

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.09.003

文章编号: 1005-8982(2019)09-0011-05

## ERK/CT-1 通路对氧化应激致 H9C2 细胞凋亡的影响

杜娜<sup>1</sup>, 戴红良<sup>2</sup>, 贾桂枝<sup>3</sup>

(1. 锦州医科大学附属第一医院 心血管内科二病区, 辽宁 锦州 121001; 2. 锦州医科大学  
护理学院, 辽宁 锦州 121001; 3. 锦州医科大学 生理学教研室, 辽宁 锦州 121001)

**摘要:** **目的** 观察在氧化应激情况下心肌营养因子-1 (CT-1) 的表达情况及其对心肌细胞凋亡的影响, 探讨其相关机制。**方法** 以过氧化氢刺激 H9C2 细胞建立氧化损伤模型, N-乙酰半胱氨酸或 CT-1 小干扰 RNA (siRNA) 与过氧化氢共同孵育以确定活性氧类 (ROS) 对 CT-1 表达的影响, 以及 CT-1 在细胞凋亡中的作用。以丝裂原活化细胞外信号调节激酶 (MEK/ERK) 特异性抑制剂 PD98059 预处理 H9C2 细胞, 以确定过氧化氢诱导 CT-1 表达的机制。**结果** 过氧化氢可剂量依赖性地诱导 CT-1 的过表达, N-乙酰半胱氨酸可显著抑制过氧化氢诱导的 CT-1 过表达。过氧化氢诱导的 H9C2 细胞凋亡可被 N-乙酰半胱氨酸阻断, 但 CT-1 siRNA 可加重过氧化氢诱导的 H9C2 细胞凋亡。过氧化氢可剂量依赖性地促进 ERK 的活化, PD98059 预处理明显抑制过氧化氢诱导的 CT-1 上调。**结论** 过氧化氢能活化 ERK/CT-1 通路, 从而缓解氧化应激引起的细胞凋亡。

**关键词:** 氧化应激; H9C2 细胞; 心肌营养因子-1; 凋亡; ERK

**中图分类号:** R54

**文献标识码:** A

## Role of ERK/CT-1 pathway in oxidative stress-induced H9C2 cell apoptosis

Na Du<sup>1</sup>, Hong-liang Dai<sup>2</sup>, Gui-zhi Jia<sup>3</sup>

(1. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2. School of Nursing, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 3. Department of Physiology, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

**Abstract: Objective** To examine the expression profile of cardiotrophin-1 (CT-1) in oxidative stress challenged H9C2 cells and potential role of ERK/CT-1 signal pathway in this pathological procedure. **Methods** H9C2 cell model of oxidative stress was established by coincubation with hydrogen peroxide. N-acetylcysteine or CT-1 siRNA was incubated to determine the effect of reactive oxygen species (ROS) on CT-1 expression and apoptosis. Mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase (MEK/ERK) specific inhibitor PD98059 was utilized to determine the probable mechanisms. **Results** Hydrogen peroxide induced a dose-dependent increasing of CT-1 expression, which was significantly attenuated by N-acetylcysteine. H9C2 cell apoptosis was inhibited by N-acetylcysteine treatment but was accelerated by CT-1 siRNA. Hydrogen peroxide dose promoted the activation of ERK signal pathway, while pretreatment with PD98059 significantly inhibited Hydrogen peroxide -induced upregulated expression of CT-1. **Conclusions** Hydrogen peroxide alleviates cell apoptosis probably through activation of ERK/CT-1 pathway.

**Keywords:** oxidative stress; H9C2 cells; cardiotrophin-1; apoptosis; ERK

收稿日期: 2018-11-25

[通信作者] 戴红良, E-mail: jy2006hldai@sohu.com

心肌营养因子-1 (cardiotrophin-1, CT-1) 属白细胞介素 6 家族成员, 最初从小鼠心脏胚胎干细胞中发现, 在体外具有促进心肌细胞肥厚的生物活性<sup>[1]</sup>。研究显示心肌细胞在缺氧条件可诱导 CT-1 的过表达<sup>[2]</sup>。但目前对于 CT-1 的功能及其表达上调的病理生理机制尚不明确。鉴于氧化应激在各种心血管疾病中所起的重要作用, 本研究拟探讨在氧化应激情况下心肌细胞 CT-1 的表达情况及其对心肌细胞凋亡的影响, 以及氧化应激诱导 CT-1 表达的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

