

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.12.003

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210601.1345.004.html\(2021-06-01\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210601.1345.004.html(2021-06-01))

氧化应激介导的 DNA 损伤在大鼠心肌 H9C2 细胞缺氧/复氧损伤中的作用*

骆佳铭,李 机,赵 伟[△]

(南方医科大学珠江医院麻醉科,广州 510282)

[摘要] **目的** 探讨氧化应激介导的 DNA 损伤在大鼠心肌 H9C2 细胞缺氧/复氧损伤中的作用。**方法** 采用大鼠心肌 H9C2 细胞制备缺氧/复氧损伤模型。实验分为对照组(Con 组)、缺氧/复氧模型组(H/R 组)、抗氧化剂 NAC 组(NAC 组)、抗氧化剂+模型组(NAC+H/R 组)。Western blot 检测细胞凋亡相关蛋白(Bax、Bcl-2)表达;细胞免疫荧光法检测活性氧(ROS)水平,DNA 损伤相关蛋白(p-γH2ax、8-OHdG)、细胞损伤指标[细胞色素 c (Cytochrome c)]表达。**结果** 与 Con 组比较,H/R 组细胞内 ROS 水平升高,p-γH2ax、8-OHdG、Cytochrome c、Bax/Bcl-2 表达增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 H/R 组比较,NAC+H/R 组 ROS 水平降低,p-γH2ax、8-OHdG、Cytochrome c、Bax/Bcl-2 表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 抑制心肌细胞氧化应激,可明显改善心肌细胞 DNA 损伤和凋亡。

[关键词] 氧化应激;DNA 损伤;心肌缺血再灌注损伤**[中图法分类号]** R363.2+1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2021)12-1993-05

Role of oxidative stress-mediated DNA damage in hypoxia/reoxygenation damage of rat myocardial H9C2 cells*

LUO Jiaming, LI Ji, ZHAO Wei[△]

(Department of Anesthesiology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of oxidative stress-mediated DNA damage in myocardial ischemia-reoxygenation injury in rat myocardial H9C2 cells. **Methods** The ischemia-reoxygenation injury model was prepared by using rat myocardial H9C2 cells. The experiment was divided into the control group (Con), hypoxia/reoxygenation model group (H/R), antioxidant NAC group (NAC) and antioxidant + model group (NAC+H/R). The expressions of apoptosis-related proteins Bax, Bcl-2 and cytochrome c were detected by Western blot and immunofluorescence assay. The level of ROS in the cells was detected by DCFH-DA staining. The expression of DNA damage-related proteins p-γH2ax and 8-OHdG were detected by immunofluorescence assay. **Results** Compared with the Con group, the intracellular oxidative stress ROS level in the H/R group was increased, and the expressions levels of p-γH2ax, 8-OHdG and Cytochrome c were increased, Bax/Bcl-2 was increased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the H/R group, the ROS level in the NAC+H/R group was significantly decreased, the expression levels of p-γH2ax, 8-OHdG and Cytochrome c were significantly decreased, Bax/bcl-2 was decreased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Inhibiting the oxidative stress in cardiomyocytes can significantly improve the DNA damage and apoptosis of cardiomyocytes.

[Key words] oxidative stress; DNA damage; myocardial ischemia reperfusion injury

心肌缺血-再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)是围术期面临的一种常见

病理生理变化,严重威胁患者生命安全^[1-2],其发病机制仍不清楚。前期研究表明 MIRI 是多种因素共同作

用的结果^[3-4],在急性心肌缺血再灌注状态中氧化应激发挥了显著破坏作用^[5-6]。当发生心肌缺血再灌注时,活性氧(reactive oxygen species, ROS)暴发超过了机体捕获清除的能力时可破坏细胞膜结构的完整性,造成 MIRI。氧化应激是如何导致 MIRI 后心肌细胞损伤和死亡,至今尚不明确。

相关研究表明,氧化应激是导致细胞 DNA 损伤的重要因素之一^[7]。DNA 作为生物体最重要的遗传物质,其稳定性决定了生物的生存和发展。但生物体本身基因的完整性容易受内、外环境因素影响,辐射线的伤害或化学试剂的破坏均可导致 DNA 的双键结构断裂而造成损伤。前期研究发现, MIRI 过程中心肌细胞内 ROS 水平增高^[6,8-9]。由此推测, MIRI 病理过程中氧化应激产生的 ROS 很可能是导致心肌细胞 DNA 损伤的重要因素。

