

## PUMA 对高糖诱导的大鼠 H9C2 心肌细胞凋亡的作用及机制\*

郭佳<sup>1</sup>, 李志东<sup>2△</sup>, 肖传实<sup>1</sup>, 边云飞<sup>3</sup>

(1. 山西医科大学第一医院高血压科, 太原 030001; 2. 山西医科大学药理学教研室, 太原 030001; 3. 山西医科大学第二医院心内科, 太原 030001)

**【摘要】** 目的: 观察促凋亡蛋白 p53 上调凋亡调控因子(PUMA)在高糖所致 H9C2 心肌细胞凋亡中的作用及机制。方法: H9C2 心肌细胞随机分为对照组(使用 5.5mmol/L 葡萄糖作用于细胞)和高糖组(使用 35 mmol/L 葡萄糖作用于细胞, HG 组)分别刺激 6 h, 12 h, 24 h 和 48 h, 每组设复孔 5 个, TUNEL 染色检测细胞凋亡率; RT-PCR 及 Western blot 法分别测定 PUMA mRNA 及蛋白表达情况; JC-1 法检测线粒体膜电位; Western blot 测定 caspase-3 表达和细胞色素 c (Cyt C) 释放。H9C2 细胞随机分为四组, 对照组、高糖(35 mmol/L)、HG+si-scramble 组(使用 si-scramble 转染心肌细胞 24 h, 使用 35mmol/L 葡萄糖作用于细胞)和 Si-PUMA 组(使用 si-PUMA 转染心肌细胞 24 h, 使用 35mmol/L 葡萄糖作用于细胞), 观察抑制 PUMA 表达对高糖诱导细胞凋亡率、线粒体膜电位、Cyt C 的影响。结果: 与对照组相比, 高糖刺激心肌细胞组 TUNEL 染色阳性率、活化 caspase-3 和 PUMA 表达明显升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 细胞损伤和 PUMA 表达增高具有时间依赖性, 其中高糖 24 h 组和 48 h 细胞凋亡率和 PUMA 表达差异无统计学意义, 后续实验采用高糖刺激 24 h 作为作用时间。与高糖组相比, HG+si-PUMA 组 PUMA 表达抑制、线粒体膜电位恢复、Cyt C 释放减少、心肌细胞凋亡减少( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); HG+si-Scramble 组与高糖组相比, PUMA 表达、线粒体膜电位、Cyt C 释放、心肌细胞凋亡均无显著性差异( $P > 0.05$ )。结论: PUMA 介导高糖所致的大鼠心肌细胞凋亡, 提示 PUMA 可能是糖尿病心肌病治疗的一个重要的靶基因。

**【关键词】** 促凋亡蛋白 p53 上调凋亡调控因子; 高糖; 心肌细胞; 细胞培养; 凋亡; 细胞色素 C

**【中图分类号】** R542.2+2

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1000-6834(2024)01-120-006

**【DOI】** 10.12047/j.cjap.6338.2022.094

## Effects of PUMA knockout on the apoptosis of H9C2 cardiomyocytes induced by high glucose

GUO Jia<sup>1</sup>, LI Zhi-dong<sup>2△</sup>, XIAO Chuan-shi<sup>1</sup>, BIAN Yun-fei<sup>3</sup>

(1. Center for Hypertension Care, Shanxi Medical University First Hospital, Taiyuan 030001; 2. Department of Pharmacology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001; 3. Department of Cardiology, Shanxi Medical University Second Hospital, Taiyuan 030001, China)

**【ABSTRACT】 Objective:** To investigate the effects of p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) on the apoptosis of H9C2 cardiomyocytes induced by high glucose and its mechanisms. **Methods:** H9C2 cardiomyocytes were treated with 5.5mmol/L (control group) or 35 mmol/L glucose (HG group) for 6 h, 12 h, 24 h or 48 h respectively to induce apoptosis, each group sets 5 multiple wells. Apoptosis was tested by TUNEL assay. PUMA mRNA was measured by RT-PCR and protein expression was measured by Western blot assay. The mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 method. The expressions of cleaved caspase-3 and cytochrome C (Cyt C) protein in mitochondria and cytoplasm were determined by Western blot assay. H9C2 cardiomyocytes were randomly divided into four groups, control group (5.5 mmol/L), HG (35 mmol/L) group, HG+si-scramble group (si-scramble treatment for 24 h, then 35 mmol/L high glucose treatment for 24 h) and HG-si-PUMA group (si-PUMA treatment for 24 h, then 35mmol/L high glucose treatment for 24 h). Si-PUMA was transfected into cardiomyocytes and the effects of PUMA on high glucose-induced apoptosis were studied. **Results:** Compared with the control group, high glucose increased cardiomyocyte apoptosis and enhanced PUMA mRNA and protein expressions significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Cell injury and increased PUMA expression were time-dependent and there was no significant difference between the high glucose 24 h group and the high glucose 48h group. The following experiment used high glucose 24 h as the stimulation time. The cardiomyocytes transfected with si-PUMA to inhibit PUMA expression had decreased apoptotic rate and cleaved caspase-3, increased mitochondria membrane potential and decreased Cyt C release ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). There were no significant differences between the HG+si-scramble group and the high glucose group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** PUMA mediates high glucose-induced cardiomyocyte apoptosis suggesting PUMA may be an important target gene of diabetic cardiomyopathy.

