

# Notch1/Hes1 通路活化通过抑制氧化应激改善高糖诱导的心肌细胞肥大

李丽, 顾文燕

(恩施土家族苗族自治州中心医院手术室, 湖北省恩施市 445000)

[关键词] Notch1/Hes1 信号通路; 心肌细胞肥大; 氧化应激

[摘要] 目的 研究 Notch1/Hes1 信号通路活化对高糖诱导的心肌细胞肥大的影响, 及其对氧化应激的作用。方法 原代培养大鼠心肌细胞, 采用图像分析法检测心肌细胞表面积, BCA 试剂盒分析细胞总蛋白含量, 采用 RT-qPCR 和 Western blot 技术检测 Notch1、Hes1、超氧化物歧化酶(SOD1)及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)蛋白表达水平, 相关试剂盒检测细胞匀浆中丙二醛(MDA)及一氧化氮(NO)含量。结果 与对照组比较, 高糖能明显诱导心肌细胞表面积及总蛋白含量的增加( $P < 0.05$ ), 心肌细胞中 Notch1、Hes1 蛋白表达量也明显降低( $P < 0.05$ ), 同时氧化应激产物 MDA、NO 明显升高( $P < 0.05$ ), 并且 SOD1 显著降低、iNOS 显著升高( $P < 0.05$ ); 激活 Notch1/Hes1 信号通路能够显著降低高糖引起的心肌细胞肥大及氧化应激损伤( $P < 0.05$ ), 而 Notch1 干扰慢病毒可阻断 Notch1 对心肌细胞肥大及氧化应激的上述改善作用( $P < 0.05$ )。结论 激活 Notch1 可以降低高糖诱导的心肌细胞肥大, 其作用机制可能与降低细胞氧化应激损伤有关。

[中图分类号] R363; R5

[文献标识码] A

## Activation of Notch1/Hes1 pathway reduces high glucose-induced cardiomyocyte hypertrophy by inhibiting oxidative stress

LI Li, GU Wenyan

(Operating Room, Central Hospital of En-shi Autonomous Prefecture, Enshi, Hubei 445000, China)

[KEY WORDS] Notch1/Hes1 signaling pathway; cardiomyocyte hypertrophy; oxidative stress

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of Notch1/Hes1 pathway activation on the cardiomyocyte hypertrophy induced by high glucose (HG), and observe its role in oxidative stress. **Methods** Primarily cultured rat cardiomyocytes were used in the study. The cell surface areas of the cardiomyocytes were measured by an image analysis system. The cell protein content was detected by BCA method. The expression levels of Notch1, Hes1, superoxide dismutase 1 (SOD1) and induction nitric oxide synthase (iNOS) were determined by RT-qPCR and Western blot. Related kits were used to measure the content of malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) in cardiomyocytes. **Results** Compared with control group, the cell surface areas and total protein content of the cardiomyocytes were significantly increased ( $P < 0.05$ ), the expression levels of Notch1 and Hes1 were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), the levels of MDA, NO and iNOS were significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the expression of SOD1 was greatly decreased ( $P < 0.05$ ) in HG-induced cardiomyocytes. Notch1 activation suppressed HG-induced cardiomyocyte hypertrophy and the levels of oxidative stress ( $P < 0.05$ ). These effects of Notch1 activation were abolished by Notch1 gene interference ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Notch1 activation reduces HG-induced cardiomyocyte hypertrophy by decreasing oxidative stress in cardiomyocyte.

