

硫化氢通过抑制 ROS-TLR4 通路对抗高糖诱导的 H9c2 心肌细胞损伤和炎症反应

梁伟杰^{1,2}, 何洁仪^{1,2}, 黄惠敏^{1,2}, 陈君^{1,2}, 余盛龙^{1,2}, 程飞^{3,4}, 冯鉴强^{3,4}, 兰军^{3,4}

(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疾病研究所,广东省广州市 511400;
3.东莞市第三人民医院心血管内科,4.东莞市心血管疾病研究所,广东省东莞市 523326)

[关键词] 硫化氢; 活性氧; Toll 样受体 4; 高糖; 心肌细胞损伤; 炎症反应

[摘要] **目的** 探讨外源性硫化氢(H₂S)能否通过抑制活性氧(ROS)-Toll 样受体 4(TLR4)通路对抗高糖诱导的 H9c2 心肌细胞损伤和炎症反应。**方法** 应用细胞计数盒(CCK-8)检测细胞存活率,用试剂盒检测细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)活性,ELISA 检测细胞培养液中白细胞介素 1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的水平,Hoechst 33258 核染色荧光显微镜照相法测定凋亡细胞数量,Western blot 测定 TLR4 和 Cleaved Caspase 3 蛋白的表达水平,双氯荧光素染色荧光显微镜照相法测定细胞内 ROS 水平,罗丹明 123 染色荧光显微镜照相法检测线粒体膜电位(MMP)。**结果** 应用 35 mmol/L 葡萄糖(高糖)作用 H9c2 心肌细胞 24 h 能上调 TLR4 的表达水平。在高糖作用前,应用 1000 μ mol/L N-乙酰半胱氨酸(NAC)预处理 60 min 或 400 μ mol/L 硫化氢(NaHS)预处理 30 min 能明显减轻高糖对 TLR4 蛋白表达的上调作用。高糖作用心肌细胞 24 h 可引起心肌细胞损伤和炎症反应,使细胞存活率降低,LDH 活性、凋亡细胞数量、Cleaved Caspase 3 蛋白的表达、ROS 生成、MMP 丢失及 IL-1 β 和 TNF- α 的分泌增加;400 μ mol/L NaHS 预处理心肌细胞 30 min 后再予高糖作用 24 h 或 30 μ mol/L TAK-242(TLR4 抑制剂)和高糖共处理心肌细胞 24 h 能显著拮抗高糖引起的上述损伤和炎症反应。**结论** 外源性 H₂S 可通过抑制 ROS-TLR4 通路对抗高糖诱导的 H9c2 心肌细胞损伤和炎症反应。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Hydrogen Sulfide Protects Against High Glucose-induced H9c2 Cardiomyocyte Injury and Inflammatory Response by Inhibiting ROS-TLR4 Pathway

LIANG Wei-Jie^{1,2}, HE Jie-Yi^{1,2}, HUANG Hui-Min^{1,2}, CHEN Jun^{1,2}, YU Sheng-Long^{1,2}, CHENG Fei^{3,4}, FENG Jian-Qiang^{3,4}, and LAN Jun^{3,4}

(1.Department of Cardiology, Central Hospital of Panyu District, 2.Cardiovascular Institute of Panyu District, Guangzhou, Guangdong 511400, China; 3.Department of Cardiology, the Third People's Hospital of Dongguan City, 4.Cardiovascular Institute of Dongguan City, Dongguan, Guangdong 523326, China)

[KEY WORDS] Hydrogen Sulfide; Reactive Oxygen Species; Toll-like Receptor 4; High Glucose; Cardiomyocyte Injury; Inflammation Response

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether exogenous hydrogen sulfide (H₂S) protects against high glucose (HG)-induced H9c2 cardiomyocyte injury and inflammation response by inhibiting reactive oxygen species (ROS)-Toll-like receptor 4 (TLR4) pathway. **Methods** Cell counter kit-8 (CCK-8) assay was used to measure the cell viability, the activity of lactate dehydrogenase (LDH) in the culture medium was measured with commercial kits, the levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by ELISA, the number of apoptotic cells was observed by Hoechst 33258 nuclear staining followed by photofluorography, the expression levels of TLR4 and Cleaved Caspase 3 were determined by Western blot, the intracellular level of ROS was detected by 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-

[收稿日期] 2016-04-11

[修回日期] 2016-05-14

[基金项目] 广东省自然科学基金资助项目(2015A030313690);番禺区科技计划项目(2015-Z03-57)

[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。何洁仪,学士,医师,研究方向为心血管疾病的损伤机制,E-mail 为 1018748490@qq.com。通讯作者兰军,硕士,主任医师,研究方向为心血管介入和心血管疾病的损伤与保护机制,E-mail 为 dgsdsrmyylj@126.com。

