

低糖培养对 H9c2 心肌细胞的自噬功能和细胞凋亡的影响

刘向东 毕亚光 王光宇 张庆勇

摘要 **目的** 研究低糖培养对 H9c2 心肌细胞自噬活性的影响及此时自噬功能对细胞凋亡水平的影响。**方法** 用 33.3mmol/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 4h 作为低糖组 (LG 组), 高糖组 (HG 组) 维持 33.3mmol/L 的葡萄糖浓度, 对照组 (Con 组) 维持 5.5mmol/L 的葡萄糖浓度; LG 组加入自噬抑制剂 3-MA 作为抑制剂组 (LG+3-MA 组)。采用 LDH 检测试剂盒检测细胞毒性; MTT 法检测 H9c2 细胞增殖能力; Western blot 法检测 caspase3、LC3、Beclin-1 的表达量。**结果** 与 Con 组和 HG 组相比, LG 组 LDH 活性显著增加, 细胞增殖能力显著降低, caspase3、LC3-II 和 Beclin-1 表达显著增加; 而与 LG 组比较, 抑制剂组 LC3-II、Beclin-1 表达降低, 同时 caspase3 以及细胞毒性降低, 细胞活力增加。**结论** 低糖培养通过激活 H9c2 心肌细胞的自噬活性引起细胞凋亡。

关键词 低糖 H9c2 细胞 自噬 凋亡

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.04.015

Effect of Low Glucose Incubation on the Activity of Autophagy and Apoptosis in H9c2 Cells. Liu Xiangdong, Bi Yaguang, Wang Guanyu, et al. Department of Cardiology, Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China

Abstract **Objective** To investigate the effects of low glucose incubation on autophagy activity and autophagy on apoptosis in H9c2 cells. **Methods** DMEM of 2.5mmol/L glucose concentration was used to replace that of 33.3mmol/L glucose concentration maintaining for 4h as the low glucose group (LG). The high glucose group (HG) was maintained 33.3mmol/L glucose concentration environment, and the control group (Con group) was maintained 5.5mmol/L glucose concentration environment all the time. In addition, autophagy inhibitor 3-MA was added to LG as the inhibitor group (LG+3-MA). Lactate dehydrogenase assay was used to detect cytotoxicity; MTT assay was used to detect the proliferation of H9c2 cells; Western blotting assay was used to detect the expression of caspase3, LC3 and Beclin-1. **Results** Compared with the Con group and RG group, the activity of LDH in LG group was increased and the cell proliferation capacity of LG group was reduced. The protein levels of caspase3, Beclin-1 and ratio of LC3-II/LC3-I were also increased in LG group which was all reversed in LG+3-MA group. **Conclusion** Low glucose increase cell apoptosis through activating autophagy in H9c2 cells.

Key words Low-glucose; H9c2 cell; Autophagy; Apoptosis

低血糖已成为糖尿病治疗过程中最常见的急性并发症^[1]。糖尿病作为高血糖综合征的一种, 在其治疗中特别在利用胰岛素治疗或口服降糖药物不当之后, 也会有低血糖症的出现, 并且控制血糖越靠近正常情况, 低血糖的现象就越容易产生^[2]。心血管系统是低血糖主要损害的系统之一, 低血糖时可诱发加重心脏损伤也能引起许多心血管事件如炎症反应、心律失常、血小板活化等, 严重者甚至可以危及生命^[3-5]。因此糖尿病患者的低血糖发生不容忽视。

自噬 (autophagy) 是一种细胞降解过程, 能将细胞质中受损、变性或衰老的蛋白质或细胞器运送到溶酶体进行消化, 在分解过程中还能对一些大分子物质进行回收利用^[6]。自噬在维持细胞稳态、细胞生长及细胞防御系统中都扮演着重要的角色。自噬不仅是细胞生存的一个保障, 在细胞处于营养缺乏、氧化应激或药物及辐射等条件下自噬过度激活又会导致细胞损伤或细胞凋亡^[7, 8]。自噬活性的检测方法有很多, 一般选择采用自噬标识性蛋白 LC3 和自噬起始蛋白 Beclin-1 作为自噬活性的判断^[9]。