糖尿病在中国的患病率及死亡率已位居第 3 位, 仅次于心脑血管疾病及癌症<sup>[1]</sup>。糖尿病心肌病属于糖尿病的并发症之一, 主要病理特征为心肌肥厚、心肌间质纤维化及凋亡升高, 然而心肌细胞肥

大是高糖环境刺激的特异性反应, 能够导致多种心脏疾病, 也是引起患者死亡率升高的主要原因之一<sup>[2-3]</sup>。早期研究还发现活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 堆积引起的氧化应激反应能够诱导

[收稿日期] 2018-08-15

[修回日期] 2018-09-26

[作者简介] 李丽, 主治医师, 主要研究方向为心血管系统疾病, E-mail 为 1634598925@qq.com。通信作者顾文燕, 主治医师, 主要研究方向为心血管系统疾病, E-mail 为 190244682@qq.com。

心肌细胞肥大<sup>[4]</sup>。有学者提出 Notch1/Hes1 信号通路在细胞多个进化过程中发挥重要作用,而且该通路信号传导的抑制还能诱导心肌细胞肥大<sup>[5]</sup>;并且还提出阻滞 Notch1/Hes1 信号传导可以导致细胞氧化应激损伤<sup>[6-7]</sup>。魏潇等<sup>[8]</sup>研究发现白藜芦醇可通过激活 Notch1/Hes1 信号通路进而改善高糖诱导的 H9C2 心肌细胞肥大,但缺乏 Notch1 通路对高糖诱导原代心肌细胞肥大的具体作用机制。因此,本研究采用大鼠原代心肌细胞给予高糖刺激,探讨 Notch1 对高糖诱导的心肌细胞肥大的影响及其对心肌细胞氧化损伤的保护作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

健康 SD 雄性大鼠(1~3 天)购自北京维通利华实验动物中心,许可证号 SCXK(京)2006-0009。

### 1.2 主要试剂及仪器

DMEM 培养基、II 型胶原酶、胎牛血清(FBS,美国 Gibco 公司),胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司),BCA 试剂盒(上海碧云天公司),兔抗鼠跨膜受体蛋白(Notch homolog 1, Notch1)、毛发和增强剂分裂同源物 1(hairy and enhancer split homolog-1, Hes1)、超氧化物歧化酶 1(superoxide dismutase 1, SOD1)、诱导型一氧化氮合酶(induction nitric oxide synthase, iNOS)及  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体购自英国 Abcam 公司,HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体(武汉谷歌生物公司),SOD、一氧化氮(nitric oxide, NO)试剂盒(南京建成生物公司),Notch1 激动剂 Jagged1(美国 Sigma 公司)。Victor3 1420 Multilable Counter 酶标仪(DX540, 美国),DYCZ-24DN 型电泳仪(北京六一仪器厂, 中国),4000B 倒置相差显微镜及成像系统(Leica, 德国),HERA cell CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(Heraeus, 德国),自动 X 光片机 UPV 凝胶成像系统(GelDoc-It/EC3)。

### 1.3 原代心肌细胞培养、鉴定及分组

原代心肌细胞分离、培养、鉴定参考文献<sup>[9]</sup>,将心肌组织消化为单细胞悬液后,差速离心分离加入含 20% FBS 及 0.1 mmol/L 5-溴脱氧尿嘧啶的 DMEM 培养液培养细胞。待细胞生长至第 4 天进行心肌细胞鉴定,采用 SABC 法,首先细胞用大鼠  $\alpha$ -横纹肌动蛋白抗体孵育,DAB 显色后,阳性为  $\alpha$ -心肌肌动蛋白。将细胞分为 4 组:对照组,给予 5 mmol/L 葡萄糖培养细胞;高糖(HG)组,给予 33 mmol/L 葡萄糖

培养细胞 48 h;HG+Jagged1 组,同时加入 33 mmol/L 葡萄糖及 Notch1 特异性激动剂 Jagged1(2  $\mu$ mol/L)培养细胞 48 h;HG + Jagged1 + shRNA 组,先给予 Notch1 干扰慢病毒转染细胞后,再加入 HG 及 Jagged1 培养细胞 48 h,每组实验设置 3 个复孔。

### 1.4 心肌细胞表面积及总蛋白检测

任意选取心肌细胞的 6 个视野进行拍照,每个视野随机选取 10 个细胞进行表面积测定,采用 Image J 图像分析软件测量单个细胞表面积。细胞用 PBS 清洗 3 次后加入 RIPA 裂解液冰上充分裂解细胞,4  $^{\circ}$ C、 $1.2 \times 10^4$  r/min 离心 12 min 取上清,按照 BCA 试剂盒说明进行蛋白浓度检测。