DA) staining followed by photofluorography, mitochondrial membrane potential (MMP) was examined by Rhodamine 123 staining followed by photofluorography. **Results** After H9c2 cardiac cells were exposed to 35 mmol/L glucose (HG) for 24 h, the expression level of TLR4 was significantly increased. Pre-treatment of the cells with 1000 $\mu\text{mol/L}$ N-acetyl-L-cysteine (NAC) for 60 min or with 400 $\mu\text{mol/L}$ sodium hydrogen sulfide (NaHS) for 30 min before HG exposure considerably attenuated the up-regulation of TLR4 expression level induced by HG. HG induced considerable injuries and inflammatory response, leading to a decrease in cell viability, increases in the activity of LDH, the number of apoptotic cells, the expression of Cleaved Caspase 3, ROS generation, MMP loss as well as the secretion levels of IL-1 β and TNF- α . Pre-treatment of the cells with 400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS for 30 min before HG exposure or co-treatment of the cells with 30 $\mu\text{mol/L}$ TAK-242 (an inhibitor of TLR4) and HG for 24 h obviously reduced the above injuries and inflammatory response induced by HG. **Conclusion** Exogenous H₂S protects against the HG-induced H9c2 cardiomyocyte injury and inflammation response by inhibiting ROS-TLR4 pathway.

越来越多的证据表明,高血糖是导致糖尿病所有心血管并发症如冠心病、糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)发生的最主要病理生理机制之一。高血糖引起心血管损伤的机制是多方面的,包括炎症反应、氧化应激、心肌细胞死亡、激活多个信号分子通路等^[1-6]。研究表明,在 DCM 患者或动物模型中,高血糖激活的炎症相关信号分子如 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、核因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB),伴随着大量炎症细胞因子如白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的分泌,最终导致心肌慢性炎症发生^[1-2,7]。TLR4 是 Toll 样受体家族中的重要成员,在心肌细胞中有大量的表达^[8],是启动炎症反应的关键信号分子。有研究指出,高血糖可激活 TLR4 从而诱导心肌细胞炎症发生^[9],但激活的 TLR4 能否引起心肌细胞凋亡、线粒体功能受损等损伤,目前尚未完全清楚。氧化应激是高血糖引起心肌细胞损伤的另一个重要机制。氧化应激过程中产生过多的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 可通过活化 NF- κB 通路^[10]、诱导细胞凋亡^[4,11]、损伤 ATP 敏感性钾通道 (ATP-sensitive K⁺ channel, KATP)^[4] 从而损伤心肌。然而,ROS 能否激活 TLR4 通路,迄今未见报道。硫化氢 (hydrogen sulfide, H₂S) 是一种新型气体信号分子,其在糖尿病心血管并发症中的防治作用得到了越来越多的研究证实^[5,12-13]。有研究指出,H₂S 可通过抑制 TLR4 对抗下肢缺血再灌注诱导的肺继发性损伤^[14]。然而,H₂S 能否通过调控 TLR4 通路对抗高糖诱导的心肌细胞损伤和炎症反应,目前尚未有报道。因此,本研究建立高糖损伤 H9c2 心肌细胞模型^[12],旨在探讨 ROS 和 TLR4 通路的关系、TLR4 通路在高糖损伤心肌细胞中的作用以及 H₂S 能否通过抑制

ROS-TLR4 通路对抗高糖诱导的心肌细胞损伤和炎症反应。

1 材料和方法

1.1 材料

罗丹明 123 (Rhodamine 123, Rh123)、N-乙酰半胱氨酸 (N-acetyl-L-cysteine, NAC)、Hoechst 33258 荧光染料、硫化钠 (sodium hydrogen sulfide, NaHS)、双氯荧光素 (2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate, DCFH-DA)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒和抗 Cleaved Caspase 3 抗体由 Sigma-Aldrich 公司供应;细胞计数试剂盒 8 (cell counter kit-8, CCK-8) 由 Dojindo Lab 提供;抗 TLR4 抗体购自 Abcam 公司;TAK-242 (TLR4 抑制剂) 购自 Invivogen 公司;DMEM 培养基购自 Hyclone 公司;IL-1 β 和 TNF- α ELISA 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司;特级胎牛血清购自 Gibco BRL 公司。H9c2 心肌细胞来源于胚胎期大鼠心脏组织的亚克隆细胞系,由中山大学实验动物中心提供。

1.2 细胞培养

H9c2 心肌细胞接种于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,置于含有 5% CO₂ 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中传代培养,待细胞生长至汇合度约 80% 时用于实验。

1.3 实验分组

实验分为 8 组:①对照组:DMEM (葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L) 处理心肌细胞 24 h;②高糖组:35 mmol/L 葡萄糖处理 H9c2 心肌细胞 24 h;③NaHS+高糖组:400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 作用心肌细胞 30 min, PBS 液洗 2 次,再予高糖处理 24 h;④TAK-242+高糖组:30 $\mu\text{mol/L}$ TAK-242 与高糖共处理心肌细胞 24 h;⑤NAC+高糖组:1000 $\mu\text{mol/L}$ NAC 作用心肌细胞 60 min, PBS 液洗 2 次,再予高糖处理 24 h;⑥

