

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

林春喜¹, 林建聪², 郭润民³, 沈宁³, 冯鉴强³, 郑东诞²

(中山大学 1. 附属第一医院 CCU 科, 2. 附属第一医院黄埔院区内科; 3. 中山医学院生理学教研室, 广东省广州市 510080)

[关键词] 硫化氢; JNK 通路; 活性氧; 细胞毒性; 线粒体膜电位; 氧化应激损伤

[摘要] **目的** 研究 JNK 通路在高糖诱导的心肌细胞损伤中的作用及硫化氢是否通过调控 JNK 通路保护心肌细胞对抗高糖引起的损伤。**方法** 应用高浓度葡萄糖处理 H9c2 心肌细胞以建立高糖损伤的细胞模型。应用 CCK-8 比色法测定细胞存活率, DCFH-DA 染色荧光显微镜照相测定细胞内活性氧水平, Rh123 染色荧光显微镜照相测定线粒体膜电位, Western blot 测定 JNK 蛋白的表达。**结果** 高浓度葡萄糖对 H9c2 心肌细胞具有明显的损伤作用, 表现为细胞存活率降低, 活性氧生成增多和线粒体膜电位丢失, 并能促进心肌细胞内磷酸化 JNK 的表达; N-乙酰-半胱氨酸和 JNK 抑制剂 SP600125 预处理 30 min 均能阻断高浓度葡萄糖引起的细胞毒性; 400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 预处理 30 min, 不仅能抑制高糖引起的心肌细胞损伤, 使细胞存活率升高、活性氧生成减少以及线粒体膜电位丢失减少, 还能抑制高糖对心肌细胞磷酸化 JNK 表达的上调作用。**结论** 活性氧和 JNK 通路介导高糖引起的 H9c2 心肌细胞损伤; 硫化氢可通过抑制氧化应激和 JNK 通路保护心肌细胞对抗高糖引起的损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Hydrogen Sulfide Protects Against High Glucose-Induced Oxidative Stress Injury by Modulating JNK Pathway in H9c2 Cardiac Cells

LIN Chun-Xi¹, LIN Jian-Cong², GUO Run-Min³, SHEN Ning³, FENG Jian-Qing³, and ZHENG Dong-Dan²

(Sun Yat-sen University 1. Department of Cardiac Care Unit, the First Affiliated Hospital; 2. Department of Internal Medicine, Huangpu Division of the Affiliated Hospital; 3. Department of Physiology, Zhongshan School of Medicine, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[KEY WORDS] Hydrogen Sulfide; JNK Pathway; Reactive Oxygen Species; Cytotoxicity; Mitochondrial Membrane Potential; Oxidative Stress Injury

[ABSTRACT] **Aim** To explore the role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway in high glucose-induced cardiomyocyte injury and whether hydrogen sulfide (H_2S) protects cardiomyocytes against high glucose-induced injury by modulating JNK pathway. **Methods** H9c2 cells were treated with high glucose to establish a model of cardiac cell injury.

CCK-8 was used to detect cell viability, intracellular level of reactive oxygen species (ROS) was measured by DCFH-DA staining and photofluorography, mitochondrial membrane potential (MMP) was tested by Rh123 staining and photofluorography, the activation of JNK protein was measured by Western blot assay. **Results** Glucose at high concentration induced obvious injury of H9c2 cells, leading to a decrease in cell viability, an increase in ROS generation and MMP loss, as well as upregulation of phosphorylated JNK expression; Pretreatment with N-acetyl-L-cysteine (NAC), a ROS scavenger or SP600125 (an inhibitor of JNK) for 30 min inhibited high glucose-induced cytotoxicity; Pretreatment with 400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS (a donor of H_2S) for 30 min prior to exposure of H9c2 cells to high glucose blocked high glucose-induced injuries, evidenced by an increase in cell viability, decreases in ROS generation and loss of MMP, along with inhibition of phosphorylated JNK expression induced by high glucose. **Conclusion** Both ROS and JNK pathway mediate H9c2 cardiac cell injury induced by high glucose, H_2S may protect cardiac cells against high glucose-induced injury by inhibiting oxidative stress and JNK pathway.

