

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.13.002

文章编号: 1005-8982(2016)13-0007-05

论著

糖原合成酶激酶 3 β 介导心房钠尿肽对 H9c2 心肌细胞线粒体保护作用的研究*

洪兰¹, 洪英姬¹, 金红花²

(1. 延边大学医学院 生理学与病理生理学教研部, 吉林 延吉 133002;

2. 延边大学附属医院 药学部, 吉林 延吉 133000)

摘要:目的 探讨心房钠尿肽(ANP)对 H9c2 心肌细胞缺血再灌注损伤的保护作用机制。**方法** 采用四甲基罗丹明乙酯(TMRE)荧光染料和激光共聚焦显微镜成像技术测定 H9c2 心肌细胞 TMRE 荧光强度的变化,即线粒体膜通透性转换孔(mPTP)开放程度。利用双氧水 H₂O₂ 诱导 H9c2 心肌细胞线粒体 mPTP 的开放,预处理不同浓度的 ANP 后,观察 ANP 对 mPTP 开放的影响;同时利用 Western blot 检测 H9c2 心肌细胞的糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β Ser9)磷酸化程度,即失活程度。利用激活型 GSK-3 β 质粒转染的 H9c2 心肌细胞(GSK-3 β -S9A-HA),来观察 ANP 对 GSK-3 β -S9A-HA 的线粒体 mPTP 开放程度。**结果** 与对照组(600 μ mol/L H₂O₂)比较,0.01、0.10、1.00 和 10.00 nmol/L ANP 明显抑制 H₂O₂ 对 TMRE 荧光强度的衰减效应($P < 0.05$),其中 1.00 nmol/L 的 ANP 效应最强。Western blot 检测结果显示,0.01、0.10、1.00 和 10.00 nmol/L ANP 明显增强 GSK-3 β Ser9 的磷酸化($P < 0.05$),即抑制 GSK-3 β 的活性。利用 GSK-3 β -S9A-HA 后发现,ANP(1.0 nmol/L)不能抑制 mPTP 开放(与 H9c2 比较 $P < 0.05$)。**结论** ANP 通过调节 GSK-3 β 活性来抑制 H9c2 心肌细胞 mPTP 的开放,从而保护 H9c2 心肌细胞的缺血再灌注损伤。

关键词: 心房钠尿肽;缺血再灌注;线粒体膜通透性转移孔;糖原合成酶激酶 3 β

中图分类号: R542.2

文献标识码: A

Protective mechanism of ANP on mitochondria of H9c2 myocardial cells via GSK-3 β *

Lan Hong¹, Ying-ji Hong¹, Hong-hua Jin²

(1. Department of Physiology and Pathophysiology, Medical College of Yanbian University,

Yanbian, Jilin 133002, China; 2. Department of Pharmacy, the Affiliated Hospital

of Yanbian University, Yanbian, Jilin 133000, China)

Abstract: Objective To investigate protective mechanism of atrial natriuretic peptide (ANP) on H9c2 myocardial cell mitochondria via glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β). **Methods** The change of mitochondrial membrane potential was determined using fluorescent dye tetramethylrhodamine ester (TMRE) and laser confocal microscopy imaging technique. The open degree of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) was reflected as TMRE fluorescence intensity and the GSK-3 β Ser9 phosphorylation (deactivation degree) was detected by Western blot. Then the protective effect of ANP on H9c2 cells transfected with activated GSK-3 β plasmid (GSK-3 β -S9A-HA) was observed. **Results** Compared to the control group (600 μ mol/L H₂O₂), 0.01, 0.10, 1.00 and 10.00 nmol/L ANP significantly inhibited attenuation effect of TMRE fluorescence intensity induced by H₂O₂ ($P < 0.05$); of which 1.00 nmol/L ANP had the strongest effect. It suggested that ANP may modulate the mPTP opening. Western blot result showed that 0.01, 0.10, 1.00, 10.00 and 100.00 nmol/L ANP significantly

