

用^[11]。该实验中,ESM-1 预处理 MSCs 后,TGF- β 1 含量随着 ESM-1 干预浓度的升高而增加,各组之间差异有统计学意义。ESM-1 干预 MSCs 后,TGF- β 1 的分泌也明显增加,TGF- β 1 的生物学作用在改善 MSCs 生长、分化过程中也起到了重要的作用。

综上所述,ESM-1 预处理 MSCs 可提高与炎症反应、细胞凋亡和细胞生长分化相关的多种细胞因子的含量,可能通过多种信号转导通路改善 MSCs 的存活和增殖。由于该实验选择炎症反应、细胞凋亡和细胞生长分化相关的部分因子,故 MSCs 经 ESM-1 预处理后生物学特性的改善,是某一因子的重要生物学作用,还是多种因子和多个信号通路相互作用的结果,尚需开展进一步研究。

参考文献

- 1 朱宗成,惠杰,沈振亚,等. 内皮细胞特异性分子-1 预处理对小鼠骨髓间充质干细胞生物学特性的影响[J]. 心脏杂志,2013,25(1):22-27
- 2 朱宗成,惠杰,沈振亚,等. 内皮细胞特异性分子-1 预处理干细胞用于心肌梗死治疗的实验研究[J]. 心脏杂志,2014,26(2):147-151
- 3 Ward-Kavanagh LK, Lin WW, Sedy JR, *et al.* The TNF receptor

- superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory responses[J]. *Immunology*, 2016, 44(5):1005-1019
- 4 Zhou HS, Su XF, Fu XL, *et al.* Mesenchymal stem cells promote pancreatic adenocarcinoma cells invasion by transforming growth factor- β 1 induced epithelial-mesenchymal transition[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(27):41294-41305
- 5 邹颖,王学民,顾军. 肿瘤坏死因子超家族成员 LIGHT 及其受体研究进展[J]. 医学综述,2015,21(21):3902-3905
- 6 黄璟,周毅. 肿瘤坏死因子 α 及其抑制剂的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志,2015,42(1):63-68
- 7 Prabhu SD1, Frangogiannis NG. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction:from inflammation to fibrosis[J]. *Circ Res*, 2016, 119(1):91-112
- 8 王维媛,李斑斑,陈晨,等. 缺氧在肿瘤发病机制中的研究进展[J]. 中华临床医师杂志:电子版,2015,9(22):4197-4201
- 9 Chen W, Huang Y, Han J, *et al.* Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells-derived exosome[J]. *Immunol Res*, 2016, 64(4):831-840
- 10 秦庆华,姚咏明. 转化生长因子 β 信号通路研究进展[J]. 医学研究杂志,2012,41(10):5
- 11 崔杨,莽靖. Nodal 信号网络参与脑缺血损伤研究进展[J]. 中风与神经疾病杂志,2015,32(1):94-96

(收稿日期:2016-07-03)

(修回日期:2016-08-25)

干预 GLP-1 通路保护过氧化氢诱导心肌细胞凋亡的研究

赵树梅 张 谦 郭春艳

摘 要 **目的** 观察 Exendin-4(Ex-4, GLP-1 受体激动剂)对 H₂O₂ 孵育的心肌细胞凋亡的影响,探讨 GLP-1 通路干预心肌细胞损伤的机制。**方法** 分离、培养心室肌细胞,分成 5 组:A 组为对照组;B 组为 H₂O₂ 干预组(100 μ mol/L,24h);C 组为 H₂O₂ + Ex-4(Ex-10nmol/L,孵育 24h)组;D 组为 H₂O₂ + Ex-4(Ex-20nmol/L,孵育 24h)组;E 组为 H₂O₂ + Ex-4 + LY294002(Ex-20nmol/L,LY-5 μ mol/L,孵育 24h)组。荧光染色测定各组细胞内活性氧簇(ROS)生成的水平;流式细胞仪测定各组细胞凋亡率情况。以 Western blot 法测定各组细胞凋亡蛋白及机制蛋白(PI₃K/AKT)的表达。**结果** 与 H₂O₂ 孵育组相比,Ex-4 干预使得心肌细胞内 ROS 水平下降,细胞凋亡率下降,在高剂量组(D 组)均达到差异统计学意义($P < 0.05$)。同时,Ex-4 干预可使 p-AKT/AKT 表达显著增加,caspase-3 表达显著下降($P < 0.05$);而这些效应可被 LY294002 共孵育(E 组)所逆转。**结论** 干预 GLP-1 通路,可缓解 H₂O₂ 诱导的心肌细胞凋亡,此效应至少部分是通过影响 PI₃K/AKT 途径实现的。

