

# 活性氧与 ATP 敏感性钾通道的相互作用参与高糖对 H9c2 心肌细胞的损伤

梁伟杰<sup>1,2</sup>, 陈景福<sup>3</sup>, 宋明才<sup>1,2</sup>, 李健仪<sup>1,2</sup>, 郑东诞<sup>3</sup>, 张稳柱<sup>1,2</sup>, 潘玩莹<sup>4</sup>, 冯鉴强<sup>4</sup>, 廖新学<sup>5</sup>

(1. 广州市番禺区中心医院心血管内科, 2. 广州市番禺区心血管病研究所, 广东省广州市 511400; 中山大学附属第一医院黄埔院区 3. 心血管内科 CCU, 4. 麻醉科, 广东省广州市 510700; 5. 中山大学附属第一医院高血压血管病科, 广东省广州市 510080)

[关键词] 活性氧; ATP 敏感性钾通道; 相互作用; 高糖; 心肌细胞损伤

[摘要] **目的** 研究活性氧(ROS)和 ATP 敏感性钾通道( $K_{ATP}$ 通道)的相互作用在高糖(HG)引起的心肌细胞损伤中的作用。**方法** 应用 Western blot 检测心肌细胞  $K_{ATP}$  通道蛋白、Cleaved Caspase-3 的表达水平; 双氯荧光素染色荧光显微镜照相检测胞内 ROS 水平; 细胞计数盒测定心肌细胞存活率; Hoechst 33258 核染色荧光显微镜照相测定凋亡细胞数量的变化; JC-1 染色法测定线粒体膜电位。**结果** 应用高糖(35 mmol/L 葡萄糖)处理 H9c2 心肌细胞 24 h 能明显下调  $K_{ATP}$  通道蛋白的表达水平, 1000  $\mu\text{mol/L}$  N-乙酰半胱氨酸(ROS 清除剂)预处理心肌细胞 60 min 可阻断 HG 对心肌细胞  $K_{ATP}$  通道蛋白表达的下调作用。100  $\mu\text{mol/L}$  二氮嗪(线粒体  $K_{ATP}$  通道开放剂)和 50  $\mu\text{mol/L}$  吡拉地尔(非选择性  $K_{ATP}$  通道开放剂)预处理均显著抑制 HG 引起的心肌细胞 ROS 的堆积。1000  $\mu\text{mol/L}$  N-乙酰半胱氨酸、100  $\mu\text{mol/L}$  二氮嗪和 50  $\mu\text{mol/L}$  吡拉地尔均能抑制 HG 引起的心肌细胞损伤, 使细胞存活率升高, 凋亡细胞数量、Cleaved Caspase-3 表达及线粒体膜电位丢失减少。**结论** 在 HG 状态下, 心肌细胞的 ROS 和  $K_{ATP}$  通道存在相互作用, 两者在 HG 引起的心肌细胞损伤中发挥重要作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Interaction Between Reactive Oxygen Species and ATP-sensitive $K^+$ Channel Is Involved in High Glucose-induced Injury in H9c2 Cardiac Cells

LIANG Wei-Jie<sup>1,2</sup>, CHEN Jing-Fu<sup>3</sup>, SONG Ming-Cai<sup>1,2</sup>, LI Jian-Yi<sup>1,2</sup>, ZHENG Dong-Dan<sup>3</sup>, ZHANG Wen-Zhu<sup>1,2</sup>, PAN Wan-Ying<sup>4</sup>, FENG Jian-Qiang<sup>4</sup>, and LIAO Xin-Xue<sup>5</sup>

(1. Department of Cardiology, Central Hospital of Panyu District, 2. Institute of Cardiovascular Diseases of Panyu District, Guangzhou, Guangdong 511400, China; 3. Unit of Cardiac Care of Department of Cardiology, 4. Department of Anesthesiology, Huangpu Division of the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510700, China; 5. Department of Hypertension and Vascular Diseases, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[KEY WORDS] Reactive Oxygen Species; ATP-sensitive  $K^+$  Channel; Interaction; High Glucose; Cardiac Muscle Cell Injury

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the roles of the interaction between reactive oxygen species (ROS) and ATP-sensitive  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) channel in high glucose (HG)-induced cardiac muscle cells injury. **Methods** The expression levels of  $K_{ATP}$  channel protein and cleaved caspase-3 protein were determined by Western blot assay. The intracellular level of ROS was detected by 2',7-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) staining and fluorescence microscopy. The cell viability was measured by cell counter kit-8 (CCK-8) assay. The number of apoptotic cells was tested by Hoechst 33258 nuclear staining and photofluorography. Mitochondrial membrane potential (MMP) was examined by JC-1 staining.

**Results** After H9c2 cells were treated with 35 mmol/L glucose (high glucose, HG) for 24 h, the expression level of  $K_{ATP}$

[收稿日期] 2015-05-14

[修回日期] 2015-10-04

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81270296); 广东省财政科技项目(2014SC107)

[作者简介] 梁伟杰, 硕士, 主治医师, 研究方向为心血管介入和心血管疾病的保护机制, E-mail 为 279096515@qq.com。陈景福, 硕士, 医师, 研究方向为心血管疾病的损伤与保护机制, E-mail 为 chenjf\_gdmc@163.com。通讯作者廖新学, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为心血管疾病的损伤与保护机制, E-mail 为 liaoxinx@mail.sysu.edu.cn。

channel protein was significantly reduced. Pretreatment of the cells with 1000  $\mu\text{mol/L}$  N-acetyl-L cysteine (NAC, a scavenger of ROS) for 60 min before HG exposure obviously reduced the HG-induced inhibitory effect on the expression of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel protein. Meanwhile, pretreatment of the cells with 100  $\mu\text{mol/L}$  diazoxide (DZ, a mitochondrial  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel opener) or 50  $\mu\text{mol/L}$  pinacidil (Pin, a none-selective  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel opener) markedly inhibited HG-induced accumulation of intracellular ROS in cardiac cells. On the other hand, 1000  $\mu\text{mol/L}$  NAC, 100  $\mu\text{mol/L}$  DZ and 50  $\mu\text{mol/L}$  Pin obviously inhibited HG-induced cardiac muscle cells injury, leading to an increase in cell viability, a decrease in number of apoptotic cells, cleaved caspase-3 expression and MMP loss respectively. **Conclusion** In HG state, there is an interaction between ROS and  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel, which plays an important role in the HG-induced injury in cardiac muscle cells.