本研究在大鼠心肌 H9C2 细胞缺氧/复氧模型上检测细胞内氧化应激导致的 DNA 损伤,并通过加入抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)论证由氧化应激导致的 DNA 损伤在 MIRI 发病过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠心肌 H9C2 细胞购自中科院上海细胞库(目录号 GNR 5);一抗 Bcl-2(货号: # 3498)、Bax(货号: # 1479)、Cytochrome c(货号: # 12963)、Phospho-Histone H2A. X (S139)(货号: # 9718S)和 β -actin(货号: # 4967)抗体购自美国 CST 公司;8-OHdG(货号: # sc-66036)抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

大鼠心肌 H9C2 细胞是来源于胚胎期 BD1X 大鼠心脏组织的亚克隆细胞系,由于来源于心脏,常作为心脏成肌细胞用于心肌疾病的研究。将 H9C2 细胞置于含有 10% FBS 100 U/mL 青霉素+100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养液中,37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 细胞孵箱培养,培养液每 2 天换 1 次^[10]。

1.2.2 建模和分组

将正常培养的 H9C2 细胞分成 4 组。对照组(Con 组):37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中正常培养;缺氧/复氧模型组(H/R 组):在 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后换液,细胞长至 80%后将细胞用 PBS 冲洗,加入不含血清的低糖 DMEM,置入 85% N₂、10% H₂、5% CO₂ 的 37% 饱和湿度厌氧培养箱,分别缺氧培养 6 h,加入新鲜 DMEM 培养基,置于 5% CO₂ 培养箱中继续复氧培养 12 h^[11];抗氧化剂 NAC 组(NAC

组):仅在培养基中加入终浓度为 1 mmol/L 抗氧化剂 NAC,不进行缺氧/复氧处理^[12];抗氧化剂+模型组(NAC+H/R 组):缺氧/复氧前 1 h 在培养基中加入终浓度为 1 mmol/L 抗氧化剂 NAC 预处理,再进行缺氧/复氧处理。

1.2.3 Western blot 检测细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 表达

取各组处理后的 H9C2 细胞,以预冷的 PBS 洗涤 3 次后加入 100 μ L 含 10% PMSF 和 5% 磷酸酶抑制剂的细胞裂解液(使用前 5 min 配置),低温离心取蛋白上清液后进行蛋白定量;上样后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳完成后再用 200 mA 恒定电流进行 0.22 μ m PVDF 转膜 90 min,封闭 2 h,继续孵一抗过夜, TBST 缓冲液清洗 3 次,室温下孵二抗 1 h, TBST 清洗 3 次,化学发光仪进行检测。Image J 软件分析照片中蛋白条带的吸光度(A)值,计算目的蛋白相对表达水平。

1.2.4 细胞免疫荧光检测 ROS 水平、DNA 损伤、细胞损伤情况^[13]

H9C2 细胞接种于 6 孔培养板的细胞爬片上。各组处理后, PBS 漂洗 2 次, 10 mmol/L 的 DCFH-DA 染液于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, DAPI 37 $^{\circ}$ C 复染细胞核 10 min。随机选取 5 个视野用荧光显微镜采集照片。

经过分组处理后, PBS 清洗细胞爬片 3 次, 4% 的多聚甲醛的固定 10 min, 放入含 0.1% Triton X-100 的 PBS 中室温孵育 15 min。PBS 清洗 3 次, 分别加入目的抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜; 次日 PBS 清洗 3 次, 分别采用对应荧光二抗室温孵育 1 h, PBS 清洗 3 次, 加入 1 μ g/mL DAPI 37 $^{\circ}$ C 复染细胞核 10 min; 加抗淬灭封片剂盖上盖玻片, 荧光显微镜下观察并拍照记录。Image J 软件分析各样品的平均荧光强度。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism6 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞氧化应激 ROS 水平

与 Con 组比较, H/R 组细胞内 ROS 水平升高 ($P < 0.05$); 与 H/R 组比较, NAC+H/R 组 ROS 水平明显降低 ($P < 0.05$), 见图 1。

