

·细胞与生理学·

DOI:10.16605/j.cnki.1007-7847.2020.09.0246

多肽 K-YFAE 对 H9C2 心肌细胞增殖及缺氧耐受的影响

王靠山, 朱莉*

(扬州大学 医学院, 中国江苏 扬州 225008)

摘要: 为了观察多肽 K-YFAE 对 H9C2 心肌细胞增殖和缺氧耐受的影响, 体外培养 H9C2 心肌细胞后, 将其分为对照组和多肽组, 对照组只使用 10% 的二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)处理, 多肽组在对照组处理的基础上分别加入浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 的多肽 K-YFAE, 7 d 后对各组细胞分别行 CCK-8 检测、细胞周期的流式细胞术检测、细胞周期相关基因的 qPCR 检测等, 以观察多肽 K-YFAE 对 H9C2 心肌细胞增殖的影响; 用三气培养箱对细胞行缺氧处理后分组, 并分别行细胞凋亡的 TUNEL 检测和流式细胞术检测, 以及细胞凋亡相关基因的 qPCR 检测等, 以观察多肽 K-YFAE 对 H9C2 心肌细胞缺氧耐受的影响。结果显示: 与对照组比较, K-YFAE 的干预可促进 H9C2 心肌细胞进入增殖期, 并且减少其凋亡。实验结果初步表明, 多肽 K-YFAE 既可以促进 H9C2 心肌细胞增殖, 又可以增加其缺氧耐受。

关键词: 多肽 K-YFAE; H9C2 心肌细胞; 富含半胱氨酸肠蛋白 2 (Crip2); Wnt 信号通路; 心脏发育; 心脏再生

中图分类号: Q517, R542.22

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2022)01-0047-07

Effects of Polypeptide K-YFAE on Proliferation and Hypoxia Tolerance of H9C2 Cardiomyocytes

WANG Kao-shan, ZHU Li*

(College of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225008, Jiangsu, China)

Abstract: To observe the effects of polypeptide K-YFAE on the proliferation and hypoxia tolerance of H9C2 cardiomyocytes, H9C2 cardiomyocytes were cultured *in vitro* and divided into control and polypeptide groups. In the control group, only 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and fetal bovine serum (FBS) were used, and in the polypeptide groups, different concentrations (10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$ and 50 $\mu\text{mol/L}$) of polypeptide K-YFAE were added. After 7 days, CCK-8, flow cytometry and qPCR were conducted to observe the effects of K-YFAE on the proliferation of H9C2 cardiomyocytes. After hypoxia treatment in three-gas incubator, the cells were grouped, for apoptosis detection by both TUNEL assay and flow cytometry, and for apoptosis-related genes by qPCR. The results showed that, compared with the control group, the intervention of K-YFAE promoted H9C2 cardiomyocytes to enter the proliferation phase and decreased their apoptosis, which means that K-YFAE may not only promote the proliferation of H9C2 cardiomyocytes, but also increase their hypoxia tolerance.

Key words: polypeptide K-YFAE; H9C2 cardiomyocytes; cysteine-rich intestinal protein 2 (Crip2); Wnt signaling pathway; heart development; heart regeneration

(Life Science Research, 2022, 26(1): 047-053)

心肌梗死中, 缺氧、缺血等多种因素常导致心肌发生坏死, 而目前尚无治疗方法可以逆转这种

坏死^[1], 故心脏再生越来越引起人们的关注。成熟的心肌细胞属于终末分化细胞, 通常被认为几乎

收稿日期: 2020-09-03; 修回日期: 2020-10-23; 网络首发日期: 2020-12-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81600223); 江苏省医学创新团队项目(CXTDB2017015)

作者简介: 王靠山(1994-), 男, 江苏泰州人, 学生; *通信作者: 朱莉(1966-), 女, 江苏盐城人, 博士, 扬州大学教授, 主要从事心脏再生、干细胞分化研究, E-mail: tzheart@126.com。

没有再生能力,但越来越多的实验研究表明,在某些特定情况下,心肌细胞是可以再生的,如:美国有学者发现新生小鼠在出生后的 7 d 内,其心肌细胞是可以再生的,这一特定时间段被称为心脏再生的窗口期,只是这种再生能力随后又失去了^[2]。多肽是由多个氨基酸分子脱水缩合而成的化合物,机体的众多活性物质都是以多肽的形式存在。近年来,多肽以毒性低、特异性高、相对分子质量小等独特优势被广泛研究于组织再生领域^[3],如:Stiernberg 等^[4]研究发现,合成肽(TP508)能促进肢体损伤血管的再生,加速皮肤伤口的愈合。