糖尿病心肌病 (diabetic cardiomyopathy, DCM) 是糖尿病重要的并发症之一,也是糖尿病患者死亡的主要原因。2004 年美国糖尿病学会 (American Diabetes Association, ADA) 年会提出,糖尿病及其慢性并发症有统一的发病机制,即高血糖损伤的共同基础——氧化应激<sup>[1]</sup>。氧化应激在 DCM 的发生发展中发挥重要作用。引起氧化应激的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 可直接损伤心肌细胞及血管内皮细胞,引起细胞凋亡,最终表现为心肌细胞功能障碍。然而,ROS 在 DCM 中损伤心肌细胞的具体机制目前尚未完全明了。因此,深入探讨这一学术问题对阐明 DCM 的发病机制有重大的意义。ATP 敏感性钾通道 (ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel,  $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) 是细胞内的代谢信号感受器,主要作用是将细胞的兴奋性与其新陈代谢偶联起来,从而参与血管的舒张、心肌的保护<sup>[2]</sup>、缺血预适应等活动。有研究表明,高血糖可通过损伤人血管内皮细胞的  $\text{K}_{\text{ATP}}$  通道而损伤血管,且 ROS 和  $\text{K}_{\text{ATP}}$  通道之间存在相互作用<sup>[3-4]</sup>。但是,在高糖 (high glucose, HG) 损伤心肌细胞中,ROS 和  $\text{K}_{\text{ATP}}$  通道之间是否也存在相互作用及这种作用对心肌细胞损伤的影响如何,目前仍鲜有报道。为此,本研究建立高糖损伤 H9c2 心肌细胞模型<sup>[5]</sup>,重点探讨:(1)ROS 和  $\text{K}_{\text{ATP}}$  通道两者在高糖损伤心肌细胞中的作用;(2)高糖损伤心肌细胞过程中,ROS 和  $\text{K}_{\text{ATP}}$  通道之间是否存在相互作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

抗  $\text{K}_{\text{ATP}}$  抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司 (美国);抗 Cleaved Caspase-3 抗体、N-乙酰半胱氨酸 (N-acetyl-L cysteine, NAC)、双氯荧光素 (2', 7'-dichlorfluorescein-diacetate, DCFH-DA)、Hoechst 33258 和 JC-1 购自 Sigma-Aldrich 公司 (美国);二氮嗪 (diazoxide, DZ) 和吡拉地尔 (pinacidil, Pin) 由 Cayman Chemical 公司 (美国) 供应;细胞计数试剂

盒 8 (cell counter kit-8, CCK-8) 购自 Dojindo Lab 公司 (日本);DMEM 培养基购自 Hyclone 公司 (美国);特级胎牛血清购自 Gibco BRL 公司 (美国)。H9c2 心肌细胞由中山大学实验动物中心提供。

### 1.2 细胞培养

H9c2 心肌细胞来源于大鼠胚胎期的心脏组织,培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 5%  $\text{CO}_2$ 、37 $^{\circ}\text{C}$  的温箱中培养。

### 1.3 实验分组

实验分为 8 组:①对照组 (Control 组):DMEM 培养基 (含 5.5 mmol/L 葡萄糖) 处理心肌细胞 24 h;②高糖组 (HG 组):35 mmol/L 葡萄糖处理 H9c2 心肌细胞 24 h;③NAC + HG 组:1000  $\mu\text{mol/L}$  NAC 作用心肌细胞 60 min,撤去,PBS 洗 2 次,接着 35 mmol/L 葡萄糖处理 24 h;④DZ + HG 组:100  $\mu\text{mol/L}$  DZ 作用心肌细胞 30 min,撤去,PBS 洗 2 次,接着 35 mmol/L 葡萄糖处理 24 h;⑤Pin + HG 组:50  $\mu\text{mol/L}$  Pin 作用心肌细胞 30 min,撤去,PBS 洗 2 次,接着 35 mmol/L 葡萄糖处理 24 h;⑥NAC 组:1000  $\mu\text{mol/L}$  NAC 作用心肌细胞 60 min,撤去,PBS 洗 2 次,接着 DMEM 培养基处理 24 h;⑦DZ 组:100  $\mu\text{mol/L}$  DZ 作用心肌细胞 30 min,撤去,PBS 洗 2 次,接着 DMEM 培养基处理 24 h;⑧Pin 组:50  $\mu\text{mol/L}$  Pin 作用心肌细胞 30 min,撤去,PBS 洗 2 次,接着 DMEM 培养基处理 24 h。

### 1.4 Western blot 检测 $\text{K}_{\text{ATP}}$ 通道和 Cleaved Caspase-3 蛋白

将 H9c2 心肌细胞接种于 35 mm 培养皿中,培养至 80% 满时,各实验组给予不同的处理因素后,用预冷的 PBS 洗 3 次,加入裂解液,4 $^{\circ}\text{C}$  静置 30 min,12000 r/min 离心 10 min,取上清,然后采用二喹啉甲酸法进行蛋白定量。总蛋白经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转移到二氟化树脂膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭 60 min,随后分别加入抗  $\text{K}_{\text{ATP}}$  和抗 Cleaved Caspase-3 (1:1000) 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$  过夜,然后用 TBST 洗 3 次,每次 5 min,与相应的二抗