H9C2 心肌细胞 (中国科学院上海细胞库), 胰蛋白酶、DMEM 培养基、过氧化氢、PD98059 (美国 Sigma 公司), 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (美国 Gibco 公司), CT-1 抗体 (美国 Abcam 公司), Cleaved-Caspase-3、ERK、pERK 抗体 (美国 Cell Signaling 公司), Annexin V-PI 凋亡试剂盒 (北京宝赛生物有限公司), CT-1 siRNA 干扰序列 5'-CCAAUUGCUGGAGCAAUAUTT-3' (苏州吉玛基因股份有限公司)。二氧化碳培养箱、酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 倒置荧光显微镜 (德国 LEICA), 流式细胞仪 (美国 BD 公司), 电泳仪及转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.2 检测方法与指标

**1.2.1 Western blotting 检测** 根据研究目的, 将细胞分为不同组别: 为检测过氧化氢对 H9C2 细胞 CT-1 表达及 ERK 活化的影响, 将细胞分为对照组及不同浓度 (50、100、200  $\mu\text{mol/L}$ ) 过氧化氢组; 为检测抗氧化剂对 H9C2 细胞 CT-1 表达及 Caspase-3 活化的影响, 将细胞分为对照组、200  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、N-乙酰半胱氨酸组、N-乙酰半胱氨酸 + 过氧化氢组; 为检测 CT-1 对过氧化氢诱导 Caspase-3 活化的影响, 将细胞分为对照组、200  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、CT-1 siRNA+ 过氧化氢组; 为检测 ERK 活化对 CT-1 表达的影响, 将细胞分为对照组、200  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、PD98059 组、PD98059+ 过氧化氢组。用细胞裂解液收集刺激完成细胞的总蛋白, 离心收集上清后测定蛋白浓度, 总蛋白行 10% ~ 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。待电泳完成后电转移至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜。用 1% BSA 封闭 1 h, 接着加入待检测蛋白的一抗 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。TBST 充分洗膜后, 以辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗室温孵育 2 h。TBST 洗膜后, 增强

化学发光法 (enhanced chemiluminescence, ECL) 显色, 以 GAPDH 做为内参。

**1.2.2 RNA 干扰** H9C2 细胞于转染前一天以无血清培养基培养 24 h。预先将小干扰 RNA (siRNA) 与 Opti-MEMi 按 1 : 16 混合; 阳离子脂质体与 Opti-MEMi 按照 4 : 11 混合。最后将上述 2 个混合体系合并后与 4 倍量的 DMEM 一起加入到细胞中, 在二氧化碳培养箱中继续培养 8 h。最后, 调整培养体系血清浓度为 10% 后继续培养 72 h, 用于后续研究。

**1.2.3 流式细胞术检测凋亡细胞** 为检测活性氧类 (reactive oxygen species, ROS) 及 CT-1 对过氧化氢诱导 H9C2 细胞凋亡的影响, 将细胞分为对照组、200  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组、N-乙酰半胱氨酸 + 过氧化氢组及 CT-1 siRNA+ 过氧化氢组。过氧化氢刺激 24 h 后, 各组细胞用 0.25% 胰酶消化 2 ~ 3 min 后, 以 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 用预冷 PBS 洗 2 次, 加入 Annexin V-FITC 和碘化丙啶各 5  $\mu\text{l}$ , 避光室温反应 15 min, 于 1 h 内利用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

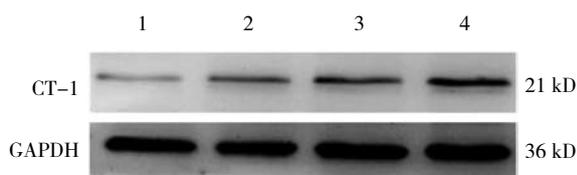
### 2.1 过氧化氢对 H9C2 细胞 CT-1 表达的影响

与对照组比较, 不同浓度过氧化氢刺激 H9C2 细胞 24 h 后, Western blotting 检测结果显示 CT-1 的表达随着过氧化氢浓度的增加而增加 (见表 1 和图 1), 说明氧化应激刺激可增加 H9C2 细胞 CT-1 的表达。