近期,笔者所在课题组在乳鼠心脏再生相关多肽的筛选项目中开展了与心脏再生相关多肽的筛选工作。以出生后 1 d 的乳鼠心脏组织样本为检测对象、出生 7 d 后的小鼠心脏组织标本为对照,应用 Nano LC-MS/MS (nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry) 质谱技术筛选与心脏再生相关的多肽,结果发现出生后 1 d 与 7 d 的小鼠心脏多肽的表达存在较大差异。在出生后 1 d 的小鼠心脏组织中,差异高表达 2 倍以上的多肽有 73 条,差异低表达 2 倍以上的多肽有 36 条。其中,一条前体蛋白为富含半胱氨酸肠蛋白 2 (cysteine-rich intestinal protein 2, Crip2) 的多肽 KTVYFAE (文中简称“K-YFAE”),在出生后 1 d 与 7 d 的小鼠心脏组织中的差异表达倍数高达 2.82 倍,且表现为下调,其生物信息学分析显示, K-YFAE 全长 7 个氨基酸,相对分子质量为 856.97, 等电位点为 6.0, 是一条疏水性多肽,在体内、体外都非常稳定。肽学研究早已发现多肽可能与其前体蛋白发挥相似的作用。而 Crip2 蛋白作为 LIM 蛋白家族的重要成员之一,在心脏发育、细胞免疫等过程中发挥重要作用^[5]。故本文拟观察多肽 K-YFAE 对 H9C2 心肌细胞增殖及缺氧耐受的影响,为心脏再生提供新的研究对象,促进心脏再生机制的理解,为心肌梗死提供新的治疗思路。

1 材料与方 法

1.1 材 料

小鼠心肌细胞 H9C2、DMEM 完全培养基、细胞增殖及毒性检测(CCK-8)试剂盒均购自江苏无锡怀信公司,多肽 K-YFAE 由上海科肽公司合成,qPCR 试剂盒及流式凋亡试剂盒购自诺唯赞公司(中国),无菌操作台和培养箱购自 ThermoFisher

公司(美国),倒置相差显微镜购自 Nikon 公司(日本),纯水仪购自 Millipore 公司(美国),qPCR 仪购自 Analytik Jena 公司(德国),流式细胞仪购自 Beckman 公司(美国),其余基础实验室试剂如磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)、无水乙醇等均由泰州市人民医院中心实验室提供。

1.2 细 胞 培 养

H9C2 心肌细胞使用 10 mL DMEM 完全培养基于 37 °C 温箱中静置培养,每 2~3 d 换液 1 次。将生长到对数期的细胞接种到 96 孔培养板上,细胞密度为每孔 1×10^5 个,然后分组处理。

1.3 实 验 分 组

培养后的 H9C2 心肌细胞分为对照组、多肽处理组。其中多肽组分为 3 个浓度,分别为 10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$,对照组只使用 10% 的二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)处理。所有组均为每 2 d 换液 1 次。

1.4 多肽 K-YFAE 对 H9C2 心肌细胞增殖的影响

分组、干预 7 d 后,对各组细胞分别行 CCK-8、流式细胞术检测细胞周期、qPCR 反应检测细胞周期相关基因等实验。

1.4.1 CCK-8 细胞增殖检测

将各组细胞分别消化后制成细胞悬浮液并均匀铺入 96 孔板中,按照 CCK-8 试剂盒说明书步骤检测 OD 值。

1.4.2 流式细胞术检测细胞周期

将原培养液、PBS 以及消化后的细胞悬液一起收集于 EP 管中,1 000 r/min 离心 5 min。弃上清,加入 1.5 mL 预冷的 PBS,1 000 r/min 离心 5 min 后去除 PBS 和细胞碎片。加入 1.5 mL 预冷的 PBS,在涡旋状态下加入无水乙醇 3.5 mL,4 °C 固定 30 min 后 1 000 r/min 离心 5 min,将乙醇吸除,加 PBS 清洗混匀。1 000 r/min 离心 5 min 后,将残留的乙醇除去并吸除管内 PBS,然后加入 200 μL PBS 和 2 μL RNA 酶,37 °C 下孵育 30 min。加入碘化丙啶(propidium iodide, PI)于室温下避光染色 30 min,将 EP 管内细胞过滤至含有 PBS 的 EP 管中,检测细胞周期。