(1:2500) 室温孵育 1.5 h, 用 TBST 洗 3 次, 每次 5 min。将二氟化树脂膜用增强化学发光法显色, 暗室曝光到 X 线片上, 凝胶成像系统扫描分析结果。重复 5 次。

### 1.5 DCFH-DA 染色测定胞内 ROS 水平

将 H9c2 心肌细胞接种于 24 孔培养板中, 当细胞生长到培养孔面积大约 80% 时, 经上述各实验组不同的处理因素后, PBS 冲洗 3 次, 用 10  $\mu\text{mol/L}$  DCFH-DA 染液于 37 $^{\circ}\text{C}$  温箱中孵育 30 min, 然后用 PBS 冲洗 3 次。在荧光显微镜 (TE-2000 Nikon, 日本) 下随机选取 5 个不重复区摄片, 用 Image J 1.47i 软件分析 5 个视野绿色荧光强度的平均值, 再对每组的各样本进行统计分析。重复 5 次。

### 1.6 CCK-8 测定细胞存活率

将 H9c2 心肌细胞接种于 96 孔培养板中, 当心肌细胞生长到占培养孔面积大约 80% 时, 按各分组因素处理后, 于每孔中加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 和 90  $\mu\text{L}$  DMEM, 轻摇, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2.5 h, 用酶标仪 ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) 记录各孔吸光度 (absorbance, A)。取 5 孔 A 值的平均数, 按下列公式计算细胞存活率: 细胞存活率 (%) = 处理组 A / 对照组 A  $\times 100\%$ , 重复 5 次。

### 1.7 Hoechst 33258 核染色检测细胞凋亡

将 H9c2 心肌细胞接种于 24 孔培养板中, 在细胞生长到占培养孔面积大约 80% 时, 按各分组因素处理后, 用 PBS 冲洗 3 次, 然后用 4% 多聚甲醛于 4 $^{\circ}\text{C}$  环境中固定 10 min, 加入含 5 mg/L Hoechst 33258 试剂, 于 37 $^{\circ}\text{C}$  温箱孵育 30 min。在荧光显微镜下摄片, 鉴别正常的心肌细胞和凋亡的心肌细胞, 随机选取视野摄片, 重复 5 次。

### 1.8 JC-1 染色测定线粒体膜电位

将 H9c2 心肌细胞接种于 24 孔培养板中, 当细胞生长到培养孔面积大约 80% 时, 上述各实验组经不同的处理因素作用后, 用 PBS 冲洗 3 次, 用 10  $\mu\text{g/L}$  JC-1 的无血清培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$  温箱中孵育 45 min, 然后用 PBS 冲洗 3 次。在荧光显微镜下随机选取 5 个不重复区摄片, 细胞核周围绿色的亮点即为摄取了 JC-1 的线粒体。用 Image J 1.47i 软件分析 5 个视野绿色荧光强度的平均值, 再对每组的各样本进行统计分析。重复 5 次。

### 1.9 统计学处理

实验数据用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 所有结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 用 SNK-q 进行均数之间的比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 高糖抑制心肌细胞 $\text{K}_{\text{ATP}}$ 通道蛋白的表达水平

应用 35 mmol/L 葡萄糖 (高糖, HG) 分别处理 H9c2 心肌细胞 1 ~ 24 h,  $\text{K}_{\text{ATP}}$  通道蛋白表达水平 6 h 时开始明显降低 ( $P < 0.01$ ), 9 h 时进一步降低 ( $P < 0.01$ ), 12 h 和 24 h 时降至最低水平 ( $P < 0.01$ )。以上结果表明, HG 能够抑制心肌细胞  $\text{K}_{\text{ATP}}$  通道蛋白的表达水平 (图 1)。

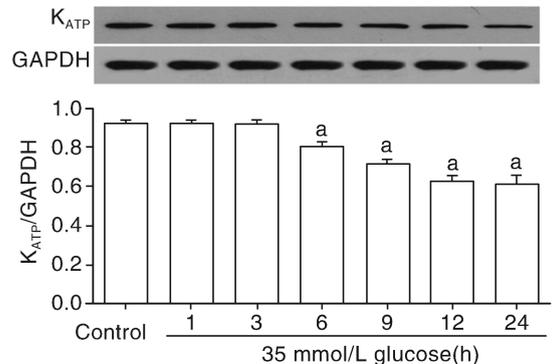


图 1. 高糖抑制心肌细胞  $\text{K}_{\text{ATP}}$  通道蛋白的表达水平 ( $n = 5$ )  
a 为  $P < 0.01$ , 与 Control 组比较。

Figure 1. High glucose inhibits the expression level of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel protein in cardiac cells ( $n = 5$ )

### 2.2 NAC 减弱高糖对心肌细胞 $\text{K}_{\text{ATP}}$ 通道蛋白表达的抑制

应用 HG 处理心肌细胞 24 h 后,  $\text{K}_{\text{ATP}}$  通道蛋白表达明显减少, 与对照组比较, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。但是, 在 HG 处理心肌细胞前, 应用 1000  $\mu\text{mol/L}$  NAC (ROS 清除剂) 预处理 60 min, 可使 HG 对  $\text{K}_{\text{ATP}}$  通道蛋白表达的抑制作用显著减弱, 与 HG 组比较, 差异显著 ( $P < 0.01$ )。1000  $\mu\text{mol/L}$  NAC 本身对心肌细胞  $\text{K}_{\text{ATP}}$  通道蛋白的基础表达水平无明显的影响。上述结果提示: ROS 清除剂可减弱 HG 对心肌细胞  $\text{K}_{\text{ATP}}$  通道蛋白表达的抑制 (图 2)。

### 2.3 $\text{K}_{\text{ATP}}$ 通道开放剂抑制高糖引起的心肌细胞 ROS 堆积

正常心肌细胞内存在少量的 ROS, 采用 HG 作用 H9c2 心肌细胞 24 h 可使胞内 DCFH-DA 的平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI; 能间接反映 ROS 水平) 明显增强, 与对照组相比, 差异显著 ( $P < 0.01$ ; 图 3A)。然而, 在 HG 处理心肌细胞前, 应用 100  $\mu\text{mol/L}$  DZ (线粒体  $\text{K}_{\text{ATP}}$  通道开放剂) 和 50  $\mu\text{mol/L}$  Pin (非选择性  $\text{K}_{\text{ATP}}$  通道开放剂) 预处理