目前对于糖尿病在心肌及脑组织损害方面的研究已非常广泛, 但对于糖尿病低血糖的关注仍较少, 故本研究拟在低糖培养条件下对 H9c2 心肌细胞自

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

qingyong71@hotmail.com

噬功能的影响及此时自噬对细胞凋亡水平的影响进行探索。

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;一抗抗体 cleaved caspase3 (#9661)、LC3 (#2775)、Beclin-1 (#3495)、GAPDH (#5174) 购自 Cell Signaling Technology 公司;二抗山羊抗兔购自北京博奥森公司;DMEM、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;噻唑蓝 (methylthiazolyl tetrazolium, MTT)、二甲基亚砜 (DMSO) 购自美国 Sigma 公司;乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒 (LDH cytotoxicity Assay Kit)、BCA 蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术公司;增强型化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 显影液购自美国 Thermo 公司;PowerPac Universal 电泳装置购自美国 Bio-Rad 公司;EPOCH 型酶标仪购自 BioTek 公司。

2. 方法:(1) 细胞培养:在 5% CO₂、37℃ 的培养条件下培养 H9c2 细胞。培养液为含 10% 胎牛血清的 DMEM。待细胞长满后使用 PBS 2 毫升/次冲洗 2 次,然后加入 2ml 0.25% 的胰酶消化 1min 再加入 2ml 培养液终止消化。使用枪头将贴壁细胞吹打下来,将细胞悬液吸入 15ml 离心管以 0.9 × g 速度离心 3min,离心后弃去上清,将细胞混匀后按 1:3 的比例分到新的培养皿中。(2) 细胞处理:细胞分组处理如下:HG 组用 33.3mmol/L 葡萄糖浓度的 DMEM 加 10% 血清培养;LG 组在 HG 组的基础上换成 2.5mmol/L 葡萄糖环境培养 4h;抑制剂组在 LG 组低糖处理的基础上同时加自噬抑制剂 3-MA (10mmol/L);Con 组保持 5.5mmol/L 葡萄糖环境培养。处理完毕后收集细胞。(3) 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,再用 PBS 洗涤 1 次,分组处理。提前 1h 将 20μl 的 LDH 释放试剂加入样品最大酶活性对照孔中,吹打混匀后孵育。1h 后样品以 400 × g 离心 5min。每孔取出 120μl 上清液,加入另一 96 孔板相应孔中。按说明配置 LDH 检测工作液后每孔加 60μl 混匀,室温置于水平摇床上摇动孵育 30min,避光,于 490nm 处测定吸光度。(4) 细胞增殖检测:细胞按分组处理后以 1 × 10⁴/孔接种到 96 孔板中。每孔加入 0.5g/L 的 MTT 培养 4h。培养结束后吸去上清,每孔再加入 150μl 的 DMSO,快速震荡 10min 使结晶充分溶解。空白对照只加 DMSO,于 490nm 处测定吸光度。(5) Western blot 法检测蛋白表达:处理结束后,每孔加入 100μl 含

1% 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 和 10% 磷酸酶抑制剂的细胞裂解液裂解细胞。待细胞充分裂解后离心,取上清后使用 BCA 检测试剂盒进行蛋白定量,浓度调齐后煮沸 15min。12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 跑完后用二氟乙烯 (PVDF) 膜进行转膜。然后 40ml TBST 中加入 2g 牛奶混匀后于室温下将膜封闭 2h,一抗 caspase3、LC3、Beclin-1、GAPDH 4℃ 孵育过夜。TBST 10 分钟/次将膜洗涤 3 次。室温下孵育二抗 2h,TBST 10 分钟/次将膜洗涤 3 次。使用 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,而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. 高糖后低糖对细胞毒性的影响:LDH 释放实验检测结果显示,与 Con 组 (5.5mmol/L 组) 和 HG 组 (33.3mmol/L 组) 比较,LG 组 (2.5mmol/L 组) 对 H9c2 细胞毒性显著增加 (图 1)。