表 1 各组 H9C2 细胞 CT-1 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	CT-1 相对表达水平
对照组	1.000 $\pm$ 0.000
50 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组	1.230 $\pm$ 0.087
100 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组	1.603 $\pm$ 0.181 <sup>(1)(2)</sup>
200 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢组	2.104 $\pm$ 0.226 <sup>(1)(2)(3)</sup>
F 值	30.655
P 值	0.000

注: 1) 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与 50  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组比较,  $P < 0.05$ ; 3) 与 100  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢组比较,  $P < 0.05$



1: 对照组; 2 ~ 4: 50、100、200 μmol/L 过氧化氢组

图1 各组 H9C2 细胞 CT-1 的表达

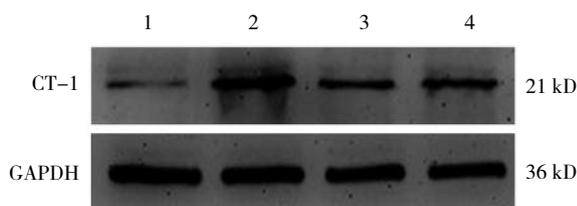
### 2.2 N-乙酰半胱氨酸对 H9C2 细胞 CT-1 表达的影响

经 200 μmol/L 过氧化氢刺激后, H9C2 细胞 CT-1 的表达明显增强, 而抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸预处理可显著抑制过氧化氢诱导的 CT-1 的表达(见表 2 和图 2), 表明过氧化氢诱导 CT-1 的过表达是通过 ROS 介导的。

表 2 各组 N-乙酰半胱氨酸对过氧化氢诱导的 CT-1 表达影响 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	CT-1 相对表达水平
对照组	1.000 ± 0.000
200 μmol/L 过氧化氢组	2.155 ± 0.253 <sup>1)</sup>
N-乙酰半胱氨酸组	1.033 ± 0.125
N-乙酰半胱氨酸 + 过氧化氢组	1.117 ± 0.182 <sup>2)</sup>
F 值	32.656
P 值	0.000

注: 1) 与对照组比较, P < 0.05; 2) 与 200 μmol/L 过氧化氢组比较, P < 0.05



1: 对照组; 2: 200 μmol/L 过氧化氢组; 3: N-乙酰半胱氨酸组; 4: N-乙酰半胱氨酸 + 过氧化氢组

图2 N-乙酰半胱氨酸抑制过氧化氢诱导 CT-1 的表达

### 2.3 N-乙酰半胱氨酸及 CT-1 干扰对 H9C2 细胞凋亡的影响

经 200 μmol/L 过氧化氢刺激后, 流式细胞仪检测显示 H9C2 细胞的凋亡明显增加, 而 N-乙酰半胱氨酸预处理则明显抑制过氧化氢引起的细胞凋亡; 相反, CT-1 敲低后 H9C2 细胞的凋亡更加严重。见表 3 和图 3。

表 3 N-乙酰半胱氨酸及 CT-1 siRNA 对过氧化氢诱导 H9C2 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	凋亡率 /%
对照组	5.841 ± 1.145
200 μmol/L 过氧化氢组	22.174 ± 3.172 <sup>1)</sup>
N-乙酰半胱氨酸 + 过氧化氢组	10.351 ± 1.339 <sup>2)</sup>
CT-1 siRNA + 过氧化氢组	27.297 ± 2.144 <sup>2)</sup>
F 值	67.600
P 值	0.000

