

网络出版时间: 网络出版地址:

左卡尼汀调控钙调神经磷酸酶表达抑制 过氧化氢诱导心肌细胞凋亡作用

贾桂枝¹, 王洪新², 李红¹, 王翠瑶¹, 戴红良³

(辽宁医学院 1. 生物化学与分子生物学教研室、2. 药理学教研室、3. 护理学院, 辽宁 锦州 121001)

doi:10.3969/j.issn.1001-1978.2014.03.028

文献标志码:A 文章编号:1001-1978(2014)03-0425-04

中国图书分类号:

摘要:目的 研究钙调神经磷酸酶(CaN)是否参与左卡尼汀对过氧化氢(H_2O_2)诱导心肌细胞凋亡的抑制作用。方法 将新生乳鼠心肌细胞体外培养进行实验,实验分为对照组、 H_2O_2 组、左卡尼汀+ H_2O_2 组、环孢素A(CsA)+ H_2O_2 组。对照组采用生理盐水; H_2O_2 组加入 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 孵育12 h;左卡尼汀+ H_2O_2 组、CsA+ H_2O_2 组分别给予 $1.2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 左卡尼汀1 h或 $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CsA 30 min 预处理,再分别加入 H_2O_2 继续孵育12 h。通过流式细胞仪检测细胞凋亡率,蛋白质免疫印迹法检测 cleaved caspase-3、Bcl-2 和 Bax 等凋亡相关蛋白及 CaN 的表达。结果 与对照组相比, H_2O_2 组心肌细胞凋亡率、促凋亡蛋白 cleaved caspase-3 及 Bax 的表达均明显增加,而其抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达明显降低,左卡尼汀及 CaN 特异性抑制剂 CsA 可明显改善上述指标。而且,左卡尼汀还可抑制 H_2O_2 刺激下 CaN 的过表达。结论 左卡尼汀可通过调控钙调神经磷酸酶表达抑制 H_2O_2 诱导的心肌细胞凋亡。

关键词: 左卡尼汀; H_2O_2 ; 心肌细胞; 凋亡; CaN; caspase-3

心肌缺血/再灌注可引起心肌细胞广泛性的坏死,促发心力衰竭,是目前世界上引起人类死亡的最重要原因之一^[1]。缺血/再灌注损伤在人体可引起心肌细胞产生过多的活性氧,发生氧化应激性的损伤。 H_2O_2 等活性氧能改变心肌细胞内凋亡相关蛋白的表达水平,最终引发细胞凋亡^[2]。因此,对抗由氧化应激介导的心肌细胞凋亡对于临床治疗各种缺血性心脏病意义重大。钙调神经磷酸酶(calci-neurin, CaN)是目前已知唯一受钙离子/钙调素调节的蛋白磷酸酶类。在 Ca^{2+} 的激活下,对包括心肌

细胞在内的多种细胞的凋亡进行调节^[3-4]。有研究已证实缺血/再灌注损伤^[5]、 H_2O_2 ^[6] 及血清剥夺^[7] 等诱导的心肌细胞凋亡均与 CaN 有关。左卡尼汀是位于线粒体膜的机体内源性化合物,其主要作用是促进长链脂肪酸转运至线粒体进行 β 氧化,为机体供能^[8]。除此之外,左卡尼汀还具有明显的抗氧化、抗凋亡活性^[9-10]。其可通过缓解细胞内的 Ca^{2+} 超载,明显抑制 H_2O_2 诱导的心肌细胞凋亡^[10]。但左卡尼汀抗 H_2O_2 致心肌细胞凋亡的机制是否与 CaN 有关,仍缺乏相关报道。为此,本研究利用体外培养的新生大鼠心肌细胞,探讨 CaN 在左卡尼汀抑制 H_2O_2 诱导心肌细胞凋亡中的作用。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂 左卡尼汀、环孢素 A(cyclosporin A, CsA)、胰蛋白酶、达尔伯克必需基本培养基(Dulbecco's minimum essential medium, DMEM)低糖培养基均购于美国 Sigma 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所;AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物技术有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒美国 Pierce 公司;cleaved caspase-3、Bcl-2 及 Bax 一抗购于美国 Cell Signaling 公司;CaN 一抗购自美国 Santa Cruz 公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)一抗购于美国 Sigma 公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗购于美国 Santa Cruz 公司。

