

过表达 *SIRT1* 基因通过 PI3K/AKT 信号通路抑制高糖刺激心肌 H9c2 细胞凋亡和活性氧水平*

翟铁¹, 郝凤杰^{1△}, 田雪品¹, 张宗群²

(承德市中心医院¹内分泌科,²神经内科, 河北承德 067000)

[摘要] 目的: 探讨过表达沉默信息调节因子 1 (*SIRT1*) 对高糖刺激心肌 H9c2 细胞凋亡和活性氧簇 (ROS) 水平的影响。方法: 分别用空载质粒 (pcDNA3.1-NC) 和 *SIRT1* 过表达质粒 (pcDNA3.1-SIRT1) 转染心肌细胞, 并进行高糖诱导。实验分为对照组、高糖组、高糖 + pcDNA3.1-NC 组和高糖 + pcDNA3.1-SIRT1 组, 用 qPCR 和 Western blot 法分别检测各组心肌 H9c2 细胞的 *SIRT1* 表达, 噻唑蓝 (MTT) 法检测细胞的活力, 流式细胞术检测细胞凋亡, DCFH-DA 检测细胞内 ROS 水平, Western blot 检测细胞中磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、磷酸化 PI3K、AKT 和磷酸化 AKT 的蛋白水平。结果: 与对照组相比, 高糖诱导的心肌 H9c2 细胞中 *SIRT1* 表达显著降低, 细胞活力显著下降, ROS 水平和细胞凋亡率增加, PI3K 和 AKT 磷酸化蛋白水平下调 ($P < 0.05$); 过表达 *SIRT1* 可诱导高糖刺激的心肌 H9c2 细胞活力增加, ROS 水平和凋亡率降低, PI3K 和 AKT 磷酸化蛋白水平上调 ($P < 0.05$)。结论: 过表达 *SIRT1* 可通过调控 PI3K/AKT 信号通路逆转高糖刺激心肌 H9c2 细胞活力的降低及凋亡率和氧化应激的增加。

[关键词] 沉默信息调节因子 1; PI3K/AKT 信号通路; 活性氧簇; 细胞凋亡; 糖尿病心肌病

[中图分类号] R587.2; R363.2 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.05.018

Over-expression of *SIRT1* gene inhibits high glucose-stimulated H9c2 cardiomyocyte apoptosis and ROS level through PI3K/AKT signaling pathway

ZHAI Tie¹, HAO Feng-jie¹, TIAN Xue-pin¹, ZHANG Zong-qun²

(¹Department of Endocrinology, ²Department of Neurology, Chengde Municipal Central Hospital, Chengde 067000, China.

E-mail: haofengjie@medmail.com.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effects of silent information regulator 1 (*SIRT1*) over-expression on the apoptosis and the level of reactive oxygen species (ROS) in high glucose-induced H9c2 cardiomyocytes. **METHODS:** H9c2 cardiomyocytes were transfected with empty plasmid (pcDNA3.1-NC) and *SIRT1* over-expression plasmid (pcDNA3.1-SIRT1), and then stimulated by high glucose. The H9c2 cells were divided into control group, high glucose group, high glucose + pcDNA3.1-NC group and high glucose + pcDNA3.1-SIRT1 group. The expression of *SIRT1* at mRNA and protein levels in each group was determined by qPCR and Western blot. The viability of the cells was measured by MTT assay. The apoptotic rate was analyzed by flow cytometry. The protein levels of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phosphorylated PI3K, AKT and phosphorylated AKT were examined by Western blot. **RESULTS:** *SIRT1* was significantly decreased in high glucose-induced H9c2 cardiomyocytes, the cell viability was significantly decreased compared with control group, while the ROS levels and apoptotic rate were increased, and the phosphorylated PI3K and AKT protein levels were down-regulated ($P < 0.05$). Over-expression of *SIRT1* significantly promoted the viability of H9c2 cardiomyocytes induced by high glucose, decreased the ROS levels and apoptotic rate, and up-regulated phosphorylated PI3K and AKT protein levels ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** *SIRT1* over-expression reverses the decrease in the viability of high glucose-stimulated H9c2 cardiomyocytes, and the increases in apoptotic rate and oxidative stress by regulating PI3K/AKT signaling pathway.

