

姜黄素衍生物 H79L43H3 对高糖诱导心肌损伤及对 ERK、NRF2 的调节

洪 莹 郑 超

摘 要 **目的** 研究在 H9C2 细胞中姜黄素衍生物 H79L43H3 对高糖诱导 H9C2 心肌细胞肥大和纤维化的保护作用以及对 ERK、NRF2 信号通路的调节作用。**方法** 将心肌细胞分为 5 组,即对照组、模型组、干预组(2.5、5、10 μ mol/L)。以不同浓度姜黄素衍生物 H79L43H3 干预 1h 后,模型组和干预组予以高糖(33mmol/L)干预。高糖干预 24h 后,用 ELISA 方法检测细胞培养液炎症因子 IL-6、TNF- α 分泌量的变化;用荧光定量 PCR 和 Western blot 法检测 Collegan-I、TGF- β 、ANP、MAPK 和 NRF2 通路 mRNA 及蛋白表达;罗丹明鬼笔环肽染色显示肌动蛋白肌丝的结构。DHE 染色显示活性氧簇(ROS)的含量。**结果** 与对照组相比,模型组 Collegan-I、TGF- β 水平明显升高($P < 0.05$),H79L43H3 干预组具有剂量依赖性的抑制作用($P < 0.05$)。与对照组相比,模型组 ERK 通路明显激活,NRF2 通路被抑制,H79L43H3 干预组可逆转这一改变($P < 0.05$)。**结论** 姜黄素衍生物 H79L43H3 可明显抑制 H9C2 细胞中高糖诱导的心肌肥大和纤维化改变,可能与其抑制炎症因子释放及抗氧化作用有关,提示 H79L43H3 可能有望成为防治糖尿病心肌病的新药。

关键词 糖尿病心肌病 姜黄素衍生物 炎症 氧化应激

中图分类号 R589.1

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.08.006

Glucose-induced Myocardial Injury and Regulation on ERK and NRF2. Hong Ying, Zheng Chao. The Second School of Medicine, Wenzhou Medical University The Second Affiliated Hospital, Zhejiang 325027, China

Abstract **Objective** To explore the protection of curcumin derivatives H79L43H3 on high glucose-induced myocyte hypertrophy and fibrosis in H9C2 cells and analyze possible role of H79L43H3 on regulating ERK and NRF2 signaling. **Methods** Myocardial cells were divided into 5 groups: control group, model group and treatment group (2.5, 5, 10 μ mol/L). After incubated with different concentrations of curcumin derivatives H79L43H3 for 1h, the model group and treatment groups were exposed to high glucose (33mmol/L). ELISA method was used for detecting changes of IL-6 and TNF- α production in culture solution. By fluorescence quantitative PCR and western blotting, Collegan-I, TGF- β , ANP, MAPK and NRF pathways were tested. Rhodamine phalloidin showed actin microfilament. The staining were used to detect oxidation level. **Results** Compared with control group, the levels of Collegan-I, TGF- β was significantly increased in model group($P < 0.05$). Meanwhile it was significantly reduced in a dose-dependent manner in the treatment group($P < 0.05$). Compared with the control group, the ERK pathway was significantly activated and the NRF pathway was inhibited in the model group. And it was reversed in the treatment group($P < 0.05$). **Conclusion** Curcumin derivative H79L43H3 can obviously inhibit myocardial hypertrophy and fibrosis in H9C2 cells, which may be related to the inhibition of inflammatory factor release and antioxidant activity. H79L43H3 might be expected to become a new drug for the prevention and control of diabetic cardiomyopathy.

