

# 白细胞介素 10 通过促进线粒体自噬调节心肌细胞生物氧化

林永青<sup>1,2</sup>, 梁颖<sup>3</sup>, 张海峰<sup>2</sup>, 田国平<sup>1</sup>

(1. 南华大学附属第二医院心血管内科, 湖南省衡阳市 421001; 2. 中山大学孙逸仙纪念医院心血管内科, 广东省广州市 510120; 3. 中山大学孙逸仙纪念医院内分泌科, 广东省广州市 510120)

[关键词] 白细胞介素 10; 线粒体自噬; 生物氧化

[摘要] **目的** 探讨白细胞介素 10(IL-10)对心肌细胞葡萄糖代谢的影响及其可能机制。**方法** 使用棕榈酸干预复制心肌脂毒性和葡萄糖利用减少细胞模型,外源性 IL-10 干预后,以荧光标记的 2-脱氧葡萄糖(2-NBDG)摄入量检测心肌细胞的葡萄糖摄取,检测乳酸及体外氧化磷酸分别代表葡萄糖无氧酵解及有氧氧化水平;使用免疫荧光检测线粒体自噬;使用 Real-Time PCR 及 Western Blot 检测线粒体自噬关键基因 PINK1 表达。**结果** 与对照组比较,IL-10 处理后,心肌细胞摄入 2-NBDG 量约增加 1 倍;细胞培养上清乳酸含量减少近 80%;细胞内乳酸含量亦显著减少。IL-10 促进微管相关蛋白 1 轻链 3-绿色荧光蛋白(LC3-GFP)在心肌细胞线粒体聚集,促进线粒体自噬,并上调 PTEN 诱导假定激酶 1(PINK1)表达。**结论** IL-10 通过促进葡萄糖转入及氧化磷酸化恢复心肌细胞供能物质组成;其对氧化磷酸化的作用可能是通过上调 PINK1 进而促进线粒体自噬实现的。

[中图分类号] R392.3;R5

[文献标识码] A

## Interleukin-10 promotes oxidative phosphorylation via inducing mitophagy in cardiomyocytes

LIN Yongqing<sup>1,2</sup>, LIANG Ying<sup>3</sup>, ZHANG Haifeng<sup>2</sup>, TIAN Guoping<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiovascular Medicine, the Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Department of Cardiology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510120, China; 3. Department of Endocrinology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

[KEY WORDS] interleukin-10; mitophagy; oxidative phosphorylation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of interleukin-10 (IL-10) in cardiomyocyte metabolism. **Methods** Cardiomyocyte lipotoxicity and glucose utilization reduction was induced by palmitate. Cardiomyocytes were treated with IL-10 and 2-NBDG uptake assay was adopted to assess the glucose utilization in cells. Lactic acid and oxidative phosphorylation were used to assess glycolysis and oxidation of glucose, respectively. Immuno-fluorescence was used to evaluate mitophagy in cardiomyocytes. RT-qPCR and Western blot were used to detect PINK1 expression. **Results** Compared with the control, IL-10 treatment approximately doubled the amount of 2-NBDG in cardiomyocytes. The supernatant and intracellular lactic acid were both reduced. Moreover, LC3-GFP was enhanced in mitochondrial aggregation and the PINK1 expression was up-regulated, which indicated mitophagy increase in cardiomyocytes. **Conclusion** IL-10 may re-balance cardiomyocytes metabolism substrates by increasing glucose utilization, glycolysis and oxidative phosphorylation through inducing mitophagy mediated by PINK1 up-expression.

心肌细胞是体内对三磷酸腺苷(ATP)需求最大的组织细胞,且 ATP 对心肌细胞维持正常功能至关

重要。生理情况下,心肌细胞主要通过线粒体内的生物氧化生成 ATP 满足供能需要。因此,生物氧化

[收稿日期] 2018-12-08

[修回日期] 2019-03-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81300071);广东省自然科学基金项目(2014A030313049);广州市科技计划项目(201510010048、201510010050)

[作者简介] 林永青,学士,主治医师,研究方向为心血管介入治疗,E-mail 为 linyq1213@126.com。通信作者田国平,博士,教授,主任医师,研究方向为心肌细胞物质代谢机制,E-mail 为 1164385050@qq.com。