NaHS 组:400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 作用心肌细胞 30 min, PBS 液洗 2 次,再予 DMEM 处理 24 h;⑦ TAK-242 组:30 $\mu\text{mol/L}$ TAK-242 与 DMEM 共处理心肌细胞 24 h;⑧ NAC 组:1000 $\mu\text{mol/L}$ NAC 作用心肌细胞 60 min, PBS 液洗 2 次,再予 DMEM 处理 24 h。

1.4 Western blot 检测 TLR4 和 Cleaved Caspase 3 蛋白的表达水平

H9c2 心肌细胞在培养皿中生长至汇合度约 80% 时,按照分组给予相应处理后,弃上清, PBS 液洗 3 次,加入细胞裂解液并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上作用 30 min,高速离心后收集上清液,二喹啉甲酸法测定蛋白质含量。等量蛋白经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转移至二氟化树脂膜上,常温下 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入浓度为 1:1000 的兔抗鼠 TLR4、Cleaved Caspase 3 或 GAPDH 抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,经预冷的 TBST 洗涤后加入浓度为 1:2500 的二抗稀释液,室温下作用 90 min 后再予 TBST 洗涤 15 min,用增强化学发光法使二氟化树脂膜显色,暗室中条带曝光至 X 线片上,凝胶成像扫描系统分析结果。实验重复 5 次。

1.5 CCK-8 测定细胞存活率

H9c2 心肌细胞在 96 孔板中生长至汇合度约 80% 时,按分组给予相应处理后, PBS 洗 3 次,每孔中加入含 10% CCK-8 的无血清培养基 100 μL ,培养箱内孵育 120 min,利用酶标仪测定各孔在 450 nm 波长处的吸光度 (absorbance, A) 值。细胞存活率 = 处理组 A 值 / 对照组 A 值 $\times 100\%$ 。实验重复 5 次。

1.6 细胞培养液中 LDH 活性检测

H9c2 心肌细胞在 96 孔板中生长至汇合度约 80% 时,按分组给予相应处理后,严格按照 LDH 试剂盒说明书步骤检测并计算培养液中 LDH 活性。实验重复 5 次。

1.7 Hoechst 33258 核染色荧光显微镜照相检测凋亡细胞数量

H9c2 心肌细胞在 24 孔板中生长至汇合度约 80% 时,按分组给予相应处理后, PBS 洗 3 次,多聚甲醛固定 10 min,随后 Hoechst 33258 染料作用 30 min,再予 PBS 洗 3 次。荧光显微镜 (TE-2000 Nikon, 日本) 下可观察到:正常心肌细胞核呈弥散均匀低密度荧光,凋亡细胞则表现为细胞核呈浓缩致密的颗粒块状荧光。随机照片记录 5 个高倍镜视野,应用 Image J 1.47i 图像分析软件计算蓝色荧光的平均荧光强度 (mean fluorescent intensity, MFI),

并进行数据分析统计。实验重复 5 次。

1.8 DCFH-DA 染色荧光显微镜照相检测细胞内 ROS 水平

H9c2 心肌细胞在 24 孔板中生长至汇合度约 80% 时,按分组给予相应处理后, PBS 洗 3 次,加入 DCFH-DA 染液作用 30 min,再予 PBS 洗 3 次。荧光显微镜下随机照片,记录 5 个高倍镜视野,应用 Image J 1.47i 图像分析软件计算绿色荧光的 MFI (数值大小能间接反映 ROS 水平的高低),并进行数据统计分析。实验重复 5 次。

1.9 Rh123 染色荧光显微镜照相检测线粒体膜电位

H9c2 心肌细胞在 24 孔板中生长至汇合度约 80% 时,按分组给予相应处理后, PBS 洗 3 次,加入 Rh123 缓冲液作用 30 min,再予 PBS 洗 3 次。摄取 Rh123 的心肌细胞在荧光显微镜下可发出绿色荧光,当线粒体功能受损时荧光强度减弱或消失。随机照片记录 5 个高倍镜视野,应用 Image J 1.47i 图像分析软件计算绿色荧光的 MFI,并进行数据统计分析。实验重复 5 次。

1.10 ELISA 检测细胞培养液中 IL-1 β 和 TNF- α 水平

H9c2 心肌细胞在 96 孔板中生长至汇合度约 80% 时,按分组给予相应处理后,收集上清液作待测标本。ELISA 操作流程按试剂盒说明书进行,在终止显色反应后,利用酶标仪测定各孔在 450 nm 波长处的 A 值。取 5 孔 A 值的平均数,根据以下公式计算 IL-1 β 和 TNF- α 的诱导释放率:处理组 A 值 / 对照组 A 值 $\times 100\%$ 。实验重复 5 次。

