

姜黄素对缺血再灌注 H9c2 心肌细胞凋亡和 GSK-3 表达及其磷酸化的影响

虞燕萍¹ 周承亮² 傅云峰² 黄先玫¹

摘要 **目的** 观察姜黄素对缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R) H9c2 心肌细胞凋亡和糖原合成酶激酶 3(GSK-3)表达及其磷酸化的影响。**方法** 利用缺血台氏液对体外培养的 H9c2 心肌细胞模拟 I/R 处理,同时随机分为模型组(模拟缺血 90 min,再灌注 30 min)、姜黄素组(再灌注同时加入 7.5 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素)和对照组(正常台氏液培养 120 min 代替模拟 I/R),采用流式细胞术检测细胞凋亡情况,采用 Western blot 检测 GSK-3、酪氨酸磷酸化 GSK-3 (pTyr-GSK-3)和丝氨酸磷酸化 GSK-3 (pSer-GSK-3)蛋白的表达。**结果** 与对照组比较,模型组 H9c2 细胞凋亡率明显提高($t=10.439, P=0.000$),模型组 pTyr-GSK-3 和 pSer-GSK-3 表达均显著增加($t=5.208, P=0.006; t=5.854, P=0.004$)。与模型组比较,姜黄素组凋亡率及 pTyr-GSK-3 表达水平显著降低($t=-8.325, P=0.001; t=-3.607, P=0.023$),存活率及 pSer-GSK-3 表达水平显著升高($t=9.165, P=0.001; t=3.747, P=0.02$)。**结论** GSK-3 的酪氨酸和丝氨酸磷酸化可能参与心肌细胞 I/R 损伤,姜黄素减少 I/R 心肌细胞凋亡可能与其通过减少酪氨酸磷酸化、增加丝氨酸磷酸化抑制 GSK-3 活性有关。

关键词 姜黄素;心肌细胞;缺血再灌注;糖原合成酶激酶-3;酪氨酸磷酸化蛋白;丝氨酸磷酸化蛋白

Effects of Curcumin on Ischemia/Reperfusion Induced Apoptosis of H9c2 Myocardial Cells and the Expression of Glycogen Synthase Kinase-3 and Its Phosphorylation YU Yan-ping¹, ZHOU Cheng-liang², FU Yun-feng², and HUANG Xian-mei¹ 1 Department of Pediatrics, Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou (310006), China; 2 Central Laboratory, Women's Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou (310006), China

ABSTRACT **Objective** To investigate the effects of curcumin on the apoptosis of ischemia/reperfusion (I/R) induced H9c2 myocardial cells and the expression of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) and its phosphorylation state. **Methods** I/R of H9c2 cells *in vitro* was simulated by an ischemic Tyrode solution. Cells were randomly divided into 3 groups, i.e., the model group (exposed to ischemic solution for 90 min followed by 30 min reperfusion with the normal Tyrode solution), the curcumin group (7.5 $\mu\text{mol/L}$ curcumin added at the onset of reperfusion for 30 min), and the control group (exposed to normal Tyrode solution for 120 min). Then, the cell apoptosis was detected in 3 groups by flow cytometry. The expression levels of GSK-3, phosphotyrosine-GSK-3 (pTyr-GSK-3), and phosphoserine-GSK-3 (pSer-GSK-3) were detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the apoptosis rate was obviously enhanced in the model group ($t=10.439, P=0.000$). And the relative expression levels of both pTyr-GSK-3 and pSer-GSK-3 significantly increased in the model group ($t=5.208, P=0.006; t=5.854, P=0.004$, respectively). Compared with the model group, the apoptosis rate and the expression of pTyr-GSK-3 significantly decreased in the curcumin group ($t=-8.325, P=0.001; t=-3.607, P=0.023$). Compared with the model group, the rate of viable cells and the expression of pSer-GSK-3 were significantly enhanced in the curcumin group ($t=9.165, P=0.001; t=3.747, P=0.02$). **Conclusions** Both pTyr-GSK-3 and pSer-GSK-3 might participate in the IR injured myocardial cells. Curcumin could reduce apoptosis of I/R injured myocardial cells, which might be correlated with GSK-3 inhibition by decrea-

基金项目:南京医科大学科技发展基金(No.2011NJMU119)

作者单位:1.杭州市第一人民医院儿科(杭州 310006);2.浙江大学医学院附属妇产科医院中心实验室(杭州 310006)

通讯作者:黄先玫, Tel:0571-87065701 转 11181, E-mail: hxianmei630715@163.com

sing tyrosine phosphorylation and increasing serine phosphorylation.