收稿日期: 2015-12-21

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 81260035); 吉林省卫生厅科研课题基金(No: 2013300-612013111)

[通信作者] 金红花, E-mail: kimflower1988@163.com; Tel: 0433-2660788

increased the level of phosphorylation of GSK-3 β ($P < 0.05$); which indicated that ANP could inhibit the activity of GSK-3 β ; however, 1.00 nmol/L ANP was not able to inhibit mPTP opening in cells of GSK-3 β -S9A-HA. **Conclusions** ANP prevents the mPTP opening by inactivating GSK-3 β so as to protect H9c2 myocardial cells during ischemia-reperfusion injury.

Keywords: atrial natriuretic peptide; ischemia-reperfusion injury; mitochondrial permeability transition pore; glycogen synthase kinase 3 β

心房钠尿肽 (atrial natriuretic peptide, ANP) 是由心房肌细胞合成和分泌的肽类激素。ANP 对缺血再灌注损伤具有较好的保护作用。在大鼠离体心脏灌流模型中, ANP 可以增加再灌注心脏的心输出量, 减少缺血再灌注心脏的心梗面积, 对急性心肌梗死患者静脉注射 ANP 能减轻缺血再灌注造成的心脏损伤^[1], 但 ANP 发挥心肌保护作用的具体机制尚未清楚。线粒体膜通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 的开放是导致缺血再灌注损伤的关键因素^[2], 防止 mPTP 的开放是减轻再灌注损伤的有效手段, 抑制 mPTP 的开放是一些心脏保护类药物, 如腺苷, 抗缺血再灌注损伤的共同作用机制。糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase 3 β , GSK-3 β) 是真核生物中普遍存在的一种多功能丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 静息时 GSK-3 β 保持激活状态。GSK-3 β 的丝氨酸 (Serine, Ser9) 位点磷酸化使 GSK-3 β 活性降低。研究发现, 抑制 GSK-3 β 的活性可以有效抑制 mPTP 的开放^[3]。但是, ANP 保护缺血再灌注损伤机制与 GSK-3 β 活性和 mPTP 的开放是否有关, 尚不清楚。本研究采用激光共聚焦显微成像技术和 Western blot 检测, 观察 ANP 是否通过降低 GSK-3 β 的活性而抑制 mPTP 的开放, 起到抵制缺血再灌注损伤的作用, 拟探讨 ANP 的心肌保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验试剂及仪器

大鼠胚胎心脏组织来源的 H9c2 细胞株 (美国 ATCC 菌种收藏中心), ANP、细胞培养所用的达尔伯克必需基本培养基、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶等 (美国 Gibco 公司), GSK-3 β -S9A-HA (美国宾夕法尼亚大学医学院), 四甲基罗丹明乙酯 (tetramethyl-rhodamine ethylester, TMRE) 荧光染料 (美国 Invitrogen 公司), Western blot 检测凝胶试剂盒 (北京索莱宝公司), 抗磷酸化的 GSK-3 α/β (Phospho-GSK-3 α/β , Ser21-GSK-3 α /Ser9-GSK-3 β) 抗体以及 α -actin 抗体 (美国 Cell Signaling Technology

公司)。

实验中主要仪器有 FV-1000 激光共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司), JY200C 电泳系统 (北京君意东方电泳设备有限公司), 680 型酶标仪 (美国 Bio-Red 公司), ChampGel 6000 凝胶成像分析系统 (北京赛智创业科技有限公司), 5430R 台式低温离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

