调控 ERK1/2 通路在 H_2S 保护心肌细胞对抗阿霉素损伤中的作用

徐文明[1]，林健聪[1]，王秀玉[2]，郭润民[2]，沈 宁[2]，华潇潇[2]，陈培熹[2]，冯鉴强[2*]
(中山大学 1. 附属第一医院黄埔院区内科；2. 中山医学院生理学教研室，广东 广州 510080)

摘 要：【目的】探讨胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)在阿霉素心肌毒性中的作用及硫化氢(H_2S)是否通过调控 ERK1/2 通路抑制阿霉素的心肌毒性。【方法】 应用阿霉素处理 H9c2 心肌细胞建立心肌细胞毒性损伤模型；CCK-8 比色法测定细胞存活率；蛋白印迹法(Western blot)检测 ERK1/2 蛋白的表达水平；双氯荧光素(DCFH-DA)染色荧光显微镜照相测定细胞内的活性氧(ROS)水平；罗丹明 123(Rh123)染色荧光显微镜照相检测线粒体膜电位(MMP)。【结果】5 μmol/L 阿霉素呈时间依赖性地上调磷酸化(p)ERK1/2 表达水平；硫氢化钠(NaHS，为 H_2S 的供体)预处理心肌细胞 30 min 明显地抑制阿霉素对 p-ERK1/2 表达的上调作用；400 μmol/L NaHS 和 10 μmol/L PD-98059(ERK1/2 抑制剂)预处理 30 min，均能对抗阿霉素引起的心肌细胞损伤，分别使 H9c2 的存活率增加，胞内 ROS 堆积和 MMP 丢失均减少。【结论】ERK1/2 通路介导阿霉素的心肌毒性作用；通过抑制 ERK1/2 通路可能是 H2S 保护心肌细胞对抗阿霉素心肌毒性的作用机制之一。

关键词：胞外信号调节激酶 1/2；硫化氢；阿霉素；心肌毒性
中图分类号：R33 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-3554(2013)01-0048-05

Role of Modulating Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2 Pathway in Cardioprotection of Hydrogen Sulfide against Doxorubicin-induced Injury

XU Wen-ming[1], LIN Jian-cong[1], WANG Xiu-yu[2], GUO Run-min[2], SHEN Ning[2], HUA Xiao-xiao[2], CHEN Pei-xi[2], FENG Jian-qiang[2*]
(1.Department of Internal Medicine, Huangpu Division of the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2.Department of Physiology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the role of extracellular signal-regulated kinases1/2 (ERK1/2) in cardiotoxicity induced by doxorubicin (DOX) and whether hydrogen sulfide (H_2S) inhibits DOX-induced cardiotoxicity by modulating ERK1/2 pathway in H9c2 cardiac cells. 【Methods】 H9c2 cardiac cells were treated with DOX to establish the model of cardiotoxicity injury. The expression level of ERK1/2 was tested by Western blot assay. Intracellular level of reactive oxygen species (ROS) was detected by DCFH-DA staining and photoflurography. Mitochondrial membrane potential (MMP) was measured by rhodamine 123 staining and photoflurography. 【Results】 DOX at 5 μmol/L time-dependently upregulated expressive level of phosphorylated (p) ERK1/2. Pretreatment of H9c2 cardiac cells with sodium hydrosulfide (NaHS, a H_2S donor) for 30 min obviously inhibited up-regulation of p-ERK1/2 expression induced by DOX. Pretreatment of cardiac cells with both NaHS (400 μmol/L) or PD-98059 (an inhibitor of ERK1/2, 10 μmol/L) for 30 min respectively blocked cardiomyocyte injury induced by DOX, increasing cell viability of H9c2 cardiac cells, reducing accumulation of intracellular ROS and loss of MMP. 【Conclusion】 ERK1/2 pathway mediates DOX-induced cardiotoxicity. Inhibition of ERK1/2 pathway may be one of the mechanism underlying cardioprotection of H_2S against cardiotoxicity induced by DOX.

