

Ghrelin 预处理对 H9C2 心肌细胞缺氧/复氧损伤的影响

陈莹莹¹, 吴继雄¹, 王 靓², 何 非¹

摘要 目的 探讨 Ghrelin 预处理对 H9C2 心肌细胞缺氧/复氧损伤的影响。方法 培养 H9C2 心肌细胞并建立心肌细胞缺氧(21 h)/复氧(6 h)模型。细胞随机分成 4 组:对照组、缺氧/复氧组(H/R 组)、缺氧/复氧 + Ghrelin 组(H/R + G 组)、缺氧/复氧 + Ghrelin + 生长激素促分泌素受体(GHSR)-siRNA 组(H/R + G + G-siRNA 组);采用 siRNA 干扰技术阻断 Ghrelin 受体 GHSR 的表达以及 Hoechst 33258 染色剂和流式细胞术检测各组细胞凋亡率,Western blot 法检测各组凋亡相关蛋白表达情况。结果 GHSR 存在于正常 H9C2 心肌细胞中,GHSR-siRNA 可以显著抑制 H9C2 心肌细胞中 GHSR 的表达。与 H/R 组相比,在 H/R + G 组中缺氧/复氧损伤所导致心肌细胞的凋亡率明显下降($P < 0.05$)。B 淋巴细胞瘤-2 蛋白/Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2/Bax)比率明显上调($P < 0.05$),含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(caspase-3)表达水平被显著抑制($P < 0.05$)。而与 H/R + G 组相比,H/R + G + G-siRNA 组心肌细胞凋亡率增加($P < 0.05$),Bcl-2/Bax 比率显著下降($P < 0.05$),caspase-3 表达上调($P < 0.05$)。结论 Ghrelin 具有减轻缺氧/复氧所引起的心肌细胞损伤、抑制心肌细胞凋亡的作用。

关键词 H9C2 细胞株;缺氧/复氧损伤;Ghrelin;凋亡

中图分类号 R 322.11; R 845.22

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)08-1058-06

临床上应用的溶栓、经皮冠状动脉介入治疗以及冠状动脉搭桥手术能够有效治疗心肌梗死,再血管化治疗后引起的心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)严重影响患者的预后^[1],因此如何降低 MIRI 已成为心脏病学研究的重点和热点问题。心肌细胞凋亡是心肌缺血再灌注损伤的主要病理改变,长期的心肌细胞凋亡可以导致临床早期心肌舒张功能降低,晚期合并心肌收缩功能障碍及心脏衰竭的形成。因此,减少再灌注期心肌细胞的损伤是减轻 MIRI 的有效途径。Ghre-

lin 是 1999 年首次从胃组织中发现,由 28 个氨基酸组成的脑肠肽,是生长激素促分泌素受体(growth secretagogue receptor, GHSR)的内源性配体^[2]。GHSR 属于 G 蛋白偶联受体家族,以两种亚型的形式存在,即 GHS-R1a 和 GHS-R1b。Ghrelin 及其受体 GHSR 存在于许多器官和组织中,Ghrelin 通过与 GHSR 结合参与了食欲、能量、体重的调节,糖和脂肪的代谢,胃肠、心血管和免疫功能的调节以及细胞的增殖和凋亡等诸多生理作用,并且可以通过 siRNA 干扰阻断 GHSR 的表达,从而影响 Ghrelin 各项生理作用的发挥^[3-4]。Ghrelin 及其受体在人的心脏和血管中都有表达^[5]。在心血管系统中,Ghrelin 可以增加心肌收缩力,改善由心肌梗死引起的心脏衰竭,并且这种心脏保护作用的发挥不依赖于生长激素的释放^[6]。该研究利用 H9C2 心肌细胞株建立心肌细胞缺氧/复氧模型,模拟心肌细胞的缺血再灌注,同时运用 siRNA 技术阻断 GHSR 的表达,观察各实验组心肌细胞凋亡率以及凋亡相关蛋白的表达情况,研究 Ghrelin 预处理对缺氧复氧心肌细胞的保护作用以及对心肌细胞凋亡的抑制作用,为减少心肌细胞缺血再灌注损伤提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料 H9C2 心肌细胞株(中国科学院上海生命科学研究所细胞资源中心);Ghrelin(美国 Phoenixbiotech 公司);胰蛋白酶(中国 Biosharp 公司);DMEM 高糖培养基(美国 Hyclone 公司);DMEM 低糖培养基、Opti-MEM 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司);Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(上海贝博生物技术有限公司);Hoechst 33258 染色试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);GHSR、B 淋巴细胞瘤-2 蛋白(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)及含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(cysteiny aspartate specific proteinase 3, caspase-3)抗体(美国 Cell Signaling Technologies); β -actin、过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG(武汉博士德生物工程有限公司);RIPA 裂解液、BCA 蛋