[KEY WORDS] Silent information regulator 1; PI3K/AKT signaling pathway; Reactive oxygen species; Apoptosis; Diabetic cardiomyopathy

[收稿日期] 2018-07-24 [修回日期] 2018-11-13

* [基金项目] 河北省医学科学研究重点课题计划 (No. 20160307)

△通讯作者 Tel: 13932422223; E-mail: haofengjie@medmail.com.cn

糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)主要是由于机体持续高糖状态导致心脏功能代谢异常,结构发生改变的一种疾病状态^[1-3]。既往研究表明,在糖尿病患者和动物模型中心肌细胞表现为凋亡率增加,增殖能力降低,但目前对其分子机制尚不明确^[4-5]。近年来的研究表明,细胞中氧化应激损伤是导致糖尿病心肌病发生的主要原因之一^[6]。沉默信息调节因子1(silent information regulator 1, SIRT1)是一种被广泛研究的 sirtuins 家族成员,在机体多种器官中均有表达如大脑、心脏和脂肪组织等,主要存在于细胞核中,对机体多种信号通路的调节作用具有重要意义^[7-8]。SIRT1 调节蛋白质发生脱乙酰化反应,参与蛋白质的转录和翻译,调节细胞的增殖、氧化应激和新陈代谢等,对代谢性疾病、肿瘤和心脏功能发挥重要作用^[9-10]。本研究探讨过表达 *SIRT1* 对高糖诱导下心肌 H9c2 细胞活力和凋亡的影响,以期对糖尿病心肌病的预防和治疗寻找新的思路。

材 料 和 方 法

1 实验材料

心肌 H9c2 细胞购自中科院上海细胞库。DMEM 培养基购自 Gibco; *SIRT1* 过表达质粒(pcDNA3.1-SIRT1)和空载质粒(pcDNA3.1-NC)购自上海吉玛有限公司; TRIzol 和 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen; 细胞凋亡检测试剂盒、抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体和噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl tetrazolium bromide, MTT)购自上海碧云天生物有限公司; 双氯荧光素(2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)购自 Sigma; 抗磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)抗体、抗磷酸化 PI3K(p-PI3K)抗体、抗 AKT 抗体、抗磷酸化 AKT(p-AKT)抗体和抗 SIRT1 抗体购自 Santa Cruz。ABI 7900 实时荧光定量 PCR 仪购自 Applied Biosystems; 流式细胞仪购自 Thermo Fisher Scientific; 凝胶成像仪购自 Bio-Rad。

2 方法

2.1 细胞的培养与分组 心肌 H9c2 细胞培养于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,每 2~3 d 加入 0.25% 胰酶消化,加入完全培养基终止消化,按照 1:3 或 1:4 进行传代。取生长状态良好的细胞,随机分为对照(control)组(常规培养)和高糖(high glucose, HG)组(加入 33 mmol/L 葡萄糖刺激 24 h),高糖组又分为 3 组:高糖 + 过表达 SIRT1(HG + SIRT1)组(转染

pcDNA3.1-SIRT1 后给予高糖刺激)、高糖 + 阴性对照(HG + NC)组(转染 pcDNA3.1-NC 后给予高糖刺激)和高糖(HG)组(加入高糖刺激)。

2.2 细胞的转染 转染前 24 h,胰酶消化、计数心肌 H9c2 细胞,接种于 24 孔板中,采用不含抗生素的培养基稀释 pcDNA3.1-SIRT1 和 pcDNA3.1-NC,与 Lipofectamine 2000 混合均匀,37 °C 静置 20 min,加入每孔细胞中,37 °C 孵育 5 h,更换为含 10% 血清的培养基培养 48 h。

2.3 qPCR 检测 SIRT1 的 mRNA 表达 使用 TRIzol 试剂提取细胞中总 RNA。微量移液器吸取 5 μ g RNA 反转录为 cDNA,进行扩增反应。SIRT1 的上游引物序列为 5'-CTTCAGGTC AAGGGATGGTAT-3',下游引物序列为 5'-GCGTGTCTATGTTCTGGGTAT-3'; 内参照 β -actin 的上游引物序列为 5'-GGGAAATCGT-GCGTGACA-3',下游引物序列为 5'-TCAGGAGGAG-CAATGATC-3'。置于 ABI 7900 实时荧光定量 PCR 仪中进行扩增,条件为:95 °C 5 min;95 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 8 min,40 个循环。实验重复 3 次,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算 SIRT1 mRNA 的相对表达量。