Key words: extracellular signal-regulated kinases1/2; hydrogen sulfide; doxorubicin; cardiotoxicity
[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(1): 48-52]

收稿日期：2012-08-27
基金项目：广东省科技计划项目(2010B080701035；2009B080701014)
作者简介：徐文明，硕士，主治医师，研究方向：内分泌与心血管疾病的基础与临床，E-mail：XWM920018@163.com；*通信作者：冯鉴强，教授，博士生导师，研究方向：细胞保护及其机制，E-mail：fengjq-sums@163.com

阿霉素是一种临床上常用的广谱化疗药物,被应用于白血病、淋巴瘤、乳腺癌和黑色素瘤等恶性肿瘤的治疗[1]。但是,由于它呈剂量依赖性地诱发心肌毒性(cardiotoxicity),例如心律失常、心肌病和心力衰竭等[2-3],故限制了其临床应用。因此深入研究阿霉素引起的心肌毒性的分子机制及抑制此毒性的作用与机制具有重要的临床意义。近年,丝裂原激活蛋白激酶(补英文全称,MAPK)家族中的成员之一:胞外信号调节激酶 1/2(extracellular signal-regulated kinases 1/2)在阿霉素心肌毒性中的作用日益受到重视,但是,在不同的实验模型,存在不同的结果。例如,Esaki 等[4]认为,阿霉素能抑制心肌细胞内 ERK1/2 的活化,肝细胞生长因子可通过激活 ERK1/2 通路对抗阿霉素引起的心肌病;而 Lou 等[5]在离体的心肌细胞却观察到,阿霉素能激活 ERK1/2 通路,抗氧化剂能抑制阿霉素引起的心肌细胞凋亡及 ERK1/2 的活化。因此,深入研究 ERK1/2 通路在阿霉素诱导的心肌毒性中的作用很有必要。最近,本研究小组证实,气体信号分子硫化氢(H_2S)能通过抗氧化作用及抑制内质网应激等途径保护心肌细胞对抗阿霉素的心肌毒性[6]。然而 H2S 能否通过调制ERK1/2 通路对抗阿霉素引起的心肌细胞损伤迄今尚未明了。为此,本研究根据最近的研究成果[6]应用 5 μmol/L 阿霉素处理 H9c2 心肌细胞以建立阿霉素心肌毒性的实验模型,旨在探讨:(1)阿霉素对 ERK1/2 表达的影响;(2)ERK1/2 通路在阿霉素引起的心肌损伤中的作用;(3)400 μmol/L H2S 预处理[6]是否通过调控 ERK1/2 通路对抗阿霉素的心肌毒性。

1　材料与方法

1.1　材　料

阿霉素、NaHS、PD-98059 (ERK1/2 抑制剂)、罗丹明 123(rhodamin 123,Rh123)以及双氯荧光素酶 (2′,7′-dichlorfluorescein-diacetate, DCFH-DA)购自 Sigma-Aldrich 公司(USA)。细胞计数试剂盒-8(Cell Counter Kit-8, CCK-8)由 Dojindo 公司 (日本) 提供。DMEM-F12 培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium F12, DMEM-F12 medium)以及特级胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Gibco BRL(USA)。

1.2　CCK-8 法测定细胞存活率

根据 CCK-8 试剂盒的说明书检测细胞活力[6]。当细胞生长至 70%~80%融合时,给予不同的条件培养基。处理结束后,每孔加入无血清培养基稀释的 CCK-8 工作液 150 μL;在未接种细胞的培养孔内加入 150 μL CCK-8 工作液,作为空白对照。37 ℃培养 3 h,用酶标仪(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)记录 450 nm 波长处的吸光度。取 4 孔光密度(optical density, D)的平均值,按照下列公式计算细胞存活率:$r_{viability} = (D_{处理组} - D_{空白组}) / (D_{对照组} - D_{空白组}) \times 100\%$。实验重复 3 次后,进行统计分析。

1.3　Western blot 法检测 ERK1/2 蛋白的表达

H9c2 心肌细胞接种于 60 mm 培养皿内,各实验组给予不同的处理因素后, 用预冷的 PBS 洗两次, 加入细胞裂解液,4 ℃静置 30 min,10 000 ×g 离心 10 min,取上清,采用 BCA 法进行蛋白定量。总蛋白经 SDS PAGE 分离后,转移到 PVDF 膜上。用 5%脱脂奶粉封闭 1 h, 而后在 4 ℃分别与特异性的一抗孵育过夜:兔抗大鼠 ERK1/2 抗体 (1∶1000 dilution; Bioworld Technology, Dublin, USA),接着与相应的二抗室温孵育 1.5 h。将 PVDF 膜用发光试剂 ECL 显色,暗室曝光到 X 线片上,将 X 线片扫描后,ImageJ 1.41o 软件 (National Institutes of Health,USA), 进行半定量分析。