### 1.5 Notch1 慢病毒感染心肌细胞

Notch1 shRNA 由武汉巴菲尔生物科技有限公司设计合成,采用慢病毒包装。6 孔板细胞接种密度为  $2 \times 10^7$  个/孔,培养 3 天后,除去旧培养液,每孔加入 1 mL 新鲜培养液,并加入适量 Polybrene,使其浓度为 5 mg/L,再加入 100  $\mu$ L Notch1 shRNA 慢病毒原液与培养液充分混匀,37  $^{\circ}$ C 感染 4 h,结束后再加入 1 mL 新鲜培养液,感染后第 2 天,除去培养液,37  $^{\circ}$ C 继续感染 72 h,再进行后续实验处理。

### 1.6 丙二醛和一氧化氮含量测定

收集各组心肌细胞制备成匀浆,4  $^{\circ}$ C、 $1.2 \times 10^4$  r/min 离心 12 min 取上清,按照操作说明书对丙二醛(malondialdehyde, MDA)和一氧化氮(nitric oxide, NO)含量进行测定。

### 1.7 RT-qPCR 实验

提取各组细胞中总 RNA 水平,反转录操作获得 cDNA。采用 Real-time PCR 方法分析 Notch1 mRNA 表达水平,反应体系为 95  $^{\circ}$ C 3 min,95  $^{\circ}$ C 5 s,60  $^{\circ}$ C 15 s,72  $^{\circ}$ C 15 s,共 39 个循环,65  $^{\circ}$ C 15 s,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算分析 mRNA 相对表达水平。Notch1 引物序列为 F: 5'-CTCCCCGTTCAGCAGTCTC-3', R: 5'-CAGCCACTCGCATTGACCAT-3';  $\beta$ -actin 引物序列为 F: 5'-GGCGGCACCACCATGTACCCT-3', R: 5'-AGGGCCCGGACTCGTCATACT-3'。

### 1.8 Western blot 实验

收集各组细胞裂解液,采用 BCA 法测定蛋白总浓度后,每孔上样 50  $\mu$ g 蛋白进行电泳、电转、封闭,然后将条带放入含 Notch1、Hes1、SOD1、iNOS 及  $\beta$ -actin 抗体溶液中(稀释比 1:1000),4  $^{\circ}$ C 振摇过夜,次日用 HRP 标记二抗室温反应 1.5 h 后,TBST 洗膜 3 次后 ECL 显色,进行蛋白表达分析。

### 1.9 统计学处理方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,实验数据

用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析及 *LSD-t* 检验,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Notch1 shRNA 慢病毒感染心肌细胞对 Notch1 表达的影响

Notch1 干扰慢病毒转染心肌细胞后, 对细胞中 Notch1 蛋白及 mRNA 表达水平检测结果表明, 与对照组比较, Notch1 shRNA 组的 Notch1 蛋白及 mRNA 表达量均显著降低 ( $P < 0.05$ ; 图 1)。

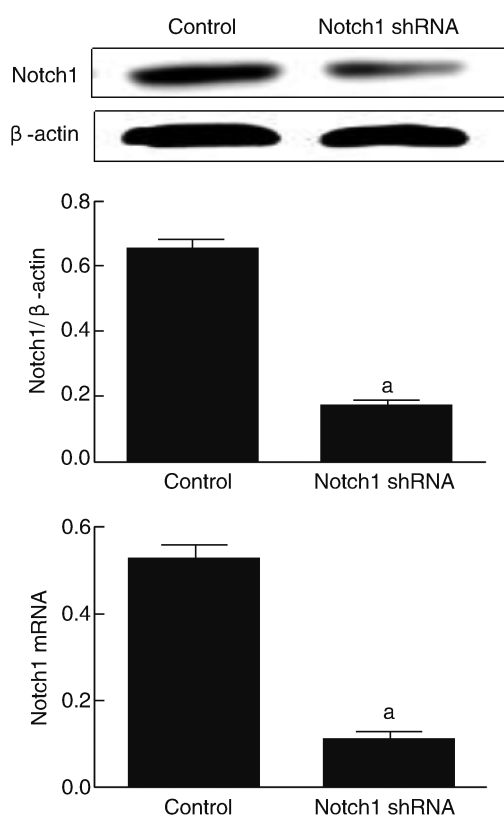


图 1. 心肌细胞 Notch1 蛋白和 mRNA 表达 ( $n=3$ ) a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