1.5 多肽 K-YFAE 对 H9C2 心肌细胞凋亡的影响

采用三气培养箱使细胞暴露于缺氧环境 3 h,然后分组,24 h 后观察细胞形态,并对各组细胞

分别行 TUNEL 检测细胞凋亡、流式细胞术检测细胞凋亡、qPCR 反应检测细胞凋亡周期相关基因等实验。

1.5.1 TUNEL 检测细胞凋亡

在室温下将约 $5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ H9C2 心肌细胞固定于 4% 中性甲醛中 10 min。在载玻片上滴加细胞悬液 50~100 μL , 干燥后用 PBS 清洗 5 min, 共清洗两次。室温下, 在色缸中加入含 2% 过氧化氢的 PBS, 反应 5 min 后再次用 PBS 洗两次, 每次 5 min。吸去载玻片上多余液体后, 在切片上加两滴 TdT 酶缓冲液, 室温下静置 5 min。再次吸去多余液体后滴加 TdT 酶反应液 54 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 下在湿盒中反应 1 h。在染色缸中加入预热至 37 $^{\circ}\text{C}$ 的洗涤和终止反应缓冲液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 30 min, 每 10 min 轻轻搅动 1 次。用 PBS 洗 3 次切片, 每次 5 min, 滴加过氧化物酶标记的抗地高辛抗体两滴, 室温下, 于湿盒中反应 30 min, PBS 清洗 4 次, 每次 5 min。在切片上加入现配的 0.05% DAB 溶液, 室温显色 5 min 后蒸馏水清洗 4 次, 前 3 次每次 1 min, 最后 1 次 5 min。甲基绿复染 10 min 后蒸馏水洗 3 次, 前两次提起放下载玻片 10 次, 最后静置 30 s, 1 次。依此法再用 100% 正丁醇洗 3 次、二甲苯脱水 3 次, 每次 2 min, 封片、干燥后, 观察并记录实验结果。

1.5.2 流式细胞术检测细胞凋亡

选择对数生长期且状态良好的细胞, 消化、洗涤并重悬细胞后行细胞染色, 加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 染色液, 吹匀后, 室温下避光孵育 20 min。加入 400 μL 缓冲液, 轻轻混匀, 染色后样品在 1 h 内用流式细胞仪检测。

1.6 qPCR 反应检测细胞周期及凋亡相关基因

按照 Trizol 试剂说明书提取、分离 RNA, 并测其浓度。采用反转录试剂盒合成 cDNA 后, 按照 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 说明书行 qPCR 反应。以 *GAPDH* 为内参, 采用 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法定量分析细胞周期相关基因 (*P21*、*PLK3*、*E2F1*、*cyclin C*) 和细胞凋亡相关基因 (*Bax*、*Bcl-2*) 的表达水平。qPCR 反应条件: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 变性 95 $^{\circ}\text{C}$, 8 s; 退火/延伸 60 $^{\circ}\text{C}$, 8 s; 熔解曲线分析 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 60s; 95 $^{\circ}\text{C}$, 15s。其中, 变性与退火/延伸循环次数为 39 次。引物信息如下, P21-FP: 5' -AAGACCATGTGGACCTGTCA -3', P21-RP: 5' -GGCTTCCTCTTGAGAAAGAT -3'; PLK3-FP: 5' -TCAGCAAGTGGGTTGACTAC -3', PLK3-

RP: 5' -GATCTCCACCCTTCATGAGGT -3'; E2F1-FP: 5' -CTCGACTACCACTTCGGCCTC -3', E2F1-RP: 5' -TAGAAGCTTCTGGAGACAGAG -3'; cyclin C-FP: 5' -GAGCCTCTCGCTGACCAGCT -3', cyclin C-RP: 5' -TGGGCTCTAAATTGGCTCAC -3'; Bax-FP: 5' -GATGCGTCCACCAAGAAGCT -3', Bax-RP: 5' -AGCACCAGTTTGTGGCAAAG -3'; Bcl-2-FP: 5' -TGGTATTTCAGATTACATGCATG -3', Bcl-2-RP: 5' -TCAGGAAGACCCTGAAGGAC -3'; GAPD-H-FP: 5' -AACGACCCCTTCATTGAC -3', GAPD-H-RP: 5' -TCCACGACATACTCAGCAC -3'。

1.7 统计学分析

采用 GraphPad Prism 7.0 进行统计分析。计量资料采用平均数 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 Student's *t*-test, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 多肽 K-YFAE 促进 H9C2 心肌细胞增殖

显微观察结果显示, 与对照组 (control) 相比, 多肽组 H9C2 心肌细胞的密度明显增加, 且随着多肽浓度的增加, 细胞密度进一步增加 (图 1)。在 CCK-8 检测细胞增殖实验中, 多肽 K-YFAE 的干预显著提高了各浓度实验组心肌细胞的 OD 值, 并随着多肽 K-YFAE 浓度的增加, OD 值亦逐渐增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2); 在细胞周期检测中, 多肽组 H9C2 心肌细胞的 G0/G1 周期较对照组明显缩短, 且随着多肽浓度增加, G0/G1 周期进一步缩短 ($P < 0.05$), 表明多肽 K-YFAE 能促进 H9C2 心肌细胞更早进入分裂期 (图 3)。进一步采用 qPCR 反应检测细胞周期相关基因 (*P21*、*PLK3*、*E2F1*、*cyclin C*) 的表达水平, 结果显示: 与对照组相比, *P21* 基因的表达随多肽剂量增加而降低, 而 *PLK3*、*cyclin C*、*E2F1* 基因的表达随多肽剂量增加而递增 (图 4)。以上结果均提示, 多肽 K-YFAE 可以促进 H9C2 心肌细胞增殖, 并使得更多细胞进入分裂期。

2.2 多肽 K-YFAE 促进 H9C2 心肌细胞缺氧耐受

通过在显微镜下观察各组细胞形态, 我们发现经过缺氧处理后, 对照组细胞皱缩, 而多肽 K-YFAE 处理组细胞随多肽剂量增加回复正常形态的细胞数增多 (图 5)。TUNEL 法检测细胞凋亡结果显示, 经过多肽 K-YFAE 处理后, 与对照组相