1.11 统计学分析

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, SNK-q 检验用于多个样本均数间的两两比较, One-way ANOVA 用于多个样本均数间的比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ROS 清除剂减弱高糖对心肌细胞 TLR4 表达的促进作用

高糖作用 H9c2 心肌细胞 24 h 明显促进 TLR4 的表达 ($P < 0.01$);在高糖作用前,应用 1000 $\mu\text{mol/L}$ NAC (ROS 清除剂) 预处理心肌细胞 60 min,明显减弱高糖对 TLR4 表达的促进作用 ($P < 0.01$);1000 $\mu\text{mol/L}$ NAC 本身对心肌细胞 TLR4 的基础表达无明显影响 (图 1)。

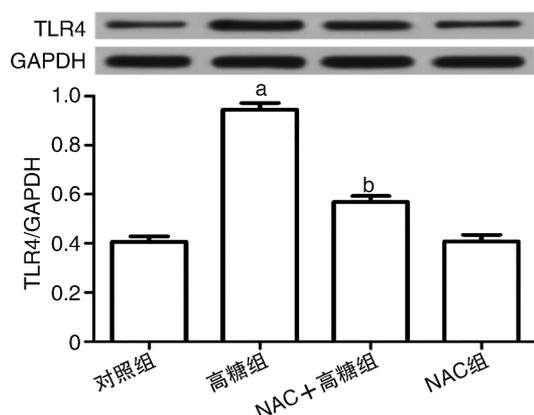


图 1. ROS 清除剂减弱高糖对心肌细胞 TLR4 表达的促进作用 ($n=5$) a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与高糖组比较。

Figure 1. The scavenger of ROS attenuates high glucose-induced up-regulation of the expression of TLR4 in H9c2 cardiac cells ($n=5$)

2.2 H_2S 抑制高糖对心肌细胞 TLR4 表达的上调作用

高糖可上调心肌细胞 TLR4 的表达;应用 400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 预处理心肌细胞 30 min 再予高糖作用细胞 24 h,可减弱高糖对 TLR4 表达的上调作用 ($P<0.01$);400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 本身对心肌细胞 TLR4 的基础表达无明显影响(图 2)。

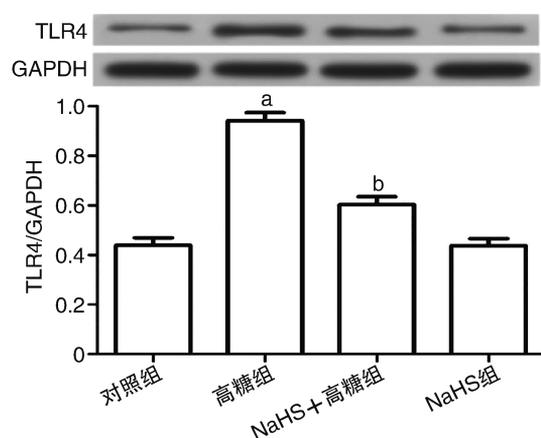


图 2. H_2S 抑制高糖对心肌细胞 TLR4 表达的上调作用 ($n=5$) a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与高糖组比较。

Figure 2. H_2S inhibits high glucose-induced up-regulation of the expression of TLR4 in H9c2 cardiac cells ($n=5$)

2.3 H_2S 和 TLR4 抑制剂减轻高糖引起的心肌细胞毒性

高糖作用 H9c2 心肌细胞 24 h,明显诱导产生心肌细胞毒性,使细胞存活率降低,培养液中 LDH 活性

增加 ($P<0.01$)。应用 400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 预处理心肌细胞 30 min 再予高糖作用心肌细胞 24 h 或应用 30 $\mu\text{mol/L}$ TAK-242 (TLR4 抑制剂) 与高糖共处理心肌细胞 24 h,均能明显减轻高糖引起的心肌细胞毒性,使细胞存活率升高,LDH 活性减少 (P 均 <0.01)。400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 或 30 $\mu\text{mol/L}$ TAK-242 本身对心肌细胞存活率和 LDH 活性无明显影响(图 3)。

