

境下海马神经元凋亡是胰岛素改善糖尿病认知功能障碍的机制之一。继续深入研究两者的关系将为糖尿病慢性并发症的早期防治提供坚实的实验基础。

参考文献

- 1 Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienias JL, *et al.* Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function[J]. Arch Neurol, 2004, 61(5): 661-666
- 2 Zhang YW, Zhang JQ, Liu C, *et al.* Memory dysfunction in type 2 diabetes mellitus correlates with reduced hippocampal CA1 and subiculum volumes[J]. Chinese Med J, 2015, 128(4): 465-471
- 3 Banks WA, Owen JB, Erickson MA. Insulin in the brain; there and back again[J]. Pharmacol Therapeut, 2012, 136(1): 82-93
- 4 傅静奕, 李焱, 严励, 等. NF- κ B 在甘精胰岛素拮抗胰岛 β 细胞脂性凋亡中的作用[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(8): 1048-1052
- 5 葛晨亮, 刘广辉, 唐振旺, 等. 胰岛素对大鼠平滑肌细胞表达 MMP-9、TIMP-1 及内皮细胞表达 sES 的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(2): 145-149
- 6 陈永松, 张娟, 朱旭新, 等. 胰岛素对高葡萄糖浓度下内皮细胞的凋亡及 bax 和 bcl-2 表达的影响[J]. 中国临床实用医学, 2007, 1(8): 1
- 7 叶瑾. 胰岛素通过 Akt/FoxO/SV 信号通路抑制缺血/再灌注损伤诱导的心肌微血管内皮细胞凋亡的研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2014
- 8 王华梅, 周青珍, 吴家晔. 胰岛素对大鼠脑缺血再灌注后 Bcl-2 表达及细胞凋亡的影响[J]. 神经疾病与精神卫生, 2011, 11(4): 333-336
- 9 李志飞, 张建明, 刘群, 等. 胰岛素对烟雾吸入性损伤大鼠肺组织细胞凋亡及 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响[J]. 中华损伤与修复杂志: 电子版, 2011, 6(2): 31-34
- 10 徐敏. 高糖刺激对雪旺细胞增殖与凋亡机制的探讨[D]. 济南: 山东大学, 2014
- 11 郭丽萍, 王坚, 蒋雨平. 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 磷酸化是胰岛素受体后信号转导通路控制 PC12 细胞凋亡的机制[J]. 中国临床神经科学, 2007, 15(6): 596-599
- 12 姜寿峰, 边连防, 陈晓红, 等. 胰岛素对谷氨酸诱导 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2005, 25(1): 62-64
- 13 Sun X, Huang L, Zhang M, *et al.* Insulin like growth factor-1 prevents 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced apoptosis in PC12 cells through activation of glycogen synthase kinase-3 β [J]. Toxicology, 2010, 271(1-2): 5-12
- 14 Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival[J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(1): 59-71
- 15 Kern W, Peters A, Fruehwald Schultes B, *et al.* Improving influence of insulin on cognitive functions in humans[J]. Neuroendocrinology, 2001, 74(4): 270-280

(收稿日期: 2016-09-20)

(修回日期: 2016-09-29)

高糖后低糖过程通过 ERK1/2 信号途径增强 H9c2 心肌细胞自噬的功能

毕亚光 王光宇 刘向东 张庆勇

摘要 目的 研究高糖后低糖 H9c2 心肌细胞自噬活性的影响及 ERK1/2 在此过程中对自噬的调节作用。方法 用 25mmol/L 葡萄糖浓度的培养基培养 H9c2 细胞后用 2.5mmol/L 葡萄糖浓度培养基处理细胞 2h 作为低糖组 (LG 组), 高糖组 (HG 组) 维持 25mmol/L 的葡萄糖浓度, 空白对照组 (Con 组) 维持 5.5mmol/L 的葡萄糖浓度; 低糖组加入 ERK 抑制剂 U0126 作为抑制剂组。采用 MTT 法检测 H9c2 细胞增殖能力; LDH 检测试剂盒检测细胞毒性; Western blot 法检测 ERK、p-ERK、LC3、Beclin-1 的表达量。结果 与 Con 组和 HG 组相比, LG 组细胞增殖能力降低, LDH 活性增加; 与 Con 组相比, HG 组 LC3-II、Beclin-1 表达量升高, p-ERK 表达无显著改变; 与 Con 组和 HG 组相比, LG 组 p-ERK、LC3-II 和 Beclin-1 表达显著增加; 而与 LG 组比较, 抑制剂组 p-ERK 明显降低, 同时 LC3-II、Beclin-1 表达以及细胞毒性降低, 细胞活力增加。结论 ERK1/2 信号途径促进了高糖后低糖过程中 H9c2 心肌细胞的自噬活性。