Key words Diabetic cardiomyopathy; Curcumin derivatives; Inflammation; Oxidative stress

糖尿病相关的心肌结构和功能的改变为糖尿病心肌病显著的特征,炎症和氧化应激在其发病机制中有着至关重要的作用^[1~5]。过度产生的促炎细胞因子如白介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α),通过正反馈持续刺激炎症介质的产生,诱导糖尿

病心肌病的发生^[6]。同样地,当活性氧簇(reactive oxidative stress,ROS)大量过剩,细胞内生物高分子如核酸、脂质和蛋白质可被活性氧修饰,从而导致细胞功能障碍。过度的炎症和活性氧簇可以相互促进各自的产生。前期研究发现,姜黄素可通过抗炎抗氧化保护糖尿病非酒精性脂肪肝以及急性炎症的作用^[7~9]。基于此,本研究观察和探讨自主研发的姜黄素衍生物 H79L43H3 对糖尿病心肌细胞模型的保护作用及可能机制。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81670777)

作者单位:325027 温州医科大学第二临床医学院、温州医科大学附属第二医院

通讯作者:郑超,电子信箱:wallbb_1022@163.com

材料与方法

1. 材料:正常大鼠胚胎心肌细胞 H9C2 (中科院上海细胞库);胎牛血清、培养基 DMEM (美国 Gibco 公司);姜黄素衍生物 H79L43H3 粉末 (温州医科大学梁广教授所赠);蛋白一抗 (CST 公司, 美国 Santa Cruz 公司);二抗 (美国 Santa Cruz 公司);Trizol、PCR 引物合成、反转录试剂盒 (美国 Invitrogen 公司);real-time PCR 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司);DHE 探针 (中国碧云天有限公司);罗丹明鬼笔环肽。

2. 方法:(1)细胞培养:H9C2 心肌细胞株常规培养于含 10% 胎牛血清、1% 青链霉的低糖 DMEM 培养基中,置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中。细胞融合 80% ~ 90% 时进行传代,每 2 ~ 3 天传代 1 次,取对数生长期细胞为实验对象。(2) real-time PCR 检测 mRNA 的相对表达量:用 Trizol 试剂裂解细胞,按照试剂说明书方法提取细胞总 mRNA。定量 1 μg mRNA 进行 RT-PCR 反应。配置 10 μl 反应体系放入 real-time PCR 仪进行反应,内参为 GAPDH,根据循环 (Ct) 值以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各基因相对表达量。实验重复 3 次。(3) Western blot 法检测蛋白表达:如上述收获细胞裂解液,置于 4℃ 离心 (12000r/min, 10min),根据考马斯亮蓝法测定其蛋白含量。定容定量后,取样品加热变性、电泳分离、转膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 1.5h, TBST 洗膜,一抗 4% 孵育 1h,再洗膜后,化学发光液孵育,用 Image-Lab 成像仪曝光显影。用 Image J 分析软件对条带进行分析。一抗浓度:各蛋白指标 1:1000 (CST), 1:300 (美国 Santa Cruz 公司),二抗浓度 1:3000。(4) ELISA 法检测细胞上清炎性因子:如上述收获细胞培养液置于 -80℃ 保存。按照说明书进行操作,包被一抗 4℃ 孵育过夜,次日洗涤印干,加入 AD,洗涤印干,加入标准品或待测样品,洗涤印干,加入亲和素辣根过氧化物酶,洗涤印干,加入底物工作液,洗涤印干,加入终止液,最后于酶标仪 450nm 处读取 A 值。以蛋白浓度使标准化。(5) 细胞荧光检测 ROS:如上述干预细胞后,DHE 检测细胞内活性氧。按说明书将探针溶于培养基,细胞培养液更换成含探针细胞培养液,37℃ 避光孵育 40min 后,清洗细胞置于荧光显微镜下观察拍摄。罗丹明鬼笔环肽检测肌丝结构,配置工作液,4% 多聚甲醛固定,清洗,0.1% TritonX-100 通透,清洗,罗丹明鬼笔环肽避光室温孵育 40min,清洗,清洗细胞置于荧光显微镜下观察拍摄。

3. 统计学方法:所有实验均重复 2 ~ 3 次,用

GraphPad Prism5.0 及 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析,描绘出柱状图。实验所得数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。参数多组间比较使用单因素方差分析 (one-way anova),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. H79 对高糖诱导心肌纤维化蛋白 TGF-β、Collegan-I 以及 mRNA 水平的影响:与对照组比较,模型组高糖可明显诱导前纤维化因子 TGF-β、Collegan-I 的过表达。H79 干预可剂量依赖性的逆转上述高糖诱导的纤维化 ($P < 0.05$, 图 1)。同样地,在蛋白水平,H79 干预可降低高糖诱导的 TGF-β、Collegan-I 的过表达 ($P < 0.05$, 图 2)。这些结果表明,姜黄素衍生物 H79 可以缓解高糖引起的 H9C2 心肌细胞的纤维化,缓解糖尿病心肌病。

