

过表达 C3G 对高糖诱导 H9C2 心肌细胞增殖和凋亡的影响*

张旭¹, 陈旺盛², 张梦娇¹, 聂娇¹, 陈秀^{1△}

(西南医科大学附属医院:1.老年病科;2.胃肠外科,四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 探讨过表达 C3G 对高糖诱导 H9C2 心肌细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 分别用 pCXN2-Flag(空质粒)、pCXN2-Flag-hC3G(人过表达 C3G mRNA)质粒通过瞬时转染 H9C2 心肌细胞,并进行高糖干预。实验分为空白组、空载体组、过表达 C3G 组、空白+高糖组、空载体+高糖组、过表达 C3G+高糖组,分别检测各组 H9C2 心肌细胞的 C3G 蛋白表达、增殖率及凋亡率。**结果** 空白+高糖组、空载体+高糖组较空白组、空载体组细胞增殖率均明显降低,凋亡率均明显升高。过表达 C3G 组较空白组与空载体组,过表达 C3G+高糖组较空白+高糖组与空载体+高糖组 H9C2 心肌细胞的 C3G 蛋白表达增加,增殖率升高,凋亡率明显降低。**结论** 高糖抑制 H9C2 心肌细胞增殖、促进 H9C2 心肌细胞凋亡;过表达 C3G 可逆转高糖诱导 H9C2 心肌细胞增殖率的降低、凋亡率的升高。过表达 C3G 能促进高糖诱导 H9C2 心肌细胞的生存力。

[关键词] H9C2 心肌细胞;鸟嘌呤核苷酸释放因子 2;高糖血症;细胞生存力

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)08-1033-03

Effect of C3G overexpression on proliferation and apoptosis of high glucose-induced H9C2 cardiomyocytes*

ZHANG Xu¹, CHEN Wangsheng², ZHANG Mengjiao¹, NIE Jiao¹, CHEN Xiu^{1△}

(1. Department of Geriatrics; 2. Department of Gastrointestinal Surgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of Crk-SH3 domain guanine exchange factor (C3G) overexpression on the proliferation and apoptosis of high glucose-induced H9C2 cardiomyocytes. **Methods** H9C2 cardiomyocytes were transiently transfected with pCXN2-Flag(empty plasmid) and pCXN2-Flag-hC3G (human C3G mRNA) plasmids, then conducted high glucose (HG) intervention. The experiment was divided into the blank group, empty vector group, C3G overexpression group, blank + HG group, empty vector + HG group and C3G overexpression + HG group. The C3G protein expressions, apoptosis and proliferation rate were respectively detected in each H9C2 cardiomyocytes groups. **Results** The proliferation rate in the blank + HG group and empty vector + HG group were significantly decreased compared with the blank group and empty vector group, while the apoptosis rate was significantly increased. Compared with blank group and empty vector group, blank + HG and empty vector + HG group, the C3G protein expression and proliferation rate in the C3G overexpression group and C3G overexpression + HG group were increased significantly, while the apoptosis rate was decreased significantly. **Conclusion** High glucose inhibits H9C2 myocardial cell proliferation and promotes its apoptosis; furthermore, C3G overexpression can reversed the decrease of high glucose-induced H9C2 cardiomyocyte proliferation rate and apoptosis increase. C3G overexpression can promote the survivability of high glucose-induced H9C2 cardiomyocytes.

[Key words] H9C2 cardiomyocyte; guanine nucleotide-releasing factor 2; high glucose; cell survivability

糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)是指由于持续高血糖水平所致心脏微血管病变、心肌代谢紊乱及心肌细胞纤维化等病变,导致的心肌结构发生广泛改变,最终引起左心室肥厚、心脏泵血功能障碍的一种疾病状态^[1-3]。多项研究提示,在糖尿病动物模型和糖尿病患者中均存在心肌细胞凋亡增加、生存力降低^[4-5],但其机制目前仍报道甚少。鸟苷酸交换因子 C3G 参与多种细胞在不同病理条件下的增殖分化与凋亡^[6-7],笔者前期研究发现 C3G 在心肌缺血、缺氧损伤模型中对心肌细胞具有保护作用^[8],但其对高糖诱导环境下心肌细胞的作用目前暂无报道。本研究探讨过表达 C3G 对高糖诱导下 H9C2 心肌细胞的增殖率、凋亡率的影响,以期对 DCM 的防治寻找新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料 大鼠 H9C2 心肌细胞株购自中科院上海生命