Figure 1. Expression of Notch1 protein and mRNA in cardiomyocytes ( $n=3$ )

### 2.2 激活 Notch1 对心肌细胞肥大的影响

各组心肌细胞表面积及总蛋白检测结果表明, HG 组细胞表面积及总蛋白含量较对照组均显著升高 ( $P < 0.05$ ); HG+Jagged1 组细胞表面积及总蛋白含量相比 HG 组显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与 HG+Jagged1 组比较, 给予 Notch1 shRNA 慢病毒干扰后, 心肌细胞表面积显著增大, 总蛋白含量显著升高 ( $P < 0.05$ ; 表 1)。

表 1. 激活 Notch1 对心肌细胞表面积及总蛋白含量的影响 ( $n=3$ )

Table 1. Effects of Notch1 activation on the surface area and protein content in cardiomyocytes ( $n=3$ )

分组	细胞表面积 ( $\mu\text{m}^2$ )	蛋白浓度 [ $\text{mg}/(1 \times 10^6 \text{ cells})$ ]
对照组	369.05 $\pm$ 98.25	0.76 $\pm$ 0.08
HG 组	1 023.65 $\pm$ 205.39 <sup>a</sup>	1.05 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>
HG+Jagged1 组	539.61 $\pm$ 68.47 <sup>b</sup>	0.82 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>
HG+Jagged1+shRNA 组	952.42 $\pm$ 120.68 <sup>c</sup>	0.96 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 HG 组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与 HG+Jagged1 组比较。

### 2.3 激活 Notch1 对心肌细胞中氧化应激产物 MDA 和 NO 含量的影响

与对照组比较, HG 组细胞 MDA 和 NO 含量均显著升高 ( $P < 0.05$ ); HG+Jagged1 组细胞 MDA、NO 含量相比于 HG 组显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与 HG+Jagged1 组比较, 给予 Notch1 shRNA 慢病毒干扰后, 心肌细胞 MDA 和 NO 含量显著升高 ( $P < 0.05$ ; 表 2)。

表 2. 激活 Notch1 对心肌细胞中 MDA 和 NO 含量的影响 ( $n=3$ )

Table 2. Effects of Notch1 activation on the content of MDA and NO in cardiomyocytes ( $n=3$ )

分组	MDA ( $\mu\text{mol/L}$ )	NO ( $\mu\text{mol/L}$ )
对照组	16.36 $\pm$ 1.82	43.05 $\pm$ 3.54
HG 组	34.15 $\pm$ 2.41 <sup>a</sup>	72.57 $\pm$ 4.29 <sup>a</sup>
HG+Jagged1 组	21.08 $\pm$ 2.15 <sup>b</sup>	51.34 $\pm$ 3.68 <sup>b</sup>
HG+Jagged1+shRNA 组	31.29 $\pm$ 2.63 <sup>c</sup>	74.09 $\pm$ 5.34 <sup>c</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 HG 组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与 HG+Jagged1 组比较。

### 2.4 激活 Notch1 对心肌细胞中 Hes1 表达的影响

HG 组心肌细胞中 Hes1 表达水平相比对照组显著降低 ( $P < 0.05$ ); HG+Jagged1 组心肌细胞中 Hes1 表达水平相比 HG 组显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与 HG+Jagged1 组比较, 给予 Notch1 shRNA 慢病毒干扰后, 心肌细胞中 Hes1 表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ; 图 2)。