H9c2 心肌细胞 30 min 均能显著地使胞内 ROS 堆积减少(图 3C、D),与 HG 组比较,差异非常明显( $P < 0.01$ )。单独应用 DZ 或 Pin 对心肌细胞 ROS 的基础水平无明显的影响。值得注意的是,线粒体  $K_{ATP}$  通道开放剂对 HG 致心肌细胞 ROS 堆积的抑制作用与非选择性  $K_{ATP}$  通道开放剂比较,两者无明显的差异( $P > 0.05$ )。上述结果提示: $K_{ATP}$  通道开放剂能抑制高糖引起的心肌细胞 ROS 的堆积(图 3)。

#### 2.4 NAC 及 $K_{ATP}$ 通道开放剂抑制高糖引起的心肌细胞毒性

应用 1000  $\mu\text{mol/L}$  NAC 预处理 H9c2 心肌细胞 60 min 能明显抑制 HG 引起的心肌细胞毒性,提高细胞存活率( $P < 0.01$ );1000  $\mu\text{mol/L}$  NAC 本身对心肌细胞存活率无显著影响。与 NAC 的作用相类似,应用 0.06、0.08、0.10、0.12、0.14、0.16 mmol/L DZ 预处理 H9c2 心肌细胞 30 min 也明显抑制 HG 引起的心肌细胞毒性,提高细胞存活率( $P < 0.05$ );0.06 ~ 0.16 mmol/L DZ 本身对心肌细胞存活率无显著影响。另一方面,应用 0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08 mmol/L Pin 预处理 H9c2 心肌细胞 30 min 均能明显抑制 HG 引起的心肌细胞毒性,使细

胞存活率升高,与 HG 组比较,均具有统计学意义(均  $P < 0.01$ );0.03 ~ 0.08 mmol/L Pin 本身对心肌细胞的存活率无明显影响。值得注意的是,线粒体  $K_{ATP}$  通道开放剂对抗 HG 细胞毒性的作用与非选择性  $K_{ATP}$  通道开放剂比较,两者无明显差异( $P > 0.05$ )。以上结果表明:ROS 清除剂和  $K_{ATP}$  通道开放剂均能抑制高糖引起的心肌细胞毒性(图 4)。

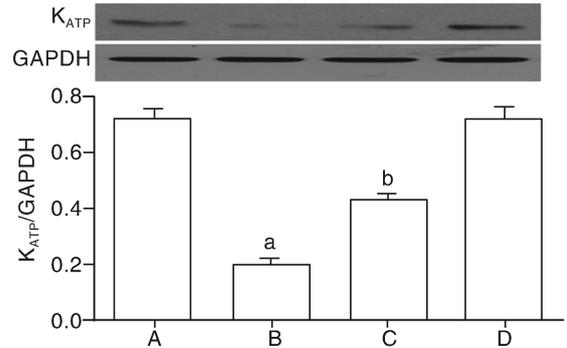


图 2. NAC 减弱高糖对心肌细胞  $K_{ATP}$  通道蛋白表达的抑制作用( $n = 5$ ) A 为对照组, B 为高糖组, C 为 NAC + HG 组, D 为 NAC 组。a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与高糖组比较。

Figure 2. NAC ameliorates the HG-induced inhibitory effect on  $K_{ATP}$  channel protein expression ( $n = 5$ )

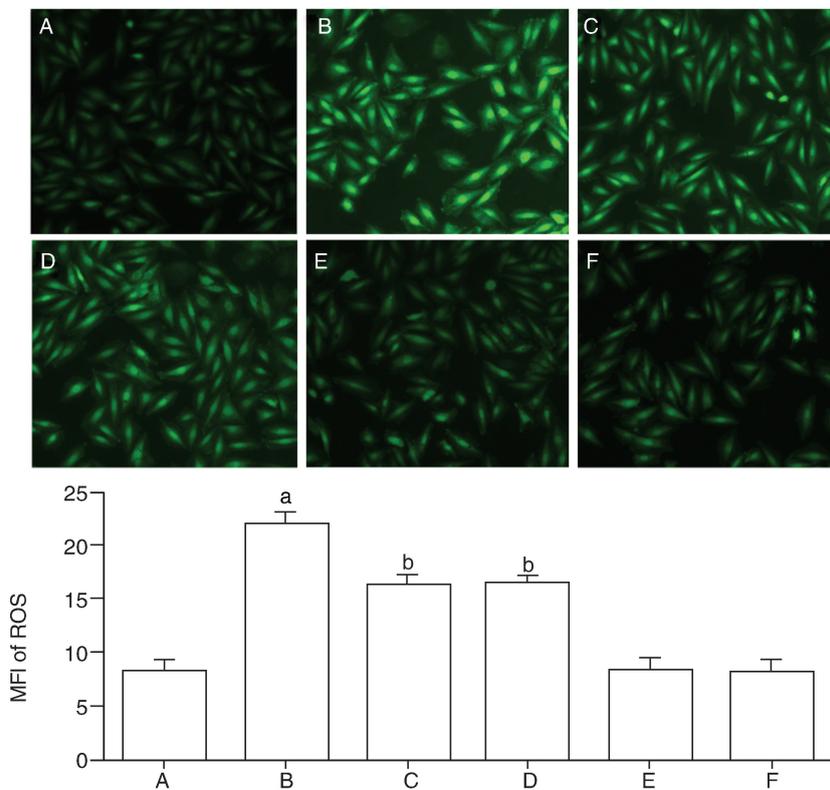


图 3.  $K_{ATP}$  通道开放剂抑制高糖引起的心肌细胞 ROS 堆积作用( $n = 5$ ) 显微镜图放大倍数为 200 倍。A 为对照组, B 为高糖组, C 为 DZ + HG 组, D 为 Pin + HG 组, E 为 DZ 组, F 为 Pin 组。a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与高糖组比较。