2015-03-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81202631)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院心血管内科,合肥 230601

²安徽中医药大学药理学教研室,合肥 230032

作者简介:陈莹莹,女,硕士研究生;

吴继雄,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:

wjx8261@163.com

白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、超敏 ECL 化学发光试剂盒(上海碧云天公司); PVDF 膜(美国密理博公司); GHSR-siRNA 和 scramble siRNA(杂乱 siRNA, 即阴性对照组)(广州锐博生物科技有限公司)。GHSR-siRNA 序列如下, 上游引物: 5'-CGTCACGTTGGACCTGGATTTCAGAGAATC CAGGTCCAACGTGACGTTTTT-3', 下游引物: 5'-AATTAACCAACGTGACGTTGGACCTGGATTCTCTGA AATCCAGGTCCAACGTGACGGGCC-3'。

1.2 实验方法

1.2.1 H9C2 心肌细胞的培养 细胞培养基成分是 DMEM、10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素, 置 37 °C、95% 的空气和 5% CO₂ 培养箱中培养。培养 48 h 换液, 以后每 2 d 换液 1 次, 细胞覆盖率达 80% 后用于建立模型。

1.2.2 建立心肌细胞缺氧/复氧模型 利用 0.5% 胎牛血清、低糖 DMEM 培养基在缺氧培养箱(95% N₂ 5% CO₂)、37 °C 下处理 21 h, 然后更换 0.5% 胎牛血清的 DMEM 培养基在常规 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行复氧处理 6 h^[7]。对照组一直在 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在常规 37 °C、5% CO₂ 培养箱下培养。

1.2.3 Ghrelin 预处理 使用 6 孔板接种 H9C2 心肌细胞, 将其在 DMEM 完全培养液(含 10% 胎牛血清)中培养至 70% ~ 80% 汇合, 然后以无血清培养液饥饿培养 24 h。更换已加入了 1 × 10⁻⁶ mol/L 的 Ghrelin 的 DMEM 完全培养基培养 1 h^[8]。Ghrelin 预处理后, 用 PBS 洗涤 3 遍, 更换不含 Ghrelin 的低糖 DMEM 培养基(含 0.5% 胎牛血清)进行心肌细胞缺氧/复氧处理。

1.2.4 实验分组 将培养的细胞随机分成 4 组($n = 8$): 对照组、缺氧/复氧组(H/R 组)、缺氧/复氧 + Ghrelin 预处理组(H/R + G 组)、缺氧/复氧 + Ghrelin + GHSR-siRNA 组(H/R + G + G-siRNA 组, Ghrelin 预处理前予以 siRNA 干扰 GHSR 表达)。

1.2.5 利用 siRNA 干扰 H9C2 心肌细胞中 GHSR 的表达 siRNA 干扰技术被用于沉默 H9C2 心肌细胞中 GHSR 的表达。细胞被接种于 6 孔板中, 用无血清的完全培养基培养 24 h 以后, 按照说明书利用 Lipofectamine 2000 将 GHSR-siRNA 或 scramble siRNA 转染入细胞, 细胞在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。siRNA 的干扰效率由 Western blot 检测, 将细胞随机分成 3 组($n = 8$): 空白对照组、scramble