KEYWORDS curcumin; myocyte; ischemia/reperfusion; glycogen synthase kinase 3; tyrosine-phosphorylated protein; serine-phosphorylated protein

心肌组织缺血再灌注 (ischemia-reperfusion, I/R) 损伤目前仍然是临床亟待解决的问题。现已证实, 传统中药姜黄素能对抗心脏的 I/R 和氧化应激等各种损伤^[1], 但其机制并未完全阐明。糖原合成酶激酶 3 (glycogen synthase kinase-3, GSK-3) 是一种多功能的丝/苏氨酸蛋白激酶, 近年来的研究提示 GSK-3 可能与 I/R 损伤等心血管疾病关系密切^[2]。但姜黄素对心肌细胞 I/R 损伤的保护作用是否与 GSK-3 有关尚不清楚。本研究初步探讨了姜黄素对模拟 I/R 损伤的 H9c2 心肌细胞凋亡和 GSK-3 表达及其酪氨酸磷酸化 GSK-3 (pTyr-GSK-3) 和丝氨酸磷酸化 GSK-3 (pSer-GSK-3) 蛋白的影响。

材料与方法

1 细胞株 H9c2 大鼠心肌细胞株来自美国 ATCC, 在含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 完全培养基内, 5% CO₂、37℃ 培养。

2 主要试剂及仪器 姜黄素 (批号: 054K1030)、二甲基亚砜 (DMSO, 批号: RNBB7017)、D-2-脱氧葡萄糖 (批号: D8375)、HEPES 缓冲液 (批号: 83264) 和蛋白酶抑制剂鸡尾酒 (批号: 016K4065) 购自 Sigma 公司, 鼠抗人 GSK-3 一抗 (批号: H0508)、兔抗人 pTyr-GSK-3 一抗 (批号: K0507)、兔抗人 pSer-GSK-3 一抗 (批号: A2610) 及鼠抗人 β -actin 一抗 (批号: D2710) 购自 Santa Cruz 公司, Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (批号: 699477) 购自 Invitrogen 公司, 超敏 ECL 试剂盒 (批号: KL140445) 购自 Pierce 公司, 辣根过氧化物酶标记的二抗购自联科生物公司, Bradford 蛋白定量试剂盒 (批号: SK3041) 购自上海生工, 高糖 DMEM 培养基 (批号: 11995) 购自 Gibco 公司, 胎牛血清 (批号: 110809) 购自杭州四季青公司, Na₂S₂O₄ (批号: T20100106) 购自国药集团化学试剂公司, 其他试剂均为国产分析纯。主要仪器: 超净工作台 (VS-1300c, 苏净集团), 细胞培养箱 (series II, Thermo-Forma, 美国), 流式细胞仪 (EPICS ALTRA, Beckman Coulter, 美国), 电泳仪 (Powerpac Basic, BIO-RAD, 美国), 光密度扫描仪 (GS-800, BIO-RAD, 美国)。

