

左旋卡尼汀联合 CrkL 降低缺氧复氧诱导的心肌细胞损伤

蔡婵娟¹, 徐章伦¹, 汪莲开²

(1. 天门市第一人民医院介入科, 湖北省天门市 431700; 2. 湖北民族大学附属民大医院心内科, 湖北省恩施州 445000)

[关键词] 左旋卡尼汀; CrkL; 心肌细胞; 缺氧复氧; 细胞凋亡; 炎症因子

[摘要] **目的** 研究左旋卡尼汀联合 CT10 激酶调节子样蛋白 (CrkL) 降低缺氧复氧 (H/R) 诱导的心肌细胞损伤的作用。**方法** 利用 H/R 损伤心肌细胞 H9c2, 使用左旋卡尼汀处理。细胞计数试剂盒 8 (CCK-8)、流式细胞术、Western blot 分别检测细胞的增殖、凋亡和细胞核相关抗原 Ki-67 (Ki-67)、增殖细胞核抗原 (PCNA)、B 细胞淋巴瘤/白血病 2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、核因子 κ B (NF- κ B)、CrkL 水平。在细胞 H9c2 中转染 pcDNA-CrkL, 使用 H/R 处理或 H/R+左旋卡尼汀处理。采用上述方法检测细胞增殖、凋亡等。**结果** 与对照组比较, H/R 组 H9c2 细胞的活力、Ki-67、PCNA、Bcl-2、CrkL 蛋白表达量明显降低, 细胞凋亡率、Bax 蛋白水平及炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B 的蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$)。与 H/R 组比较, 左旋卡尼汀明显增加 H/R 诱导的 H9c2 细胞活力及 Ki-67、PCNA、Bcl-2、CrkL 蛋白表达量, 显著降低细胞凋亡率、Bax 蛋白水平及 TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B 蛋白水平 ($P < 0.05$)。CrkL 过表达明显提高 H/R 诱导的 H9c2 细胞活力和 Ki-67、PCNA、Bcl-2 蛋白表达量, 显著降低细胞凋亡率、Bax 蛋白水平及 TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B 蛋白水平 ($P < 0.05$)。与单独使用左旋卡尼汀或 CrkL 过表达比较, 左旋卡尼汀联合 CrkL 过表达明显提高 H9c2 细胞的活力和 Ki-67、PCNA、Bcl-2 蛋白表达量, 显著降低细胞凋亡率、Bax 蛋白水平及 TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B 蛋白水平 ($P < 0.05$)。**结论** 左旋卡尼汀联合 CrkL 可以促进缺氧复氧诱导的心肌细胞增殖, 降低细胞凋亡和炎症反应, 从而保护心肌细胞。

[中图分类号] R363; R5

[文献标识码] A

L-carnitine combined with CrkL reduces hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury

CAI Chanjuan¹, XU Zhanglun¹, WANG Liankai²

(1. Intervention Department of the First People's Hospital of Tianmen City, Tianmen, Hubei 431700, China; 2. Department of Cardiology, Minda Hospital Affiliated to Hubei University for Nationalities, Enshi, Hubei 445000, China)

[KEY WORDS] L-carnitine; CrkL; cardiomyocytes; hypoxia/reoxygenation; cell apoptosis; inflammatory factors

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of L-carnitine combined with CT10 regulator of kinase like protein (CrkL) on reducing myocardial cell injury induced by hypoxia/reoxygenation (H/R). **Methods** H9c2 cells were injured by H/R and treated with L-carnitine. CCK-8, flow cytometry, and Western blot were applied to determine cell proliferation, apoptosis, and nuclear associated antigen Ki67 (Ki-67), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), nuclear factor- κ B (NF- κ B), and CrkL levels, respectively. Cells H9c2 were transfected with pcDNA-CrkL, and treated with H/R or treated with H/R and L-carnitine. The above methods were used to detect cell proliferation and apoptosis. **Results** Compared with the control group, the viability, Ki-67, PCNA, Bcl-2, and CrkL protein expression of H9c2 cells were significantly decreased in the H/R group, and the apoptosis rate, Bax protein level, and the levels of inflammatory factors TNF- α , IL-1 β , NF- κ B were evidently increased ($P < 0.05$). Compared with the H/R group, L-carnitine obviously improved the H/R-induced H9c2 cell viability, Ki-67, PCNA, Bcl-2, and CrkL protein expression, and remarkably reduced the apoptosis rate, Bax protein level, and TNF- α , IL-1 β , NF- κ B levels ($P < 0.05$). CrkL overex-

[收稿日期] 2020-03-04

[修回日期] 2020-05-21

[基金项目] 湖北省卫生健康委重点支持项目 (WJ2019H139)

[作者简介] 蔡婵娟, 主管护师, 研究方向为心脏介入和外周介入护理与科研, E-mail 为 3071442202@qq.com。通信作者汪莲开, 硕士, 主任医师, 研究方向为冠心病、高血压、心脏瓣膜病等的诊治, E-mail 为 849257209@qq.com。

pression dramatically enhanced H/R-induced H9c2 cell viability, Ki-67, PCNA, and Bcl-2 protein expression, while markedly reduced apoptosis rates, Bax protein levels, TNF- α , IL-1 β , and NF- κ B levels ($P < 0.05$). Compared with L-carnitine or CrkL overexpression alone, L-carnitine combined with CrkL overexpression clearly increased the viability of H9c2 cells, Ki-67, PCNA, and Bcl-2 protein expression, and distinctly reduced the apoptosis rate and Bax protein level, TNF- α , IL-1 β , NF- κ B levels ($P < 0.05$). **Conclusion** L-carnitine combined with CrkL promotes the proliferation of cardiomyocytes induced by H/R, reduces apoptosis and inflammatory response, and thus protects cardiomyocytes from damage.