关键词 低糖 高糖 H9c2 细胞 自噬 ERK/MAPK

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.03.017

基金项目: 上海市科委基金资助项目 (13ZR1431500)

作者单位: 200233 上海交通大学附属第六人民医院心内科

通讯作者: 张庆勇, 副教授, 硕士生导师, 电子信箱: zhang_qingyong71@hotmail.com

Effect of Low – after – high Glucose on the Activity of Autophagy in H9c2 Cells. Bi Yaguang, Wang Guangyu, Liu Xiangdong, et al. Department of Cardiology, Shanghai Jiaotong University affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China

Abstract Objective To investigate the effect of low – after – high glucose on the autophagy activity in H9c2 cells. **Methods** DMEM of 2.5mmol/L glucose concentration was used to replace that of 25mmol/L glucose concentration maintaining for 2h as the low glucose group (LG). The high glucose group (HG) was maintained 25mmol/L glucose concentration environment, and the control group (Con group) was maintained 5.5mmol/L glucose concentration environment all the time. In addition, ERK inhibitor U0126 was added to LG as the inhibitor group (LG + U0126). MTT assay was used to detect the proliferation of H9c2 cells; Lactate dehydrogenase assay was used to detect cytotoxicity. Western blott assay was used to detect the expression of ERK, p – ERK, LC3 and Beclin – 1. **Results** Compared with the Con group and RG group, the cell proliferation capacity of LG group was reduced and the activity of LDH was increased which were all reversed in LG + U0126 group. The protein level of Beclin – 1 and ratio of LC3 II / LC3 – I were increased one by one in the Con, HG and the LG group. Expression of p – ERK was significantly increased in LG group than other two groups, but had no obviously change in HG group and Con group. Moreover, LC3 – II / LC3 – I and Beclin – 1 expressed in LG + U0126 group were decreased than that in LG group. **Conclusion** Low – after – high glucose increase autophagy activity in H9c2 cells by activating ERK/MAPK signal pathway, which may damage H9c2 myocardial cells.

Key words Low – glucose; High – glucose; H9c2 cell; Autophagy; ERK/MAPK

对糖尿病患者来说血糖控制十分关键,但随着各种降糖药的广泛应用,降糖药物治疗过程中由于多种因素影响导致的低血糖反应也明显增加^[1]。低血糖已成为治疗糖尿病过程中不可避免的急性并发症^[2]。低血糖能引起许多心血管事件如心律失常、炎症反应、血小板的活化、心肌损伤等,严重者甚至可以危及生命^[3]。因此糖尿病患者的低血糖发生不可忽视。

自噬 (autophagy) 是一种广泛存在于真核生物的细胞降解过程,能将一些受损、变性或衰老的蛋白质或细胞器运送到溶酶体进行消化,以去除受损细胞器,更新长寿命蛋白,并在分解过程中对一些高分子物质进行回收利用^[4]。自噬不仅能维持细胞稳态,在细胞处于营养缺乏、氧化应激或药物及辐射环境中时自噬也能被诱发。一定程度的自噬具有细胞保护作用,但自噬过度又会使细胞内稳态失调,甚至导致细胞损伤^[5]。自噬的诱发通路有很多,其中 ERK/MAPK 为其中较为重要的信号分子,它可以通过上调 LC3 – I 向 LC3 – II 转化以及 Beclin – 1 的表达激活自噬^[6]。对于糖尿病在心肌及脑组织损害方面的研究目前已非常广泛,但对于糖尿病低血糖的研究仍较少,故本研究拟在 H9c2 心肌细胞中探索糖尿病低糖对细胞自噬功能的影响及其可能参与的调控机制。

材料与方法

1. 材料:大鼠心肌细胞株 H9c2 (2 – 1) 购自中国科学院上海细胞库; ERK (#9102)、p – ERK (#9101)、LC3 (#2775)、Beclin – 1 (#3495)、GAPDH