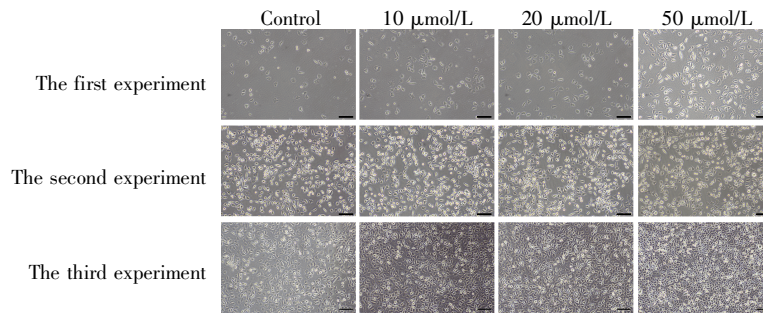


图1 培养7 d后各组H9C2心肌细胞的形态
标尺: 100 μm。

Fig.1 Morphology of H9C2 cardiomyocytes in each group after cultured for 7 days
Scale bar: 100 μm.

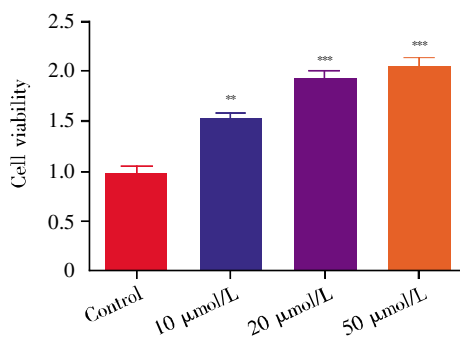


图2 CCK-8检测H9C2心肌细胞增殖

与对照组比较, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ 。图4、6、8、9的统计分析同此图。

Fig.2 Determination of proliferation of H9C2 cardiomyocytes by CCK-8

Compared with the control group, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. The marks have the same meanings in Figs. 4, 6, 8 and 9.

比, 多肽组细胞凋亡比例减少, 且随着多肽浓度增加, 细胞凋亡比例进一步减少, 差异具有显著性 ($P < 0.01$) (图6)。流式细胞术检测细胞凋亡结果显示, 多肽组细胞更能耐受缺氧, 细胞凋亡率明显下降(图7~8)。其中, 对照组早期凋亡率(Q1-LR)=10.50%, 晚期凋亡率(Q1-UR)=25.23%; 20 μmol/L

多肽组 Q1-LR=8.50%, Q1-UR=13.98%; 50 μmol/L 多肽组 Q1-LR=5.53%, Q1-UR=8.25%, 可以看到当多肽浓度在 20~50 μmol/L 范围内时, 细胞早期凋亡率明显减少, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 这表明在此范围内, 多肽浓度的增加减少了细胞的凋亡。有意思的是, 10 μmol/L 多肽组早期凋亡率增加(Q1-LR=12.82%), 晚期凋亡率减少(Q1-UR=12.08%) (图7), 这可能提示多肽 K-YFAE 可以促进 H9C2 心肌细胞缺氧耐受, 但其存在一定的浓度依赖性。进一步采用 qPCR 检测细胞凋亡相关基因 (*Bax*、*Bcl-2*) 的表达水平, 结果显示: 与对照组相比, *Bax* 基因的表达随多肽 K-YFAE 浓度增加而降低, *Bcl-2* 基因的表达随多肽剂量增加而递增(图9)。以上结果均提示, 多肽 K-YFAE 可能促进 H9C2 心肌细胞缺氧耐受, 减少其缺氧状态下的凋亡。