siRNA 组(阴性对照组)、GHSR-siRNA 组。

1.2.6 Hoechst 33258 染色 根据 Hoechst 33258 染色试剂盒所提供的方法检测各处理组中心肌细胞凋亡情况。荧光显微镜下以紫外光激发, 发出蓝色荧光。观察细胞核, 固缩、浓集、变亮的细胞核认为是凋亡细胞核。每组 5 张不同的玻片上随机选取 5 个高倍视野, 观察凋亡情况。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡情况 根据 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒所提供的方法检测 Ghrelin 对缺氧/复氧损伤的 H9C2 细胞凋亡的调节作用。将处理后的细胞收集上清液中悬浮的细胞, 贴壁的细胞用不含 EDTA 的胰酶消化后, 收集细胞 2 000 r/min 离心 5 min, 弃培养基。用冷 PBS 洗涤细胞 2 次。用 400 μ l 1 × Binding Buffer 悬浮细胞, 浓度大约为 1 × 10⁶ 个/ml。在细胞悬浮液中加入 5 μ l Annexin V-FITC, 轻轻混匀后于 2 ~ 8 °C 避光条件下孵育 5 min。加入 10 μ l PI 后轻轻混匀于 2 ~ 8 °C 避光条件下孵育 5 min。在 1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.8 Western blot 法检测凋亡相关蛋白的表达情况 总蛋白样本提取: 培养的心肌细胞, 每瓶细胞加 400 μ l 含 PMSF 的裂解液, 于冰上裂解 30 min 后于 4 °C 下 13 000 r/min 离心 5 min。将离心后的上清液分装收集放于 -20 °C 保存。采用 BCA 法测定蛋白含量并制作标准曲线。采用 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒配置 10% 分离胶, 每个泳道蛋白上样量为 20 μ g。样本在分离胶中泳动时, 电压为 80 V, 条带进入分离胶, 电压增至 100 V。转膜 2 000 mA 恒流转移 80 min; 转膜结束后, 将 PVDF 膜放入 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h, 之后孵一抗 4 °C 过夜。用 TBST 漂洗后将膜放入稀释后的二抗中, 37 °C 孵育 2 h, 洗膜后用 ECL 试剂盒显影, 将胶片进行扫描, 用凝胶图象处理系统分析结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间进行方差分析, 如方差不齐则进行非参数分析(Kruskal-Wallis H 检验), 并进行 q 检验。

2 结果

2.1 GHSR 在 H9C2 心肌细胞中的表达 Western blot 结果表明, GHSR 存在于正常 H9C2 心肌细胞中, GHSR-siRNA 可以显著抑制 H9C2 心肌细胞中 GHSR 的表达, 而在空白对照组和 scrambled siRNA

组(阴性对照组)中未见明显的抑制作用。见图1。

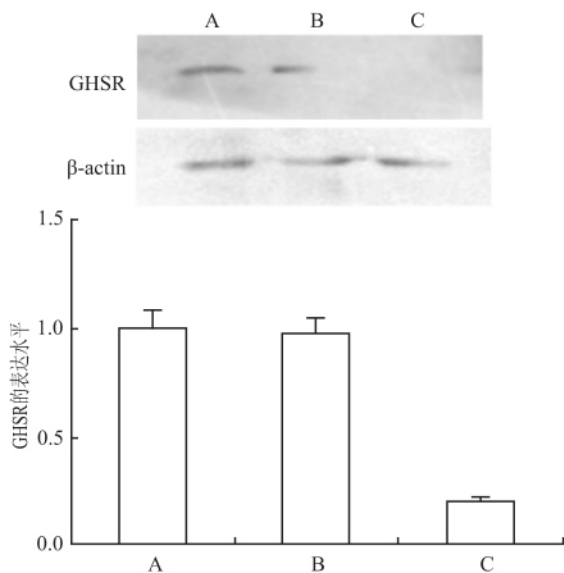


图1 GHSR在H9C2心肌细胞中的表达情况($n=8$)

A: 空白对照组; B: scrambled siRNA 组; C: GHSR-siRNA 组

2.2 Ghrelin 预处理对 H9C2 心肌细胞凋亡的影响

由 Hoechst 33258 染色可见, 对照组细胞核呈弥散均匀暗淡的蓝色荧光; 而 H/R 组可见典型的凋亡细胞核表现, 即细胞核固缩、变亮、变圆、呈蓝白色荧光, 呈现明显的凋亡特征; 而 H/R + G 组凋亡细胞明显减少, H/R + G + G-siRNA 组凋亡细胞较 H/R + G 组增多, 见图2。Annexin V-FITC/PI 检测显示, H/R 组心肌细胞凋亡率显著高于对照组 ($P < 0.05$), H/R + G 组心肌细胞凋亡率显著低于 H/R 组 ($P < 0.05$), 而 H/R + G + G-siRNA 组凋亡率明显高于 H/R + G 组 ($P < 0.05$)。见图3、表1。

