

## 坏死性凋亡与活性氧的相互作用介导高糖引起的 H9c2 心肌细胞损伤

梁伟杰<sup>1,2</sup>, 何洁仪<sup>1,2</sup>, 陈景福<sup>3</sup>, 陈君<sup>1,2</sup>, 余盛龙<sup>1,2</sup>, 宋明才<sup>1,2</sup>, 郑东诞<sup>3</sup>, 廖新学<sup>4</sup>, 张稳柱<sup>1,2</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疾病研究所,广东省广州市 511400;

3.中山大学附属第一医院黄埔院区心血管内科 CCU,广东省广州市 510700;

4.中山大学附属第一医院心血管内科,广东省广州市 510080)

[关键词] 坏死性凋亡; 活性氧; 高血糖; 心肌细胞

[摘要] **目的** 探讨坏死性凋亡(Nec)与活性氧(ROS)之间的相互作用能否介导高糖引起的 H9c2 心肌细胞损伤。**方法** 应用蛋白质免疫印迹试验(Western blot)检测心肌细胞 RIP3 蛋白的表达水平;细胞计数盒测定心肌细胞存活率;罗丹明 123(Rh123)染色荧光显微镜摄片测定线粒体膜电位(MMP);2',7'-二氯二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)染色荧光显微镜摄片检测心肌细胞内 ROS 水平;Hoechst 33258 核染色荧光显微镜摄片测定凋亡细胞的数量。**结果** 应用高糖(HG,35 mmol/L 葡萄糖)分别处理 H9c2 细胞 0~24 h,其中 3、6、9、12 和 24 h 均能明显地上调 RIP3 蛋白的表达水平,24 h 时 RIP3 蛋白表达上调最为明显。应用 100  $\mu$ mol/L Nec 的特异性阻断剂 necrostatin-1(Nec-1)共处理心肌细胞可对抗高糖引起的 RIP3 蛋白表达的上调作用。此外,100  $\mu$ mol/L Nec-1 能显著地抑制高糖引起的细胞毒性、线粒体损伤及氧化应激,使细胞存活率升高,MMP 丢失及 ROS 生成减少。1 000  $\mu$ mol/L ROS 清除剂 N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)预处理心肌细胞 60 min,可明显地抑制高糖对心肌细胞 RIP3 蛋白表达的上调作用;此外,高糖诱导的细胞凋亡和细胞毒性作用,经 NAC 预处理后均能得到显著的抑制。**结论** Nec 与 ROS 之间的相互作用介导高糖对心肌细胞的损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Interaction Between Necroptosis and Reactive Oxygen Species Mediates High Glucose-induced Injury in H9c2 Cardiac Cells

LIANG Wei-Jie<sup>1,2</sup>, HE Jie-Yi<sup>1,2</sup>, CHEN Jing-Fu<sup>3</sup>, CHEN Jun<sup>1,2</sup>, YU Sheng-Long<sup>1,2</sup>, SONG Ming-Cai<sup>1,2</sup>, ZHENG Dong-Dan<sup>3</sup>, LIAO Xin-Xue<sup>4</sup>, and ZHANG Wen-Zhu<sup>1,2</sup>

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

[KEY WORDS] Necroptosis; Reactive Oxygen Species; Hyperglycemia; Cardiomyocyte

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether the interaction between necroptosis (Nec) and reactive oxygen species (ROS) mediates high glucose (HG)-induced injury in H9c2 cardiac cells. **Methods** The expression level of RIP3 protein (an important index that reflects Nec) was determined by Western blot assay. The cell viability was measured by cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Mitochondrial membrane potential (MMP) was examined by Rhodamine 123 (Rh 123) staining followed by photofluorography. The intracellular levels of ROS were detected by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) staining followed by photofluorography. Apoptotic cells were evaluated by the nuclear morphology observed with Hoechst 33258 staining followed by photofluorography. **Results** After the H9c2 cells were treated with

[收稿日期] 2015-12-28

[修回日期] 2016-02-18

[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。何洁仪,医师,研究方向为心血管疾病损伤机制,E-mail 为 1018748490@qq.com。通讯作者张稳柱,博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向为冠心病介入和心血管疾病的损伤与保护机制,E-mail 为 wenzhuzhang@sohu.com。

35 mmol/L glucose (HG) for 0~24 h, respectively, the expression levels of RIP3 protein were significantly increased at 3 h, 6 h, 9 h, 12 h and 24 h, reaching the maximum level at 24 h. Cotreatment of the cells with necrostatin-1 (Nec-1, a specific inhibitor of Nec) considerably blocked the up-regulation of RIP3 expression level induced by HG. Moreover, cotreatment with Nec-1 obviously inhibited HG-induced injuries (including cytotoxicity, mitochondrial damage and oxidative stress), leading to an increase in the cell viability, decreases in a loss of MMP and ROS generation. On the other hand, pretreatment of the cells with 1000  $\mu$ M N-acetyl-L-cysteine (NAC, a scavenger of ROS) for 60 min before HG exposure obviously reduced the HG-induced increase in the expression of RIP3. In addition, pretreatment of the cells with NAC dramatically alleviated the HG-induced apoptosis and cytotoxicity. **Conclusion** The interaction between Nec and ROS mediates HG-induced injury in H9c2 cardiac cells.

