冲洗 3 次;FITC-标记的抗鼠 IgG (1:50),孵化 37 °C 1 h;PBS 冲洗 3 次,荧光显微镜下观察。免疫荧光结果的评定方法:以半定量方法评定阳性染色率,以胞质或胞膜呈现特异性绿色荧光为阳性表达。共分四级:(-)无荧光;(+)荧光较弱,但清晰可见;((+))荧光明亮;(((+)))荧光闪亮。

八、Western blot 检测蛋白表达情况

取各组培养的心肌细胞,PBS 洗涤,加入全细胞裂解液,冰上处理 10 min,4 °C、12 000 × g 离心 15 min,取上清进行蛋白质定量。取 50 μg 总蛋白样品于 10% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,随后转印至 PVDF 膜,用 10% 无脂肪牛奶封闭后,分别用 1:1000 抗 p-ERK/t-ERK、p-p38/t-p38、p-JNK/t-JNK 4 °C 孵育过夜。再用二抗 (碱性磷酸酶标记,稀释度 1:1000)室温孵育 1 h,最后用 Western blue stabilized substrate for AP (Promega)显色,光密度扫描半定量分析显影条带。

九、统计学分析

实验数据均以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用方差分析和配对 *t* 检验判断其差异显著性。 $P < 0.05$ 差异为有统计学意义。全部数据统计采用 SPSS 10.1 统计软件包进行。

结 果

1. Hoechst33342 染色检测细胞凋亡情况:正常情况下,荧光染料 Hoechst33342 只有少量能透过细胞膜

表1 各组心肌细胞 caspase-3、caspase-9 及 Bcl-2 表达的变化(n = 10)

组别	caspase-3 蛋白阳性细胞数				caspase-9 蛋白阳性细胞数				Bcl-2 蛋白阳性细胞数			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
C 组	0	9	1	0	0	8	2	0	0	5	3	2
I/R 组	0	0	2	8	0	0	1	9	0	3	2	5
Bro 组	0	6	1	3	0	5	3	2	0	1	1	8
Hal 组	0	0	3	7	0	0	2	8	0	6	1	3

注:C: 正常对照组;I/R: 缺血-再灌注组;Bro: DR2 激动剂组;Hal: 抑制剂组

进入细胞,使其染上低蓝色。但是当细胞发生凋亡时,它的细胞膜通透性增强,因此进入凋亡细胞中的 Hoechst33342 比正常细胞的多,荧光强度要比正常细胞中要高。此外,凋亡细胞的染色体 DNA 的结构发生了改变,从而使该染料能更有效地与 DNA 结合,并且凋亡细胞膜上的 p-糖蛋白泵功能受到损伤不能有效地将 Hoechst33342 排出到细胞外使之在细胞内积累增加等都使凋亡细胞的蓝色荧光增强。本实验结果显示:C 组正常的细胞核呈圆形,淡蓝色,细胞凋亡率只有 (6.8 ± 1.6)% ;与 C 组比较,I/R 组凋亡的细胞增多,核呈分叶或碎块状,致密浓染,高亮度荧光,细胞凋亡率达 (78.4 ± 10.3)% (P < 0.01) ;Bro 组细胞凋亡率为 (39.6 ± 8.9)% ,较 I/R 组降低 (P < 0.01) ;Hal 组细胞凋亡率为 (75.2 ± 14.8)% ,与 I/R 组比较变化不明显 (图 1)。

2. 免疫荧光检测 caspase-3、caspase-9 及 Bcl-2 蛋白表达水平:FITC 的激发波长为 520 nm,发散波长为 488 nm,在激发状态,FITC 发出绿色荧光。在实验各组加入抗鼠 caspase-3、caspase-9 和 Bcl-2 单克隆抗体,如有相应蛋白的表达,则抗体就会在培养细胞的膜表面及胞质中与相应蛋白结合。抗原-抗体复合物再与有 FITC 标记的而抗结合,在激发状态下就会呈现特异性绿色荧光;无相应蛋白的表达组,则无荧光显现。本实验结果显示,C 组:心肌细胞胞质及胞膜有微量 caspase-3 和 caspase-9 及少量 Bcl-2 表达;I/R 组和 Hal 组:caspase-3 和 caspase-9 在胞质及胞膜上呈强阳性表达,而 Bcl-2 呈中度表达;Bro 组:caspase-3 和 caspase-9 在胞质及胞膜上弱强阳性表达,而 Bcl-2 呈强阳性表达 (图 2,表 1)。

