

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.21.004

# 硒对线粒体 STAT3 活性表达及细胞凋亡的影响研究\*

杨胜祥<sup>1</sup>, 张旭涛<sup>2</sup>, 华晓芳<sup>1△</sup>

(1. 湖北省恩施土家族苗族自治州中心医院/武汉大学恩施临床学院, 湖北恩施 445000;

2. 湖北省建始县中医医院心内科, 湖北恩施 445300)

**[摘要]** **目的** 研究硒对心肌细胞线粒体信号转导和转录激活因子 3(STAT3)与琥珀酸脱氢酶活性及细胞凋亡的影响。**方法** 原代培养乳鼠心肌细胞,根据不同硒浓度培养液分为无毒性对照组(0.1 μmol/L 亚硒酸钠)及低硒组(0.05 μmol/L 亚硒酸钠)。免疫印迹检测线粒体 STAT3、p-STAT3 及凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 的表达,分光光度计测定琥珀酸脱氢酶活性,流式细胞术检测心肌细胞凋亡情况。**结果** 与对照组相比,低硒组琥珀酸脱氢酶活性明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。低硒组线粒体 STAT3 活性与对照组相比明显降低( $P < 0.01$ ),但总 STAT3 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与对照组相比,低硒组心肌细胞 Bax 蛋白表达升高,Bcl-2 蛋白表达降低,细胞凋亡率增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 硒缺乏导致心肌细胞线粒体 STAT3 活性及线粒体功能下降,促进心肌细胞凋亡。

**[关键词]** 硒;肌细胞,心脏;线粒体;转录激活因子 3;细胞凋亡

**[中图分类号]** R331.3+1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2019)21-3618-04

## Study on effects of selenium on mitochondrial STAT3 activity expression and cellular apoptosis\*

YANG Shengxiang<sup>1</sup>, ZHANG Xutao<sup>2</sup>, HUA Xiaofang<sup>1△</sup>

(1. Central Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture/Enshi Clinical College,

Wuhan University, Enshi, Hubei 445000, China; 2. Department of Cardiology, Jianshi County

Hospital of Traditional Chinese Medicine, Enshi, Hubei 445300, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the influence of selenium on mitochondrial signal transduction and activator of transcription 3 (STAT3), the activity of succinate dehydrogenase and cellular apoptosis. **Methods** The neonatal rat cardiomyocytes performed the primary culture, and were divided into the non-toxic control group (0.1 μmol/L sodium selenite) and low selenium treatment group (0.05 μmol/L sodium selenite) according to different selenium concentrations of culture solution. The expressions of mitochondria STAT3, p-STAT3 and apoptosis related proteins, Bax and Bcl-2, were detected by the immunoblotting. The activity of succinate dehydrogenase and the apoptosis of cardiomyocytes were detected by using the spectrophotometer and flow cytometry respectively. **Results** Compared with the control group, the activity of succinate dehydrogenase in the low selenium treatment group was significantly decreased, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The activity of STAT3 in the low selenium treatment group was significantly decreased compared with the control group ( $P < 0.01$ ), but no statistical significance difference was found in the total STAT3 ( $P > 0.05$ ). Compared with the control group, the myocardial cellular Bax protein expression level and the cellular apoptosis in the low selenium treatment group were increased, while the Bcl-2 protein expression level was decreased, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The selenium deficiency of myocardial cells leads to the decrease of mitochondrial STAT3 activity and mitochondrial function, thus promotes the apoptosis of cardiomyocytes.

**[Key words]** selenium; myocytes, cardiac; mitochondria; activating transcription factor 3; apoptosis

硒是人体必需的微量元素,通过在机体中辅助多种酶类重要的调节功能,维持人体健康<sup>[1]</sup>。大量的临床数据及科研报道显示硒与心血管疾病存在相关性。

冠心病的发病率与血硒水平存在逆向相关,血硒水平是判定冠心病的重要指标<sup>[2]</sup>。动脉粥样硬化的主要原因是内皮细胞膜脂质的过氧化反应,低硒导致抗氧

\* 基金项目:2017—2018 年度湖北省卫生健康委适宜技术推广项目(WJ2017S019)。 作者简介:杨胜祥(1976—),主治医师,硕士,主要从事冠心病的基础与临床研究。 △ 通信作者, E-mail:37629106@qq.com。

化酶类活性下降,加剧动脉粥样硬化,补硒对动脉粥样硬化患者有明显的治疗效果<sup>[3]</sup>。此外,低硒也是导致克山病的主要原因,其病理学表现为心肌坏死<sup>[4]</sup>。因此,硒在心肌细胞的凋亡中具有重要作用。