关键词 GLP-1 通路 氧化应激 心肌细胞凋亡 PI₃K/AKT

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.03.025

Improvement of Cardiomyocyte Apoptosis Induced by Hydrogen Peroxide via the Intervention of GLP-1 Signal Pathway. Zhao Shumei,

基金项目:首都医科大学基础-临床科研基金资助项目(13-JL58)

作者单位:100050 首都医科大学附属北京友谊医院心血管内科

通讯作者:郭春艳,电子信箱:Cardiovas@sina.com

Zhang Qian, Guo Chunyan. Cardiovascular Center, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Abstract Objective To observe the effect of Exendin - 4 on the apoptosis of cardiomyocyte induced by H_2O_2 , and approach the relationship between GLP - 1 signal pathway and the injury of cardiomyocyte. **Methods** Cardiomyocytes were isolated and cultured, and were divided into 5 groups. Intercellular ROS (reactive oxygen species) was measured, and cell apoptosis rate was evaluated by Flow cytometry in different groups. Also expressions of apoptosis - associated proteins (caspase - 3) and PI_3K/AKT were evaluated by western blot. **Results** Compared with H_2O_2 group, Ex - 4 co - incubation decreased the production of intercellular ROS levels, also improved the cardiomyocyte apoptosis. At the same time, Ex - 4 resulted in the alterations in expressions of the caspase - 3 and p - AKT/AKT proteins. However, these effects of Exendin - 4 were counteracted significantly by the co - incubation of LY294002. **Conclusion** The interventions of GLP - 1 signal pathway can improve cardiomyocyte apoptosis induced by H_2O_2 incubation, and the mechanisms might partly attribute to the PI_3K/AKT system.

Key words GLP - 1 signal pathway; Oxidative stress; Cardiomyocyte apoptosis; PI_3K/AKT

胰高血糖素样肽 - 1 (glucagon - like peptide 1, GLP - 1) 是小肠分泌的一种肠促胰岛素,具有多方面的调控血糖作用。一方面, GLP - 1 可刺激胰岛素的分泌、抑制胰高血糖素分泌,另一方面,可抑制胃排空,从而发挥降低血糖的作用^[1]。近年来的研究发现, GLP - 1 通路干预还具有广泛的细胞、组织保护作用,如延缓胰岛 β 细胞凋亡、促进其再生,保护血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞损伤等^[2,3]。而 GLP - 1 通路的生物学效应,可能部分是通过抑制氧化应激实现的^[3]。

同时,研究显示 GLP - 1 通路干预具有心肌保护作用,如改善心肌细胞缺氧/再灌注后的损伤,改善梗死后心肌的重塑等^[4,5]。氧化应激是导致心肌细胞损伤的重要原因之一, GLP - 1 通路干预是否可以干预心肌细胞的氧化应激状态,从而发挥心肌细胞保护作用,目前相关研究较少。本研究观察 Exendin - 4 (GLP - 1 受体激动剂)对 H_2O_2 孵育的心肌细胞凋亡的影响,及对相关信号通路的影响,目的在于探讨 GLP - 1 通路干预与心肌细胞氧化应激损伤之间的关系及相关的机制。

材料与方法

1. 试验材料: Exendin - 4 和 LY294002 购自美国 Sigma 公司; Annexin V - FITC/PI 染色试剂盒购自美国 BD PharmingenTM公司; ROS 试剂盒购自中国碧云天生物技术有限公司; p - AKT/AKT 和裂解型 caspase - 3 蛋白测定一抗购自美国 CST 公司。

2. 细胞培养与分组: 1 ~ 2 天 SD 乳鼠心肌组织剪碎,以胰酶 (0.07%) 和胶原酶 II (0.04%) 反复消化,提取上清液,经 1000r/min 离心,差速贴壁分离后,获取心肌细胞;经 37℃、5% CO_2 培养 24h,分成 5 组用于试验: A 组为对照组; B 组为 H_2O_2 干预组 (100 μ mol/L, 24h); C 组为 H_2O_2 + Exendin - 4 (Ex -

10nmol/L, 孵育 24h) 组; D 组为 H_2O_2 + Exendin - 4 (Ex - 20nmol/L, 孵育 24h) 组; E 组为 H_2O_2 + Ex - 4 + LY294002 (Ex - 20nmol/L, LY 5 μ mol/L, 孵育 24h) 组。