### 2.5 激活 Notch1 对心肌细胞中氧化还原酶 SOD1、iNOS 的影响

与对照组比较, HG 组心肌细胞中 SOD1 表达水平显著降低, iNOS 显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与 HG 组比较, HG+Jagged1 组心肌细胞中 SOD1 表达水平显著

升高, iNOS 显著降低, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ); 与 HG+Jagged1 组比较, 给予 Notch1 shRNA 慢病毒干扰后, 心肌细胞中 SOD1 表达水平显著降低, iNOS 显著升高 ( $P < 0.05$ ; 图 3)。

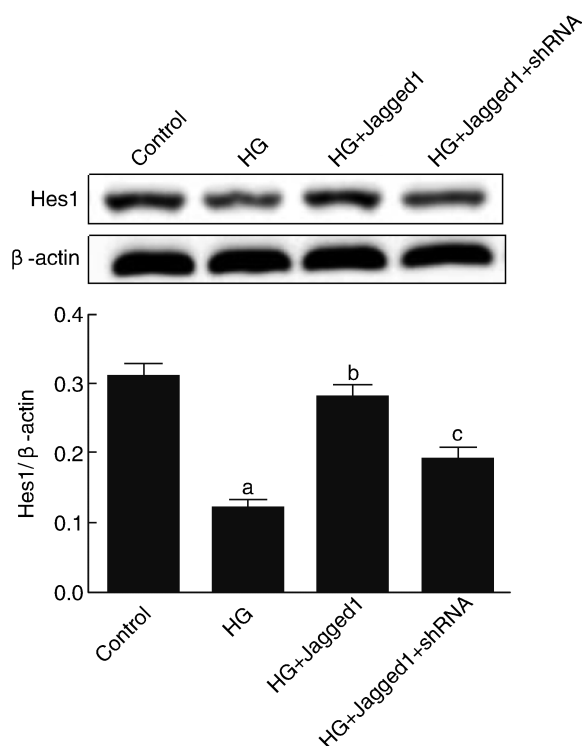


图 2. 激活 Notch1 对心肌细胞 Hes1 表达的影响 ( $n = 3$ )  
a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 HG 组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与 HG+Jagged1 组比较。

Figure 2. Effects of Notch1 activation on the expression of Hes1 in cardiomyocytes ( $n = 3$ )

### 3 讨论

糖尿病心肌病是在高糖环境持续刺激下导致的一种并发症, 早期病理特征为氧化应激反应明显及心肌细胞肥大, 后期恶化为心力衰竭等多种心脏疾病, 增加了患者死亡的风险<sup>[10]</sup>。目前对该病的发生机制尚未完全阐明, 还没有效果非常显著的药物。心肌细胞肥大主要是细胞表面积增大和细胞总蛋白水平升高<sup>[11]</sup>, 多个病理性刺激都可以导致心肌肥厚、蛋白质合成增多。早期报道让心肌细胞培养在 33 mmol/L 高糖环境中 2 天能够诱导心肌细胞肥大<sup>[12]</sup>。据此, 本文也用 33 mmol/L 葡萄糖培养原代心肌细胞 2 天建立肥大模型。实验结果也提示 HG 组心肌细胞表面积及细胞中总蛋白含量相对对照组细胞显著增加, 说明肥大模型构建成功, 可用于后续实验。

