

硫化氢通过抑制 p38 MAPK 通路和坏死性凋亡的相互作用对抗高糖引起的 H9C2 心肌细胞损伤和炎症

梁伟杰¹, 陈美姬², 何洁仪¹, 陈景福³, 郑东诞³, 李健豪¹, 张稳柱¹, 廖新学⁴

(1.广州市番禺区中心医院心血管内科//广州市番禺区心血管疾病研究所,广东 广州 511400;2,3.中山大学附属第一医院黄埔院区儿科²,心血管内科³,广东 广州 510700;4.中山大学附属第一医院心血管内科,广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨外源性硫化氢(H₂S)能否通过抑制 p38 丝裂原激活蛋白激酶(p38 MAPK)通路和坏死性凋亡的相互作用对抗高糖引起的 H9C2 心肌细胞损伤和炎症。【方法】采用细胞计数试剂盒 8(CCK-8)检测心肌细胞的存活率;ELISA 法检测细胞培养液中白介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平;蛋白质免疫印迹法(Western Blot)测定 p38 MAPK 和 RIP3 蛋白(反映坏死性凋亡的指标)的蛋白水平;双氯荧光素染色荧光显微镜照相测定细胞内活性氧(ROS)水平;罗丹明 123 染色荧光显微镜照相测定线粒体膜电位(MMP)。【结果】H9C2 心肌细胞经 35 mmol/L 葡萄糖(高糖, HG)作用 24 h, 胞内 RIP3 的蛋白水平明显增加, 应用 3 μ mol/L SB203580(p38 MAPK 抑制剂)预处理心肌细胞 60 min 能明显地抑制 HG 对 RIP3 蛋白水平的上调作用;另一方面, HG 可上调磷酸化(p)p38 MAPK 的蛋白水平, 应用 100 μ mol/L necrostatin-1(Nec-1, 坏死性凋亡的特异性抑制剂)共处理心肌细胞 24 h 能阻断 HG 对 p-p38 MAPK 蛋白水平的上调作用;而 400 μ mol/L NaHS(为 H₂S 的供体)预处理心肌细胞 30 min 能同时抑制 HG 对 RIP3 和 p-p38 MAPK 蛋白水平的上调作用。此外, 400 μ mol/L NaHS、3 μ mol/L SB203580 预处理或 100 μ mol/L Nec-1 共处理心肌细胞均可抑制 HG 引起的心肌细胞毒性、氧化应激、线粒体损伤和炎症反应, 使细胞存活率升高, ROS 生成、MMP 丢失及 IL-1 β 和 TNF- α 的分泌水平减少。【结论】抑制 p38 MAPK 通路和坏死性凋亡的相互作用可能是外源性 H₂S 对抗高糖引起的 H9c2 心肌细胞损伤和炎症的重要作用机制之一。

关键词:硫化氢; p38 丝裂原激活蛋白激酶; 坏死性凋亡; 相互作用; 高糖; 心肌细胞

中图分类号: R363

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2016)05-0649-08

Hydrogen Sulfide Protects H9C2 Cardiac Cells against High Glucose-Induced Injury and Inflammation by Inhibiting the Interaction between p38 MAPK Pathway and Necroptosis

LIANG Wei-jie¹, CHEN Mei-ji², HE Jie-yi¹, CHEN Jing-fu³, ZHENG Dong-dan³,

LI Jian-hao¹, ZHANG Wen-zhu¹, LIAO Xin-xue⁴

(1.Department of Cardiology, Central Hospital of Panyu District // Cardiovascular Institute of Panyu District, Guangzhou 511400, China; 2.Department of Paidology, 3.Department of Cardiology, Huangpu Division of The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510700, China; 4.Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: LIAO Xin-xue, E-mail: liaoxinx@mail.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】 To investigate whether exogenous hydrogen sulfide (H₂S) protects H9C2 cardiac cells against high glucose-induced injury and inflammation by inhibiting the interaction between p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) pathway and necroptosis. 【Methods】 The cell viability was measured by cell counter kit-8 (CCK-8) assay. The levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by ELISA. The protein levels of p38 MAPK and RIP3 (an indicator of necroptosis) were tested by western blotting. The intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) were detected by 2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) staining followed by photofluorography. Mitochondrial membrane potential (MMP) was

收稿日期: 2016-03-21

基金项目: 国家自然科学基金(81270296); 番禺区科技计划项目(2015-Z03-57)

作者简介: 梁伟杰, 硕士, 主治医师, 研究方向: 心血管介入和心血管疾病的保护机制, E-mail: 279096515@qq.com; 廖新学, 通信作者, 教授, 博士生导师, 研究方向: 心血管疾病的损伤与保护机制, E-mail: liaoxinx@mail.sysu.edu.cn

examined by rhodamine 123 (Rh 123) staining followed by photofluorography. 【Results】 After the H9C2 cells were treated with 35 mmol/L glucose (high glucose, HG) for 24 h, the protein level of RIP3 was significantly increased; pre-treatment of the cells with 3 μ mol/L SB203580 (an inhibitor of p38 MAPK) for 60 min considerably blocked the up-regulation of RIP3 protein level induced by HG. Moreover, co-treatment of the cells with 100 μ mol/L necrostatin-1 (Nec-1, a specific inhibitor of necroptosis) attenuated the up-regulation of phosphorylated (p)-p38 MAPK protein level induced by HG. In addition, pre-treatment of the cells with 400 μ mol/L NaHS (a donor of H_2S) inhibited the up-regulation of both RIP3 and p-p38 MAPK protein levels induced by HG. On the other hand, pre-treatment of the cells with 400 μ mol/L NaHS or 3 μ mol/L SB203580 or co-treatment of the cells with 100 μ mol/L Nec-1 ameliorated the HG-induced cytotoxicity, oxidative stress, mitochondrial damage and inflammation, evidenced by an increase in cell viability, decreases in the levels of ROS generation, MMP loss as well as the secretion levels of IL-1 β and TNF- α . 【Conclusion】 Inhibiting the interaction between p38 MAPK pathway and necroptosis may be an important mechanism responsible for the protection of exogenous H_2S against the HG-induced injury and inflammation in H9c2 cardiac cells.