[收稿日期] 2012-09-17

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81200606); 广东省科技计划项目(2012B031800313 和 2012B031800358)

[作者简介] 林春喜, 主管护师, 研究方向为心血管疾病的损伤与保护。林建聪, 主治医师, 研究方向为心肺的损伤机制与保护。郭润民, 博士, 主治医师, 研究方向为心肾的损伤机制与保护。通讯作者郑东诞, 硕士, 副主任医师, 研究方向为心血管疾病的损伤机制与保护, E-mail 为 zhengdongdan@126.com。

糖尿病是一种常见的代谢障碍性疾病,并发症多,如动脉硬化、高血压及心肌损伤等,其中糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)是糖尿病患者的一种独立心脏并发症(不依赖心肌缺血和高血压),发病率高,危害大。近30年来,氧化应激在DCM发病机制中的作用一直是人们关注的重点之一^[1-3]。活性氧(reactive oxygen species, ROS)可通过氧化蛋白质、催化脂类物质为活性氧化物质及损伤DNA等方式损伤线粒体及其他细胞成分,甚至引起心肌细胞凋亡^[4]。而且,氧化应激被认为是丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族的成员之一, JNK通路的上游刺激。最近报道指出, JNK通路是治疗糖尿病和胰岛素抵抗的新靶点,在胰岛素抵抗时被激活^[5],提示JNK可能参与高糖引起的心肌损伤。

硫化氢(H₂S)是继一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)之后被发现的第三种内源性气体信号分子^[6],具有抗氧化作用和心肌保护作用^[7,8]。最近,我们证实H₂S可通过抑制ROS生成保护心肌细胞对抗化学性缺氧引起的损伤^[7,8]及抑制化学性缺氧对JNK的激活作用^[9]。因此,本研究推测H₂S可通过抗氧化应激及调控JNK通路保护心肌细胞对抗高浓度葡萄糖引起的损伤。

为了验证上述问题,本研究在H9c2心肌细胞建立高糖损伤模型,重点探讨H₂S能否抑制高糖引起的心肌细胞损伤以及H₂S的心肌细胞保护作用是否与抑制氧化应激及JNK通路有关。

1 材料和方法

1.1 材料

NaHS、Hoechst33258、DCFH-DA和Rh123购自美国Sigma Aldrich公司, CCK-8试剂盒购自日本Dojindo Lab, DMEM-F12培养基购自Gibco公司, 抗JNK、p-JNK和SB302580(p38抑制剂)购自Cell Signaling technology Inc (CST)。

1.2 心肌细胞培养

H9c2心肌细胞在37℃、5% CO₂条件下培养于含有10%胎牛血清的DMEM-F12培养基中。

1.3 实验分组及预处理方式

实验分组:①对照组;②高浓度葡萄糖(high glucose, HG)处理组(HG组):分别应用20、40和80 mmol/L葡萄糖处理H9c2心肌细胞36 h;③NaHS预处理+高浓度葡萄糖处理组(NaHS+HG组):在80 mmol/L葡萄糖处理H9c2细胞之前,应用400 μmol/L NaHS预处理30 min;④NAC预处理+高浓

度葡萄糖处理组(NAC+HG组):在80 mmol/L葡萄糖处理H9c2细胞前,分别应用不同浓度(0.5、1和1.5 mmol/L) NAC预处理1 h;⑤JNK抑制剂预处理+高浓度葡萄糖处理组(SP600125+HG组):在80 mmol/L处理H9c2细胞前,应用JNK抑制剂SP600125(20 μmol/L)预处理30 min;⑥单独NaHS处理组:应用400 μmol/L NaHS处理H9c2细胞30 min;⑦单独NAC处理组:应用1.5 mmol/L NAC处理H9c2细胞1 h;⑧单独JNK抑制剂处理组:应用20 μmol/L SP600125处理H9c2细胞30 min。

1.4 细胞存活率的测定

H9c2心肌细胞接种于96孔培养板中,当细胞生长到培养孔的约80%面积时,根据实验需要进行不同的处理:80 mmol/L葡萄糖培养36 h, 400 μmol/L NaHS提前30 min加入培养基中作为预处理,然后更换成80 mmol/L继续培养36 h,每个处理因素设4个复孔。终止培养后,每孔加入10 μL CCK-8,轻摇,37℃孵育3 h,用酶标仪(λ=450 nm)记录各孔的吸光度(OD)。取4孔OD值的平均数,按公式计算细胞存活率,细胞存活率(%)=处理组OD/对照组OD×100%,重复3次。