3. Western blot 检测 p-ERK、p-p38 及 p-JNK 活性的变化:分别以 p-ERK、p-p38 和 p-JNK 与 t-ERK、t-p38 及 t-JNK 的比值为参数,与 C 组相比:I/R 组 p-ERK 活性减弱,p-p38 和 p-JNK 活性均增加 (P < 0.01) ;与 I/R 组比较:Bro 增强 p-ERK 的活性,减弱 p-p38 和 p-JNK 的活性 (P < 0.05) ;Hal 对上述指标的影响不明显 (P > 0.05,图 3)。

讨 论

大量研究证明,心肌缺血-再灌注存在细胞凋亡^[1],其发生可能与缺血-再灌注损伤活性氧大量产生、钙超载等直接或间接激活细胞凋亡的信号途径,启动凋亡相关基因的表达有关^[1]。

Hoechst33342 是一种可穿透细胞膜并对细胞核 DNA 染色的蓝色荧光染料,常用于细胞凋亡检测。凋亡细胞的膜通透性增强、染色体 DNA 的结构发生了改变,使该染料有效地与 DNA 结合从而蓝色荧光增强。本实验结果显示缺血-再灌注组心肌细胞核浓集呈亮蓝色,分叶或碎片状,边集,表明心肌细胞发生明显的损伤及凋亡,我们给予 DR2 的激动剂 Bro 后,细胞凋亡减轻,这证明 DR2 激活后能够抑制细胞凋亡,这与我们以前的报道相符^[4]。

caspase-3、-9 是参与细胞凋亡的关键蛋白酶,其活化可触发凋亡级联反应^[6]。抑凋亡蛋白 Bcl-2 可抗氧化自由基,减轻脂质过氧化和增强细胞对活性氧的耐受,并抑制 caspases 激活而阻断凋亡发生^[7]。本实验免疫荧光结果与以前报道的 Western blot 的结果一致^[4],即:缺血-再灌注后心肌细胞 caspase-3、-9 和 Bcl-2 蛋白表达明显增加;Bro 能够下调 caspase-3 和-9 的表达,上调 Bcl-2 的表达,这说明,DR2 激活能够通过减少促凋亡因子、增加抑凋亡因子抑制缺血-再灌注损伤诱导的细胞凋亡。其中 Bcl-2 的蛋白表达在缺血-再灌注组也是增加的,这可能是机体代偿的适应性反应。

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 是生物体内重要的信号转导系统之一,参与细胞生长、分裂、分化、凋亡以及细胞间的功能同步等多种生理过程^[8-9]。MAPK 通路主要包括 ERK、JNK 和 p38 三条途径,其中,ERK 磷酸化激活不仅促进细胞增殖和分化,同时还可以抑制 Caspases 激活和诱导抗凋亡蛋白表达,从而抑制细胞凋亡^[8]。JNK 与 p38 属应激激活蛋白激酶,磷酸化激活促进细胞凋亡^[9]。本实验 Western blot 结果显示缺血-再灌注组 p-ERK 活性降低,p-p38 和 p-JNK 活性均增加,而 Bro 升高了 p-ERK