Key words: hydrogen sulfide; p38 mitogen-activated protein kinase; necroptosis; interaction; high glucose; cardiomyocyte

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2016, 37(5): 649-656]

细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD) 是一个主动的、由基因决定的自动结束生命的过程。PCD 在糖尿病的心血管并发症如糖尿病心肌病 (diabetic cardiomyopathy, DCM) 的发生和发展中起关键性启动作用^[1]。坏死性凋亡 (necroptosis) 有独特的信号通路, 由死亡诱导因子如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 与相应的受体结合, 激活受体相互作用蛋白 (receptor interaction protein, RIP)1 和 RIP3 并使两者形成复合物从而启动 PCD, 小分子物质 necrostatin-1 (Nec-1) 能特异性地抑制这种细胞死亡方式^[2-5]。RIP3 是坏死性凋亡信号通路的关键性调节因子, 其表达和激活为坏死性凋亡所依赖^[5-7]。最近, 我们研究证实: 坏死性凋亡参与高糖引起的 H9c2 心肌细胞损伤, 外源性硫化氢 (hydrogen sulfide, H_2S) 可通过抑制坏死性凋亡的发生对抗高糖引起的心肌细胞损伤^[8]。有报道指出: 坏死性凋亡与 p38 丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路的关系非常密切, p38 MAPK 通路可介导坏死性凋亡的发生^[9-10]。然而, 在高糖状态下, p38 MAPK 信号通路与坏死性凋亡之间的关系如何, 两者是否存在相互作用, 如若存在, H_2S 能否通过抑制这种相互作用发挥心肌保护作用, 目前仍缺乏深入的研究。为此, 本研究通过高糖损伤 H9C2 心肌细胞建立 DCM 细胞实验模型^[11], 重点探讨: ① p38 MAPK 通路和坏死性凋亡之间相互关系如何; ② 外源性 H_2S 能否通过抑制 p38 MAPK 通路和坏死性凋亡之间的相互联系对抗高糖引起的心肌细胞损伤和炎症。

1 材料与方法

1.1 材料

SB203580 (p38 MAPK 通路抑制剂)、硫化氢钠 (sodium hydrosulfide, NaHS, 为 H_2S 的供体)、necrostatin-1 (Nec-1, 坏死性凋亡的特异性抑制剂)、双氯荧光素 (2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate, DCFH-DA) 和罗丹明 123 (rhodamine 123, Rh 123) 购自 Sigma-Aldrich 公司 (USA); 抗 RIP3 抗体和抗 p38 MAPK 抗体由 Cell Signaling 公司 (USA) 供应; 细胞计数试剂盒 8 (cell counter kit-8, CCK-8) 购自 Dojindo Lab (Japan); TNF- α 和白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒由武汉华美生物工程有限公司提供; 特级胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 购自 Gibco BRL (USA); DMEM 培养基 (其葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L) 由 Hyclone 公司 (USA) 供应。

1.2 细胞培养

H9C2 心肌细胞由中山大学实验动物中心供应, 在体积分数 5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 的条件下、于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中培养, 选取对数生长期细胞进行实验。

1.3 实验分组

实验分为 8 组: ① 对照 (Control) 组: 采用 DMEM 培养基作用心肌细胞 24 h; ② 高糖 (high glucose, HG) 组: 用含有高浓度葡萄糖 (35 mmol/L) 的 DMEM 培养基作用心肌细胞 24 h; ③ NaHS + HG 组: 400 μ mol/L NaHS 预处理心肌细胞 30 min, PBS 液洗 2 次, 然后用含高浓度葡萄糖的

DMEM培养基作用 24 h; ④SB203580 +HG 组: 3 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 作用心肌细胞 60 min, PBS 液洗 2 次, 然后用含高浓度葡萄糖的 DMEM 培养基作用 24 h; ⑤Nec-1+ HG 组: 100 $\mu\text{mol/L}$ Nec-1 与含高浓度葡萄糖的 DMEM 培养基共处理心肌细胞 24 h; ⑥NaHS 组: 400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 作用心肌细胞 30 min, PBS 洗 2 次, 接着 DMEM 培养基处理 24 h; ⑦SB203580 组: 3 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 作用心肌细胞 60 min, 撤去, PBS 洗 2 次, 接着 DMEM 培养基作用 24 h; (8) Nec-1 组: 100 $\mu\text{mol/L}$ Nec-1 与 DMEM 培养基共处理心肌细胞 24 h。

1.4 蛋白质免疫印迹法测定 RIP3 和 p38 MAPK 的蛋白水平

在 60 mm 培养皿中种植 H9C2 心肌细胞, 待细胞生长至约 80% 融合度时, 根据分组给予相应处理后, 预冷 PBS 液洗 3 次, 加入细胞裂解液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min, 11 400 $\times g$ 离心 10 min, 取上清, BCA 法进行蛋白含量。等量的蛋白经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入相应的 I 抗, 即兔抗鼠 RIP3、p-p38、t-p38、 β -actin (1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 作用过夜, 然后相应的 II 抗室温孵育 1.5 h。用增强化学发光法使 PVDF 膜显色, 暗室中将显色条带曝光到 X 线片上, 凝胶成像扫描系统分析结果。实验重复 5 次。