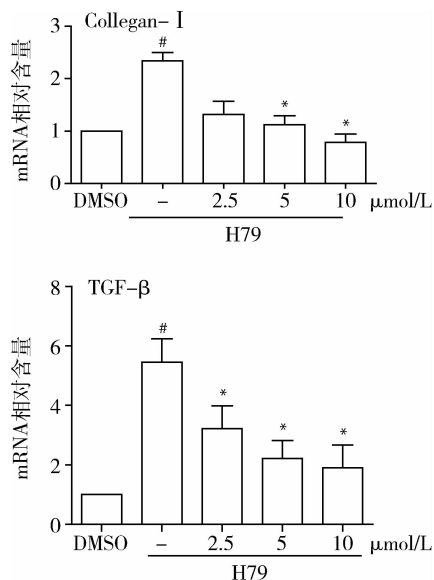


图 1 H79 对高糖诱导心肌纤维化相关 TGF-β、Collegan-I mRNA 的影响

与 DMSO 比较, * $P < 0.05$; 与高葡萄糖组比较, # $P < 0.05$

2. H79 对高糖诱导的心肌肥大指标 ANP 的影响:与对照组比较,模型组高糖可显著诱导心肌细胞肥大相关指标 ANP 基因水平表达,给予 H79 干预可明显改善高糖诱导的变化 ($P < 0.05$, 图 3)。在蛋白水平,高糖干预同样可以刺激肥大相关标志物的表达,而给予 H79 干预可逆转这一改变 ($P < 0.05$, 图 4)。罗丹明鬼笔环肽染色结果同样显示,高糖组细胞形态明显变得肥大,而 H79 干预后细胞肥大形态有所改善 ($P < 0.05$, 图 5)。这些结果表明,高糖可诱导体外细胞的肥大,而 H79 具有抑制高糖诱导细胞肥大的作用,发挥保护糖尿病心肌病作用。

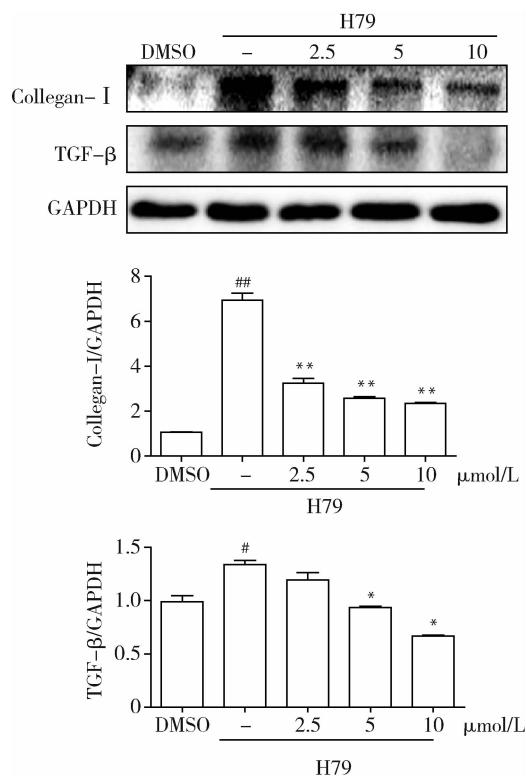


图2 H79对高糖诱导心肌纤维化相关TGF-β、Colgan-I蛋白水平的影响

与DMSO比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;

