

· 短篇论著 ·

Syk 对高糖诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡的影响及其机制研究

龙广凤 薛美婷 陈玉凤 乔迎春 田熙熙 李胜玉 刘运德 申艳娜 崔宇杰

【摘要】 目的 探讨脾酪氨酸激酶(Syk)对高糖诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡的影响及其机制。**方法** 将体外培养的 H9c2 心肌细胞分为 5 组:对照组(5.5 mmol/L 葡萄糖, NG 组)、高糖组(33 mmol/L 葡萄糖, HG 组)、Syk 抑制剂对照组(5.5 mmol/L 葡萄糖 + 1 μ mol/L BAY, NG + BAY 组)、Syk 抑制剂高糖组(33 mmol/L 葡萄糖 + 1 μ mol/L BAY, HG + BAY 组)、甘露醇高渗透压对照组(5.5 mmol/L 葡萄糖 + 27.5 mmol/L 甘露醇, OC 组)。采用 Western 印迹方法检测磷酸化 Syk(p-Syk)、cleaved-caspase-1 及 Bax、Bcl-2 的蛋白水平;逆转录 PCR 检测 caspase-1、Bax、Bcl-2 mRNA 的表达;流式细胞仪检测 H9c2 心肌细胞凋亡率;MTT 比色法检测细胞活力。**结果** 与 NG 组相比, HG 组 H9c2 心肌细胞活力下降($F=37.3$, $P<0.05$)、凋亡率增加($F=46.5$, $P<0.05$), OC 组、NG + BAY 组细胞凋亡率与细胞活力差异均无统计学意义(P 均 >0.05);且 HG 组 p-Syk、cleaved-caspase-1 及 Bax 表达增加, Bcl-2 表达降低($F=8.4, 80.5, 7.6, 37.4$, P 均 <0.05), caspase-1 及 Bax mRNA 表达升高, Bcl-2 mRNA 表达降低($F=130.7, 17.8, 7.18$, P 均 <0.05);与 HG 组相比, HG + BAY 组细胞活力升高($F=37.3$, $P<0.05$)、细胞凋亡率降低($F=46.5$, $P<0.05$), 且 cleaved-caspase-1 及 Bax 表达降低, Bcl-2 表达水平升高($F=80.5, 7.6, 37.4$, P 均 <0.05), caspase-1 及 Bax mRNA 表达降低, Bcl-2 mRNA 表达升高($F=130.7, 17.8, 7.18$, P 均 <0.05)。**结论** 在高糖条件下, Syk 可诱导心肌细胞凋亡, 其作用是通过调控 Bax、Bcl-2 的表达。

【关键词】 脾酪氨酸激酶; H9c2 心肌细胞; 细胞凋亡; Caspase-1; 糖尿病

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81200116); 天津市自然科学基金资助项目(15JCYBJC49700); 药物化学生物学国家重点实验室开放基金(201601008)

Effects of Syk on regulation of high glucose-induced apoptosis of H9c2 myocardial cells and its mechanism Long Guangfeng, Xue Meiting, Chen Yufeng, Qiao Yingchun, Tian Xixi, Li Shengyu, Liu Yunde, Shen Yanna, Cui Yujie. School of Medical Laboratory, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China
Corresponding author: Cui Yujie, Email: yujiecuil@126.com

【Abstract】 Objective To study the effects of spleen tyrosine kinase (Syk) on high glucose-induced apoptosis of H9c2 myocardial cells and its mechanism. **Methods** The cultured H9c2 myocardial cells were divided into 5 groups: control group (5.5 mmol/L glucose, NG group), high glucose group (33 mmol/L glucose, HG group), Syk inhibitor with normal glucose group (5.5 mmol/L glucose + 1 μ mol/L BAY, NG + BAY group), Syk inhibitor with high glucose group (33 mmol/L glucose + 1 μ mol/L BAY, HG + BAY group) and osmotic control group (5.5 mmol/L glucose + 27.5 mmol/L mannose, OC group). The protein levels of phospho-Syk, cleaved-caspase-1, Bax, Bcl-2 were measured by Western blotting. The mRNA levels of caspase-1, Bax, Bcl-2 were measured by reverse transcription PCR. Apoptosis of H9c2 myocardial cells was detected by flow cytometry. The cell viability were detected by MTT colorimetry. **Results** Compared with NG group, the viability of H9c2 myocardial cells was decreased ($F=37.3$, $P<0.05$) and the apoptosis rate was increased ($F=46.5$, $P<0.05$) in HG group. The apoptosis rate and viability in OC group and NG + BAY group were not different (all $P>0.05$). Moreover, the protein levels of p-Syk, cleaved-caspase-1, Bax were increased while the level of Bcl-2 was decreased in HG group ($F=8.4, 80.5, 7.6, 37.4$, all