的调节对心肌细胞有着关键意义。线粒体自噬,主要指在活性氧(ROS)、营养缺乏、细胞衰老等刺激下,细胞内线粒体发生去极化损伤,损伤的线粒体被特异性包裹进自噬体中并与溶酶体融合而发生降解。线粒体自噬是细胞清除受损或功能失调线粒体从而保证线粒体更新和正常功能状态的主要机制,是氧化磷酸化得以正常进行不可缺少的重要机制,也是病理条件下心肌细胞的重要代偿反应<sup>[1]</sup>。

白细胞介素 10(IL-10)是一种被证实具有心肌保护作用的细胞因子,既往已经发现其在减少泡沫细胞生成中有着关键作用<sup>[2]</sup>。许多研究显示 IL-10 主要通过抗炎等机制发挥保护效应,但新近研究显示它还具有调节巨噬细胞线粒体自噬的作用<sup>[3]</sup>;但 IL-10 是否可影响心肌细胞物质代谢尚不清楚。本研究拟观察 IL-10 对心肌细胞物质代谢的影响,并探讨线粒体自噬在其中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

大鼠心肌细胞株 H9c2 及腺病毒包装工具细胞 293A 均购自 ATCC 公司;AdMax 腺病毒包装质粒及穿梭质粒购自 MicroBix Biosystems 公司并由本实验室保存;装载有 LC3-GFP 及 mito-TdTomato 序列的质粒购自 Addgene 公司;H9c2 及 293A 细胞均生长于完全培养基和胎牛血清,均购自 Gibco 公司。IL-10 购自 R&D System 公司;ADP、寡霉素及葡萄糖购自 Sigma 公司;2-脱氧葡萄糖(2-NBDG)摄取试剂盒购自 BioVision 公司;线粒体提取试剂盒购自 Qiagen 公司;PINK1 及 GAPDH 抗体均购自 CST 公司。

### 1.2 细胞培养和棕榈酸配置

将大鼠心肌细胞株 H9c2 和腺病毒包装细胞 293A 置于含 10% FBS 和 1% 青霉素及链霉素的 DMEM 培养基中,在 37 °C 和 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的恒温培养箱中培养。每 48 h 换液 1 次,融合度到达 80% 即予 1:3 传代。将棕榈酸粉末置于 BSA-氢氧化钠溶解,加热至 70 °C 后溶解,过滤后使用。

### 1.3 腺病毒包装

AdMax 系统包装腺病毒。将 LC3-GFP 及 mito-TdTomato 编码序列克隆至 AdMax 表达载体 pDC315 中,获得 pDC315-LC3-GFP 及 pDC315-mito-TdTomato。使用磷酸钙转染法将骨架质粒 pBHGloxΔE1 及表达质粒 pDC315-LC3-GFP 或 pDC315-mito-TdTomato 共同转入 293A 中,72 h 后裂解细胞并用 CsCl 超速密度梯度离心法纯化腺病毒。

### 1.4 葡萄糖摄取试验

使用 2-NBDG 摄取试验检测 H9c2 对葡萄糖的摄取。2-NBDG 结构与葡萄糖相似,故可经葡萄糖转运蛋白进入细胞,但其在细胞内的代谢终止于 6-磷酸-2-NBDG,故将在胞内聚集而不能再进行氧化分解。2-NBDG 带有绿色荧光,故可由荧光分光光度计检测荧光强度,代表葡萄糖摄入量。其操作步骤简述如下:细胞贴壁后,更换为 0.5% FBS 培养 1 h 后加入 1 μL 2-NBDG 及 20 μL 葡萄糖摄取增强剂,继续培养 30 min 后以预冷的缓冲液处理后离心收集细胞,最后重悬于缓冲液中并由荧光分光光度计检测荧光强度,激发波长为 495 nm。

### 1.5 氧化磷酸化检测

分离不同处理组细胞的线粒体后加入葡萄糖作为氧化磷酸化底物,使用耗氧量测定仪测定耗氧量,从而反映细胞氧化磷酸化水平。加入 ADP 以反映复合物 III 耗氧量;加入寡霉素以反映复合物 IV 的耗氧量。

### 1.6 RT-qPCR

TRIZOL 提取总 RNA,经反转录使用 SYBR 法进行 q-PCR 检测其 mRNA 表达。RT-qPCR 引物如下: PINK1-F:5'-ACA GGC TCA CAG AGA AGT GT-3'; PINK1-R:5'-AGA CCA TCA CGA CAC AGA GG-3'; GAPDH-F:5'-TTC CTG GTA TGA CAA CGA AT-3'; GAPDH-R:5'-TTG ATG GTA CAT GAC AAG GT-3'。

