

· 药理 ·

基于 HSF1 高表达 H9c2 细胞的参芎葡萄糖注射液抗氧化损伤作用探讨

刘亭¹, 宋菲^{2,3}, 杨健^{1,2}, 陆定艳^{1,2}, 林村勇², 薛维娜³, 孙佳^{1*}

(1. 贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 药学院, 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004)

[摘要] 目的:建立热休克转录因子 1(HSF1)高表达的 H9c2 细胞系,考察在 HSF1 高表达的情况下参芎葡萄糖注射液(SGI)对过氧化氢(H₂O₂)诱导的 H9c2 细胞氧化损伤的保护作用。方法:构建 GV1422-HSF1 的重组质粒,并利用 FuGENE 6 转染试剂将重组质粒转染至 H9c2 细胞中,用遗传霉素(G418)来筛选稳定转染细胞株,并用实时荧光定量聚合酶链式反应法(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 HSF1 和热休克蛋白 70(HSP70) mRNA 和蛋白的表达情况,来鉴定 HSF1 高表达的 H9c2 细胞系(H9c2-HSF1)是否建立成功。用 H₂O₂(300 μmol·L⁻¹)处理 H9c2-HSF1 细胞 0.5 h 构建氧化损伤模型,考察 HSF1 高表达的情况下参芎葡萄糖注射液预处理对细胞存活率、乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸激酶(CK)漏出量、丙二醛(MDA)和活性氧(ROS)含量、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响,同时 Western blot 检测 HSF1 和 HSP70 蛋白表达情况。结果:Real-time PCR 和 Western blot 实验结果显示:筛选出来的稳定转染细胞的 HSF1 和 HSP70 蛋白表达显著上调($P < 0.01$),表明 H9c2-HSF1 细胞系构建成功。经参芎葡萄糖注射液预处理 6 h, H₂O₂ 损伤 0.5 h 后,与 H9c2 + H₂O₂ 组和 H9c2-HSF1 + H₂O₂ 组比较,对应给药组细胞的 HSF1 和 HSP70 蛋白表达显著上调($P < 0.01$),细胞存活率显著增高($P < 0.01$),LDH,CK 释放量和 MDA 含量显著减少($P < 0.01$);ROS 含量显著降低,GSH-Px 和 SOD 活性明显升高。结论:本研究成功构建了 HSF1 高表达 H9c2 细胞系,并发现 HSF1 高表达能明显增强参芎葡萄糖注射液抗氧化损伤作用,其机制可能不在于增加细胞清除 ROS 能力,但可能与上调 HSP70 表达相关,需要进一步研究。

[关键词] 热休克转录因子 1(HSF1); 参芎葡萄糖注射液; 过氧化氢(H₂O₂); H9c2 细胞系; 抗氧化损伤作用

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)08-0085-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180822

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180126.1647.001.html>

[网络出版时间] 2018-01-29 9:55

Anti-oxidative Activity of Shenxiong Glucose Injection in H9c2 Cells with High Expression of HSF1

LIU Ting¹, SONG Fei^{2,3}, YANG Jian^{1,2}, LU Ding-yan^{1,2}, LIN Cun-yong²,
XUE Wei-na³, SUN Jia^{1*}

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China;

2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China;

3. Engineering Research Center for Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To construct H9c2 cell line with high expression of heat shock transcription factor

[收稿日期] 20171127(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81760699);贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(QZYY-2016-061);贵州省科学技术厅人才团队项目(黔科合平台人才[2016]5613,黔科合平台人才[2016]5677);贵州省教育厅项目(黔教合协同创新字[2013]04)