信号转导和转录活化因子 3(the signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)在心脏各类细胞形成和信号转导中起重要作用。STAT3 具有多种功能,其中就包含可以影响线粒体转运孔,参与能量代谢的调控,线粒体 STAT3 的表达及活性变化也可以从侧面反映心肌细胞的活性<sup>[5]</sup>。琥珀酸脱氢酶定位于线粒体内膜,参与线粒体产生腺苷三磷酸(ATP)的过程,其水平变化代表细胞内线粒体的活性。

低硒影响线粒体 STAT3 表达量<sup>[6]</sup>,但是与心肌细胞凋亡的关系仍不清楚。因此,本实验采用乳鼠原代心肌细胞,通过低硒培养液和正常硒培养液培养,检测 STAT3、琥珀酸脱氢酶及凋亡相关蛋白的表达,探讨低硒对线粒体活性和心肌细胞凋亡的影响及其分子机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 选取出生 3 d 的 C57BL/6 小鼠 6 只,体质量(10±0.2)g,购自南京模式动物中心,见图 1。



图 1 出生 3 d 的乳鼠

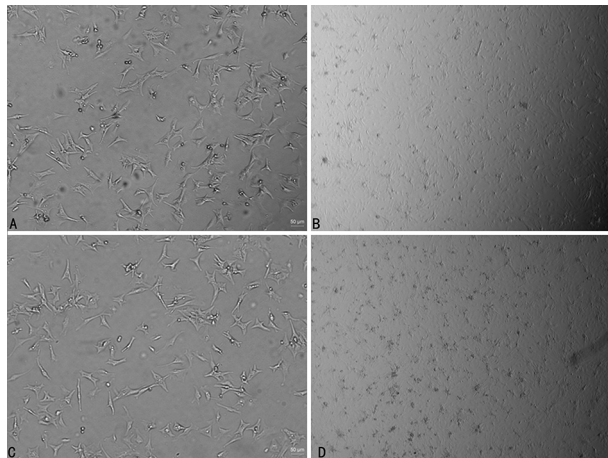
**1.2 仪器与试剂** 琥珀酸脱氢酶活性检测试剂盒购自美国 Sigma 公司,分光光度计购自美国 Thermo 公司,免疫印迹抗体均购自美国 Abcam 公司,流式细胞仪购自美国 BD 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 乳鼠心肌细胞提取和培养** 乳鼠浸入 75% 无水乙醇 1~2 min,剪开胸骨,取出心脏,置于预冷的 Hanks 培养液,去除心脏周围的多余组织。用预冷的 Hanks 漂洗 3 次,将心脏放入胰酶中剪碎。37℃ 水浴 10 min,自然沉淀后弃上清液。再次胰酶消化 10 min,移液器混匀,加培养基终止消化,重复 6 次。将消化所得细胞 1 000 r/min 离心 10 min,加入适量培养基混匀,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱培养,24 h 后观察细胞状态。

**1.3.2 低硒培养液浓度确定** 取生长良好的原代心肌细胞,分别用含有 0、0.01、0.05、0.08、0.10、0.50 μmol/L 和 1.00 μmol/L 亚硒酸钠的培养液及正常培

养液进行培养,见图 2。36 h 后检测不同浓度硒处理组细胞凋亡率。乳酸脱氢酶(LDH)检测发现,0.10 μmol/L 硒处理组与正常培养液组毒性差异无统计学意义,可作为正常硒对照组,而过高或过低的硒浓度均表现出不同程度的细胞凋亡率,0.05 μmol/L 硒处理组心肌细胞凋亡率为 50%,后续实验以含 0.05 μmol/L 硒的培养液作为低硒组。



A:0;B:0.01 μmol/L;C:0.05 μmol/L;D:0.08 μmol/L

图 2 不同浓度亚硒酸钠刺激原代心肌细胞病理图片(×50)

**1.3.3 心肌细胞线粒体提取** 取适量的对照组和低硒处理组心肌细胞,胰酶消化离心后加入适量的细胞裂解液,置于匀浆器,冰上研磨。4℃ 1 200 g 离心 15 min 去除细胞核后,10 000 g 离心 10 min,弃上清液得到线粒体沉淀。加入适量的线粒体储存液-80℃ 保存线粒体。