1.2 实验动物 出生 1~3 d 的 Sprague-Dawley(SD)大鼠乳鼠,♀♂不拘,由辽宁医学院实验动物中心提供。动物合格证号:SCXK(辽)2003-0007。

1.3 心肌细胞培养 新生大鼠心肌细胞原代培养方法,参照文献^[10]。取出生 1~3 d SD 大鼠乳鼠,开胸取出心脏,用 D-Hanks 液冲洗 3 次后剪成约 $1\ \text{mm}^3$ 大小的碎块,在 $37\ ^\circ\text{C}$ 条件下,以 $0.8\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶消化分离细胞。将消化完毕的细胞以差速贴壁法进行纯化后,置于含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。待细

收稿日期:2013-09-15,修回日期:2013-10-10

基金项目:辽宁省高等学校优秀人才支持计划(No 2008RC33)

作者简介:贾桂枝(1981-),女,硕士,实验师,研究方向:心血管药理学, E-mail: jiaguizhi2006@163.com;

戴红良(1982-),男,博士,讲师,研究方向:心血管药理学,通讯作者, E-mail: jy2006hldai@sohu.com

胞贴壁融合后,换以含 0.04% 胎牛血清的 DMEM,继续培养 24 h 后,将细胞分组用于实验。

1.4 实验分组 在进行细胞凋亡及细胞内 cleaved caspase-3、Bcl-2 及 Bax 表达水平分析的实验中,将体外培养的 SD 大鼠心肌细胞随机分为正常对照组、 H_2O_2 处理组、左卡尼汀($1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + H_2O_2 组和 CsA (CaN 特异性抑制剂, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + H_2O_2 组。在检测细胞内 CaN 表达的实验中将其分为正常对照组、 H_2O_2 处理组、左卡尼汀($1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)组和左卡尼汀 + H_2O_2 组。 H_2O_2 作用强度为 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、12 h 刺激。左卡尼汀于加入 H_2O_2 1 h 前加入, CsA 于加入 H_2O_2 30 min 前加入^[10-11]。左卡尼汀及 CsA 均维持至 H_2O_2 作用结束。

1.5 心肌细胞凋亡测定 将经过处理的心肌细胞用 $1.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶消化分离,调节细胞密度为 $1 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ 后,上流式细胞仪进行检测。具体操作方法按照 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒说明书进行。

1.6 Western blot 待各组细胞处理结束后,加细胞裂解液 RIPA[(1% 乙基苯基聚乙二醇 (Nonidet P 40, NP-40), 0.5% 脱氧胆酸钠, 1% 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS), 0.1% 苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)] 提取细胞总蛋白, 2,2-联喹啉-4,4-二甲酸二钠(bicinchoninic acid, BCA)法测定蛋白浓度。取 $50 \mu\text{g}$ 总蛋白,以 $1 \times$ 样品缓冲液配平上样体积,沸水煮 5 min 后置 10% SDS-PAGE 中进行电泳,待电泳完成后电转移至聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜。用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,接着加 cleaved caspase-3、Bcl-2、Bax、CaN 及 GAPDH 一抗 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。TBS-T 充分洗膜后,以 HRP 标记的二抗室温孵育 2 h。TBS-T 洗膜后,化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)显色。利用美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH) Image J 1.42 软件对扫描的条带进行灰度分析。指定对照组蛋白表达为 1,以其它组与对照组的比值反映各组的相对蛋白表达。

1.7 统计学处理 数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 左卡尼汀及 CsA 对心肌细胞凋亡的影响 Fig