$P < 0.05$). The level of caspase-1, Bax mRNA were increased while the Bcl-2 mRNA was decreased ($F = 130.7, 17.8, 7.18$, all $P < 0.05$) in HG group. Compared with HG group, the cell viability of H9c2 cells was increased ($F = 37.3, P < 0.05$) and the apoptosis rate was reduced in HG + BAY group ($F = 46.5, P < 0.05$). At the same time, the protein levels of cleaved-caspase-1, Bax were decreased and Bcl-2 was increased ($F = 80.5, 7.6, 37.4$, all $P < 0.05$). The mRNA level of caspase-1, Bax were decreased while Bcl-2 mRNA level was decreased ($F = 130.7, 17.8, 7.18$, all $P < 0.05$) in HG + BAY group. **Conclusion** Syk regulates high glucose-induced apoptosis of myocardial cells by regulating the expression of Bax and Bcl-2.

【Key words】 Syk; H9c2 myocardial cell; Apoptosis; Caspase-1; Diabetes mellitus

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81200116); Natural Science Foundation of Tianjin of China (15JCYBJC49700); State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology (201601008)

最近研究表明,链脲佐菌素诱导的糖尿病心脏病大鼠心肌细胞中可见受体相互作用丝氨酸-苏氨酸激酶 3 高表达,后者是细胞凋亡过程的调控因子,其表达升高提示细胞凋亡与高血糖引起的心肌损伤密切相关^[1]。但高血糖引起心肌细胞凋亡的具体机制尚未明了。

脾酪氨酸激酶(Spleen tyrosine kinase, Syk)是一种非受体型酪氨酸激酶,可在造血细胞、上皮细胞、血管内皮细胞等多种细胞中表达,并参与炎症反应过程。在真菌感染中, Syk 可以激活 NOD 样受体蛋白 3 炎症反应小体,募集并活化 caspase-1,从而促进白细胞介素-1 β 的成熟与分泌^[2-3]。研究表明,在高糖环境下, caspase-1 前体被剪切成有活性的 cleaved-caspase-1,可促进白细胞介素-1 β 的成熟与分泌,进而引起心肌细胞凋亡^[4-5]。此外,高血糖可引起磷酸化 Syk (p-Syk) 水平显著升高,因此,推测 Syk 信号通路可能在糖尿病心肌病的发病中起重要作用。本文拟探讨 Syk 对高血糖诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡的影响及其机制,以期阐明 Syk 在糖尿病心肌病发病机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂 DMEM 培养液和胎牛血清购自 Gibco 公司; Syk 抑制剂购自 Amresco 公司; p-Syk、总 Syk (t-Syk)、Bax 和 Bcl-2 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司; caspase-1 抗体购自 Abcam 公司; β -actin 抗体购自 Santa Cruz 公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自 Thermo 公司; Annexin V/PI 双染试剂盒购自 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 H9c2 心肌细胞培养 H9c2 心肌细胞株购于中国医学科学院基础医学研究所。用含 10% 胎牛血清的正常糖 DMEM 培养基,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 2~3 d 后用 0.25% 胰酶消化传代 1 次,以 1×10^7 /L 密度接种于培养板中,取对数生长期 H9c2