(#5174) 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司; 二抗山羊抗兔购自北京博奥森公司; 噻唑蓝 (methylthiazolyl tetrazolium, MTT)、二甲基亚砷 (DMSO) 购自 Sigma 公司; DMEM、胎牛血清购自 Gibco 公司; BCA 蛋白定量试剂盒、乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒 (LDH cytotoxicity assay kit) 购自碧云天生物技术公司; 增强型化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 显影液购自 Thermo 公司; PowerPac Universal 电泳装置购自 Bio – Rad 公司; EPOCH 型酶标仪购自 BioTek 公司。

2. 方法: (1) 细胞培养: 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液在 5% CO₂、37℃ 的培养条件下培养 H9c2 细胞。待细胞铺满皿后加 2ml PBS 冲洗 2 遍, 加入 1ml 0.25% 的胰酶消化 1min 然后加入 2ml 培养液终止消化。吹打贴壁细胞使其悬浮, 将细胞悬液吸入 15ml 离心管后以 0.91 × g 离心 3min, 弃上清, 稀释细胞后按 1:3 的比例分到新的培养皿。(2) 细胞处理: 按上述方法培养 H9c2 细胞, 待细胞长满后分组处理。HG 组用 25mmol/L 葡萄糖浓度的 DMEM 加 10% 血清培养 12h; LG 组在 HG 组的基础上换成 2.5mmol/L 葡萄糖环境培养 2h; 抑制剂组在 LG 组低糖处理的基础上加 ERK 抑制剂 U0126 (15μmol/L) (LG + U0126 组); Con 组保持 5.5mmol/L 葡萄糖环境培养 12h。处理完毕后收集细胞。(3) 细胞增殖检测: 细胞按上述分组处理后以 1 × 10⁴/孔接种到 96 孔板中。每孔加终质量浓度为 0.5g/L 的 MTT 培养 4h。吸去上清后每孔加入 150μl 的 DMSO, 快速震荡 10min 使结晶充分溶解。空白对照只加 DMSO, 酶标

仪于490nm处测定吸光度。(4)乳酸脱氢酶细胞毒性检测:将细胞接种到96孔板中,吸去培养液,使用PBS洗涤1次,分组处理。提前1h将20μl LDH释放试剂加入到样品最大酶活性对照孔中,吹打混匀后孵育。1h后,以400×g离心5min。各孔取120μl上清液,加入另一96孔板相应孔中。各孔分别加入现配置的60μl LDH检测工作液后混匀,室温避光置于水平摇床上摇动孵育30min,于490nm处测定吸光度。(5)Western blot法检测蛋白表达及磷酸化水平:收集细胞后,每孔加入含1%苯甲基磺酰氟(PMSF)和10%磷酸酶抑制剂的细胞裂解液100μl。待细胞充分裂解后离心,使用BCA检测试剂盒进行蛋白定量,12%聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后用二氟乙烯(PVDF)膜进行转膜。40ml TBST中加入2g牛奶混匀后室温下封闭2h,一抗ERK、p-ERK、LC3、Beclin-1、caspase-3、GAPDH 4℃孵育过夜。TBST 10分钟/次,洗3次。室温下孵育二抗2h,TBST 10分钟/次,洗涤3次。Image Quant LAS 4000 mini进行显影。

3. 统计学方法:采用SPSS 17.0 统计分析软件。定量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较选用*t*检验,多组均数间的比较选用单因素方差分析,以*P*<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. 高糖后低糖对细胞活力的影响:MTT法检测结果显示,与Con组和HG组比较,LG组对H9c2细胞增殖有显著抑制作用(图1)。

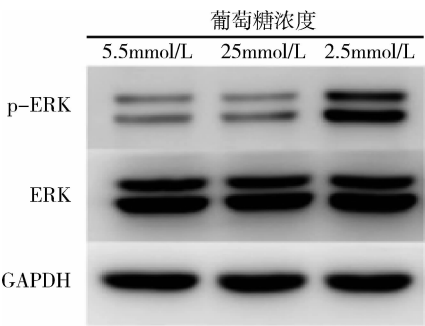


图3 高糖后低糖对p-ERK表达的影响
与2.5mmol/L组比较,**P*<0.05

4. 高糖后低糖对LC3、Beclin-1表达的影响:Western blot法检测结果显示,与Con组和HG组相比,LG组LC3-II与LC3-I的比值以及Beclin-1

