

马里苷减轻高糖诱导的大鼠心肌细胞系 H9c2 损伤

祖力皮亚·阿布拉¹, 赵强², 张泰民³, 李甜^{4,5*}

新疆医科大学 1. 中医学院; 3. 临床医学部; 4. 基础医学院 组织学胚胎学教研室;
5. 新疆地方病分子生物学重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830001;
2. 新疆维吾尔自治区人民医院 心脏及泛血管医学诊疗中心, 新疆 乌鲁木齐 830001

摘要:目的 研究马里苷对高糖所致大鼠心肌细胞系(H9c2)损伤的影响。方法 将H9c2细胞分为对照组(Ctrl)、高糖(30 mmol/L)损伤模型组和马里苷(25、50、100 μmol/L)干预模型组。MTT法检测H9c2细胞的活性;Western blot检测细胞LC-3 II/I、p62、mTOR蛋白表达。结果 与对照组相比,模型组细胞活性下降($P<0.01$),马里苷组H9c2细胞活性显著增强($P<0.01$);模型组LC-3 II/I蛋白表达水平降低($P<0.05$),p62及mTOR水平升高($P<0.01$),马里苷组LC-3 II/I水平增加,p62及mTOR降低($P<0.01$),且随着浓度的增加蛋白质表达量更加明显。结论 马里苷能够影响高糖诱导的心肌细胞损伤的自噬相关蛋白质的表达。

关键词: 马里苷;H9c2细胞;高糖损伤;自噬

中图分类号:R285.5 文献标志码:A

DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2024.09.1269

Marein alleviates high glucose-induced damage of rat myocardial cell line H9c2

Zulipiya · ABULA¹, ZHAO Qiang², ZHANG Taimin³, LI Tian^{4,5*}

1. School of Traditional Chinese Medical; 3. Clinical Medicine Department; 4. Department of Histology and Embryology, School of Basic Medicine;5. Xinjiang Key Laboratory of Molecular Biology of Endemic Diseases, Xinjiang Medical University, Urumqi 830001; 2. Heart and Pan-vascular Medical Diagnosis and Treatment Center, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, China

Abstract: Objective To study the effect of marein on the damage of rat myocardial cell line (H9c2) induced by high glucose. **Methods** H9c2 cells were divided into Ctrl group, high glucose (30 mmol/L) injury model group and marein (25, 50, 100 μmol/L) intervention group. The viability of H9c2 cells was detected by MTT method. Western blot was used to detect the protein expression level of LC-3 II/I, p62 and mTOR. **Results** Compared with the Ctrl group, the viability of H9c2 cells in the model group was decreased ($P<0.01$) and the viability of H9c2 cells in the marein group was significantly increased ($P<0.01$). The protein expression of LC-3 II/I in model group was decreased ($P<0.05$) and the level of p62 and mTOR was increased ($P<0.01$). The level of LC-3 II/I in the marein group was increased, while the level of p62 and mTOR was decreased ($P<0.01$). The

收稿日期:2024-01-03 修回日期:2024-05-15

基金项目:新疆维吾尔自治区高校科研计划(XJEDU2020Y021);国家级大学生创新创业训练计划(202010760011);新疆医科大学博士启动基金(2023)

*通信作者(corresponding author):292629092@qq.com

protein expression was more obvious with the increase of concentration. **Conclusions** Marein can affect the expression of autophagy associated proteins in cardiomyocyte injury induced by high glucose.

Key words: marein; H9c2 cell; high-glucose injury; autophagy

糖尿病性心肌病 (diabetic cardiomyopathy, DCM) 是独立于冠心病、高血压等心血管疾病的一种特异性心肌病。是 2 型糖尿病常见并发症之一。目前研究表明, 糖尿病心肌病会在长期高血糖、能量代谢异常等的影响下, 导致心肌代谢紊乱, 心肌间质纤维化, 心肌细胞凋亡, 心室重构等一系列病理生理反应。最终导致患者出现心脏功能的衰竭。