2.2 各组 DNA 损伤、细胞损伤情况

与 Con 组比较, H/R 组细胞 p- γ H2ax、8-OHdG、Cytochrome c 表达增多 ($P < 0.05$); 与 H/R 组比较, NAC+H/R 组细胞 p- γ H2ax、8-OHdG、Cytochrome c 表达明显降低 ($P < 0.05$), 见图 2、3。

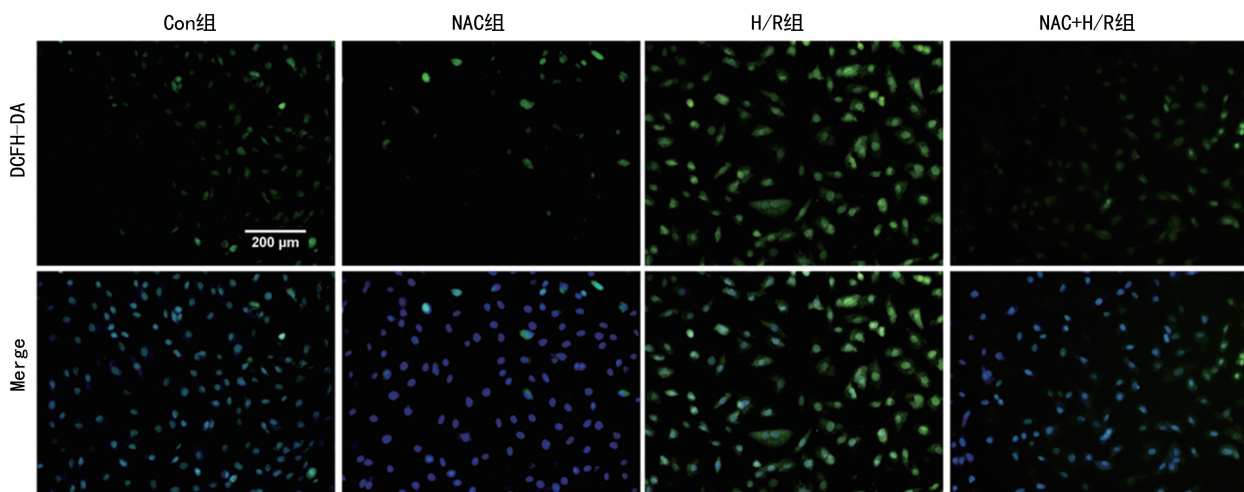
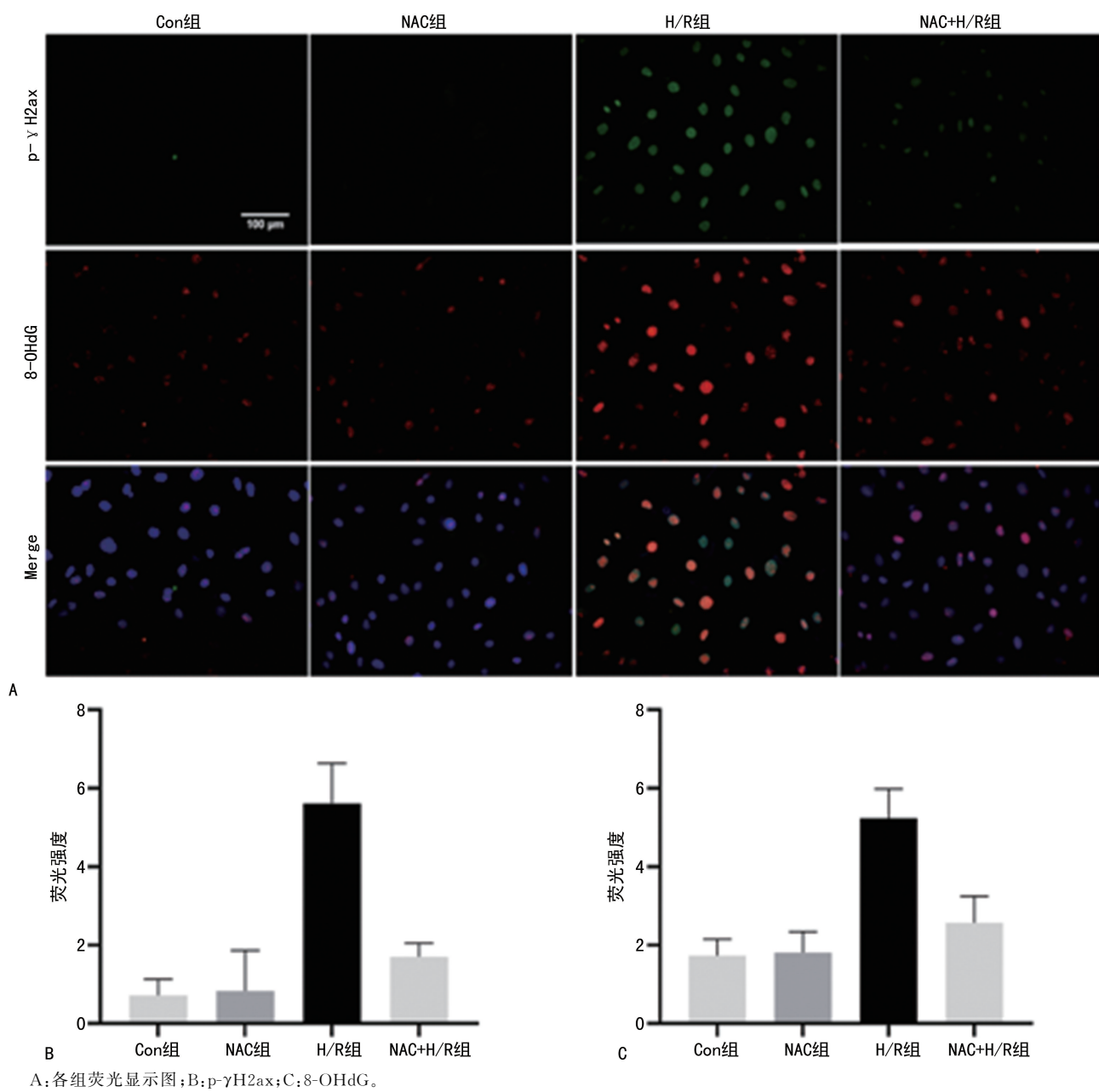