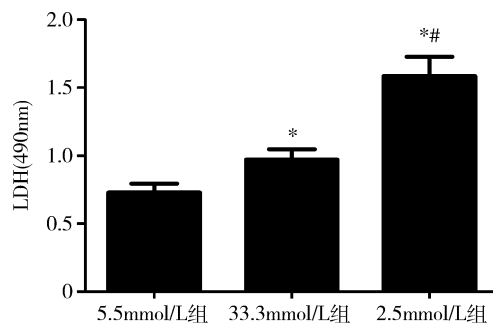


图 1 低糖培养对 H9c2 细胞毒性的影响

与 5.5mmol/L 组比较, * *P* < 0.05; 与 33.3mmol/L 组比较, # *P* < 0.05

2. 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 2)。

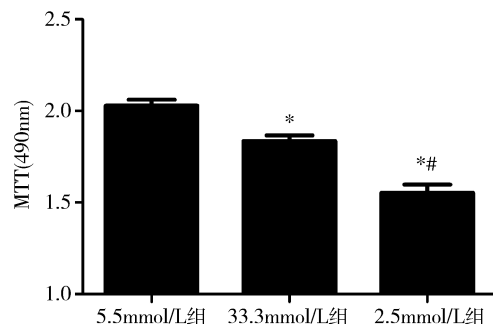


图 2 低糖培养对 H9c2 细胞活力的影响

与 5.5mmol/L 组比较, * *P* < 0.05; 与 33.3mmol/L 组比较, # *P* < 0.05

3. 低糖培养对 H9c2 中 caspase3、LC3 和 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 caspase3 的表达、LC3-II/LC3-I 的比值以及 Beclin-1 的表达显著增高(图 3)。

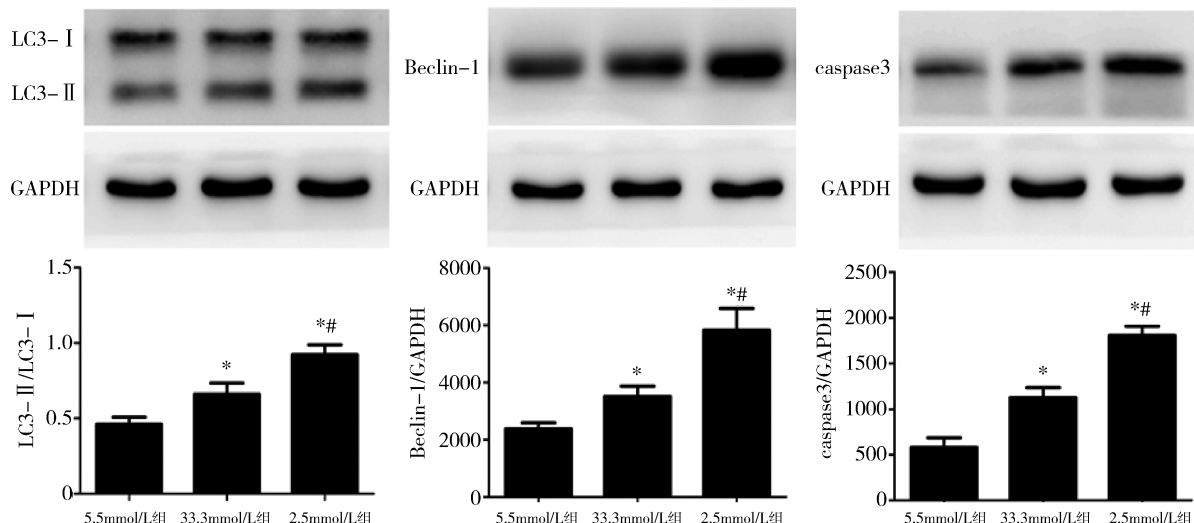


图 3 低糖培养对 Caspase3、Beclin-1 以及 LC3 表达的影响

与 5.5mmol/L 组比较, * $P < 0.05$; 与 33.3mmol/L 组比较, # $P < 0.05$

4. 自噬抑制剂 3-MA 对低糖培养中细胞毒性影响: LDH 释放实验检测结果显示, 与 LG 组相比, LG + 3-MA 组细胞毒性降低且差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4)。

6. 自噬抑制剂 3-MA 对低糖培养中 caspase3、LC3 和 Beclin-1 表达的影响: Western blot 法检测结果显示, 与 LG 组相比, LG + 3-MA 组 caspase3 的表达, LC3-II/LC3-I 的比值以及 Beclin-1 的表达显著降低(图 6)。