3 讨论

随着生活节奏的加快, 心肌梗死等心血管疾病成为威胁人类健康的主要疾病之一^[6]。目前, 虽然药物治疗、溶栓及介入技术的开展明显改善了

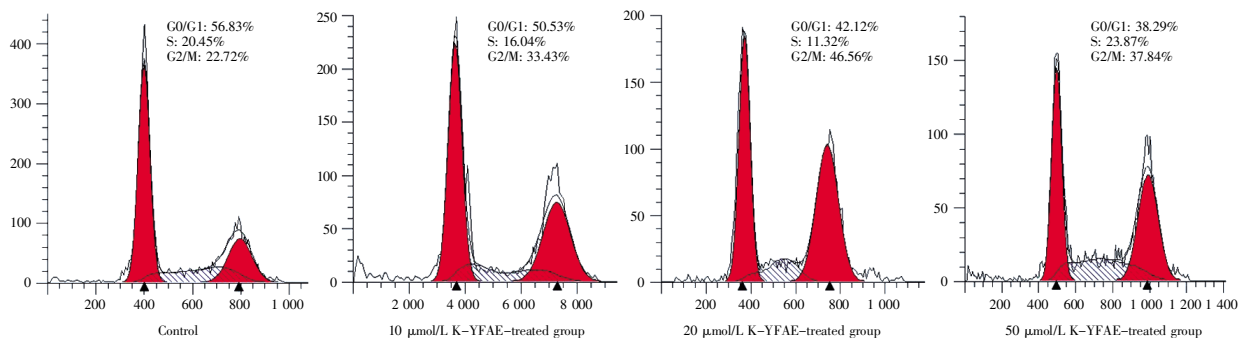


图3 流式细胞术检测H9C2心肌细胞增殖

Fig.3 Detection of H9C2 cardiomyocyte proliferation by flow cytometry

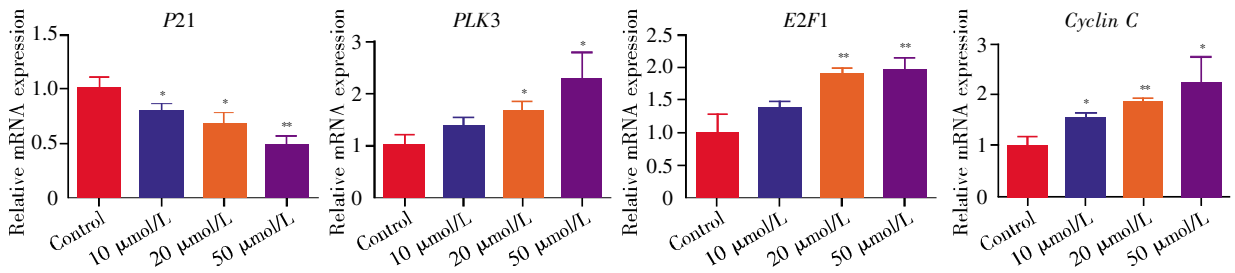


图 4 细胞周期相关基因的 qPCR 检测

Fig.4 Detection of cell cycle-related genes by qPCR

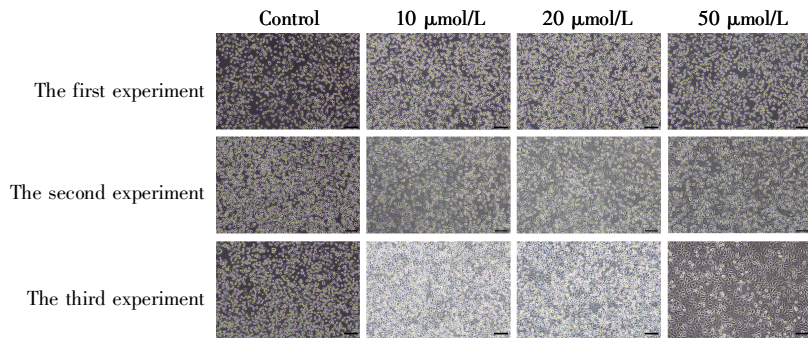


图 5 多肽 K-YFAE 对 H9C2 心肌细胞缺氧 3 h 后细胞形态的影响

标尺: 100 μm。

Fig.5 The effect of polypeptide K-YFAE on H9C2 cardiomyocyte morphology under hypoxia for 3 hours

Scale bar: 100 μm.

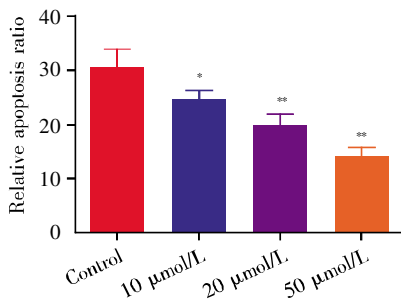


图 6 TUNEL 法检测缺氧处理 3 h 后各组细胞凋亡

Fig.6 Apoptosis detection by TUNEL assay after hypoxia treatment for 3 hours

心肌梗死患者的临床症状及生存率,但是现有措施对于已经坏死或已经瘢痕化的心肌却无能为力^[7]。

此外,由于成年人心肌细胞几乎没有再生能力,终末期心脏病成为临床上不可避免的“老大难”问题。近年来,为探索治疗终末期心脏病的更多方法,科研界一直把心脏再生作为研究热点。科学研究发现,心脏是可以再生的,且其再生存在某个窗口期^[8]。心肌梗死后,梗塞区域发生快速血管重建,有研究用全器官成像技术发现,新生小鼠可再生心脏中存在着侧支动脉网络,这些侧支动脉是由动脉内皮细胞沿预先存在的毛细血管迁移形成的,这一过程称为“动脉重组”^[8]。同时,淋巴管生成在心脏修复中也起着关键作用,在心肌梗塞后,淋巴管的生成导致 7 d 后机体免疫细胞减少,提示新形成的淋巴管有助于心肌梗塞后炎症