缺血性心脏病是世界范围内主要的死亡原因之一^[1]。通过冠状动脉再灌注可以提高患者的生存率。然而,再灌注本身也有可能引起致命的心肌损伤,这一过程被称为心肌缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤^[2]。心肌 I/R 损伤是急性心肌梗死、心脏骤停、经皮冠状动脉介入治疗和心脏外科手术等重要临床场景中发病和死亡的主要原因^[3-4]。因此,需要阐明心肌 I/R 损伤的潜在机制,以开发有效的治疗方法。既往研究表明,左旋卡尼汀(L-carnitine)对缺氧复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)诱导的乳鼠心肌细胞具有保护作用,可以降低 H/R 诱导的心肌细胞凋亡率^[5]。在缺血、缺氧刺激的心肌细胞中,左旋卡尼汀能够减轻细胞凋亡,保护心肌细胞免受缺血、缺氧损伤^[6]。左旋卡尼汀还可以降低 I/R 引起的心肌细胞凋亡^[7]。CT10 激酶调节子样蛋白(CT10 regulator of kinase like protein, CrkL)过表达时可抑制 H/R 导致的心肌细胞凋亡,增加细胞存活率^[8]。CrkL 在 H/R 刺激的 H9c2 细胞中低表达,过表达 CrkL 可抑制正常培养的 H9c2 心肌细胞凋亡,促进细胞存活,且显著抑制 H/R 诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡增加、存活力降低^[8-9]。然而左旋卡尼汀、CrkL 对 H/R 损伤 H9c2 细胞炎症因子分泌的影响,以及二者联用在心肌 I/R 损伤中的功能尚不清楚。鉴于此,本研究旨在考察左旋卡尼汀联合 CrkL 对 H/R 诱导的心肌细胞增殖、凋亡和炎症的影响,为心肌 I/R 损伤的治疗选择提供新的线索。

1 材料和方法

1.1 细胞与试剂

H9c2 细胞购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),DMEM 培养基购自美国 Sigma-Aldrich 公司,细胞计数试剂盒 8(cell counting kit-8, CCK-8)购自日本 Dojindo 公司,Annexin V-PI 凋亡试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,细胞核相关抗原 Ki-67(nuclear associated antigen Ki67, Ki-67)、增殖细胞核抗原

(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、B 细胞淋巴瘤/白血病 2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、CrkL、辣根过氧化物酶偶联的二抗购自英国 Abcam 公司。

1.2 细胞培养、转染与实验分组

H9c2 细胞在含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基中,在 5% CO₂ 培养箱中于 37 °C 孵育。细胞生长至 70% ~ 80% 汇合,将 H9c2 细胞置于 5% CO₂、94% N₂ 和 1% O₂ 的潮湿环境中缺氧 4 h,再复氧 12 h,建立 H/R 损伤模型^[10]。为了确定左旋卡尼汀或 CrkL 对 H/R 诱导的心肌细胞损伤的作用,将细胞分为:对照(Control)组:正常培养的 H9c2 细胞;模型(H/R)组:H/R 处理 H9c2 细胞;H/R + 左旋卡尼汀(1 μ mol/L)组:H/R 和 1 μ mol/L 左旋卡尼汀处理 H9c2 细胞;H/R + 左旋卡尼汀(2 μ mol/L)组:H/R 和 2 μ mol/L 左旋卡尼汀处理 H9c2 细胞;H/R + 左旋卡尼汀(5 μ mol/L)组:H/R 和 5 μ mol/L 左旋卡尼汀处理 H9c2 细胞。以 2 μ mol/L 的左旋卡尼汀进行后续实验。H/R+pcDNA-NC 组:转染 pcDNA-NC 和进行 H/R 处理;H/R+CrkL 组:转染 pcDNA-CrkL 和进行 H/R 处理;H/R+左旋卡尼汀+CrkL 组:转染 pcDNA-CrkL,进行 H/R 和 2 μ mol/L 左旋卡尼汀处理。其中,左旋卡尼汀预处理 24 h 后进行 H/R 处理。细胞转染时,根据 Lipofectamine 2000 试剂说明书的指示,将 pcDNA-NC、pcDNA-CrkL 转染到生长至 70% 汇合的 H9c2 细胞,转染 24 h 后进行其他处理。

1.3 CCK-8 检测细胞增殖

将 H9c2 细胞接种到 96 孔板(3×10^5 个/孔)中,并在 37 °C 和 5% CO₂ 下孵育 48 h。随后,将 CCK-8 试剂添加到每孔中,并将心肌细胞继续培养 4 h。使用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度(A)值。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡

将 H9c2 细胞以 1×10^6 个/孔接种在 6 孔板中,

经过不同处理后,用冰冷的 PBS 洗涤 2 次,细胞轻轻重悬于 500 μ L Annexin V 结合缓冲液中。然后 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI 添加到每组细胞中,轻轻摇动。在室温下孵育 10 min 后,使用 FAC-Scan 流式细胞仪在 488 nm 的激发波长和 530 nm 的发射波长下分析细胞凋亡。

1.5 Western blot 检测 Ki-67、PCNA、Bcl-2、Bax、TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B、CrkL 水平

收获不同处理的 H9c2 细胞,在加入蛋白酶抑制剂的放射免疫沉淀缓冲液中裂解。4 $^{\circ}$ C 下 12 000 g 离心 10 min,使用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白水平。之后用 10% ~ 12% SDS-PAGE 分离等量的蛋白(50 μ g),然后转移到聚偏二氟乙烯膜上。在室温下用 5% 的脱脂牛奶封闭 2 h,将膜与抗 Ki-67、PCNA、Bcl-2、Bax、TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B、CrkL(1 : 1 000)和 β -actin(1 : 2 000)抗体在 4 $^{\circ}$ C 下过夜。孵育后,将膜用 TBST 洗涤 3 次,然后用辣根过氧化物酶偶联的二抗(1 : 5 000)在室温下放置 2 h。使用增强的化学发光试剂将膜可视化,使用 Image J 软件对结

果进行定量。 β -actin 用作内对照。

1.6 统计学分析

数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据的比较采用 t 检验,多组数据间的比较采用单因素方差分析,组间多重比较使用 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