糖尿病性心肌病 (diabetic cardiomyopathy, DCM) 是糖尿病的一种严重并发症, 极大地危害着人类的健康。在 DCM 的发生过程中, 心肌细胞死亡起关键性的启动作用。Cai 等<sup>[1]</sup>报道在糖尿病患者和动物模型中都可观察到心肌细胞死亡。目前, 细胞的死亡方式包括凋亡、坏死、自噬和坏死性凋亡 (necroptosis, Nec)<sup>[2-3]</sup>。一般认为, 细胞凋亡是主动的程序性死亡方式; 而细胞坏死一直被认为是一种随机且不受基因调控的细胞死亡方式。Nec 是近年新发现的一种细胞死亡方式, 其特征是同时具备坏死的形态学特征和凋亡所具备的规律性调控机制, 参与缺血性心血管疾病和神经退行性疾病等的发生<sup>[4-6]</sup>。在调控 Nec 过程中, 受体相互作用蛋白 (receptor interaction protein, RIP) 发挥重要的作用。目前, RIP 蛋白家族由 RIP1~RIP7 共 7 个成员组成, 其中 RIP1 和 RIP3 是参与 Nec 的核心分子蛋白, 其相互作用是启动 Nec 的关键。有研究指出, RIP3 的表达与 Nec 呈正相关, 下调 RIP3 后可以阻止细胞发生 Nec<sup>[7-8]</sup>。Luedde 等<sup>[5]</sup>证实, 心肌梗死大鼠心肌细胞 RIP3 蛋白表达明显上调, 而过量表达的 RIP3 可导致 Nec 的发生。另有研究报道, 在链脲霉素诱导的糖尿病大鼠, 心肌炎症、纤维化、肥厚的发生伴随着 RIP3 的大量表达<sup>[9]</sup>, 说明 Nec 可能是高血糖损伤心肌的机制之一, 但抑制 Nec 活动能否减轻高糖对心肌的损伤作用, 该研究小组并没有作进一步的探讨。因此, 深入研究这个科学问题, 对防治糖尿病心血管并发症的发生有重要的意义。此外, 有报道指出在白血病细胞模型中, Nec 和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 之间存在正反馈回路<sup>[10]</sup>。但是, 在 DCM 细胞模型中, Nec 和 ROS 是否也存在相互作用, 目前尚未见报道。为此, 本研究根据 Xu 等<sup>[11]</sup>的方法, 利用高糖损伤 H9c2 心肌细胞建立 DCM 细胞模型, 重点探讨: ①Nec 是否介导高糖引起的心肌细胞损伤; ②在高糖引起心肌细胞损伤过程中, Nec 与 ROS 之间是否存在相互作用,

为深入探讨 DCM 的发病机制提供新的实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

抗 RIP3 抗体购自 Cell Signaling (USA); 2', 7'-二氢二氯荧光素二乙酸酯 (2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate, DCFH-DA) 染料、N-乙酰基-L-半胱氨酸 (N-acetyl-L-cysteine, NAC, 一种细胞 ROS 清除剂)、necrostatin-1 (Nec-1)、荧光染料罗丹明 123 (Rhodamine 123, Rh123) 和 Hoechst 33258 荧光染料由 Sigma-Aldrich (USA) 提供; 细胞增殖活性检测试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 从 Dojindo Lab (Japan) 订购; 特级胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 购自 Gibco BRL (USA), DMEM 培养基 (其葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L) 由 Hyclone 公司 (USA) 供应; 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细胞库供应。

### 1.2 细胞培养

H9c2 心肌细胞置于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中, 于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 的条件下传代培养, 待细胞生长至约 80% 的融合状态可用于实验。

### 1.3 实验分组

实验分为 6 组: ①对照 (Control) 组: DMEM 培养基处理心肌细胞 24 h; ②高糖 (high glucose, HG) 组: 35 mmol/L 葡萄糖处理 H9c2 心肌细胞 24 h; ③Nec-1+HG 组: 100  $\mu$ mol/L Nec-1 与 35 mmol/L 葡萄糖共处理心肌细胞 24 h; ④Nec-1 组: 100  $\mu$ mol/L Nec-1 与 DMEM 共处理心肌细胞 24 h; ⑤NAC+HG 组: 1 000  $\mu$ mol/L NAC 作用心肌细胞 60 min, 弃上清, 用 PBS 液冲洗 2 次, 然后予 35 mmol/L 葡萄糖处理 24 h; ⑥NAC 组: 1 000  $\mu$ mol/L NAC 作用心肌细胞 60 min, 弃上清, 用 PBS 液冲洗 2 次, 然后予 DMEM 培养基处理 24 h。