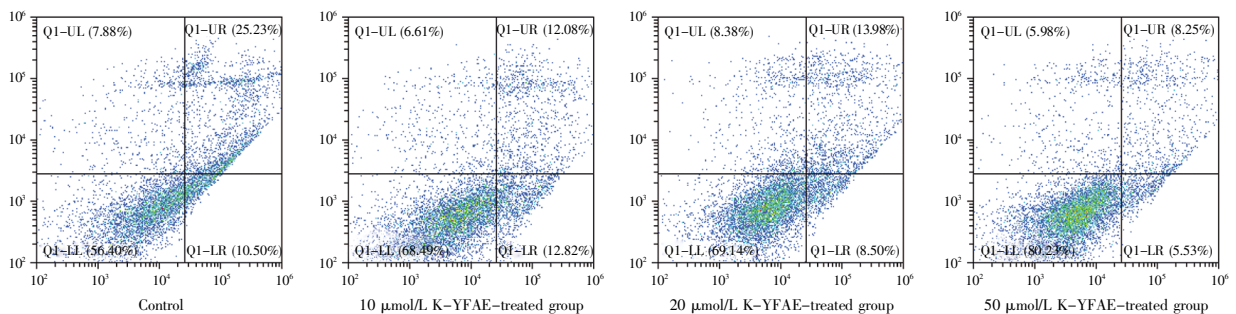


图 7 流式细胞术检测 H9C2 心肌细胞缺氧处理 3 h 后的凋亡

Fig.7 Apoptosis of H9C2 cardiomyocytes detected by flow cytometry after hypoxia treatment for 3 hours

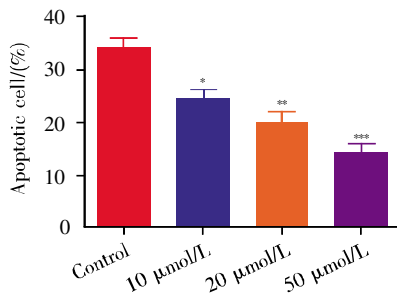


图8 流式细胞术检测 H9C2 心肌细胞缺氧处理 3 h 后凋亡的数据分析

Fig.8 Analysis of apoptosis of H9C2 cardiomyocytes treated with hypoxia by flow cytometry for 3 hours

的消退^[9]。多肽是指由 α -氨基酸通过肽键连接形成的化合物,一般由 3 个或 3 个以上的氨基酸分子构成,其因特异性高、毒性低、相对分子质量小等诸多独特优势被广泛研究并应用于临床实践中^[10-11]。深入探索多肽在心脏再生中的功能,将有助于促进人们对心脏再生机制的理解,亦有望为终末期心脏病的治疗提供新的策略。

Crip2 是 LIM 域蛋白家族的 Crip 型亚组,其在细胞骨架构建、心脏发育过程、血管和淋巴管形成、肿瘤发生以及机体免疫等多种生理病理过程中发挥重要作用。现有的研究表明,Crip2 蛋白可能通过与相关通路的重要蛋白质相互作用,调控相关信号通路(如 Wnt 信号通路等),参与调节机体的病理生理过程^[12]。

多肽 K-YFAE 是笔者所在课题组近期进行的乳鼠心脏再生相关多肽的筛选项目中应用 Nano LC-MS/MS 技术所筛选出的兴趣多肽,其来源于前体蛋白 Crip2,且在小鼠出生 7 d 后表现为下调。近年来,肽学新的研究表明,多肽往往与其前体蛋白功能相近^[13]。故此多肽极有可能与 Crip2 发挥相似的作用,即参与调节心脏的发育、心功能的维持、伤口愈合、血管形成等。另外,由于此多肽为差异性多肽,且在心脏再生的“窗口

期(7 d)”内表现为极有意义的下调。我们有理由推测它是否对心脏再生产生关键的影响。因此,我们针对其前体蛋白 Crip2 的功能特点,设计了此实验,拟观察多肽 K-YFAE 对 H9C2 心肌细胞增殖及缺氧耐受的影响。

本研究中,通过直接观察细胞形态以及流式细胞术检测细胞周期,我们发现多肽 K-YFAE 确实可以促进 H9C2 心肌细胞增殖,使更多的细胞进入到增殖期,并且随着多肽浓度的增加,其作用也越明显。细胞周期相关基因表达水平的检测也充分证实了这一点,多肽组随着多肽浓度的增加,P21 基因的表达逐渐降低,PLK3、E2F1、cyclin C 基因的表达逐渐增加。另外一方面,经多肽 K-YFAE 处理后,缺氧后由皱缩恢复至正常形态的细胞数目增多。流式细胞术检测结果显示,多肽 K-YFAE 处理可以使得缺氧引起的细胞凋亡比例逐渐减小,且在多肽浓度为 20~50 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞早期凋亡率减少显著,表明这种作用可能存在一定的浓度依赖性。同时 TUNEL 法检测结果显示,多肽 K-YFAE 处理可显著减少缺氧诱导的 H9C2 心肌细胞的凋亡。在凋亡基因检测中,多肽 K-YFAE 的处理可抑制缺氧环境诱导的 Bax 蛋白表达,同时可促进缺氧环境诱导的 Bcl-2 蛋白表达。以上结果均表明,多肽 K-YFAE 可以增强 H9C2 心肌细胞的缺氧耐受。