2.4 细胞活力的检测 将各组细胞以每孔 5 \times 10³ 个接种于 96 孔板上,培养箱中培养 24 h、48 h 和 72 h,加入 MTT 20 μ L,37 °C 静置 4 h,加入 200 μ L 二甲基亚砷,37 °C 孵育 30 min,酶标仪中检测细胞 570 nm 的吸光度(A)值。细胞的活力 = (实验组 A₅₇₀ - 空白组 A₅₇₀) / (对照组 A₅₇₀ - 空白组 A₅₇₀) \times 100%。

2.5 细胞凋亡的检测 收集各组细胞,加入 PBS 清洗 3 次,加入胰酶,调整其密度为 1 \times 10⁹/L,吸取 0.5 mL 细胞悬浮液培养 24 h 后,每孔加入 1.25 μ L 膜联蛋白 V-FITC 和 10 μ L 碘化丙啶,4 °C 染色过夜,流式细胞术分析凋亡率。

2.6 细胞中活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的检测 收集各组心肌 H9c2 细胞,接种至 24 孔板中,待细胞密度为 80% 左右,每孔加入 10 μ mol/L DCFH-DA,37 °C 培养 30 min,荧光显微镜下随机选取 5 个视野,分析绿色荧光强度,取平均值(mean fluorescence intensity, MFI),可间接反映 ROS 水平。

2.7 Western blot 检测蛋白水平 收集细胞,加入预冷的 PBS 缓冲液清洗 2 次,置于细胞裂解液中 30 min,12 000 \times g 离心 20 min,收集上清。吸取 50 μ g 总蛋白,采用 10% SDS-PAGE 分离蛋白,将分离的目的蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜中,阻断缓冲液封闭 2 h;加入 I 抗,4 °C 过夜,Tris-HCl-Tween 缓冲盐溶液漂洗 3 次,每次 10 min,加入 II 抗,37 °C 孵育 2 h,Tris-

HCl-Tween 缓冲盐溶液漂洗 3 次,每次 10 min,凝胶成像仪中拍照,Quantity One 软件分析蛋白质灰度值,计算蛋白的相对表达量。

3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计处理,结果以均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示,多组数据间的比较采用单因素方差分析,组间多重比较使用 SNK-*q* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 转染后心肌 H9c2 细胞中 SIRT1 的表达变化

与对照组相比,高糖诱导的心肌 H9c2 细胞显著降低 SIRT1 的表达量 ($P < 0.05$);与高糖组相比,转染过表达载体显著增加心肌 H9c2 细胞中 SIRT1 的表达量 ($P < 0.05$),见图 1。

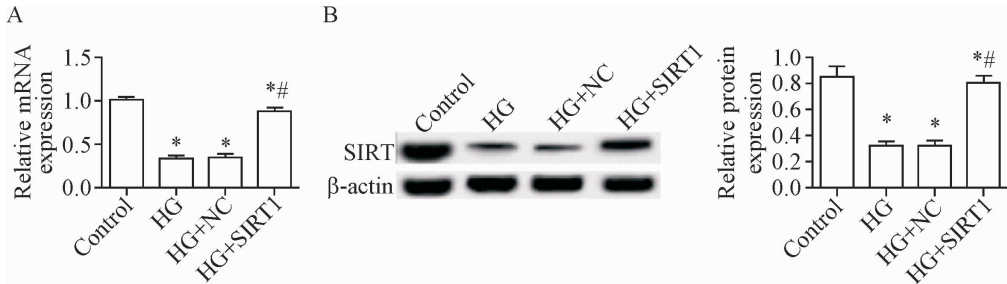


Figure 1. The expression of SIRT1 at mRNA and protein levels in the H9c2 cells after transfection. A: the mRNA expression level of SIRT1 detected by qPCR; B: the protein level of SIRT1 detected by Western blot. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs HG group.

图 1 转染后心肌 H9c2 细胞中 SIRT1 的 mRNA 和蛋白表达

2 过表达 SIRT1 对心肌 H9c2 细胞活力的影响

MTT 结果显示,与对照组相比,高糖诱导的心肌 H9c2 细胞的活力显著降低 ($P < 0.05$);与高糖组相比,过表达 SIRT1 显著增加心肌 H9c2 细胞的活力 ($P < 0.05$),见图 2。

3 过表达 SIRT1 对 H9c2 心肌细胞凋亡率的影响

与对照组相比,高糖诱导显著提高心肌 H9c2 细胞的凋亡率 ($P < 0.05$);过表达 SIRT1 细胞的凋亡率与对照组相比差异无统计学显著性;与高糖组相比,过表达 SIRT1 显著降低细胞凋亡率 ($P < 0.05$),见图 3。