1.2 线粒体膜电位的测定及实验分组

TMRE 荧光探针是一种带正电荷、可透过细胞膜的无毒性荧光染料, 其激发光波长为 543 nm, 发射波长为 560 nm。在正常生理条件下, 线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 保持内负外正的状态。由于该电压差使正电的 TMRE 可迅速地进入并聚集在线粒体内。mPTP 的开放使得氢离子等进入细胞, 造成 MMP 消失, MMP 降低是 mPTP 开放的象征, 从而导致 TMRE 从线粒体释放。所以线粒体内 TMRE 荧光强度变化能较为准确地显示 MMP 的高低和 mPTP 的开放。故利用激光共聚焦显微镜成像技术检测线粒体内 TMRE 荧光强度值的变化值, 可推测线粒体膜电位的变化, 从而可以测定线粒体 mPTP 的开放。本实验利用双氧水 H₂O₂ 诱导 H9c2 的缺血再灌注损伤, TMRE 荧光强度减少至 <50% 基础值则认为诱导缺血再灌注损伤成功。

H9c2 分成 7 组, 用 H₂O₂ (终浓度 600 μ mol/L) 在 37 $^{\circ}$ C 孵育箱内孵育 20 min, 诱导 H9c2 氧化应激损伤。H9c2 分成两组, 对照组: H₂O 20 min+H₂O₂ 20 min; ANP 组: ANP (终浓度 0.001、0.010、0.100、1.000、10.000 和 100.000 nmol/L) 20 min+H₂O₂ 20 min。各组以每 10 min 间隔扫描图片, 并用定量分析软件测定荧光强度值。

1.3 GSK-3 β 质粒 DNA 的转染及实验分组

GSK-3 β 质粒 (GSK-3 β -S9A-HA) 采用 Fugene 6 转染试剂盒进行转染, 所有实验在转染 48 h 内进行^[4]。对照组: H₂O 20 min+H₂O₂ (终浓度 600 μ mol/L) 20 min; ANP 组: ANP (终浓度 1 nmol/L) 20 min+H₂O₂ 20 min; S9A 组: 转染激活型 GSK-3 β 质粒的 H9c2 细胞 +H₂O 20 min+H₂O₂ (终浓度 600 μ mol/L) 20 min;

S9A/ANP 组: 转染激活型 GSK-3β 质粒的 H9c2 细胞 +ANP(终浓度 1 nmol/L)20 min+H₂O₂ 20 min。各组以每 10 min 间隔扫描图片,并用定量分析软件测定荧光强度值。

1.4 Western blot 检测 GSK-3β 磷酸化水平

采用终浓度为 0.001、0.010、0.100、1.000、10.000 和 100.000 nmol/L ANP 预处理 H9c2 细胞 20 min,常规 Western blot 检测 GSK-3β Ser9 位点的磷酸化,从而观察 GSK-3β 的活性。其最终数据表示为(目的蛋白/内参蛋白)/(对照组蛋白/对照组内参蛋白)×100%。

1.5 统计学方法

采用 Prism 3.0 统计软件进行数据处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数比较用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 LSD-t 检验, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ANP 对线粒体 mPTP 开放的影响

对照组利用 600 μmol/L H₂O₂ 处理 H9c2 细胞 20 min 后, TMRE 荧光强度明显减少至基础值的 (36.75 ± 3.87)%, 即 H₂O₂ 可以明显诱导缺血再灌注损伤。不同浓度的 ANP 预处理 H9c2 心肌细胞 20 min 后发现,0.01、0.10、1.00 和 10.00 nmol/L ANP 均抑制 H₂O₂ 减少 TMRE 荧光强度的效应(P<0.05),而浓度 0.001 nmol/L 和最高浓度 100.000 nmol/L ANP 未能抵制 H₂O₂ 对 MMP 的衰减作用。ANP 防止 mPTP 开放的有效浓度范围为 0.01 ~ 10.00 nmol/L。见表 1 和图 1。

2.2 ANP 对 GSK-3β 活性的影响

0.01 ~ 100.00 nmol/L ANP 均明显增加 GSK-3β Ser9 的磷酸化水平,即可以明显抑制 GSK-3β 的活性,其中 1.0 nmol/L ANP 效果最明显,只有最低浓度 ANP (0.001 nmol/L) 对 GSK-3β 磷酸化没有影响。该有效浓度范围与 ANP 对 mPTP 抑制作用的有效浓度范围基本一致。见图 2 和表 2。