[第一作者] 刘亭,博士,副教授,硕士生导师,从事中药药理学研究,Tel: 0851-86908468,E-mail: t-liu@163.com

[通信作者] *孙佳,硕士,副教授,从事中药药理学研究,Tel:0851-86908468,E-mail: 392828662@qq.com

1 (HSF1), in order to investigate the effect of Shenxiong glucose injection (SGI) in protecting H_2O_2 -induced H9c2 cellular oxidation injury with a high expression of HSF1. **Method:** The recombinant plasmid of GV142-HSF1 was constructed and transfected into H9c2 cells with FuGENE 6 transfection reagent, and G418 was used to obtain stably transfected cell line. The expressions of HSF1 and heat shock protein 70 (HSP70) were detected with Real-time RT-PCR and Western blot to confirm the establishment of H9c2 cell line with high expression of HSF1 (H9c2-HSF1). The H9c2-HSF cells were pretreated with SGI for 24 h, and then treated with H_2O_2 ($300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) for 0.5 h. After that, cell viability, contents of malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS), releases of lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK), activities of superoxide dismutase (SOD) and Glutathione peroxidase (GSH-Px), and expressions of HSF1 and HSP70 were examined. **Result:** The results of Real-time PCR and Western blot assays showed that the mRNA and protein expressions of HSF1 and HSP70 were significantly up-regulated ($P < 0.01$) compared with the untransfected cells, which verified the establishment of H9c2-HSF1 cell line. Compared with H9c2 cells + H_2O_2 and H9c2-HSF1 cells + H_2O_2 , corresponding administration unit showed an up-regulated expressions of HSF1 and HSP70 ($P < 0.01$), an increased cell survival rate ($P < 0.01$), and decreased releases of LDH and CK and MDA generation ($P < 0.01$) after 6 h pretreatment with SGI and 0.5 h treatment with H_2O_2 , decreased content of ROS and increased the activities of SOD and GSH-Px. **Conclusion:** H9c2 cell line with high expression of HSF1 was constructed successfully. It is found that high expression of HSF1 can significantly enhance the anti-oxidative damage effect of SGI; the mechanism may not be associated with the enhancement of the cell's capability of clearing ROS, but may be correlated with the up-regulation of HSP70 expression, which needs further study.

[**Key words**] heat shock transcription factor 1 (HSF1); Shenxiong glucose injection; H_2O_2 ; H9c2 cell line; anti-oxidant damage

热休克转录因子(HSF)是一种广泛表达于各种细胞并控制细胞应激反应的保守蛋白。在已经发现的3种HSF(HSF1, HSF2和HSF4)中, HSF1是调节细胞应激反应的主要转录因子^[1-2]。热休克蛋白(HSPs), 也称为应激蛋白, 是所有物种中存在的高度同源蛋白家族^[3-4]。HSF1可通过与HSP基因转录调控区结合, 上调HSPs的表达^[5-6], 进而调控细胞行为, 如HSPs中的HSP70是受到HSF1调控的, 并具有促进细胞增殖与分化、抗细胞凋亡等功能^[7-9]。参芎葡萄糖注射液是由丹参和盐酸川芎嗪配伍组成的中药注射剂, 在临床上用于心绞痛、冠心病及其他缺血性心血管疾病的治疗。在前期研究中, 本课题组发现参芎葡萄糖注射液具有抗氧化损伤作用^[10-11], 并且发现参芎葡萄糖注射液预处理后, 被过氧化氢(H_2O_2)损伤的H9c2细胞中HSF1的表达有上调趋势。笔者推测HSF1的表达上调, 可能与参芎葡萄糖注射液的抗氧化损伤功能有关。因此, 本研究拟构建一个HSF1高表达的H9c2细胞系, 用于考察HSF1高表达对参芎葡萄糖注射液抗氧化损伤作用的影响。

1 材料

1.1 细胞 H9c2大鼠心肌细胞株购自中国科学院

细胞库。

1.2 药物及试剂 参芎葡萄糖注射液(贵州景峰注射剂有限公司, 批号H52020703); 1640培养基, 胎牛血清, 胰蛋白酶(美国Gibco公司, 批号分别为8117121, 1217694, 1748650); SDS-PAGE凝胶制备, BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝公司, 批号分别为20170309, 20170302); 丙二醛(MDA), 活性氧(ROS), 超氧化物歧化酶(SOD), 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px), 乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸激酶(CK)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号分别为20170410, 201700913, 20170613, 20170907, 20170912, 20170919); trizol(美国Thermo公司, 批号157707); Eastep总RNA提取试剂盒, FuGENE6转染试剂(美国Promega公司, 批号分别为0000187133, 0000254749); TransScript™ One-Step PCR SuperMix, SYBR® Premix Ex Taq™ II(大连宝生物有限公司, 批号分别为RR820A, RR047A); 抗甘油醛-3磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG和抗鼠IgG抗体(巴傲得生物科技有限公司, 批号分别为AB66132, AB01151, G3114); 质粒提取试剂盒(美国Axygen公司, 批号15517KC1); HSF1一抗, HSP70一抗(美国CST公