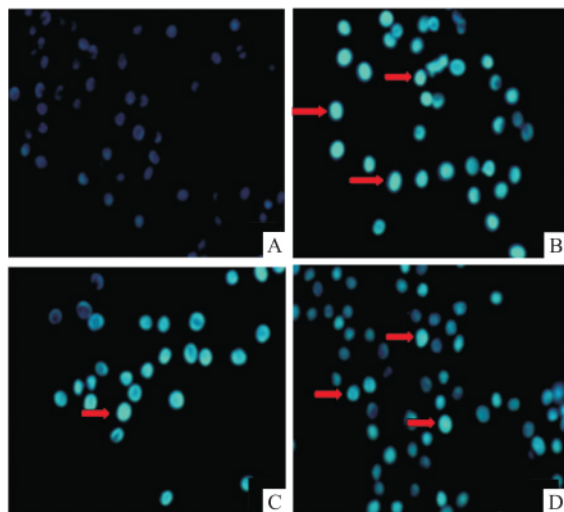


图2 各处理组心肌细胞凋亡情况 Hoechst33258 染色 $\times 400$ ($n=5$)

A: 对照组; B: H/R 组; C: H/R + G 组; D: H/R + G + G-siRNA 组; 凋亡细胞阳性染色定位于细胞核, 荧光下呈亮蓝白色(如箭头所示)

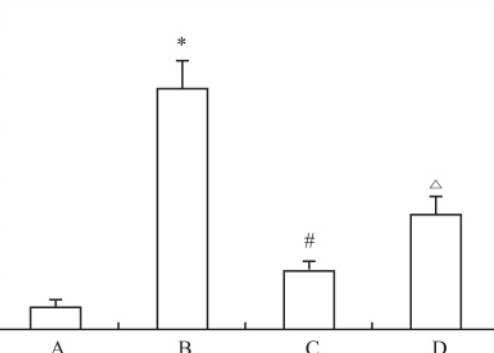
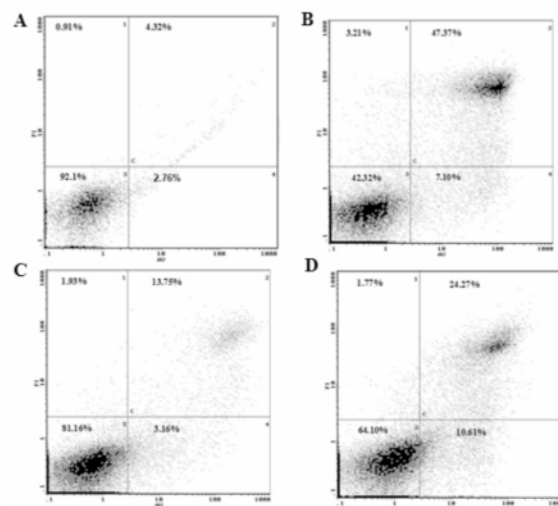


图3 流式细胞仪检测 H9C2 心肌细胞凋亡变化

A: 对照组; B: H/R 组; C: H/R + G 组; D: H/R + G + G-siRNA 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 H/R 组比较: # $P < 0.05$; 与 H/R + G 组比较: $\Delta P < 0.05$