心肌细胞进行实验。

1.2.2 H9c2 心肌细胞的分组和处理 将培养的 H9c2 心肌细胞分为 5 组: 对照组 (NG 组)、高糖组 (HG 组)、甘露醇高渗透压对照组 (OC 组)、Syk 抑制剂对照组 (NG + BAY 组) 和 Syk 抑制剂高糖组 (HG + BAY 组), 对上述 5 组细胞分别给予相应的预处理方法和培养液环境, 见表 1。

表 1 不同组别 H9c2 心肌细胞预处理方法及培养环境

组别	预处理方法	培养液环境
NG 组	无	普通培养液 (5.5 mmol/L 葡萄糖) 处理 36 h
HG 组	无	高糖培养液 (33 mmol/L 葡萄糖) 处理 36 h
OC 组	无	高渗透压培养液 (5.5 mmol/L 葡萄糖 + 27.5 mmol/L 甘露醇) 处理 36 h
NG + BAY 组	BAY (1 μ mol/L) 处理细胞 2 h	普通培养液 (5.5 mmol/L 葡萄糖) 处理 36 h
HG + BAY 组	BAY (1 μ mol/L) 处理细胞 2 h	高糖培养液 (33 mmol/L 葡萄糖) 处理 36 h

注: Syk: 脾酪氨酸激酶; BAY: Syk 抑制剂; NG 组: 对照组; HG 组: 高糖组; OC 组: 甘露醇高渗透压对照组; NG + BAY 组: Syk 抑制剂对照组; HG + BAY 组: Syk 抑制剂高糖组

1.2.3 Annexin V-FITC/PI 双标法及流式细胞仪检测细胞凋亡 5 组细胞在相应培养液培养 36 h 后, 用不含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化细胞, 200 g 离心 5 min, PBS 洗涤两次, 用 100 μ l 1 \times binding buffer 重悬细胞, 每 100 μ l 细胞悬液中分别加入 5 μ l FITC Annexin V 和 PI 混匀, 室温避光孵育 15 min。然后, 每管加 400 μ l binding buffer, 1 h 后内流式细胞仪检测细胞凋亡情况。收集数据后在流式二维图中计算凋亡率。

1.2.4 Western 印迹检测 p-Syk、cleaved-caspase-1、Bax、Bcl-2 蛋白表达 H9c2 心肌细胞接种于 6 孔板中, 分别给予相应处理 10 min 后提取蛋白检测 p-Syk、t-Syk, 给予相应处理 36 h 后提取蛋白检测

cleaved-caspase-1、pro-caspase、Bax、Bcl-2、 β -actin。用冷 PBS 冲洗两遍后加入 RIPA 裂解液,室温静置 30 min,13 000 g 离心 30 min 后取上清液,BCA 法测定蛋白浓度。蛋白上样总量为 40 μ g,通过浓度为 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳法,将蛋白质从凝胶转移至 PVDF 膜上。使用 5% 脱脂奶粉封闭处理 PVDF 膜 1 h,将膜放入一抗溶液中,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日, TBST 洗涤 PVDF 膜 10 min \times 3 次,将膜放入 HRP 标记的二抗溶液中,室温孵育 1 h 后, TBST 洗涤 PVDF 膜 10 min \times 3 次, ECL 发光显示蛋白条带。用 Image J 软件对其进行半定量分析,以 p-Syk/t-Syk、cleaved-caspase-1/pro-caspase、Bax/ β -actin、Bcl-2/ β -actin 的比值进行分析。

1.2.5 逆转录 PCR 检测 H9c2 心肌细胞以 1×10^7 /L 的密度接种在 6 孔板中培养,分别给予相应处理 36 h 后,使用 Trizol 法提取 RNA。用 Nanodrop 分光光度仪检测 RNA 的纯度和浓度。以 RNA 为模板,逆转录获得 cDNA 后,再以 cDNA 为模板,采用 RT-PCR 试剂盒进行扩增,其中以 β -actin 为内参,以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳扩增产物。采用多色荧光化学发光成像仪对该琼脂糖凝胶曝光拍照,相应的引物序列见表 2。

1.2.6 MTT 比色法测定 H9c2 心肌细胞活力 将细胞以 1×10^7 /L,每孔 200 μ l 的密度接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后分组对应处理,每孔加入 20 μ l MTT

