

橙皮素对脂多糖诱导 H9C2 心肌细胞活性氧水平的影响

邓 伟 刘 源 陈昌贵 魏 丽 唐其柱

摘 要 **目的** 探讨橙皮素对脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)诱导 H9C2 心肌细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平的影响。**方法** 使用不同浓度橙皮素(0.0625、0.125、0.25 $\mu\text{mol/L}$)和 LPS(1 $\mu\text{g/ml}$)共同孵育 H9C2 心肌细胞 120min,DCFH-DA 探针检测 H9C2 细胞 ROS 水平,荧光显微镜定性观察以及流式细胞仪定量检测各组细胞荧光强度,以观察不同浓度橙皮素对 LPS 诱导 H9C2 心肌细胞产生 ROS 的影响。选择 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 橙皮素和 LPS(1 $\mu\text{g/ml}$)共同孵育 H9C2 心肌细胞 30、60、120min,观察橙皮素对 LPS 诱导 H9C2 心肌细胞产生 ROS 的时间相关性。**结果** 橙皮素干预可以浓度依赖性的缓解 LPS 诱导 H9C2 心肌细胞 ROS 产生;在 60、120min,橙皮素能够抑制 LPS 诱导 H9C2 心肌细胞 ROS 产生。**结论** 橙皮素能够抑制 LPS 诱导的 H9C2 心肌细胞 ROS 产生,从而降低心肌细胞氧化应激水平,其有可能成为心肌保护新的潜在药物。

关键词 橙皮素 脂多糖 H9C2 心肌细胞 活性氧

[中图分类号] R5 [文献标识码] A

Effect of Hesperetin on the Level of Reactive Oxygen Species in H9C2 Cardiomyocytes which Induced by Lipopolysaccharides. Deng Wei, Liu Yuan, Chen Changgui, et al. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract Objective To investigate the effect of hesperetin on the level of reactive oxygen species(ROS)in H9C2 cardiomyocytes which induced by lipopolysaccharides(LPS). **Methods** The embryonic rat heart - driven H9C2 cells were coincubated with different concentrations of hesperetin(0.0625, 0.125, 0.25 $\mu\text{mol/L}$)and LPS(1 $\mu\text{g/ml}$)for 120min. And then H9C2 cells were coincubated with hesperetin(0.25 $\mu\text{mol/L}$)and LPS(1 $\mu\text{g/ml}$)for different time(30, 60, 120min). **Results** We found that H9C2 cells treated with hesperetin could be protected from LPS - induced ROS production. The decreasing ROS levels in LPS - stimulated cells were concentration - dependent and time - related by hesperetin treatment. **Conclusion** Hesperetin can reduce the ROS production and attenuate oxidative stress in H9C2 cardiomyocytes which induced by LPS.

Key words Hesperetin; LPS; H9C2 cardiomyocytes; Reactive oxygen species

心肌重构是慢性心力衰竭发生、发展的基本病理生理过程,是高血压、冠心病、瓣膜病和心肌疾病等多种心血管疾病引起心力衰竭的共有通路。尽管目前治疗心力衰竭的理念已不仅是改善症状、提高生活质量,更重要是针对心肌重构的机制,防治和延缓心肌重构的发展,从而降低心力衰竭的病死率和住院率^[1]。但近 10 年来心肌重构和心力衰竭的治疗并未取得实质性突破,现有治疗方法的效果已达到瓶颈,

需要寻找更有效的治疗机制和方法抑制甚至逆转心肌重构,防止心力衰竭发生。

近年来研究表明,天然免疫信号与生长信号交织在一起,参与心肌重构和心力衰竭的发生、发展^[2]。而脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)作为 Toll 样受体 4(toll - like receptor 4, TLR4)的天然配体,在天然免疫信号激活中起到重要作用^[3]。橙皮素(hesperetin, Hes)是一种天然黄酮类化合物,其广泛存在于水果、花卉、食品等植物源物质中。以前的研究已证实其具有抗氧化、抗炎、抗衰老和降低血脂及抗肿瘤等多种生物学活性,以及能够缓解抗肿瘤化疗药物阿霉素对心脏的毒性作用^[4~6]。笔者的最近的研究也证实橙皮素能够抑制机械压力负荷诱导的小鼠心肌重构和缓解 Ang II 诱导的心肌细胞肥大^[7,8]。但其是否能够减轻 LPS 刺激下的心肌细胞氧化应激水平尚不清楚。基于此,本研究中笔者应用橙皮素干预 LPS 刺

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81300104);教育部博士点基金资助项目(20130141120042);湖北省自然科学基金资助项目(2013CFB303)