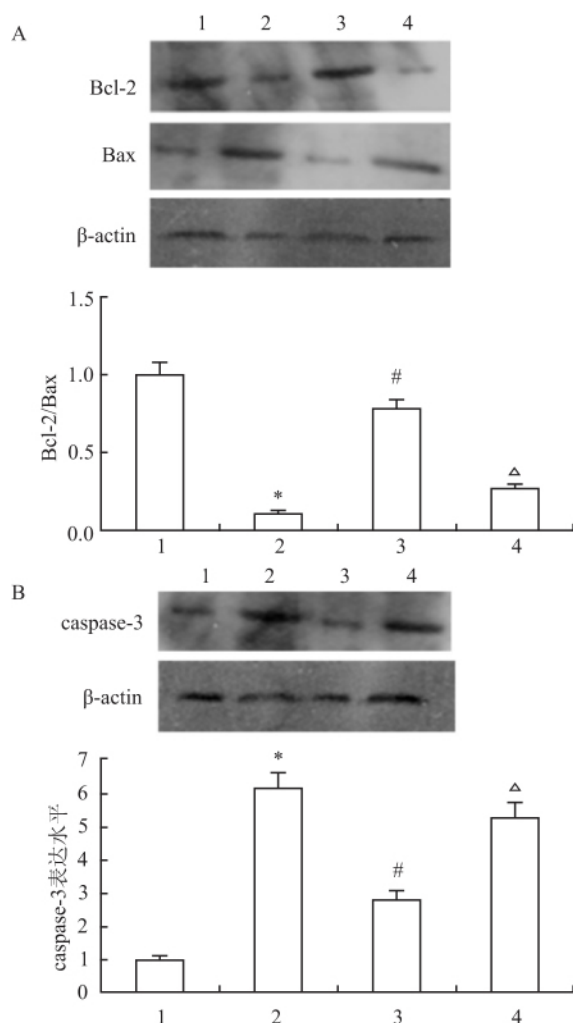
2.3 Ghrelin 预处理对于 H9C2 心肌细胞缺氧/复氧损伤后 Bcl-2 和 Bax 以及 cleaved caspase-3 蛋白表达的影响 H/R 组相对于对照组 Bcl-2 蛋白表达水平显著下降, 而 Bax 蛋白水平显著升高, 所以 Bcl-2/Bax 显著降低 ($P < 0.05$); 而予以 Ghrelin 预处理后, Bcl-2 蛋白表达量显著升高, 同时 Bax 蛋白表达量显著下降, Bcl-2/Bax 也相应上升 ($P < 0.05$)。与 G + H/R 组相比, 用 siRNA 抑制 GHSR 表达可以使得 H/R 后 H9C2 心肌细胞 Bcl-2 蛋白表达水平下降, 而 Bax 蛋白表达水平显著升高, Bcl-2/Bax 相应降低 ($P < 0.05$)。同样, 在 H/R 组中 caspase-3 蛋白表达水平相对于对照组显著升高 ($P < 0.05$), 而这种升高在 H/R + G 组中被显著抑制 ($P < 0.05$), 然而在 H/R + G + G-siRNA 组中 caspase-3 蛋白表达量升高 ($P < 0.05$)。见图4、表1。

3 讨论

本研究探讨了 Ghrelin 对缺氧/复氧干预下的心

表1 各组实验数据的统计检验结果($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	H/R 组	H/R + G 组	H/R + G + G-siRNA 组	χ^2 值	P 值
凋亡率(%) (平均秩次)	4.25 $\pm$ 1.54 (5.50)	46.42 $\pm$ 5.52 (35.50)	11.35 $\pm$ 2.88 (15.50)	22.14 $\pm$ 3.66 (25.50)	36.589	0.000
Bcl-2/Bax (平均秩次)	1.00 $\pm$ 0.02 (35.50)	0.11 $\pm$ 0.01 (5.50)	0.78 $\pm$ 0.06 (25.50)	0.28 $\pm$ 0.02 (15.50)	36.890	0.000
caspase-3 (平均秩次)	1.00 $\pm$ 0.03 (5.50)	6.15 $\pm$ 0.50 (34.65)	2.82 $\pm$ 0.28 (15.50)	5.30 $\pm$ 0.44 (26.35)	35.524	0.000

图4 Western blot 检测凋亡相关蛋白在各组中的表达情况($n=8$)

A: Bcl-2 和 Bax 在各组中的表达水平; B: caspase-3 在各组的表达水平; 1: 对照组; 2: H/R 组; 3: H/R + G 组; 4: H/R + G + G-siRNA 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 H/R 组比较: # $P < 0.05$; 与 H/R + G 组比较: $\Delta P < 0.05$

肌细胞凋亡的阻断作用。结果显示 Ghrelin 的受体 GHSR 存在于正常 H9C2 心肌细胞中,用 siRNA-GHSR 沉默后可以显著抑制 H9C2 心肌细胞中 GHSR 的表达。予以 Ghrelin 预处理可以显著减轻再灌注后心肌细胞的凋亡率,以及抑制复氧促凋亡蛋白 Bax 的表达和 caspase-3 的激活,以及上调凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,继而减少心肌细胞凋亡,具有心肌细胞保护作用。而予以 GHSR-siRNA 沉默 GHSR 的