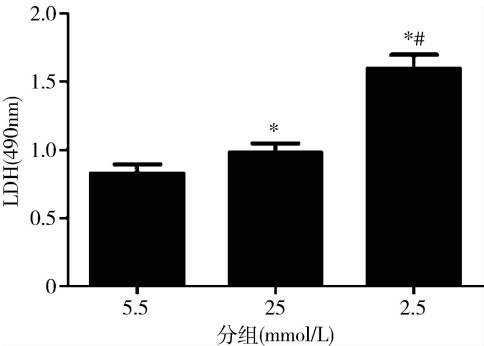


图1 高糖后低糖对H9c2细胞活力的影响
与5.5mmol/L组比较,**P*<0.05;与25mmol/L组比较,**P*<0.05

2. 高糖后低糖对细胞毒性的影响:LDH释放实验检测结果显示,与Con组和HG组比较,LG组对H9c2细胞毒性显著增加(图2)。

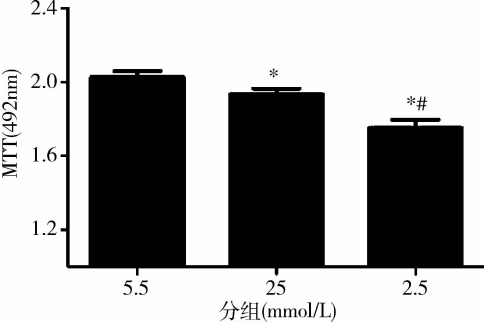
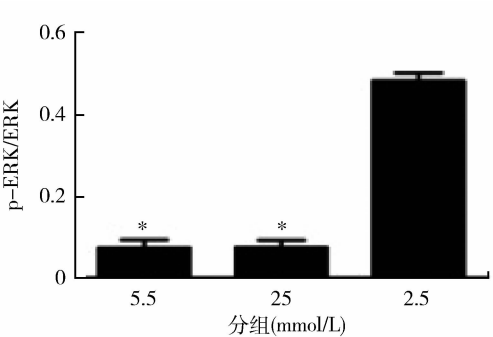


图2 高糖后低糖对H9c2细胞毒性的影响
与5.5mmol/L组比较,**P*<0.05;与25mmol/L组比较,**P*<0.05

3. 高糖后低糖对H9c2中p-ERK表达的影响:Western blot法检测结果显示,与Con组和HG组相比,LG组p-ERK的表达显著升高。而HG组和Con组相比,p-ERK没有显著性变化(图3)。