用于治疗糖尿病性心肌病的药物目前主要包括他丁类^[1]、胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1)^[2]、双胍类、 α -糖苷酶抑制剂、胰岛素增敏剂等^[3]。上述药物虽然可显著降低血糖, 但它们并未有效抑制或改善糖尿病性心肌病的发生及演变过程, 临床研究对于糖尿病心肌病的发生机制仍不明确, 同时也无特异性的诊治方法^[1,4-5]。从传统的民族药中寻找新型的药效稳定和安全的治疗药物成为一个新的方向。

马里昔 (marein) 是一种从两色金鸡菊头状花序中分离得到的黄酮类单体化合物^[4]。研究表明, 马里昔对血糖调节有一定的影响, 能够改善高胰岛素抵抗, 清除自由基活性^[5-6]、并且能够增强糖尿病肾病肾脏组织的自噬水平^[7], 但马里昔对糖尿病性心肌病的作用尚不清楚。本研究通过马里昔干预高糖所致 H9c2 细胞损伤体外模型, 观察其对细胞活性及自噬相关蛋白的影响, 研究马里昔对高糖所致大鼠心肌细胞系损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系: 大鼠心肌细胞系 H9c2 (上海中乔新舟生物科技有限公司)。

1.1.2 主要试剂: 马里昔 (marein; Extrasynthese 公司; 纯度 99.9%); 胎牛血清 (Gibco 公司); 基因引物序列 (上海生工生物合成); 二甲双胍 (metformin, Met) (MCE 公司); 辣根过氧化物酶标记山羊抗体 (博奥森生物技术有限公司); 兔抗 P62, LC3-II/I、m-TOR 抗体 (Cell Signaling Technology 公司); 兔抗 GAPDH 抗体 (Affinity 生物科学公司); 蛋白质

marker (10~180 ku)、BCA 蛋白质定量试剂 (Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞的分组及处理: 将 H9c2 细胞分为对照组 (Ctrl)、高糖损伤模型组 (model, 30 mmol/L 葡萄糖作用 24 h)、阳性药对照组 (Met, 1 mmol/L), 分别用马里昔低浓度 (25 μ mol/L)、中浓度 (50 μ mol/L)、高浓度 (100 μ mol/L) 干预模型组, 每组 $n=3$ 。将细胞放于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中用完全培养基培养, 定期观察细胞状态。取对数生长期细胞, 细胞计数后按 1×10^5 个心肌细胞种于 96 孔板中, 加细胞悬液按 100 μ L/孔。次日观察细胞, 待细胞增殖至 80%~90% 汇合后换液并确定高糖浓度分组, 每孔加入 200 μ L 浓度不同的葡萄糖溶液 (20、30、40、50 mmol/L), 分别处理 24 h 和 48 h 后弃上清。每孔加 20 μ L 的 5 g/L MTT, 室温避光孵育 4 h 后弃上清。每孔加 150 μ L 的二甲基亚砜 (DMSO), 用全自动酶标仪在波长 490 nm 下测定各孔的吸光度 (A) 值, A 值越大表明细胞存活的越多。对照组以等量含有 10% 的完全低糖培养基处理 24 h 和 48 h。细胞存活率 (%) = 实验组平均 A 值 / 对照组平均 A 值 $\times 100\%$ 。

1.2.2 MTT 法检测 H9c2 细胞活性: 将对数期的 H9c2 细胞以细胞密度为 1×10^5 个接种于 96 孔板上, 加入不同浓度的马里昔溶液 (25、50、100、200、400、800、1 000 μ mol/L) 处理 24 h 和 48 h, 检测马里昔对细胞毒性。对照组以等量含有 10% 的完全低糖培养基处理 24 h 和 48 h。

1.2.3 Western blot 检测 P62、LC3-II/I、mTOR 蛋白的表达: 待细胞增殖至 80%~90% 汇合度后, 按 1×10^5 个细胞接种于 6 孔板中, 药物干预 48 h 后, 加入含有 1% 磷酸酶抑制剂混合物的细胞高效蛋白裂解液 200 μ L, 收集上清液, 置冰上短暂存放或放置 -80 $^{\circ}$ C 冰箱长期保存。取出 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存的心肌细胞提取蛋白质, 加入组织高效蛋白裂解液后在冰上放置 30 min, 匀浆、裂解并离心, 取上清液弃沉淀, 并将其放在冰上进行短期保存或放在 -80 $^{\circ}$ C 的冰箱中进行长期保存。用 BCA 法进行蛋白质定量后进行 SDS-