图 1 各组细胞 ROS 水平



A: 各组荧光显示图; B: p-γH2ax; C: 8-OHdG。

图 2 各组细胞 DNA 损伤情况

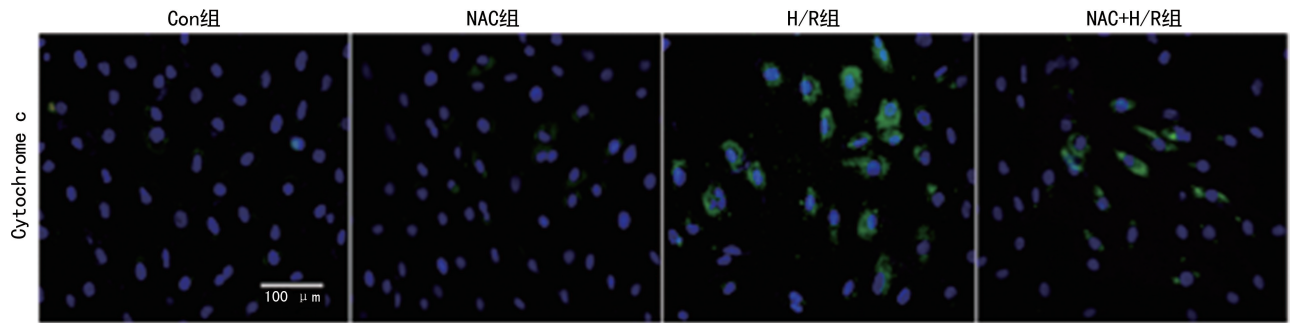
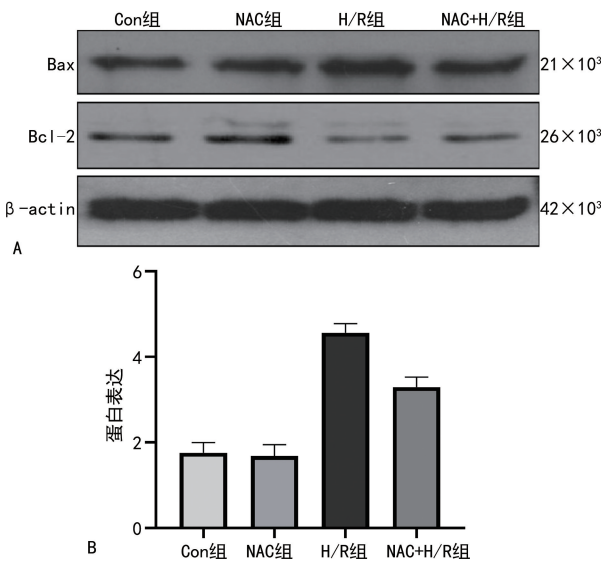