### 1.7 Western blot

提取总蛋白后在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上分离,转 PVDF 后 5% 脱脂牛奶封锁,先后用抗 PINK1 一抗及二抗孵育;最后用超敏 ECL 发光液并捕获图像,以 Image Pro Plus 分析图像,以光密度值代表表达量。

### 1.8 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据处理分析。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用两样本 *t* 检验,多组间采用单因素方差分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 IL-10 逆转棕榈酸导致的 H9c2 葡萄糖摄取减少

在棕榈酸刺激的基础上,流式细胞术检测细胞对 2-NBDG 的摄取情况,结果显示,与 PBS 组比较,IL-10 组(50 μg/L 处理 24 h) FITC 荧光强度显著增加(2205 ± 128 比 3198 ± 126;图 1),表明 IL-10 处理可促进葡萄糖向细胞内转运。

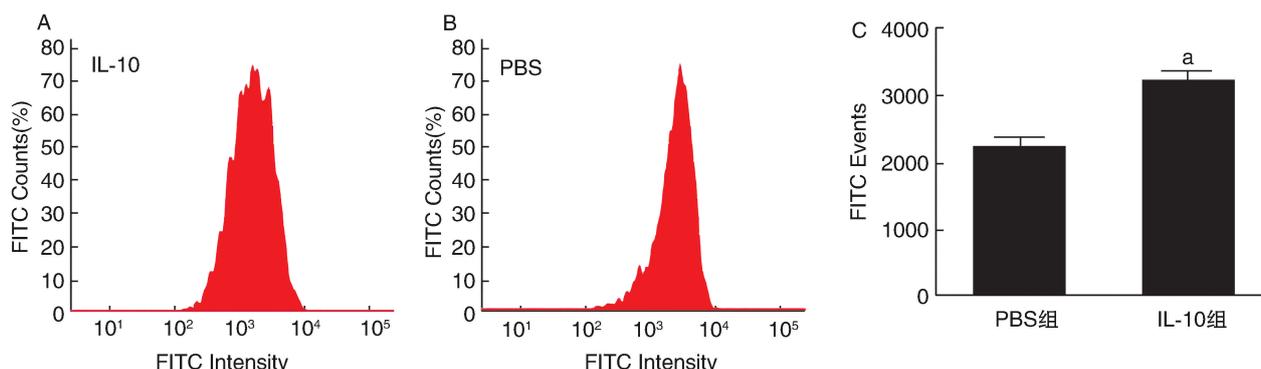


图 1. IL-10 对心肌细胞葡萄糖摄取的影响 棕榈酸 (150  $\mu\text{mol/L}$ ) 诱导心肌细胞脂毒性, 流式细胞仪检测 2-NBDG 孵育后 H9c2 细胞内平均荧光强度。A: IL-10 组; B: PBS 组; C: 两组的比较。a 为  $P < 0.05$ , 与 PBS 组比较。

Figure 1. Effect of IL-10 treatment on glucose uptake in cardiomyocytes after palmitate induction

## 2.2 IL-10 同时促进糖酵解和氧化磷酸化

分离相应处理后细胞的线粒体, 加入葡萄糖作为氧化磷酸化底物, 检测氧化磷酸化氧消耗速率, 以代表氧化磷酸化速率。结果显示, IL-10 组复合物 III 耗氧量增加约 40%; 复合物 IV 耗氧量增加约 20%。同时检测乳酸水平发现, IL-10 组细胞内上清及裂解液的乳酸减少, 提示进入细胞的葡萄糖没有停留在糖酵解阶段而进入线粒体库进行了有氧氧化(图 2)。

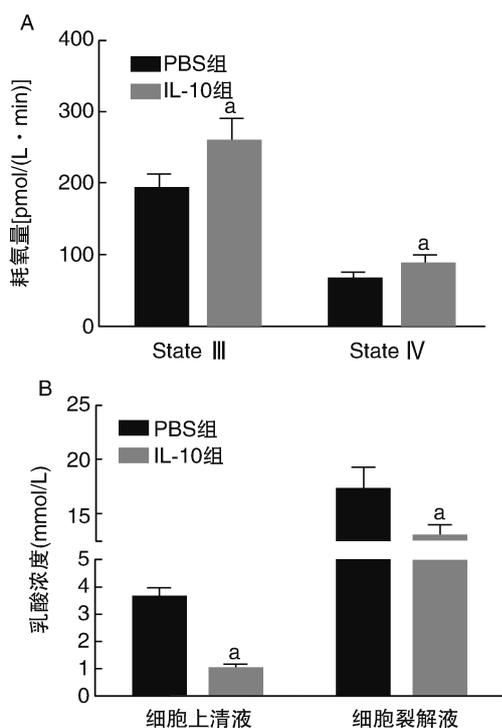


图 2. IL-10 对心肌细胞葡萄糖氧化磷酸化及糖酵解的影响 A: 线粒体 III 态呼吸 (State III) 以及线粒体 IV 态呼吸 (State IV) 耗氧量; B: 细胞上清及裂解液乳酸含量。a 为  $P < 0.05$ , 与 PBS 组比较。