注: 1) 与对照组比较, P < 0.05; 2) 与 200 μmol/L 过氧化氢组比较, P < 0.05

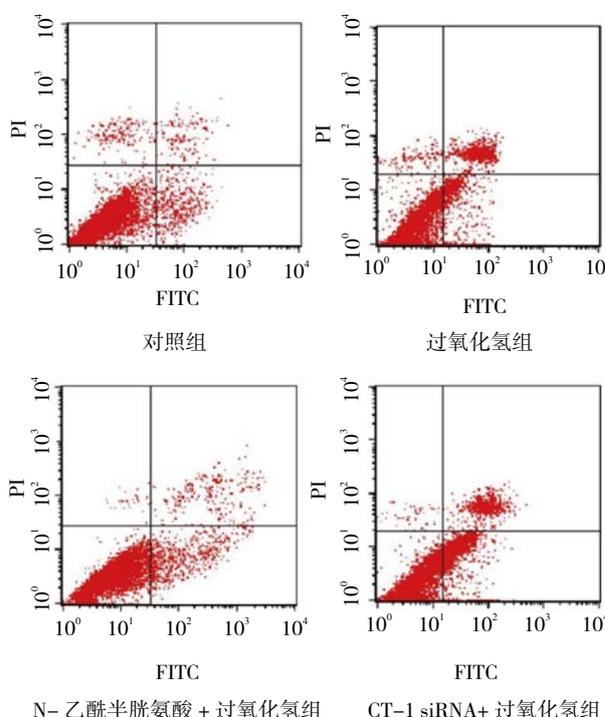


图3 N-乙酰半胱氨酸及 CT-1 siRNA 对过氧化氢诱导 H9C2 细胞凋亡的影响

### 2.4 N-乙酰半胱氨酸对过氧化氢诱导 Caspase-3 活化的影响

Active Caspase-3 的表达表明过氧化氢可通过对 CT-1 的过表达负反馈性地抑制 H9C2 细胞的凋亡。见表 4、图 4 和表 5、图 5。

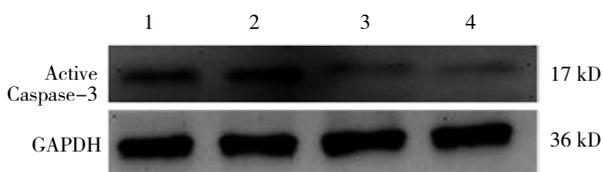
### 2.5 PD98059 对过氧化氢诱导的 CT-1 表达的影响

与对照组比较, 过氧化氢可浓度依赖性地促进 H9C2 细胞 ERK 的活化(见表 6 和图 6), 而丝裂原活化细胞外信号调节激酶 (MEK/ERK) 特异性抑制剂 PD98059 可显著抑制过氧化氢诱导的 CT-1 表达上调(见表 7 和图 7)。

表 4 N-乙酰半胱氨酸对过氧化氢诱导 Caspase-3 活化的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Active Caspase-3 相对表达水平
对照组	1.000 ± 0.000
200 μmol/L 过氧化氢组	2.154 ± 0.194 <sup>1)</sup>
N-乙酰半胱氨酸组	0.964 ± 0.148
N-乙酰半胱氨酸 + 过氧化氢组	0.952 ± 0.208 <sup>2)</sup>
F 值	40.721
P 值	0.000

注: 1) 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与 200 μmol/L 过氧化氢组比较,  $P < 0.05$



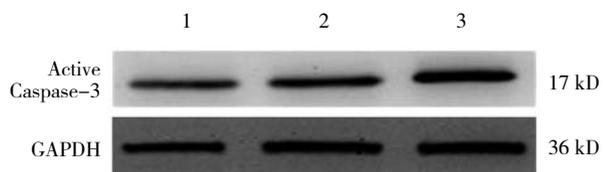
1: 对照组; 2: 200 μmol/L 过氧化氢组; 3: N-乙酰半胱氨酸组; 4: N-乙酰半胱氨酸 + 过氧化氢组

图 4 N-乙酰半胱氨酸对过氧化氢诱导 Caspase-3 活化的影响

表 5 CT-1 siRNA 对过氧化氢诱导 Caspase-3 活化的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Active Caspase-3 相对表达水平
对照组	1.000 ± 0.000
200 μmol/L 过氧化氢组	1.846 ± 0.157 <sup>1)</sup>
CT-1 siRNA+ 过氧化氢组	2.591 ± 0.243 <sup>2)</sup>
F 值	68.059
P 值	0.000

注: 1) 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与 200 μmol/L 过氧化氢组比较,  $P < 0.05$