2.3 ANP 对转染 GSK-3β 质粒的 H9c2 细胞 mPTP 开放的影响

对照组、ANP 组、S9A 组、S9A/ANP 组经 20 min H₂O₂ 处理后,各组 TMRE 荧光强度分别减少至基础值的 (36.75 ± 3.87)%、(78.47 ± 11.00)%、(35.32 ± 5.49)%和(39.95 ± 4.51)%,差异有统计学意义(F=8.830, P=0.000),ANP 组 TMRE 荧光强度高于对照组、S9A 组及 S9A/ANP 组(t=3.576、3.520 和 3.247,

表 1 不同浓度的 ANP 对 TMRE 荧光强度的影响 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	0 min	20 min
对照组	100.0 ± 0.0	36.8 ± 3.9
ANP(0.001 nmol/L)	100.0 ± 0.0	51.8 ± 9.0
ANP(0.010 nmol/L)	100.0 ± 0.0	52.0 ± 2.4 ¹⁾
ANP(0.100 nmol/L)	100.0 ± 0.0	75.1 ± 1.0 ²⁾
ANP(1.000 nmol/L)	100.0 ± 0.0	78.5 ± 11.0 ²⁾
ANP(10.000 nmol/L)	100.0 ± 0.0	75.9 ± 14.5 ¹⁾
ANP(100.000 nmol/L)	100.0 ± 0.0	50.4 ± 14.3
F 值	2.820	
P 值	0.023	

注:1)与对照组比较, P<0.05;2)与对照组比较, P<0.01

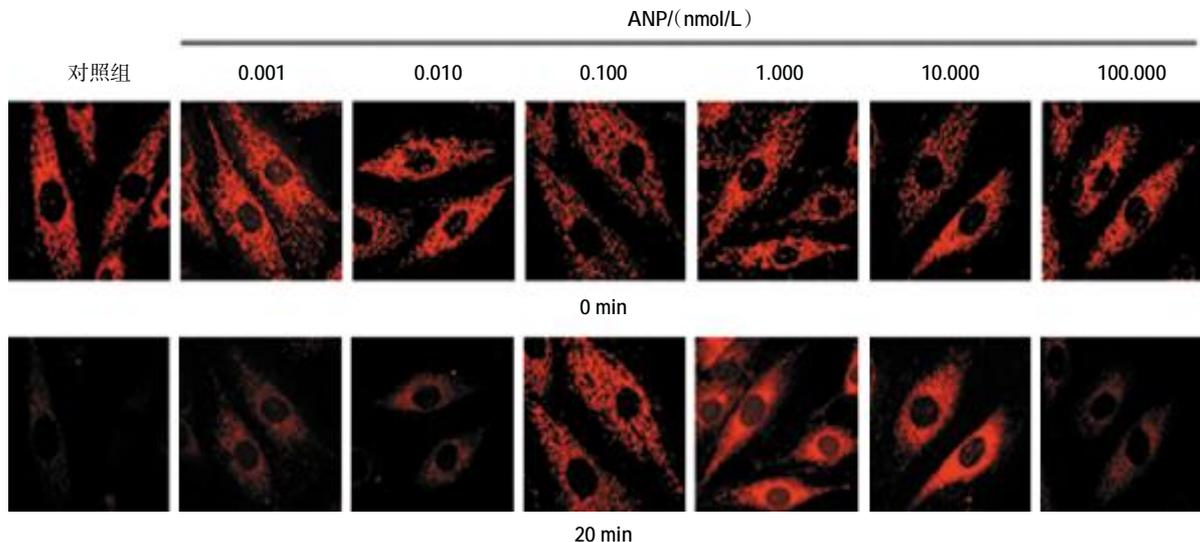


图 1 不同浓度 ANP 预处理后各组 TMRE 荧光强度比较 (×120)