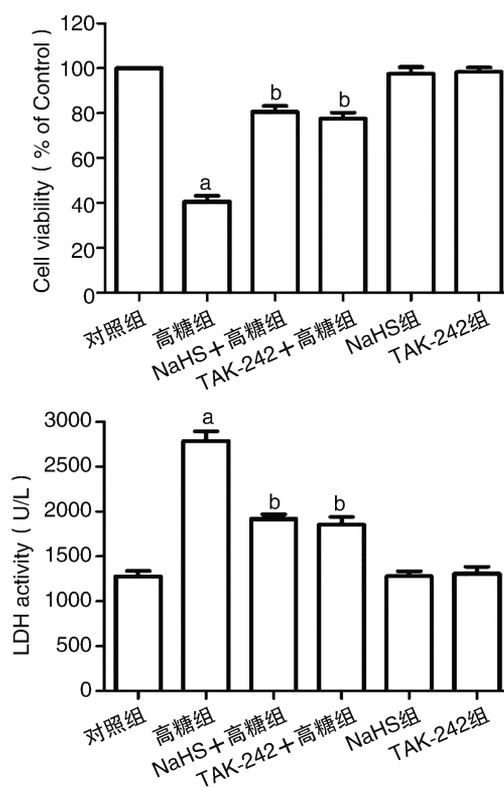


图 3. H_2S 和 TLR4 抑制剂减轻高糖引起的心肌细胞毒性 ($n=5$) a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与高糖组比较。

Figure 3. H_2S and TLR4 inhibitor inhibit high glucose-induced cytotoxicity in H9c2 cardiac cells ($n=5$)

2.4 H_2S 和 TLR4 抑制剂减轻高糖致心肌细胞凋亡作用

Hoechst 33258 染色荧光显微镜结果显示, H9c2 心肌细胞被高糖作用 24 h 后凋亡细胞数量明显增多 ($P<0.01$);应用 400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 预处理心肌细胞 30 min 后再予高糖作用 24 h 或应用 30 $\mu\text{mol/L}$ TAK-242 与高糖共处理心肌细胞 24 h,均能明显减少凋亡细胞数量 (P 均 <0.01);NaHS 或 TAK-242 本身对心肌细胞凋亡无明显影响。高糖可明显上调 Cleaved Caspase 3 的表达,而 NaHS 预处理或 TAK-242 共处理均能抑制高糖对 Cleaved Caspase 3 表达的上调作用 ($P<0.01$),NaHS 或 TAK-242 本身不影响 Cleaved Caspase 3 的基础表达(图 4)。

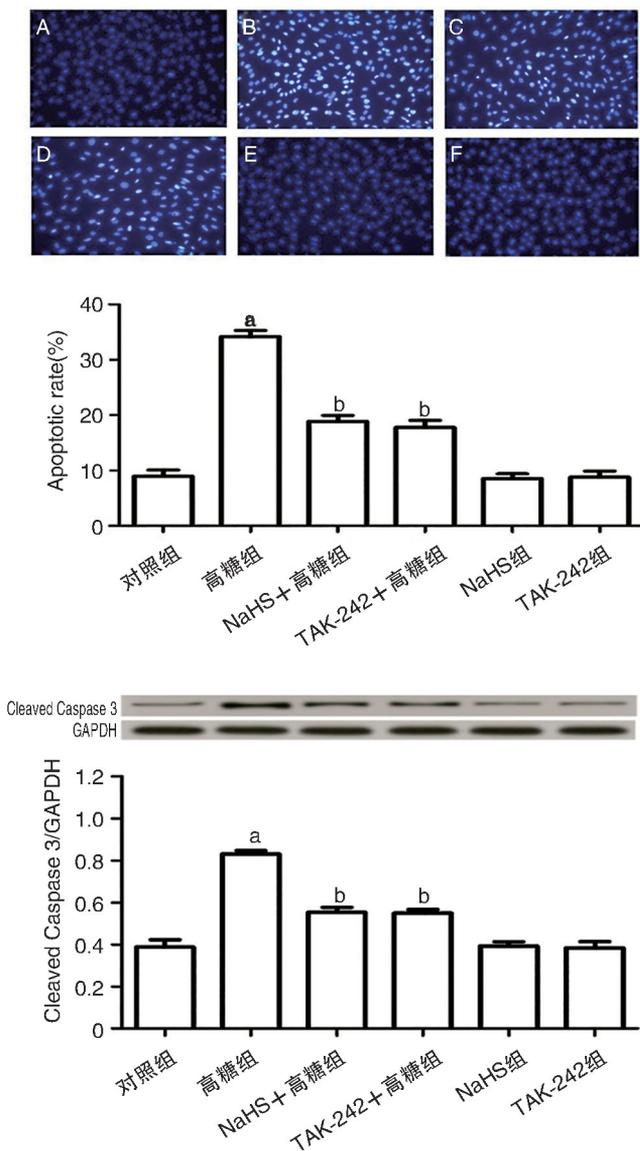


图 4. H₂S 和 TLR4 抑制剂减轻高糖致心肌细胞凋亡作用 (n = 5) 显微镜图放大倍数为 200 倍。A 为对照组, B 为高糖组, C 为 NaHS+高糖组, D 为 TAK-242+高糖组, E 为 NaHS 组, F 为 TAK-242 组。a 为 P<0.01, 与对照组比较; b 为 P<0.01, 与高糖组比较。
Figure 4. H₂S and TLR4 inhibitor reduce high glucose-induced apoptosis in H9c2 cardiac cells (n = 5)