**【KEY WORDS】** p53 upregulated modulator of apoptosis; high glucose; cardiomyocyte; cell culture; apoptosis; cytochrome C

全球糖尿病的发病率急剧攀升,我国糖尿病发病率居世界首位,其心血管并发症发病早、病情重、进展快,致死致残率高,是现今严重影响人民生活质量的疾病之一。其中糖尿病心脏病发病隐匿,以心力衰竭为主要表现,是糖尿病的重要并发症之一<sup>[1]</sup>。研究表明其分子机制可能与心肌细胞凋亡致心肌细胞纤维化有关<sup>[2]</sup>。凋亡的异常增加恶化高糖所致的细胞损伤,因此降低高糖所致的心肌细胞凋亡对糖尿病心脏病的治疗具有非常重要的意义。

促凋亡蛋白 p53 上调凋亡调控因子 (p53 up-regulated modulator of apoptosis, PUMA) 基因是近年发现的 Bcl-2 家族中 BH3-only 促凋亡蛋白亚家族成员<sup>[3,4]</sup>, 可以通过 p53 依赖途径和非 p53 依赖途径被迅速激活, 具有强大的促凋亡活性<sup>[5,6]</sup>。Toth 等研究发现, PUMA 对心肌缺血/再灌注诱导的细胞凋亡至关重要<sup>[7]</sup>, 付等证实 PUMA 介导大鼠缺氧/复氧心肌细胞凋亡<sup>[8]</sup>。并且研究发现, PUMA 可以抑制所有 Bcl-2 抗凋亡蛋白, 激活 Bax/Bak, 是公认的线粒体凋亡途径中的关键蛋白<sup>[9,10]</sup>。除线粒体凋亡途径外, Hong, Nickson 等证实 PUMA 也是内质网应激导致细胞凋亡的重要因子<sup>[11,12]</sup>。鉴于糖尿病患者心肌组织长期缺血缺氧存在内质网应激和线粒体凋亡途径激活状态, 探讨 PUMA 是否为介导高糖所致的心肌凋亡的关键因子尤为重要。

既往对 PUMA 的研究虽然取得重大进展, 但研究多数集中在肿瘤细胞凋亡机制及治疗方面, PUMA 在糖尿病引起的细胞凋亡方面的作用国内外至今未见报道。为明确 PUMA 是否介导高糖所致的细胞凋亡, 本文通过抑制 PUMA 表达观察其对心肌细胞凋亡的影响, 从而为糖尿病心脏病发现新的治疗方法。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

MTT 试剂盒购自 sigma-Aldrich 公司, si-PUMA 购自上海吉玛公司; lipofectamin 2000 购买于 Invitrogen 公司; PUMA 抗体、细胞色素 C (cytochrome C, Cyt C) 抗体、活化 caspase-3 和二抗均购自 Abcam 公司; si-PUMA 购自上海吉玛公司; TUNEL 染色剂购自罗氏; Hoechst33258 购自 Sigma-Aldrich 公司; 流式

细胞仪 (BD Biosciences); 流式试剂盒购自晶美生物公司; 线粒体膜电位染色剂购自凯基生物公司。倒置显微镜 (Nikon TS100); 激光扫描共焦显微镜 (Olympus FV1000)。