Figure 3.  $K_{ATP}$  channel openers inhibit HG-induced accumulation of intracellular ROS in cardiac cells ( $n = 5$ )

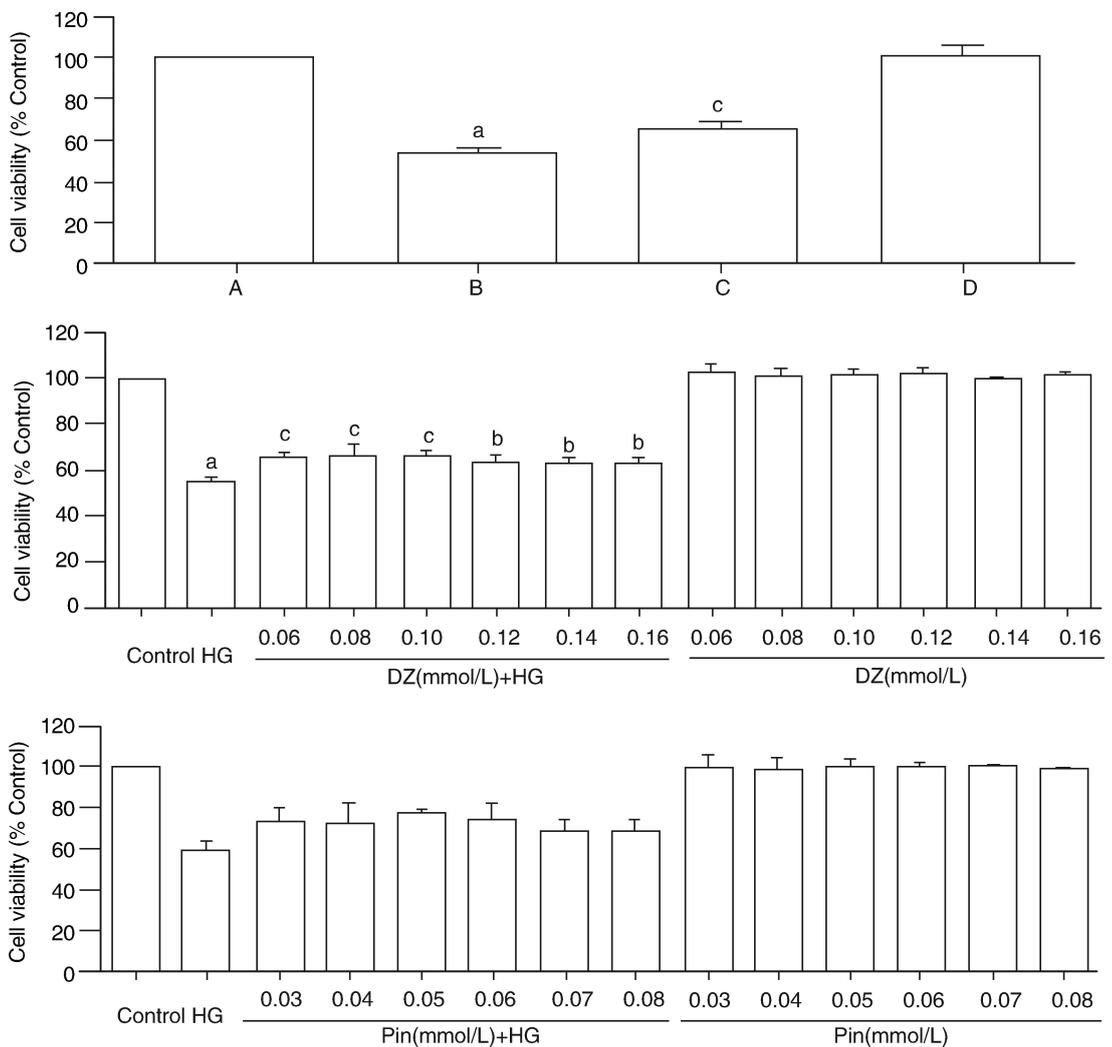


图 4. NAC 及  $K_{ATP}$  通道开放剂抑制高糖引起的心肌细胞毒性作用 ( $n=5$ ) A 为对照组, B 为高糖组, C 为 NAC + HG 组, D 为 NAC 组。a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , c 为  $P < 0.01$ , 与高糖组比较。

Figure 4. NAC and  $K_{ATP}$  channel openers inhibit HG-induced cytotoxicity in cardiac cells ( $n=5$ )

## 2.5 NAC 及 $K_{ATP}$ 通道开放剂减弱高糖的致心肌细胞凋亡作用

Hoechst 核染色检测结果显示, 正常 H9c2 心肌细胞染色质分布均匀, 呈现出弥散均匀的低密度荧光。但是, 应用 HG 处理心肌细胞 24 h 后, 呈现典型凋亡特征 (即细胞核呈浓缩致密的固缩形态或颗粒荧光) 的细胞数量增多, 与对照组比较, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。然而, 1000  $\mu\text{mol/L}$  NAC 预处理 H9c2 心肌细胞 60 min 能显著减少凋亡细胞的数量, 与 HG 组比较, 差异非常明显 ( $P < 0.01$ )。与 NAC 的抗凋亡作用相似, 应用 100  $\mu\text{mol/L}$  DZ 和 50  $\mu\text{mol/L}$  Pin 预处理 H9c2 心肌细胞 30 min 均能显著减少凋亡细胞的数量, 与 HG 组比较, 差异非常明显 ( $P < 0.01$ )。值得注意的是, 线粒体  $K_{ATP}$  通道