(5 g/L),继续培养 4 h 后,弃上层培养液,每孔加 DMSO 0.15 ml,振荡 15 min,用酶标仪检测各孔吸光度值(检测波长为 570 nm)。

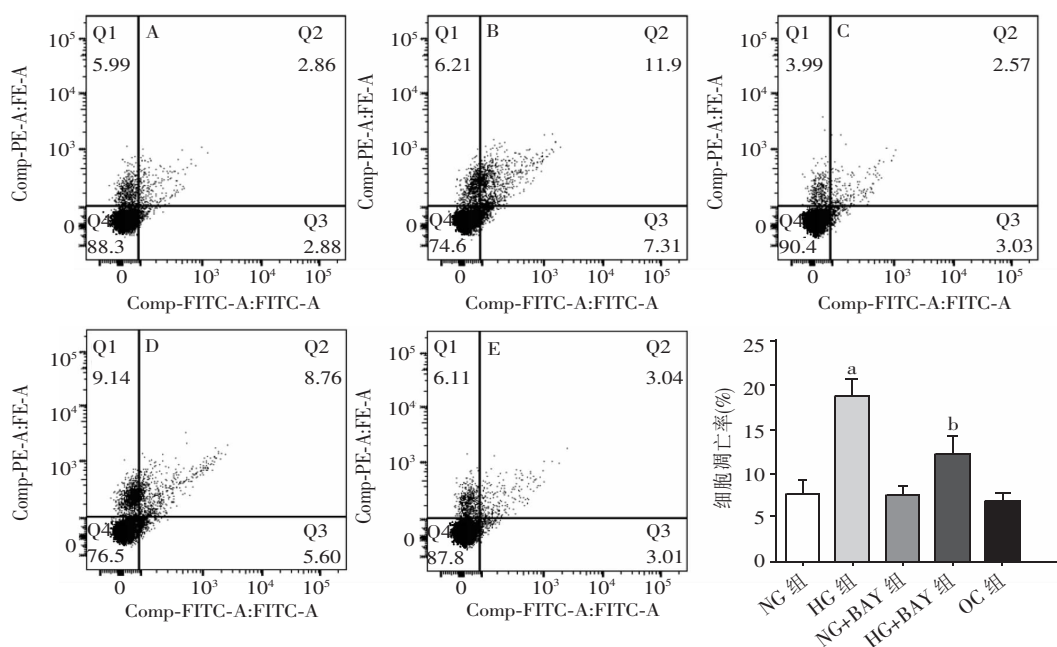
表 2 RT-PCR 基因引物序列

基因	引物序列(5'→3')	扩增片段长度(bp)
caspase-1	上游引物: TGCCTGGTCTTGTGACTTGGAG	133
	下游引物: ATGTCCTGGGAAGAGGTAGAAACG	
Bax	上游引物: GCGATGAAGTGGACAACAAC	252
	下游引物: GCAAAGTAGAAAAGGGCAACC	
Bcl-2	上游引物: GGTGGACAACATCGCTCTG	193
	下游引物: TGAGCAGCGTCTTCAGAGACA	
β -actin	上游引物: GTTGACATCCGTAAAGACC	236
	下游引物: GACTCATCGTACTCTGCT	

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件分析数据,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

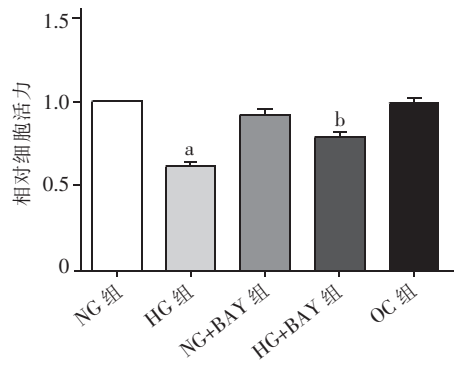
2 结果

2.1 Syk 抑制剂对高糖引起的 H9c2 心肌细胞凋亡和细胞活力变化的影响 与 NG 组相比, HG 组 H9c2 心肌细胞凋亡率增加($F = 46.5$, $P < 0.05$)、细胞的活力下降($F = 37.3$, $P < 0.05$), OC 组、NG + BAY 组细胞凋亡率与细胞活力差异均无统计学意义(P 均 > 0.05);与 HG 组相比, HG + BAY 组心肌细胞凋亡率降低($F = 46.5$, $P < 0.05$)、细胞活力升高($F = 37.3$, $P < 0.05$),见图 1、2。