1.4 Western blot 检测心肌细胞内 RIP3 蛋白的表达水平  
在 60 mm 塑料培养皿中种植 H9c2 心肌细胞,

待细胞生长至大约 80% 的融合度时,根据分组给予相应的处理后,弃上清,用 4℃ PBS 液洗涤 3 次,加入适量的细胞裂解缓冲液(含蛋白酶抑制剂),放置于 4℃ 的摇床上处理 30 min,12 000 r/min 高速离心 10 min,小心收集上清液,以二喹啉甲酸(Bicinchoninic acid, BCA)法测定蛋白质含量。等量的蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳分离后,电转移至 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液常温下封闭 1 h,加入一抗,即兔抗鼠 RIP3 或 GAPDH(浓度均为 1:1 000),4℃ 作用过夜,预冷的 TBST 脱色摇床洗涤 3 次,5 min/次,浓度为 1:2 500 的二抗稀释液与膜接触,室温下孵育 1.5 h,在脱色摇床上予 TBST 洗涤 3 次,5 min/次。用增强化学发光法(ECL)使 PVDF 膜显色,暗室中将显色条带曝光到医用 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

于 96 孔培养板中种植 H9c2 心肌细胞,待细胞融合度达到大约 80% 时,按照设定的分组分别处理后,弃去上清液,用 PBS 冲洗 3 次,于每孔中加入 DMEM 90  $\mu$ L 和 CCK-8 溶液 10  $\mu$ L,将培养板放置于培养箱内孵育 2.5 h,在酶标仪上读取 450 nm 处的吸光度值(A)。细胞存活率按照以下公式计算:细胞存活率(%)=处理组 A/对照组 A $\times$ 100%。实验重复 5 次。

### 1.6 Rh123 染色荧光显微镜摄片检测线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)

用 24 孔塑料培养板培养 H9c2 心肌细胞,细胞融合度为 80% 左右时,按照分组给予相应的处理后,弃上清,预冷的 PBS 液洗涤 3 次,加入 Rh123 缓冲液,置于细胞培养箱中孵育 45 min,再予预冷的 PBS 液洗涤 3 次。Rh123 是一种可对活细胞线粒体染色的细胞染色试剂,可透过细胞膜且在活细胞的线粒体内聚集,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。每组随机照片记录 5 个高倍镜视野,应用图像分析软件(Image J 1.47i)计算出绿色荧光强度的平均值[平均荧光强度(mean fluorescent intensity, MFI)],再对每组数据进行统计分析。实验重复 5 次。

### 1.7 DCFH-DA 染色荧光显微镜摄片检测胞内 ROS 水平

用 24 孔塑料培养板培养 H9c2 心肌细胞,待细胞融合度达到大约 80% 时,按照分组给予相应的处理后,弃上清,预冷的 PBS 液洗涤 3 次,加入 DCFH-DA 染液(浓度为 10  $\mu$ mol/L),置于细胞培养箱中孵育 30 min,再予预冷的 PBS 液洗涤 3 次。在荧光显

微镜下随机照片记录 5 个高倍镜视野,应用图像分析软件(Image J 1.47i)计算出绿色荧光的 MFI(数值大小能间接反映 ROS 水平的高低),再对每组数据进行统计分析。实验重复 5 次。

### 1.8 Hoechst 33258 核染色荧光显微镜摄片检测凋亡细胞数量

用 24 孔塑料培养板培养 H9c2 心肌细胞,待细胞生长至大约 80% 的融合度时,按照分组给予相应的处理后,弃上清,预冷的 PBS 液洗涤 3 次,固定液(浓度为 4% 的多聚甲醛)作用 10 min,加入 Hoechst 33258 染料缓冲液(浓度为 5 mg/L),置于细胞培养箱中孵育 30 min,再予预冷的 PBS 液洗涤 3 次。在荧光显微镜(TE-2000 Nikon, 日本)下可观察到:正常的心肌细胞呈弥散均匀的低密度荧光,凋亡细胞则表现为细胞核呈现浓缩致密的固缩形态或颗粒荧光。随机照片记录 5 个高倍镜视野,应用图像分析软件(Image J 1.47i)计算出蓝色荧光的 MFI,再对各组进行数据分析统计。实验重复 5 次。