2 结果

2.1 左旋卡尼汀处理对缺氧复氧诱导的 H9c2 细胞增殖和凋亡的影响

CCK-8、流式细胞术、Western blot 检测结果显示,与对照组比较,H/R 组 H9c2 细胞的活力明显降低,细胞凋亡率显著增加,Ki-67、PCNA、Bcl-2 蛋白表达量明显减少,Bax 蛋白水平显著升高;与 H/R 组比较,左旋卡尼汀明显增加 H/R 诱导的 H9c2 细胞活力,显著减少细胞凋亡率,以及提高 Ki-67、PCNA、Bcl-2 蛋白表达水平,降低 Bax 蛋白水平($P < 0.05$,图 1 和图 2)。

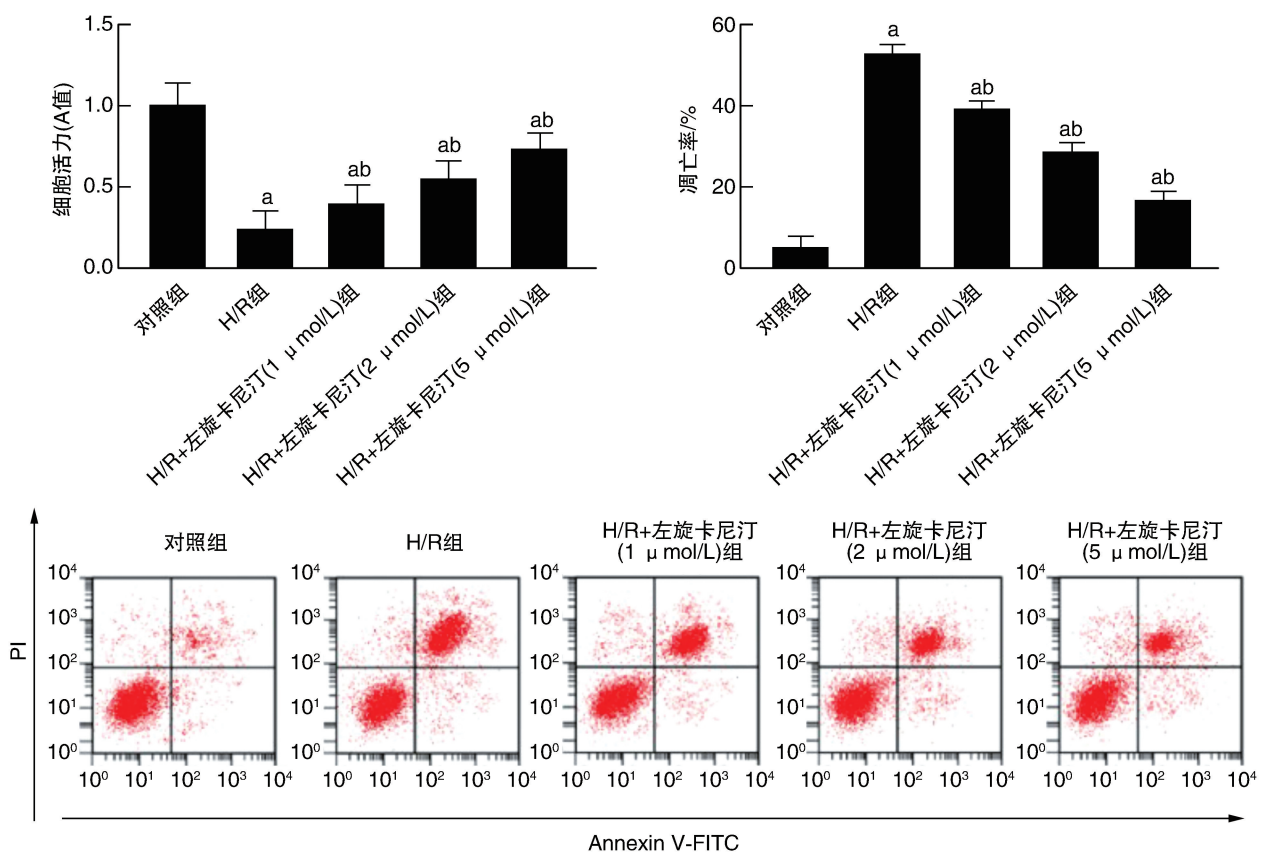


图 1. 不同浓度左旋卡尼汀对 H/R 诱导的 H9c2 细胞增殖与凋亡的影响($n=3$)

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 H/R 组比较。

Figure 1. Effect of different concentrations of L-carnitine on proliferation and apoptosis in H9c2 cells induced by H/R ($n=3$)

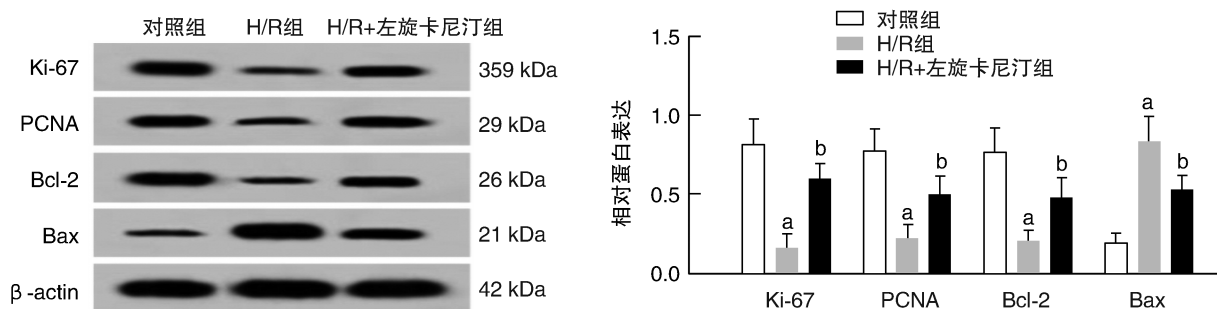


图 2. 左旋卡尼汀处理对 H/R 诱导的 H9c2 细胞增殖和凋亡相关蛋白表达水平的影响 ($n=3$)