1.4　细胞内 ROS 含量的检测

DCFH-DA 是一种本身没有荧光,可以自由穿过细胞膜的物质。当其进入细胞后,可被细胞内的酯酶水解成 DCFH, 而 DCFH 不能自由穿过细胞膜,从而将探针装载到细胞内。细胞内的 ROS 可将无荧光的 DCFH 氧化成发出绿色荧光的 DCF。绿色荧光的强弱可以间接反映细胞内 ROS 的水平。H9c2 心肌细胞被均匀地接种于盖玻片上,各处理因素作用后, 盖玻片用 PBS 洗两次, 在含 10 μmol/L DCFH-DA 的无血清培养基中 37 ℃避光孵育 30 min。在荧光显微镜下随机摄片,绿色荧光强度用 ImageJ 1.41o 软件进行半定量分析[6]。

1.5　线粒体膜电位的检测

当细胞生长到约 80%融合时, 根据实验需要给予不同的条件培养基。处理结束后,用 PBS 洗 2 次,在含 100 μg/L Rh 123 的无血清培养基中 37 ℃孵育 30 min。在荧光显微镜下随机选取 3 个不重复区摄片, 细胞核周围绿色的亮点即为摄取了

Rh123 的线粒体。用 ImageJ 1.41o 软件对绿色荧光强度进行半定量分析[7]。

1.6 统计分析

实验数据以平均数 ± 标准误 (mean ± SE)表示,用 SPSS 13.0(SPSS, Chicago, IL, USA)软件进行统计分析。组间差别采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA),两两比较按照最小显著性差异(least significant difference, (LSD)-*t* test)进行。$P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 阿霉素时间依赖性地促进心肌细胞 p-ERK1/2 的表达

图 1 结果显示, 应用 5 μmol/L 阿霉素处理 H9c2 心肌细胞 1 ~ 6 h,可呈时间依赖性地增加磷酸化(p)ERK1/2 的表达,而 5 μmol/L 阿霉素对总(t)ERK1/2 的表达水平无明显影响(图 1B)。

2.2 H_2S 抑制阿霉素诱导的 ERK1/2 活化

为了明确外源性 H_2S 是否通过抑制阿霉素诱导的 ERK1/2 活化发挥其心肌细胞保护作用。本研究在应用 5 μmol/L 阿霉素处理 H9c2 心肌细胞前, 应用 400 μmol/L NaHS (H_2S 供体) 预处理 H9c2 心肌细胞 30 min。结果,H_2S 能明显地抑制阿霉素对 p-ERK1/2 的上调作用。400 μmol/L NaHS 本身对 ERK1/2 的基础表达无明显的影响(图 2)。

2.3 H_2S 和 ERK1/2 抑制剂保护心肌细胞对抗阿霉素引起的细胞毒性

在 5 μmol/L 阿霉素处理 H9c2 心肌细胞前,应用 400 μmol/L NaHS 预处理 30 min, 可明显地抑制阿霉素引起的细胞毒性, 使细胞存活率明显升高,与阿霉素组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。类似地, 应用选择性 ERK1/2 抑制剂 PD-98059(10 μmol/L)预处理 H9c2 心肌细胞 30 min 也能显著地保护心肌细胞对抗阿霉素引起的细胞毒性($P < 0.05$),提示 ERK1/2 通路介导阿霉素引起的细胞毒性,H2S 可通过抑制 ERK1/2 通路对抗阿霉素引起的心肌毒性(图 3)。

2.4 H_2S 和 ERK1/2 抑制剂保护心肌细胞对抗阿霉素引起的氧化应激

在正常 H9c2 心肌细胞内,DCF 的平均荧光强度(MFI,是反映 ROS 水平的指标)很弱,但是,5 μmol/L 阿霉素处理 H9c2 心肌细胞 2 h 可使细胞内 MFI 明显增强, 表明 ROS 水平明显增多,400 μmol/L NaHS 预处理能使胞内 ROS 水平显著降低(图 4)。另外, 与 NaHS 预处理的作用相似,10 μmol/L ERK1/2 抑制剂 PD-98059 预处理 30 min 也能明显地拮抗阿霉素对胞内 ROS 生成的促进作