表达之后 Ghrelin 的这种心肌细胞的保护作用被抑制。

Ghrelin 是 GHSR 的天然内源性配体,同时也最先被认为是生长激素释放的强有力的刺激因素^[2]。本研究证实 GHSR 存在于正常 H9C2 心肌细胞中,表明 Ghrelin 可能通过心肌细胞的 GHSR 发挥着心血管调节作用,这与此前的研究^[9]结果一致。此外,研究^[10]表明 Ghrelin 可以提高慢性心力衰竭大鼠的心输出量、左室射血分数和左室最大压力变化率,以及抑制左室肥大。更有研究发现,Ghrelin 也可以在成年大鼠中抑制有氧化应激刺激引起的心肌细胞凋亡^[11]。

凋亡是一种复杂的有秩序的细胞自主生化过程,是引起心肌缺血再灌注损伤的主要机制和病例特征之一^[12]。细胞凋亡的发生受到细胞内凋亡调节蛋白的调节,这些凋亡调节蛋白分为促凋亡蛋白(如 Bax, Bak)和抗凋亡蛋白(如 Bcl-2, Bcl-xL)两大类。在一系列的刺激或者损伤后促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白的平衡决定着细胞是生存还是出现凋亡的关键^[13]。所以常以 Bax/Bcl-2 的比率来反映细胞的凋亡水平^[14]。含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase)是哺乳动物细胞凋亡的启动者和执行者,其中 caspase-3 是 caspases 级联“瀑布”下游最关键的凋亡蛋白酶,caspase-3 也是细胞凋亡的重要标志物之一^[15]。

本研究中,H/R 组的 H9C2 细胞可见大量细胞核浓缩,呈亮蓝色的凋亡细胞,流式细胞术证实凋亡率约为(46.42 $\pm$ 5.52)%,较对照组和单纯缺氧组明显上升,表明缺氧/复氧损伤模型可以有效地模拟体外缺血再灌注损伤。随即探讨 Ghrelin 是否具有减轻 H9C2 细胞缺氧/复氧损伤的作用。Ghrelin 预处理后,凋亡细胞显著减少,用 GHSR-siRNA 沉默 Ghrelin 受体的表达后,凋亡细胞较 H/R + G 组显著增加,流式细胞术进一步证实相较于 H/R 组,Ghrelin 预处理将心肌细胞缺氧/复氧损伤所导致的凋亡率从(46.42 $\pm$ 5.52)%降低至(11.35 $\pm$ 2.88)%,GHSR-siRNA 沉默 GHSR 的表达后,凋亡率又上升至(22.14 $\pm$ 3.66)%。Western blot 结果表明,Ghre-

lin 预处理后抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著升高、促凋亡蛋白 Bax 表达量降低。Bcl-2/Bax 比例的降低可以促进凋亡蛋白 caspase-3 从线粒体释放,从而启动细胞凋亡程序,所以还可以观察到 Ghrelin 预处理可以引起 caspase-3 蛋白表达量显著减少。此外,GH-SR-siRNA 沉默细胞中 GHSR 的表达,Bcl-2/Bax 蛋白表达量比率显著减少,而 caspase-3 蛋白表达量增加。以上实验结果均表明 Ghrelin 预处理在培养心肌细胞缺氧/复氧损伤中具有显著抗凋亡效应,而予以 GHSR 敲除之后 Ghrelin 的这种抗凋亡作用消失,进一步验证了 Ghrelin 通过与受体 GHSR 结合而发挥心血管保护作用。由于早期的抗凋亡处理可以减少缺血后持续的再灌注所引起的心肌梗死的面积。因此可以得出结论 Ghrelin 通过减少心肌缺血再灌注损伤引起的凋亡而起到心脏保护作用。