**1.3.4 线粒体琥珀酸脱氢酶活性检测** 待测样品与标准品按说明书稀释比例配好,加入酶标包被板。封板 37℃ 孵育 30 min。弃去液体,用提前配好的洗涤液清洗 5 次,每孔加酶标试剂 50 μL 后,封板 37℃ 孵育 30 min。用洗涤液清洗 5 次后显色,37℃ 避光显色 15 min,采用分光光度计于 600 nm 检测琥珀酸脱氢酶活性。

**1.3.5 免疫印迹法检测 STAT3、p-STAT3 及凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 水平** 取对照组和低硒组心肌细胞线粒体,裂解后 Nanodrop 2000(美国 Thermo 公司)检测蛋白浓度。取相同量的线粒体裂解液或全细胞裂解液,加入 SDS 凝胶,80 V 120 min 电泳,350 mA 转膜 4 h。5% 无糖脱脂奶粉封闭 1 h,按抗体说明书稀释比例孵育一抗室温 4 h, TBST 清洗 3 次,室温孵育二抗 1 h 后,于暗室显影。Image J 灰度分析检测各条带光密度值。

**1.3.6 流式细胞术检测心肌细胞凋亡率** 收集对照组和低硒组心肌细胞,0.01 mol/L PBS 洗涤后加入预冷的 70% 无水乙醇固定 2 h。PBS 重悬细胞,经过滤网过滤后,1 000 r/min 离心 5 min,弃去 PBS。PI

染色液 4 ℃ 避光孵育 0.5 h。流式细胞仪于 488 nm 检测心肌细胞凋亡率。

**1.4 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,采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 心肌细胞线粒体酶活力及 STAT3 表达变化** 低硒处理原代心肌细胞 36 h 后,提取对照组和低硒组心肌线粒体,检测琥珀酸脱氢酶活力变化。与对照组相比,低硒组琥珀酸脱氢酶活性明显下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 3A。p-STAT3 是 STAT3 的活性状态,线粒体裂解后,通过免疫印迹检测线粒体 p-STAT3 和总 STAT3 的表达情况,并以 p-STAT3 与总 STAT3 比值来显示 STAT3 活性。结果显示低硒组线粒体 STAT3 活性与对照组相比明显降低 ( $P < 0.01$ ),但总 STAT3 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),见图 3B。

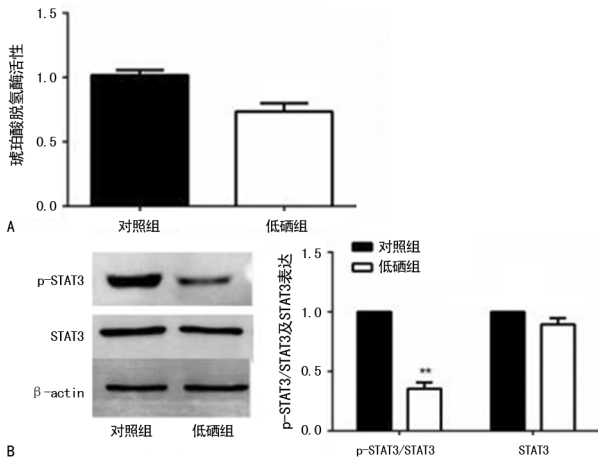


图 3 两组心肌细胞琥珀酸脱氢酶活性及 STAT3 表达变化

**2.2 凋亡相关蛋白表达变化** 与对照组比较,低硒组 Bax 蛋白表达明显升高,Bcl-2 蛋白表达降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 4。

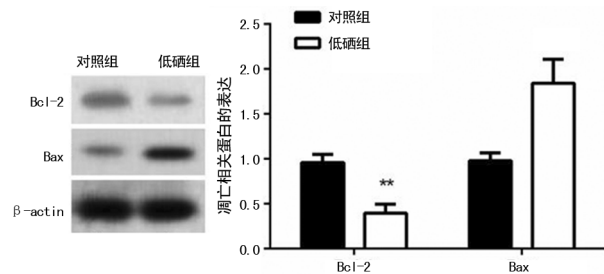


图 4 两组心肌细胞凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达量变化

**2.3 心肌细胞凋亡情况** PI 荧光点图观察到,对照组细胞主要为非凋亡细胞,而低硒组心肌细胞出现大量凋亡细胞。低硒组心肌细胞凋亡率为  $(42.62 \pm 2.21)\%$ ,高于对照组的  $(6.13 \pm 2.32)\%$ ,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 5。