3 I/R 模型制备及分组 按文献 [3] 方法对

H9c2 细胞模拟 I/R 处理。配制正常台氏液: 140 mmol/L NaCl, 6 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L CaCl₂, 5 mmol/L HEPES, 5.8 mmol/L 葡萄糖, pH 7.4。配制缺血台氏液: 140 mmol/L NaCl, 6 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L CaCl₂, 5 mmol/L HEPES, 10 mmol/L D-2-脱氧葡萄糖, 10 mmol/L Na₂S₂O₄, pH 7.4。对数生长期细胞, 去除培养基, PBS 小心洗 1 遍, 用正常台氏液预培养 1 h 后进入模拟 I/R 程序。实验分为 3 组 (每组 $n=3$): I/R 组 (模型组): 缺血台氏液培养 90 min 后, 改用正常台氏液再培养 30 min; 姜黄素组: 缺血台氏液培养 90 min 后, 改用正常台氏液, 同时立即加入 7.5 μ mol/L (预实验提示 ≤ 10 μ mol/L 姜黄素对 H9c2 无细胞毒效应) 姜黄素再培养 30 min, 姜黄素用 DMSO 溶解, 确保实验时 DMSO 的终浓度 $\leq 0.1\%$; 对照组: 取即将进入模拟 I/R 程序的细胞, 正常台氏液培养 120 min 代替 I/R; 模型组及对照组最后 30 min 均加入与姜黄素组等体积 DMSO。

4 检测指标及方法

4.1 细胞凋亡检测 采用流式细胞术检测细胞凋亡情况, H9c2 细胞按上述方法模拟 I/R 处理, 根据 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明书, 胰酶消化、收集各组细胞, PBS 洗 2 次, 加入 100 μ L 结合缓冲液, 重悬细胞, 加入 5 μ L Annexin V-FITC, 1 μ L PI, 混匀, 避光 10 min, 再加入 400 μ L 结合缓冲液, 上流式细胞仪检测、分析凋亡率, 重复 3 次取平均值。

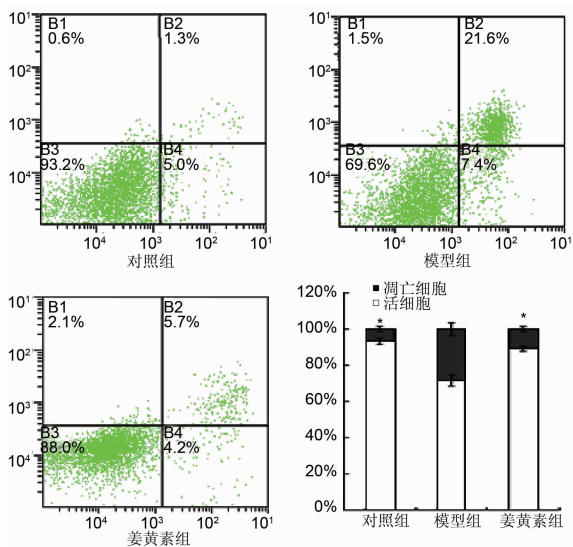
4.2 GSK-3、pTyr-GSK-3 及 pSer-GSK-3 蛋白表达检测 采用 Western blot 检测蛋白表达。H9c2 细胞接种 6 孔板, 至次融合, 按前述分组处理后去除培养上清, PBS 轻柔洗涤 1 次, 加入含 1% 蛋白酶抑制剂鸡尾酒的细胞蛋白裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.02% Na₃N₃) 200 μ L, 刮下细胞, 抽提蛋白, Bradford 法测定蛋白浓度。各取 30 μ g 蛋白样品, 12% SDS-PAGE 电泳后转膜, 在含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20) 封闭后, 加一抗 (GSK-3 一抗 1:500, pTyr-GSK-3 一抗 1:400, pSer-GSK-3 一抗 1:400, β -actin 一抗 1:500) 4℃ 过夜, 洗膜后, 二抗室温孵育 1 h, 再洗膜后, ECL 显影, GS-800 成像系

统扫描胶片,Quantity One 软件分析条带像素值,蛋白相对表达量 = 待测蛋白的净像素值/ β -actin 的净像素值,重复 3 次取平均值。

5 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 H9c2 细胞凋亡情况比较(图 1) 与对照组(凋亡率:6.5% $\pm$ 1.5%;存活率:92.6% $\pm$ 1.8%)比较,模型组 H9c2 细胞凋亡率明显提高(27.9% $\pm$ 3.2%, $t = 10.439$, $P = 0.000$);与模型组(凋亡率:27.9% $\pm$ 3.2%;存活率:70.2% $\pm$ 3.0%)比较,姜黄素组凋亡率显著降低(10.7% $\pm$ 1.5%, $t = -8.325$, $P = 0.001$),存活率显著升高(87.4% $\pm$ 1.3%, $t = 9.165$, $P = 0.001$)。