司,批号分别为 4356S,4872);ECL 试剂(美国 Bio-Rad 公司,批号 170-5060);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)引物由上海生工公司合成;HSF1 基因由北京博迈德公司合成。

1.3 仪器 TS100 型荧光倒置显微镜(日本尼康公司);Forma 370 型 CO₂ 细胞培养箱, Heraeus Fresco17 型冷冻高速离心机, Biomate3S 型蛋白核酸分析仪(美国 Thermo Scientific 公司); Model 680 型酶标仪, PowerPac Basic 型电泳仪, CFX96 型 Real-time PCR 仪, Mini-PROTEAN Tetra 型垂直电泳槽(美国 Bio-Rad 公司);G:BOXChemiXL1.4 型凝胶成像仪(英国 Sysgene 公司)。

2 方法

2.1 H9c2 细胞的培养 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基在 37 °C 5% CO₂ 中静置培养 H9c2。细胞贴壁生长,生长至 80% ~ 90% 汇合度时,用胰蛋白酶消化传代。

2.2 HSF1 稳定高表达的 H9c2-HSF1 细胞系的构建

2.2.1 GV142-HSF1 质粒的构建 将 HSF1 基因片段与 GV142 载体分别用 *Hind* III 与 *Xho* I 双酶切后连接。将连接产物转化至 TOP10 感受态大肠埃希菌中,在 0.1% 卡那霉素的 LB 琼脂平板上 37 °C 过夜培养,挑选单克隆至含 0.1% 卡那霉素的 LB 培养基中,180 r·min⁻¹,37 °C 过夜培养。然后用质粒提取试剂盒提取质粒进行双酶切验证,并挑取阳性克隆进行测序鉴定。

2.2.2 筛选最佳转染条件 取对数生长期的 H9c2 细胞,胰酶消化后,在 6 孔板中每孔加入密度为 12.0 × 10⁴ 个/mL 的细胞悬浮液 2 mL。细胞汇合度为 60% 时进行转染。按 FuGENE6 转染试剂说明书配制转染工作液,使 FuGENE6 与 GV142-HSF1 质粒的比例分别达到 4:1,3:1,2:1,1.5:1,在 H9c2 细胞中加入不同比例的转染液,孵育 30 h 后倒置荧光显微镜下观察拍照,根据荧光强度筛选出最佳转染条件。

2.2.3 挑选稳定转染 H9c2 细胞单克隆培养 选取 FuGENE6 与 GV142-HSF1 质粒的比例为 3:1 的条件进行转染。按文献方法^[12],挑选转染效率为 90% 的细胞,并将原培养液更换为含 G418(质量浓度 800 mg·L⁻¹)的选择性培养液,每 2 d 更换 1 次选择性培养液,孵育 14 d 后,可得到含 G418 抗性 H9c2 细胞的克隆,挑选单个细胞克隆扩大培养,并用 800 mg·L⁻¹ 的 G418 培养液维持筛选。

2.2.4 Real-time PCR 测定 H9c2-HSF1 细胞系中 HSF1 和 HSP70 的 mRNA 水平 由于 HSF1 调控 HSPs 的表达,因此本文在检测 HSF1 表达量的同时,也考察了与抗凋亡相关的 HSP70 的表达量,以验证高表达的 HSF1 具有正常基因调控功能。设置 H9c2 组(未转染组),H9c2-HSF1 组。按说明书操作,使用 TRIzol 与 EastepTM 总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。取总 RNA 2 μg,用 TransScriptTM One-Step RT-PCR SuperMix 合成 cDNA。以 cDNA 为模板,用 SYBRTM Premix Ex TaqTM II 进行 Real-time PCR 检测。PCR 引物如表 1,反应体系为混合液 10.0 μL,上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各 0.8 μL,cDNA 模板 2.0 μL,ddH₂O 6.4 μL。反应程序为 94 °C 预变性 3 min,然后进行 40 个循环的反应(94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 35 s,读板),反应结束后进行熔解曲线分析。以 GAPDH 作为内参,用 2^{-ΔΔC_t} 法分析数据。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| 引物名称 | 引物序列(5'-3') | 片段长度/bp |
|-------|----------------------|---------|
| HSF1 | ATGGATCTGCCCGTGGGCC | 127 |
| | CTAGGAGACACTGGGGTCC | |
| HSP70 | CATCGCCTATGGGCTGGAC | 94 |
| | GGAGAGAACCACACATCGAA | |
| GAPDH | ACAGCAACAGGCTGGTGGAC | 143 |
| | TTTGAGGCTGCAGCGAACTT | |