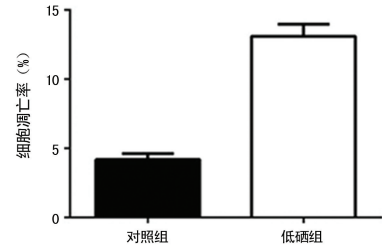
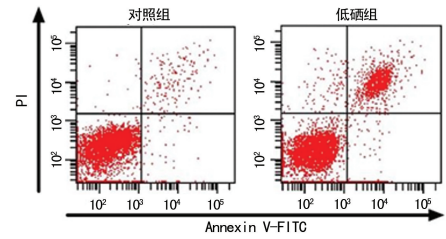


图 5 两组心肌细胞凋亡情况

## 3 讨论

硒元素作为人体必需的微量元素之一,与抗氧化、机体免疫、衰老、疾病等方面有重要的联系<sup>[7]</sup>。硒缺乏导致的疾病,绝大多数都是由氧化损伤引起。研究发现,由血硒含量降低引起的心肌细胞损伤主要以线粒体损伤为主,体现在线粒体膜受损,活性氧产生,脂类氧化物含量升高,导致心肌细胞凋亡<sup>[8]</sup>。作为线粒体信号转导与转录因子家族的一员,p-STAT3 和细胞损伤紧密相关<sup>[9]</sup>。大量的临床数据和研究结果表明 STAT3 蛋白在心肌病患者和模型动物均表达降低,提示 STAT3 参与心肌病病理学过程<sup>[10]</sup>。研究发现 STAT3 与线粒体呼吸链复合物 I 共同作用,在保留电子传递链复合物和稳定细胞内 ATP 水平以维持正常线粒体的保护功能中起十分重要的作用<sup>[11]</sup>。相关研究表明,硒能够上调细胞中 STAT3 活性,从而实现其对下游基因的调控,参与细胞的凋亡过程<sup>[12]</sup>。有研究表明,线粒体 STAT3 的活性与大鼠心脏功能有着明显的正相关<sup>[13-14]</sup>。本研究分离了 C57BL/6 乳鼠心肌细胞,通过低硒处理模拟心肌细胞硒缺乏后的病理环境。分离心肌细胞线粒体后,通过免疫印迹检测 p-STAT3/STAT3 的变化显示线粒体 STAT3 的活性变化。笔者发现,低硒条件下 STAT3 的活性下降,但是 STAT3 蛋白表达量并没有发生改变。检测琥珀酸脱氢酶活性可以间接表明线粒体活性变化,结果显示低硒处理后心肌细胞的线粒体活性也受到明显的影响,与对照组相比有明显的降低。这些结果表明低硒处理后影响了心肌细胞线粒体 STAT3 的活性,从而导致线粒体功能受损。

STAT3 在心肌缺血模型中起保护作用,但是由硒缺失引起的心肌细胞损伤对线粒体 STAT3 活性影响是否会引起凋亡信号的产生促进心肌细胞凋亡还未有明确的报道,因此笔者采用离体的心肌细胞通过低硒处理,在细胞水平上研究这一问题。在 STAT3 受到低硒影响的前提下,检测了凋亡相关蛋白 Bax 和

Bcl-2 的表达水平,结果显示低硒组 Bax 蛋白表达明显升高,Bcl-2 蛋白表达降低。流式细胞术检测结果显示,低硒处理后导致心肌细胞凋亡率上升。

综上所述,硒缺乏降低了心肌细胞线粒体 STAT3 活性和线粒体活力,促进细胞凋亡相关蛋白的表达,最终导致心肌细胞凋亡。本研究进一步阐明了硒缺乏导致心肌疾病的致病机制,为硒相关治疗药物的开发提供了理论依据。

## 参考文献

- [1] STADTMAN T C. Post-translational activation of non-selenium glutathione peroxidase of *Chlamydomonas reinhardtii* by specific incorporation of Selenium[J]. *Bio Rep*, 2015,4(1):39-43.
- [2] VINCETI M,MANDRIOLI J,BORELLA P,et al. Selenium neurotoxicity in humans:bridging laboratory and epidemiologic studies[J]. *Toxicol Lett*, 2014, 230(2):295-303.
- [3] KROHN R M,LEMAIRE M,NEGRO SILVA L F. High-selenium lentil diet protects against arsenic-induced atherosclerosis in a mouse model[J]. *J Nutr Biochem*, 2015,27(1):72-76.
- [4] YANG X P,GHORESCHI K,STEWARD-THARP S M,et al. Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct,reciprocal actions of STAT3 and STAT5[J]. *Nat Immunol*, 2011,12(3):247-254.
- [5] GUO X,QIU J,TU T,et al. Induction of innate lymphoid cell-derived interleukin-22 by the transcription factor STAT3 mediates protection against intestinal infection[J]. *Immunity*, 2014,40(1):25-39.
- [6] JOHNSON D E,O'KEEFE R A,GRANDIS J R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018,15(4):234-248.
- [7] KOC S,CAYLI S,AKSAKAL C,et al. Protective effects

of melatonin and Selenium against apoptosis of olfactory sensory neurons:A rat model study[J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2016,30(3):62-66.