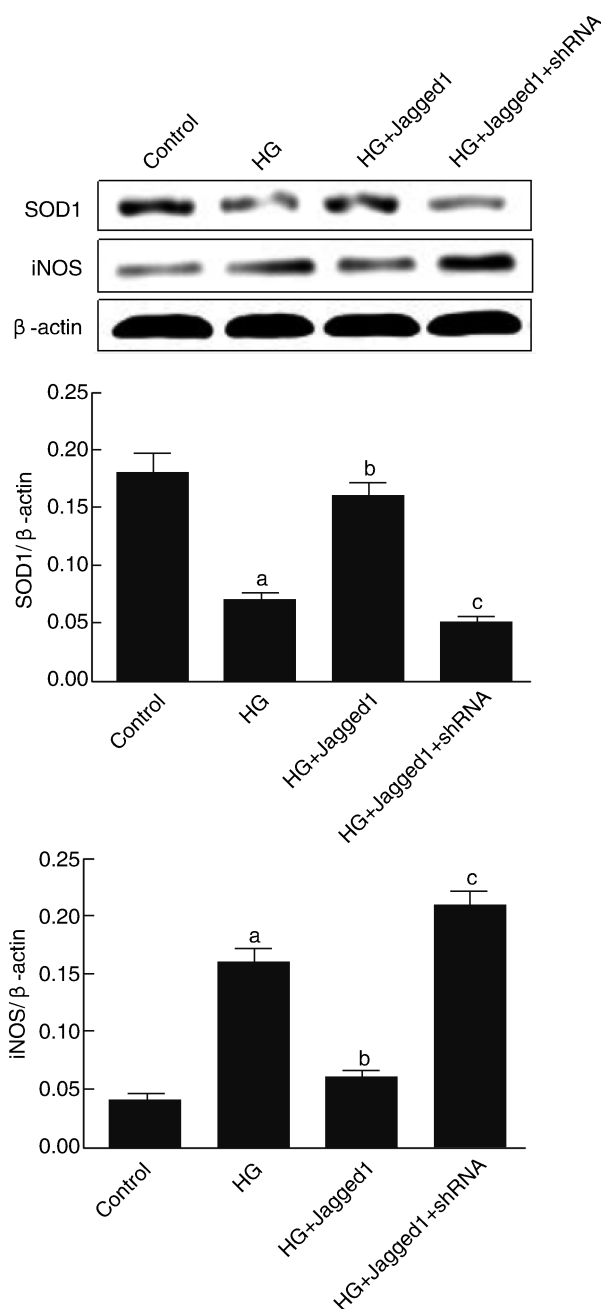


图 3. 激活 Notch1 对心肌细胞 SOD1 和 iNOS 表达的影响 ( $n = 3$ )  
a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 HG 组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与 HG+Jagged1 组比较。

Figure 3. Effects of Notch1 activation on the expression of SOD1 and iNOS in cardiomyocytes ( $n = 3$ )

已有研究证实高糖引起的心肌细胞肥大与急剧的氧化应激反应密切相关<sup>[13]</sup>。高糖环境能够导致 H9C2 心肌细胞出现肥大及氧化应激产物的大量产生, 检测发现心肌细胞裂解液中 ROS 及 MDA 水平均显著升高, 抗氧化酶 SOD1 水平降低<sup>[8]</sup>, 与本文研究结果相似, 即高糖刺激原代心肌细胞 48 h 后, 细胞中 MDA、NO 水平显著升高, SOD1 酶表达显著

降低,而 iNOS 蛋白表达明显升高。Notch1 信号通路是细胞内重要的信号传导途径之一,与多种心血管疾病的发生发展关系密切<sup>[14]</sup>。研究还发现阻滞 Notch1 信号传导容易导致扩张型心肌病,而激活 Notch1 信号传导能够改善心肌肥厚及纤维化<sup>[15]</sup>。近年来提出 Notch1 途径激活可以诱导 SOD1 酶活性,降低细胞氧化损伤,还能改善心脏的缺血/再灌注损伤<sup>[16]</sup>。上述研究说明 Notch1 途径与心肌肥大及氧化损伤有关,但 Notch1 基因作用的机制尚未阐明。因此,本研究采用 Notch1 激动剂 Jagged1 干预心肌细胞后发现,不仅细胞表面积及细胞内总蛋白含量降低,而且氧化应激产物 MDA、NO 水平也显著降低;进一步研究发现 Hes1 蛋白及抗氧化酶 SOD1 表达水平显著升高,而 iNOS 蛋白表达水平显著降低。实验结果说明 Notch1 能够通过激活 Hes1 信号通路,进而活化抗氧化酶系统降低氧化应激反应,从而改善心肌细胞肥大。接着采用 Notch1 shRNA 慢病毒感染心肌细胞,发现可以逆转 Notch1 激动剂的作用效应。