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 H/R 组比较。

Figure 2. Effects of L-carnitine treatment on expression of proliferation and apoptosis-related protein in H9c2 cells induced by H/R ($n=3$)

2.2 左旋卡尼汀处理对 H/R 诱导的 H9c2 细胞炎症因子表达的影响

Western blot 检测结果表明, 与对照组比较, H/R 组 H9c2 细胞炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B 的水平明显提高; 与 H/R 组比较, 左旋卡尼汀显著降低 H/R 诱导的 H9c2 细胞中 TNF- α 、IL-1 β 和 NF- κ B 表达水平 ($P<0.05$, 图 3)。

2.3 左旋卡尼汀处理促进 H/R 诱导的 H9c2 细胞 CrkL 的表达

Western blot 检测结果显示, 与对照组比较, H/R 组 H9c2 细胞内 CrkL 蛋白表达量明显减少; 与 H/R 组比较, 左旋卡尼汀显著提高 H/R 诱导的 H9c2 细胞中 CrkL 蛋白水平 ($P<0.05$, 图 4)。

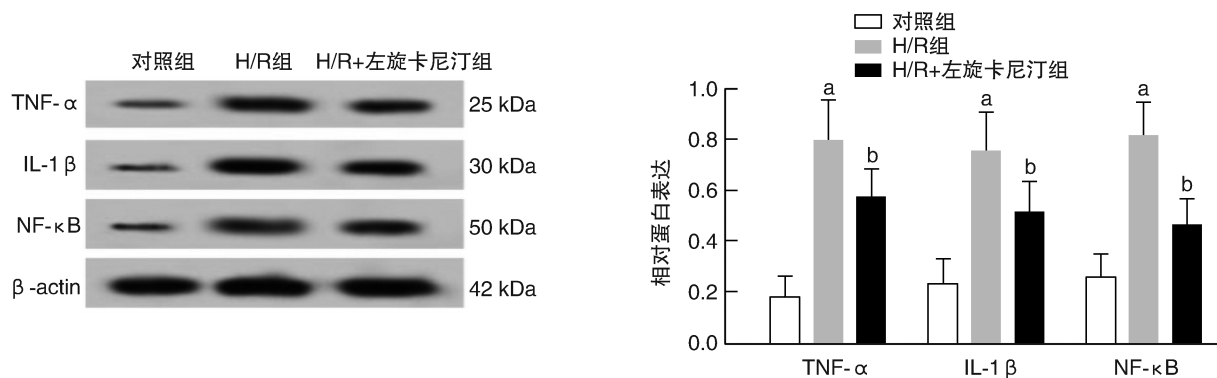


图 3. 左旋卡尼汀处理对 H/R 诱导的 H9c2 细胞炎症因子表达的影响 ($n=3$)

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 H/R 组比较。

Figure 3. Effects of L-carnitine treatment on the expression of inflammatory factors in H9c2 cells induced by H/R ($n=3$)

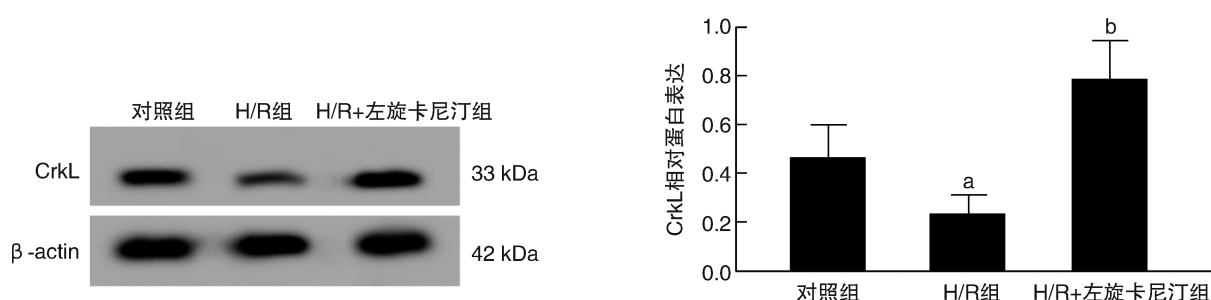


图 4. 左旋卡尼汀处理对 H/R 诱导的 H9c2 细胞 CrkL 表达的影响 ($n=3$)

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 H/R 组比较。

Figure 4. Effect of L-carnitine treatment on the expression of CrkL in H9c2 cells induced by H/R ($n=3$)

2.4 CrkL 过表达对 H/R 诱导的 H9c2 细胞增殖和凋亡的影响

CCK-8、流式细胞术、Western blot 检测结果表明,与对照组比较,H/R 组 H9c2 细胞的活力明显降低,细胞凋亡率显著增加,且 Ki-67、PCNA、Bcl-2 蛋

白水平明显降低,Bax 蛋白表达量显著升高;与 H/R 组比较,CrkL 过表达明显增加 H/R 诱导的 H9c2 细胞活力,显著降低细胞凋亡率,并提高 Ki-67、PCNA、Bcl-2 蛋白水平,减少 Bax 蛋白表达量($P < 0.05$,图 5 和图 6)。