1.5 CCK-8 测定心肌细胞存活率

于 96 孔板中种植 H9C2 心肌细胞, 待细胞融合度达到约 80% 时, 按照设定的分组分别处理后, 弃上清, PBS 液洗 3 次, 每孔中加入 DMEM 90 μL 和 CCK-8 溶液 10 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2.5 h, 酶标仪上读取 450 nm 处的吸光度值 (A)。细胞存活率按照以下公式计算: 细胞存活率 = $A_{\text{处理组}}/A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。实验重复 5 次。

1.6 ELISA 法检测细胞培养液中 IL-1 β 和 TNF- α 的水平

于 96 孔板中种植 H9C2 心肌细胞, 待细胞融合度达到约 80% 时, 按照分组给予不同处理后, 收集培养基作待测标本。ELISA 操作流程按试剂盒说明书进行, 在终止显色反应后, 用酶标仪 ($\lambda = 450\text{nm}$) 测定各孔吸光度 (A)。取 5 孔 A 值的平均数, 根据以下公式计算 IL-1 β 和 TNF- α 的诱导释放率: $A_{\text{处理组}}/A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。实验重复 5 次。

1.7 DCFH-DA 染色荧光显微镜照相法测定胞内

活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平

用 24 孔板种植 H9C2 心肌细胞, 待细胞融合度达到约 80% 时, 按照分组给予相应处理后, PBS 液洗 3 次, 加入 DCFH-DA 稀释液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。在荧光显微镜下随机照相记录 5 个高倍镜视野, 图像分析软件 (Image J 1.47i) 计算绿色荧光强度的平均值 [平均荧光强度 (mean fluorescent intensity, MFI), 数值大小能间接反映 ROS 水平的高低], 再对每组数据进行分析。实验重复 5 次。

1.8 Rh 123 染色荧光显微镜照相法检测线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP)

用 24 孔板培养 H9C2 心肌细胞, 待细胞融合度达到约 80% 时, 按照分组给予相应处理后, PBS 液洗 3 次, 加入 Rh 123 缓冲液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min。Rh 123 是一种可透过细胞膜且在活细胞线粒体内聚集的细胞染色试剂, 荧光显微镜下发出绿色荧光, 当线粒体功能受损时荧光强度减弱或消失。每组随机照相记录 5 个高倍镜视野, 图像分析软件 (Image J 1.47i) 计算出绿色荧光的 MFI, 再对每组数据进行分析。实验重复 5 次。

1.9 统计分析

应用 SPSS 17.0 软件统计分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准误 (mean $\pm$ SEM) 表示, 单因素方差分析 (one-way ANOVA) 用于多个样本均数间的比较, 有统计学意义后用 SNK- q 检验进行均数间的两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

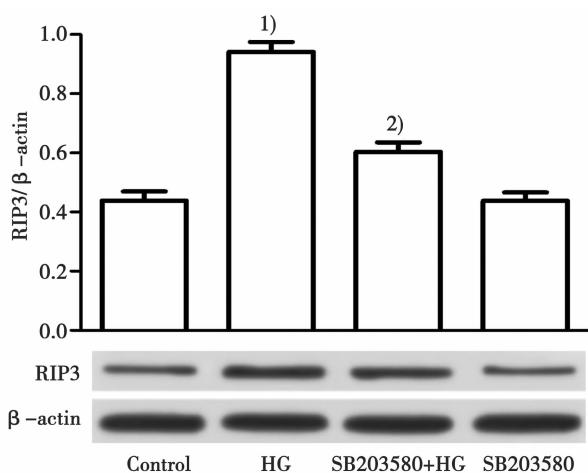
2 结 果

2.1 p38 MAPK 抑制剂拮抗 HG 对心肌细胞 RIP3 蛋白水平的上调作用

心肌细胞经 HG (35 mmol/L 葡萄糖) 作用 24 h, 其 RIP3 的蛋白表达水平明显升高。应用 3 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 (p38 MAPK 抑制剂) 预处理心肌细胞 60 min 后再予 HG 作用心肌细胞 24 h, RIP3 的蛋白水平明显降低, 与 HG 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。3 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 本身对心肌细胞 RIP3 的蛋白水平无明显影响 (图 1)。

2.2 坏死性凋亡抑制剂拮抗 HG 对磷酸化 p38 MAPK 蛋白水平的上调作用

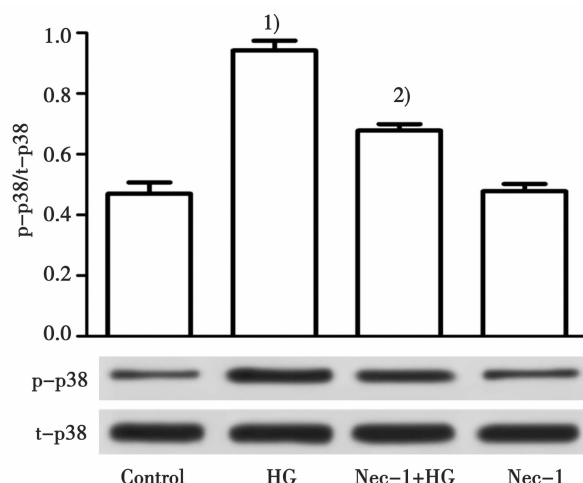
HG 作用 H9C2 心肌细胞 24 h 可使磷酸化 (phosphorated, p-) p38 MAPK 的蛋白水平明显升高。应用 100 $\mu\text{mol/L}$ Nec-1 (坏死性凋亡的特异性



After the H9C2 cardiac cells were exposed to HG for 24 h with or without pre-treatment with 3 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 (an inhibitor of p38 MAPK) for 60 min, the RIP3 protein levels were semi-quantified by western blot analysis. Data are shown as the means $\pm$ SEM ($n = 5$). ANOVA result: $F = 59.047$, $P = 0.000.1$) $P < 0.01$ vs control group; 2) $P < 0.01$ vs the HG-treated group.