### 1.2 H9C2 心肌细胞培养

H9C2 心肌细胞株为本实验室保存, 用 0.25% 胰酶消化, 调整至细胞悬液 (细胞密度为  $2 \times 10^8$  cells/L), 然后接种于六孔板上, 每孔 2 ml, 12 h 后进行试验干预。分为 5 组, 每组设置 3 个复孔: 正常对照组 (葡萄糖 5.5 mmol/L); 高糖组 (葡萄糖 35 mmol/L); 高糖分别处理 6 h、12 h、24 h、48 h, 检测心肌细胞凋亡。为检测 PUMA 对高糖所致心肌细胞凋亡的影响, H9C2 心肌细胞随机分为正常对照组 (葡萄糖 5.5 mmol/L)、高糖组 (葡萄糖 35 mmol/L)、高糖 + si-scramble 组 (使用 si-scramble 转染心肌细胞 24 h, 使用 35 mmol/L 葡萄糖作用于细胞) 和高糖 + si-PUMA 组 (使用 si-PUMA 转染心肌细胞 24 h, 使用 35 mmol/L 葡萄糖作用于细胞), PUMA 转染心肌细胞 24 h 后, 高糖组给予高糖处理 24 h, 流式细胞术检测心肌细胞转染效率, MTT 法检测细胞活力, RT-PCR 法和 Western blot 法检测 PUMA mRNA 和蛋白表达情况。

### 1.3 细胞活力检测

按照试剂盒说明书操作, 收集对数期细胞, 调整细胞悬液浓度接种于 96 孔板至细胞单层铺满孔底, 每组设 5 个复孔, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 孵育 48 h 后, 吸出培养液, 每孔加入 20 μl MTT (5 mg/ml) 溶液, 继续培养 4 h; 酶标仪在 490 nm 波长处检测每孔的光密度。

### 1.4 TUNEL 法检测细胞凋亡

给予各组细胞指定的处理, 收集细胞, 固定、含 0.1% TritonX-100 的 PBS 处理细胞, PBS 液反复漂洗; 根据说明书在避光条件下 37°C 孵育箱内心肌细胞与 TUNEL 试剂共孵育 30 min 后, 再予 DAPI 试剂共孵育 5 min。荧光染色的心肌细胞采用激光扫描共聚焦显微镜 (LSCM) 观察, 发生凋亡的核呈现绿色荧光。计数 10 个随机视野范围内的凋亡细胞数, 与所选计数范围内心肌细胞数的比值即为凋亡率。

### 1.5 RT-PCR 检测 mRNA 表达

收集六孔板里的心肌细胞, 按照说明书按步骤加入 Trizol 试剂, 提取心肌细胞总 RNA, 检测提取的细胞 RNA 浓度及纯度, 取 1 μg 总 RNA 使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录合成 cDNA, 引物序列: GAPDH: 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3', 5'-TCCAC-CACCCTGTTGCTGTA-3'; 3'-ATGT CGTTGTCAC-CACCT-5', PUMA: 5'-ACCAGCCCAGCAGCACCTA-

\*【基金项目】国家自然科学基金青年基金 (81600256); 中央引导地方基金 (晋财教 [2020]165 号); 山西省回国留学人员科研资助项目 (晋留管办 2021-159)

【收稿日期】2022-06-28 【修回日期】2022-09-28

△【通讯作者】Tel: 0351-4962225; E-mail: lee2991@163.com

3', 3'-TGCTCGCCGCCTCTGTT-5'。应用 SYBR Green 荧光染料法,对目的基因和 GAPDH 进行扩增。

### 1.6 Western blot 检测蛋白表达

首先提取总蛋白;各组细胞按指定要求处置后提取细胞,加入裂解液裂解细胞 2 h,低温 13 000 r/min 离心后分离上清液采用 BCA 蛋白浓度检测法定量蛋白含量,样品经 SDS-PAGE 分离、转膜、封闭 2 h,分别依次加入一抗过夜和二抗 2 h,ECL 显色曝光显影定影,凝胶分析系统分析处理。胞浆和线粒体 Cyt C 分别用胞浆和线粒体蛋白提取试剂盒根据试剂盒说明书提取胞浆和线粒体蛋白,余步骤相同。

### 1.7 大鼠心肌细胞转染

根据 Genbank 中大鼠 PUMA cDNA 序列 (AY157758.1),设计合成 PUMA-siRNA。转染前一天消化并接种细胞,细胞铺板转染时密度为 90% 左右;低血清无抗生素培养基稀释质粒;用低血清的 DMEM 培养基稀释 Invitrogen 阳离子转染试剂 Lipofectamine™ 2000;按合适的体积比例 (control、100:4、125:5、150:6、175:7.5)混合经过稀释的 Lipofectamine™ 2000 和 DNA,以获取最大的转染效率。混合液在室温下静置 20 min,将细胞在孵箱中孵育 24 h 后待用。