注: Syk: 脾酪氨酸激酶; NG 组: 对照组; HG 组: 高糖组; NG+BAY 组: Syk 抑制剂对照组; HG+BAY 组: Syk 抑制剂高糖组; OC 组: 甘露醇高渗透压对照组; A: NG 组; B: HG 组; C: NG+BAY 组; D: HG+BAY 组; E: OC 组; 与 NG 组相比, $P < 0.05$; 与 HG 组相比, $P < 0.05$

图 1 Syk 抑制剂对 H9c2 心肌细胞凋亡的影响



注: Syk: 脾酪氨酸激酶; NG 组: 对照组; HG 组: 高糖组; NG+BAY 组: Syk 抑制剂对照组; HG+BAY 组: Syk 抑制剂高糖组; OC 组: 甘露醇高渗透压对照组; 与 NG 组相比, $^aP<0.05$; 与 HG 组相比, $^bP<0.05$

图 2 MTT 比色法检测 Syk 抑制剂对 H9c2 心肌细胞活力的影响

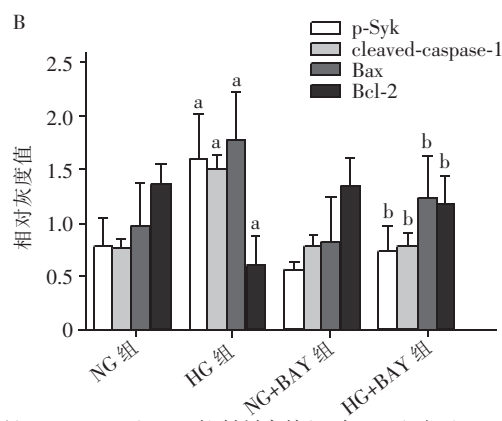
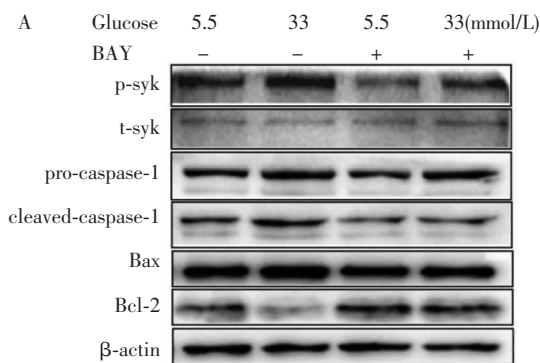
2.2 Syk 抑制剂对高糖引起的 H9c2 心肌细胞 caspase-1、Bax、Bcl-2 表达变化的影响 与 NG 组相比, HG 组细胞内 p-Syk、cleaved-caspase-1 及 Bax 蛋白表达增加, Bcl-2 蛋白表达降低 ($F=8.4、80.5、7.6、$

$37.4, P$ 均 <0.05), NG + BAY 组上述蛋白表达差异无统计学意义 (P 均 >0.05); 与 HG 组相比, HG + BAY 组 p-Syk、cleaved-caspase-1 及 Bax 蛋白表达降低, Bcl-2 蛋白表达水平升高 ($F=8.4、80.5、7.6、37.4, P$ 均 <0.05), 见图 3。

与 NG 组相比, HG 组 caspase-1 及 Bax mRNA 表达升高, Bcl-2 mRNA 表达降低 ($F=130.7、17.8、7.18, P$ 均 <0.05), NG + BAY 组上述 mRNA 表达差异无统计学意义 (P 均 >0.05); 与 HG 组相比, HG + BAY 组细胞内 caspase-1 及 Bax mRNA 表达降低, Bcl-2 mRNA 表达升高 ($F=130.7、17.8、7.18, P$ 均 <0.05), 见图 4。