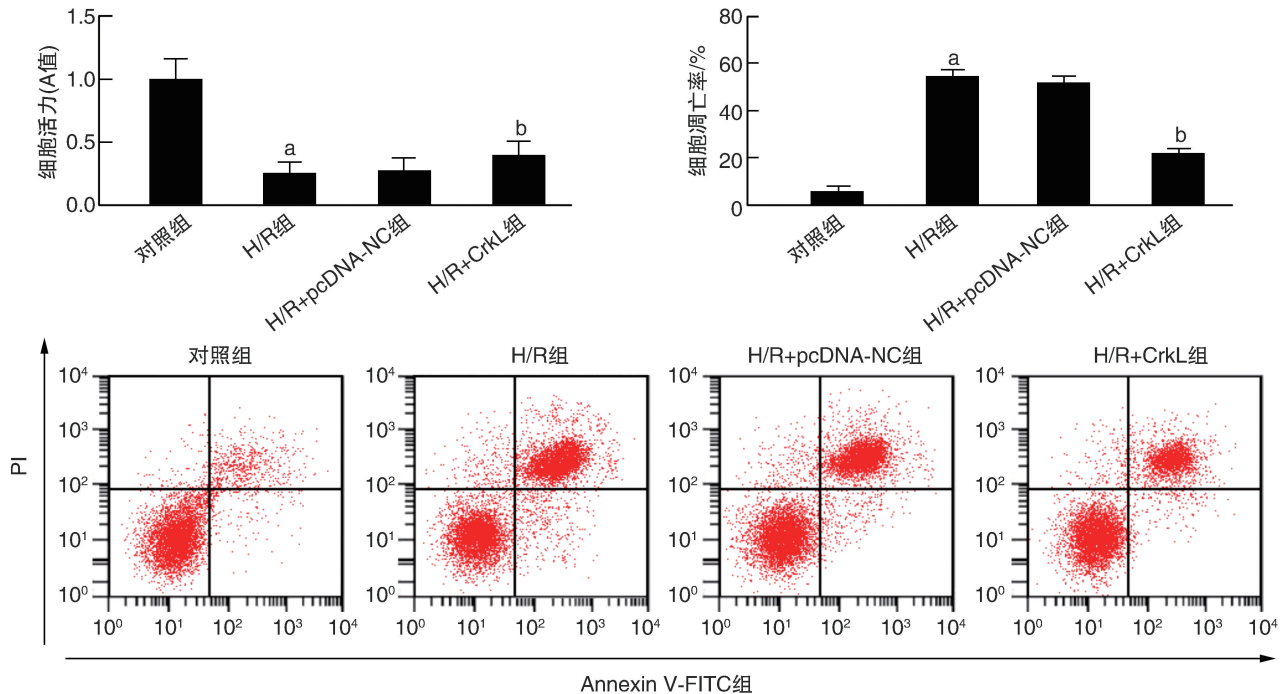


图 5. CrkL 过表达对 H/R 诱导的 H9c2 细胞增殖和凋亡的影响($n=3$)

a 为 $P < 0.05$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 H/R 组比较。

Figure 5. The effect of CrkL overexpression on proliferation and apoptosis in H9c2 cells induced by H/R ($n=3$)

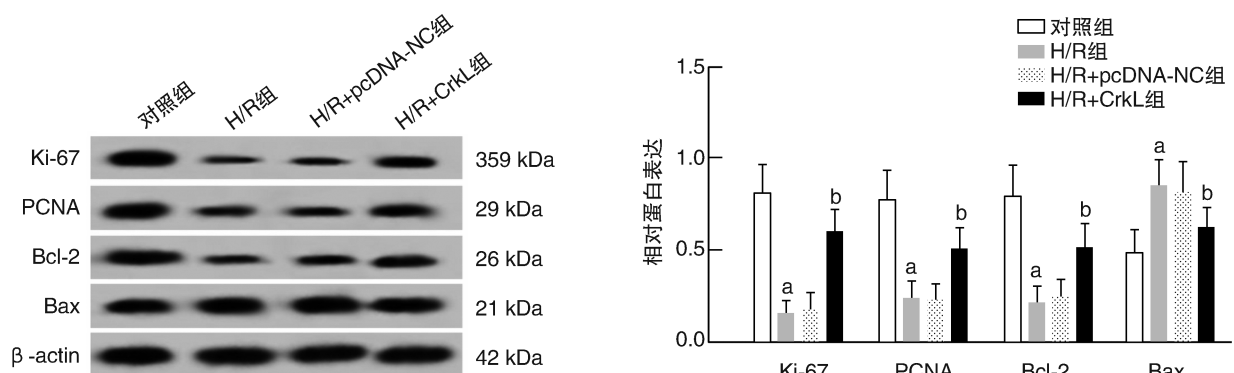


图 6. CrkL 过表达对 H/R 诱导的 H9c2 细胞增殖和凋亡相关蛋白表达的影响($n=3$)

a 为 $P < 0.05$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 H/R 组比较。

Figure 6. Effect of CrkL overexpression on expression of proliferation and apoptosis-related protein in H9c2 cells induced by H/R ($n=3$)

2.5 CrkL 过表达对 H/R 诱导的 H9c2 细胞炎症因子表达的影响

Western blot 检测结果发现,与对照组比较,H/R

组 H9c2 细胞的 TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B 表达明显增加;与 H/R 组比较,CrkL 过表达明显减少 H/R 诱导的 H9c2 细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B 表达($P <$

0.05,图7)。

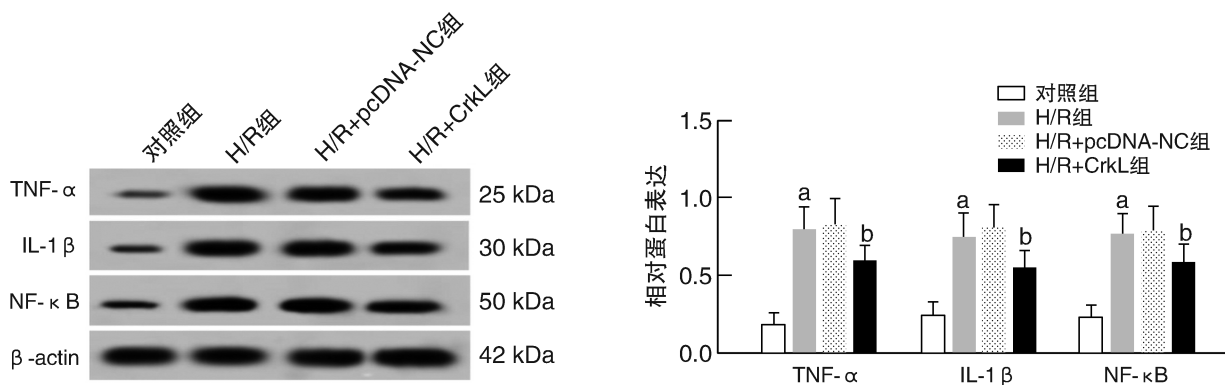


图7. CrkL 过表达对外/R诱导的H9c2细胞炎症因子表达的影响($n=3$)

a 为 $P<0.05$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,与 H/R 组比较。

Figure 7. Effect of CrkL overexpression on the expression of inflammatory factors in H9c2 cells induced by H/R ($n=3$)