与高葡萄糖组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

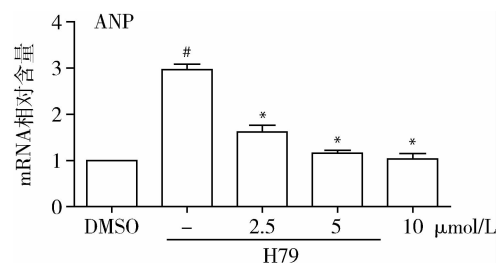


图3 H79对高糖诱导心肌肥大指标

ANP基因水平的影响

与DMSO比较, * $P < 0.01$;与高葡萄糖组比较, # $P < 0.01$

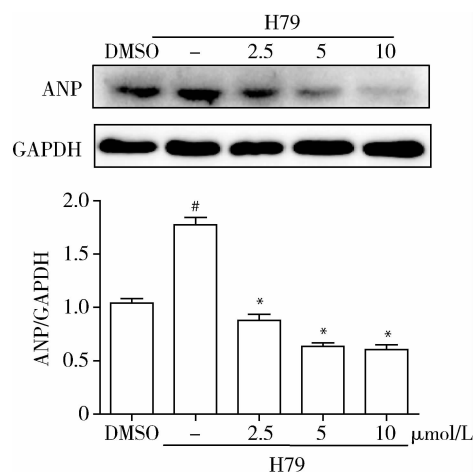


图4 H79对高糖诱导心肌肥大指标

ANP蛋白水平的影响

与DMSO比较, * $P < 0.01$;与高葡萄糖组比较, # $P < 0.01$

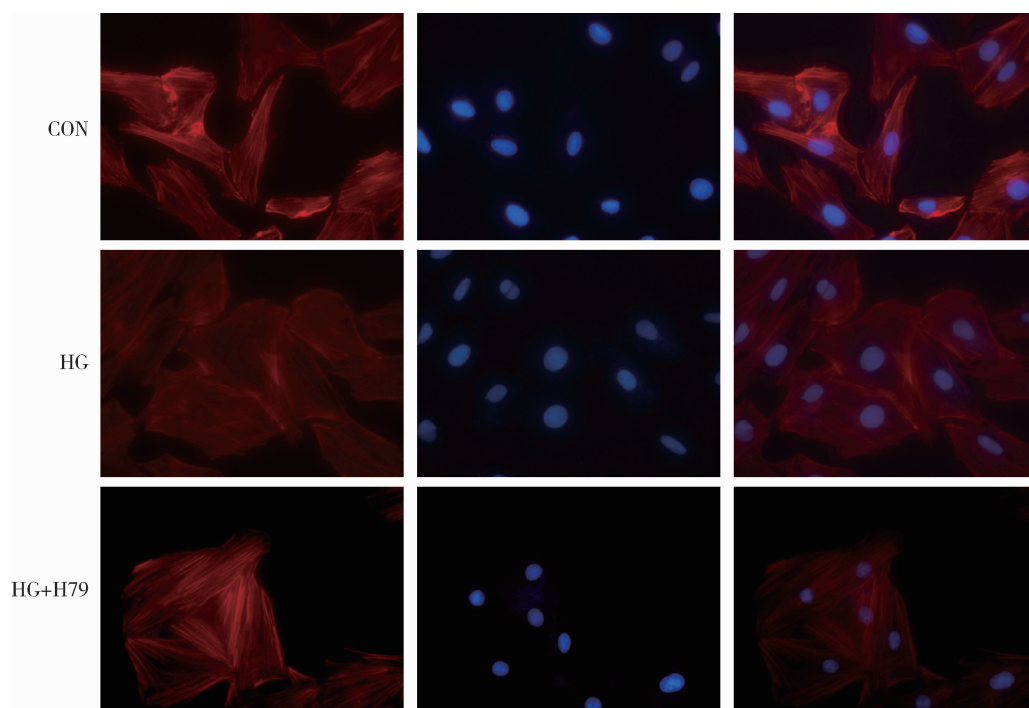


图5 罗丹明鬼笔环肽染色H79干预后的心肌(×400)

3. H79 对高糖诱导的炎症的影响:与对照组比较,模型组炎症相关基因 IL-6、TNF- α 的 mRNA 的表达明显上调,而药物干预可剂量依赖性降低上述基因的上调($P < 0.05$,图 6)。并且在黏附因子 ICAM、VCAM 方面呈现出相似的缓解结果($P < 0.05$,图 7)。通过 ELISA 法,笔者观察到高糖可诱导心肌细胞 IL-6、TNF- α 等炎症因子的分泌增多,这一改变可被药物干预所逆转($P < 0.05$,图 8)。这些结果提示,在高糖作用下,H79 可通过抗炎来达到保护心肌的作用。