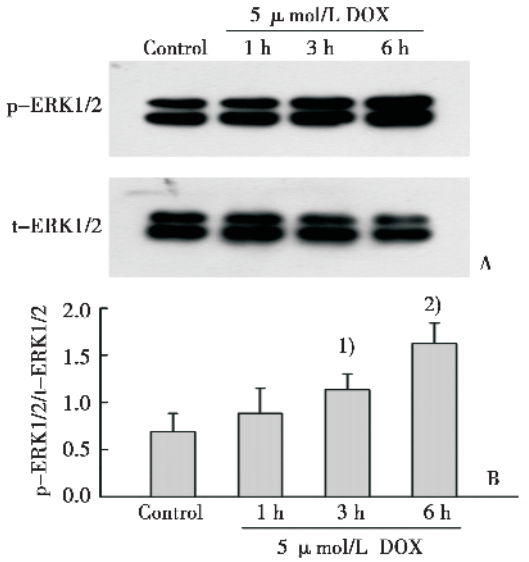


图 1 阿霉素对 H9c2 心肌细胞 ERK1/2 活化的影响

Fig.1 Effect of doxorubicin on the activation of ERK1/2 in H9c2 cardiac cells

Compared with control group, 1)$P < 0.05$, 2)$P < 0.01$.

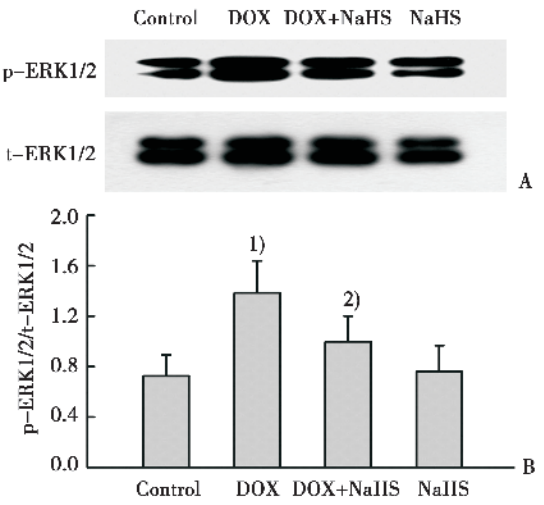


图 2 H_2S 抑制阿霉素对 p-ERK1/2 表达的上调作用

Fig.2 Hydrogen sulfide inhibits the upregulation of phosphorylated (p) ERK1/2 induced by doxorubicin (DOX)

Compared with control group, 1)$P < 0.01$; Compared with doxorubicin group, 2)$P < 0.01$.

用。而 400 μmol/L NaHS 或 10 μmol/L PD-98059 本身对 H9c2 心肌细胞内 ROS 水平无明显的影响(图 4)。

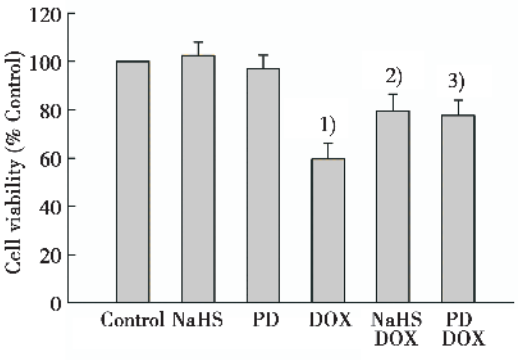


图 3　H2S 和 ERK1/2 抑制剂拮抗阿霉素引起的心肌细胞毒性

Fig.4　Both hydrogen sulfide and inhibitor of ERK1/2 block the cytotoxicity induced by doxorubicin (DOX) in H9c2 cardiac cells

Compared with control group, 1) $P < 0.01$; Compared with doxorubicin group, 2) or 3) $P < 0.05$.

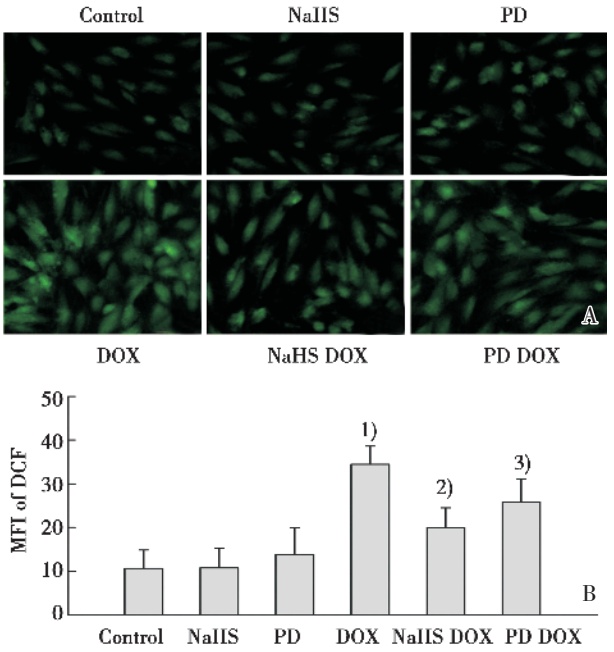


图 4　H_2S 和 ERK1/2 抑制剂保护心肌细胞对抗阿霉素引起的氧化应激

Fig.4　Both hydrogen sulfide and inhibitor of ERK1/2 protect H9c2 cardiac cells against doxorubicin-induced oxidative stress