Figure 2. Effect of IL-10 on glucose oxidative phosphorylation and glycolysis in H9c2 cells

## 2.3 IL-10 通过调节线粒体自噬促进葡萄糖有氧氧化

以 LC3-GFP 及线粒体定位的红色荧光蛋白 mito-TdTomato 共定位观察线粒体自噬发生, 结果显示, IL-10 处理 12 h 后, 绿色荧光及红色荧光蛋白共定位明显增加(图 3), 提示 IL-10 促进线粒体自噬。而 PINK1 mRNA 及蛋白质表达均显著上调(图 4)。因此表明, IL-10 通过上调 PINK1 促进线粒体自噬。

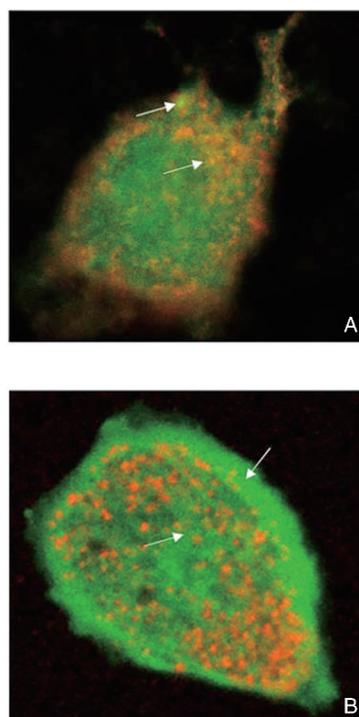


图 3. IL-10 对心肌细胞线粒体自噬的影响 (630 $\times$ ) A: IL-10 组, 可见自噬小体 (绿) 与线粒体 (红) 重叠, 而形成橙色区域; B: PBS 组, 可见部分自噬小体 (绿), 但未与线粒体 (红) 重叠。

Figure 3. Effect of IL-10 on mitophagy in cardiomyocytes (630 $\times$ )

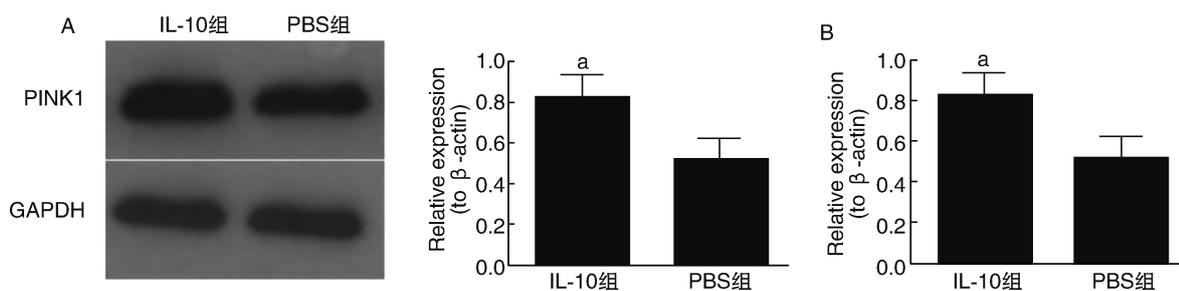


图4. IL-10对PINK1表达的影响 A: Western blot检测PINK1蛋白表达; B: RT-qPCR检测PINK1 mRNA表达。a为 $P < 0.05$ ,与PBS组比较