多肽 K-YFAE 的前体蛋白 Crip2 可能通过与 Wnt 信号通路的重要蛋白质 Wnt3a 相互作用,调控 Wnt 信号通路,参与心肌细胞生长发育的调控。研究显示,Wnt3a 在胚胎心肌发育中可能具有促进作用,并且主要作用在分化早期阶段;Wnt3a 的减少会破坏心脏菱形肌 r6 中的 Crip2 表达,并导致心脏神经嵴细胞异常迁移、心脏功能受损及咽弓发育的破坏^[14]。在心衰大鼠心肌中,Wnt3a 表达上升可能是一种机体自我保护的正反馈机制,

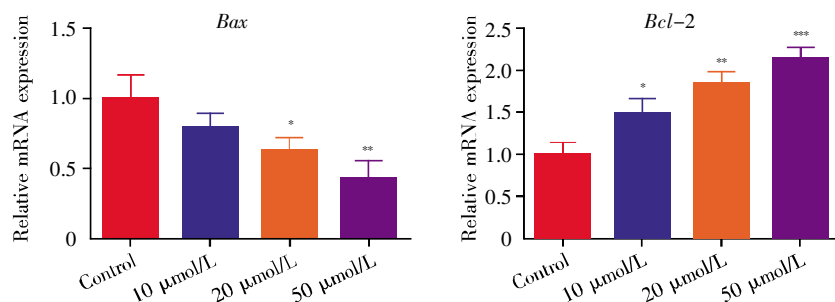


图9 qPCR 检测 H9C2 心肌细胞经缺氧处理 3 h 后的凋亡相关基因

Fig.9 Detection of apoptosis-related genes in H9C2 cardiomyocytes treated with hypoxia by qPCR for 3 hours

可以减少心衰细胞凋亡,具体的作用机制可能与其下游通路以及 caspase-3 的下调有关^[15]。在小鼠出生 7 d、心脏失去再生能力后, Crip2 蛋白来源的多肽 K-YFAE 在心脏中的含量明显下降,这可能是因为 Crip2 蛋白与 Wnt3a 相互作用,从而对心肌细胞生长发育起到抑制作用。在心肌梗死中,心肌处于缺血、缺氧状态,蛋白 Crip2 可能会通过上调 Wnt3a 表达减少心肌细胞凋亡。由于 Wnt 信号通路机制复杂,故 Crip2 蛋白与 Wnt3a 是否具有互相调控的作用,尚需要进一步研究。而多肽 K-YFAE 有望成为此通道新的研究对象,且因其易合成、毒性低、相对分子质量小、特异性强等优势,或可为心脏再生或心肌梗死提供新的治疗策略。

综上所述,多肽 K-YFAE 既可以促进 H9C2 心肌细胞的增殖,又可以增强 H9C2 心肌细胞的缺氧耐受,发挥与其前体蛋白 Crip2 相近的作用,而 Crip2 蛋白可能参与调控 Wnt 信号通路,具体机制尚待进一步研究。

参考文献(References):