讨 论

急性低血糖一直是糖尿病治疗中为达到理想血糖水平而引起的最常见的并发症, 急性低血糖增加了心血管疾病的发生率, 容易诱发恶性心律失常等病症, 并且其对心脏的危险性不亚于糖尿病^[10-13]。随着糖尿病患者的不断增多, 急性低血糖在降糖过程中也不断发生, 但是对于其造成的心脏损害的机制仍未阐明。

自噬作为细胞内的自救机制不仅可以降解一些长寿命蛋白和细胞器、保证物质的循环利用, 还可以使细胞适应营养剥夺的环境、抵抗细胞衰老、呈递抗原以及引起细胞的死亡^[14]。许多研究表明自噬在生理情况及病理情况下都可以发挥作用。目前自噬已被报道与一些心血管疾病的发生、发展密切相关如糖尿病心肌缺血/再灌注、心肌病、肥厚性心肌病等^[7, 15, 16]。细胞凋亡是一种较为成熟的细胞程序性死亡, 自噬与凋亡的关系也密不可分, 在一些情况下自噬可以抵抗细胞凋亡如 Chang 等的研究表明糖尿病引起的心肌细胞凋亡是由于自噬受到抑制所致, 并且上调自噬可以减轻糖尿病性疾病^[17]。但在另外一些情况下, 自噬也作为一种自杀的启动可以引起细胞