注:右侧象限为凋亡细胞(右下为早期凋亡、右上为晚期凋亡),左下象限为活细胞;与模型组比较, $*P < 0.01$

图 1 各组 H9c2 细胞凋亡情况比较

2 各组 GSK-3、pTyr-GSK-3、pSer-GSK-3 蛋白表达比较(表 1,图 2) 与对照组比较,模型组 GSK-3 蛋白相对表达水平差异无统计学意义($t = 0.952$, $P = 0.395$),pTyr-GSK-3 和 pSer-GSK-3 表达均显著增加(分别为 $t = 5.208$, $P = 0.006$; $t = 5.854$, $P = 0.004$)。

与模型组比较,姜黄素组 GSK-3 蛋白表达差异无统计学意义($t = 1.45$, $P = 0.22$);姜黄素组 pTyr-GSK-3 表达水平显著降低($t = -3.607$, $P = 0.023$),pSer-GSK-3 表达水平显著升高($t = 3.747$, $P = 0.02$)。

表 1 各组 GSK-3、pTyr-GSK-3、pSer-GSK-3

蛋白表达比较 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	n	GSK-3	pTyr-GSK-3	pSer-GSK-3
对照	3	115.1 $\pm$ 12.6	25.4 $\pm$ 9.2	16.2 $\pm$ 12.0
模型	3	123.9 $\pm$ 10.1	68.5 $\pm$ 11.0 [*]	60.3 $\pm$ 5.0 [*]
姜黄素	3	135.1 $\pm$ 8.7	43.8 $\pm$ 4.5 [△]	90.7 $\pm$ 13.1 [△]

注:与对照组比较, $*P < 0.01$;与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

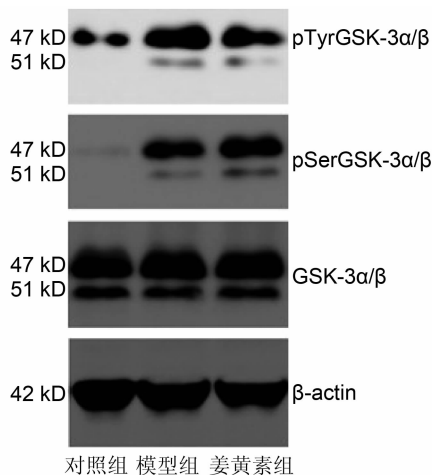


图 2 各组 GSK-3、pTyr-GSK-3、pSer-GSK-3 蛋白表达

讨 论

姜黄素是传统中药姜黄的主要成分,具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化等广泛的药理作用,其对 I/R 的保护效应近年来颇受关注^[4]。本研究发现,体外培养的 H9c2 心肌细胞在模拟 I/R 损伤后的细胞凋亡率明显上升。虽然再灌注同时给予 7.5 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素不能完全消除 I/R 损伤导致的细胞凋亡,但其凋亡率明显低于 I/R 组,并促使活细胞比例明显回升,说明减少心肌细胞凋亡可能是姜黄素改善 I/R 损伤的重要途径之一。

GSK-3 作为一种丝/苏氨酸蛋白激酶,其生物学作用已远远超过了最初认为的糖代谢调节酶的功能,广泛参与了细胞基本功能的调节,如细胞凋亡、细胞增殖和细胞骨架的稳定等^[5]。GSK-3 有两种生物学功能相似的亚型,包括 GSK-3 α (51 kD)和 GSK-3 β (47 kD),但研究主要关注 GSK-3 β 。GSK-3 活性受磷酸化双向调控,如果 GSK-3 α 第 279 位的酪氨酸和 GSK-3 β 第 216 位的酪氨酸被磷酸化,其活性则增强;而 GSK-3 α 第 21 位的丝氨酸和 GSK-3 β 第 9 位的丝氨酸被磷酸化,则迅速失活^[6]。近年来研究证明 GSK-3 β 与组织 I/R 损伤密切相关。研究提示,抑制 GSK-3 β 活性可减轻肝脏^[7]、肾脏^[8]、小肠^[9]、脑^[10]和心肌^[11,12]等多种 I/R 损伤。如 GSK-3 β 抑制剂 SB216763 能有效改善小鼠