参考文献

- [1] Cokkinos D V ,Pantos C. Myocardial protection in man-from research concept to clinical practice[J]. *Heart Fail Rev* 2007 ,12 (3 -4) : 345 -62.
- [2] Kamegai J ,Tamura H ,Shimizu T ,et al. The role of pituitary ghrelin in growth hormone (GH) secretion: GH - releasing hormone - dependent regulation of pituitary ghrelin gene expression and peptide content[J]. *Endocrinology* 2004 ,145(8) : 3731 -8.
- [3] Sato T ,Nakamura Y ,Shiimura Y ,et al. Structure , regulation and function of ghrelin[J]. *J Biochem* 2012 ,151(2) : 119 -28.
- [4] Li B ,Zeng M ,He W ,et al. Ghrelin protects alveolar macrophages against lipopolysaccharide-induced apoptosis through growth hormone secretagogue receptor 1a-dependent c-Jun N-terminal kinase and Wnt/ β -Catenin signaling and suppresses lung inflammation[J]. *Endocrinology* 2015 ,1(1) : 203 -17
- [5] Kleinz M J ,Maguire J J ,Skepper J N ,et al. Functional and immunocytochemical evidence for a role of ghrelin and des-octanoyl ghrelin in the regulation of vascular tone in man[J]. *Cardiovasc Res* 2006 ,69(1) : 227 -35.
- [6] Nagaya N ,Uematsu M ,Kojima M ,et al. Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors[J]. *Circulation* 2001 ,104(17) : 2034 -8.
- [7] Park M ,Youn B ,Zheng X L ,et al. Globular adiponectin , acting via AdipoR1 /APPL1 , protects H9c2 cells from hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis[J]. *PLoS One* 2011 ,6(4) : e19143.
- [8] Baldanzi G ,Filigheddu N ,Cutrupi S ,et al. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT[J]. *J Cell Biol* 2002 ,159 (6) : 1029 -37.
- [9] Papotti M ,Ghè C ,Cassoni P ,et al. Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues[J]. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 ,85(10) : 3803 -7.
- [10] Nagaya N ,Uematsu M ,Kojima M ,et al. Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure[J]. *Circulation* 2001 ,104(12) : 1430 -5.
- [11] Kui L ,Weiwei Z ,Ling L ,et al. Ghrelin inhibits apoptosis induced by high glucose and sodium palmitate in adult rat cardiomyocytes through the PI3K-Akt signaling pathway[J]. *Regul Pept* 2009 ,155(1 -3) : 62 -9.
- [12] Jin Y C ,Kim C W ,Kim Y M ,et al. Cryptotanshinone , a lipophilic compound of *Salvia miltiorrhiza* root , inhibits TNF- α -induced expression of adhesion molecules in HUVEC and attenuates rat myocardial ischemia/reperfusion injury *in vivo* [J]. *Eur J Pharmacol* , 2009 ,614(1 -3) : 91 -7.
- [13] Liao Y H ,Xia N ,Zhou S F ,et al. Interleukin-17A contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating cardiomyocyte apoptosis and neutrophil infiltration[J]. *J Am Coll Cardiol* 2012 ,59(4) : 420 -9.
- [14] Babu P P ,Suzuki G ,Ono Y ,et al. Attenuation of ischemia and/or-reperfusion injury during myocardial infarction using mild hypothermia in rats: an immunohistochemical study of Bcl-2 ,Bax ,Bak and TUNEL[J]. *Pathol Int* 2004 ,54(12) : 896 -903.
- [15] Li Q ,Li Z ,Xu X Y ,et al. Neuroprotective properties of picroside II in a rat model of focal cerebral ischemia[J]. *Int J Mol Sci* 2010 ,11(11) : 4580 -90.

Effect of pretreatment with Ghrelin on hypoxia/reoxygenation injury in H9C2 cells

Chen Yingying¹ ,Wu Jixiong¹ ,Wang liang² ,et al

(¹Dept of Cardiology ,The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230001;

²Dept of Pharmacology ,Anhui University of Chinese Medicine ,Hefei 230032)

Abstract Objective To determine the effect of pretreatment with Ghrelin on hypoxia/reoxygenation (H/R) injury in rat cardiomyocytes. **Methods** Cultured H9C2 cells were randomly divided into 4 groups ,including control group ,H / R group ,H / R + Ghrelin group ,and H / R + Ghrelin + growth secretagogue receptor (GHSR) -siRNA