开放剂对 HG 致心肌细胞凋亡的抑制作用与非选择性  $K_{ATP}$  通道开放剂比较, 两者无明显的差异 ( $P > 0.05$ )。另一方面, HG 处理心肌细胞 24 h 能明显增加 Cleaved Caspase-3 (为凋亡效应器) 的表达水平 ( $P < 0.01$ ), 而 NAC 预处理心肌细胞能抑制 HG 对 Cleaved Caspase-3 表达的上调作用; 与 NAC 的作用相似, 100  $\mu\text{mol/L}$  DZ 和 50  $\mu\text{mol/L}$  Pin 预处理 H9c2 心肌细胞 30 min 也能抑制 HG 对 Cleaved Caspase-3 表达的促进作用。一系列结果提示: ROS 清除剂和  $K_{ATP}$  通道开放剂均能减弱高糖的致心肌细胞凋亡作用 (图 5)。

## 2.6 NAC 及 $K_{ATP}$ 通道开放剂减少高糖引起的心肌细胞线粒体膜电位丢失

MFI 是反映线粒体膜电位 (mitochondrial mem-

brane potential, MMP) 大小的指标。采用 HG 作用 H9c2 心肌细胞 24 h 可使胞内 JC-1 的 MFI 降低至  $51.10\% \pm 0.07\%$ , 与对照组 ( $78.60\% \pm 0.62\%$ ) 比较, 差异非常显著 ( $P < 0.01$ )。然而,  $1000 \mu\text{mol/L}$  NAC 预处理 H9c2 心肌细胞 60 min 可明显减少 MMP 丢失, 使 MFI 升高至  $70.01\% \pm 0.30\%$ , 与 HG 组比较, 差异非常显著 ( $P < 0.01$ )。与 NAC 的 MMP 保护作用相似,  $100 \mu\text{mol/L}$  DZ 和  $50 \mu\text{mol/L}$  Pin 预

处理 H9c2 心肌细胞 30 min 均能对抗 HG 对心肌细胞线粒体的损伤, 使 MFI 分别增加至  $67.10\% \pm 0.15\%$  和  $67.20\% \pm 0.25\%$  ( $P < 0.01$ )。分别单独应用  $1000 \mu\text{mol/L}$  NAC、 $100 \mu\text{mol/L}$  DZ 和  $50 \mu\text{mol/L}$  Pin 预处理对心肌细胞的 MMP 大小无显著影响。这一实验结果表明: ROS 清除剂和  $K_{\text{ATP}}$  通道开放剂能减少高糖引起的心肌细胞 MMP 丢失 (图 6)。

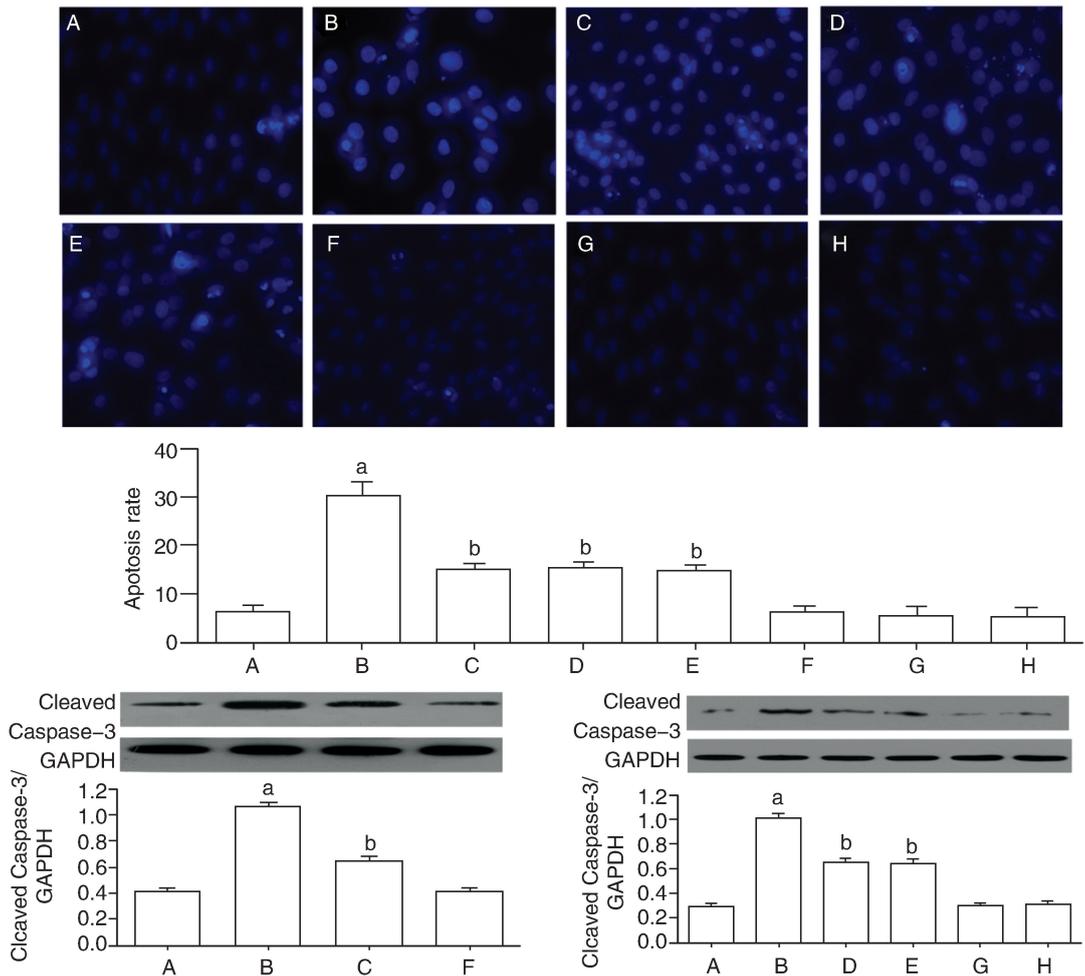


图 5. NAC 及  $K_{\text{ATP}}$  通道开放剂减弱高糖的致心肌细胞凋亡作用 ( $n = 5$ ) 显微镜图放大倍数为 200 倍。A 为对照组, B 为高糖组, C 为 NAC + HG 组, D 为 DZ + HG 组, E 为 Pin + HG 组, F 为 NAC 组, G 为 DZ 组, H 为 Pin 组。a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与高糖组比较。