### 1.8 流式细胞术检测转染效率

H9C2 心肌细胞转染 PUMA-siRNA 和 scramble-siRNA 后,胰酶消化、收集细胞、1×PBS 漂洗 3 次,加入 PBS 制成悬液,使用 BDFACSDiVa™ 软件 (BD Biosciences) 在 LSRII Fortessa 流式细胞仪进行上样检测转染有 FITC 荧光标记质粒的细胞和未标记的细胞,激发波长 488 nm,荧光波长 495 nm,转染效率=绿色荧光细胞/总细胞数×100%,重复 3 次。

### 1.9 线粒体膜电位测定

培养 H9C2 心肌细胞,给予不同的处理,收集心肌细胞,加入 JC-1 溶液 (10 mg/L),孵育 15 min,清洗、重悬细胞,荧光显微镜下正常细胞线粒体发射红

色荧光,而凋亡细胞红色荧光减弱,绿色荧光增强。Image J 图像软件分析 5 个视野下绿色/红色荧光强度比值,即为心肌细胞去极化程度。

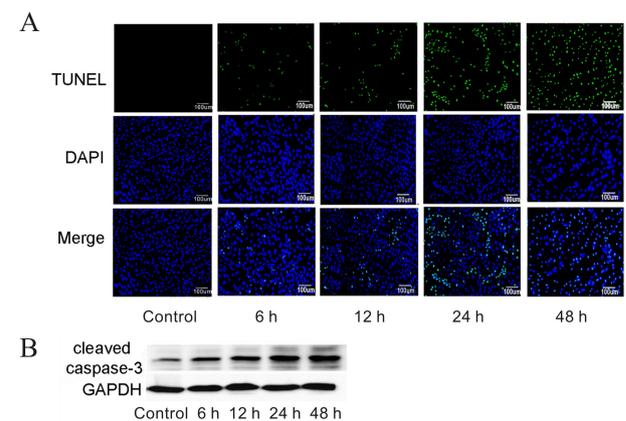
### 1.10 统计学处理

数据以均值±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示,SPSS 20.0 进行数据分析,计数资料正态性检验,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析,单因素方差分析基础上采用 LSD 检验。

## 2 结果

### 2.1 高糖处理对 H9C2 心肌细胞凋亡率的影响

采用高糖分别刺激 H9C2 心肌细胞 6 h,12 h,24 h 和 48 h,高糖刺激 6 h,12 h,24 h 和 48 h 组细胞存活率较对照组明显下降 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ,图 1A,B),TUNEL 染色显示高糖刺激 6 h,12 h,24 h 和 48 h 心肌细胞凋亡率与对照组相比明显升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ,图 1A,表 1),24 h 和 48 h 组凋亡率无统计学差异 ( $P>0.05$ )。高糖处理后 Cleaved caspase-3 较对照组明显升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ,图 1B,表 1),提示高糖诱导 H9C2 细胞凋亡。



**Fig. 1** High glucose induced H9C2 cell apoptosis ( $n=3$ )

H9C2 cells were treated with or without high glucose for indicated intervals

A: TUNEL assay; B: cleaved caspase-3

**Tab. 1** High glucose increased the expression of PUMA and cell apoptosis ( $\bar{x}\pm s$ )

Group	Cell viability ( $n=5$ )	Tunel positive cells (%) ( $n=3$ )	cleaved-caspase-3 ( $n=3$ )	PUMA mRNA ( $n=3$ )	PUMA protein ( $n=3$ )
Control	1	2.70±2.89	0.21±0.04	1	0.19±0.06
6 h	0.96±0.02*	13.50±5.60*	0.30±0.03*	1.17±0.08*	0.34±0.06*
12 h	0.90±0.03**	20.87±8.17*	0.45±0.10*	1.42±0.13*	0.50±0.12*
24 h	0.77±0.04**	34.33±10.02**	0.86±0.10**	2.02±0.29**	0.83±0.11**
48 h	0.55±0.04**	38.33±9.04**	0.87±0.15**	2.01±0.17**	0.86±0.13**

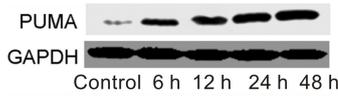
\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control group

### 2.2 高糖对 H9C2 细胞 PUMA mRNA 和蛋白表达的影响

细胞给予高糖处理 6 h,12 h,24 h,48 h,观察 PUMA mRNA 和蛋白表达情况,RT-PCR 结果显示,

与对照组相比,高糖处理 6 h,12 h,24 h,48 h 细胞 PUMA mRNA 表达水平持续升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ,图 2,表 1)。与对照组相比,高糖处理 6 h,12 h,24 h,48 h 细胞 PUMA 蛋白表达持续升高 ( $P<$