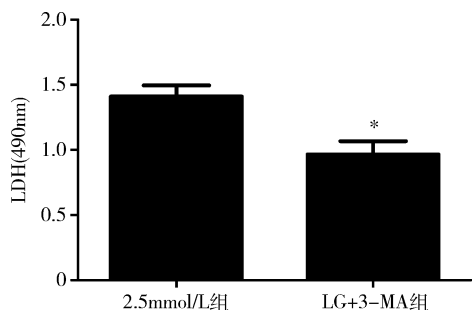


图 4 3-MA 对低糖培养中 H9c2 细胞毒性的影响

与 2.5mmol/L 组比较, * $P < 0.05$

5. 自噬抑制剂 3-MA 对低糖培养中细胞活力的影响: MTT 法检测结果显示, 与 LG 组相比, LG + 3-MA 组细胞增殖能力显著增加(图 5)。

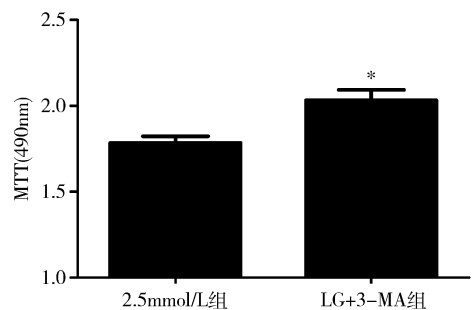


图 5 3-MA 对低糖培养中 H9c2 细胞活力的影响

与 2.5mmol/L 组比较, * $P < 0.05$

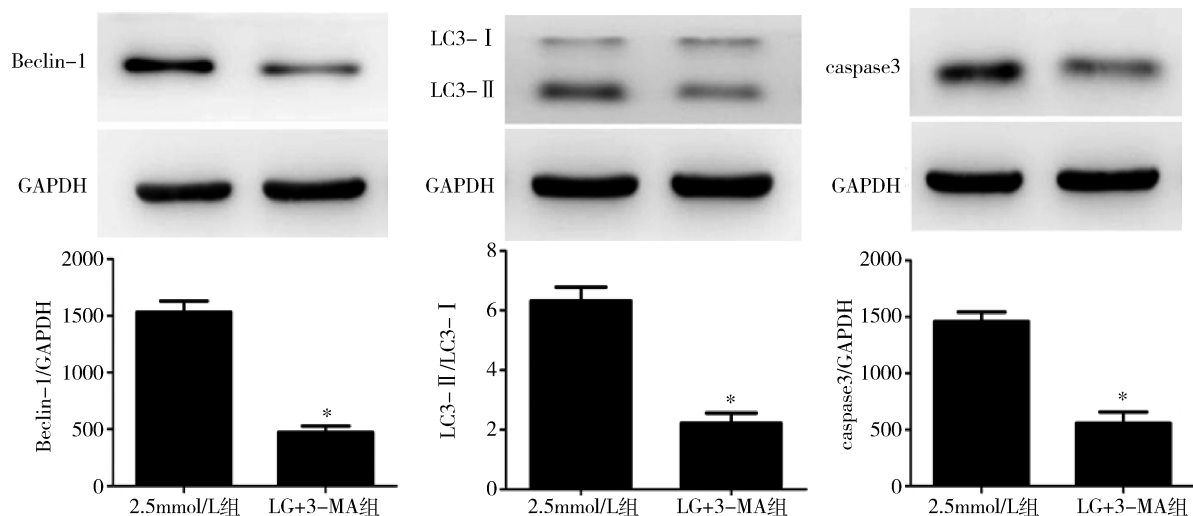


图6 3-MA对低糖培养中caspase3、Beclin-1以及LC3表达的影响

与2.5mmol/L组比较,* $P < 0.05$

凋亡,不管是在细胞正常生长过程还是在疾病过程中,当自噬过度消化细胞质内蛋白及细胞器时,便会引起细胞凋亡^[14, 18]。

本研究发现,低糖处理降低了细胞活力并增加了细胞毒性以及凋亡相关蛋白caspase3的表达,同时增加了自噬功能,表现为LC3-II/LC3-I的比值以及Beclin-1的表达增加,说明低糖培养可以促进自噬功能并引起细胞凋亡。为了进一步验证,笔者使用了自噬抑制剂3-MA将自噬的活性抑制后,LC3-II/LC3-I和Beclin-1也显著降低同时caspase3表达降低,且细胞活力较LG组有所增加,LDH释放较LG组降低,进一步表明低糖培养引起了自噬功能增加并且激活的自噬增加了细胞的凋亡水平。

综上所述,本研究发现低糖培养使H9C2细胞的自噬活性增加并增加了细胞凋亡水平,而低糖培养中引起自噬与凋亡的具体机制以及是否还有其他损伤机制仍有待于进一步研究。

参考文献

- 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
- 白书臣,孙鹏. 糖尿病低血糖症22例临床分析[J]. 现代中西医结合杂志, 2009,33:4098-4099
- 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
- Li Y, Mu Y, Ji Q, *et al.* Hypoglycaemia, abnormal lipids, and cardiovascular disease among Chinese with type 2 diabetes[J]. Biomed Res Int, 2015,2015:1-8
- Chow E, Bernjak A, Williams S, *et al.* Risk of cardiac arrhythmias during hypoglycemia in patients with type 2 diabetes and cardiovascu-

lar risk[J]. Diabetes, 2014,63(5):1738-1747

- Linton PJ, Gurney M, Sengstock D, *et al.* This old heart: cardiac ageing and autophagy[J]. J Mol Cell Cardiol, 2015,83:44-54
- 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
- Gu J, Hu W, Song ZP, *et al.* Rapamycin inhibits cardiac hypertrophy by promoting autophagy via the MEK/ERK/Beclin-1 pathway[J]. Front Physiol, 2016,7:104
- Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy[J]. Autophagy, 2012,8(4):445-544
- Oyer DS. The science of hypoglycemia in patients with diabetes[J]. Curr Diabetes Rev, 2013,9(3):195-208
- 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
- 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
- Pilotto A, Noale M, Maggi S, *et al.* Hypoglycemia is independently associated with multidimensional impairment in elderly diabetic patients[J]. Biomed Res Int, 2014,2014:906103
- Nishida K, Yamaguchi O, Otsu K. Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease[J]. Circ Res, 2008,103(4):343-351
- 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
- Hsu H, Chen C, Lee B, *et al.* High-fat diet induces cardiomyocyte apoptosis via the inhibition of autophagy[J]. Eur J Nutr, 2015
- Ouyang C, You J, Xie Z. The interplay between autophagy and apoptosis in the diabetic heart[J]. J Mol Cell Cardiol, 2014,71:71-80
- Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict?[J]. J Clin Invest, 2005,115(10):2679-2688

(收稿日期:2016-08-28)

(修回日期:2016-08-28)