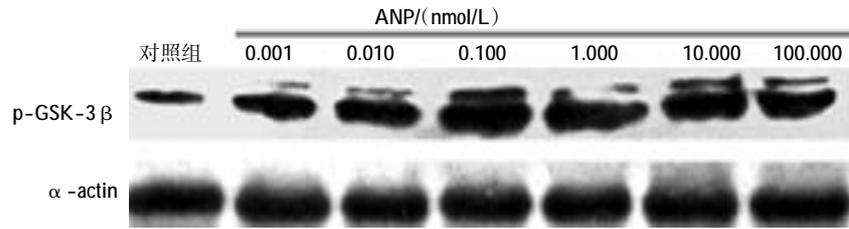


图 2 不同浓度 ANP 对 GSK-3β 磷酸化的影响

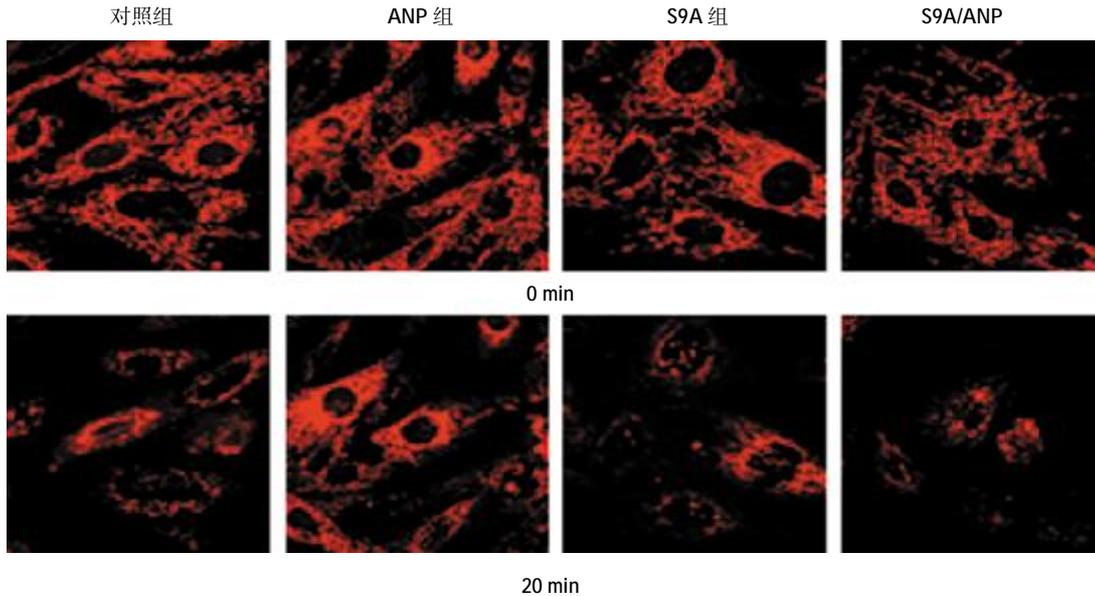


图 3 各组 TMRE 荧光强度比较 (×120)

表 2 ANP 对 GSK-3β 磷酸化的影响 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	Phosphor-GSK-3β
对照组	100.00 ± 0.00
ANP(0.001nmol/L)	124.80 ± 15.26
ANP(0.010nmol/L)	146.40 ± 15.02 ¹⁾
ANP(0.100nmol/L)	188.60 ± 19.48 ²⁾
ANP(1.000nmol/L)	225.60 ± 21.04 ²⁾
ANP(100.000nmol/L)	184.10 ± 20.31 ¹⁾
ANP(1000.000nmol/L)	151.10 ± 20.70 ¹⁾
F 值	6.886
P 值	0.000