2.6 左旋卡尼汀联合 CrkL 过表达对外/R诱导的H9c2细胞增殖、凋亡和炎症因子表达的影响

CCK-8、流式细胞术、Western blot 检测结果显示,与对照组比较,H/R组H9c2细胞的活力、Ki-67、PCNA、Bcl-2蛋白表达量明显减少,细胞凋亡率、Bax蛋白水平及TNF-α、IL-1β、NF-κB水平显著升高;与H/R组比较,左旋卡尼汀或CrkL过表达明显增加H/R诱导的H9c2细胞活力和Ki-67、PCNA、

Bcl-2蛋白表达量,显著降低细胞凋亡率、Bax蛋白水平及TNF-α、IL-1β、NF-κB水平;与H/R+左旋卡尼汀组或H/R+CrkL组比较,H/R+左旋卡尼汀+CrkL组H9c2细胞的活力、Ki-67、PCNA、Bcl-2蛋白表达量明显升高,细胞凋亡率、Bax蛋白水平及TNF-α、IL-1β、NF-κB水平显著降低($P<0.05$,图8、图9和图10)。

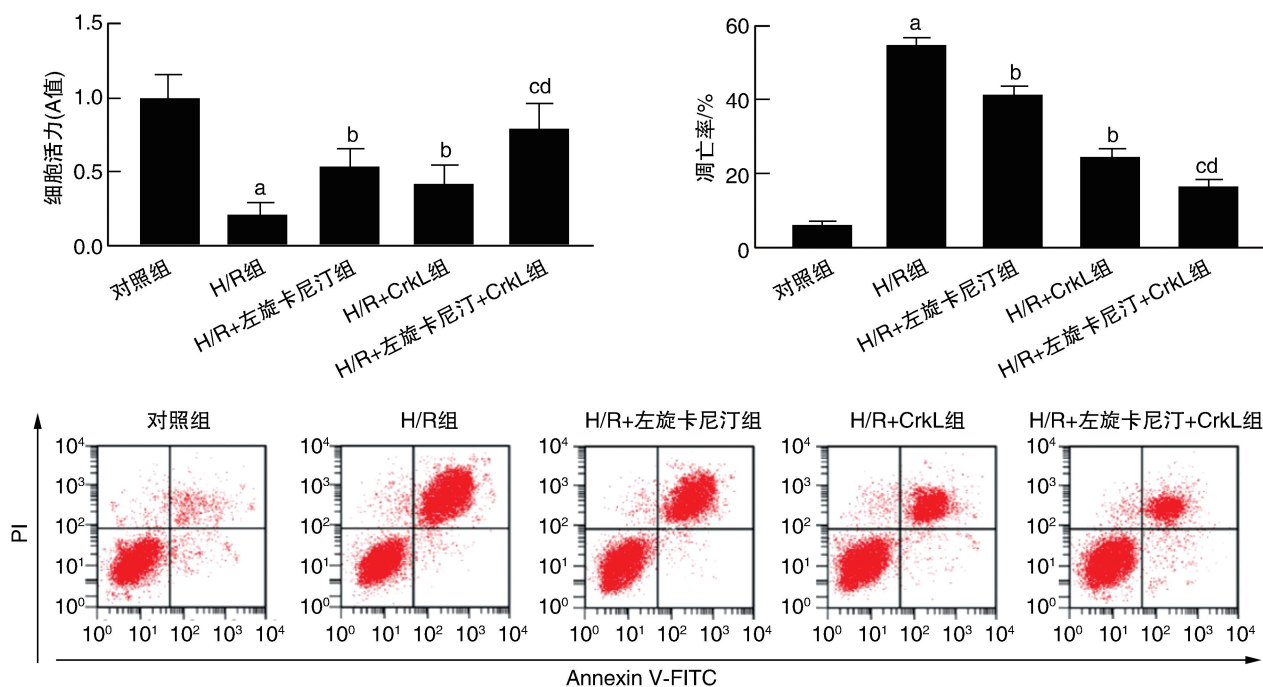


图8. 左旋卡尼汀联合 CrkL 过表达对外/R诱导的H9c2细胞增殖和凋亡的影响($n=3$)

a 为 $P<0.05$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,与 H/R 组比较;c 为 $P<0.05$,与 H/R+左旋卡尼汀组比较;d 为 $P<0.05$,与 H/R+CrkL 组比较。

Figure 8. Effect of L-carnitine combined with CrkL overexpression on proliferation and apoptosis in H9c2 cells induced by H/R ($n=3$)

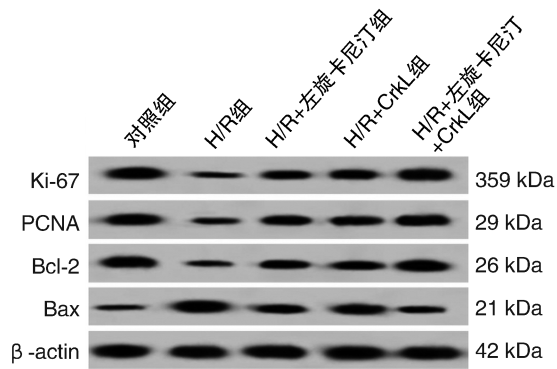


图9. 左旋卡尼汀联合 CrkL 过表达对 H/R 诱导的 H9c2 细胞增殖和凋亡相关蛋白表达的影响 ($n=3$)

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 H/R 组比较; c 为 $P<0.05$, 与 H/R+左旋卡尼汀组比较; d 为 $P<0.05$, 与 H/R+CrkL 组比较。