2.2.5 蛋白免疫印迹(Western blot)测定 HSF1 和 HSP70 的蛋白表达 设置 H9c2 组(未转染组),H9c2-HSF1 组,裂解各组细胞后用 BCA 试剂盒测定蛋白含量。取蛋白 30 μg 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳结束后,将目的蛋白所在位置凝胶切下,湿转法转膜后,将膜放入 5% BSA 溶液中封闭 2 h,加入一抗 HSF1 和 HSP70 抗体(1:1 000),GAPDH 抗体(1:5 000)室温孵育 2 h,洗膜后加入二抗室温下孵育 2 h,洗膜后用 ECL 显色,凝胶成像系统检测。

2.3 参芎葡萄糖注射液预处理及 H₂O₂ 造模 取 H9c2 细胞和 H9c2-HSF1 细胞,以 8 × 10⁴ 个细胞/孔接种于 96 孔培养板中或以 24 × 10⁴ 个细胞/孔接种于 6 孔培养板。培养 24 h 后,将细胞分为 H9c2 细胞组,H9c2 细胞 H₂O₂ 损伤组,H9c2 细胞 SGI 预处理 + H₂O₂ 损伤组,H9c2-HSF1 细胞组,H9c2-HSF1 细胞 H₂O₂ 损伤组,H9c2-HSF1 细胞 SGI 预处理 + H₂O₂ 损伤组。参芎葡萄糖注射液预处理时,最终体

积比为 6%，预处理时间为 6 h，预处理完毕用 DMEM 洗涤细胞，进行 H₂O₂ 造模。造模浓度参照课题组前期工作^[11]，浓度为 300 μmol·L⁻¹，作用时间为 0.5 h。

2.4 HSF1 高表达对参芎葡萄糖注射液抗氧化损伤作用的影响 实验方法参照课题组前期工作^[11]。作用完毕后，根据说明书，用 MTS 检测细胞存活率。细胞存活率 = $A_{\text{样品组}} / A_{\text{空白组}} \times 100\%$ ，H9c2 细胞组和 H9c2-HSF1 细胞组作为空白组，分别计算其余各组的细胞存活率。收集细胞上清液，按试剂盒说明书检测上清液中 LDH 和 CK 的释放量；收集细胞，按试剂盒说明书检测胞内 ROS，MDA 含量和 SOD，GSH-Px 活力。

2.5 各组细胞中 HSF1 与 HSP70 蛋白表达的情况 按 2.3 项分组处理细胞，作用完毕后，裂解各组细胞并用 BCA 试剂盒测定蛋白含量。按 2.2.5 项方法进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，转膜，抗体孵育和 ECL 显色。最后用凝胶成像系统检测。

2.6 统计学分析 数据采用 SPSS 18.0 统计软件处理，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间采用单因素方差分析比较，两组间采用 *t* 检验进行比较，以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 GV142-HSF1 质粒的鉴定 从挑取的克隆中提取 GV142-HSF1 质粒，并进行 *Hind* III 与 *Xho* I 双酶切，产物符合理论大小。将阳性克隆送出测序，结果与 HSF1 序列 NM_024393.1 相符，说明质粒 GV142-HSF1 构建成功。

3.2 GV142-HSF1 稳定转染细胞模型的建立与鉴定 GV142-HSF1 质粒通过 FuGENE 6 转染试剂稳定转染至 H9c2 细胞后，细胞在荧光显微镜下显绿色荧光，这说明转染成功且载体编码的绿色荧光蛋白的融合蛋白得到表达。利用荧光强度，笔者筛选出了 FuGENE6 与 GV142-HSF1 质粒的最佳比例为 3:1，在该比例下荧光蛋白的表达最高，见图 1。