PAGE, 转 PVDF 膜, 浸入配置好的 5% 牛奶的封闭液中于摇床上封闭 1.5 h。用 1×TBST 清洗 3 次, 每次 10 min。4 °C 冰箱敷一抗过夜。次日, 用 1×TBST 冲洗 3 次, 每次 10 min。敷二抗, 室温避光摇床孵育 1.5 h。1×TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。加加强型化学发光液 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂, 曝光显影成像。利用 ImageJ 软件对数据进行分析。

1.3 统计学分析

数据采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析处理, 测定结果均采用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (One-way Anova)。

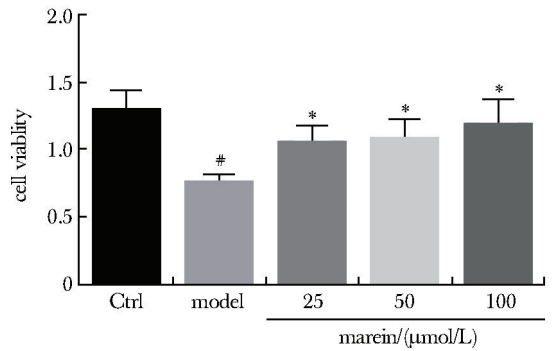
2 结果

2.1 马里昔对 H9c2 细胞活性的影响

与对照组比较, 模型组 H9c2 细胞活性显著降低 ($P<0.01$); 马里昔组的细胞活性显著回升 ($P<0.01$) (图 1)。

2.2 马里昔对 H9c2 细胞 p62 和 LC3-II/I 蛋白表达的影响

与对照组比较, 模型组 H9c2 细胞 p62 蛋白表

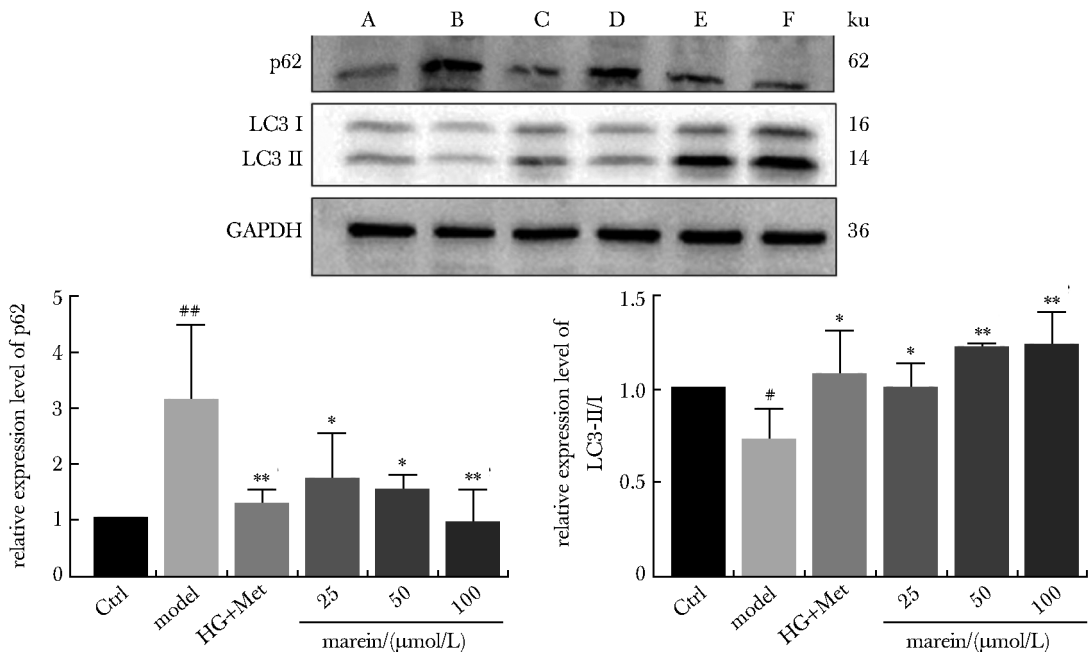


$P<0.01$ compared with ctrl; * $P<0.01$ compared with model.