1.5 细胞内ROS水平的测定

将赖氨酸包被的盖玻片置于6孔培养板内, H9c2心肌细胞被均匀地接种于盖玻片上。当细胞生长到培养孔的约80%面积时,根据实验需要给予相应的处理:80 mmol/L葡萄糖处理4 h; 400 μmol/L NaHS预处理30 min后,再用80 mmol/L葡萄糖处理4 h;单纯用400 μmol/L NaHS处理30 min,每组均包括3个复孔。处理完成后,用PBS漂洗盖玻片2次,用10 μmol/L DCFH-DA染液于37℃孵育30 min。在荧光显微镜下随机选取5个不重复区摄片,用ImageJ 1.41o软件分析5个视野绿色荧光强度的平均值,再对每组的各样本进行统计分析。

1.6 线粒体膜电位的测定

将赖氨酸包被的盖玻片置于6孔培养板内, H9c2心肌细胞被均匀地接种于盖玻片上,每组均包括3个复孔。处理完成后,盖玻片用PBS洗2次,在含100 μg/L Rh123的无血清培养基中37℃孵育45 min,在荧光显微镜下随机选取5个不重复区摄片,细胞核周围绿色的亮点即为摄取了Rh123的线粒体。用ImageJ 1.41o软件分析5个视野的绿色荧光强度平均值,再对每组的各样本进行统计分析。

1.7 Western blot 测定 JNK 蛋白的表达

H9c2心肌细胞接种于60 mm培养皿中,各实验组给予不同的处理因素后,用预冷的PBS洗2

次,加入细胞裂解液,4℃静置 30 min,12000 r/min 离心 10 min,取上清,采用 BCA 法进行蛋白定量。总蛋白经 SDS-PAGE 分离后,转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h,随后加入抗 JNK、p-JNK 抗体(1:1000,4℃过夜,用 TBST 洗 3 次,每次 10 min)。将 PVDF 膜用发光试剂 ECL 显色,暗室曝光到 X 线片上,凝胶成像系统扫描分析结果。

1.8 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),用 LSD-t 进行均数之间的比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $n = 3$ 。

2 结果

2.1 硫化氢降低心肌细胞对高糖引起的细胞毒性

20~80 mmol/L 葡萄糖处理 36 h 呈浓度依赖性地抑制 H9c2 心肌细胞的存活率,其中 80 mmol/L 葡萄糖使心肌细胞的存活率明显降低,至 $66.7\% \pm 6.2\%$ ($P < 0.01$;图 1A)。因此,在后续实验中,应用 80 mmol/L 葡萄糖处理 36 h 作为有效的损伤浓度及作用时间。400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 预处理 H9c2 心肌细胞 30 min 对细胞存活率无明显影响,但能显著地对抗 80 mmol/L 葡萄糖对心肌细胞的毒性作用,使细胞存活率从 $66.7\% \pm 6.2\%$ 增加至 82.3 ± 7.5 ($P < 0.05$;图 1B)。

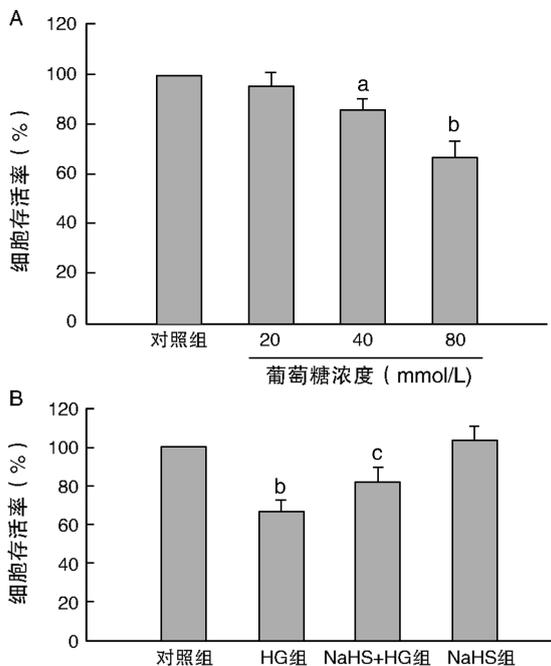


图 1. 不同浓度的葡萄糖对 H9c2 心肌细胞存活率的影响及硫化氢的保护作用 a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 HG 组比较。

Figure 1. Effect of the different concentrations of glucose on the cell viability of H9c2 cells and NaHS protection

2.2 硫化氢抑制心肌细胞对高糖引起的氧化应激反应

80 mmol/L 葡萄糖使 H9c2 心肌细胞内 DHR 的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)明显增多,表示 ROS 水平明显升高($P < 0.05$)。但是,400 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 预处理 30 min 能明显地抑制高糖引起的氧化应激反应,使 DHR 的 MFI 从 19.6 ± 3.7 降低至 13.4 ± 2.9 ($P < 0.05$;图 2)。