0.05,  $P < 0.01$ , 图 2, 表 1), 24 h 与 48 h 高糖组 PUMA mRNA 和蛋白表达水平均无显著性差异 ( $P > 0.05$ , 图 2, 表 1)。因此, 后续实验采用的高糖刺激时间为 24 h。



**Fig. 2** High glucose increased the expression levels of PUMA in H9C2 cells ( $n=3$ )

**2.3 流式细胞仪检测不同转染条件下的转染效率**

将 PUMA 特异性 siRNA (PUMA-siRNA) 及对照组 siRNA (scramble-siRNA) 转染心肌细胞, 流式细胞仪检测不同转染条件下的 si-PUMA 转染效率, 为下一步探讨 PUMA 对心肌细胞高糖所致凋亡的影响奠定实验基础。流式细胞术结果显示: control 组、100 : 4、125 : 5、150 : 6、175 : 7.5 组转染率分别为 (%) :  $0.22 \pm 0.16$ 、 $37.20 \pm 6.46$ 、 $42.40 \pm 10.11$ 、 $79.20 \pm 3.96$ 、 $60.80 \pm 11.28$ , 当 siRNA 与 Lipo 2000 的比例为 150 : 6 时转染效率最高, 比例为 175 : 7.5 转染效率降低, 故在细胞转染实验中将选择 siRNA 与 Lipo 2000 的比例为 150 : 6。

**2.4 转染后心肌细胞的活性检测**

Si-scramble 转染组 ( $0.99 \pm 0.01$ ) 和 si-PUMA 转

**Tab. 2** The effect of si-PUMA transfection on H9C2 cells subjected to HG ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Group	PUMA mRNA	PUMA protein	Apoptosis cells (%)	Cleaved-caspase-3
Control	1	$0.31 \pm 0.70$	$1.30 \pm 1.05$	$0.51 \pm 0.11$
HG	$1.97 \pm 0.30^{**}$	$0.95 \pm 0.06^{**}$	$37.00 \pm 7.56^{**}$	$0.83 \pm 0.09^*$
HG+si-scramble	$2.02 \pm 0.29^{**}$	$0.97 \pm 0.07^{**}$	$36.00 \pm 9.16^{**}$	$0.79 \pm 0.10^*$
HG+si-PUMA	$1.32 \pm 0.21^{##}$	$0.36 \pm 0.07^{###}$	$10.87 \pm 4.73^{###}$	$0.50 \pm 0.10^{\#}$

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$ , ### $P < 0.01$  vs HG group

**2.6 si-PUMA 转染对高糖刺激 H9C2 心肌细胞细胞凋亡率的影响**

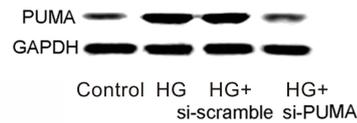
采用特异性干扰心肌细胞 PUMA 表达后, HG+si-PUMA 组细胞凋亡率与高糖组相比, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), HG+si-scramble 组凋亡率与高糖组相比无显著性差异 ( $P > 0.05$ , 图 4A, 表 2)。与高糖组相比, HG+si-PUMA 组 Cleaved caspase-3 蛋白表达明显下降 ( $P < 0.05$ ), 而 HG+si-scramble 组与高糖组相比无显著性差异 ( $P > 0.05$ , 图 4B, 表 2), 提示 si-PUMA 转染敲除 PUMA 表达可降低高糖所致的凋亡。

染组 ( $0.97 \pm 0.04$ ) 的 H9C2 心肌细胞生长情况与对照组相比无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 转染对细胞生长无明显影响及毒性。

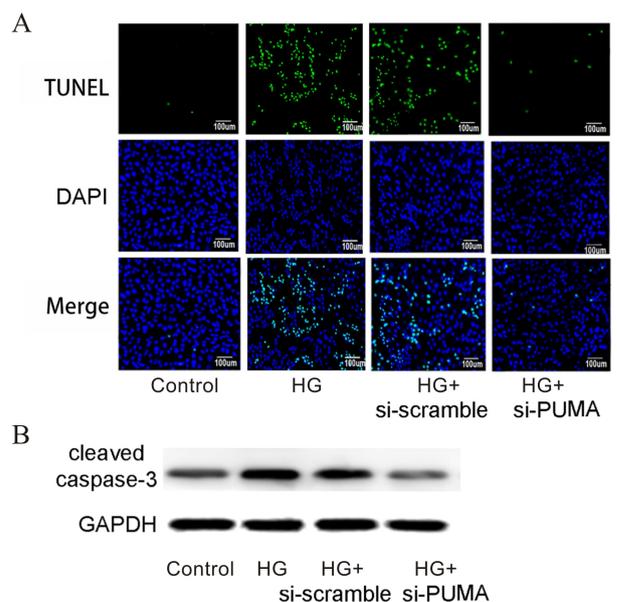
**2.5 si-PUMA 转染对 H9C2 心肌细胞高糖刺激 PUMA mRNA 和蛋白表达的影响**