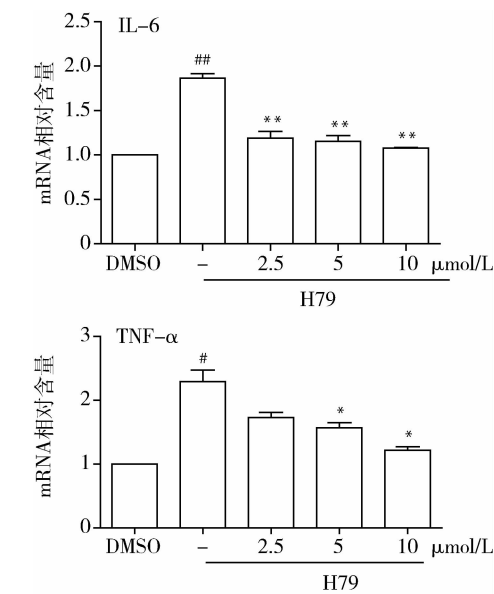


图 6 H79 对高糖诱导心肌炎症基因水平的影响
与 DMSO 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与高葡萄糖组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

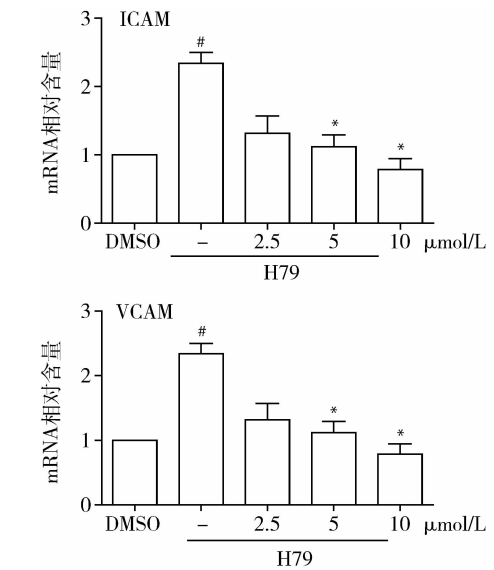


图 7 H79 对高糖诱导心肌炎症因子的影响
与 DMSO 比较, * $P < 0.05$;与高葡萄糖组比较, # $P < 0.05$

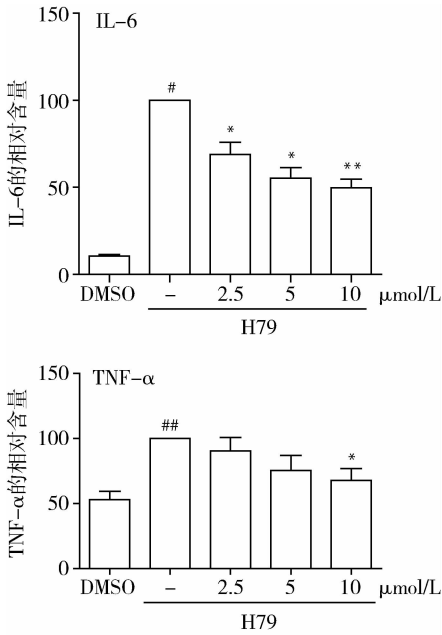


图 8 ELISA 检测 H79 对高糖诱导心肌炎症指标
与 DMSO 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与高葡萄糖组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

4. H79 可通过影响 ERK 来发挥抗炎作用:高糖可激活心肌细胞内的 MAPK 通路,从而促进炎症的发生。其中,H79 干预后,可以剂量依赖性的降低高糖诱导的 ERK 的磷酸化($P < 0.05$,图 9)。而对于 JNK、P38 信号通路,高糖可以诱导两者磷酸化的增多,而 H79 干预并不能逆转这种趋势($P > 0.05$,图 10、图 11)。这提示 H79 可能通过阻断 ERK 信号通路而发挥抗炎作用,从而保护心肌细胞。