1: 对照组; 2: 200 μmol/L 过氧化氢组; 3: CT-1 siRNA+ 过氧化氢组

图 5 CT-1 siRNA 对过氧化氢诱导 Caspase-3 活化的影响

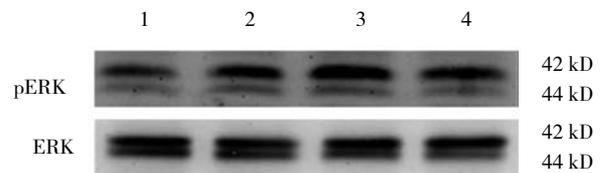
### 3 讨论

成年心肌细胞属终端分化细胞, 不具有再生增殖

表 6 过氧化氢对 ERK 活化的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	pERK/ERK 相对水平
对照组	1.000 ± 0.000
过氧化氢 50 μmol/L 组	1.646 ± 0.214 <sup>1)</sup>
过氧化氢 100 μmol/L 组	1.982 ± 0.229 <sup>1)2)</sup>
过氧化氢 200 μmol/L 组	1.818 ± 0.136 <sup>1)</sup>
F 值	19.001
P 值	0.001

注: 1) 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与 50 μmol/L 过氧化氢组比较,  $P < 0.05$



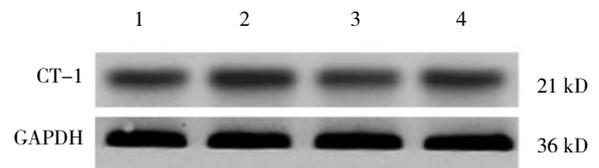
1: 对照组; 2 ~ 4: 50、100、200 μmol/L 过氧化氢组

图 6 过氧化氢对 ERK 活化的影响

表 7 PD98059 对过氧化氢诱导 CT-1 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	CT-1 相对表达水平
对照组	1.000 ± 0.000
200 μmol/L 过氧化氢组	2.042 ± 0.177 <sup>1)</sup>
PD98059 组	1.067 ± 0.125
PD98059+ 过氧化氢组	1.205 ± 0.165 <sup>2)</sup>
F 值	37.923
P 值	0.000

注: 1) 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与 200 μmol/L 过氧化氢组比较,  $P < 0.05$



1: 对照组; 2: 200 μmol/L 过氧化氢组; 3: PD98059 组; 4: PD98059+ 过氧化氢组

图 7 PD98059 对过氧化氢诱导 CT-1 表达的影响

的能力。因此, 心肌细胞的存活在维持心脏的功能和发育中起着极为关键的作用。当遇到各种伤害性刺激时, 心肌细胞会通过自分泌或旁分泌等形式释放细胞保护因子, 作为负反馈机制对抗各种损伤。

CT-1 在血清剥夺<sup>[3]</sup>、热休克<sup>[4]</sup>、缺血再灌注损伤等<sup>[5]</sup>损伤中呈现心肌保护的特性。体外研究显示<sup>[5]</sup>,在低氧状态下,心肌细胞 CT-1 表达增加;体内研究也发现在不稳定性心绞痛<sup>[6]</sup>、急性心肌梗死<sup>[7]</sup>、高血压性心脏病等<sup>[8]</sup>病理状态下,外周循环中的 CT-1 水平是增加的。但对于 CT-1 在上述病理条件下如何升高,及其在疾病过程中发挥何种作用,目前尚不完全明确。

在缺血缺氧状态下,心肌组织会产生过量的 ROS。这些 ROS 攻击细胞的脂质、DNA 及蛋白质等生物大分子,并诱导心肌细胞发生凋亡<sup>[9-10]</sup>。本研究也发现,抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸可显著抑制过氧化氢诱导的 H9C2 心肌细胞活化 Caspase-3 的表达及凋亡。既然缺血缺氧可以诱导 CT-1 的过表达,就有理由推测 ROS 增加有可能是诱导 CT-1 过表达的重要机制。本研究发现,过氧化氢可剂量依赖性地诱导 CT-1 的过表达。而且,利用特异性 siRNA 敲低 CT-1 后,无论是活化 Caspase-3 的表达还是细胞的凋亡率均较过氧化氢组显著增加,表明上述病理状态下由 ROS 激发的 CT-1 过表达起到一种负反馈性保护机制,起到对抗氧化性损伤本身所带来的细胞损伤的作用。这与 DONG 等<sup>[11]</sup>报道的 CT-1 处理能促进心肌细胞活力的结论相一致。