2.5 H₂S 和 TLR4 抑制剂减轻高糖引起的心肌细胞内 ROS 堆积

高糖作用心肌细胞 24 h 可引起明显的氧化应激反应, 表现为 DCFH-DA 的 MFI 明显增强 (P<0.01); 应用 400 μmol/L NaHS 预处理心肌细胞 30 min 后再予高糖作用 24 h 或应用 30 μmol/L TAK-242 与高糖共处理心肌细胞 24 h, 均能显著减少细胞内 ROS 堆积 (P 均<0.01); NaHS 或 TAK-242 本身对心肌细胞 ROS 的基础生成无明显影响 (图 5)。

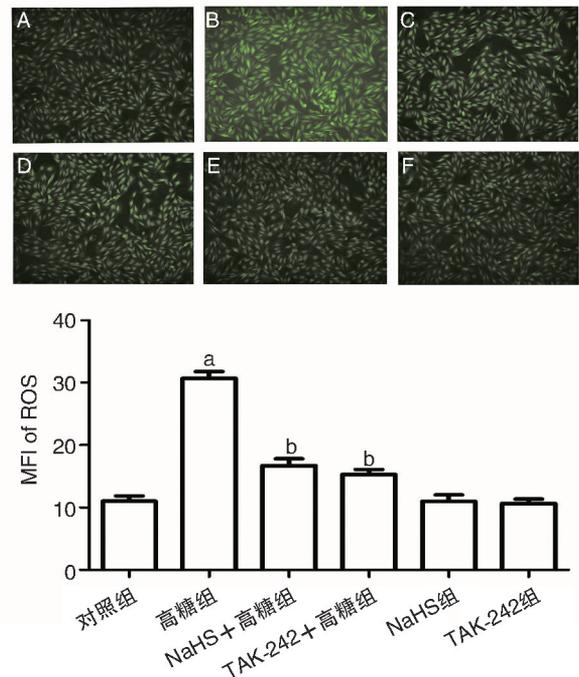


图 5. H₂S 和 TLR4 抑制剂减轻高糖引起的心肌细胞内 ROS 堆积 (n = 5) 显微镜图放大倍数为 200 倍。A 为对照组, B 为高糖组, C 为 NaHS+高糖组, D 为 TAK-242+高糖组, E 为 NaHS 组, F 为 TAK-242 组。a 为 P<0.01, 与对照组比较; b 为 P<0.01, 与高糖组比较。
Figure 5. H₂S and TLR4 inhibitor ameliorate high glucose-induced accumulation of intracellular ROS in H9c2 cardiac cells (n = 5)

2.6 H₂S 和 TLR4 抑制剂减轻高糖引起的心肌细胞线粒体膜电位丢失

高糖作用 H9c2 心肌细胞 24 h 可使 MFI 明显降低, 提示高糖可损伤线粒体功能。应用 400 μmol/L NaHS 预处理心肌细胞 30 min 后再予高糖作用 24 h 或应用 30 μmol/L TAK-242 与高糖共处理心肌细胞 24 h, 均能显著减轻高糖致线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 丢失 (P 均<0.01)。400 μmol/L NaHS 或 30 μmol/L TAK-242 本身对心肌细胞 MMP 无明显影响 (图 6)。

2.7 H₂S 和 TLR4 抑制剂减少高糖引起的炎症细胞因子分泌

高糖处理心肌细胞 24 h 可使炎症细胞因子 IL-1β 和 TNF-α 的分泌水平明显升高 (P<0.01), 应用 400 μmol/L NaHS 预处理心肌细胞 30 min 再予高糖作用 24 h 或应用 30 μmol/L TAK-242 与高糖共处理心肌细胞 24 h, 均可使 IL-1β 和 TNF-α 的分泌水平明显降低 (P 均<0.01), 400 μmol/L NaHS 或 30 μmol/L TAK-242 本身对心肌细胞炎症细胞因子的基础分泌无明显影响 (图 7)。