### 1.9 统计学处理

应用 SPSS 17.0 软件进行统计数据处理和分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,SNK(Student-Newman-Keuls) $q$  检验用于多个样本均数的两两之间比较,单因素方差分析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 高糖可促进心肌细胞的坏死性凋亡

应用高糖分别处理 H9c2 心肌细胞 0~24 h,其中,3 h 时开始 RIP3 蛋白表达水平开始明显增多( $P < 0.01$ ),随着高糖作用时间延长,RIP3 蛋白的表达增多更为明显,高糖作用 24 h,RIP3 表达达最高水平( $P < 0.01$ ;图 1)。

### 2.2 Nec-1 减轻高糖引起的心肌细胞毒性

高糖作用心肌细胞 24 h 可使细胞存活率降低至  $53.3\% \pm 2.68\%$ ,提示高糖可产生明显的心肌细胞毒性。但是,分别应用 75、100、200、400、600、800  $\mu$ mol/L Nec-1(Nec 的特异性阻断剂)与高糖共处理心肌细胞 24 h,均能减轻高糖导致的细胞毒性,升高细胞存活率,分别与高糖组比较,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ;图 2),其中 100  $\mu$ mol/L Nec-1 对细胞毒性的抑制作用最为明显。单纯予 75、100、200、400、600、800  $\mu$ mol/L Nec-1 分别和 DMEM 共处理心肌细胞 24 h 均不影响细胞存活率。根据上述结果,本研究采用 Nec-1 的有效作用浓度确定为 100  $\mu$ mol/L。



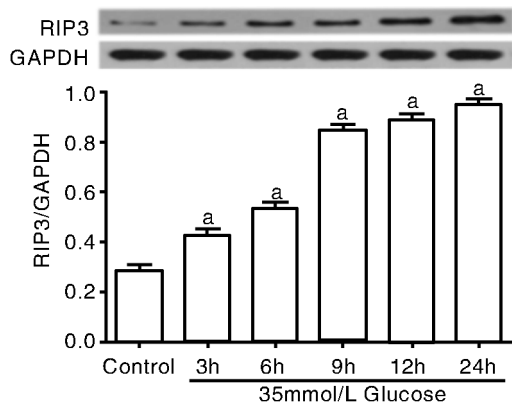


图 1. 高糖可促进 H9c2 心肌细胞的坏死性凋亡 ( $n=5$ )  
a 为  $P < 0.01$ , 与 Control 组比较。

Figure 1. High glucose promotes necroptosis in H9c2 cardiac cells ( $n=5$ )

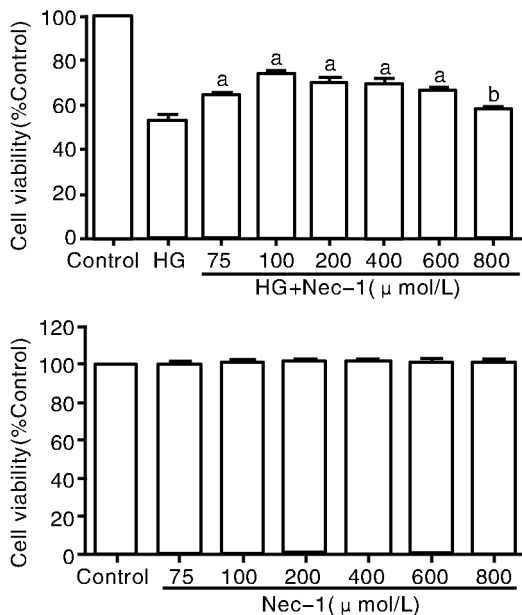


图 2. Nec-1 减轻高糖引起的心肌细胞毒性 ( $n=5$ ) a 为  $P < 0.01$ , b 为  $P < 0.05$ , 与 HG 组比较。

Figure 2. Nec-1 attenuates the high glucose-induced cytotoxicity in cardiac cells ( $n=5$ )

### 2.3 Nec-1 对高糖上调心肌细胞 RIP3 蛋白表达的抑制作用

高糖可显著提高 H9c2 心肌细胞 RIP3 蛋白表达水平,然而,应用 100  $\mu\text{mol/L}$  Nec-1 与高糖共处理心肌细胞 24 h,可显著减弱高糖对 RIP3 蛋白的上调作用,与高糖组比较,差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。100  $\mu\text{mol/L}$  Nec-1 和 DMEM 共处理心肌细胞不影响 RIP3 蛋白的表达(图 3)。

### 2.4 Nec-1 减轻高糖导致的心肌细胞 MMP 丢失

高糖可使心肌细胞内 Rh123 的 MFI 从  $30.5\% \pm$

1.27% (图 4A) 降低至  $9.6\% \pm 0.90\%$  (图 4B),两者差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。然而,100  $\mu\text{mol/L}$  Nec-1 与高糖共处理 H9c2 心肌细胞 24 h 能使 MFI 升高至  $15.4\% \pm 1.38\%$  (图 4C),与高糖处理组比较,差异具有显著性 ( $P < 0.01$ )。100  $\mu\text{mol/L}$  Nec-1 本身对心肌细胞 MMP 无明显的影响。