为进一步探讨 PUMA 对高糖诱导凋亡的影响, 分别将 si-PUMA 和 si-scramble 转染细胞, RT-PCR 结果显示: HG 处理显著增加 PUMA mRNA 表达 ( $P < 0.01$ ), HG+si-PUMA 组细胞 PUMA mRNA 表达明显减少 ( $P < 0.01$ ), si-scramble 转染对 PUMA mRNA 表达无明显影响 ( $P > 0.05$ , 表 2)。

Western blot 结果显示, HG 处理显著增加 PUMA 蛋白表达 ( $P < 0.01$ ), si-PUMA 转染细胞明显抑制 HG 诱导的 PUMA 蛋白表达 ( $P < 0.01$ ), si-scramble 对 PUMA 蛋白表达无明显影响 ( $P > 0.05$ , 图 3, 表 2), 提示 si-PUMA 转染有效抑制 PUMA mRNA 和蛋白的表达。



**Fig. 3** The expressions of PUMA after transfected with si-PUMA in H9C2 cells ( $n=3$ )



**Fig. 4** PUMA knockout decreased H9C2 cells apoptosis induced by high glucose ( $n=3$ )

## 2.7 PUMA 敲除对高糖刺激 H9C2 心肌细胞线粒体膜电位的影响

与对照组相比, HG 组及 HG+si-scramble 组绿色/红色荧光比值显著增加( $P<0.05$ )。与 HG 组相比, HG+si-PUMA 组绿色/红色荧光比值明显降低( $P<0.05$ ), 而 HG+si-scramble 组与 HG 组相比无明显变化( $P>0.05$ , 图 5, 表 3), 提示 si-PUMA 转染敲除 PUMA 表达可显著减少高糖诱导的线粒体膜电位变化。

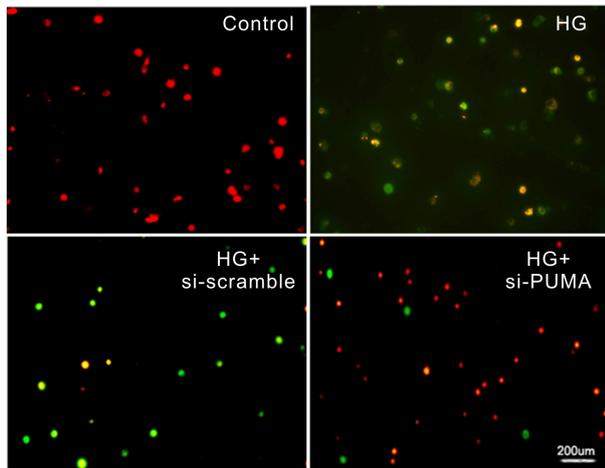


Fig. 5 PUMA knockout decreased the mitochondrial membrane potential of H9C2 cells induced by high glucose ( $n=3$ )

Tab. 3 The effect of si-PUMA on the mitochondrial membrane potential and Cyt C ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

Group	Ratio of fluorescence intensity	Mitochondria cyt C/GAPDH	Cytoplasm cyt C/GAPDH
Control	1.01±0.02	0.84±0.07	0.22±0.08
HG	1.46±0.17*	0.51±0.10**	0.45±0.11*
HG+si-scramble	1.43±0.08*	0.57±0.08**	0.44±0.08*
HG+si-PUMA	1.10±0.06#	0.79±0.11#	0.23±0.05#

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control group; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  vs HG group

## 2.8 si-PUMA 转染对高糖刺激 H9C2 心肌细胞线粒体 Cyt C 释放的影响

与对照组相比, HG 组及 HG+si-scramble 组线粒体中 Cyt C 蛋白表达明显降低, 胞浆中 Cyt C 明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 与 HG 组相比, HG+si-PUMA 组线粒体中 Cyt C 蛋白水平明显升高, 胞浆中 Cyt C 蛋白明显减低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 而 HG+si-scramble 组线粒体 Cyt C 和胞浆中 Cyt C 与高糖组相比均无明显变化( $P>0.05$ , 图 6, 表 3)。