1 结果显示,与对照组相比, H_2O_2 处理组心肌细胞凋亡明显增加。而左卡尼汀及 CsA 预处理能够明显降低 H_2O_2 诱导的心肌细胞凋亡。

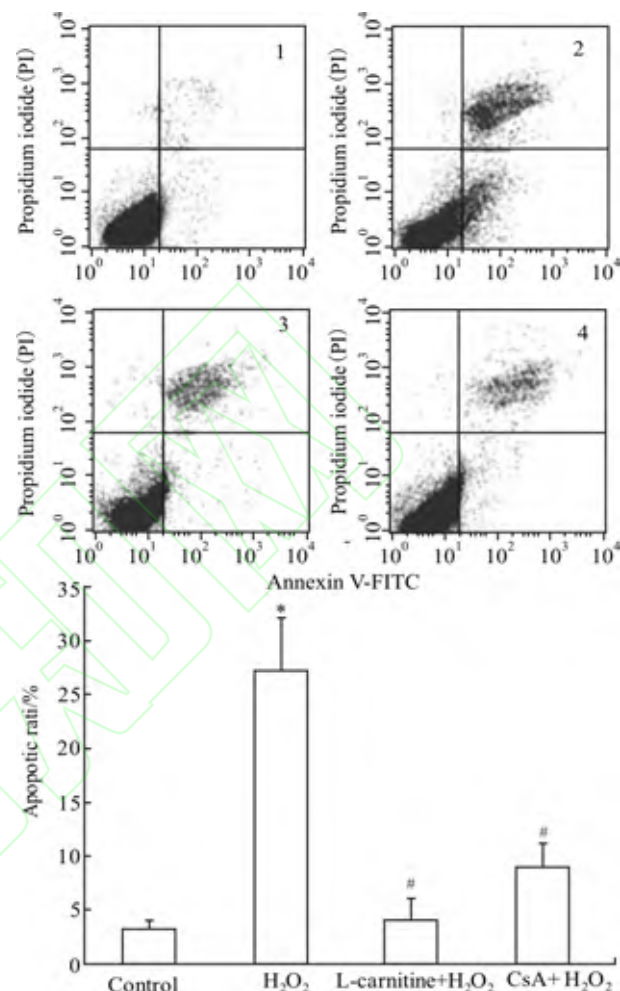


Fig 1 Effect of L-carnitine and CsA on H_2O_2 -triggered apoptosis in rat cardiac myocytes ($n=4$)

1: Control; 2: H_2O_2 ; 3: L-carnitine + H_2O_2 ; 4: CsA + H_2O_2 .

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs H_2O_2 group

2.2 左卡尼汀及 CsA 对心肌细胞凋亡相关蛋白表达的影响 Fig 2 结果显示,与正常组比较, H_2O_2 处理 12 h 后心肌细胞内 cleaved caspase-3 及 Bax 的表达明显增加,而 Bcl-2 的表达却明显降低。左卡尼汀及 CsA 均能明显地改善 H_2O_2 诱导的上述改变。

2.3 左卡尼汀对心肌细胞内 CaN 表达水平的影响

Fig 3 结果显示,与正常组比较, H_2O_2 处理 12 h 后心肌细胞内 CaN 表达水平明显增加。左卡尼汀能明显降低 H_2O_2 处理组心肌细胞 CaN 的表达。而其本身不影响 CaN 的表达。