作者单位:430060 武汉大学人民医院心血管内科(邓伟、刘源、陈昌贵、唐其柱);430060 武汉大学心血管病研究所(邓伟、刘源、陈昌贵、魏丽、唐其柱);430060 武汉大学人民医院儿科(魏丽)

通讯作者:唐其柱,教授,主任医师,博士生导师,电子信箱: qztang@whu.edu.cn

激的 H9C2 心肌细胞,观察活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生情况,拟进一步证实橙皮素对心肌重构的抑制作用。

对象与方法

1. 细胞来源与试剂: H9C2 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,橙皮素 (HPLC > 98%) 购自上海融禾生物有限公司。DMEM 培养液、胎牛血清、胰酶、青霉素/链霉素双抗购于 GIBCO 公司,活性氧检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司, LPS、DMSO 购于 Sigma 公司,其余为国产分析纯。

2. 实验分组: 浓度相关观察实验分 5 组: 对照组 (control 组), LPS 组, LPS + 0.0625 $\mu\text{mol/L}$ Hes 组, LPS + 0.125 $\mu\text{mol/L}$ Hes 组, LPS + 0.25 $\mu\text{mol/L}$ Hes 组。时间相关观察实验分 7 组: 对照组, LPS 30min 组, LPS + 0.25 $\mu\text{mol/L}$ Hes30min 组, LPS 60min 组, LPS + 0.25 $\mu\text{mol/L}$ Hes60min 组, LPS 120min 组, LPS + 0.25 $\mu\text{mol/L}$ Hes120min 组。

3. 细胞内活性氧水平测定: 用 DCFH-DA 探针检测 ROS 水平。本身没有荧光的 DCFH-DA 可穿过细胞膜进入细胞,在细胞内 ROS 存在的条件下被氧化生成荧光物质 DCF,其荧光强度与细胞内 ROS 水平呈正相关。按活性氧检测试剂盒说明,将生长在 6 孔板中的细胞经上述分组培养后,吸弃板内培养液,每孔滴加 1ml 终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 DCFH-DA, 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内避光孵育 20min 后,用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,分别用倒置荧光显微镜进行定性观察以及使用流式细胞仪进行定量检测各组细胞荧光强度。DCFH-DA 荧光探针激发波长为 488nm,发射波长为 525nm,以荧光强度反映细胞内 ROS 水平。

4. 统计学方法: 采用 SPSS 14.0 统计学软件进行分析,所有数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组之间的比较用两独

立样本 t 检验;多组之间的比较用多因素方差分析以及 *post hoc Tukey* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同浓度橙皮素对 LPS 诱导 H9C2 心肌细胞 ROS 水平的影响: 使用不同浓度橙皮素 (0.0625、0.125、0.25 $\mu\text{mol/L}$) 和 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) 共同孵育 H9C2 心肌细胞 120min 后,评估橙皮素对 LPS 诱导的 H9C2 心肌细胞 ROS 产生的影响。运用 DCFH-DA 探针检测 ROS 水平。结果显示, LPS 刺激后 H9C2 细胞 ROS 产生明显增多 ($P < 0.01$),而不同浓度的橙皮素均能显著降低 LPS 刺激引起的 ROS 产生增多,且呈浓度依赖性 ($P < 0.01$,图 1、图 2)。

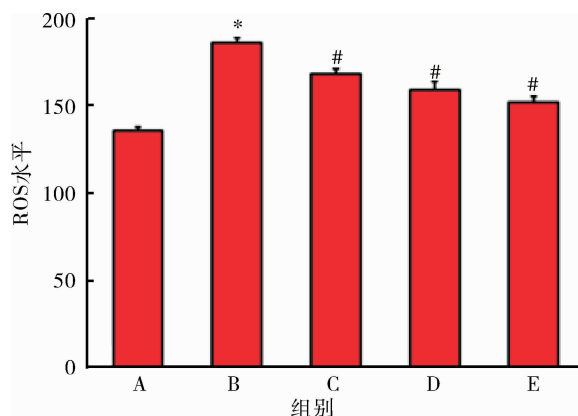


图 1 不同浓度橙皮素对 LPS 诱导 H9C2 心肌细胞 ROS 水平的影响

与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 LPS 组比较, # $P < 0.01$; A. 对照组; B. LPS 组; C. LPS + 0.0625 $\mu\text{mol/L}$ Hes 组; D. LPS + 0.125 $\mu\text{mol/L}$ Hes 组; E. LPS + 0.25 $\mu\text{mol/L}$ Hes 组