3. 细胞内活性氧簇 (ROS) 水平测定: 细胞内活性氧簇 (ROS) 浓度测定按 ROS 试剂盒操作说明完成。简而言之, 24 孔板上各组细胞以 2.0×10^5 /孔的密度种植; 孵育 24h 后, 每孔加入 2', 7' - dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH - DA, 10 μ mol/L), 37℃ 孵育 1h, 后者可被细胞内活性氧所氧化。然后以荧光显微镜观察荧光复合物的生成。

4. 流式细胞仪测定各组细胞凋亡率: 各组细胞孵育 24h 后, 以胰酶消化后, 重新悬浮成 1×10^5 细胞/毫升的悬液; 分别加入 5 μ l of Annexin V - FITC 和 5 μ l of propidium iodide (PI), 室温避光孵育 15min; 以流式细胞仪检测和比较各组细胞的凋亡率。

5. Western blot 法蛋白表达测定: 各组细胞分别裂解后, 以 BCA 法进行蛋白定量; 取等量蛋白 (12 μ g) 进行 SDS - PAGE 电泳分离。电泳后, 将蛋白转移至 PVDF 膜上, 封闭后分别加入相应的一抗, 4℃ 过夜。次日, 加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗, 室温轻摇 40min。试验中以 β - actin 作为内参照。

6. 统计学方法: 应用统计软件 SPSS 13.0 进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 以 One - way ANOVA 分析, 两组间差异以 SNK 检验完成, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组细胞内 ROS 浓度测定的结果: 与对照组 (A 组) 相比, H_2O_2 干预组 (B 组) 中 ROS 水平明显升高, Ex - 4 干预后, C 组和 D 组中 ROS 水平均出现显著下降 ($P < 0.05$, 图 1)。

2. 各组细胞凋亡情况的结果: 与 A 组相比, H_2O_2

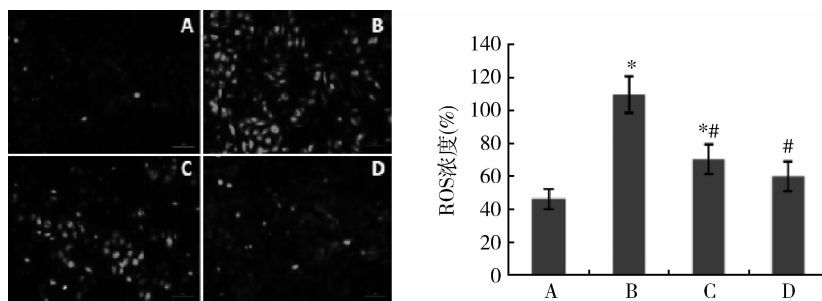


图1 各组细胞内 ROS 浓度比较

与 A 组相比, * $P < 0.05$; 与 B 组相比, # $P < 0.05$

孵育 (B 组) 心肌细胞凋亡率显著增加 ($37.5\% \pm 3.94\%$ vs $11.97 \pm 1.13\%$), 较高剂量 Ex-4 (20nmol/L)

与 H_2O_2 共孵育 (D 组) 显著减少心肌细胞凋亡比率 ($19.08\% \pm 2.05\%$, $P < 0.05$, 图 2)。

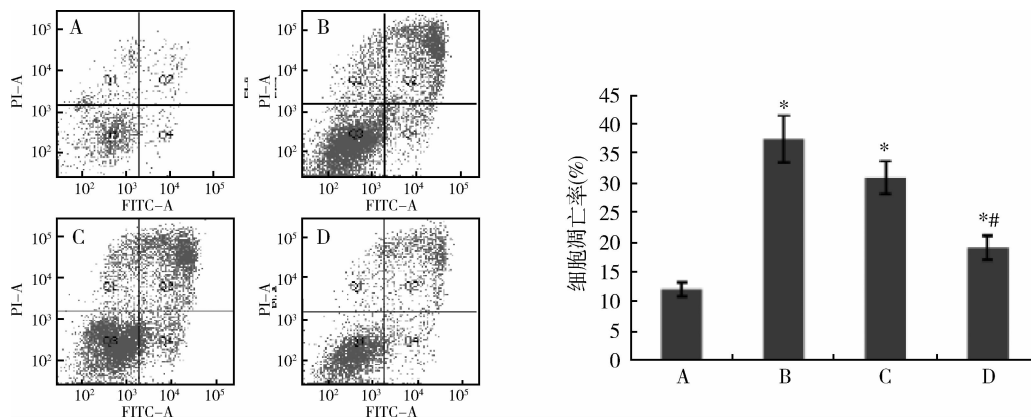


图2 各组心肌细胞凋亡率测定及比较。

与 A 组相比, * $P < 0.05$; 与 B 组相比, # $P < 0.05$

3. 凋亡蛋白与相关机制蛋白表达的情况: 与 A 组相比, H_2O_2 孵育 (B 组) 使心肌细胞 p-AKT/AKT 表达显著下降, 凋亡相关蛋白裂解 caspase-3 表达显著上升 ($P < 0.05$); 经 Ex-4 与 H_2O_2 共孵育, 改善了 H_2O_2 对上述蛋白表达的影响; 而 LY294002 (PI₃K 通路阻滞剂) 干预的 E 组细胞中, 再次出现 p-AKT/AKT 的表达下降, 及裂解 caspase-3 蛋白表达显著上升 (图 3、图 4)。