图3 各组细胞损伤情况

2.3 各组细胞凋亡情况

与 Con 组比较, H/R 组细胞 Bax/Bcl-2 表达增加 ($P < 0.05$); 与 H/R 组比较, NAC + H/R 组细胞 Bax/Bcl-2 表达减少 ($P < 0.05$), 见图 4。



A: Western blot; B: Bax/Bcl-2。

图4 各组细胞凋亡相关蛋白表达

3 讨论

MIRI 是多种因素共同作用的结果, 当发生心肌缺血再灌注时, ROS 通过心肌细胞和内皮细胞的一系列相互作用途径暴发性产生^[14], 并成为缺血后损伤的关键机制。当心肌发生缺血或梗死时, 细胞内氧自由基的形成增加, 同时抗氧化系统受到限制, O_2^- 和 H_2O_2 的清除减少, 使氧自由基转变成最强的 $-HO$, 超过了机体捕获清除的能力^[15]。ROS 可攻击生物膜上的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化, 破坏心肌细胞膜结构完整性, 最终造成 MIRI。另外, 氧化应激可通过上调细胞凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2 来引发细胞损伤。可见氧化应激在心肌细胞凋亡和损伤过程中起着至关重要的作用, 它们参与了 MIRI 的发病机制。因此, ROS 的产生是决定心肌损伤严重程度的重要因素。

DNA 作为生物体最重要的遗传物质, 对正常情况下不可再生的心肌细胞来讲尤为重要^[15]。相关研究表明: 氧化应激是导致细胞 DNA 损伤的重要因素之一^[16]。MIRI 过程中 ROS 产生过多或 DNA 损伤

未能修复, 将对心肌造成不可逆的损伤^[17]。此外, 既往研究发现, 当机体发生 DNA 损伤后会激活细胞周期“防火墙”, 可暂时阻滞细胞周期的进展, 而且还会激活相关的修复通路对损伤的 DNA 进行修复, 如果 DNA 损伤无法完全被修复, 则会引起细胞凋亡甚至坏死^[18]。本研究显示, 大鼠心肌细胞经过缺氧/复氧处理后, 细胞内 ROS 水平升高, DNA 损伤明显加重, 凋亡增多。而之前的研究也有类似报道, MIRI 病理过程中氧化应激产生的 ROS 很可能导致心肌细胞的 DNA 损伤^[19]。

因此, 寻找一个心脏保护剂和抗氧化剂来调节 ROS 水平进行预处理, 对改善心脏功能和延缓心肌坏死具有重要的临床意义^[4,6]。最近, 基础研究提供了心肌缺血和再灌注期间 ROS 形成的直接证据, 一些临床前和临床研究也已经证明抗氧化剂的潜在心脏保护价值^[20-22]。NAC 作为一种含有巯基的抗氧化剂, 它能干扰 ROS、清除自由基。有研究报道 NAC 可通过减少自由基的产生, 拮抗 ROS 介导的大鼠 H9C2 心肌细胞凋亡^[23], 与本研究结果一致。临床上, NAC 是极具研究价值且用途广泛的药物, 其在学习慢性肝损害、呼吸系统疾病、神经退行性疾病、艾滋病和心功能损伤等疾病方面均取得了较好的疗效。然而, NAC 是一种非特异性的抗氧化剂, 它不能针对性地降低具有破坏性的氧化因素, 甚至可能干预到正常的生理水平的氧化功能。笔者加入终浓度为 1 mmol/L 抗氧化剂 NAC, 结果显示 NAC 组与 Con 组细胞内 ROS 水平、DNA 损伤均无明显差异。如果明确加重 MIRI 过程中氧化应激的种类, 进行有针对地干预清除而保留生理功能的氧化水平将会极大地发挥该类抗氧化剂的治疗效果^[4], 后续研究将以此为侧重点。

综上所述, 氧化应激介导的 DNA 损伤可能密切参与 MIRI 的发病过程, 抗氧化剂 NAC 可明显减少氧化应激心肌细胞的 DNA 损伤和凋亡, 从而减轻 MIRI。