表 2 稳定转染细胞株中 HSF1 和 HSP70 的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

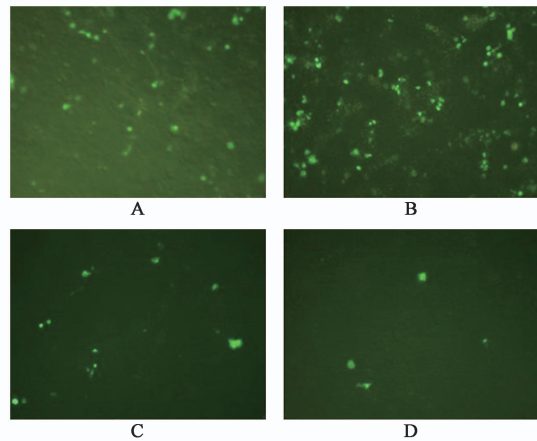
Table 2 Expressions of HSF1 and HSP70 in stably transfected cell line ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | mRNA | | 蛋白相对表达量 | |
|-----------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | HSF1/GAPDH | HSP70/GAPDH | HSF1/GAPDH | HSP70 /GAPDH |
| H9c2 | 1.00 ± 0.15 | 1.00 ± 0.10 | 0.18 ± 0.05 | 0.21 ± 0.08 |
| H9c2-HSF1 | 79.50 ± 8.01 ¹⁾ | 4.13 ± 0.82 ¹⁾ | 1.34 ± 0.15 ¹⁾ | 0.53 ± 0.05 ¹⁾ |

注：与 H9c2 组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 HSF1 高表达对参芎葡萄糖注射液抗氧化损伤作用的影响 H₂O₂ 处理后，H9c2 细胞和 H9c2-

利用该转染条件，将质粒通过 FuGENE 6 转染试剂转染至 H9c2 细胞后，用质量浓度为 800 mg·L⁻¹ 的 G418 筛选成功转染的细胞，第 5 天细胞开始大量死亡，第 14 天后大部分细胞死亡，得到 G418 抗性 H9c2 细胞的克隆。从中挑选单克隆继续进行筛选扩增，最终挑选出一株稳定表达 HSF1 的细胞株，取名 H9c2-HSF1。



A. 4:1; B. 3:1; C. 2:1; D. 1.5:1

图 1 细胞株转染 GV142-HSF1 质粒后绿色荧光蛋白表达情况 (荧光显微镜, ×100)

Fig.1 Expression of green fluorescent protein in cells transfected with GV142-HSF1 (fluorescence microscope, ×100)

3.3 H9c2-HSF1 细胞中 HSF1 及 HSP70 mRNA 及蛋白的表达 由于本文构建的是稳定转染细胞株，所以只需要比较未转染细胞和稳定转染细胞在目标蛋白表达量上的差异即可。H9c2-HSF1 组细胞与 H9c2 组细胞比较，HSF1 mRNA 的表达丰度明显升高，是正常组的 79 倍多 ($P < 0.01$)。H9c2-HSF1 组细胞中 HSP70 mRNA 表达也有相应增高，幅度为 4 倍多 ($P < 0.01$)。与正常 H9c2 细胞比较，H9c2-HSF1 细胞的 HSF1 蛋白表达明显增高 ($P < 0.01$)，HSP70 表达也相应增高 ($P < 0.01$)，与 Real-time PCR 实验结果相符。见表 2，图 2。以上结果说明高表达 HSF1 的 H9c2-HSF1 细胞系构建成功。