注:1)与对照组比较, P<0.05;2)与对照组比较, P=0.000

P=0.003、0.003 和 0.006)。而 S9AANP 组的 TMRE 荧光强度与 S9A 对照组比较,差异无统计学意义(P>0.05)。见图 3。

3 讨论

心肌缺血再灌注损伤是治疗缺血性心脏病过程中面临的最棘手的医学问题⁶⁾。虽然介入和搭桥手

术等目前先进的医疗手段能够改善缺血带来的损伤,但由于冠状动脉再通后容易引起再灌注损伤,急性心肌梗死的治疗难度和死亡率依然很高。目前动物实验显示,再灌注期给予几种药物,如腺苷,可以改善缺血再灌注损伤,但临床试验结果均不理想⁷⁾,究其原因是还未完全了解保护再灌注损伤的作用机制⁸⁾。研究认为,心肌缺血再灌注时,mPTP 持续性开放是导致再灌注损伤的重要原因⁹⁾,因此抑制 mPTP 的开放是防止再灌注损伤的关键。有研究发现,预先反复短暂缺血(缺血预处理)可以提高心肌组织对随后持续缺血的耐受性,减少心肌梗死面积,减少心律失常发生,而缺血预处理保护心肌细胞的作用机制就是通过抑制 mPTP 的开放而减轻再灌注损伤⁹⁾。

ANP 最早发现的生物学作用是排钠利尿,而近年来的研究证实,ANP 在许多缺血缺氧相关性疾病如急性心肌梗死、充血性心力衰竭、慢性阻塞性肺疾病中保持高分泌状态,并且在该类疾病中分泌的 ANP 可以发挥抵制心肌肥大¹⁰⁾、氧化应激¹¹⁾、保护缺

血再灌注损伤等作用^[2]。在本研究中,0.01、0.10、1.00、10.00 nmol/L ANP 可以明显抑制 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞 mPTP 开放,提示 ANP 可能通过抑制线粒体 mPTP 的开放,抵制氧化应激伤的损伤,进而保护缺血再灌注的心脏。本实验室长期对大鼠 ANP 浓度测定结果显示,大鼠心房灌流液的 ANP 浓度一般在 50~300 pg/ml,而本实验所用的 ANP 浓度已经超出大鼠灌流液当中的 ANP 生理浓度。本实验室前期研究还显示,大鼠心房缺氧时 ANP 浓度明显升高,并且升高至常氧时的 5~10 倍。故根据本实验的结果推测,缺氧缺血时增高的 ANP 可能起到抵制缺氧缺血等的生理学作用,从而保护缺氧缺血的心脏。

防止 mPTP 开放可以有效抵制心肌缺血再灌注损伤。而在抑制 mPTP 开放的具体信号机制中,目前普遍认为 GSK-3 β 发挥重要的作用。研究发现,缺血预处理能够增加 GSK-3 β 的磷酸化,而抑制 GSK-3 β 的活性能模拟缺血预处理的心肌保护作用^[3],提示 GSK-3 β 在心肌保护机制中发挥重要作用。JUHASZOVA 等^[4]认为,抑制 GSK-3 β 的活性对阻止 mPTP 的开放可能发挥重要作用。在心肌细胞中,一些心脏保护类物质如腺苷^[5]、酒精^[6]和外源性锌^[6]均通过抑制 GSK-3 β 的活性而阻止 mPTP 的开放。本实验结果表明,ANP 能够增加 GSK-3 β Ser9 的磷酸化,表明 ANP 能明显抑制 GSK-3 β 的活性,并且有效浓度和最高效应浓度与 ANP 抑制 mPTP 开放的浓度值相吻合。进一步的实验表明,利用 GSK-3 β 质粒转染的 H9c2 细胞(GSK-3 β -S9A)观察发现,ANP 未能抵制 H₂O₂ 诱导 GSK-3 β -S9A 的 mPTP 开放效应,说明 ANP 通过抑制 GSK-3 β 的活性,从而抵制线粒体 mPTP 开放。综上所述,ANP 具有保护缺血再灌注损伤作用,其作用机制是通过抑制增加 GSK-3 β 的磷酸化而抑制 GSK-3 β 的活性,从而防止 mPTP 开放,最终起到心肌保护作用。