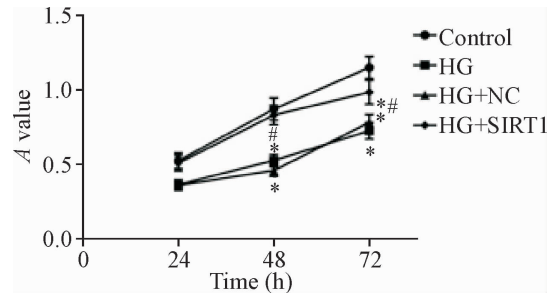


Figure 2. The effect of SIRT1 over-expression on the viability of H9c2 cells. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs HG group.

图 2 过表达 SIRT1 对心肌 H9c2 细胞活力的影响

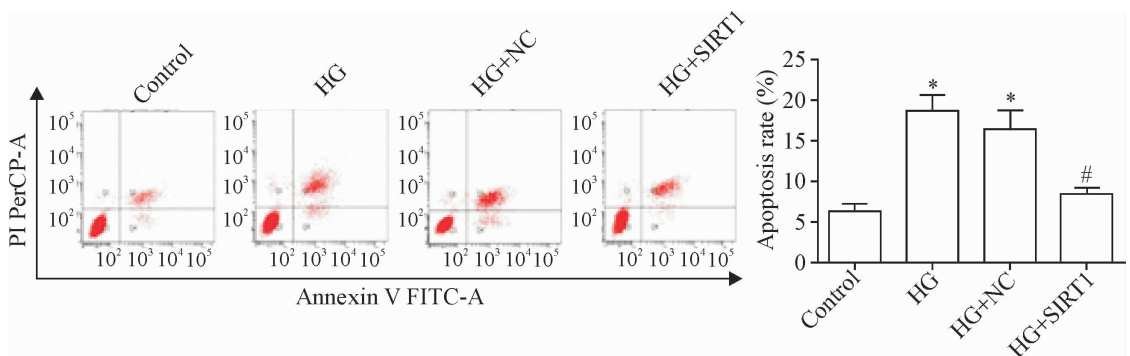


Figure 3. The effect of SIRT1 over-expression on the apoptotic rate of H9c2 cells. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs HG group.

图 3 过表达 SIRT1 对心肌 H9c2 细胞凋亡率的影响

4 过表达 SIRT1 对心肌 H9c2 细胞 ROS 生成的影响

与对照组相比,高糖诱导显著提高心肌 H9c2 细胞中 ROS 的水平,过表达 SIRT1 的细胞与对照组相比差异无统计学显著性;与高糖组相比,过表达 SIRT1 显著降低细胞中 ROS 的水平($P < 0.05$),见图 4。

5 过表达 SIRT1 对 PI3K/AKT 蛋白水平和磷酸化的影响

Western blot 结果显示,各组间心肌 H9c2 细胞中 PI3K 和 AKT 总蛋白的水平变化差异无统计学显著性;与对照组相比,高糖诱导显著降低 PI3K 和 AKT 磷酸化蛋白的水平($P < 0.05$),过表达 SIRT1 对细胞中 PI3K 和 AKT 磷酸化蛋白的水平无显著影响;与高糖组相比,过表达 SIRT1 显著增加 PI3K 和

AKT 磷酸化蛋白的水平($P < 0.05$),见图 5。

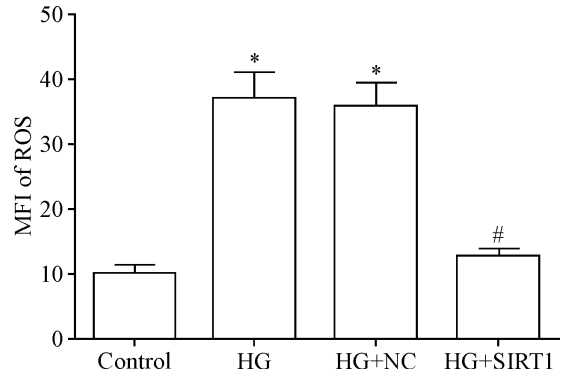


Figure 4. The effect of SIRT1 over-expression on the production of ROS in the H9c2 cells. Mean ± SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs HG group.