3 讨论

本实验发现,左卡尼汀可通过抑制 CaN 的过表

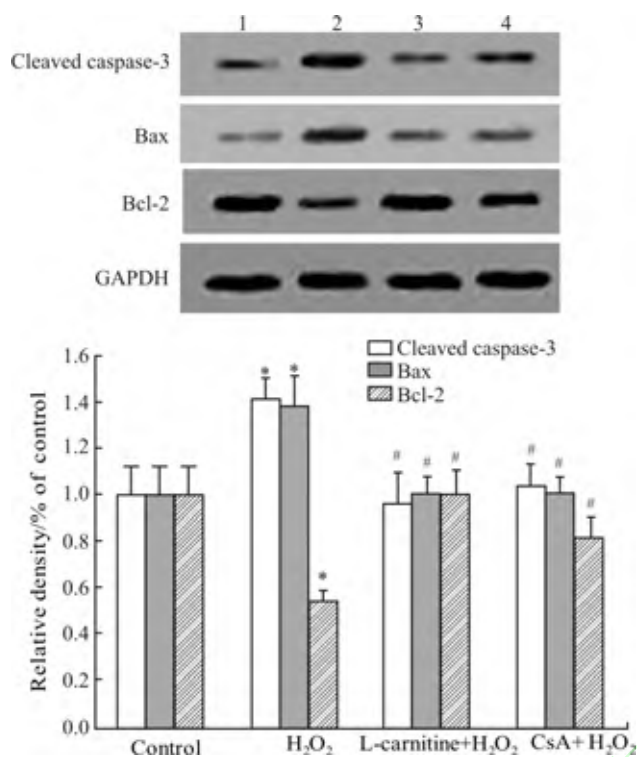


Fig 2 Effect of L-carnitine and CsA on apoptosis associated protein expression in rat cardiac myocytes (n = 3)

1: Control; 2: H₂O₂; 3: L-carnitine + H₂O₂; 4: CsA + H₂O₂.

* P < 0.05 vs control group; # P < 0.05 vs H₂O₂ group

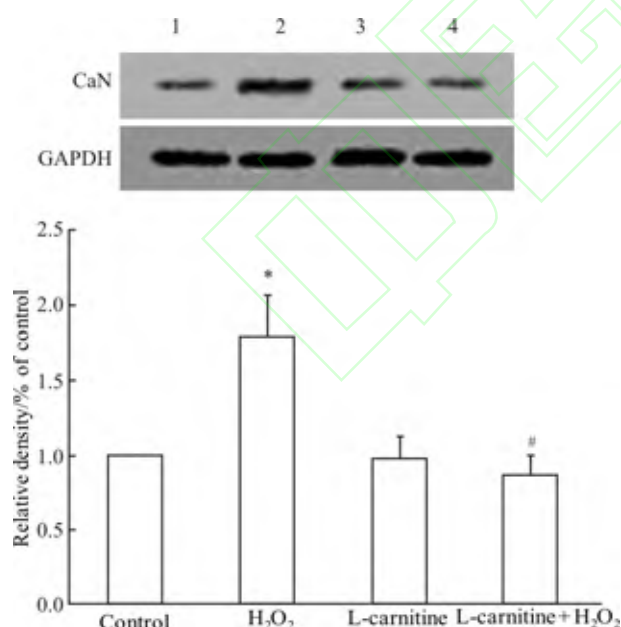


Fig 3 Effect of L-carnitine on H₂O₂-triggered CaN overexpression in rat cardiac myocytes (n = 3)

1: Control; 2: H₂O₂; 3: L-carnitine; 4: L-carnitine + H₂O₂.

* P < 0.05 vs control group; # P < 0.05 vs H₂O₂ group

达以抑制氧化应激状态下心肌细胞凋亡的发生。

目前,越来越多的研究提示缺血/再灌注损伤与

心肌细胞凋亡有着密切的关系。尽管缺血/再灌注引起凋亡的确切机制尚未完全阐明,但可以肯定其与氧化应激损伤、钙超载有关^[12-13]。H₂O₂可诱发心肌细胞内的钙超载,引起心肌凋亡。而左卡尼汀能够明显地缓解钙超载,抑制其细胞的凋亡^[10]。CaN是细胞内钙离子执行功能的重要靶蛋白之一。最近的研究发现,CaN在H₂O₂诱导的心肌凋亡中发挥着重要作用^[6]。本实验也发现,在CaN经其特异性抑制剂CsA阻断后,H₂O₂所诱发的各种凋亡相关蛋白的表达得到明显改善。具体表现为促凋亡蛋白cleaved caspase-3及Bax的表达下调,而抗凋亡蛋白Bcl-2的表达上调。心肌细胞的凋亡也明显降低。而更为重要的是,左卡尼汀在抑制心肌细胞凋亡的同时,能够明显降低H₂O₂诱导下CaN的过表达,提示左卡尼汀的抗凋亡活性可能与其抑制CaN的过表达有关。