的表达显著增高;与Con组相比,HG组LC3-II/LC3-I和Beclin-1显著性增加(图4)。

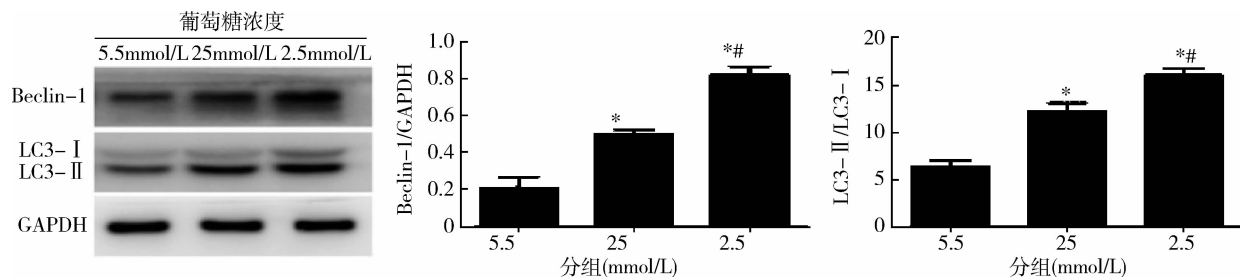


图4 高糖后低糖对 H9c2 细胞中 Beclin-1、LC3 表达的影响

与 5.5mmol/L 组比较, * $P < 0.05$;与 25mmol/L 组比较, # $P < 0.05$

5. ERK 抑制剂 U0126 对高糖后低糖中 p-ERK 表达的影响: Western blot 法检测结果显示, 与 LG 组

相比, LG + U0126 组 p-ERK 显著降低 (图 5)。

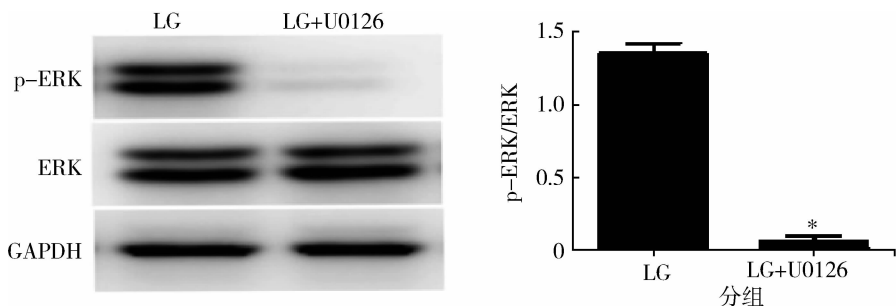


图5 U0126 对 p-ERK 表达的影响

与 LG 组比较, * $P < 0.05$

6. ERK 抑制剂 U0126 对高糖后低糖中 LC3、Beclin-1 表达的影响: Western blot 法检测结果显示, 与

LG 组相比, LG + U0126 组 LC3-II/LC3-I 的比值以及 Beclin-1 的表达也显著降低 (图 6)。

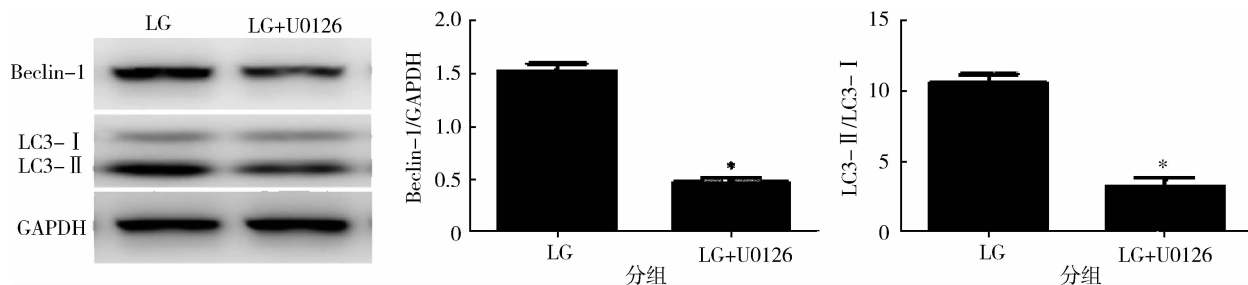


图6 U0126 对 Beclin-1 和 LC3 表达的影响

与 LG 组比较, * $P < 0.05$

7. ERK 抑制剂 U0126 对高糖后低糖中细胞活力的影响: MTT 法检测结果显示, 与 LG 组相比, LG + U0126 组细胞增殖能力显著增加 (图 7)。

8. ERK 抑制剂 U0126 对高糖后低糖中细胞毒性影响: LDH 释放实验检测结果显示, 与 LG 组相比, LG + U0126 组细胞毒性降低且差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 8)。

讨 论

急性低血糖一直是糖尿病降糖治疗中不可避免

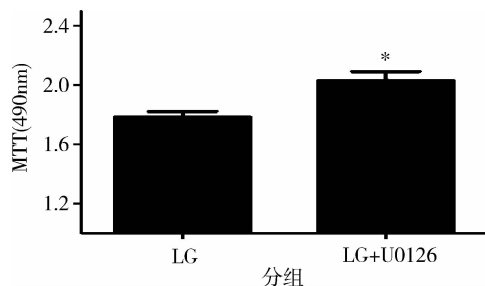


图7 U0126 对 H9c2 细胞活力的影响

与 LG 组比较, * $P < 0.05$

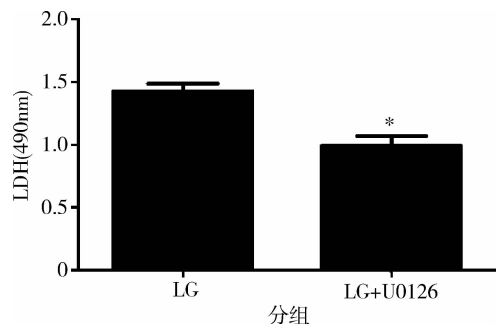


图 8 U0126 对 H9c2 细胞毒性的影响

与 LG 组比较, * $P < 0.05$

的难题,并且容易诱发恶性心律失常等病症,其对心脏的危险性不亚于糖尿病^[7,8]。目前关于糖尿病心肌损伤的研究已非常广泛。尽管急性低血糖在降糖过程中仍不断发生,但是对于糖尿病急性低血糖心脏损害的机制尚未阐明。