科学研究院;DMEM 培养基、D-葡萄糖、胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;pCXN2-Flag、pCXN2-Flag-hC3G 质粒由重庆医科大学附属第一医院妇产科令狐华教授惠赠;质粒提取试剂盒购自美国 Omega Bio-Tek 公司;转染试剂脂质体 LTX 和 Plus 购自美国 Invitrogen 公司;小鼠抗大鼠 β -actin 抗体(sc-47778)、兔抗大鼠及人 C3G 抗体(sc-15359)购自美国 Santa Cruz 公司;细胞凋亡试剂盒(Annexin V-FITC、PI)购自江苏碧云天生物研究所;四甲基偶氮唑盐(MTT)购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验方法及分组 H9C2 心肌细胞在含 10% FBS 的低糖(5 mmol/L) DMEM 培养基中培养,将处于对数生长期的细胞分别接种于 6 个直径 10 cm 培养皿中,细胞密度达 60% 左右时分别用空白试剂、空质粒、人过表达 C3G 质粒瞬时转染

* 基金项目:西南医科大学附属医院科研课题(2017-PT-26)。

作者简介:张旭(1986-),医师,硕士,主要从事心血管及消化道肿瘤基础与

临床研究。△ 通信作者,E-mail:wangzhai_147@163.com。

H9C2 心肌细胞,将细胞标记为空白组、空载体组、过表达 C3G 组 3 组,每组 2 份,培养 9 h 后重新消化细胞、细胞计数,从以上 3 组中分别取相同细胞,接种于 6 个平板中(Western blot 用培养基皿,MTT 用 96 孔平板,流式细胞计数用 6 孔板),低糖培养基培养 6 h 让其充分贴壁后将其中一份培养基替换为含 10% 胎牛血清的 5.5 mmol/L 的 D-葡萄糖培养基,另一份培养基替换为含 10% 胎牛血清的 33.3 mmol/L 的 D-葡萄糖培养基(此时设置为实验的 0 点),培养 72 h(此时设置为实验的 72 点),将细胞分为空白组、空载体组、过表达 C3G 组、空白+高糖组、空载体+高糖组、过表达 C3G+高糖组。

1.2.2 Western blot 检测 C3G 蛋白相对表达水平 分别提取 6 组细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺分离凝胶(SDS-PAGE),每组分别上样 20 μ g 蛋白,电泳分离后电转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,4% 牛奶 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h 后,一抗孵育 8 h 以上,洗膜,孵育二抗,洗膜,最后通过 ECL 发光试剂盒显影成像,进行吸光度值定量分析,实验重复 3 次。采用 Quantity-One 软件分析各组 C3G 蛋白的相对表达量,C3G 蛋白相对表达量用 C3G 吸光度值/ β -actin 吸光度值表示。

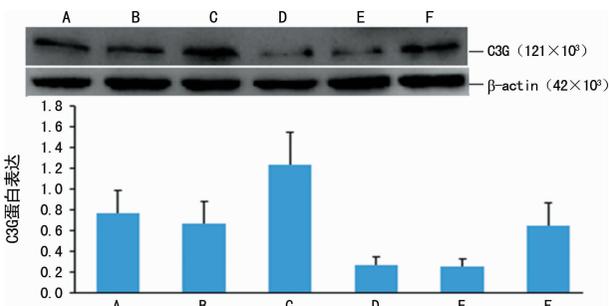
1.2.3 MTT 法检测细胞增殖率 分别检测各组 0 点、72 点细胞的吸光度值,在相应的时间点取相同细胞数加 MTT 液 20 μ L (5 mg/mL),4 h 后弃液,加 200 μ L 二甲基亚砜(DMSO),37 $^{\circ}$ C 摇床培养 30 min,酶标仪(570 nm 波长)测定吸光度值,实验重复 3 次。细胞增殖率(%) = (72 点吸光度值 - 0 点吸光度值)/0 点吸光度值。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率 分别检测各组 72 点的凋亡率。收集细胞,将其悬浮后加入 Annexin V-FITC、PI 后进行流式细胞仪检测细胞凋亡,细胞凋亡率 = 凋亡细胞数/总细胞数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 H9C2 心肌细胞 C3G 蛋白表达 较空白组(0.764 \pm 0.223)、空载体组(0.666 \pm 0.200),过表达 C3G 组(1.233 \pm 0.340)的 C3G 蛋白表达明显增加($P < 0.05$)。较空白+高糖组(0.262 \pm 0.082)、空载体+高糖组(0.249 \pm 0.074),过表达 C3G+高糖组(0.646 \pm 0.217)的 C3G 蛋白表达明显增加($P < 0.05$),见图 1。