图 1 p38 MAPK 抑制剂减轻 HG 对心肌细胞 RIP3 蛋白水平的上调作用

Fig.1 The inhibitor of p38 MAPK ameliorated the high glucose (HG)-induced up-regulation of RIP3 protein level in H9C2 cardiac cells



After the H9C2 cardiac cells were exposed to HG for 24 h with or without co-treatment with 100 $\mu\text{mol/L}$ Nec-1 (an inhibitor of necroptosis), the p-p38 protein levels were semi-quantified by western blot analysis. Data are shown as the means $\pm$ SEM ($n = 5$). ANOVA result: $F = 55.145$, $P = 0.000.1$) $P < 0.01$ vs control group; 2) $P < 0.01$ vs the HG-treated group.

图 2 坏死性凋亡抑制剂减弱 HG 对磷酸化 p38 MAPK 蛋白水平的上调作用

Fig.2 The inhibitor of necroptosis attenuated the high glucose (HG)-induced up-regulation of p-p38 MAPK protein level in H9C2 cardiac cells

抑制剂)和HG共处理心肌细胞24h,p-p38 MAPK的蛋白水平明显下降,与HG组比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。100 $\mu\text{mol/L}$ Nec-1本身对心肌细胞p-p38 MAPK的蛋白水平无明显的影响(图2)。

2.3 NaHS 抑制 HG 对心肌细胞 RIP3 和磷酸化 p38 MAPK 蛋白水平的上调作用

如前所述,心肌细胞经HG作用24h,其RIP3和p-p38 MAPK的蛋白水平明显升高。在HG作用前,应用400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS预处理心肌细胞30min,RIP3和p-p38 MAPK的蛋白水平均明显降低,与HG组比较,差异均具有统计学意义(P 均 < 0.01)。400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS本身对心肌细胞RIP3和p-p38 MAPK的基础蛋白水平无明显影响(图3)。

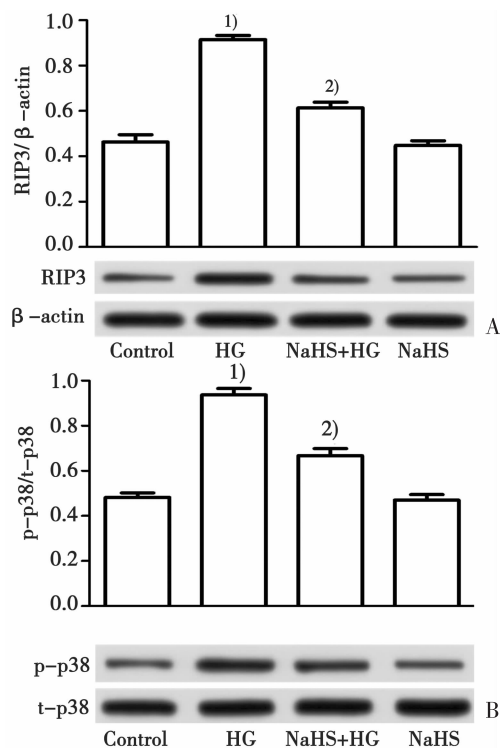
2.4 NaHS 和 p38 MAPK、坏死性凋亡的抑制剂对抗高糖引起的细胞毒性作用

HG作用心肌细胞24h可使细胞存活率明显降低。在HG作用前,应用400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS预处理心肌细胞30min可使细胞存活率明显升高,与HG组比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。类似

地,3 $\mu\text{mol/L}$ SB203580预处理60min或100 $\mu\text{mol/L}$ Nec-1与HG共处理心肌细胞24h均能明显升高细胞存活率,分别与HG组比较,差异均具有统计学意义(P 均 < 0.01)。400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS、3 $\mu\text{mol/L}$ SB203580或100 $\mu\text{mol/L}$ Nec-1本身对心肌细胞的存活率无明显的影响(图4)。

2.5 NaHS 和 p38 MAPK、坏死性凋亡的抑制剂减轻高糖引起的细胞炎症反应

HG作用心肌细胞24h可明显升高炎症因子IL-1 β (图5A)和TNF- α (图5B)的分泌水平,与Control组比较,差异均具有统计学意义(P 均 < 0.01)。在HG作用前,应用400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS预处理心肌细胞30min可使IL-1 β 和TNF- α 的分泌水平明显降低,分别与HG组比较,差异均具有统计学意义(P 均 < 0.01)。与NaHS的作用相类似,3 $\mu\text{mol/L}$ SB203580预处理60min或100 $\mu\text{mol/L}$ Nec-1和HG共处理心肌细胞24h也能降低IL-1 β 和TNF- α 的分泌水平,分别与HG组比较,差异均具有统计学意义(P 均 < 0.01)。400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS、3 $\mu\text{mol/L}$ SB203580或100 $\mu\text{mol/L}$ Nec-1



After the H9C2 cardiac cells were exposed to HG for 24 h with or without pre-treatment with 400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS (a donor of H_2S) for 30 min, the RIP3 (A) and p-p38 MAPK (B) protein levels were semi-quantified by western blot analysis. Data are shown as the means $\pm$ SEM ($n = 5$). ANOVA result: $F_{\text{RIP3}} = 76.925$, $P_{\text{RIP3}} = 0.000$; $F_{\text{p-p38}} = 66.833$, $P_{\text{p-p38}} = 0.000.1$) $P < 0.01$ vs control group; 2) $P < 0.01$ vs the HG-treated group.