Figure 9. Effects of L-carnitine combined with CrkL overexpression on the expression of proliferation and apoptosis-related proteins in H9c2 cells induced by H/R ($n=3$)

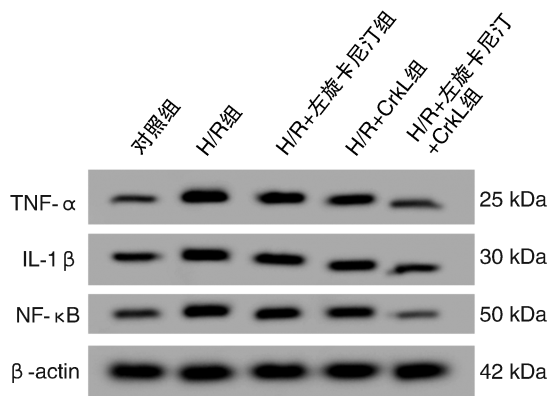
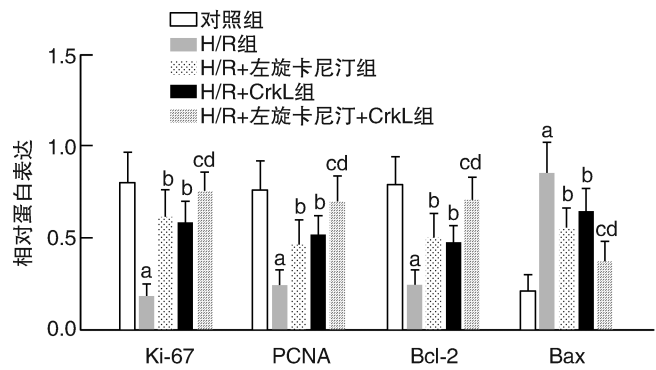
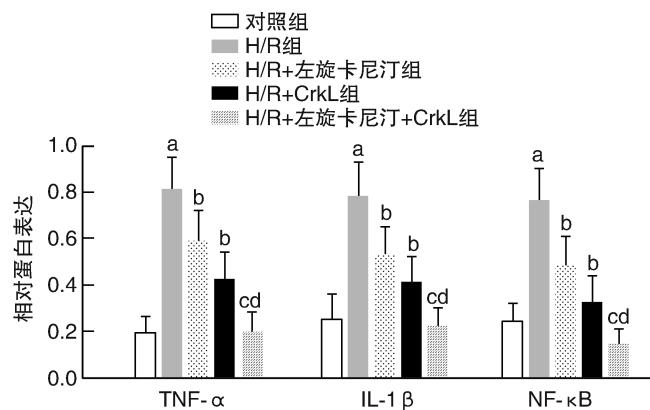


图10. 左旋卡尼汀联合 CrkL 过表达对 H/R 诱导的 H9c2 细胞炎症因子表达的影响 ($n=3$)

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 H/R 组比较; c 为 $P<0.05$, 与 H/R+左旋卡尼汀组比较; d 为 $P<0.05$, 与 H/R+CrkL 组比较。

Figure 10. Effect of L-carnitine combined with CrkL overexpression on the expression of inflammatory factors in H9c2 cells induced by H/R ($n=3$)



3 讨论

目前, 心肌 I/R 损伤的分子机制尚未明确。本研究中, 通过用 H/R 刺激 H9c2 细胞建立了 I/R 细胞模型, 以评估左旋卡尼汀和 CrkL 在心肌 I/R 损伤中的潜在作用。值得注意的是, 左旋卡尼汀或过表达 CrkL 可保护 H9c2 细胞免受 H/R 诱导的细胞损伤和减轻炎症反应, 并且左旋卡尼汀与过表达 CrkL 联合的保护效果显著优于二者单独使用。

H/R 会抑制 H9c2 细胞的增殖, 表现为细胞活力降低^[11], 细胞增殖相关蛋白 Ki-67、PCNA 被下调; 并且, H9c2 细胞发生凋亡^[12], 伴随着抗凋亡蛋白 Bcl-2 的下调和促凋亡蛋白 Bax 的上调。此外, H9c2 细胞在 H/R 处理后产生炎症反应^[13], 炎症因子 TNF-α、IL-1β、NF-κB 表达增加。越来越多的文献报道了左旋卡尼汀在心肌细胞损伤中的保护作

用^[14], 左旋卡尼汀有助于长链脂肪酸转运到线粒体基质中, 通过减少氧化应激、心肌细胞的炎症和坏死而触发心脏保护作用^[15]。左旋卡尼汀预处理在 I/R 后可显著改善心脏功能, 抑制心肌细胞凋亡, 降低 Bax 表达水平, 增加 Bcl-2 蛋白表达, 其对心肌缺血损伤的心脏保护作用可能与 PI3K/Akt 信号通路有关^[16]。左旋卡尼汀可以保护心肌细胞免受氧化应激相关的损害, 防止活性氧形成并在高血糖情况下激活抗氧化信号通路^[17]。本研究提供了新的体外证据, 发现左旋卡尼汀可能对 H/R 诱导的心肌细胞损伤具有保护作用, 能够促进细胞增殖, 并抑制凋亡, 与前人研究^[5-7]一致。此外, 左旋卡尼汀对 H/R 诱导的 H9c2 细胞炎症因子表达具有抑制作用, 提示左旋卡尼汀发挥保护心肌免受 I/R 损伤的作用可能是通过促进细胞增殖、减轻凋亡和炎症反应来实现的。