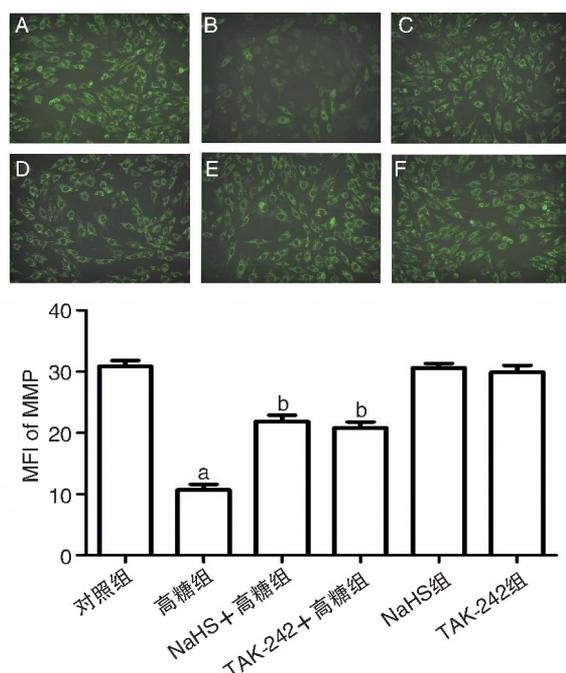


图 6. H_2S 和 TLR4 抑制剂减轻高糖致心肌细胞 MMP 丢失 ($n=5$) 显微镜图放大倍数为 200 倍。A 为对照组, B 为高糖组, C 为 NaHS+高糖组, D 为 TAK-242+高糖组, E 为 NaHS 组, F 为 TAK-242 组。a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与高糖组比较。
Figure 6. H_2S and TLR4 inhibitor attenuate high glucose-induced MMP loss in H9c2 cardiac cells ($n=5$)

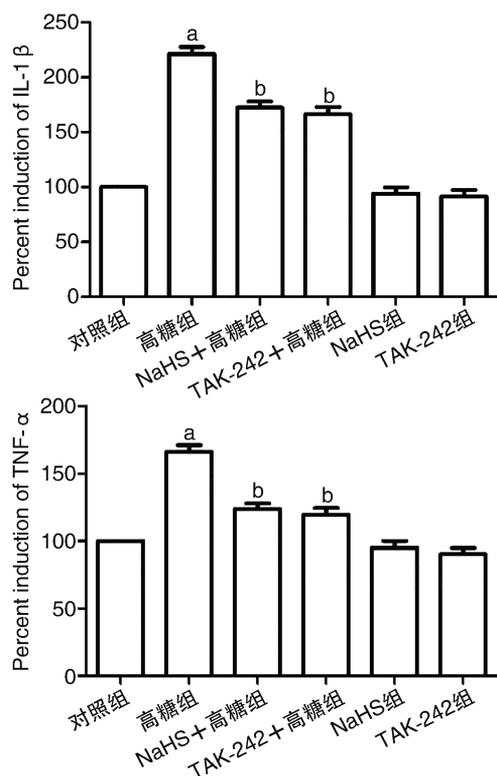


图 7. H_2S 和 TLR4 抑制剂减少高糖引起的炎症细胞因子分泌 ($n=5$) a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与高糖组比较。
Figure 7. H_2S and TLR4 inhibitor attenuate high glucose-induced secretion of inflammatory cytokines in H9c2 cardiac cells ($n=5$)

3 讨论

TLR4 是一种先天性免疫受体,在传递炎症信号过程中发挥重要的作用。本研究观察到,高糖可促进心肌细胞 TLR4 的表达,提示高糖可激活 TLR4 通路,这与 de Laat 等^[9]的报道相似。然而高糖激活 TLR4 的机制如何,激活的 TLR4 除了参与高糖引起的炎症外,是否还参与高糖引起的心肌细胞损伤包括氧化应激、细胞凋亡、线粒体受损等,目前尚未完全清楚。有报道指出,ROS 可激活心肌细胞的 NF- κ B 通路^[10],而 TLR4 是 NF- κ B 的上游信号分子^[8-9,15-16],因此,推测 ROS 可能激活 TLR4 通路。为了验证这种假设,本研究观察了 ROS 清除剂 NAC 对高糖引起 TLR4 表达上调的影响。结果发现, NAC 可抑制高糖对 TLR4 表达的上调作用,提示高糖损伤心肌细胞可能与其促进 ROS 生成并进一步可激活 TLR4 通路有关。此外,TLR4 抑制剂 TAK-242 不仅能减少高糖引起的炎症细胞因子分泌,还能对抗高糖引起的心肌细胞毒性、致细胞凋亡作用、氧化应激及线粒体受损,使细胞存活率升高, LDH 活性、凋亡细胞数量、Cleaved Caspase 3 表达、ROS 生成及 MMP 丢失减少。上述结果提示 ROS 激活的 TLR4 通路介导高糖引起的心肌细胞损伤和炎症反应。值得注意的是, TAK-242 能抑制高糖引起的 ROS 生成,提示 TLR4 可促进 ROS 生成。因此,在高糖引起 H9c2 心肌细胞损伤模型中, ROS 和 TLR4 之间可能存在正反馈回路,但需要进一步的实验论证。