本研究进一步对过氧化氢诱导 CT-1 表达的机制进行初步探讨。有研究显示,过氧化氢预处理能通过激活 ERK 保护心肌细胞对抗氧化应激引起的损伤和凋亡<sup>[12]</sup>。笔者推测过氧化氢诱导的 CT-1 过表达有可能与 ERK 的活化有关。本研究发现,MEK/ERK 特异性抑制剂 PD98059 能显著抑制过氧化氢诱导的 CT-1 过表达。由此可见,ERK 不光可以作为下游分子介导 CT-1 的各种生物学活性<sup>[13]</sup>,本研究也是首次发现 ERK 可以作为上游分子介导 CT-1 的过表达。对 ERK 如何能促进 CT-1 的表达有待于进一步研究。

综上所述,本研究证实氧化应激在诱导心肌细胞发生凋亡性损伤的同时,可通过激活 ERK 反馈性地诱导 CT-1 的过表达,从而限制由氧化应激本身带来的心肌细胞损害。本研究不仅有助于进一步理解心血管疾病的病理生理机制,也可为疾病的防治提供新的线索。

#### 参 考 文 献:

[1] ZHOU J, GAO J, ZHANG X, et al. MicroRNA-340-5p functions

downstream of cardiotrophin-1 to regulate cardiac eccentric hypertrophy and heart failure via target gene dystrophin[J]. *Int Heart J*, 2015, 56(4): 454-458.

[2] ROBADOR P A, SAN J G, RODRIGUEZ C, et al. HIF-1-mediated up-regulation of cardiotrophin-1 is involved in the survival response of cardiomyocytes to hypoxia[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 92 (2): 247-255.

[3] SHENG Z, KNOWLTON K, CHEN J, et al. Cardiotrophin 1 (CT-1) inhibition of cardiac myocyte apoptosis via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. Divergence from downstream CT-1 signals for myocardial cell hypertrophy[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(9): 5783-5791.

[4] STEPHANOU A, BRAR B, HEADS R, et al. Cardiotrophin-1 induces heat shock protein accumulation in cultured cardiac cells and protects them from stressful stimuli[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, 30(4): 849-855.

[5] BRAR B K, STEPHANOU A, LIAO Z, et al. Cardiotrophin-1 can protect cardiac myocytes from injury when added both prior to simulated ischaemia and at reoxygenation[J]. *Cardiovasc Res*, 2001, 51(2): 265-274.

[6] TALWAR S, SQUIRE I B, DOWNIE P F, et al. Plasma N terminal pro-brain natriuretic peptide and cardiotrophin 1 are raised in unstable angina[J]. *Heart*, 2000, 84(4): 421-424.

[7] TALWAR S, SQUIRE I B, O'BRIEN R J, et al. Plasma cardiotrophin-1 following acute myocardial infarction: relationship with left ventricular systolic dysfunction[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2002, 102(1): 9-14.

[8] SONG K, WANG S, HUANG B, et al. Plasma cardiotrophin-1 levels are associated with hypertensive heart disease: a meta-analysis[J]. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2014, 16(9): 686-692.

[9] FARIAS J G, MOLINA V M, CARRASCO R A, et al. Antioxidant therapeutic strategies for cardiovascular conditions associated with oxidative stress[J]. *Nutrients*, 2017, 9(9): E966.

[10] LEE K H, LEE S R, CHO H, et al. Cardioprotective effects of PKG activation by soluble GC activator, BAY 60-2770, in ischemia-reperfusion-injured rat hearts[J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): p e0180207.

[11] DONG Z L, WANG Y, LI T F, et al. p42/p44 mitogen-activated protein kinases inhibit atrial natriuretic peptide mRNA transcription in gp130-mediated hypertrophic ventricular myocytes[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2014, 7(3): 216-220.

[12] 廖新学,王艳丽,郭瑞鲜,等. ERK1/2 介导 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 预处理对抗氧化应激损伤的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(9): 1151-1156.

[13] ZHAO H N, WANG Y, JIANG M N, et al. Relation of Cardiotrophin-1 (CT-1) and cardiac transcription factor GATA4 expression in rat's cardiac myocytes hypertrophy and apoptosis[J]. *Pathol Res Pract*, 2009, 205(9): 615-625.

(张蕾 编辑)