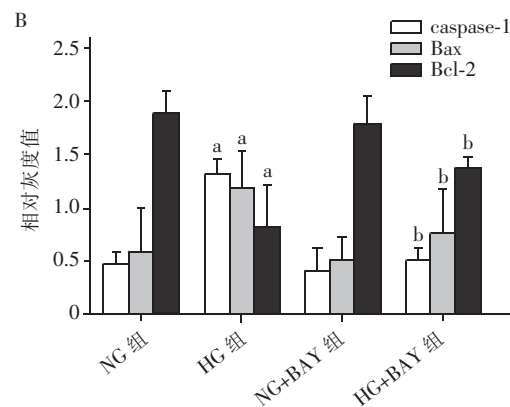
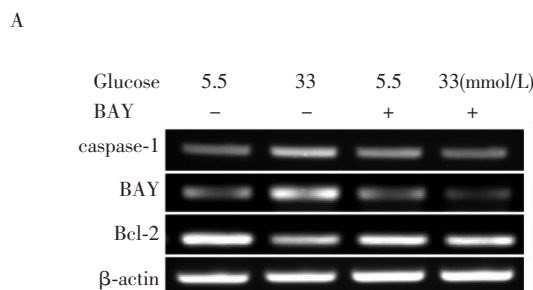
3 讨论

心肌细胞凋亡是糖尿病心肌病的一个重要特点, 当心肌细胞凋亡达到一定数量时, 就会导致心脏组织结构和心肌功能发生改变^[6]。研究证明, 持续的高血糖通过诱导心肌细胞凋亡改变心肌结构和功能, 是引起心功能不全的主要原因^[7]。高血糖及其



注: NG 组: 对照组; HG 组: 高糖组; NG+BAY 组: Syk 抑制剂对照组; HG+BAY 组: Syk 抑制剂高糖组; 与 NG 组相比, $^aP<0.05$; 与 HG 组相比, $^bP<0.05$; Syk: 脾酪氨酸激酶; β-actin: 肌动蛋白; p-Syk: 磷酸化 Syk

图 3 Syk 抑制剂对 H9c2 心肌细胞 p-Syk、caspase-1、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响



注: NG 组: 对照组; HG 组: 高糖组; NG+BAY 组: Syk 抑制剂对照组; HG+BAY 组: Syk 抑制剂高糖组; 与 NG 组相比, $^aP<0.05$; 与 HG 组相比, $^bP<0.05$; Syk: 脾酪氨酸激酶; β-actin: 肌动蛋白

图 4 Syk 抑制剂对 H9c2 心肌细胞 caspase-1、Bax、Bcl-2 mRNA 表达的影响

诱导的氧化应激还可通过激活 p38 丝裂原活化蛋白激酶,促进凋亡相关蛋白 Bax 从细胞质进入线粒体,启动细胞的线粒体凋亡途径,最终导致心脏功能障碍^[8]。抑制凋亡蛋白 Bcl-2 在糖尿病心肌病的发生和发展中亦具有重要作用^[9]。但是,在糖尿病心肌病发病过程中调控 Bcl-2 的上游信号尚不清楚。

Syk 是一种非受体型蛋白酪氨酸激酶,除参与免疫应答,还参与高糖诱导的细胞内信号通路的转导^[10]。研究表明,高糖诱导的氧化应激促进细胞内高迁移率蛋白-1 表达增多,高迁移率蛋白-1 激活 Toll 样受体 4,活化的 Toll 样受体 4 进而促进 Syk 的磷酸化^[11]。p-Syk 通过抑制核因子- κ B 抑制蛋白的活性,最终促进核因子- κ B 的表达,当加入 Syk 抑制剂后,核因子- κ B 表达量明显下降^[12-13]。p-Syk 还可激活细胞外调节蛋白激酶,进而使蛋白激酶-1 活性增加,核因子- κ B 与蛋白激酶-1 共同促进转化生长因子的产生^[9]。本研究用 5 mmol/L 葡萄糖作为基础代谢的对照,采用 33 mmol/L 葡萄糖作为高糖诱导 H9c2 心肌细胞凋亡的条件,发现高糖刺激不仅可以诱导 H9c2 心肌细胞凋亡、活力降低,还可促进 p-Syk、caspase-1、Bax 表达上调,同时抑制 Bcl-2 的表达,当给予 Syk 抑制剂预处理 2 h 后,可显著抑制高糖导致的心肌细胞凋亡、活力降低,并抑制 p-Syk、caspase-1、Bax 表达,同时上调 Bcl-2 表达。表明 Syk 参与调控高糖诱导的心肌细胞凋亡过程。