总之,本研究提示激活 Notch1 可以降低高糖诱导的心肌细胞肥大,其作用机制可能与活化 Hes1 信号传导降低氧化应激反应有关。上述结论为 Notch1 激动剂在治疗糖尿病心肌病方面的应用提供了参考价值。

#### [参考文献]

- [1] Zhou J, Liu C, Shan P, et al. Characteristics of white coat hypertension in Chinese Han patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Clin Exp Hypertens, 2014, 36(5): 321-325.
- [2] Chen R, Peng X, Du W, et al. Curcumin attenuates cardiomyocyte hypertrophy induced by high glucose and insulin via the PPAR $\gamma$ /Akt/NO signaling pathway[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2015, 108(2): 235-242.
- [3] Peng X, Chen R, Wu Y, et al. PPAR $\gamma$ -PI3K/AKT-NO signal pathway is involved in cardiomyocyte hypertrophy induced by high glucose and insulin[J]. J Diabetes Complications, 2015, 29(6): 755-760.
- [4] Yang K, Xu X, Nie L, et al. Indoxyl sulfate induces oxidative stress and hypertrophy in cardiomyocytes by inhibiting the AMPK/UCP2 signaling pathway[J]. Toxicol Lett, 2015, 234(2): 110-119.
- [5] Nemir M, Metrich M, Plaisance I, et al. Control of cardiac hypertrophy and fibrosis by the Notch Pathway[J]. Circulation, 2011, 124(14): 116-119.
- [6] Wang C, Li X, Wang H, et al. Notch1-nuclear factor  $\kappa$ B involves in oxidative stress-induced alcoholic steatohepatitis[J]. Alcohol Alcohol, 2014, 49(1): 10-16.
- [7] Pei H, Yu Q, Xue Q, et al. Notch1 cardioprotection in myocardial ischemia/reperfusion involves reduction of oxidative/nitrative stress[J]. Basic Res Cardiol, 2013, 108(5): 373-342.
- [8] 魏 潇, 雷建明, 郭静文, 等. 白藜芦醇抑制高糖诱导的 H9C2 心肌细胞系肥大[J]. 基础医学与临床, 2017, 37(3): 320-324.
- [9] 王 涛, 余志斌, 谢满江, 等. 新生大鼠心肌细胞培养技巧[J]. 第四军医大学学报, 2013, 24(2): 2-3.
- [10] Adeghate E, Singh J. Structural changes in the myocardium during diabetes-induced cardiomyopathy[J]. Heart Fail Rev, 2014, 19(1): 15-23.
- [11] Tham YK, Bernardo BC, Ooi JY, et al. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets[J]. Arch Toxicol, 2015, 89(9): 1401-1438.
- [12] 孟哲颖, 王 玉, 林艳端, 等. 成纤维细胞生长因子 21 对高糖诱导心肌细胞肥大的保护作用[J]. 上海交通大学学报(医学版)[J]. 2015, 35(1): 23-28.
- [13] Elnakish MT, Ahmed AA, Mohler PJ, et al. Role of oxidative stress in thyroid hormone-induced cardiomyocyte hypertrophy and associated cardiac dysfunction: an undisclosed story[J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 12(9): 854-867.
- [14] 叶 挺, 程治源, 凌秋洋, 等. Notch1 蛋白在人心脏瓣膜间质细胞凋亡与钙化关系中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(2): 122-128.
- [15] Urbanek K, Cabral-da-Silva MC, Ide-Iwata N, et al. Inhibition of Notch1-dependent cardiomyogenesis leads to a dilated myopathy in the neonatal heart[J]. Circ Res, 2010, 107: 429-441.
- [16] 陈 伟, 陈嘉勤, 毛海峰, 等. 有氧运动和黑果枸杞多糖对慢性脑缺血小鼠的干预及 Notch 通路相关因子的组织差异表达[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(8): 783-790.

(此文编辑 许雪梅)