Figure 4. Effect of IL-10 treatment on expression of PINK1

### 3 讨论

心脏收缩需要大量的ATP,心肌的供能物质有葡萄糖、脂肪酸(fatty acids, FA)、乳酸、酮体、氨基酸等,线粒体是真核细胞进行氧化磷酸化作用合成ATP的主要场所,是细胞的“动力工厂”,提供细胞生命活动所需80%的能量。正常心肌细胞FA的摄取和氧化维持在一个动态平衡,如果心肌中大量脂质积聚可损伤线粒体功能,引起心脏功能异常,成为心肌脂毒性,甚至引起脂毒性心肌病<sup>[4]</sup>。因此,供能物质的代谢对心肌细胞线粒体库的完整性和功能正常,以至维持心肌细胞的正常活动具有特殊意义<sup>[5]</sup>。本研究结果显示,IL-10通过促进PINK1诱导心肌细胞线粒体自噬,使氧化磷酸化得以顺利进行的同时,增加心肌细胞对葡萄糖的摄取,可使处于脂毒性状态的心肌细胞恢复供能物质的构成比例,减少对脂肪酸依赖,从而缓解脂毒性。

棕榈酸导致心肌细胞脂毒性<sup>[6]</sup>,持续的主要机制之一是Randle循环,即过多的长链脂酰辅酶A在细胞内堆积,造成葡萄糖酵解途径受阻,最终导致葡萄糖氧化不能进行而更多地利用脂肪酸供能,从而造成恶性循环。而对葡萄糖利用增加是心肌细胞脂毒性缓解的标志性现象。心肌细胞遭受脂毒性损害后,脂毒性物质及其激活的信号通路可导致葡萄糖转运蛋白表达下降及膜转位受阻,造成心肌细胞对葡萄糖摄取的进一步降低;而因为脂质过氧化及内质网应激等造成线粒体膜损伤和钙超载等,使线粒体不能正常产生ATP<sup>[7]</sup>。此时,抑制脂肪酸氧化可改善心肌细胞对胰岛素敏感性,从而促进心肌细胞更多地依赖葡萄糖酵解这种不通过线粒体产生ATP的方式供能<sup>[8]</sup>。表面上,这样虽然“优化”了心肌细胞供ATP的物质来源,短期内增加了

ATP供应,但并未改善氧化磷酸化,心肌细胞内的脂肪酸得不到清除;同时,由于过度摄取葡萄糖导致糖酵解而氧化磷酸化不能相应提升可能导致糖酵解产物堆积,引起细胞内酸中毒,进一步恶化细胞内环境。因此,抑制脂肪酸氧化的这类药物如曲美他嗪虽在临床上可改善心肌缺血症状,却对临床预后没有益处<sup>[9]</sup>。清除脂毒性心肌中这些受损线粒体,使氧化磷酸化得以顺利进行并产生ATP,从而通过氧化的方式清除过度堆积的脂肪酸衍生物,才是脂毒性心肌健康的代偿方式之一。但另一方面,由于Randle循环的存在,促进脂肪酸氧化会进一步抑制心肌细胞对葡萄糖的摄取,使心肌细胞进一步依赖脂肪酸供能,这对心肌是不利的。因此,在促进脂肪酸氧化的同时促进细胞摄入葡萄糖,恢复供能物质构成,是缓解脂毒性心肌细胞不必缺少的机制之一。

IL-10是一种由免疫细胞分泌的、具有抗炎作用的细胞因子。研究证实,巨噬细胞是IL-10的主要来源之一,课题组亦曾证实巨噬细胞分泌的IL-10可抑制泡沫细胞的形成<sup>[2]</sup>。在本研究中,IL-10可提高棕榈酸诱导的脂毒性心肌细胞对葡萄糖的摄取以及促进细胞内糖酵解和氧化磷酸化,改善能量代谢。线粒体功能障碍是心肌细胞功能障碍,脂毒性发生发展的重要原因。在心肌细胞中,IL-10被报导具有抑制血管紧张素-II诱导的非选择性自噬并发挥心肌保护效应<sup>[10]</sup>;另有研究显示IL-10抑制饥饿诱导的成纤维细胞非选择性自噬<sup>[11]</sup>。然而值得指出的是,线粒体自噬属于选择性自噬。目前已知的线粒体自噬主要有以下几种<sup>[12-17]</sup>:ATG32介导的酵母线粒体自噬;Nix介导的线粒体自噬;PINK介导的线粒体自噬;FUNDC1介导的线粒体自噬;Beclin-1介导的线粒体自噬等。PINK介导的线粒体