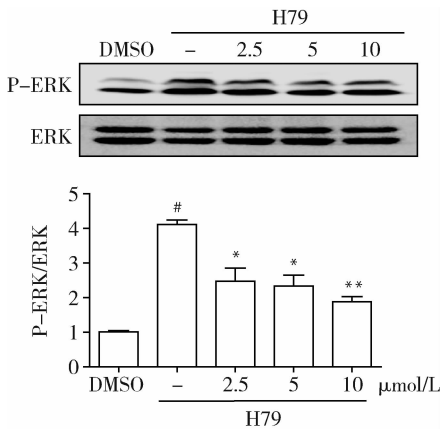


图 9 H79 对高糖诱导心肌细胞 ERK 的影响
与 DMSO 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;
与高葡萄糖组比较, # $P < 0.01$

5. H79 对抗氧化应激蛋白 NRF2 的影响:从 DHE

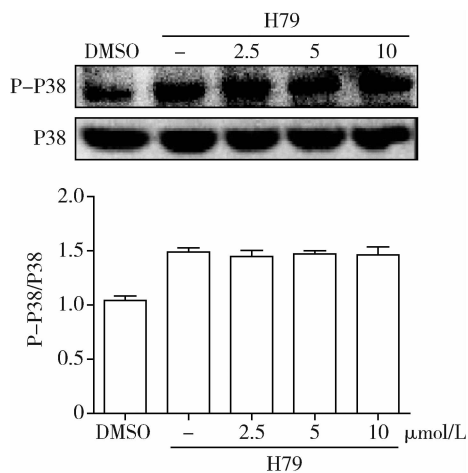


图 10 H79 对高糖诱导心肌细胞 P-38 的影响

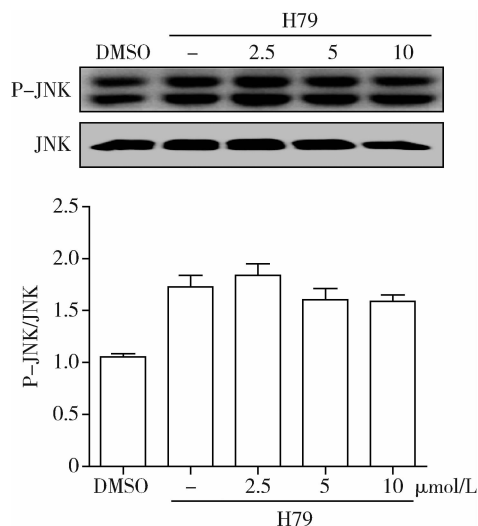


图 11 H79 对高糖诱导心肌细胞 JNK 的影响

染色可以看出,与对照组比较,模型组可见明显增强的荧光强度,而 H79 干预后,荧光强度明显减弱至正常水平(图 12)。Western blot 法结果显示,高糖干预明显降低抗氧化蛋白 NRF2 的水平,而 H79 干预可呈