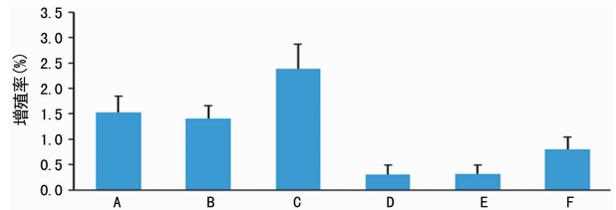


A: 空白组; B: 空载体组; C: 过表达 C3G 组; D: 空白+高糖组; E: 空载体+高糖组; F: 过表达 C3G+高糖组

图 1 各组 H9C2 心肌细胞 C3G 蛋白表达

2.2 各组 H9C2 心肌细胞增殖率 较空白组、空载体组,空白

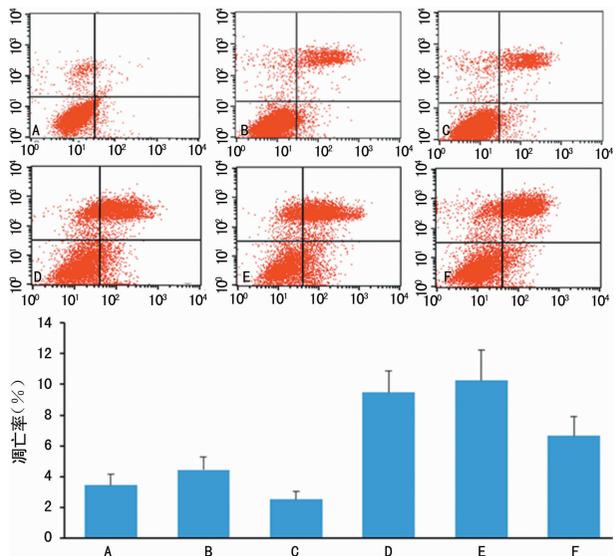
+高糖组、空载体+高糖组的增殖率均明显降低($P < 0.05$);过表达 C3G 组的增殖率较空白组、空载体组明显升高($P < 0.05$);较空白+高糖组、空载体+高糖组,过表达 C3G+高糖组的增殖率显著升高($P < 0.05$),见图 2、表 1。



A: 空白组; B: 空载体组; C: 过表达 C3G 组; D: 空白+高糖组; E: 空载体+高糖组; F: 过表达 C3G+高糖组

图 2 各组 H9C2 心肌细胞的增殖率

2.3 各组 H9C2 心肌细胞凋亡率 较空白组、空载体组,空白+高糖组、空载体+高糖组凋亡率明显升高($P < 0.05$);过表达 C3G 组的凋亡率较空白组、空载体组明显降低($P < 0.05$);较空白+高糖组、空载体+高糖组,过表达 C3G+高糖组的凋亡率明显降低($P < 0.05$),见图 3、表 1。



A: 空白组; B: 空载体组; C: 过表达 C3G 组; D: 空白+高糖组; E: 空载体+高糖组; F: 过表达 C3G+高糖组

图 3 各组 H9C2 心肌细胞的凋亡率

表 1 H9C2 心肌细胞的增殖率与凋亡率($\bar{x} \pm s$, %)

组别	增殖率	凋亡率
空白组	159.423 \pm 59.673	3.434 \pm 0.741
空载体组	140.614 \pm 46.262	4.446 \pm 0.836
过表达 C3G 组	238.178 \pm 78.205	2.504 \pm 0.516
空白+高糖组	30.814 \pm 14.319	8.774 \pm 1.386
空载体+高糖组	32.020 \pm 16.198	10.250 \pm 2.012
过表达 C3G+高糖组	79.629 \pm 21.248	6.660 \pm 1.246

3 讨论

心肌细胞的凋亡增加、生存力降低是许多心血管疾病发病的重要特点之一^[9-10]。研究表明,糖尿病患者中心肌细胞的广泛凋亡、变性坏死等心肌结构的改变,严重降低了心脏在应对各种损伤时的代偿能力,导致心脏结构与泵血功能障

碍^[11-12]。心肌细胞凋亡在 DCM 发病过程中起着重要作用, DCM 中的心肌细胞更易发生坏死、凋亡。

整合素信号通路家族,如整合素的 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 亚基及其下游的焦点黏附激酶(FAK)、整合素连接激酶(ILK)等具有促进心肌细胞存活、抑制心肌细胞凋亡的作用。完全敲除 FAK 可导致小鼠在胚胎期死亡,而主要原因可能与心血管系统发育缺陷有关,过表达 ILK 可促进心肌细胞增殖、存活,抑制心肌细胞凋亡,改善心肌梗死后心脏重塑^[2,13-15]。C3G 作为其重要成员之一,主要参与胚胎发育、细胞分化、增殖、凋亡等细胞行为,在心肌细胞及神经系统胚胎发育中起着必不可少的作用^[6,16],然而,在 DCM 心肌细胞中的作用却鲜有报道。