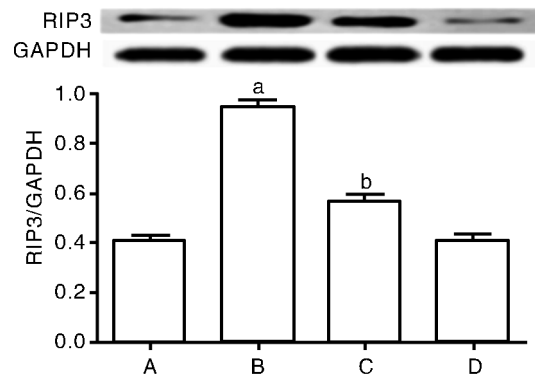


图 3. Nec-1 减弱高糖对心肌细胞 RIP3 蛋白表达的上调作用 ( $n=5$ ) A 为 Control 组, B 为 HG 组, C 为 Nec-1+HG 组, D 为 Nec-1 组。a 为  $P < 0.01$ , 与 Control 组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 HG 组比较。

Figure 3. Nec-1 inhibits the high glucose (HG)-induced up-regulation of the expression of RIP3 in cardiac cells ( $n=5$ )

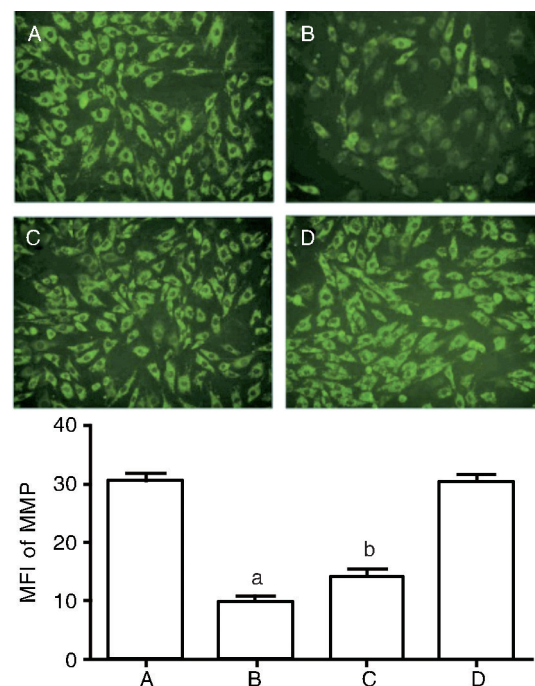


图 4. Nec-1 减轻高糖引起的心肌细胞线粒体损伤 ( $n=5$ )

A 为 Control 组, B 为 HG 组, C 为 Nec-1+HG 组, D 为 Nec-1 组。显微镜图放大倍数为 200 倍。a 为  $P < 0.01$ , 与 Control 组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 HG 组比较。

Figure 4. Nec-1 attenuates the high glucose-induced loss of mitochondrial membrane potential in cardiac cells ( $n=5$ )

2.5 Nec-1 减轻高糖导致的心肌细胞内 ROS 堆积

在高糖状态下,心肌细胞胞内的 DCFH-DA 的 MFI 明显增强(图 5B),与 Control 组(图 5A)比较,差异具有统计学显著性( $P<0.01$ )。然而,采用 100  $\mu\text{mol/L}$  Nec-1 和 DMEM 共处理 H9c2 心肌细胞 24 h 能显著地减少胞内 ROS 的堆积(图 5C),与高糖处理组比较,差异非常明显( $P<0.01$ )。Nec-1 本身对心肌细胞 ROS 的生成无明显的影响(图 5D; $P>0.05$ )。