关于CaN诱导心肌细胞凋亡的机制,可能涉及以下几个方面:①与细胞凋亡信号调节激酶(ASK1)相互作用^[14];②影响Bad的磷酸化,拮抗Bcl-2家族抗凋亡作用^[15];③去磷酸化(活化)转录因子活化T细胞核因子3(nuclear factor of activated T cells 3, NFATc3),使其由胞质转位于胞核,介导凋亡相关基因的表达^[16]。而左卡尼汀抗心肌细胞凋亡的作用是否也涉及上述机制,仍有待于进一步的实验论证。

总之,本研究证实左卡尼汀对H₂O₂诱发心肌细胞凋亡具有明显的抑制作用,其作用机制可能与调控CaN的表达有关。该发现为左卡尼汀的临床应用提供了实验依据。

参考文献:

[1] Yellon D M, Hausenloy D J. Myocardial reperfusion injury[J]. *N Engl J Med*,2007,**357**(11):1121-35.
 [2] 罗元一,殷明,鄒亚华,等. 绿原酸对过氧化氢诱导大鼠髓核细胞凋亡保护作用的研究[J]. *中成药*,2013,(4):656-60.
 [2] Luo Y Y, Yin M, Wu Y H, et al. Protective effects of chlorogenic acid against hydrogen peroxide induced rat nucleus pulposus cells apoptosis[J]. *Chin Tradit Patent Med*,2013,(4):656-60.
 [3] Lotem J, Kama R, Sachs L. Suppression or induction of apoptosis by opposing pathways downstream from calcium-activate calcineurin[J]. *PNAS*,1999,**96**(21):12016-20.
 [4] Molkentin J D. Calcineurin, mitochondrial membrane potential, and cardiomyocyte apoptosis[J]. *Circ Res*,2001,**88**(12):1220-2.
 [5] 李文霞,沈小梅,陈侠,等. 钙调磷酸酶在老龄大鼠心肌缺