剂量依赖性升高 NRF2 的表达($P < 0.05$,图 13)。这些结果表明高糖情况 H79 可能通过上调 NRF2 抗氧化从而保护心肌免于氧化应激损伤。

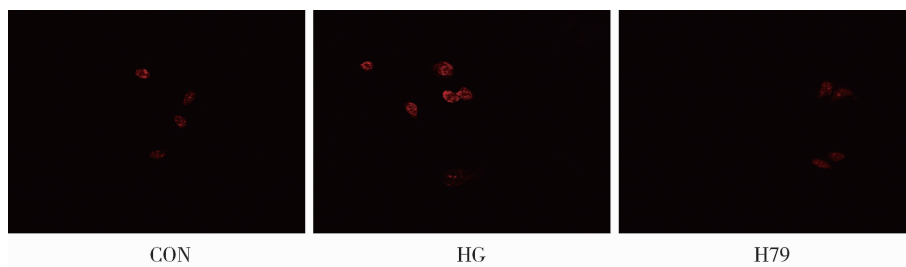


图 12 DHE 染色显示 H79 对高糖诱导心肌细胞氧化的影响

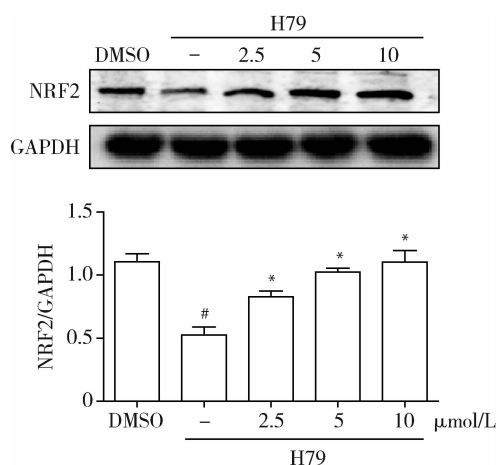


图 13 H79 对高糖诱导心肌细胞氧化 NRF2 蛋白水平的影响

与 DMSO 比较, $^*P < 0.05$; 与高葡萄糖组比较, $^{\#}P < 0.05$

讨 论

糖尿病心肌病是除冠状动脉疾病和高血压之外

导致心力衰竭的一大病因。糖尿病状态下,早期心肌细胞会代偿性增厚,心肌细胞负荷过度导致心肌肥大,最终发展为纤维化^[10]。心肌纤维化增加了心室壁僵硬,降低了心室顺应性,致心室收缩及舒张功能不全,最终导致心力衰竭^[10~12]。在这一心肌损伤过程中,过度的炎症和氧化应激扮演了重要的角色^[6,13~15]。近年来,越来越多的证据显示,炎症和氧化应激在糖尿病心肌病发生、发展中起着极其重要的作用^[16,17]。在高糖作用下,MAPK 信号通路常处于激活状态,激活状态的 MAPK 信号通路可诱导 I- κ B α 的降解,促使 NF- κ B 入核,产生大量的炎性介质(如 TNF- α 、IL-6 等),引起炎症反应的发生,同时激活 NF- κ B 信号通路的级联反应,从而扩大心肌局部炎症损伤。糖尿病心肌能量代谢异常造成氧自由基(ROS)产生增多,导致氧化应激,引起细胞损伤,这是糖尿病心肌病进展的核心机制。氧自由基(ROS)产生过多会形成脂质过氧化物同时也会造成细胞 DNA

氧化损伤,加重对机体造成损害^[18,19]。当氧化应激产生时,NRF2 结合到某些抗氧化基因启动子区域抗氧化剂转录元件处,增加抗氧化基因的表达,保护细胞抵抗氧化应激。

天然产物姜黄素的抗炎和抗氧化特性被广泛用于疾病研究,但在糖尿病心肌病中的抗炎抗氧化作用未明确报道。H79L43H3 是根据姜黄素改造而成的具有更好抗炎效果的衍生物^[9,13]。本研究显示,在高糖干预下,H79 能够剂量依赖性的抑制 IL-6、TNF- α 等炎性介质的表达,展现良好的心肌保护作用。参考以往研究,本实验发现,H79 可以明显抑制 ERK 信号通路的激活,这提示 H79 抑制炎性介质的表达和保护心肌的作用可能是通过抑制 ERK 信号通路来实现的。本实验还发现,对于高糖引起的氧化应激损伤,H79 具有显著的缓解作用,并且检测到 NRF2 表达的上调,这提示 H79 可以通过上调 NRF2 表达来保护心肌免于氧化损伤。

综上所述,本研究阐明了姜黄素衍生物 H79 能够抑制高糖诱导 ERK 的活化,并且上调 NRF2 蛋白的表达,从而发挥抗炎和抗氧化作用,缓解心肌细胞肥大和纤维化。本研究结果拓展了临床姜黄素的应用范围,为糖尿病心肌病的治疗提供新的思路。