Figure 5. NAC and  $K_{\text{ATP}}$  channel openers reduce HG-induced apoptotic effect in cardiac cells ( $n = 5$ )

### 3 讨论

高血糖被认为是引起糖尿病心血管并发症如 DCM 的重要始动因子。本研究在 HG 损伤 H9c2 心肌细胞的实验模型中, 证实 HG 能引起心肌细胞出现多种损伤, 表现为细胞存活率降低 (细胞毒性作用), 凋亡细胞数量、Cleaved Caspase-3 表达和 ROS (氧化应激) 生成增多, MMP 丢失 (线粒体受损), 这

与我们此前的报道<sup>[5-9]</sup>相一致。

越来越多的证据表明: 高血糖、氧化应激与 DCM 之间的关系非常密切。因此, 深入研究糖尿病的氧化应激机制, 将为糖尿病并发症的预防和治疗提供新的方向和思路。氧化应激是 DCM 发病的重要机制之一<sup>[10]</sup>, 但是, 氧化应激产生过多的 ROS 引起心肌细胞损伤的具体机制, 目前尚未完全清楚。为此, 本研究观察了 ROS 清除剂 NAC 对 HG 损伤心

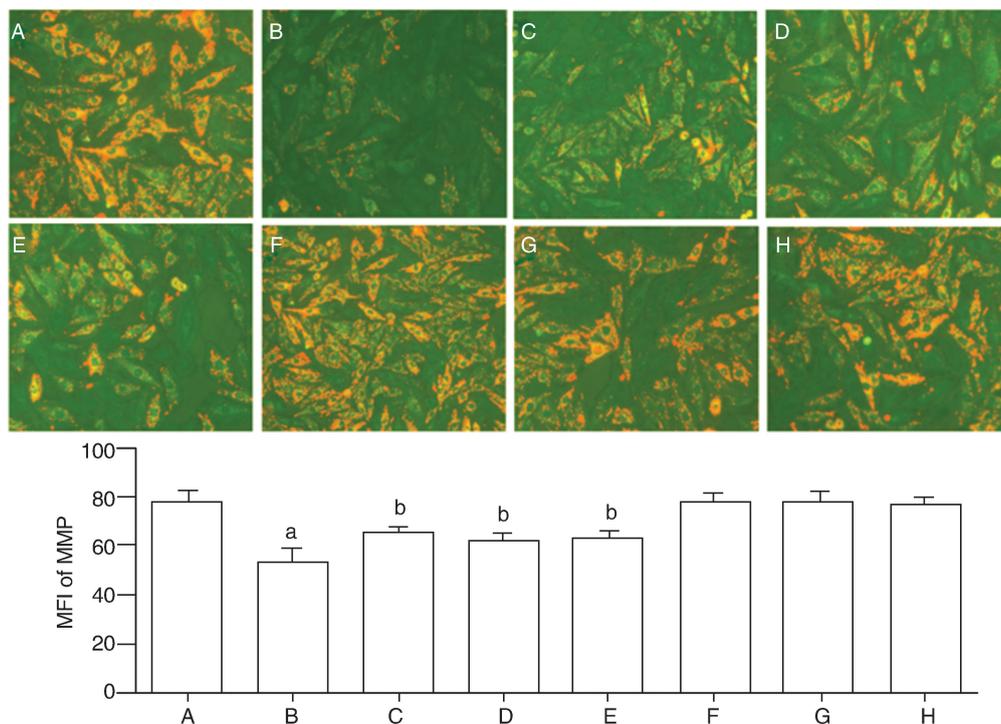


图 6. NAC 和  $K_{ATP}$  通道开放剂减少高糖引起的心肌细胞 MMP 丢失 ( $n = 5$ ) 显微镜图放大倍数为 200 倍。A 为对照组, B 为高糖组, C 为 NAC + HG 组, D 为 DZ + HG 组, E 为 Pin + HG 组, F 为 NAC 组, G 为 DZ 组, H 为 Pin 组。a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与高糖组比较。

Figure 6. NAC and  $K_{ATP}$  channel openers ameliorate HG-induced loss of MMP in cardiac cells ( $n = 5$ )

肌的影响, 结果发现: 应用 NAC 预处理心肌细胞, 能显著减轻 HG 对心肌细胞的多种损伤作用, 表现为使细胞存活率升高, 凋亡细胞数量、Cleaved Caspase-3 表达水平、MMP 丢失减少等, 清晰地提示 ROS 介导 HG 引起的细胞毒性、致凋亡及线粒体损伤等作用, 这为深入阐明 ROS 在糖尿病心肌损伤中的作用提供了新的实验依据。

$K_{ATP}$  通道是一种受细胞内 ATP 浓度调控的内向整流钾通道, 它于 1983 年被 Noma 首先在心肌细胞发现<sup>[11]</sup>。 $K_{ATP}$  通道按照其存在的部位可分为: 细胞膜上的  $K_{ATP}$  通道和线粒体内膜上的  $K_{ATP}$  通道。研究表明:  $K_{ATP}$  通道大量存在于心血管组织中, 发挥重要的生理和病理生理作用<sup>[12]</sup>。但是, 高血糖能否影响心肌细胞  $K_{ATP}$  通道, 继而引起心肌细胞损伤尚未完全清楚。为了探讨此重要的学术问题, 本研究首先观察高糖对 H9c2 心肌细胞  $K_{ATP}$  通道蛋白表达的影响; 结果表明, HG 明显抑制 H9c2 心肌细胞  $K_{ATP}$  通道蛋白的表达, 提示高糖可通过抑制  $K_{ATP}$  通道继而损伤心肌细胞。为了验证这个推断, 本研究进一步探讨了线粒体  $K_{ATP}$  通道开放剂 DZ 和非选择性  $K_{ATP}$  通道开放剂 Pin (既激活细胞膜  $K_{ATP}$  通道, 又激活线粒体  $K_{ATP}$  通道) 对高糖诱导的心肌细胞毒性、细胞