HSF1 的细胞存活率，SOD 和 GSH-Px 活力明显下降，ROS 水平，MDA 含量和 LDH，CK 释放量大幅增

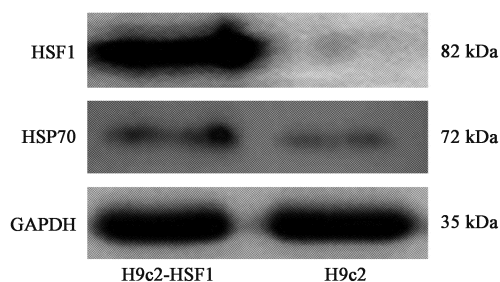


图 2 稳定转染细胞株中 HSF1 和 HSP70 蛋白的表达

Fig. 2 Protein expressions of HSF1 and HSP70 in stably transfected cell line

高,但这些指标在两组细胞中没有显著差异。参芎葡萄糖注射液预处理后,均能拮抗 H_2O_2 引起的

H9c2 细胞和 H9c2-HSF1 细胞损伤。从细胞存活率,MDA,LDH 和 CK 等指标上比较,参芎葡萄糖注射液的抗氧化损伤作用在 H9c2-HSF1 细胞中更为明显 ($P < 0.05, P < 0.01$),见表 3。但是在 ROS, SOD 和 GSH-Px 等指标上,两种细胞间无明显差异,见表 4。说明 HSF1 高表达能促进参芎葡萄糖注射液的抗氧化损伤作用,但该作用并不通过增强细胞清除 ROS 能力来实现。

3.5 各组细胞中 HSF1 和 HSP70 表达情况 H9c2 细胞在 H_2O_2 处理前后,HSF1 和 HSP70 表达量都较低,且没有明显差异。而在经过参芎葡萄糖注射液预处理后,H9c2 细胞的 HSF1 表达量有明显

表 3 HSF1 高表达对细胞存活率,MDA 含量,LDH 和 CK 释放量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of high HSF1-expression on survival rate, MDA content, LDH and CK levels ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 组别 | 存活率 /% | MDA / $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ | LDH / $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ | CK / $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ |
|--|----------------------------------|--|---|--|
| H9c2 细胞 | 100.00 \pm 3.36 | 1.84 \pm 0.13 | 122.76 \pm 4.38 | 312.24 \pm 12.04 |
| H9c2 细胞 + H_2O_2 处理 | 54.30 \pm 4.12 | 5.64 \pm 0.51 | 228.21 \pm 5.55 | 538.86 \pm 27.41 |
| H9c2 细胞 + H_2O_2 处理 + 参芎葡萄糖注射液预处理 | 74.68 \pm 4.10 ¹⁾ | 3.86 \pm 0.32 ¹⁾ | 178.70 \pm 7.48 ¹⁾ | 405.13 \pm 19.04 ¹⁾ |
| H9c2-HSF1 细胞 | 100.00 \pm 4.03 | 1.80 \pm 0.11 | 123.79 \pm 3.81 | 317.74 \pm 25.31 |
| H9c2-HSF1 细胞 + H_2O_2 处理 | 55.77 \pm 3.46 | 5.55 \pm 0.36 | 223.18 \pm 12.28 | 526.16 \pm 39.58 |
| H9c2-HSF1 细胞 + H_2O_2 处理 + 参芎葡萄糖注射液预处理 | 88.10 \pm 2.78 ^{2,4)} | 2.54 \pm 0.28 ^{2,4)} | 142.63 \pm 9.33 ^{2,4)} | 361.79 \pm 36.88 ^{2,3)} |

注:与 H9c2 细胞 + H_2O_2 处理组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 H9c2-HSF1 细胞 + H_2O_2 处理组比较²⁾ $P < 0.01$;与 H9c2 细胞 + H_2O_2 处理 + 参芎葡萄糖注射液预处理组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

表 4 HSF1 高表达对 ROS 含量,SOD 和 GSH-Px 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of high HSF1-expression on ROS content, SOD and GSH-Px levels ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 组别 | ROS(荧光强度) | SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ | GSH-Px/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ |
|--|--|--------------------------------------|---|
| H9c2 细胞 | 1 179.83 \pm 236.00 | 33.06 \pm 3.32 | 58.23 \pm 4.22 |
| H9c2 细胞 + H_2O_2 处理 | 25 887.67 \pm 3 856.90 | 15.60 \pm 2.38 | 24.35 \pm 3.06 |
| H9c2 细胞 + H_2O_2 处理 + 参芎葡萄糖注射液预处理 | 14 833.33 \pm 3 060.50 ²⁾ | 20.40 \pm 2.90 ¹⁾ | 37.50 \pm 3.27 ²⁾ |
| H9c2-HSF1 细胞 | 1 081.50 \pm 148.50 | 32.39 \pm 2.50 | 57.50 \pm 5.89 |
| H9c2-HSF1 细胞 + H_2O_2 处理 | 23 554.33 \pm 2 655.66 | 16.77 \pm 2.54 | 23.83 \pm 2.64 |
| H9c2-HSF1 细胞 + H_2O_2 处理 + 参芎葡萄糖注射液预处理 | 12 833.33 \pm 2 401.39 ⁴⁾ | 21.44 \pm 2.52 ³⁾ | 39.67 \pm 3.14 ⁴⁾ |