- [1] LI M, IZPISUA BELMONTE J C. Mending a faltering heart[J]. *Circulation Research*, 2016, 118(2): 344-351.
- [2] PORRELLO E R, MAHMOUD A I, SIMPSON E, *et al.* Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart[J]. *Science*, 2011, 331(6020): 1078-1080.
- [3] 周诗, 胡慧媛, 郝丽英. 多肽类药物在心血管疾病中作用的研究进展[J]. *生理科学进展*(ZHOU Shi, HU Hui-yuan, HAO Li-ying. Advances in the study of the role of polypeptide drugs in cardiovascular diseases[J]. *Progress in Physiological Sciences*), 2017, 48(6): 428-434.
- [4] STIERBERG J, NORFLEET A M, REDIN W R, *et al.* Acceleration of full-thickness wound healing in normal rats by the synthetic thrombin peptide, TP508[J]. *Wound Repair and Regeneration*, 2000, 8(3): 204-215.
- [5] 陈燕, 孙晨. 富含半胱氨酸肠蛋白的研究进展[J]. *海洋科学*(CHEN Yan, SUN Chen. Research progress of cysteine-rich intestinal protein[J]. *Marine Sciences*), 2020, 44(6): 148-151.
- [6] MOZAFFARIAN D, BENJAMIN E J, GO A S, *et al.* Executive summary: heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2016, 133(4): 447-454.
- [7] BULLUCK H, YELLON D M, HAUSENLOY D J. Reducing myocardial infarct size: challenges and future opportunities[J]. *Heart*, 2016, 102(5): 341-348.
- [8] MARÍN-JUEZ R, MARASS M, GAUVRIT S, *et al.* Fast revascularization of the injured area is essential to support zebrafish heart regeneration[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2016, 113(40): 11237-11242.
- [9] VIEIRA J M, NORMAN S, VILLA DEL CAMPO C, *et al.* The cardiac lymphatic system stimulates resolution of inflammation following myocardial infarction[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2018, 128(8): 3402-3412.
- [10] ZHANG L J, GUERRERO-JUAREZ C F, HATA T, *et al.* Dermal adipocytes protect against invasive *Staphylococcus aureus* skin infection[J]. *Science*, 2015, 347(6217): 67-71.
- [11] 王艳昕. 新活素治疗急性失代偿心力衰竭疗效观察[J]. *淮海医药*(WANG Yan-xin. Therapeutic effect of rhBNP in treatment of acute decompensated heart failure[J]. *Journal of Huaihai Medicine*), 2017, 35(1): 44-46.
- [12] SUN X J, ZHANG R L, LIN X Y, *et al.* Wnt3a regulates the development of cardiac neural crest cells by modulating expression of cysteine-rich intestinal protein 2 in rhombomere 6[J]. *Circulation Research*, 2008, 102(7): 831-839.
- [13] DALLAS D C, GUERRERO A, PARKER E A, *et al.* Current peptidomics: applications, purification, identification, quantification, and functional analysis[J]. *Proteomics*, 2015, 15(5/6): 1026-1038.
- [14] 高胜利, 高淑红, 刘丽霞. Wnt3a 在小鼠胚胎心肌分化中的作用[J]. *现代医药卫生*(GAO Sheng-li, GAO Shu-hong, LIU Li-xia. Role of Wnt3a in mouse embryonic cardiomyocyte differentiation[J]. *Journal of Modern Medicine & Health*), 2010, 26(3): 321-322.
- [15] 薛载耀. Wnt3a/β-catenin 信号传导通路在 Survivin 诱导心力衰竭心肌细胞凋亡抵抗中的作用[D]. 北京: 中国人民解放军医学院(XUE Zai-yao. The Role of Wnt3a/β-catenin Signal Pathway in Cardiomyocyte Apoptosis Resist in Heart Failure Induced by Survivin[D]. Beijing: Chinese People's Liberation Army Medical School), 2017.
- [17] 陈冲, 焦宁, 徐瑞荣, 等. 台盼蓝拒染法、MTT 法、CCK-8 法在研究 As₂O₃ 细胞毒性作用中的意义[J]. *中国医药导报*(CHEN Chong, JIAO Ning, XU Rui-rong, *et al.* Significance of the research of trypan blue dye exclusion, MTT and CCK-8 methods on the cytotoxicity of As₂O₃[J]. *China Medical Herald*), 2013, 10(12): 24-26.
- [18] 牛天力, 秦国政. 华蟾酥毒基抑制剂人前列腺癌 PC3 细胞体外增殖研究[J]. *北京中医药大学学报*(NIU Tian-li, QIN Guo-zheng. The inhibitory effects of cinobufagin on the *in vitro* proliferation of human castration-resistant prostate cancer PC3 cells[J]. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine*), 2018, 41(12): 1019-1024.
- [19] TAN Z W, XIE S, HU S Y, *et al.* Caudatin targets TNFAIP1/NF-κB and cytochrome c/caspase signaling to suppress tumor progression in human uterine cancer[J]. *International Journal of Oncology*, 2016, 49(4): 1638-1650.
- [20] NING Y C, WANG C Q, LIU X, *et al.* CK2-mediated CDC106 phosphorylation is required for p53 degradation in cancer progression[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2019, 38(1): 131.
- [21] D'ARCY M S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy[J]. *Cell Biology International*, 2019, 43(6): 582-592.
- [22] ZHANG H J, CHEN M, LIU Y, *et al.* Paroxetine combined with fluorouracil plays a therapeutic role in mouse models of colorectal cancer with depression through inhibiting IL-22 expression to regulate the MAPK signaling pathway[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2020, 20(6): 240.
- [23] WU C, SHANG X Q, YOU Z P, *et al.* TRIM59 promotes retinoblastoma progression by activating the p38-MAPK signaling pathway[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2020, 61(10): 2.
- [24] KAVITHA K, THIYAGARAJAN P, RATHNA NANDHINI J, *et al.* Chemopreventive effects of diverse dietary phytochemicals against DMBA-induced hamster buccal pouch carcinogenesis via the induction of Nrf2-mediated cytoprotective antioxidant, detoxification, and DNA repair enzymes[J]. *Biochimie*, 2013, 95(8): 1629-1639.
- [25] HORMOZI M, GHOREISHI S, BAHARVAND P. Astaxanthin induces apoptosis and increases activity of antioxidant enzymes in LS-180 cells[J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2019, 47(1): 891-895.
- [26] WEI Y J, SINHA S, LEVINE B. Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation[J]. *Autophagy*, 2008, 4(7): 949-951.
- [27] 余冬梅, 安输, 杨洋, 等. JNK 激酶在细胞凋亡中的作用及其与癌症的关系[J]. *中国药理学通报*(YU Dong-mei, AN Shu, YANG Yang, *et al.* The role of JNK kinase in apoptosis and its relationship with cancer[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*), 2015, 31(12): 1641-1645.
- [28] BRAICU C, BUSE M, BUSUIOC C, *et al.* A comprehensive review on MAPK: a promising therapeutic target in cancer[J]. *Cancers*, 2019, 11(10): 1618.

(上接第 46 页)