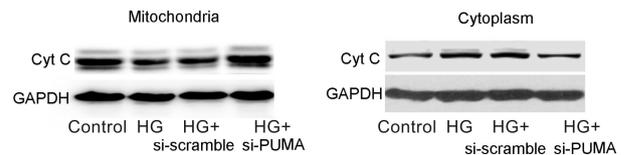


Fig. 6 PUMA knockout inhibited the release of Cyt C in H9C2 cells induced by high glucose ( $n=3$ )

## 3 讨论

糖尿病心脏损伤是糖尿病的最严重并发症之一, 是多种因素如胰岛素抵抗、细胞凋亡、炎症因子、微血管病变、内皮功能紊乱等共同参与的病理过程, Dillmann 和潘等证实凋亡是造成糖尿病心功能障碍的关键原因, 抑制凋亡可能是糖尿病心肌病治疗的新的靶点<sup>[13-15]</sup>。Bcl-2 家族是细胞死亡调节因子, 包括促生存成员, 如 Bcl-2 和 Bcl-XL, 以及促凋亡成员 Bax 和 BH3。PUMA 是新近发现的 Bcl-2 家族中仅含 BH3 结构域的一员, 定位于 19q31。与其他的仅含 BH3 的蛋白如 Bad 和 Noxa 不同, 它们只能选择性的结合其中的一些抗凋亡蛋白质, 而 PUMA 的 BH3 结构域能够结合所有的抗凋亡蛋白, 介导多种应激条件下的凋亡反应, 包括 DNA 损伤、癌基因激活、炎症和病毒感染, 目前是最全面和最强的仅含 BH3 结构域的促凋亡蛋白<sup>[16]</sup>。然而自 2001 年发现 PUMA 及其促凋亡作用以来, 对 PUMA 的研究多集中于 PUMA 与肿瘤的相关性研究<sup>[17,18]</sup>, 而对其促凋亡作用引起的过度凋亡性疾病研究较少。本实验培养 H9C2 细胞, 给予高糖处理模型, 探讨 PUMA 的作用及机制。图 1 结果显示分别给予高糖刺激心肌细胞 6 h、12 h、24 h、48 h 均可诱导细胞凋亡, 同时发现高糖导致 PUMA mRNA 及蛋白表达显著升高(图 2), 证实高糖刺激可诱导 PUMA mRNA 及蛋白表达, 促进凋亡发生。

糖尿病诱导心肌细胞凋亡, 为进一步探讨 PUMA 在此过程的作用机制, 拟构建 PUMA 基因 RNAi 将 PUMA-siRNA 转染 H9C2 心肌细胞, 抑制 PUMA 表达, 采用流式细胞术结合 Western blot 方法筛选及优化 PUMA 的 siRNA 转染条件。图 3 结果显示 si-PUMA 的最佳转染条件为 150 : 6, 故后续实验将采用 150 : 6 为转染浓度。图 4 结果表明, 与高糖处理组比较, si-PUMA 组 PUMA mRNA 及蛋白表达明显抑制, 转染阴性对照 si-scramble 组 PUMA mRNA 及蛋白表达与高糖组均无统计学差异, 证实 si-PUMA 为有效干扰质粒, 可高效特异抑制高糖诱导的 PUMA 表达, 从而为进一步探讨 PUMA 的作用及机制奠定实验基础。图 5A, 5B TUNEL 染色示 si-PUMA

组凋亡率较高糖组明显降低,caspase-3 活化较高糖组明显减少,提示 PUMA 表达抑制可减轻高糖诱导的细胞凋亡,PUMA 是链接高糖和心肌细胞凋亡的重要途径。

PUMA 可被多种病理条件激活,通过两种途径增强心肌细胞凋亡,即典型的 p53 依赖途径,射线、DNA 损伤、缺氧和 NO 所致的凋亡是经该途径活化<sup>[19]</sup>;以及非 p53 依赖途径,血清饥饿、撤除生长因子等则是通过该途径激活<sup>[20]</sup>。Bcl-2 家族通过线粒体凋亡途径参与控制细胞凋亡,通过整合细胞环境调节该家族中互相竞争的抗凋亡 Bcl-2 家族(Bcl-2、Bcl-xL、MCL-1)和促凋亡的 BH3 蛋白,仅含 BH3 结构域蛋白在此起到很重要的作用。PUMA 的 BH3 结构域主动隔离 Bcl-2 家族中的所有抗凋亡成员、激活 Bax 活性诱导线粒体外膜通透性、释放细胞色素 C,启动细胞死亡级联反应,是线粒体凋亡途径的关键因子。2 型糖尿病患者高浓度血糖可以导致心肌细胞线粒体功能障碍,诱导心肌细胞凋亡,并进一步致使心脏功能障碍。近年来关于糖尿病心肌病与心肌细胞凋亡的报道逐渐增多,线粒体凋亡通路激活是其发生的重要机制。PUMA 是线粒体外膜通透性的重要调节因子,是凋亡的重要启动子。图 1 显示高糖诱导凋亡,阻遏 PUMA 表达使得高糖处理的 H9C2 心肌细胞线粒体膜电位明显升高,线粒体 Cyt C 释放明显减少。