注:与 H9c2 细胞 + H_2O_2 处理组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 H9c2-HSF1 细胞 + H_2O_2 处理组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

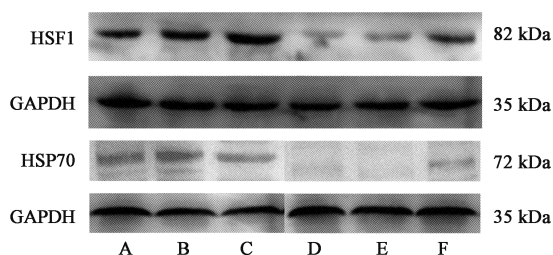
升高 ($P < 0.05$),HSP70 有所升高但无明显差异。参芎葡萄糖注射液预处理, H_2O_2 损伤后,H9c2-HSF1 细胞中的 HSF1 和 HSP70 表达量都明显高于 H9c2 细胞 ($P < 0.01$),见图 3,表 5。

4 讨论

FuGENE 6 转染试剂是一种非脂质体转染试剂,与其他试剂比较具有更高的转染效率、毒性更低等优势。因此实验选用 FuGENE 6 作为转染试剂,并筛选了最佳转染条件——FuGENE 6 转染试剂与 GV142-HSF1 质粒浓度比例为 3:1。实验表明,在该条件下,转染效率可达 90%。鉴定转染细胞系是否

构建成功的重要标志是外源基因是否表达且表达的外源基因是否具有功能。本文构建了一个能高表达 HSF1 蛋白的 H9c2 细胞系,为了验证该细胞是否构建成功,本文利用荧光显微镜观察,Real-time PCR 和 Western blot 等方法来进行鉴定。实验表明,细胞系在荧光显微镜下显绿色荧光;Real-time PCR,Western blot 表明 HSF1 蛋白在转染细胞中得到了高表达,并且其调控的下游蛋白 HSP70 的表达也显著增高。以上实验说明 H9c2-HSF1 细胞系构建成功,且高表达的 HSF1 能发挥正常基因调控功能。

HSPs 除了能修复受损伤的蛋白、降解不能被修



A. H9c2-HSF1 细胞; B. H9c2-HSF1 细胞 + H₂O₂; C. H9c2-HSF1 细胞 + H₂O₂ + 参芎葡萄糖注射液; D. H9c2 细胞; E. H9c2 细胞 + H₂O₂; F. H9c2 细胞 + H₂O₂ + 参芎葡萄糖注射液

图 3 各组细胞中 HSF1 和 HSP70 蛋白的表达

Fig. 3 Protein expressions of HSF1 and HSP70 of cells of different group

表 5 各组细胞中 HSF1 和 HSP70 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Protein expressions of HSF1 and HSP70 of cells of different group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | HSF1 /GAPDH | HSP70 /GAPDH |
|---|-----------------------------|-----------------------------|
| H9c2 细胞 | 0.76 ± 0.08 | 0.14 ± 0.04 |
| H9c2 细胞 + H ₂ O ₂ 处理 | 0.80 ± 0.09 | 0.16 ± 0.03 |
| H9c2 细胞 + H ₂ O ₂ 处理 + 参芎葡萄糖注射液预处理 | 1.89 ± 0.65 ¹⁾ | 0.27 ± 0.09 |
| H9c2-HSF1 细胞 | 5.22 ± 0.73 ²⁾ | 0.76 ± 0.14 ²⁾ |
| H9c2-HSF1 细胞 + H ₂ O ₂ 处理 | 5.67 ± 0.56 ²⁾ | 0.78 ± 0.13 ²⁾ |
| H9c2-HSF1 细胞 + H ₂ O ₂ 处理 + 参芎葡萄糖注射液预处理 | 7.37 ± 1.09 ^{2,3)} | 0.89 ± 0.11 ^{2,3)} |