图 1 马里昔对 H9c2 细胞活性回升

Fig 1 Marein increased the viability of H9c2 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

达水平显著升高 ($P<0.01$), LC3-II/I 表达水平显著降低 ($P<0.05$); 与模型组相比较, 马里昔组 p62 表达水平回降, 马里昔浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$)。LC3-II/I 表达水平回升, 且马里昔浓度为 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 时效果更显著 ($P<0.01$) (图 2)。



A. Ctrl; B. model; C. HG+Met; D. HG+25 $\mu\text{mol/L}$ marein; E. HG+50 $\mu\text{mol/L}$ marein; F. HG+100 $\mu\text{mol/L}$ marein;

$P<0.05$, ## $P<0.01$ compared with Ctrl; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with model.

图 2 马里昔对 H9c2 细胞 p62 和 LC3-II/I 表达的影响

Fig 2 Effect of marein on p62 and LC3-II/I expression in H9c2 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

2.3 马里昔对 H9c2 细胞 mTOR 表达的影响

与对照组比较,模型组 H9c2 细胞 mTOR 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$),与模型组相比较,马里昔组 H9c2 细胞 mTOR 表达水平回降,随着马里昔浓度的增加,蛋白表达水平更显著性降低,当马里昔浓度为 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 时,效果更明显(图 3)。

3 讨论

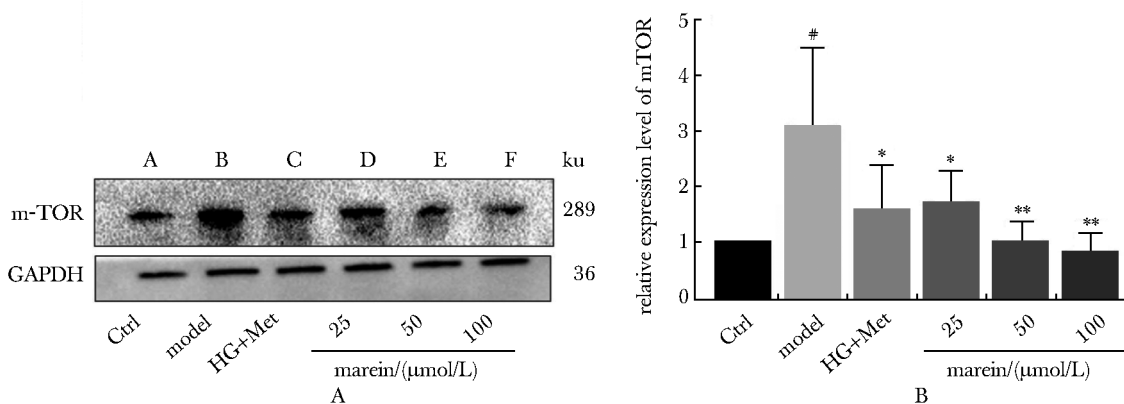
H9c2 细胞的表型类似心脏细胞,其能量代谢与正常原代心肌细胞相似,因此被广泛应用于分析胰岛素抵抗和缺血心脏的预处理损伤。为研究心肌细胞损伤,该细胞系为较合适的模型^[8]。本实验建立高糖诱导 H9c2 细胞体外损伤模型,旨在探究不同剂量的马里昔对细胞活性的影响。根据实验结果表明,马里昔对高糖诱导的 H9c2 细胞表现出保护作用,随着马里昔剂量的增加,细胞增殖率逐渐上升,细胞活性明显增强。和对照组相比,马里昔组能够增强自噬相关蛋白 LC-3 II/I 的表达,降低 p62 及 mTOR 的水平,且随着马里昔浓度的增加蛋白表达量发生明显改变,说明马里昔能够影响高糖诱导的心肌细胞损伤的自噬相关蛋白的表达。

自噬是一种细胞自我保护过程的机制,它通过溶酶体降解途径分解异常蛋白质和受损的细胞器,从而维持细胞的稳态^[9]。高糖可以导致 H9c2 细胞

毒性的增加,细胞的凋亡和细胞自噬的被抑制^[10]。本实验研究发现,高糖可升高自噬相关蛋白 p62 与 mTOR 的表达水平,降低 LC3 II/I 的表达,而马里昔能够改善高糖引起的自噬水平降低。