- 血/再灌注损伤所致细胞凋亡中的作用[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2009, 7(9): 1067-9.
- [5] Li W X, Shen X M, Chen X, et al. The role of calcineurin in cell apoptosis during myocardial ischemia-reperfusion in aged rats [J]. *Chin J Integr Med Cardio Cerebrovascul Dis*, 2009, 7(9): 1067-9.
- [6] 冯 星, 金明华, 刘晓梅, 等. CaN 抑制剂对 H₂O₂ 诱导的大鼠 H9c2 心肌细胞凋亡的影响 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2009, 35(02): 249-53.
- [6] Feng X, Jin M H, Liu X M, et al. Effect of inhibitor of calcineurin on myocardial H9c2 cell apoptosis induced by H₂O₂ [J]. *J Jilin Univ; Med Ed*, 2009, 35(02): 249-53.
- [7] González-Juanatey J R, Piñeiro R, Iglesias M J, et al. GH prevents apoptosis in cardiomyocytes cultured *in vitro* through a calcineurin-dependent mechanism [J]. *J Endocrinol*, 2004, 180(2): 325-35.
- [8] Rebouche C J, Seim H. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals [J]. *Annu Rev Nut*, 1998, 18: 39-61.
- [9] 戴红良, 王洪新, 吴国强, 等. 左卡尼汀对心肌细胞 H₂O₂ 损伤的保护作用 [J]. 辽宁医学院学报, 2009, 30(01): 4-6.
- [9] Dai H L, Wang H X, Wu G Q, et al. Protective effect of L-carnitine on H₂O₂-induced damages in cardiomyocytes [J]. *J Liaoning Med Univ*, 2009, 30(01): 4-6.
- [10] 梁春光, 戴红良, 黄 雷, 等. 左卡尼汀对过氧化氢诱导的心肌细胞凋亡的抑制作用(英文) [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(5): 602-9.
- [10] Liang C G, Dai H L, Huang L, et al. Inhibitory effect of L-carnitine on cardiomyocyte apoptosis induced by hydrogen peroxide [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2012, 26(5): 602-9.
- [11] 赵素玲, 王洪新, 周振华, 等. 黄芪多糖对异丙肾上腺素诱导的乳大鼠心肌细胞肥大的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(12): 1682-6.
- [11] Zhao S L, Wang H X, Zhou Z H, et al. Protective effects of Astragalus polysaccharides on isoproterenol induced myocardial hypertrophy in neonatal rats [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2011, 27(12): 1682-6.
- [12] Davies K J, Lin S W. Degradation of oxidatively denatured proteins in *Escherichia coli* [J]. *Free Radic Biol Med*, 1988, 5(4): 215-23.
- [13] Ernak G, Davies K J. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death [J]. *Mol Immunol*, 2002, 38(10): 713-21.
- [14] Liu Q, Wilkins B J, Lee Y J, et al. Direct interaction and reciprocal regulation between ASK1 and calcineurin-NFAT control cardiomyocyte death and growth [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(10): 3785-97.
- [15] Feske S, Okamura H, Hogan P G, et al. Ca²⁺/calcineurin signalling in cells of the immune system [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 311(4): 1117-32.
- [16] Zhu H, Gao W, Jiang H, et al. Calcineurin mediates acetylcholinesterase expression during calcium ionophore A23187-induced HeLa cell apoptosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773(4): 593-602.

Anti-apoptotic effect of L-carnitine on H₂O₂-induced cardiomyocytes via inhibition of calcineurin overexpression

JIA Gui-zhi¹, WANG Hong-xin², LI Hong¹, WANG Cui-yao¹, DAI Hong-liang³

(1. Dept of Biochemistry and Molecular Biology, 2. Dept of Pharmacology,

3. School of Nursing, Liaoning Medical University, Jinzhou Liaoning 121001, China)

Abstract; Aim To explore whether calcineurin (CaN) was involved in the inhibitory effect of L-carnitine on H₂O₂-induced cardiomyocyte apoptosis. **Methods** Neonatal rat cardiomyocytes were randomly divided into control, H₂O₂, L-carnitine + H₂O₂ and CsA + H₂O₂ groups. Control group was treated with normal saline; H₂O₂ group was challenged by 200 μmol · L⁻¹ H₂O₂ for 12 h; L-carnitine + H₂O₂ and CsA + H₂O₂ groups were pretreated with 1.2 mmol · L⁻¹ 1 h or 1 μmol · L⁻¹ CsA 30 min prior to 12 h H₂O₂ stimulation, respectively. Cell apoptotic rate was evaluated by flow cytometry, and expression of apoptosis relevant protein including cleaved caspase-3, Bcl-2, Bax and

CaN was determined by Western blot. **Results** Compared with control, H₂O₂ treatment induced a significant increase of cardiomyocyte apoptosis. Meanwhile, expression of pro-apoptotic proteins cleaved caspase-3 and Bax increased, and anti-apoptotic protein Bcl-2 decreased. L-carnitine and CsA (a specific inhibitor of CaN), significantly attenuated above-mentioned abnormalities. And also, L-carnitine greatly inhibited the overexpression of CaN induced by H₂O₂. **Conclusion**

L-carnitine attenuates cardiomyocyte apoptosis via modulating CaN expression.

Key words: L-carnitine; H₂O₂; cardiomyocyte; apoptosis; CaN; caspase-3