讨 论

综上所述, GLP-1 及其类似药物能够从多方面调控血糖代谢, 已经成为 2 型糖尿病药物治疗研究的新热点。同时研究显示, GLP-1 通路干预具有一定程度的组织、细胞保护作用, 逐渐为人们所关注。但是 GLP-1 在血浆中半衰期很短 ($< 2\text{min}$), 可被二肽酶 IV (DPP IV) 迅速降解, 因此限制了其临床效应的发挥。近年来, 研究者主要从 2 方面研发 GLP-1 相关的药物: ① 二肽酶 IV 抑制剂, 延缓内源性 GLP-1 的降解, 延长其血浆中生物效能发挥的时间; ② 合成外源性 GLP-1 受体激动剂, 如本研究使用的药物

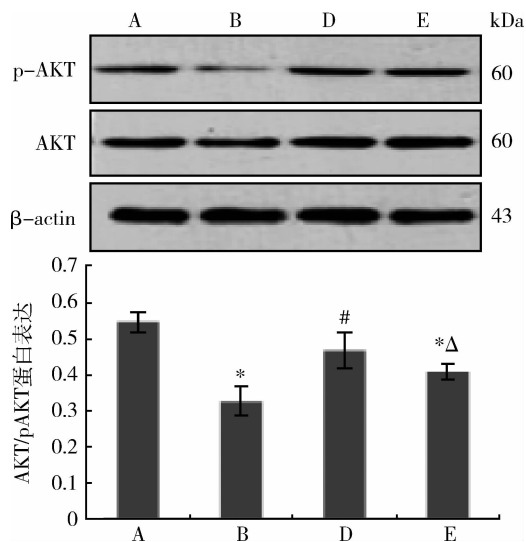


图3 心肌细胞 AKT/pAKT 表达

与 A 组相比, * $P < 0.05$; 与 B 组相比, # $P < 0.05$; 与 D 组相比, Δ $P < 0.05$

Exendin-4。

氧化应激是造成细胞损伤、凋亡的重要原因, 与心血管疾病的发生、发展有着密切的关系; H_2O_2 孵

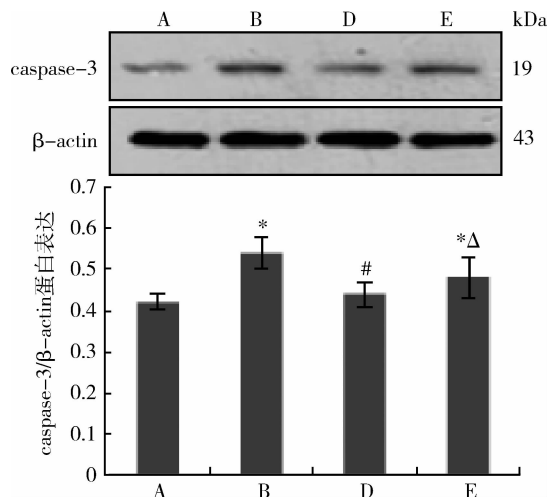


图 4 心肌细胞 caspase-3 蛋白表达

与 A 组相比, * $P < 0.05$; 与 B 组相比, # $P < 0.05$; 与 D 组相比, Δ $P < 0.05$

育的方法常被用来建立氧化损伤的模型,用于多项试验研究。本研究中,以 H_2O_2 孵育心肌细胞制备氧化损伤的心肌细胞模型;试验中观察到, H_2O_2 孵育使得心肌细胞中 ROS 水平明显升高,这种现象随着 Ex-4 共孵育得到缓解;特别是 Ex-4 较高浓度组(D 组) ROS 水平与正常对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。这一现象说明 Ex-4 干预能够影响心肌细胞内 ROS 的水平,干预心肌细胞内氧化应激反应。流式细胞仪测定了各组细胞凋亡率,显示了 H_2O_2 及 Ex-4 共孵育改善心肌细胞凋亡的情况。 H_2O_2 孵育组(B 组),细胞内 ROS 水平最高、氧化损伤最明显,在流式细胞仪的检查结果中,可以看到本组细胞凋亡率最高。经过与 Ex-4 共孵育后,一方面观察到细胞内 ROS 水平下降,同时也观察到细胞凋亡率的逐步下降(C 组和 D 组)。由此推断,Ex-4 孵育后心肌细胞凋亡率下降的机制,至少部分源于其对氧化应激过程的影响。