自噬不仅在生理情况下存在,也在各种病理情况下发挥作用^[9]。自噬与心血管疾病的发生、发展密切相关,如糖尿病心肌病、肥厚性心肌病、心肌缺血/再灌注^[5,10,11]。研究表明,在一些病理状态下增强的自噬功能可以破坏心肌的正常结构如心肌细胞间的缝隙连接蛋白 43 等,因此心脏的正常传导功能也会被破坏^[12,13]。本研究中发现,LG 处理降低了细胞活力并增加了细胞毒性,同时自噬功能增强,表现为 LC3 - II/LC3 - I 的比值以及 Beclin - 1 的表达增加,说明高糖后低糖可以促进自噬功能并引起细胞损伤。

自噬的激活途径有很多,包括 ERK/MAPK 途径。研究发现在多种病理刺激的情况下,ERK 可以被激活,活化的 ERK 可以激活自噬,表现为自噬相关蛋白 LC3 II、Beclin - 1 的表达增加。在本实验中笔者也发现低糖可以引起 ERK 的激活,而使用抑制剂 U0126 将 ERK 的活性抑制后,p - ERK 表达降低同时 LC3 - II/LC3 - I 和 Beclin - 1 也显著降低,而细胞活力较 LG 组有所增加,LDH 释放较 LG 组降低,表明高糖后低糖通过 ERK/MAPK 途径激活自噬功能,进一步表明此时增加的自噬功能对心肌细胞有损伤作用。

本研究发现,高糖后低糖通过激活 ERK/MAPK 引起自噬活性增加并对细胞造成损伤作用。而高糖

后低糖造成细胞损伤过程中是否还有除 ERK/MAPK 以外的其他途径参与自噬活性的调控以及自噬对心肌细胞的具体损伤作用还有待于进一步探讨。

参考文献

- 1 Limberg JK, Dube S, Kuijpers M, *et al.* Effect of hypoxia on heart rate variability and baroreflex sensitivity during hypoglycemia in type 1 diabetes mellitus [J]. *Clin Auton Res*, 2015,25(4):243 - 250
- 2 Limberg JK, Farni KE, Taylor JL, *et al.* Autonomic control during acute hypoglycemia in type 1 diabetes mellitus [J]. *Clin Auton Res*, 2014,24(6):275 - 283
- 3 Goto A, Goto M, Terauchi Y, *et al.* Association between severe hypoglycemia and cardiovascular disease risk in Japanese patients with type 2 diabetes [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016,5(3):e2875
- 4 Linton PJ, Gurney M, Sengstock D, *et al.* This old heart:cardiac aging and autophagy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015,83:44 - 54
- 5 赵美,臧伟进. 巨自噬在心脏疾病调节中的双向作用 [J]. *生理科学进展*, 2011,42(2):81 - 85
- 6 Wang A, Zhang H, Liang Z, *et al.* U0126 attenuates ischemia/reperfusion - induced apoptosis and autophagy in myocardium through MEK/ERK/EGR - 1 pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016,788:280 - 285
- 7 Reno CM, Daphna - Iken D, Chen YS, *et al.* Severe hypoglycemia - induced lethal cardiac arrhythmias are mediated by sympathoadrenal activation [J]. *Diabetes*, 2013,62(10):3570 - 3581
- 8 Gill GV, Woodward A, Casson IF, *et al.* Cardiac arrhythmia and nocturnal hypoglycaemia in type 1 diabetes - the 'dead in bed' syndrome revisited [J]. *Diabetologia*, 2009,52(1):42 - 45
- 9 Li M, Tan J, Miao Y, *et al.* The dual role of autophagy under hypoxia - involvement of interaction between autophagy and apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2015,20(6):769 - 777
- 10 Kanamori H, Takemura G, Goto K, *et al.* Autophagic adaptations in diabetic cardiomyopathy differ between type 1 and type 2 diabetes [J]. *Autophagy*, 2015,11(7):1146 - 1160
- 11 Hsu H, Chen C, Lee B, *et al.* High - fat diet induces cardiomyocyte apoptosis via the inhibition of autophagy [J]. *Eur J Nutr*, 2016,55(7):2245 - 2254
- 12 Zhang W, Zhao G, Hu X, *et al.* Aliskiren - attenuated myocardium apoptosis via regulation of autophagy and connexin - 43 in aged spontaneously hypertensive rats [J]. *J Cell Mol Med*, 2014,18(7):1247 - 1256
- 13 Martins - Marques T, Catarino S, Zuzarte M, *et al.* Ischaemia - induced autophagy leads to degradation of gap junction protein connexin43 in cardiomyocytes [J]. *Biochem J*, 2015,467(2):231 - 245

(收稿日期:2016 - 08 - 12)

(修回日期:2016 - 08 - 22)