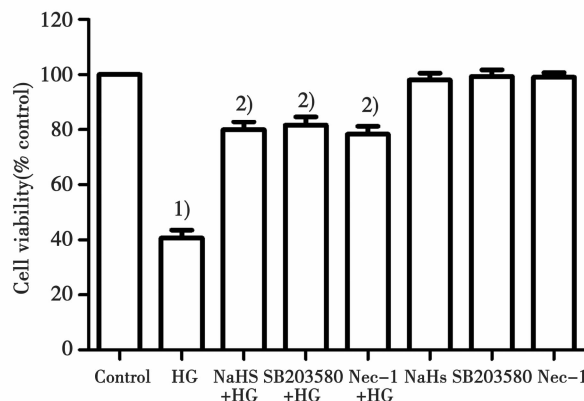
图3 NaHS抑制HG对心肌细胞RIP3和磷酸化p38 MAPK蛋白表达的上调作用

Fig.3 NaHS attenuated the high glucose (HG)-induced up-regulation of RIP3 and p-p38 MAPK protein levels in H9C2 cardiac cells

本身对细胞炎症因子的分泌无明显影响。

2.6 NaHS和p38 MAPK、坏死性凋亡的抑制剂对抗高糖引起的心肌细胞氧化应激反应

HG作用心肌细胞24 h可诱导明显的氧化应激反应,细胞内的DCFH-DA的MFI明显增强(HG组),与Control组比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。在HG作用前,应用400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS预处理30 min, MFI明显减弱(NaHS+HG组),与HG组比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。与NaHS的作用相类似,3 $\mu\text{mol/L}$ SB203580预处理心肌细胞60 min(SB203580+HG组)或100 $\mu\text{mol/L}$ Nec-1和HG共处理心肌细胞24 h(Nec-1+HG组)均能降低DCFH-DA的MFI值,分别与HG组比较,差异均具有统计学意义(P 均 < 0.01)。400



The H9C2 cardiac cells were exposed to HG for 24 h with or without pre-treatment with 400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS (a donor of H_2S) for 30 min, or pre-treatment with 3 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 (an inhibitor of p38 MAPK) for 60 min, or co-treatment with 100 $\mu\text{mol/L}$ Nec-1 (an inhibitor of necroptosis) for 24 h. Cell viability was detected using the CCK-8 assay. Data are shown as the means $\pm$ SEM ($n = 5$). ANOVA result: $F = 65.651$, $P = 0.000$. 1) $P < 0.01$ vs control group; 2) $P < 0.01$ vs the HG-treated group.

图4 NaHS和p38 MAPK、坏死性凋亡的抑制剂减轻高糖引起的细胞毒性作用

Fig.4 NaHS, the inhibitor of p38 MAPK and necroptosis attenuated the high glucose (HG)-induced cytotoxicity in H9C2 cardiac cells

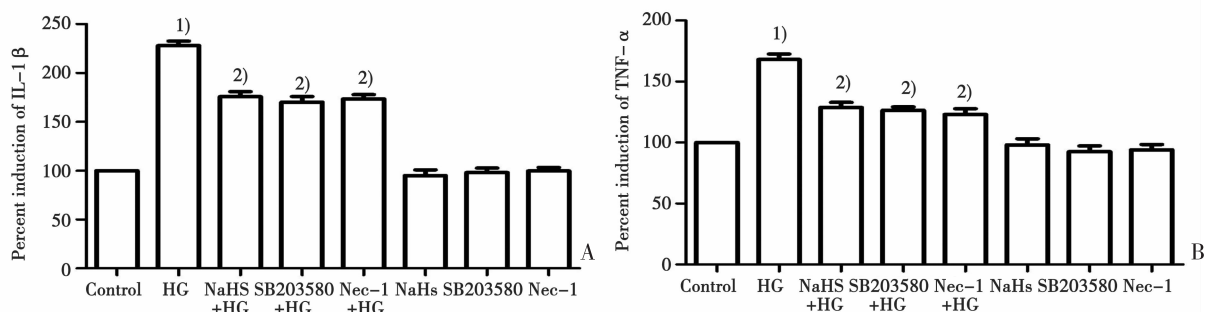
$\mu\text{mol/L}$ NaHS、3 $\mu\text{mol/L}$ SB203580或100 $\mu\text{mol/L}$ Nec-1本身对细胞ROS的生成无明显的影响(图6)。

2.7 NaHS和p38 MAPK、坏死性凋亡的抑制剂对抗高糖引起的心肌细胞MMP丢失

HG作用心肌细胞24 h对线粒体有明显的损伤作用,可降低胞内Rh 123的MFI(HG组)。在HG作用前,应用400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS预处理30 min可使MFI明显升高(NaHS+HG组),与HG组比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。类似地,3 $\mu\text{mol/L}$ SB203580预处理60 min(SB203580+HG组)或100 $\mu\text{mol/L}$ Nec-1和HG共处理心肌细胞24 h(Nec-1+HG组)均能升高胞内Rh 123的MFI值,分别与HG组比较,差异均具有统计学显著性。(P 均 < 0.01)。400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS、3 $\mu\text{mol/L}$ SB203580或100 $\mu\text{mol/L}$ Nec-1本身对细胞MMP水平无明显的影响(图7)。