心肌细胞在很大程度上也需要自噬来清除异常和受损的蛋白质和细胞器,以维持心肌的正常运作。自噬是一种进化上保守的周转过程,在分解长寿蛋白、处理聚集蛋白或维修功能障碍的细胞器时发挥着重要作用,同时还能产生能量和大分子前体。LC3 是一种可溶性蛋白,广泛存在于哺乳动物组织和多种培养的细胞中,是自噬的关键调节因子,它是通过与 ATG7 和其他自噬效应因子的相互作用而被膜结合后,启动自噬的发生^[11]。LC3-I 转移到 LC3-II 是自噬启动的标志,在高糖时抑制 LC3 的转换,抑制自噬^[12]。此外,p62 缺失会导致 LC3-II 的形成受损。另一方面,沉默 p62 也可以激活自噬,这可以通过 LC3I 向 LC3II 的转化率以及自噬体的数量增加来证明。

在细胞自噬的调控中,mTOR 激酶扮演着重要角色,激活的 mTOR 可以抑制自噬过程,而 mTOR 的负调节作用则促进自噬。在自噬的诱导过程和终止中 mTOR 起着重要的作用。在自噬途径中期 mTOR 信号通路起到负调控作用,引起心肌细胞的损伤。研究表明马里昔下调 mTOR,其保护作用可能与调控自噬有关,具体机制有待进一步研究。



A. Ctrl; B. HG; C. HG+Met; D. HG+25 $\mu\text{mol/L}$ marein; E. HG+50 $\mu\text{mol/L}$ marein; F. HG+100 $\mu\text{mol/L}$ marein; [#] $P<0.05$, [#] $P<0.01$ compared with Ctrl; ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ compared with model.

图3 马里昔对 H9c2 细胞 mTOR 表达的影响

Fig 3 Effect of Marein on mTOR expression in H9c2 cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

参考文献:

- [1] Zhou H, Chen Y, Huang S, *et al.* Regulation of autophagy by tea polyphenols in diabetic cardiomyopathy [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2018, 19: 333. doi: 10.1631/jzus.B1700415.
- [2] Sybers HD, Ingwall J, DeLuca M. Autophagy in cardiac myocytes [J]. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Meta*, 1976, 12: 453-463.
- [3] Delbridge LMD, Mellor KM, Taylor DJ, *et al.* Myocardial stress and autophagy: mechanisms and potential therapies [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2017, 14: 412-425.
- [4] Onorati AV, Dyczynski M, Ojha R, *et al.* Targeting autophagy in cancer [J]. *Cancer*, 2018, 124: 3307-3318.
- [5] Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms [J]. *J Pathol*, 2010, 221: 3-12.
- [6] 崔桂丽. 自噬在高糖高脂对 H9c2 心肌细胞凋亡中的影响 [D]. 山西医科大学, 2017: 33-38.
- [7] Li T, Abula Z, Guo Y, *et al.* Marein regulates insulin resistance in diabetic nephropathy mice by inducing autophagy [J]. *Int J Morphol*, 2021, 39:.. doi: 10.4067/s0717-95022021000601635.
- [8] Liu P, Gan W, Chin YR, *et al.* PtdIns (3, 4, 5) P 3-dependent activation of the mTORC2 kinase complex [J]. *Cancer Discov*, 2015, 5: 1194-1209.
- [9] Grootaert MOJ, Roth L, Schrijvers DM, *et al.* Defective autophagy in atherosclerosis: to die or to senesce? [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: doi: 10.1155/2018/7687083.
- [10] Lusha E, Jiang H. Simvastatin protects high glucose-induced H9c2 cells from injury by inducing autophagy [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58: 1077. doi: 10.1080/13880209.2020.1839512.
- [11] Huang R, Liu W. Identifying an essential role of nuclear LC3 for autophagy [J]. *Autophagy*, 2015, 11: 852-853.
- [12] Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, *et al.* p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death [J]. *J Cell Biol*, 2005, 171: 603-614.