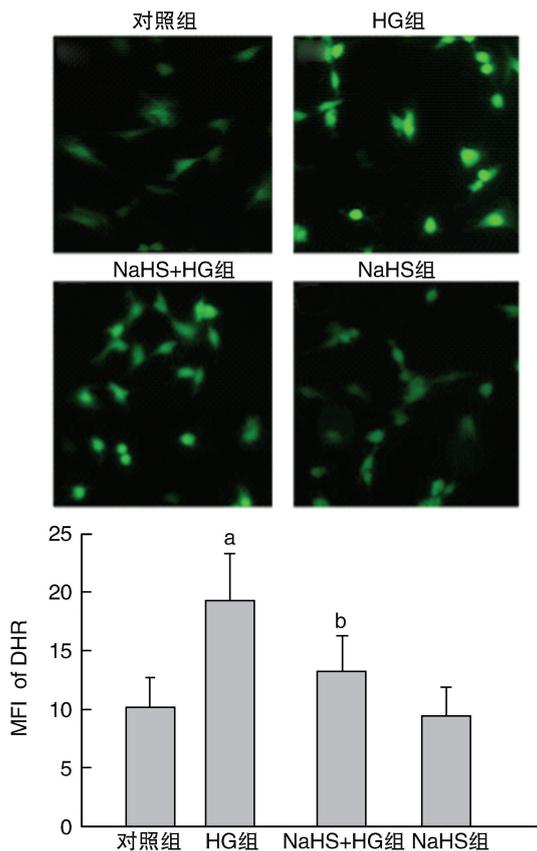


图 2. 硫化氢抑制高糖引起的心肌细胞内 ROS 堆积 a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 HG 组比较。

Figure 2. NaHS inhibits high concentration of glucose-induced ROS accumulation in H9c2 cells

2.3 ROS 抑制剂和 JNK 抑制剂降低心肌细胞对高糖引起的细胞毒性

0.5、1 和 1.5 mmol/L NAC 预处理 1 h 呈浓度依赖性地对抗 80 mmol/L 葡萄糖引起的心肌细胞毒性,其中 1.5 mmol/L NAC 使细胞存活率从 $66.7\% \pm 6.2\%$ 明显升高至 $85.3\% \pm 9.4\%$ ($P < 0.01$),提示 ROS 可能在高糖引起的心肌毒性中起重要的作用。应用 20 $\mu\text{mol/L}$ SP600125 预处理心肌细胞 30 min 能明显地阻断 80 mmol/L 葡萄糖引起的细胞毒性,使细胞存活率从 $66.7\% \pm 6.2\%$ 升高至 $80.5\% \pm 7.9\%$ (图 3; $P < 0.05$)。

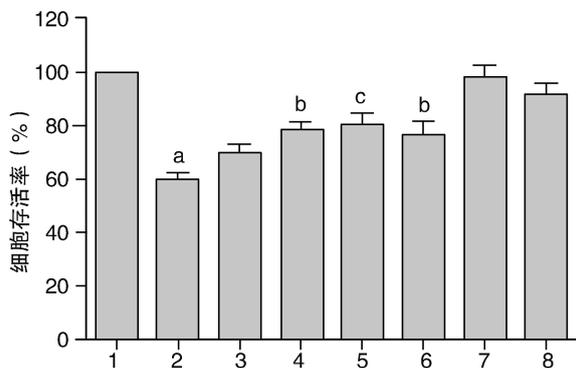


图3. ROS抑制剂和JNK抑制剂降低高糖引起的心肌细胞毒性 1为对照组,2为HG组,3为0.5 mmol/L NAC + HG组,4为1 mmol/L NAC + HG组,5为1.5 mmol/L NAC + HG组,6为SP600125 + HG组,7为NAC组,8为SP600125组。a为 $P < 0.01$,与对照组比较;b为 $P < 0.05$,c为 $P < 0.01$,与HG组比较。

Figure 3. Both ROS inhibitor and JNK inhibitor attenuated high concentration of glucose-induced cytotoxicity in H9c2 cells

2.4 硫化氢保护心肌细胞对抗高糖引起的线粒体膜电位丢失

80 mmol/L 葡萄糖处理 H9c2 心肌细胞 36 h 可使胞内 Rh123 的 MFI 明显减少。400 μ mol/L NaHS 预处理 30 min 对线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 无明显影响,但却能显著地保护心肌细胞对抗高糖引起的线粒体功能损伤,使 Rh123 的 MFI 显著升高 ($P < 0.05$; 图4)。