注:与 H9c2 细胞组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 H9c2 细胞 + H₂O₂ 处理 + 参芎葡萄糖注射液预处理组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

复的蛋白和维持新生蛋白的正确折叠外,还有更广泛的细胞生物学功能,如调控细胞周期、胚胎发育、细胞分化以及抗细胞凋亡等方面的作用^[12]。作为 HSPs 调控因子的 HSF1 高表达极有可能通过上调 HSPs 的表达来提升细胞抗凋亡能力,从而起到抗氧化损伤的作用。课题组前期发现,参芎葡萄糖注射液预处理后,被 H₂O₂ 损伤的 H9c2 细胞中 HSF1 有上调趋势。为了分析 HSF1 的上调与参芎葡萄糖注射液抗氧化损伤作用之间的联系,本实验构建了一个 HSF1 高表达的 H9c2 细胞系,来考查 HSF1 高表达对参芎葡萄糖注射液抗氧化损伤作用的影响。根据前期研究结果,笔者选取了参芎葡萄糖注射液体积分数为 6% 来开展实验,该浓度的参芎葡萄糖注射液不会对 H9c2 细胞增殖产生影响^[10-11]。实验结果表明,HSF1 高表达虽然能引起 H9c2 胞内 HSP70 的表达增加,但对氧化损伤后 H9c2 细胞的存活率,MDA 含量,LDH 和 CK 释放量没有明显影响。在参芎葡萄糖注射液预处理的情况下,HSF1 高表达却能显著提高氧化损伤后细胞的存活率,显著降低 MDA

含量,LDH 和 CK 释放量,在参芎葡萄糖注射液发挥抗氧化损伤功能中起到协同作用。但是 HSF1 高表达并未影响参芎葡萄糖注射液清除胞内 ROS 的能力——参芎葡萄糖注射液预处理的情况下,氧化损伤的 H9c2-HSF1 和 H9c2 细胞中 ROS 含量,SOD 和 GSH-Px 活性并无明显差异。实验结果提示,HSF1 的表达上调,能在参芎葡萄糖注射液发挥抗氧化损伤功能中起到协同作用,明显增强参芎葡萄糖注射液抗氧化损伤功能,但该协同作用并未体现在提高细胞 ROS 清除能力上,其具体机制值得进一步研究。

[参考文献]

[1] LI J, Labbadia J, Morimoto R I. Rethinking HSF1 in stress, development, and organismal health [J]. Trends Cell Biol, 2017, 27(12):895-905.

[2] DAI C, Sampson S B. HSF1: guardian of proteostasis in cancer [J]. Trends Cell Biol, 2016, 26(1):17-28.

[3] Koliński T, Marek-Trzonkowska N. Heat shock proteins (HSPs) in the homeostasis of regulatory T cells (Tregs) [J]. Cent Eur J Immunol, 2016, 41(3):317-323.

[4] Coward J I, Middleton K, Murphy F. New perspectives on targeted therapy in ovarian cancer [J]. Int J Womens Health, 2015, 7: 189-203.

[5] Anckar J, Sistonen L. Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease [J]. Annu Rev Biochem, 2011, 80(80):1089-1115.

[6] de Thonel A, Le Mouél A and Mezger V. Transcriptional regulation of small HSP-HSF1 and beyond [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(10): 1593-1612.

[7] Nicoll W S, Aileen B. Approaches to the isolation and characterization of molecular chaperones [J]. Protein Expr Purif, 2006, 46(1):1-15.

[8] Whitesell L, Lindquist S L. HSP90 and the chaperoning of cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(10): 761-772.

[9] Nicoll W S, Boshoff A, Ludewig M H, et al. Approaches to the isolation and characterization of molecular chaperones [J]. Protein Exp Purif, 2006, 46(1): 1-15.

[10] 杨洋,刘兰,王文华,等. 参芎葡萄糖注射液对 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 细胞氧化损伤的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(1):163-168.

[11] 杨洋,刘亭,王文华,等. 参芎葡萄糖注射液对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞氧化损伤的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(8):153-158.

[12] Pirkkala L, Nykanen P, Sistonen L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond [J]. FASEB J, 2001, 15(7): 1118-1131.

[责任编辑 周冰冰]