综上所述,本研究发现 Syk 通过调控 Bax、Bcl-2,在高糖刺激诱导心肌细胞凋亡过程中发挥作用,而 caspase-1 可能参与了这一过程。这可能为探讨糖尿病心肌病发病机制提供新的思路,为糖尿病心肌病的防治提供新的治疗靶点。

参 考 文 献

- [1] 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. DOI: 10.1016/j.jphs.2014.12.007.
- [2] Saïd-Sadier N, Padilla E, Langsley G, et al. Aspergillus fumigatus stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase[J]. PLoS One, 2010, 5(4): e10008. DOI: 10.1371/journal.pone.0010008.
- [3] Gross O, Poeck H, Bscheider M, et al. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence[J]. Nature, 2009, 459(7245): 433-436. DOI: 10.1038/nature07965.
- [4] Liu Z, Zhao N, Zhu H, et al. Circulating interleukin-1 β promotes endoplasmic reticulum stress-induced myocytes apoptosis in diabetic cardiomyopathy via interleukin-1 receptor-associated kinase-2[J]. Cardiovasc Diabetol, 2015, 14: 125. DOI: 10.1186/s12933-015-0288-y.
- [5] Grant RW, Dixit VD. Mechanisms of disease: inflammasome activation and the development of type 2 diabetes[J]. Front Immunol, 2013, 4: 50. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00050.
- [6] Rajesh M, Mukhopadhyay P, Bútkai S, et al. Cannabidiol attenuates cardiac dysfunction, oxidative stress, fibrosis, and inflammatory and cell death signaling pathways in diabetic cardiomyopathy[J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 56(25): 2115-2125. DOI: 10.1016/j.jacc.2010.07.033.
- [7] 余薇, 闵清, 郭霜. NADPH 氧化酶在高糖诱导的 H9c2 心肌细胞损伤中的作用[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(10): 1379-1382. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2015.10.011.
- [8] Liu ZW, Zhu HT, Chen KL, et al. Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) signaling pathway plays a major role in reactive oxygen species (ROS)-mediated endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in diabetic cardiomyopathy[J]. Cardiovasc Diabetol, 2013, 12: 158. DOI: 10.1186/1475-2840-12-158.
- [9] Anderson EJ, Rodriguez E, Anderson CA, et al. Increased propensity for cell death in diabetic human heart is mediated by mitochondrial-dependent pathways[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 300(1): H118-H124. DOI: 10.1152/ajpheart.00932.2010.
- [10] Katare R, Caporali A, Zentilin L, et al. Intravenous gene therapy with PIM-1 via a cardiotropic viral vector halts the progression of diabetic cardiomyopathy through promotion of prosurvival signaling[J]. Circ Res, 2011, 108(10): 1238-1251. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.239111.
- [11] Yang WS, Kim JS, Han NJ, et al. Toll-like receptor 4/spleen tyrosine kinase complex in high glucose signal transduction of proximal tubular epithelial cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(6): 2309-2319. DOI: 10.1159/000374034.
- [12] Bae YS, Lee JH, Choi SH, et al. Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein; toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2[J]. Circ Res, 2009, 104(2): 210-218. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.181040.
- [13] Yang WS, Seo JW, Han NJ, et al. High glucose-induced NF- κ B activation occurs via tyrosine phosphorylation of Ikappa-B α in human glomerular endothelial cells: involvement of Syk tyrosine kinase[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 294(5): F1065-F1075. DOI: 10.1152/ajprenal.00381.2007.

(收稿日期: 2017-01-20)