激肽原酶对大鼠中动脉缺血大鼠 CGRP、RAMP1 及 VEGF 表达的影响

常坤鹏¹, 丁小灵¹, 王取南², 夏新²

摘要 目的 研究激肽原酶预处理对脑缺血大鼠降钙素基因相关肽(CGRP)、受体活性修饰蛋白1(RAMP1)及血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。方法 将80只大鼠随机均分成4组:假手术组(S组)、脑缺血组(I组)、激肽原酶低剂量组(3.75×10^{-3} PNA 单位/(kg·d), I + Kal₁组)、激肽原酶高剂量组(17.25×10^{-3} PNA 单位/(kg·d), I + Kal₂组)。经尾静脉注射给药1周后,采用线栓法堵塞大鼠右侧大脑中动脉,建立右侧大脑中动脉缺血模型。术后24 h 红四氮唑法测量脑梗死体积,使用免疫组化和 Western blot 法观察 CGRP 蛋白在海马组织内的表达及 RAMP1 和 VEGF 蛋白在皮层组织内的表达。结果 与 S 组相比, I 组大鼠脑组织 CGRP、RAMP1 及 VEGF 蛋白水平表达增加($P < 0.01$);与 I 组相比,激肽原酶高、低剂量能明显促进脑缺血大鼠脑组织 CGRP、RAMP1 及 VEGF 蛋白的表达($P < 0.05$),脑梗死体积缩小($P < 0.05$)。结论 激肽原酶促进缺血脑组织内 CGRP、RAMP1 蛋白的表达, CGRP、RAMP1 的表达可能与脑梗死后血管新生有相关性。

关键词 降钙素基因相关肽;受体活性修饰蛋白1;血管内

皮生长因子;激肽原酶;缺血性脑卒中;大鼠

中图分类号 R 743.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)08-1063-05

降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是一个广泛分布于中枢和外周神经系统中的辣椒素敏感感觉神经的重要肽类递质。新近研究^[1]显示, CGRP 还具有显著地促进血管生成的作用,此作用可能与 CGRP 激活了内皮细胞的 AMPK-eNOS 途径有关。CGRP 的生理作用主要通过其受体发挥,而受体活性修饰蛋白1(receptor activity modifying protein 1, RAMP1)通过调节降钙素受体样受体(Calcitonin receptor-like receptor, CRLR)与配体结合,从而决定和调节 CGRP 的受体活性^[2]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种具有内皮细胞特异性的有丝分裂原,随着相关研究的不断深入, VEGF 的表达水平已被作为血管新生能力的标志。该实验采用大鼠右侧大脑中动脉缺血模型,观察不同剂量激肽原酶对大鼠脑缺血后脑梗死体积、VEGF 蛋白及促进血管新生因子 CGRP、RAMP1 表达的影响情况,探讨 CGRP、RAMP1 与缺血性脑卒中后梗死灶周围血管新生的相关性。

2015-03-20 接收

基金项目:安徽省年度重点科研项目(编号:1301043017)

作者单位:¹安徽医科大学附属医院神经内科,合肥 230001

²安徽医科大学公共卫生学院卫生毒理系,合肥 230032

作者简介:常坤鹏,男,硕士研究生;

丁小灵,女,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: mer-ryding@163.com

group. H/R injury was established by 21 hours of hypoxia and subsequent 6 hours of reoxygenation. Expression of growth GHSR in H9C2 cells was reduced by siRNA. Apoptosis of H9C2 cardiomyocytes under different treatments following H/R injury was observed by Hoechst 33258 staining and apoptotic rate was detected by flow-cytometry analysis. Besides, Western blot analysis was performed to detect the expression of the apoptosis related proteins in each group. **Results** GHSR was expressed in H9C2 cells and the expression of GHSR could be significantly knocked down by GHSR-siRNA. Compared with H/R group, in H/R + Ghrelin group the myocardium apoptotic rate was markedly decreased ($P < 0.05$), the Bcl-2/Bax ratio was increased ($P < 0.05$) and the expression of caspase-3 protein was decreased ($P < 0.05$). However, compared with H/R + Ghrelin group, the apoptotic rate was increased ($P < 0.05$), the Bcl-2/Bax ratio was decreased ($P < 0.05$) and the expression of caspase-3 protein was up-regulated ($P < 0.05$) in H/R + Ghrelin + GHSR-siRNA group. **Conclusion** Ghrelin provides concrete protection against H/R injury by inhibiting apoptosis in cardiomyocytes.

Key words H9C2 cells; hypoxia/reoxygenation injury; Ghrelin; apoptosis