参 考 文 献:

- [1] 玄春花,李彦生,关立克. ANP 的心脏保护作用研究[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(1): 156-159.
- [2] MORCIANO G, GIORGI C, BONORA M, et al. Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia-reperfusion injury[J]. J Mol Cell Cardiol, 2015, 78: 142-153.
- [3] XI J, TIAN W, ZHANG L, et al. Morphine prevents the mitochondrial permeability transition pore opening through NO/cGMP/PKG/Zn²⁺/GSK-3 β signal pathway in cardiomyocytes [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010, 298(2): H601-H607.
- [4] JANG, Y, WANG H, XI J, et al. NO mobilizes intracellular Zn²⁺ via cGMP/PKG signaling pathway and prevents mitochondrial oxidant damage in cardiomyocytes[J]. Cardiovasc Res, 2007, 75(2): 426-433.
- [5] CHANOIT G, LEE S, XI J, et al. Exogenous zinc protects cardiac cells from reperfusion injury by targeting mitochondrial permeability transition pore through inactivation of glycogen synthase kinase-3 β [J]. Am J Physiol, 2008, 295: H1227-H1233.
- [6] 李建辉. 异丙酚联合贝那普利预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国现代医学杂志, 2014, (8): 12-16.
- [7] OVIZE M, BAXTER G F, DI LISA F, et al. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the working group of cellular biology of the heart of the european society of cardiology[J]. Cardiovasc Res, 2010, 87: 406-423.
- [8] SCHWARTZ LONGACRE L, KLONER R A, ARAI A E, et al. New horizons in cardioprotection: recommendations from the 2010 national heart, lung, and blood institute workshop[J]. Circulation, 2011, 124(10): 1172-1179.
- [9] HAUSENLOY D J, ONG S B, YELLON D M. The mitochondrial permeability transition pore as a target for preconditioning and postconditioning[J]. Basic Res Cardiol, 2009, 104: 189-202.
- [10] HAYASHI D, KUDOH S, SHIOJIMA I, et al. Atrial natriuretic peptide inhibits cardiomyocyte hypertrophy through mitogen-activated protein kinase phosphatase-1[J]. Biochemical Biophysical Research Communications, 2004, 322(1): 310-319.
- [11] LASKOWSKI A, WOODMAN O L, CAO A H, et al. Antioxidant actions contribute to the antihypertrophic effects of atrial natriuretic peptide in neonatal rat cardiomyocytes[J]. Cardiovascular Research, 2006, 72(1): 112-123.
- [12] PHILIPP S, YANG X M, CUI L, et al. Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A_{2b} receptor cascade[J]. Cardiovasc Res, 2006, 70(2): 308-314.
- [13] CHEN Q Q, GU E W, RU X F, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid in the attenuation of cardioprotective effect by sufentanil postconditioning in type 2 diabetes mellitus rats[J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2014, (9): 1279-1283.
- [14] JUHASZOVA M, ZOROV D B, YANIV Y, et al. Role of Glycogen Synthase Kinase-3 (beta) in Cardioprotection[J]. Circ Res, 2009, (104): 1240-1252.
- [15] ZHOU K, ZHANG L, XI J, et al. Ethanol prevents oxidant-induced mitochondrial permeability transition pore opening in cardiac cells[J]. Alcohol Alcohol, 2009, (44): 20-24.
- [16] CHANOIT G, LEE S, XI J, et al. Exogenous zinc protects cardiac cells from reperfusion injury by targeting mitochondrial permeability transition pore through inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 295(3): H1227-H1233.

(童颖丹 编辑)