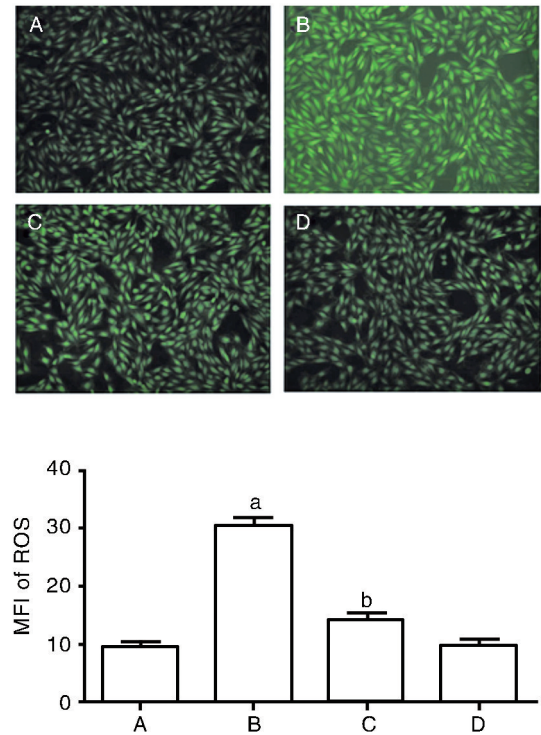


图 5. Nec-1 减轻高糖引起的心肌细胞胞内 ROS 堆积( $n=5$ ) A 为 Control 组,B 为 HG 组,C 为 Nec-1+HG 组,D 为 Nec-1 组。显微镜图放大倍数为 200 倍。a 为  $P<0.01$ ,与 Control 组比较;b 为  $P<0.01$ ,与 HG 组比较。

Figure 5. Nec-1 attenuates the high glucose-induced accumulation of intracellular ROS in cardiac cells( $n=5$ )

2.6 ROS 清除剂抑制高糖上调心肌细胞 RIP3 蛋白表达

高糖对 RIP3 蛋白的表达水平有明显的上调作用;但是,应用 1 000  $\mu\text{mol/L}$  NAC 预处理心肌细胞 60 min 后再予高糖处理细胞,RIP3 蛋白水平明显降低,与高糖组比较,差异具有统计学显著性( $P<0.01$ ;图 6)。NAC 本身对心肌细胞 RIP3 蛋白的基础表达水平无明显的影响。

2.7 ROS 清除剂抑制高糖致心肌细胞凋亡和细胞毒性作用

高糖状态可导致心肌细胞凋亡,经 Hoechst

33258 核染色后,在荧光显微镜下可观察到呈现典型凋亡特征的细胞数量明显增多,与对照组比较,差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。经 1 000  $\mu\text{mol/L}$  NAC 预处理心肌细胞后,凋亡细胞数量明显减少,与高糖组比较,两者统计学处理有差异显著性(图 7; $P<0.01$ )。

高糖处理心肌细胞 24 h 可显著降低细胞存活率;在高糖作用心肌细胞前,应用 1000  $\mu\text{mol/L}$  NAC 预处理心肌细胞 60 min 能明显地升高细胞存活率,与高糖处理组比较,差异具有统计学意义( $P<0.01$ ;图 7)。

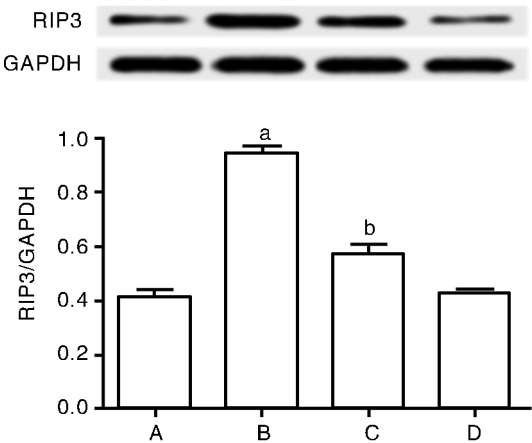


图 6. ROS 清除剂减弱高糖对心肌细胞 RIP3 蛋白表达的上调作用( $n=5$ ) A 为 Control 组,B 为 HG 组,C 为 NAC+HG 组,D 为 NAC 组。a 为  $P<0.01$ ,与 Control 组比较;b 为  $P<0.01$ ,与 HG 组比较。

Figure 6. The scavenger of ROS inhibits the high glucose-induced up-regulation of the expression of RIP3 in cardiac cells( $n=5$ )

3 讨论

心肌细胞死亡在 DCM 的发生发展中发挥重要的作用<sup>[1]</sup>。细胞的死亡方式包括 apoptosis、necrosis、autophagy 和 Nec<sup>[2-3]</sup>。已有实验证实:apoptosis、necrosis、和 autophagy 参与 DCM 的发生和发展<sup>[12-14]</sup>。作为一种新发现的细胞死亡方式,Nec 已被证实参与缺血性心血管疾病和神经退行性疾病等的发生<sup>[4-6]</sup>,是目前国际上极其活跃的研究热点之一。然而,Nec 是否与 DCM 的发病相关,目前仍鲜有报道。因此,深入探讨 Nec 在 DCM 中的作用,有望成为防治 DCM 的一个新的突破口。