3 讨论

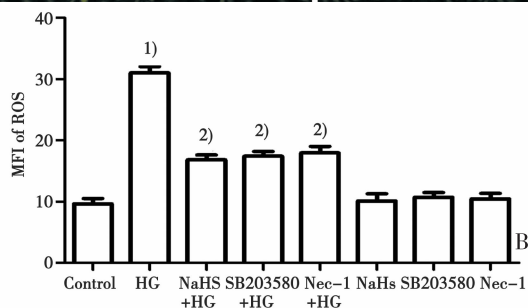
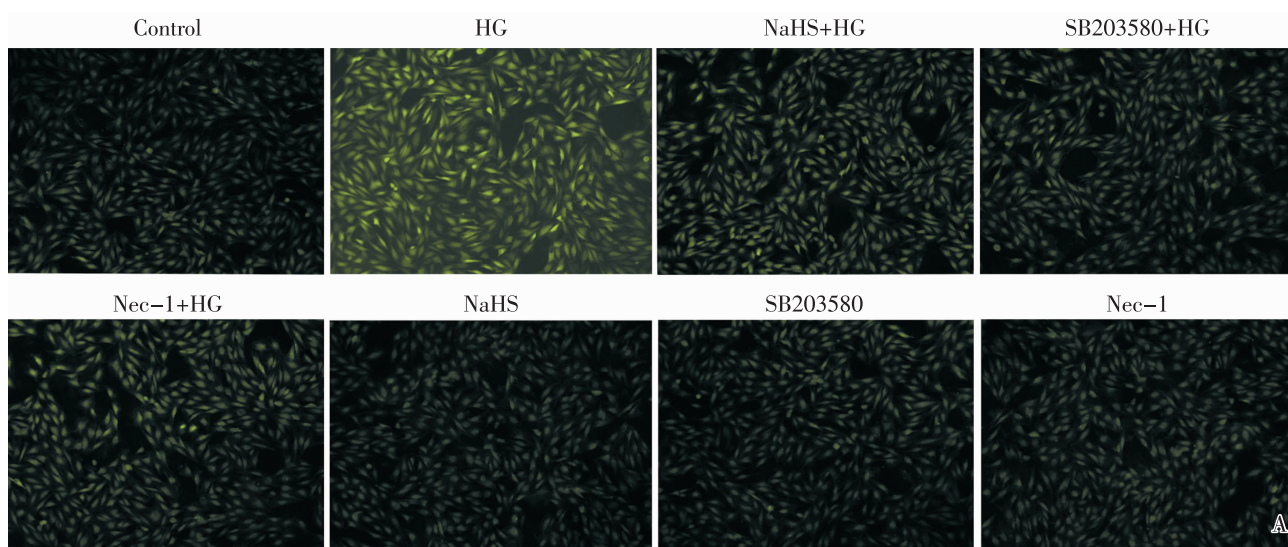
高血糖可通过激活p38 MAPK^[11-12]、核因子-



The H9C2 cardiac cells were exposed to HG for 24 h with or without pre-treatment with 400 μ mol/L NaHS (a donor of H₂S) for 30 min, or pre-treatment with 3 μ mol/L SB203580 (an inhibitor of p38 MAPK) for 60min, or co-treatment with 100 μ mol/L Nec-1 (an inhibitor of necroptosis) for 24 h. ELISA was performed to determine the levels of IL-1 β (A) and TNF- α (B) in cell supernatants. Data are shown as the means $\pm$ SEM ($n = 5$). ANOVA result: $F_{IL-1\beta} = 123.639$, $P_{IL-1\beta} = 0.000$; $F_{TNF-\alpha} = 38.605$, $P_{TNF-\alpha} = 0.000$. 1) $P < 0.01$ vs control group; 2) $P < 0.01$ vs the HG-treated group.

图 5 NaHS 和 p38 MAPK、坏死性凋亡的抑制剂对抗高糖引起的心肌细胞炎症因子分泌

Fig.5 NaHS, the inhibitor of p38 MAPK and necroptosis attenuated the high glucose (HG)-induced secretion of inflammatory cytokines in H9C2 cardiac cells



A: After the H9C2 cardiac cells were exposed to HG for 24 h with or without pre-treatment with 400 μ mol/L NaHS (a donor of H₂S) for 30 min, or pre-treatment with 3 μ mol/L SB203580 (an inhibitor of p38 MAPK) for 60min, or co-treatment with 100 μ mol/L Nec-1 (an inhibitor of necroptosis) for 24 h, intracellular ROS generation was measured by 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) staining followed by photofluorography, $\times 200$. B: Quantitative analysis of mean fluorescence intensity (MFI) in (A) using Image J 1.47i software. Data are shown as the means $\pm$ SEM ($n = 5$). ANOVA result: $F = 60.128$, $P = 0.000.1$) $P < 0.01$ vs control group; 2) $P < 0.01$ vs the HG-treated group.

图 6 NaHS 和 p38 MAPK、坏死性凋亡的抑制剂对抗高糖引起的心肌细胞氧化应激

Fig.6 NaHS, the inhibitor of p38 MAPK and necroptosis attenuated the high glucose (HG)-induced oxidative stress in H9C2 cardiac cells

κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)^[13]、瘦素^[14]等信号通路损伤心肌细胞。最近,我们实验表明,坏死性凋亡参与 HG 引起的 H9C2 心肌细胞损伤^[8]。有研究指出,在人成纤维细胞(L929)^[9]和人神经母细胞

瘤细胞(SH-SY5Y)^[10]等细胞模型中,坏死性凋亡的发生与 p38 MAPK 关系非常密切。但是,在 HG 损伤心肌细胞模拟 DCM 的细胞模型中,坏死性凋亡与 p38 MAPK 之间的关系如何,目前尚未有定