2.5 硫化氢抑制高糖对心肌细胞 p-JNK 表达的上调作用

80 mmol/L 葡萄糖处理 H9c2 心肌细胞 36 h 可使 p-JNK 表达水平明显增多 ($P < 0.01$)。80 mmol/L 葡萄糖处理 H9c2 心肌细胞对总 JNK (t-JNK) 表达水平无明显影响。另一方面,400 μ mol/L NaHS 预处理 30 min 对 H9c2 心肌细胞 p-JNK 的基础表达水平无显著作用,但却能明显地抑制高浓度葡萄糖对心肌细胞 p-JNK 表达的上调作用 ($P < 0.05$; 图5)。

3 讨论

目前,探讨糖尿病引起的心肌损伤机制日益受到重视,本研究在大鼠胚胎心肌细胞 (H9c2 细胞) 观察到,在一定的浓度 (20 ~ 80 mmol/L) 范围内,高浓度葡萄糖呈浓度依赖性引起心肌细胞毒性,使细胞存活率降低,并使胞内 ROS 生成增多及线粒体受损。为了探讨 ROS 在高糖损伤心肌细胞中的作用,我们在高糖作用心肌细胞前应用 ROS 清除剂作预处理。结果表明,NAC 能明显地阻断高糖引起的心

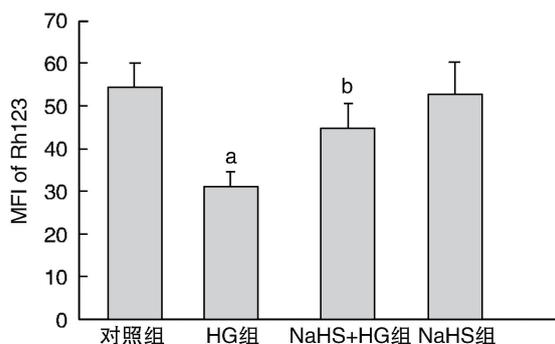
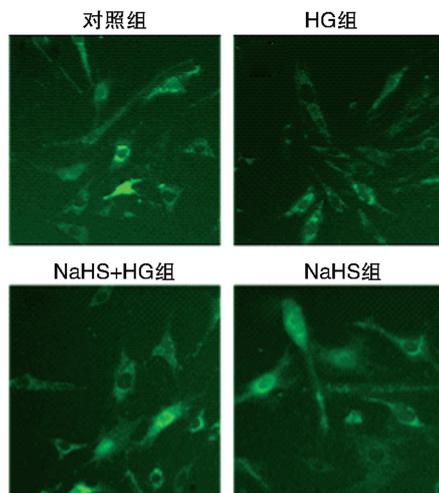


图4. 硫化氢减轻高糖对心肌细胞线粒体膜电位的损伤 a为 $P < 0.05$,与对照组比较;b为 $P < 0.05$,与HG组比较。

Figure 4. H_2S attenuates high concentration of glucose-induced mitochondrial damage in H9c2 cells

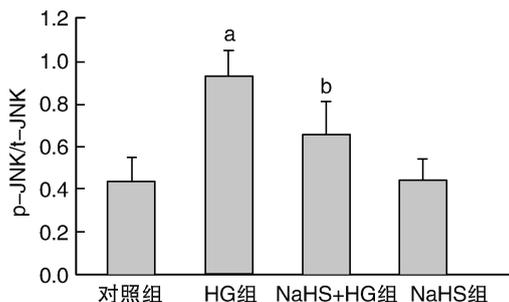
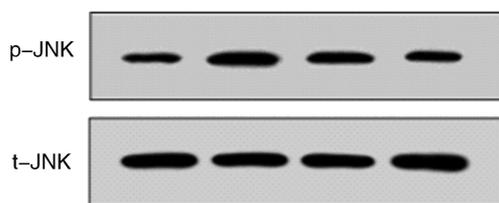


图5. 硫化氢抑制高糖诱导的 H9c2 心肌细胞内 p-JNK 表达上调 a为 $P < 0.01$,与对照组比较;b为 $P < 0.05$,与HG组比较。

Figure 5. H_2S inhibits high glucose-induced upregulation of p-JNK expression in H9c2 cells