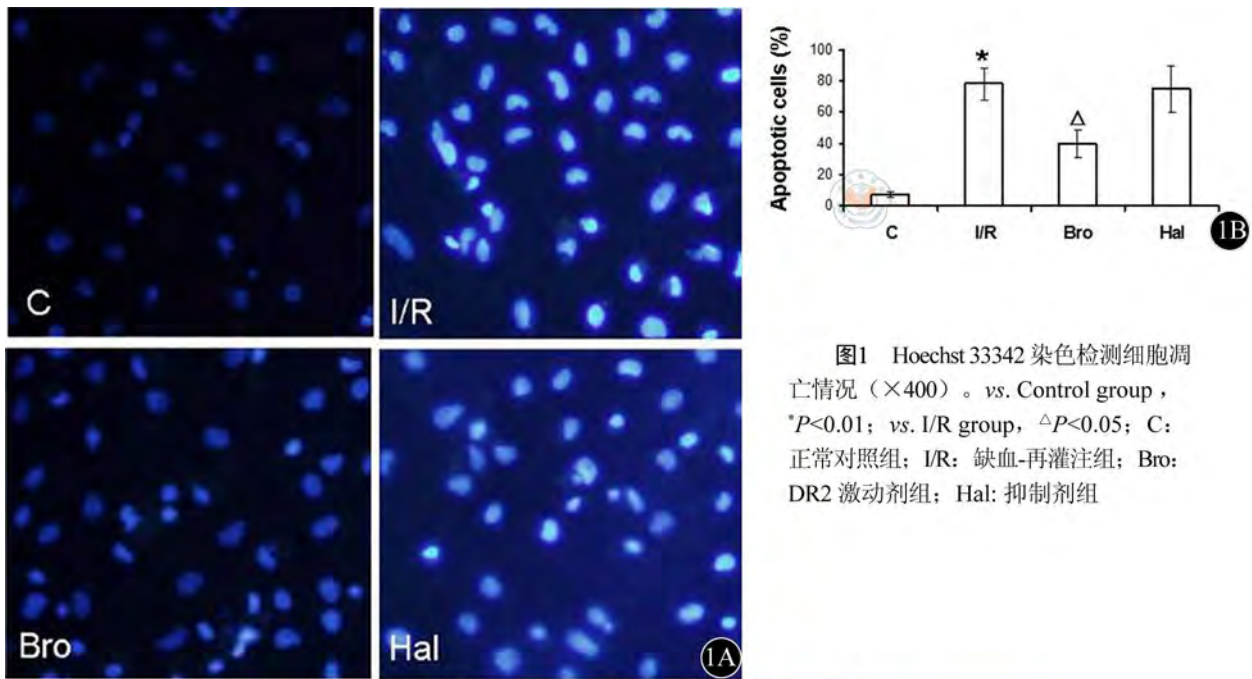


图1 Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡情况 ($\times 400$)。vs. Control group, * $P < 0.01$; vs. I/R group, $\Delta P < 0.05$; C: 正常对照组; I/R: 缺血-再灌注组; Bro: DR2 激动剂组; Hal: 抑制剂组

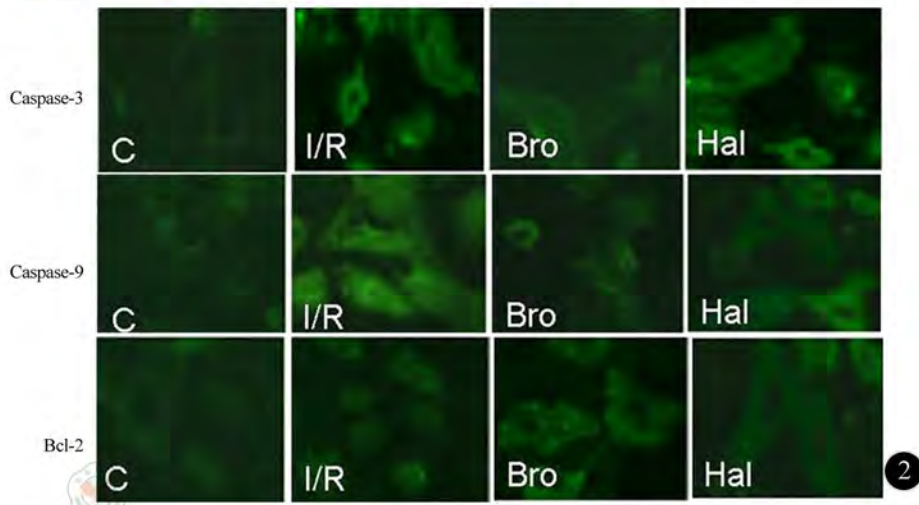


图2 各组caspase-3、caspase-9及Bcl-2表达的变化 ($\times 400$)。C: 正常对照组; I/R: 缺血-再灌注组; Bro: DR2 激动剂组; Hal: 抑制剂组