肝脏 I/R 损伤^[7],抑制 GSK-3 β 活性对心肌梗死模型的 I/R 损伤有良好保护作用^[11,12]。

本研究采用能同时特异地识别 GSK-3 α 和 GSK-3 β 及其磷酸化蛋白的抗体检测相应蛋白的表达,发现 H9c2 细胞以表达 GSK-3 β 亚型为主,静息状态下 Tyr 和 Ser 双向磷酸化水平都较低。I/R 对 H9c2 细胞 GSK-3 蛋白表达无显著影响,但可上调 pTyr-GSK-3 和 pSer-GSK-3 的表达,提示 GSK-3 的双向磷酸化都参与心肌细胞的 I/R 损伤过程。而姜黄素虽然也不影响 GSK-3 蛋白的合成,但能显著下调 pTyr-GSK-3 表达,并上调 pSer-GSK-3 表达,提示姜黄素可通过减少酪氨酸磷酸化和增加丝氨酸磷酸化而抑制或降低 GSK-3 活性。姜黄素减少 I/R 心肌细胞凋亡可能与其抑制 GSK-3 活性有关。研究表明,GSK-3 β 激活可促进线粒体膜通透性转运孔(mPTP)的开放,而 mPTP 开放则启动凋亡程序导致细胞凋亡^[2,13]。姜黄素降低 GSK-3 活性后,可能通过阻止和延缓 mPTP 的开放,进而减少或抑制 I/R 细胞的凋亡。由于 mPTP 的分子组成复杂、且 GSK-3 的潜在底物众多,其具体调控机制还需要进一步深入研究。此外,本研究的结果来自于体外培养细胞模拟 I/R,今后需要开展在体心肌 I/R 的相关实验。

参 考 文 献

- [1] Srivastava G, Mehta JL. Currying the heart: curcumin and cardioprotection [J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2009, 14(1): 22-27.
- [2] 白宝宝,陶谦民,夏强. 糖原合成酶激酶-3 β 与心血管疾病[J]. 国际心血管病杂志, 2010, 37(1): 24-26.
- [3] 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-3beta[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 295(3): H1227-H1233.
- [4] Zhou H, Beevers CS, Huang S. The targets of curcumin[J]. Curr Drug Targets, 2011, 12(3): 332-347.
- [5] Forde JE, Dale TC. Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate[J]. Cell Mol Life Sci, 2007, 64(15): 1930-1944.
- [6] Joep RS, Johnson GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3[J]. Trends Biochem Sci, 2004, 29(2): 95-102.
- [7] 任锋,张海燕,朴正福,等. 糖原合成酶激酶-3 β 在肝脏热缺血再灌注损伤中的作用及其干预[J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(7): 547-551.
- [8] Vasileva AK, Plotnikov EY, Kazachenko AV, et al. Inhibition of GSK-3 β decreases the ischemia-induced death of renal cells [J]. Bull Exp Biol Med, 2010, 149(3): 303-307.
- [9] Cuzzocrea S, Mazzon E, Esposito E, et al. Glycogen synthase kinase-3beta inhibition attenuates the development of ischemia/reperfusion injury of the gut [J]. Intens Care Med, 2007, 33(5): 880-893.
- [10] Collino M, Thiemermann C, Mastrocola R, et al. Treatment with the glycogen synthase kinase-3beta inhibitor, TDZD-8, affects transient cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat hippocampus[J]. Shock, 2008, 30(3): 299-307.
- [11] Gao HK, Yin Z, Zhou N, et al. Glycogen synthase kinase 3 inhibition protects the heart from acute ischemia-reperfusion injury via inhibition of inflammation and apoptosis[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2008, 52(3): 286-292.
- [12] Zhai P, Sciarretta S, Galeotti J, et al. Differential roles of GSK-3 β during myocardial ischemia and ischemia/reperfusion [J]. Circ Res, 2011, 109(5): 502-511.
- [13] Miura T, Tanno M. Mitochondria and GSK-3beta in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2010, 24(3): 255-263.

(收稿:2012-05-29 修回:2012-09-24)