本研究在应用 HG 损伤 H9c2 心肌细胞建立的 DCM 细胞模型中再次证实,高糖可引起心肌细胞的

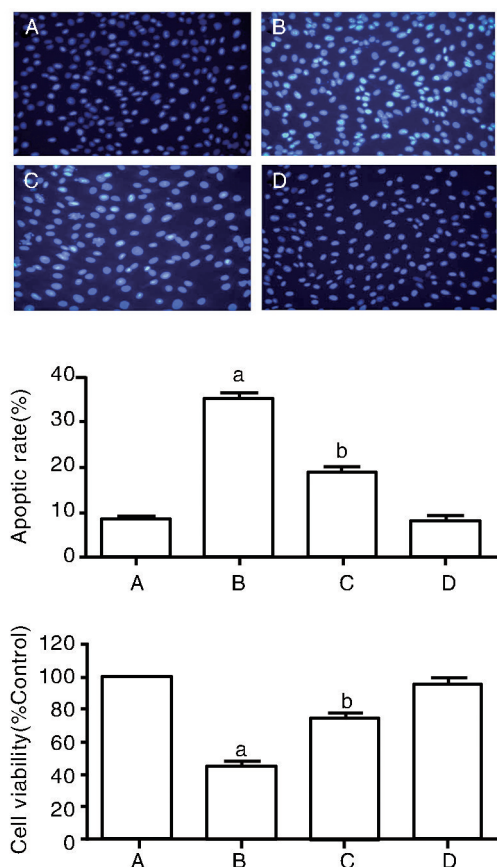


图 7. ROS 清除剂减弱高糖致心肌细胞凋亡和细胞毒性作用 ( $n=5$ ) A 为 Control 组, B 为 HG 组, C 为 NAC+HG 组, D 为 NAC 组。显微镜图放大倍数为 200 倍。a 为  $P<0.01$ , 与 Control 组比较; b 为  $P<0.01$ , 与 HG 组比较。

Figure 7. The scavenger of ROS inhibits the high glucose-induced apoptosis and cytotoxicity in cardiac cells ( $n=5$ )

多种损伤,包括有细胞存活率降低(细胞毒性)、MMP 丢失(线粒体受损)及 ROS 生成增多(氧化应激),这与我们之前报道<sup>[11,15-18]</sup>的相一致。最近, Liu 等<sup>[9]</sup>观察到,糖尿病大鼠在出现左心室重构及舒张功能障碍的同时,伴随有 Nec 的发生,提示 Nec 与糖尿病大鼠心肌损伤有关。但是,他们没有应用抑制 Nec 的技术与方法进一步探讨 Nec 在糖尿病心肌损伤中所发挥的作用。在本研究中,我们在观察到 HG 能呈时间依赖性地上调心肌细胞 RIP3 蛋白表达的基础上,进一步观察了 Nec 的特异性抑制剂 Nec-1 对 HG 诱导的心肌细胞损伤的影响,结果表明, Nec-1 在抑制 RIP3 蛋白表达上调的同时,还能减轻 HG 引起的心肌细胞多种损伤,使细胞存活率升高、MMP 丢失及 ROS 生成减少。上述结果清晰地提示: Nec 介导 HG 导致的心肌细胞毒性、线粒体受损和氧化应激等心肌损伤作用,这从细胞水平进一步扩展了 Liu 等<sup>[9]</sup>的研究结果,为阐明 Nec 在糖

尿病心肌损伤中的作用提供了新颖的实验依据。

重要的是,我们还探讨了 ROS 和 Nec 之间的关系。众所周知,氧化应激过程中产生大量的 ROS 可导致 DCM 的发生<sup>[18-19]</sup>,但是, ROS 与 Nec 之间的相互关系如何,目前尚未完全清楚。Schenk 指出:在白白血病细胞模型中, ROS 和 Nec 之间存在正相互作用<sup>[10]</sup>。与这一结论相类似,我们的实验结果也很好地诠释了它们两者的关系:一方面,采用 NAC 预处理心肌细胞抑制 ROS 的活动可明显拮抗高糖对 RIP3 蛋白的上调作用,表明氧化应激损伤心肌的机制之一是通过促进 Nec 的发生而实现的;另一方面,应用 Nec 的抑制剂 Nec-1 共处理心肌细胞能显著地减少高糖引起的细胞内 ROS 堆积, NAC 预处理能抑制高糖引起的心肌细胞致凋亡与毒性作用,提示高糖引起 Nec 发生,继而促进 ROS 的大量生成而损伤心肌细胞。因此,本研究有力地证实,在高糖损伤心肌细胞的过程中, ROS 与 Nec 之间存在正相互作用,即 ROS 能促进 Nec 的发生,而当 Nec 发生后可产生更多的 ROS 从而损伤心肌细胞。ROS 和 Nec 之间的相互作用可能是高糖损伤心肌细胞的一种新的损伤机制,然而具体的分子机制仍有待进一步的研究。