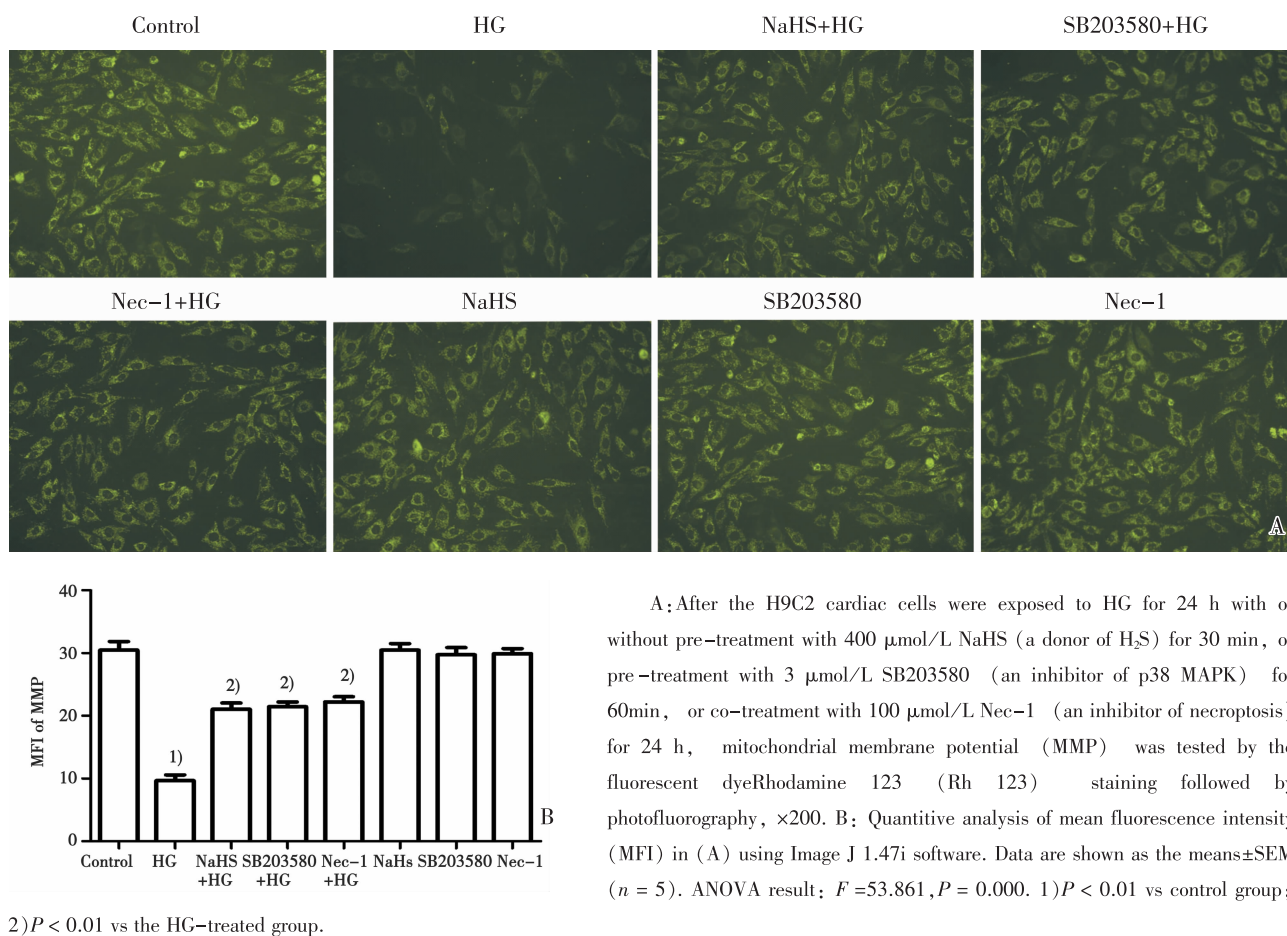


图 7 NaHS 和 p38 MAPK、坏死性凋亡的抑制剂对抗高糖引起的心肌细胞 MMP 丢失

Fig.7 NaHS, the inhibitor of p38 MAPK and necroptosis attenuated the high glucose (HG)-induced mitochondrial membrane potential (MMP) loss in H9C2 cardiac cells

论。在本研究中我们观察到, p38 MAPK 通路的抑制剂 SB203580 可减弱 HG 对 RIP3 蛋白的上调作用, 提示 p38 MAPK 通路可通过引起坏死性凋亡而损伤心肌; 另一方面, 应用坏死性凋亡的特异性抑制剂 Nec-1 可明显拮抗 HG 对 p-p38 MAPK 蛋白水平的上调作用, 提示坏死性凋亡可通过激活 p38 MAPK 通路引起心肌细胞损伤。此外, SB203580 预处理和 Nec-1 共处理心肌细胞均能对抗 HG 引起的心肌细胞毒性、细胞炎症、氧化应激和线粒体损伤。上述结果清晰地提示: 在 HG 损伤心肌模拟 DCM 的细胞模型中, HG 可激活 p38 MAPK 信号通路和诱导坏死性凋亡发生, 两者之间存在正相互作用, 即激活的 p38 MAPK 通路可促进坏死性凋亡的发生, 而坏死性凋亡也可激活 p38 MAPK 通路, 两者的正相互作用可能是 HG 引起心肌细胞损伤和炎症反应的重要作用机制之一。

我们在前期研究^[8,11]的基础上, 进一步证实了

A: After the H9C2 cardiac cells were exposed to HG for 24 h with or without pre-treatment with 400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS (a donor of H_2S) for 30 min, or pre-treatment with 3 $\mu\text{mol/L}$ SB203580 (an inhibitor of p38 MAPK) for 60min, or co-treatment with 100 $\mu\text{mol/L}$ Nec-1 (an inhibitor of necroptosis) for 24 h, mitochondrial membrane potential (MMP) was tested by the fluorescent dye Rhodamine 123 (Rh 123) staining followed by photofluorography, $\times 200$. B: Quantitative analysis of mean fluorescence intensity (MFI) in (A) using Image J 1.47i software. Data are shown as the means $\pm$ SEM ($n = 5$). ANOVA result: $F = 53.861$, $P = 0.000$. 1) $P < 0.01$ vs control group; 2) $P < 0.01$ vs the HG-treated group.