凋亡、氧化应激及线粒体损伤 (MMP 丢失) 的作用。结果表明, DZ 和 Pin 均能明显抑制高糖引起的心肌细胞毒性 (即降低细胞存活率)、致凋亡、氧化应激及线粒体损伤作用; 而且这两种  $K_{ATP}$  通道开放剂的心肌细胞保护作用没有明显差异, 提示: ①抑制  $K_{ATP}$  通道活动可能是高糖引起心肌细胞毒性、致凋亡作用、氧化应激及线粒体损伤的机制之一; ②线粒体  $K_{ATP}$  通道的开放可能在抑制高糖引起的心肌细胞损伤中起着更重要的作用, 但是, 要证实这一点, 需要进一步观察细胞膜  $K_{ATP}$  通道开放剂的作用, 并与线粒体  $K_{ATP}$  通道开放剂的作用比较。最近, Bian 等<sup>[13]</sup>报道, 线粒体  $K_{ATP}$  通道和细胞膜  $K_{ATP}$  通道介导缺血预处理引起的心肌保护作用, 本文的研究结果与他们的相类似, 提示  $K_{ATP}$  通道能保护心肌细胞对抗高糖引起的上述多种损伤。

重要的是, 我们还探讨了 ROS 和  $K_{ATP}$  通道之间的相互作用关系。实验结果证实: 应用 ROS 的清除剂 NAC 预处理心肌细胞能使 HG 对  $K_{ATP}$  通道蛋白表达的抑制作用显著减弱, 提示 HG 可通过增加 ROS 生成, 继而抑制  $K_{ATP}$  通道的活动而引起心肌损伤; 另一方面, 应用线粒体  $K_{ATP}$  通道开放剂和非选择性  $K_{ATP}$  通道开放剂预处理 H9c2 心肌细胞均能显

著减少细胞内 ROS 堆积,提示 HG 可通过损伤  $K_{ATP}$  通道,继而使 ROS 的生成增加。因此,本研究有力地证实:在 HG 损伤心肌细胞的过程中,ROS 和  $K_{ATP}$  通道之间存在相互作用,即 ROS 能损伤  $K_{ATP}$  通道,而  $K_{ATP}$  通道的激活也抑制 ROS 的生成增加;ROS 和  $K_{ATP}$  通道之间的相互作用可能是 HG 损伤心肌细胞的一种新机制。这将有助于深入阐明高血糖对心血管的损伤作用。然而,ROS 和  $K_{ATP}$  通道之间通过什么分子机制产生相互作用,尚需要更多的研究。

综上所述,本研究证实,高糖可通过产生大量的 ROS 和抑制  $K_{ATP}$  通道功能,从而损伤心肌细胞;ROS 和  $K_{ATP}$  通道存在相互作用,两者在 HG 引起的 H9c2 心肌细胞损伤中发挥重要作用。

#### [参考文献]

- [1] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism [J]. *Diabetes*, 2005, 54 (6): 1 615-625.
- [2] Ardehali H, O'Rourke B. Mitochondrial  $K_{ATP}$  channels in cell survival and death[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 39 (1): 7-16.
- [3] Bisseling TM, Versteegen MG, van der Wal S, et al. Impaired  $K_{ATP}$  channel function in the fetoplacental circulation of patients with type 1 diabetes mellitus[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 192(3): 973-979.
- [4] Kinoshita H, Matsuda N, Kaba H, et al. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt and NADPH oxidase in adenosine 5'-triphosphate-sensitive  $K^+$  channel function impaired by high glucose in the human artery[J]. *Hypertension*, 2008, 52(3): 507-513.
- [5] Xu W, Wu W, Chen J, et al. Exogenous hydrogen sulfide protects H9c2 cardiac cells against high glucose-induced injury by inhibiting the activities of the p38 MAPK and ERK1/2 pathways [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32 (4): 917-925.
- [6] Chen J, Mo H, Guo R, et al. Inhibition of the leptin-induced activation of the p38 MAPK pathway contributes to the protective effects of naringin against high glucose-induced injury in H9c2 cardiac cells [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(3): 605-612.
- [7] 刘付贞, 潘德茂, 陈景福, 等. 柚皮苷通过抑制 STAT3 通路保护 H9c2 心肌细胞对抗高糖引起的损伤[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(4): 345-350.
- [8] 梁伟杰, 陈景福, 宋明才, 等. 血管紧张素-(1-7)/Mas 受体轴通过调控 NF- $\kappa$ B 通路保护心肌细胞对抗高糖诱导的损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31 (2): 267-273.
- [9] Zhuang XD, Hu X, Long M, et al. Exogenous hydrogen sulfide alleviates high glucose-induced cardiotoxicity via inhibition of leptin signaling in H9c2 cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 391(1-2): 147-155.
- [10] 余美华, 蒋文艳, 张瑶, 等. 褪黑素通过抑制 ROS 改善胰岛素抵抗 HepG2 细胞糖代谢 [J]. *中南医学科学杂志*, 2014, 42(5): 433-435.
- [11] Noma A. ATP-regulated  $K^+$  channels in cardiac muscle [J]. *Nature*, 1983, 305(5930): 147-148.
- [12] Nichols CG, Lederer WJ. Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system [J]. *Am J Physiol*, 1991, 261(6 Pt 2): H1 675-686.
- [13] Bian JS, Yong QC, Pan TT, et al. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 316(2): 670-678.

(此文编辑 曾学清)