图 4 过表达 SIRT1 对心肌 H9c2 细胞生成 ROS 的影响

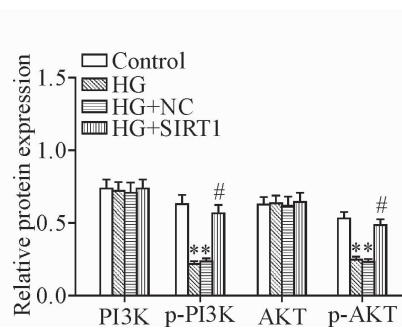
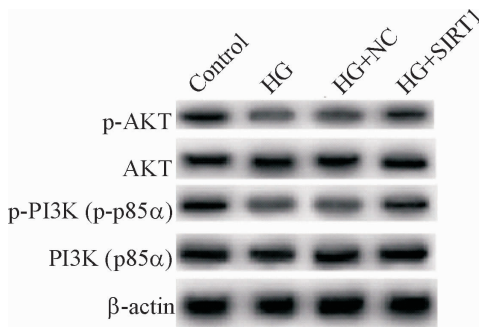


Figure 5. The effect of SIRT1 over-expression on the protein levels of PI3K/AKT signaling pathway-related molecules in the H9c2 cells. Mean ± SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs HG group.

图 5 过表达 SIRT1 对 PI3K/AKT 信号通路相关分子蛋白水平的影响

讨 论

心肌细胞凋亡率升高和存活率下降是多种心血管疾病发生的主要特征之一^[11-12]。研究发现,糖尿病患者心肌细胞凋亡的增加和坏死等导致心肌结构的变化,严重下调心脏的代偿能力,阻碍心脏的泵血功能^[13-14]。心肌细胞凋亡在糖尿病心肌病的发生、发展过程中发挥重要作用,糖尿病心肌病患者的心肌细胞更易发生坏死和凋亡。SIRT1 是一种组蛋白脱乙酰基酶,转移 DNA 组蛋白赖氨酸 N 端乙酰基并调控转录过程,参与细胞的增殖、凋亡、氧化应激、糖尿病细胞的新陈代谢等^[15-18]。在糖尿病大鼠模型中,SIRT1 通过调节 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶的水平参与糖尿病心肌病的发生和发展^[9],表明 SIRT1 在 DCM 过程中起重要作用。因此 SIRT1 在临床治疗 DCM 中发挥关键作用,在心脏和血管等细胞异常增殖的治疗中具有很好的前景。在本实验中,高糖诱导的心肌细胞中 SIRT1 的表达量降低,共转染过表达载体显著增加高糖诱导的心肌细胞中 SIRT1 的

表达量;过表达 SIRT1 促进高糖刺激的心肌 H9c2 细胞的活性,抑制细胞的凋亡,降低细胞中 ROS 的累积。既往研究表明,SIRT1 可抑制心肌细胞的凋亡,白藜芦醇显著增加 SIRT1 的表达量,减少高糖诱导的心肌细胞凋亡^[19-20],与本实验研究结果相似。

氧化应激在 DCM 病变过程中起关键作用,损害心血管系统和微血管结构的改变。糖尿病患者持续的高糖环境导致细胞代谢紊乱,促进血管内皮、微血管、心肌细胞中线粒体过氧化产物的积累,从而增加细胞内活性氧水平,活性氧的产物通过促进细胞凋亡或者激活细胞内的信号转导通路导致心肌细胞损伤,还可直接调节细胞 DNA 损伤以及损伤修复机制的活化,从而增强活性氧诱导的细胞凋亡过程,最终导致糖尿病心肌病的心脏功能和结构障碍^[21]。在糖尿病心肌细胞的氧化应激过程中,由多种信号通路的参与,如 PI3K/AKT 和核因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 等信号通路。研究表明 SIRT1 可通过 PI3K/AKT 信号通路参与细胞的增殖和凋亡过程^[22]。因此本实验通过 Western blot 检测心肌 H9c2

细胞中 PI3K/AKT 信号通路关键蛋白的水平,结果发现细胞中总蛋白水平无显著变化,但 PI3K 和 AKT 的磷酸化水平在高糖的诱导下显著降低,过表达 SIRT1 可升高 PI3K 和 AKT 的磷酸化水平,表明 SIRT1 可能通过 PI3K/AKT 信号通路调节心肌 H9c2 细胞凋亡和氧化应激。