自噬主要发生在损坏线粒体的质量控制过程中;目前认为其在清除损伤线粒体的过程中起关键作用,是介导线粒体自噬中的主要机制<sup>[6,14]</sup>。在不同组织细胞中,许多研究均发现 IL-10 可促进线粒体自噬<sup>[3,18-19]</sup>;本研究结果也同样证实了这一点。IL-10 对非选择性自噬和选择性自噬如线粒体自噬造成不同结局的机制尚未清楚,但线粒体自噬具有独特启动机制,即膜电位下降造成相关蛋白暴露,使线粒体标记分子被泛素化识别和标记<sup>[20]</sup>;尤其以线粒体膜电位下降导致 PINK1 暴露为主<sup>[20]</sup>。本研究发 现 IL-10 处理后的脂毒性损伤的心肌细胞,线粒体自噬增加,PINK1 表达增加,提示 IL-10 虽然可能抑制细胞的非选择性自噬,但可能通过启动线粒体自噬特异性机制,发挥促进线粒体自噬作用。

综上所述,本研究证实了 IL-10 通过上调 PINK1,促进线粒体以自噬方式清除受损线粒体,从而提高线粒体生物氧化能力,促进葡萄糖和脂肪酸等供能物质的氧化磷酸化,为心肌细胞提供 ATP 以维持其功能。同时,在心肌脂毒性发生过程中,IL-10 还促进葡萄糖向心肌细胞内转运,恢复供能物质比例,缓解心肌脂毒性。

#### [参考文献]

- [1] Bravo-San PJM, Kroemer G, Galluzzi L. Autophagy and mitophagy in cardiovascular disease[J]. *Circ Res*, 2017, 120(11): 1812-1824.
- [2] Zhang HF, Wu MX, Lin YQ, et al. IL-33 promotes IL-10 production in macrophages: a role for IL-33 in macrophage foam cell formation [J]. *Exp Mol Med*, 2017, 49(11): e388.
- [3] WKE I, Hoshi N, Shouval DS, et al. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages[J]. *Science*, 2017, 356(6337): 513-519.
- [4] Chiu HC, Kovacs A, Ford DA, et al. A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy [J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(7): 813-822.
- [5] Dorn GW 2nd. Parkin-dependent mitophagy in the heart [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 95: 42-49.
- [6] Zou L, Li X, Wu N, et al. Palmitate induces myocardial lipotoxic injury via the endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5): 6934-6939.
- [7] Haffar T, Akoumi A, Boussette N. Lipotoxic palmitate impairs the rate of  $\beta$ -oxidation and citric acid cycle flux in rat neonatal cardiomyocytes[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(5): 969-981.
- [8] Masoud WG, Ussher JR, Wang W, et al. Failing mouse hearts utilize energy inefficiently and benefit from improved coupling of glycolysis and glucose oxidation[J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 101(1): 30-38.
- [9] Banach M, Rysz J, Goch A, et al. The role of trimetazidine after acute myocardial infarction[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2008, 6(4): 282-291.
- [10] Kishore R, Krishnamurthy P, Garikipati VN, et al. Interleukin-10 inhibits chronic angiotensin II-induced pathological autophagy[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 89(Pt B): 203-213.
- [11] Shi J, Wang H, Guan H, et al. IL-10 inhibits starvation-induced autophagy in hypertrophic scar fibroblasts via cross talk between the IL-10-IL-10R-STAT3 and IL-10-AKT-mTOR pathways[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2133.
- [12] Kanki T, Wang K, Cao Y, et al. Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy[J]. *Dev Cell*, 2009, 17(1): 98-109.
- [13] Schwarten M, Mohrlüder J, Ma P, et al. Nix directly binds to GABARAP: a possible crosstalk between apoptosis and autophagy[J]. *Autophagy*, 2009, 5(5): 690-698.
- [14] Koyano F, Okatsu K, Kosako H, et al. Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin [J]. *Nature*, 2014, 510(7503): 162-166.
- [15] Matsuda N, Sato S, Shiba K, et al. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent parkin for mitophagy [J]. *J Cell Biol*, 2010, 189(2): 211-221.
- [16] Liu L, Feng D, Chen G, et al. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(2): 177-185.
- [17] Murakawa T, Yamaguchi O, Hashimoto A, et al. Bel-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7527.
- [18] Mannam P, Rauniyar N, Lam TT, et al. MKK3 influences mitophagy and is involved in cigarette smoke-induced inflammation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 101: 102-115.
- [19] Ko F, Abadir P, Marx R, et al. Impaired mitochondrial degradation by autophagy in the skeletal muscle of the aged female interleukin 10 null mouse[J]. *Exp Gerontol*, 2016, 73: 23-27.
- [20] Rüb C, Wilkening A, Voos W. Mitochondrial quality control by the Pink1/Parkin system[J]. *Cell Tissue Res*, 2017, 367(1): 111-123.

(此文编辑 朱雯霞)