A: DCFH-DA staining and photoflurography, × 200; B: $n = 5$. Compared with control group, 1) $P < 0.01$; Compared with doxorubicin group, 2) or 3) $P < 0.05$.

2.5　H_2S 和 ERK1/2 抑制剂拮抗阿霉素对心肌细胞线粒体膜电位的损伤

5 μmol/L 阿霉素处理 H9c2 心肌细胞 24 h 对线粒体具有损伤作用，表现为线粒体膜电位((mitochondrial membrance potential, MMP))丢失(指标表现为 Rh123 的 MFI 强度减弱)，但是 400 μmol/L NaHS 预处理能保护心肌细胞对抗阿霉素对线粒体的损伤作用,使 MMP 丢失减少;与 NaHS 的作用相似,10 μmol/L ERK1/2 抑制剂 PD-98059 预处理 30 min 也能拮抗阿霉素对 MMP 的损伤。400 μmol/L 或 10 μmol/L PD-98059 本身对心肌细胞的 MMP 无损伤作用(图 5)。

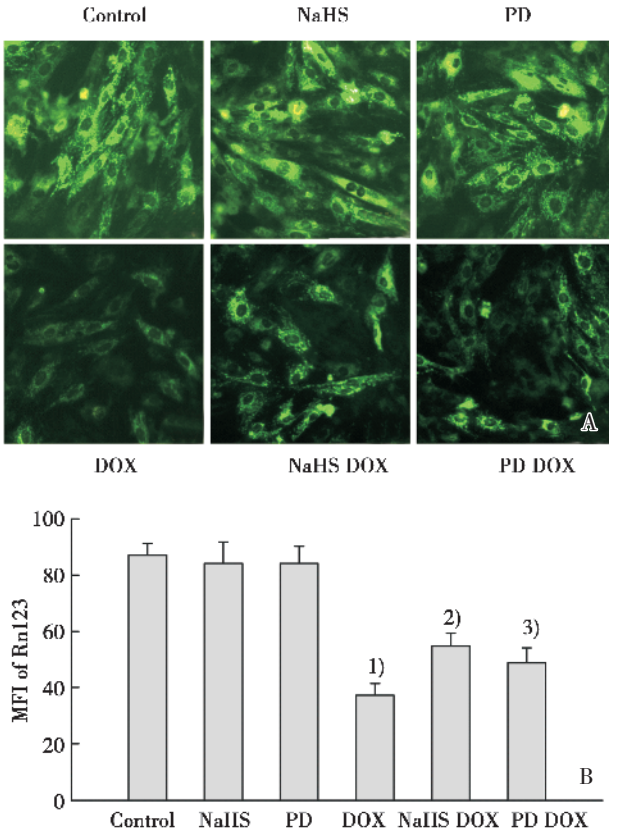


图 5　H_2S 和 ERK1/2 抑制剂保护心肌细胞对抗阿霉素引起的线粒体膜电位丢失

Fig.5　Both hydrogen sulfide and ERK1/2 inhibitor protect H9c2 cells against doxorubicin-induced mitochondrial membrane potential (MMP) loss

A: rhodamine 123 staining and photoflurography, × 200; B: Compared with control group, 1) $P < 0.01$; Compared with doxorubicin group, 2) $P < 0.05$.