综上所述,本研究证实, Nec 介导高糖诱导的 H9c2 心肌细胞损伤; Nec 与 ROS 之间的正相互作用可能是高糖对心肌细胞损伤的重要机制之一。

#### [参考文献]

- [1] Cai L, Kang YJ. Cell death and diabetic cardiomyopathy [J]. Cardiovasc Toxicol, 2003, 3(3): 219-228.
- [2] Nunes T, Bernardazzi C, de Souza HS. Cell death and inflammatory bowel diseases: apoptosis, necrosis, and autophagy in the intestinal epithelium [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 218-493.
- [3] Fenton K. The effect of cell death in the initiation of lupus nephritis [J]. Clin Exp Immunol, 2015, 179(1): 11-16.
- [4] Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition [J]. Trends Biochem Sci, 2007, 32(1): 37-43.
- [5] Luedde M, Lutz M, Carter N, et al. RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodelling after myocardial infarction [J]. Cardiovasc Res, 2014, 103(2): 206-216.
- [6] Degterev A, Huang Z, Boyce M, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury [J]. Nat Chem Biol, 2005, 1(2): 112-119.

- [7] Cho YS, Challa S, Moquin D, et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation [J]. Cell, 2009, 137(6): 1112-123.
- [8] Degterev A, Zhou W, Maki JL, et al. Assays for necroptosis and activity of RIP kinases [J]. Methods Enzymol, 2014, 545: 1-33.
- [9] Liu YS, Huang ZW, Wang L, et al. Sitagliptin alleviated myocardial remodeling of the left ventricle and improved cardiac diastolic dysfunction in diabetic rats [J]. J Pharmacol Sci, 2015, 127(3): 260-274.
- [10] Schenk B, Fulda S. Reactive oxygen species regulate Smac mimetic/TNF $\alpha$ -induced necroptotic signaling and cell death [J]. Oncogene, 2015, 34(47): 5796-806.
- [11] 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.
- [12] Liu C, Wang L, He K. Diabetic cardiomyopathy and autophagy [J]. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi, 2015, 44(2): 146-149.
- [13] Ouyang C, You J, Xie Z. The interplay between autophagy and apoptosis in the diabetic heart [J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 71: 71-80.
- [14] Nunes T, Bernardazzi C, de Souza HS. Cell death and inflammatory bowel diseases: apoptosis, necrosis, and autophagy in the intestinal epithelium [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 218493.
- [15] Zhuang XD, Hu X, Long M, et al. Exogenous hydrogen sulfide alleviates high glucose-induced cardiotoxicity via inhibition of leptin signaling in H9c2 cells. Mol Cell Biochem [J]. 2014, 391(1-2): 147-155.
- [16] 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.
- [17] Xu W, Chen J, Lin J, et al. Exogenous H<sub>2</sub>S protects H9c2 cardiac cells against high glucose-induced injury and inflammation by inhibiting the activation of the NF- $\kappa$ B and IL-1 $\beta$  pathways [J]. Int J Mol Med, 2015, 35(1): 177-186.
- [18] 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): 1081-088.
- [19] 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.

(此文编辑 李玲玲)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 本刊计量单位的使用

本刊使用下列计量单位(各类单位中,第一个单位为基本单位):

- ①长度:m, cm, mm,  $\mu$ m, nm, pm, fm;
- ②质量:g, kg, mg,  $\mu$ g, ng, pg;
- ③时间:s, ms,  $\mu$ s, ns, min, h, d;
- ④电流:A, mA,  $\mu$ A, nA;
- ⑤热力学温度:°C, 也可用 K;
- ⑥物质的量:mol, mmol,  $\mu$ mol, nmol, pmol;
- ⑦频率:Hz, kHz, MHz, GHz, THz;
- ⑧力、重力:N, kN, MN;
- ⑨压力、压强和应力:Pa, kPa, MPa;
- ⑩能量、功和热:J, kJ;
- ⑪电位、电压和电动势:V, mV, kV;
- ⑫放射性活度:Bq, kBq, MBq, GBq;

- ⑬容积、体积:L, mL,  $\mu$ L, nL;
- ⑭转速:r/min, r/s, kr/min, Mr/min;
- ⑮密度:kg/L;
- ⑯级差:dB;
- ⑰溶液浓度:mol/L, mmol/L,  $\mu$ mol/L, nmol/L, pmol/L;也可用 g/L, mg/L,  $\mu$ g/L, ng/L, pg/L;
- ⑱一种物质含有另一种物质的量:mol/kg, mmol/g,  $\mu$ mol/g, nmol/g, pmol/g;也可用 mg/g,  $\mu$ g/g, ng/g;
- ⑲血压:kPa, 也可用 mmHg (1 mmHg = 0.133 3 kPa);其它生理压用 Pa, 也可用 cmH<sub>2</sub>O (1 cmH<sub>2</sub>O = 98 Pa)。

注意:不得使用分母带词头的单位,如/ml、/mg、dL 等请修改为/L、/g、/L,但/kg 例外。