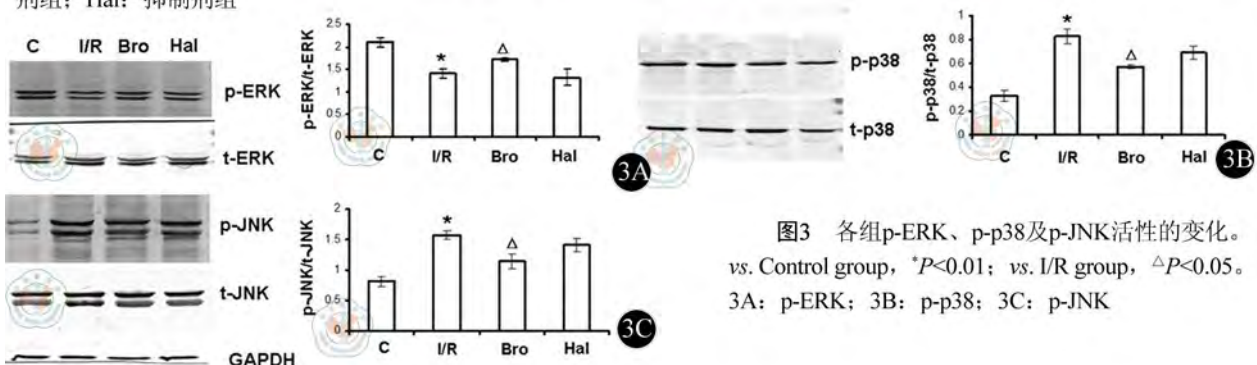


图3 各组p-ERK、p-p38及p-JNK活性的变化。vs. Control group, * $P < 0.01$; vs. I/R group, $\Delta P < 0.05$ 。3A: p-ERK; 3B: p-p38; 3C: p-JNK

的活性,降低了 p-p38 和 p-JNK 的活性,这表明 DR2 激活通过改变 MAPK 通路相关因子的活性抑制细胞凋亡。

我们还发现,应用 DR2 的抑制剂 Hal 对缺血-再灌注损伤诱导的细胞凋亡没有明显的影响,其机制有待

于进一步研究。

综上所述,缺血-再灌注损伤可以诱发心肌细胞凋亡,DR2 激活能抑制细胞凋亡的发生,其机制与下调促凋亡因子、上调抑凋亡因子及改变 MAPK 通路相关因子的活性有关。结合我们前期实验结果,激活心肌 DR2

有望为缺血性心脏病的防治提供新靶点和新方向。

参 考 文 献

[1] Scarabelli TM, Knight R, Stephanou A, et al. Clinical implications of apoptosis in ischemic myocardium. *Curr Probl Cardiol*, 2006, 31: 181-264.

[2] Li HZ, Han LP, Xu CQ, et al. Effect of Dopamine Receptor-1 on Apoptosis of Cultured Neonatal Rat Cardiomyocytes in Simulated Ischemia/Reperfusion. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2008, 102: 329-336.

[3] 李鸿珠, 徐长庆, 韩丽萍, 等. 大鼠心肌多巴胺受体在缺氧-复氧时的表达变化及其意义. *中国病理生理杂志*, 2007, 23: 2322-2326.

[4] Li HZ, Guo J, Gao J, et al. Role of dopamine D2 receptors in ischemia/reperfusion induced apoptosis of cultured neonatal rat cardiomyocytes. *J Biomed Sci*, 2011, 18: 18.

[5] 钟理, 宋治远. 模拟缺血再灌注诱导原代培养乳鼠窦房结细胞凋亡的研究. *第三军医大学学报*, 2001, 23: 59-62.

[6] 夏天, 蒋春笋, 李林江, 等. 呼吸代谢控制在 Caspase-3 对线粒体凋亡信号正反馈作用中的机制和意义. *科学通报*, 2001, 46: 1791-1796.

[7] Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, et al. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 1993, 75: 241-251.

[8] Blodt S, Weidle UH, Kolch W. The role of MAPK pathways in the action of chemotherapeutic drugs. *Carcinogenesis*, 2002, 23: 1831-1838.

[9] 陈建宇, 王聪. MAPK 信号通路研究进展. *中国医药科学*, 2011, 4: 32-34.

(收稿日期: 2013-03-20)

(本文编辑: 戚红丹)

高君, 魏琛, 陈爱东, 等. 2 类多巴胺受体激活对细胞凋亡的影响及与 MAPK 通路的关系[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(11): 4878-4882.