3 讨 论

目前，有关阿霉素对 ERK1/2 通路的作用存在 3 种不同的意见：激活、抑制和无作用。导致上述 3 种不同结果的原因是复杂的，可能与实验模型不同及所用阿霉素的剂量不同等因素有关。例如，在 H9c2 心肌细胞及新生大鼠原代培养的心肌细胞，Liu 等[8]观察到，1 μmol/L 阿霉素能激活ERK1/2 通路，特异性 ERK1/2 抑制剂 PD-98059 能抑制阿霉素引起的心肌细胞凋亡。而在小鼠实验模型，腹腔注射阿霉素却使心肌内的 P-ERK1/2 表达明显减少[4]。另一方面，Spallarossa 等[9]却指出，0.5 μmol/L 阿霉素对 H9c2 心肌细胞 ERK1/2 表达无明显的作用。本文证实，应用 5 μmol/L 阿霉素处理 H9c2 心肌 1 ~ 6 h，呈时间依赖性地上调 P-ERK1/2 的表达，这与 Lou 等[5]和 Liu 等[7]观察到的结果相似。为了进一步证实 ERK1/2 通路在阿霉素心肌毒性的作用，本文观察了 ERK1/2 抑制剂 PD-98059 对阿霉素诱导的心肌细胞损伤的影响，结果证实，PD-98059 不仅能抑制阿霉素引起的细胞毒性，使细胞存活率升高，还能抑制阿霉素引起的细胞内 ROS 堆积，并能抑制阿霉素引起的 MMP 丢失，提示 ERK1/2 通路介导阿霉素诱导的心肌细胞损伤，这为防治阿霉素心肌毒性提供了新的治疗靶点。值得注意的是，Spallarossa 等[9]也观察到阿霉素能激活 MAPK 家族的另一成员 p38 MAPK。因此，进一步探讨 MAPK 家族在阿霉素引起的心肌毒性中的作用很有必要。

重要的是，本文在前期的研究基础上，证实气体信号分子 H_2S 能抑制阿霉素对 ERK1/2 通路的激活作用。近年的研究表明，H_2S 具有心肌保护作用。H_2S 能抑制缺血再灌注引起的心肌坏死和凋亡[10]。有报道指出，抑制了内源性 H_2S 的生成能明显地阻断缺血预处理(IPC)对离体心脏和心肌细胞的保护作用[11]。我们最近发现，H_2S 可通过抗氧化作用及抑制内质网应激保护心肌细胞对抗阿霉素引起的心肌细胞损伤[6]。本研究观察到，H_2S 在阻断阿霉素对 P-ERK1/2 表达的上调作用的同时，能抑制阿霉素引起的心肌细胞毒性、氧化应激(ROS 生成)及线粒体损伤，提示抑制 ERK1/2 通路可是 H2S 保护 H9c2 心肌细胞对抗阿霉素引起的损伤作用的重要机制之一。

参考文献：

[1] Muggia FM, Green MD. New anthracycline antitumor antibiotics[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 1991, 11(1): 43-64.

[2] Hrdina R, Gersl V, Klimtova I, et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity [J]. Acta Medica: Hradec Kralove, 2000, 43(3): 75-82.

[3] Barry E, Alvarez JA, Scully RE, et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity: course, pathophysiology, prevention and management [J]. Expert Opin Pharmacother, 2007, 8(8): 1039-1058.

[4] Esaki M, Takemura G, Kosai K, et al. Treatment with an adenoviral vector encoding hepatocyte growth factor mitigates established cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 294(2): H1048-H1057.

[5] Lou H, Kaur K, Sharma AK, et al. Adriamycin-induced oxidative stress, activation of MAP kinases and apoptosis in isolated cardiomyocytes [J]. Pathophysiology, 2006, 13(2): 103-109.

[6] Wang XY, Yang CT, Zheng DD, et al. Hydrogen sulfide protects H9c2 cells against doxorubicin-induced cardiotoxicity through inhibition of endoplasmic reticulum stress[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 363(1-2):419-426.

[7] Yang Z, Yang C, Xiao L, et al. Novel insights into the role of HSP 90 in cytoprotection of H2S against chemical hypoxia-induced injury in H9c2 cardiac myocytes [J]. Int J Mol Med, 2011, 28(3): 397-403.

[8] Liu J, Mao W, Ding B, et al. ERKs/p53 signal transduction pathway is involved in doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cells and cardiomyocytes[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 295(5): H1956-H1965.

[9] Spallarossa P, Altieri P, Garibaldi S, et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by doxorubicin in H9c2 cells: The role of MAP kinases and NAD(P)H oxidase[J]. Cardiovasc Res, 2006, 69(3): 736-745.

[10] Sodha NR, Clements RT, Feng J, et al. The effects of therapeutic sulfide on myocardial apoptosis in response to ischemia-reperfusion injury [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2008, 33(5): 906-913.

[11] Bian JS, Yong QC, Pan TT, et al. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 316(2): 670-678.

(编辑 孙慧兰)