H_2S 是继 CO 和 NO 之后被发现的第 3 种内源性气体信号分子,具有多种生理及病理生理作用。本课题组已证实 H_2S 可通过调控细胞内多条信号通路对抗高糖引起的心肌细胞损伤和炎症反应^[5,12-13,17]。但 H_2S 的心肌保护作用机制十分复杂,可能涉及其它未知的作用机制,因此进一步研究 H_2S 的心肌保护作用机制具有重要的意义。本研究观察到外源性 H_2S 可减轻高糖对 TLR4 表达的上调作用,应用 TAK-242 阻断 TLR4 活动和应用 H_2S 预处理心肌细胞能产生类似的心肌保护作用,使细胞存活率升高, LDH 活性、凋亡细胞数量、Cleaved Caspase 3 表达、ROS 生成、MMP 丢失及炎症细胞因子的分泌减少。提示阻断 TLR4 通路可能是外源性 H_2S 保护心肌细胞对抗高糖引起的损伤和炎症的重要机制之一。有趣的是, Tamizhselvi 等^[18]报道,在蛙皮素诱导的小鼠急性胰腺炎细胞模

型中, H₂S 可促进 TLR4 的表达并诱导产生明显的细胞炎症反应。结果存在差异可能与细胞模型、损伤作用因素等不同有关。

综上所述, 本研究证实, 在高糖状态下, ROS-TLR4 通路介导高糖引起的心肌细胞损伤和炎症反应, 抑制 ROS-TLR4 通路保护心肌细胞对抗高糖引起的损伤和炎症可能是外源性 H₂S 发挥心肌保护作用的重要机制之一。

[参考文献]

- [1] Agrawal NK, Kant S. Targeting inflammation in diabetes: Newer therapeutic options[J]. *World J Diabetes*, 2014, 5 (5): 697-710.
- [2] Wen HL, Liang ZS, Zhang R, et al. Anti-inflammatory effects of triptolide improve left ventricular function in a rat model of diabetic cardiomyopathy[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2013, 12: 50.
- [3] Cai L, Kang YJ. Cell death and diabetic cardiomyopathy [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2003, 3 (3): 219-228.
- [4] 梁伟杰, 陈景福, 宋明才, 等. 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[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23 (11): 1 081-088.
- [5] Xu W, Chen J, Lin J, et al. Exogenous H₂S protects H9c2 cardiac cells against high glucose-induced injury and inflammation by inhibiting the activation of the NF- κ B and IL-1 β pathways [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35 (1): 177-186.
- [6] 徐文明, 陈景福, 田丽红, 等. 瘦素-p38MAPK 通路介导高糖对 H9c2 心肌细胞的损伤[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22 (5): 433-437.
- [7] Fang Q, Wang J, Wang L, et al. Attenuation of inflammatory response by a novel chalcone protects kidney and heart from hyperglycemia-induced injuries in type 1 diabetic mice [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 288 (2): 179-191.
- [8] Dasu MR, Devaraj S, Park S, et al. Increased Toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects[J]. *Diabetes Care*, 2010, 33 (4): 861-868.
- [9] de Laat MA, Gruntmeir KJ, Pollitt CC, et al. Hyperinsulinemia down-regulates TLR4 expression in the mammalian heart[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014, 5: 120.
- [10] Chan CY, Mong MC, Liu WH, et al. Three pentacyclic triterpenes protect H9c2 cardiomyoblast cells against high-glucose-induced injury [J]. *Free Radic Res*, 2014, 48 (4): 402-411.
- [11] Li K, Cui YC, Zhang H, et al. Glutamine reduces the apoptosis of H9c2 cells treated with high-glucose and reperfusion through an oxidation-related mechanism [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (7): e0132402.
- [12] 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 p38MAPK and ERK1/2 pathways [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32 (4): 917-925.
- [13] 林春喜, 林建聪, 郭润民, 等. 硫化氢通过调控 JNK 通路对抗高糖诱导的心肌细胞氧化应激损伤[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21 (1): 1-5.
- [14] Qi QY, Chen W, Li XL, et al. H₂S protecting against lung injury following limb ischemia-reperfusion by alleviating inflammation and water transport abnormality in rats [J]. *Biomed Environ Sci*, 2014, 27 (6): 410-418.
- [15] Fuentes-Antrás J, Ioan AM, Tuáón J, et al. Activation of Toll-like receptors and inflammasome complexes in the diabetic cardiomyopathy-associated inflammation [J]. *Int J Endocrinol*, 2014, 2014: 847827.
- [16] 魏婷婷, 胡志德, 仲人前. microRNA 与内毒素耐受的研究进展[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2014, 34 (6): 769-772.
- [17] 梁伟杰, 陈景福, 张稳柱, 等. ATP 敏感性钾通道在硫化氢抑制高糖引起的心肌细胞损伤中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31 (5): 785-790.
- [18] Tamizhselvi R, Shrivastava P, Koh YH, et al. Prepro-tachykinin-A gene deletion regulates hydrogen sulfide-induced Toll-like receptor 4 signaling pathway in cerulein-treated pancreatic acinar cells [J]. *Pancreas*, 2011, 40 (3): 444-452.

(此文编辑 文玉珊)