PI_3K/AKT 信号通路是膜受体信号向细胞内转导的重要途径;其中 AKT 是 PI_3K 主要的下游效应分子,LY294002 是 PI_3K 通路的抑制因子^[6];AKT 磷酸化后(p-AKT)呈活化状态,参与调节细胞生长、凋亡及一些重要基因的表达^[7,8];能使多种凋亡相关因子失活,因而具有抗凋亡的作用;也具有保护氧化应激诱导的细胞损伤的作用^[9,10]。本研究中, H_2O_2 孵育(B 组)后导致心肌细胞发生氧化损伤,同时细胞内 p-AKT/AKT 表达显著下降,抗凋亡效应减弱;Ex-4 与 H_2O_2 共孵育后(D 组),使得心肌细胞内 p-AKT/AKT 表达与前者相比显著增加;提示 Ex-4 可能是通过 p-AKT/AKT 途径,发挥改善 H_2O_2 诱导

的细胞凋亡作用。当加入 LY294002 与 Ex-4/ H_2O_2 共孵育心肌细胞时(E 组),阻断了 PI_3K 途径,观察到部分抵消了 Ex-4 的保护性作用,p-AKT/AKT 表达再次显著下降。这一现象反证了 Ex-4 改善 H_2O_2 诱导心肌细胞凋亡的效应,至少部分机制是通过 PI_3K/AKT 信号通路实现的。同时,Western blot 法检测结果还显示, H_2O_2 孵育后心肌细胞凋亡蛋白裂解的 caspase-3 表达显著增加,Ex-4 共孵育后,使得 caspase-3 表达显著下降;同样,LY294002 阻断 PI_3K/AKT 途径后,抵消了 Ex-4 的保护作用,caspase-3 的蛋白表达再次上升。

总之,本研究结果显示,GLP-1 通路激活可改善 H_2O_2 诱导的心肌细胞氧化损伤,降低细胞凋亡率,而此效应至少部分是通过干预 PI_3K/AKT 信号通路来实现的。本研究的结论可能具有片面性,本领域尚需开展深入的研究来揭示其机制。

参考文献

- Mannucci E, Rotella CM. Future perspectives on glucagon-like peptide-1, diabetes and cardiovascular risk[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2008,18(9):639-645
- Wang C, Chen X, Ding X, et al. Exendin-4 promotes beta cell proliferation via PI_3K/Akt signalling pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(6):2223-2236
- Zhao L, Li AQ, Zhou TF, et al. Exendin-4 alleviates angiotensin II-induced senescence in vascular smooth muscle cells by inhibiting Rac1 activation via a cAMP/PKA-dependent pathway[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014, 307(12):1130-1141
- Tsutsumi YM, Tsutsumi R, Hamaguchi E, et al. Exendin-4 ameliorates cardiac ischemia/reperfusion injury via caveolae and caveolins-3[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2014,7(13):132
- Robinson E, Cassidy Rs, Tate M, et al. Exendin-4 protects against post-myocardial infarction remodelling via specific actions on inflammation and the extracellular matrix[J]. *Basic Res Cardiol*, 2015,110(2):20
- Huang M, Pan D, Du Y, et al. Na^+/Ca^{2+} exchanger 1 (NCX-1) mediates the anti-apoptotic effect of Akt1 in neonatal rat cardiomyocytes during ischemia/reperfusion[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(3):1369-1378
- Yao H, Han X, Han X. The cardioprotection of the insulin-mediated $PI_3K/Akt/mTOR$ signaling pathway[J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2014,14(6):433-442
- Jiang YQ, Chang GL, Wang Y, et al. Geniposide prevents hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in H9c2 cells:improvement of mitochondrial dysfunction and activation of GLP-1R and the PI_3K/AKT signaling pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(1):407-421
- Su JD, Yen JH, Li S, et al. 3',4'-didemethylnobiletin induces phase II detoxification gene expression and modulates PI_3K/Akt signaling in PC12 cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012,52(1):126-141
- Tsai CY, Wang CC, Lai TY, et al. Antioxidant effects of diallyl trisulfide on high glucose-induced apoptosis are mediated by the PI_3K/Akt -dependent activation of Nrf2 in cardiomyocytes[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168(2):1286-1297 (收稿日期:2016-07-11) (修回日期:2016-07-28)