参考文献

- Goncalves N, Gomes - Ferreira C, Moura C, *et al.* Worse cardiac remodeling in response to pressure overload in type 2 diabetes mellitus [J]. *Int J Cardiol*, 2016, 217: 195 - 204
- Li C, Lv L, Li H, *et al.* Cardiac fibrosis and dysfunction in experimental diabetic cardiomyopathy are ameliorated by alpha - lipoic acid [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2012, 11: 73 - 82
- Su W, Zhang y, Zhang Q, *et al.* N - acetylcysteine attenuates myocardial dysfunction and postischemic injury by restoring caveolin - 3/ eNOS signaling in diabetic rats [J]. *Cardiovas Diabetol*, 2016, 15 (1): 146 - 161
- He X, Ma Q. Disruption of Nrf2 synergizes with high glucose to cause heightened myocardial oxidative stress and severe cardiomyopathy in diabetic mic [J]. *J Diabetes Metab*, 2012, Suppl 7: 12 - 19
- Giridharan RATVV. Depletion of 14 - 3 - 3 protein exacerbates cardiac oxidative stress, inflammation and remodeling process via modulation of MAP/NF - B signaling pathways after streptozotocin - induced diabetes mellitus [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2011, 28: 911 - 911
- Zhong P, Wu L, Qian Y, *et al.* Blockage of ROS and NF - kappaB - mediated inflammation by a new chaicone L6H9 protects cardiomyocytes from hyperglycemia - induced injuries [J]. *Biochim Biophys Ac-*

- ta, 2015, 1852 (7): 1230 - 1241
- Balasubramanyam M, Koteswari AA, Kumar RS, *et al.* Curcumin - induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation: novel the rapeutic implications [J]. *J Biosci*, 2003, 28 (6): 715 - 721
- Jimenez - Flores LM, Lopez - Briones S, Macias - Cervantes MH, *et al.* A PPARgamma, NF - kappaB and AMPK - dependent mechanism may be involved in the beneficial effects of curcumin in the diabetic db/db mice liver [J]. *Molecules*, 2014, 19 (6): 8289 - 8302
- Dong LL, Zheng SQ, Zhang YL, *et al.* Design, synthesis, and evaluation of semi - conservative mono - carbonyl analogs of curcumin as anti - inflammatory agents against lipopolysaccharid induced acute injury [J]. *Med Chem Comm*, 2014, 1 (3): 2 - 10
- Miki T, Yuda S, Kouzu H, *et al.* Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features [J]. *Hearts Fail Rev*, 2013, 18 (2): 149 - 166
- Mochizuki Y, Tanaka H, Matsumoto K, *et al.* Clinical features of subclinical left ventricular systolic dysfunction in patients with diabetes mellitus [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2015, 14: 37 - 46
- Wang L, Li J, Li D. Losartan reduces myocardial interstitial fibrosis in diabetic cardiomyopathy rats by inhibiting JAK/STAT signaling pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8 (1): 466 - 473
- Pan Y, Wang Y, Cai L, *et al.* Inhibition of high glucose - induced inflammatory response and macrophage infiltration by a novel curcumin derivative prevents renal injury in diabetic rats [J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 166 (3): 1168 - 1182
- Qian Y, Zhang Y, Zhong P, *et al.* Inhibition of inflammation and oxidative stress by an imidazopyridine derivative X22 prevents heart injury from obesity [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20 (8): 1427 - 1442
- Di Luigi L, Corinaldesi C, Colletti M, *et al.* Phosphodiesterase type 5 inhibitor sildenafil decreases the proinflammatory chemokine CXCL10 in human cardiomyocytes and in subjects with diabetic cardiomyopathy [J]. *Inflammation*, 2016, 49 (3): 1238 - 1252
- Wu H, Li HN, Xie J, *et al.* Resveratrol ameliorates myocardial fibrosis by inhibiting ROS/ERK/TGF - beta/periostin pathway in STZ - induced diabetic mice [J]. *BMX Cardiovasc Disord*, 2016, 16: 5 - 14
- Qin W, Wang J, Wang H. Poly (ADP - ribose) polymerase 1 inhibition protects cardiomyocytes from inflammation and apoptosis in diabetic cardiomyopathy [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (24): 35618 - 35631
- Kayama Y, Raaz U, Jagger A, *et al.* Diabetic cardiovascular disease induced by oxidative stress [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16 (10): 25234 - 25263
- Liu C, Lu XZ, Shen MZ, *et al.* N - Acetyl cysteine improves the diabetic cardiac function: possible role of fibrosis inhibition [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2015, 15: 84 - 93

(收稿日期: 2017 - 10 - 22)

(修回日期: 2017 - 11 - 09)