肌细胞毒性作用,提示 ROS 生成增多是高糖损伤心肌细胞的重要作用机制之一。Lan 等^[9]报道,DCM 的 ROS 生成明显增多,这与本研究结果相一致。

值得注意的是,本研究证实高浓度葡萄糖能促进 p-JNK 蛋白表达,JNK 抑制剂 SP600125 显著地拮抗高糖引起的心肌细胞损伤,提示 JNK 通路介导高糖的心肌细胞损伤作用。JNK 是一种生理应激蛋白,在胰岛素抵抗时被激活^[5]。JNK 表达增多可磷酸化它的下游靶—胰岛素受体基质 1 (insulin receptor substrate-1, IRS-1),从而妨碍胰岛素诱导 IRS-1 酪氨酸磷酸化,降低对胰岛素的敏感性^[10]。此外,JNK 通路也参与炎症和内质网应激等多种病理生理过程。上述的研究为 JNK 通路参与高糖引起心肌细胞损伤提供了理论依据,值得今后进一步探讨。

本研究的一个重要发现是证实气体分子 H₂S 能保护心肌细胞对抗高糖引起的损伤,表现为增加细胞存活率、减少胞内 ROS 生成和 MMP 丢失。H₂S 是一种重要的生物信号分子,在多种的实验模型,被证实具有细胞保护作用,如神经保护作用^[11]和心血管保护作用^[7,8]。H₂S 可通过清除 ROS 保护心脏对抗异丙肾上腺引起的心律不齐^[12]。本研究观察到,ROS 清除剂 NAC 能抑制高糖诱导的心肌细胞毒性,与 H₂S 的作用相似,进一步提示减少 ROS 生成可能是 H₂S 的心肌细胞保护作用机制之一,与 Chen 等^[7]报道的结果一致。重要的是,我们观察到 H₂S 预处理能明显地抑制高糖对 p-JNK 表达的上调作用;JNK 抑制剂 SP600125 能阻断高糖诱导的心肌细胞毒性,表明通过抑制 JNK 通路可能是 H₂S 保护心肌细胞对抗高糖引起损伤的另一重要机制。

综上所述,本研究证实外源性 H₂S 能抑制高浓度葡萄糖引起的心肌细胞损伤,此心肌细胞保护作用可能与其抑制氧化应激、保护线粒体及抑制 JNK 通路有关。本研究为阐明 H₂S 的又一心肌细胞保护作用及其机制提供了新颖的实验资料。

[参考文献]

- [1] Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited [J]. *Circulation*, 2007, 115 (25): 3 213-223.
- [2] Cimbalićević B, Vasilijević A, Cimbalićević S, et al. Interre-

lationship of antioxidative status, lipid peroxidation, and lipid profile in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetic patients[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2007, 85 (10): 997-1 003.

- [3] Aneja A, Tang WH, Bansilal S, et al. Diabetic cardiomyopathy: insights into pathogenesis, diagnostic challenges, and therapeutic options[J]. *Am J Med*, 2008, 121 (9): 748-757.
- [4] 郑东诞, 兰爱平, 莫利求, 等. N-乙酰半胱氨酸保护心肌细胞对抗化学性低氧诱导的内质网应激反应[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19 (7): 565-569.
- [5] Bennett BL, Satoh Y, Lewis AJ. JNK: a new therapeutic target for diabetes [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2003, 3 (4): 420-425.
- [6] Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter [J]. *FASEB J*, 2002, 16 (13): 1 792-798.
- [7] Chen SL, Yang CT, Yang ZL, et al. Hydrogen sulphide protects H9c2 cells against chemical hypoxia-induced injury [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, 37 (3): 316-321.
- [8] Yang ZL, Yang CT, Xiao LC, et al. Novel insights into the role of HSP90 in cytoprotection of H₂S against chemical hypoxia-induced injury in H9c2 cardiac myocytes [J]. *Int J Mol Med*, 2011, 28 (3): 397-403.
- [9] Lan A, Liao X, Mo L, et al. Hydrogen sulfide protects against chemical hypoxia-induced injury by inhibiting ROS-activated ERK1/2 and p38MAPK signaling pathways in PC12 cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (10): e25921.
- [10] Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance [J]. *Nature*, 2002, 420 (6913): 333-336.
- [11] Tang XQ, Yang CT, Chen J, et al. Effect of hydrogen sulphide on beta-amyloid-induced damage in PC12 cells [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2008, 35 (2): 180-186.
- [12] Geng B, Chang L, Pan C, et al. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318 (3): 756-763.

(此文编辑 文玉珊)