综上所述,高糖诱导心肌细胞凋亡,抑制 PUMA 表达可以减轻心肌细胞凋亡,可能通过升高线粒体膜电位,抑制线粒体 Cyt C 释放,减少 Caspase-3 活化,从而阻止糖尿病心肌病恶化有关。

## 【参考文献】

- [1] Lee MMY, McMurray JIV, Lorenzo-Almorós A, et al. Diabetic cardiomyopathy [J]. *Heart*, 2019, 105 (4): 337-345.
- [2] 潘孙雷, 林辉, 骆杭琪, 等. 黄酒多酚对糖尿病心肌病大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2017, 33(5): 431-435.
- [3] Yu J, Zhang L, Hwang PM, et al. Puma induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells[J]. *J Mol Cell*, 2001, 7(3): 673-682.
- [4] Nakano K, Vousden KH. Puma, a novel proapoptotic gene, is induced by p53[J]. *J Mol Cell*, 2001, 7(3): 683-694.
- [5] Hikisz P, Kilianska ZM. PUMA, a critical mediator of cell death--one decade on from its discovery [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2012, 17(4): 646-669.
- [6] Jang Y, Kim J, Ko JW, et al. Homocysteine induces PUMA-mediated mitochondrial apoptosis in SH-SY5Y cells[J]. *Amino Acids*, 2016, 48(11): 2559-2569.
- [7] Toth A, Jeffers J, Nickson P, et al. Targeted deletion of puma. Attenuates cardiomyocyte death and improves cardiac function during ischemia/reperfusion [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291: 52-60.
- [8] 付晶晶, 段荣, 李红, 等. PUMA 介导大鼠缺氧/复氧心肌细胞凋亡的研究[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(3): 312-316.
- [9] Yang FY, Zhang L, Zheng Y, et al. Dexmedetomidine attenuates ischemia and reperfusion-induced cardiomyocyte injury through p53 and forkhead box O3a (FOXO3a)/p53-upregulated modulator of apoptosis (PUMA) signaling signaling[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1): 1377-1387.
- [10] Wang J, Thomas HR, Li Z, et al. Puma, noxa, p53, and p63 differentially mediate stress pathway induced apoptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(7): 659-659.
- [11] Hong SH, Lee DH, Lee YS, et al. Molecular crosstalk between ferroptosis and apoptosis: emerging role of ER stress-induced p53-independent PUMA expression [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(70): 115164-115178.
- [12] Nickson P, Toth A, Erhardt P. PUMA is critical for neonatal cardiomyocyte apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress[J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 73(1): 48-56.
- [13] Dillmann WH. Diabetic cardiomyopathy [J]. *Circ Res*, 2019, 124(8): 1160-1162.
- [14] 潘文强, 王书凡, 丁伯平, 等. 格列齐特对糖尿病大鼠心肌的保护作用及其机制[J]. *中国应用生理学杂志*, 2020, 36(5): 402-407.
- [15] 扈敬, 李法东, 邵小婷, 等. 精胺对高糖引起的大鼠心肌纤维化的影响及其机制[J]. *中国应用生理学杂志*, 2020, 36(3): 193-196.
- [16] Yu J, Zhang L. PUMA, a potent killer with or without p53[J]. *Oncogene*, 2008, 27(suppl 1): S71-S83.
- [17] Dang Y, Zhang Y, Xu L, et al. PUMA-mediated epithelial cell apoptosis promotes Helicobacter pylori infection-mediated gastritis[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 139-139.
- [18] Luo L, Liu H, Xi Q. Trastuzumab induces PUMA-dependent apoptosis and inhibits tumor growth in gastric cancer[J]. *FEBS Open Bio*, 2018, 8(12): 1911-1919.
- [19] 黄颖, 王丽晖, 吉明. PUMA 通过线粒体途径诱导骨肉瘤细胞凋亡的研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(5): 746-750.
- [20] 周长辉, 关方霞, 常建辉, 等. PUMA 作为细胞保护和肿瘤治疗靶点的研究进展[J]. *生命科学*, 2009, 9: 556-560.