CrkL 基因是喉鳞状细胞癌、胃癌、宫颈癌、乳腺癌等多种人类肿瘤的重要调节因子,参与细胞的增殖、凋亡、侵袭等生物学过程^[18-21]。过表达 CrkL 保护心肌免受 I/R 损伤的作用已有报道^[8-9]。microRNA-429(miR-429)的下调可以通过促进 CrkL 的表达并抑制 MEK/ERK 信号通路的激活,减轻氧化应激、炎症反应和心肌细胞凋亡,而对冠心病大鼠的心肌损伤产生保护作用^[22]。在 H/R 诱导 H9c2 心肌细胞损伤中,敲低 CrkL 可以增加细胞凋亡并抑制细胞增殖和存活;相比之下,CrkL 的过表达可以通过调节 Bax 和细胞外信号调节激酶 1/2 的磷酸化改善 H9c2 心肌细胞损伤^[23]。本实验中,同样发现过表达 CrkL 促进 H/R 诱导的 H9c2 细胞增殖和抑制细胞凋亡,与前述报道相符。同时,过表达 CrkL 对 H/R 引起的 H9c2 细胞炎症反应显示出一定的抑制作用,即抑制炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B 的表达。而相比于单独使用左旋卡尼汀或 CrkL 过表达,左旋卡尼汀联合 CrkL 过表达明显提高 H9c2 细胞的活力和 Ki-67、PCNA、Bcl-2 蛋白表达量,显著降低细胞凋亡率、Bax 蛋白水平及 TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B 水平。

总之,本研究表明,左旋卡尼汀或过表达 CrkL 可以促进 H/R 诱导的 H9c2 细胞增殖,抑制细胞凋亡,并减轻炎症反应,以保护 H9c2 细胞免受 H/R 诱导的细胞损伤,二者联合应用效果更显著。这些发现可能有助于左旋卡尼汀在心血管疾病中的临床应用。

[参考文献]

- [1] Zhu P, Yang M, He H, et al. Curcumin attenuates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury by downregulating Notch signaling[J]. Mol Med Rep, 2019, 20(2): 1541-1550.
- [2] Ma K, Qiu J, Zhou M, et al. Cox-2 negatively affects the protective role of propofol against hypoxia/reoxygenation induced cardiomyocytes apoptosis through suppressing Akt signaling[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 7587451.
- [3] He X, Li S, Liu B, et al. Major contribution of the 3/6/7 class of TRPC channels to myocardial ischemia/reperfusion and cellular hypoxia/reoxygenation injuries[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(23): E4582-E4591.
- [4] Li X, Wu N, Zou L, et al. Protective effect of celastrol on myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Anatol J Cardiol, 2017, 18(6): 384-390.
- [5] 郭文怡, 杨勇, 贾国良, 等. 左旋卡尼汀对缺氧/复氧诱导的心肌细胞氧化、凋亡影响的体外研究[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(1): 72-76.
- [6] 荆翠平, 陈丽娟, 刘磊, 等. 左旋卡尼汀对大鼠缺血心肌细胞凋亡相关蛋白表达的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(12): 1098-1100.
- [7] 马兰香, 贾国良, 赵新国, 等. 左旋卡尼汀对兔缺血/再灌注心肌细胞死亡及心脏功能的影响[J]. 现代医学, 2004, 32(1): 18-21.

- [8] 张蕾, 李刚, 张志升, 等. 过表达 CrkL 对缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡和生存力的影响及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2014, 39(6): 433-438.
- [9] 朱炳豹. 过表达 CrkL 对 H9c2 心肌细胞株生物学行为的影响[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2011.
- [10] Sun MY, Ma DS, Zhao S, et al. Salidroside mitigates hypoxia/reoxygenation injury by alleviating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in H9c2 cardiomyocytes[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(4): 3760-3768.
- [11] Chen Y, Wang H, Zhang Y, et al. Pretreatment of ghrelin protects H9c2 cells against hypoxia/reoxygenation-induced cell death via PI3K/Akt and AMPK pathways[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 2179-2187.
- [12] Cheng F, Yuan W, Cao M, et al. Cyclophilin A protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis via the Akt/Nox2 pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 2717986.
- [13] Zhou S, Wen H, Cai W, et al. Effect of hypoxia/reoxygenation on the biological effect of IGF system and the inflammatory mediators in cultured synoviocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 508(1): 17-24.
- [14] da Silva Guimarães S, de Souza Cruz W, da Silva L, et al. Effect of L-carnitine supplementation on reverse remodeling in patients with ischemic heart disease undergoing coronary artery bypass grafting: a randomized, placebo-controlled trial[J]. Ann Nutr Metab, 2017, 70(2): 106-110.
- [15] Wang Z Y, Liu Y Y, Liu G H, et al. L-carnitine and heart disease[J]. Life Sci, 2018, 194: 88-97.
- [16] Xue M, Chen X, Guo Z, et al. L-carnitine attenuates cardiac dysfunction by ischemic insults through Akt signaling pathway[J]. Toxicol Sci, 2017, 160(2): 341-350.
- [17] Vacante F, Senesi P, Montesano A, et al. L-carnitine: an antioxidant remedy for the survival of cardiomyocytes under hyperglycemic condition[J]. J Diabetes Res, 2018, 2018: 4028297.
- [18] Marszałek A, Bartochowska A, Grenman R, et al. Copy number gains of the putative CrkL oncogene in laryngeal squamous cell carcinoma result in strong nuclear expression of the protein and influence cell proliferation and migration[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 24-32.
- [19] Feng R, Li J, Sah BK, et al. Overexpression of CrkL as a novel biomarker for poor prognosis in gastric cancer[J]. Cancer Biomark, 2019, 26(2): 131-138.
- [20] Song Q, Yi F, Zhang Y, et al. CrkL regulates alternative splicing of cancer-related genes in cervical cancer samples and HeLa cell[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 499-514.
- [21] Srinivasan S, Godin B. Increased soluble CrkL in serum of breast cancer patients is associated with advanced disease[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(7): 961-973.
- [22] Yang Q, Li J, Zhang H, et al. Down-regulation of microRNA-429 alleviates myocardial injury of rats with coronary heart disease[J]. Cell Cycle, 2019, 18(19): 2550-2565.
- [23] Zhang ZS, Yang DY, Fu YB, et al. Knockdown of CrkL by shRNA deteriorates hypoxia/reoxygenation-induced H9c2 cardiomyocyte apoptosis and survival inhibition via Bax and downregulation of p-Erk1/2[J]. Cell Biochem Funct, 2015, 33(2): 80-88.

(此文编辑 许雪梅)