- [8] ESTEVEZ A,MORGAN K L,SZEWCZYK N J,et al. The neurodegenerative effects of Selenium are inhibited by FOXO and PINK1/PTEN regulation of insulin/insulin-like growth factor signaling in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Neurotoxicology*, 2014(41):28-43.
- [9] SIVEEN K S,SIKKA S,SURANA R,et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer:role of synthetic and natural inhibitors[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1845(2):136-154.
- [10] ATKINSON G P,NOZELL S E,BENVENISTE E. NF-kappa B and STAT3 signaling in glioma:targets for future therapies[J]. *Expert Rev Neurother*, 2010, 10(4):575-586.
- [11] LEE J H,CHIANG S Y,NAM D,et al. Capillarisin inhibits constitutive and inducible STAT3 activation through induction of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases[J]. *Cancer Lett*, 2014,345(1):140-148.
- [12] WOLFSON R K,MAPES B,GARCIA J G. Excessive mechanical stress increases HMGB1 expression in human lung microvascular endothelial cells via STAT3[J]. *Microvasc Res*, 2014,92(92):50-55.
- [13] ALEXANIAN I,PARISSIS J,FARMAKIS D,et al. Selenium contributes to myocardial injury and cardiac remodeling in heart failure[J]. *Int J Cardiol*, 2014(176):272-273.
- [14] SU S A,YANG D,WU Y,et al. EphrinB2 regulates cardiac fibrosis through modulating the interaction of Stat3 and TGF- $\beta$ /Smad3 signaling[J]. *Circ Res*, 2017,121(6):617-627.

(收稿日期:2019-04-06 修回日期:2019-06-26)

(上接第 3617 页)

- [9] 牛慧彦,何平. PI3K/AKT/mTOR 在非小细胞肺癌中作用的研究进展[J]. *中国全科医学*, 2007,10(23):2019-2021.
- [10] 云芬,贾永峰,袁莉. PI3K/AKT 信号通路与 PTEN 在非小细胞肺癌表达中的相关性[J]. *实用肿瘤杂志*, 2012,27(4):365-368.
- [11] 张星星,童佳兵,杨程,等. 芪玉三龙汤对肺癌移植瘤小鼠 PI3K/AKT/mTOR 通路 PI3K、Akt、mTOR 表达的影响[J]. *安徽中医药大学学报*, 2016,35(1):73-75.
- [12] 刘亚莉,易佳丽,王莹,等. 补中益气汤含药血清对 A549/DDP 细胞 PI3K/AKT 信号转导通路影响的实验研究[J]. *中国医科大学学报*, 2014,43(1):14-16.
- [13] 于丹,于宁,易佳丽,等. 补中益气汤含药血清对 A549/DDP 细胞 PI3K/AKT、Survivin 表达的影响[J]. *中国生化药物杂志*, 2014,34(3):4-7.

- [14] 尚亚丽,王淑玲. 从 PTEN-PI3K-AKT 信号通路探讨补肾疏肝方含药血清抑制人肺腺癌 A549 细胞增殖和转移的机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015,21(10):153-157.
- [15] 姬秀娥,马科,马治国,等. 回药爱康方对 Lewis 肺癌 C57 小鼠瘤细胞 PCNA、SIL-2R 表达的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2016,43(7):1515-1518.
- [16] 王祁民,孙利民,许剑峰. 通关藤及其制剂消癌平抗肿瘤的相关性研究[J]. *临床误诊误治*, 2017,30(12):102-104.
- [17] NI Y,LIANG D,TIAN Y,et al. Infarct-sparing effect of adenosine A2B receptor agonist is primarily due to its action on splenic leukocytes via a PI3K/Akt/IL-10 pathway[J]. *J Surg Res*, 2018(232):442-449.

(收稿日期:2019-04-25 修回日期:2019-06-16)