参考文献

[1] THIELMANN M, KOTTENBERG E, KLEIN-

- BONGARD P, et al. Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial [J]. *Lancet*, 2013, 382 (9892): 597-604.
- [2] KOEPPEN M, LEE J W, SEO S W, et al. Hypoxia-inducible factor 2-alpha-dependent induction of amphiregulin dampens myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 816.
- [3] ZHOU H, MA Q, ZHU P, et al. Protective role of melatonin in cardiac ischemia-reperfusion injury: from pathogenesis to targeted therapy [J]. *J Pineal Res*, 2018, 64(3): 421-425.
- [4] 高翔宇, 李卫萍, 贺毅, 等. 急性心肌梗死缺血/再灌注损伤的机制及其药物防治进展 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(20): 2237-2241.
- [5] ELTZSCHIG H K, ECKLE T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation [J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1391-1401.
- [6] 田野. 活性氧在急性心肌梗死心肌再灌注损伤中的作用和机制 [J]. *临床心血管病杂志*, 2017, 33(7): 611-614.
- [7] SANCHEZ-FLORES M, MARCOS-PEREZ D, COSTA S, et al. Oxidative stress, genomic features and DNA repair in frail elderly: a systematic review [J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 37: 1-15.
- [8] 陈兴宇, 孙乐, 李艳, 等. ROS 介导的自噬在心血管疾病中的作用 [J]. *心脏杂志*, 2019, 31(2): 207-211.
- [9] ZWEIER J L, TALUKDER M A. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 70(2): 181-190.
- [10] YANG C, ZHAO J, PEI W, et al. Biochemical mechanisms of bornyl caffeate induced cytotoxicity in rat pheochromocytoma PC12 cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 219: 133-142.
- [11] CHENG Y, YANG C, ZHAO J, et al. Proteomic identification of calcium-binding chaperone calreticulin as a potential mediator for the neuroprotective and neuritogenic activities of fruit-derived glycoside amygdalin [J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 26(2): 146-154.
- [12] 董小变, 吴娟, 庄晓东, 等. N-乙酰半胱氨酸对抗丙酮醛引起的心肌细胞损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(3): 398-404.
- [13] 史华旭, 吴子一, 陈世奇, 等. DNA 氧化损伤标志物 8-羟基脱氧鸟苷检测方法及其临床意义 [J]. *沈阳医学院学报*, 2019, 21(1): 79-82.
- [14] LI H, LIU Z, WANG J, et al. Susceptibility to myocardial ischemia reperfusion injury at early stage of type 1 diabetes in rats [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2013, 12: 133.
- [15] PUENTE B N, KIMURA W, MURALIDHAR S A, et al. The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response [J]. *Cell*, 2014, 157(3): 565-579.
- [16] DIZDAROGLU M. Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease [J]. *Cancer Lett*, 2012, 327(1/2): 26-47.
- [17] 张兰, 李赫, 刘娴, 等. 糖尿病大鼠心肌 DNA 损伤及 DNA 修复酶表达的变化 [J]. *基础医学与临床*, 2017, 37(9): 1281-1285.
- [18] KORWEK Z, ALSTER O. The role of the DNA damage response in apoptosis and cell senescence [J]. *Postepy Biochem*, 2014, 60(2): 248-262.
- [19] 卢春风, 王淑秋, 陈廷玉, 等. 槲皮素抑制异烟肼诱导的 L-02 细胞线粒体氧化应激性 DNA 损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(2): 308-312.
- [20] 冯建梅, 冯建宇, 吴岩, 等. 四氢姜黄素对 H9C2 细胞缺血再灌注损伤的影响及机制研究 [J]. *中国体外循环杂志*, 2019, 17(1): 48-53.
- [21] 鄢晓平, 黄煜, 彭亚飞, 等. 银杏叶提取物对大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用及其机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(13): 3177-3179.
- [22] KURIAN G A, RAJAGOPAL R, VEDANTHAM S, et al. The role of oxidative stress in myocardial ischemia and reperfusion injury and remodeling: revisited [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 1656450.
- [23] 严俊, 史婷婷, 庄让笑, 等. N-乙酰半胱氨酸对心脏等重要脏器作用的研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2016, 13(12): 45-48.