外源性 H_2S 通过抑制 p38 MAPK 通路和坏死性凋亡之间的相互作用对抗高糖引起的心肌细胞损伤和炎症反应。 H_2S 是继 NO 和 CO 之后的第 3 种内源性气体信号分子^[15], 其心肌保护作用已得到越来越多的研究^[11,14,16-17]证实。我们近期证实, 外源性 H_2S 可通过抑制 p38 MAPK 通路或坏死性凋亡对抗 HG 引起的心肌细胞损伤^[8,11], 而本研究中我们同时证实外源性 H_2S 能抑制 p38 MAPK 通路和坏死性凋亡, 因此我们推测 H_2S 保护心肌细胞对抗 HG 引起的损伤和炎症与其抑制 p38 MAPK 通路和坏死性凋亡之间的相互作用有关。为此, 我们进一步观察了 NaHS、p38 MAPK 抑制剂及坏死性凋亡抑制剂对 HG 诱导心肌细胞损伤和炎症的影响。结果表明, NaHS、SB203580 及 Nec-1 均可减轻 HG 诱导的心肌细胞损伤和炎症, 表现为细胞存活率升高, ROS 生成及 MMP 丢失及细胞炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的分泌减少。上述结果提示, 外源

性 H₂S 对 p38 MAPK 通路和 Nec 之间的正相互作用的抑制, 可能是 H₂S 对抗 HG 引起的心肌损伤和炎症的重要机制之一。

综上所述, 本研究证实, HG 损伤心肌细胞过程中, p38 MAPK 通路和坏死性凋亡之间存在正相互作用; H₂S 通过抑制 p38 MAPK 通路和坏死性凋亡之间的相互联系对抗高糖引起的心肌细胞损伤和炎症。本研究为深入阐明 H₂S 的心肌保护机制提供了新颖的实验依据。

致谢: 本实验在中山大学中山医学院科技楼开展, 在此非常感谢实验室里给予我们大力支持和帮助的师兄、师姐、师弟和师妹, 尤其感谢中山医学院生理学教研室冯鉴强教授对本研究设计及文章书写给予的悉心指导!

参考文献

- [1] CAI L, KANG YJ. Cell death and diabetic cardiomyopathy [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2003, 3(3): 219–228.
- [2] DEGRETEV A, HUANG Z, BOYCE M, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury [J]. *Nat Chem Biol*, 2005, 1(2): 112–119.
- [3] ZHOU W, YUAN J. Necroptosis in health and diseases [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 35: 14–23.
- [4] GOLSTEIN P, KROEMER G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition [J]. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32(1): 37–43.
- [5] LUKENS JR, VOGEL P, JOHNSON GR, et al. RIP1-driven autoinflammation targets IL-1 α independently of inflammasomes and RIP3 [J]. *Nature*, 2013, 498(7453): 224–227.
- [6] HE S, WANG L, MIAO L, et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- α [J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1100–1111.
- [7] LUEDDE M, LUTZ M, CARTER N, et al. RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodelling after myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 103(2): 206–216.
- [8] 梁伟杰, 何洁仪, 张稳柱, 等. 硫化氢通过抑制坏死性凋亡对抗高糖引起的 H9c2 心肌细胞损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(3): 385–391.
- [9] WANG D, ZHAO M, CHEN G, et al. The histone deacetylase inhibitor vorinostat prevents TNF α -induced necroptosis by regulating multiple signaling pathways [J]. *Apoptosis*, 2013, 18(11): 1348–1362.
- [10] JIA X, ZHANG Q, NIU Q. MAPK signaling pathways involved in aluminum-induced apoptosis and necroptosis in SH-SY5Y cells [J]. *Wei Sheng Yan Jiu*, 2014, 43(6): 917–922.
- [11] XU W, WU W, CHEN J, et al. Exogenous hydrogen sulfide protects H9c2 cardiac cells against high glucose-induced injury by inhibiting the activities of the p38 MAPK and ERK1/2 pathways [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(4): 917–925.
- [12] THANDAVARAYAN RA, GIRIDHARAN VV, SARI FR, et al. Depletion of 14-3-3 protein exacerbates cardiac oxidative stress, inflammation and remodeling process via modulation of MAPK/NF- κ B signaling pathways after streptozotocin-induced diabetes mellitus [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2011, 28(5): 911–922.
- [13] 梁伟杰, 陈景福, 宋明才, 等. 血管紧张素-(1-7)/Mas 受体轴通过调控 NF- κ B 通路保护心肌细胞对抗高糖诱导的损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(2): 267–273.
- [14] LIANG WJ, CHEN JF, SONG MC, et al. Angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis protects cardiomyocytes against high glucose-induced injury by modulating nuclear factor- κ B pathway [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2015, 31(2): 267–273.
- [15] ZHUANG XD, HU X, LONG M, et al. Exogenous hydrogen sulfide alleviates high glucose-induced cardiotoxicity via inhibition of leptin signaling in H9c2 cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 391(1-2): 147–155.
- [16] HOSOKI R, MATSUKI N, KIMURA H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 237(3): 527–531.
- [17] 徐文明, 林健聪, 王秀玉, 等. 调控 ERK1/2 通路在 H2S 保护心肌细胞对抗阿霉素损伤中的作用 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2013, 34(1): 48–52.
- [18] XU WM, LIN JC, WANG XY, et al. Role of modulating extracellular signal-regulated kinases 1/2 pathway in cardioprotection of hydrogen sulfide against doxorubicin-induced injury [J]. *J Sun Yat-Sen Univ (Med Sci)*, 2013, 34(1): 48–52.
- [19] LIANG W, CHEN J, MO L, et al. ATP-sensitive K⁺ channels contribute to the protective effects of exogenous hydrogen sulfide against high glucose-induced injury in H9c2 cardiac cells [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(3): 763–772.

(编辑 孙慧兰)