综上所述,过表达 *SIRT1* 可增加高糖诱导的心肌 H9c2 细胞活性,降低其凋亡率和氧化应激反应,可能通过影响 PI3K/AKT 信号通路发挥作用,为糖尿病心肌病的治疗提供实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Xu Z, Sun J, Tong Q, et al. The role of ERK1/2 in the development of diabetic cardiomyopathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12):156-160.
- [2] Westermeier F, Riquelme JA, Pavez M, et al. New molecular insights of insulin in diabetic cardiomyopathy [J]. *Front Physiol*, 2016, 7:125.
- [3] Chen J, Zhang Z, Cai L. Diabetic cardiomyopathy and its prevention by Nrf2: current status [J]. *Diabetes Metab J*, 2014, 38(5):337-345.
- [4] Huynh K, Bernardo BC, McMullen JR, et al. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms and new treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 142(3):375-415.
- [5] 王金鑫,段 鹏,朱庆磊.一种建立小鼠2型糖尿病心肌病模型的方法 [J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(4):764-768.
- [6] Chen H, Yang X, Lu K, et al. Inhibition of high glucose-induced inflammation and fibrosis by a novel curcumin derivative prevents renal and heart injury in diabetic mice [J]. *Toxicol Lett*, 2017, 278(15):48-58.
- [7] 尹茂山,许淑红,王 燕,等.2型糖尿病大鼠主动脉 Wnt/ β -catenin 信号通路的变化及 SIRT1 的调节作用 [J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(3):337-342.
- [8] Muijen M. The state of psychiatry in Europe: facing the challenges, developing consensus [J]. *Int Rev Psychiatry*, 2012, 24(4):274-277.
- [9] 李超凡,徐 丹,李 婷,等. Sirt1 对糖尿病心肌病大鼠早期心肌 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶的调节作用及其机制研究 [J]. *国际心血管病杂志*, 2017, 44(6):348-351.
- [10] Karbasforooshan H, Karimi G. The role of SIRT1 in diabetic cardiomyopathy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90(9):386-392.
- [11] Huby AC, Turdi S, James J, et al. FasL expression in cardiomyocytes activates ERK1/2 pathway, leading to dilated cardiomyopathy and advanced heart failure [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2016, 130(4):289-299.
- [12] Prescimone T, Masotti S, D'Amico A, et al. Cardiac molecular markers of programmed cell death are activated in end-stage heart failure patients supported by left ventricular assist device [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2014, 23(5):272-282.
- [13] Wang S, Ding L, Ji H, et al. The role of p38 MAPK in the development of diabetic cardiomyopathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7):842-850.
- [14] Delbridge LMD, Benson VL, Ritchie RH, et al. Diabetic cardiomyopathy: the case for a role of fructose in disease etiology [J]. *Diabetes*, 2016, 65(12):3521-3528.
- [15] Oblong JE. The evolving role of the NAD⁺/nicotinamide metabolome in skin homeostasis, cellular bioenergetics, and aging [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2014, 23(11):59-63.
- [16] Arunachalam G, Samuel SM, Marei I, et al. Metformin modulates hyperglycaemia-induced endothelial senescence and apoptosis through SIRT1 [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(2):523-535.
- [17] Gong H, Pang J, Han Y, et al. Age-dependent tissue expression patterns of Sirt1 in senescence-accelerated mice [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(6):3296-3302.
- [18] Paziienza V, Pomara C, Cappello F, et al. The TRPA1 channel is a cardiac target of mIGF-1/SIRT1 signaling [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 307(7):H939-H944.
- [19] Rong G, Liu W, Liu B, et al. SIRT1 suppresses cardiomyocyte apoptosis in diabetic cardiomyopathy: An insight into endoplasmic reticulum stress response mechanism [J]. *Int J Cardiol*, 2015, 191(3):36-45.
- [20] Ma S, Feng J, Zhang R, et al. SIRT1 activation by resveratrol alleviates cardiac dysfunction via mitochondrial regulation in diabetic cardiomyopathy mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017:4602715.
- [21] Faria A, Persaud SJ. Cardiac oxidative stress in diabetes: mechanisms and therapeutic potential [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 172(2):50-62.
- [22] Zhang W, Zhang Y, Wang Z, et al. Tris(2-chloroethyl) phosphate-induced cell growth arrest via attenuation of SIRT1-independent PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *J Appl Toxicol*, 2016, 36(7):914-924.

(责任编辑:林白霜,罗 森)