本实验研究发现,C3G 在 H9C2 心肌细胞中存在表达;过表达 C3G 可使 H9C2 心肌细胞中 C3G 蛋白表达量明显增加,可明显降低心肌细胞的凋亡,促进心肌细胞的增殖、存活;经过高糖处理后,心肌细胞出现大量坏死、凋亡,细胞凋亡率明显升高,细胞增殖率明显降低,而这种现象经过转染过表达 C3G 后得以改善。由此可以证实,过表达 C3G 可以提高高糖环境下心肌细胞的生存力,对研究 DCM 的治疗有一定理论意义。

本研究还发现,在高糖+空白组、高糖+空载体组的 C3G 蛋白表达较空白组、空载体组明显减少,说明高糖环境并不能直接促进心肌细胞自身的 C3G 蛋白表达;而在过表达 C3G+高糖组,其 C3G 蛋白表达、心肌细胞增殖率、凋亡率较高糖+空白组、高糖+空载体组差异有统计学意义($P < 0.05$),其机制可能与转染后 C3G 在心肌细胞中的表达明显增加或者与过表达 C3G 能够激活或抑制其心肌细胞的某些信号分子有关,但 C3G 能够抑制高糖环境中的心肌细胞凋亡、促进心肌细胞增殖存活的机制仍不清楚,有待进一步研究。

总之,本研究结果证实,高糖环境能明显抑制心肌细胞增殖、促进心肌细胞凋亡。过表达 C3G 可以提高 H9C2 心肌细胞的生存力,逆转高糖环境对心肌细胞所造成的不良影响。本研究为过表达 C3G 保护糖尿病引起的心肌损伤提供了理论依据,随着研究的深入,C3G 在糖尿病心肌病中的作用及其相关联的信号通路也将进一步被明确。C3G 有望成为探索 DCM 发病机制的新靶点。

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 J A, 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] TSYPLENKOVA VG. Cardiomyocytic dedifferentiation, "hibernation", and apoptosis are possible factors of progressive diabetic cardiomyopathy[J]. *Arkh Patol*, 2009, 71(4): 30-33.
- [5] HUYNH K, BERNARDO B C, MCMULLEN J R, et al. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms and new treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways[J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 142(3): 375-415.
- [6] WANG L, LI G, WANG Z, et al. Elevated expression of C3G protein in the peri-infarct myocardium of rats[J]. *Med Sci Monit Basic Res*, 2013, 19: 1-5.
- [7] ARAI A, NOSAKA Y, KANDA E, et al. Rap1 is activated by erythropoietin or interleukin-3 and is involved in regulation of beta1 integrin-mediated hematopoietic cell adhesion[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(13): 10453-10462.
- [8] 杨东艳, 李刚, 张蕾, 等. C3G 基因对 H9C2 心肌细胞凋亡和增殖的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2015, 40(8): 603-609.
- [9] HUBY A C, TURDI S, JAMES J, et al. FasL expression in cardiomyocytes activates the ERK1/2 pathway, leading to dilated cardiomyopathy and advanced heart failure[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2016, 130(4): 289-299.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] DELBRIDGE L M, BENSON V L, RITCHIE R H, et al. Diabetic cardiomyopathy: the case for a role of fructose in disease etiology[J]. *Diabetes*, 2016, 65(12): 3521-3528.
- [13] FAN D, TAKAWALE A, SHEN M, et al. A Disintegrin and metalloprotease-17 regulates pressure overload-induced myocardial hypertrophy and dysfunction through proteolytic processing of integrin $\beta 1$ [J]. *Hypertension*, 2016, 68(4): 937-948.
- [14] BAI J, GU R, WANG B, et al. Overexpression of integrin-linked kinase improves cardiac function in a rat model of doxorubicin-induced chronic heart failure[J]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, 2014, 42(3): 225-229.
- [15] ELMEKKAWI S F, MANSOUR G M, ELSAFTY M S, et al. Prediction of fetal hypertrophic cardiomyopathy in diabetic pregnancies compared with postnatal outcome [J]. *Clin Med Insights Womens Health*, 2015, 8: 39-43.
- [16] RADHA V, MITRA A, DAYMA K, et al. Signalling to actin: role of C3G, a multitasking guanine-nucleotide-exchange factor[J]. *Biosci Rep*, 2011, 31(4): 231-244.

(收稿日期:2017-09-22 修回日期:2017-11-26)