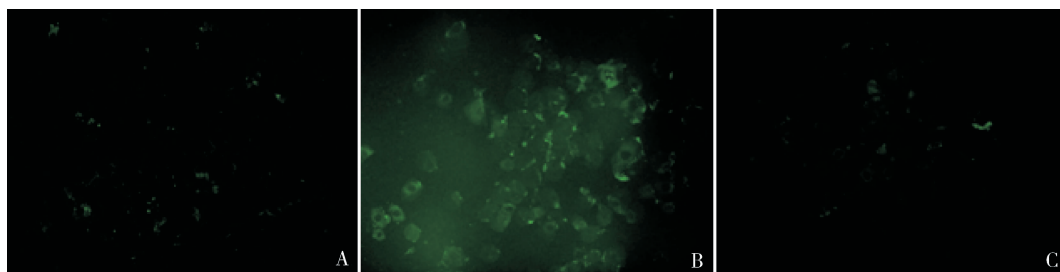


图 2 不同浓度橙皮素对 LPS 诱导 H9C2 心肌细胞 ROS 水平的影响

A. 对照组; B. LPS 120min 组; C. LPS + 0.25 $\mu\text{mol/L}$ Hes 120min 组

2. 不同时间点橙皮素对 LPS 诱导 H9C2 心肌细胞 ROS 水平的影响: 笔者选择 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度橙皮素,并运用 DCFH-DA 探针,检测不同干预时间橙皮素对 LPS 刺激 H9C2 心肌细胞 ROS 产生的影响,以进一步证实橙皮素对心肌细胞过度氧化应激的抑制作用。结果显示,在干预的第 60、120min,橙皮

素均能明显抑制 LPS 诱导的 ROS 产生增加 ($P < 0.01$);而在 30min 时,橙皮素对 ROS 产生增加的抑制并不明显 ($P > 0.05$,图 3)。

讨 论

在本项研究中,笔者从浓度依赖性和时间相关性两方面首次证实橙皮素能够减少 LPS 诱导的 H9C2

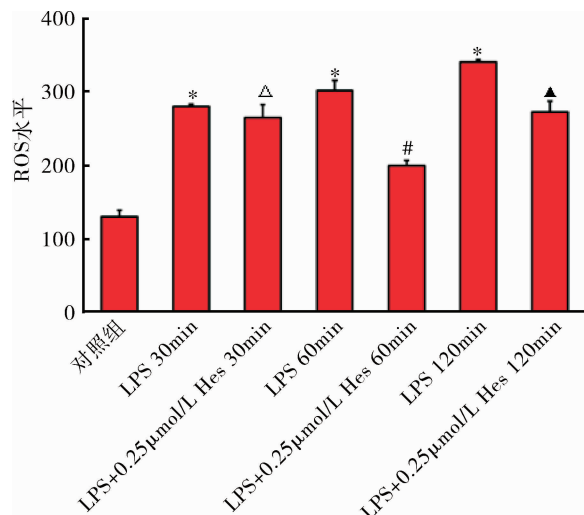


图3 不同时间点橙皮素对LPS诱导H9C2心肌细胞ROS水平的影响

与对照组比较, * $P < 0.01$; 与LPS 30min组比较, △ $P > 0.05$; 与LPS 60min组比较, # $P < 0.01$; 与LPS 120min组比较, ▲ $P < 0.01$

心肌细胞ROS产生和降低氧化应激水平,从而保护心肌细胞,抑制心肌重构。

天然免疫和心血管疾病关系密切,尤其在心脏重构领域,调节天然免疫信号能否成为治疗甚至逆转心肌肥厚的新靶点近来受到人们关注。在心肌重构和心力衰竭动物模型和病人中,多种途径的内源性刺激损害相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMP)导致心肌天然免疫信号激活,包括Toll样受体和补体的激活、下游转录因子NF- κ B的活化以及促炎因子的合成和释放^[9]。这些与影响心肌重构的经典信号蛋白一起,共同推动了心肌重构的发生、发展。LPS是TLR4的天然配体,其能够激活心肌细胞的TLR4,进而影响相关天然免疫信号,参与心肌重构^[10,11]。

氧化应激是生物的正常生命活动之一,ROS是反映机体氧化应激水平的重要标志。一定的氧化应激水平具有杀灭细菌等外来微生物的作用,但在各种有害因素的刺激下,过度升高的氧化应激水平成为导致衰老和疾病的重要因素^[12]。氧化应激也在心肌重构中扮演了重要角色,包括心肌细胞死亡、凋亡以及最终的心功能障碍:随着促心肌重构因素的不断作用,来源于线粒体、NAD(P)H氧化酶、黄嘌呤氧化酶、非偶联NO合酶的ROS不断增多;ROS通过破坏线粒体DNA,影响线粒体功能并导致细胞损伤;ROS也能直接破坏心肌结构蛋白影响兴奋-收缩偶联;而且,过度产生的ROS激活了下游众多促心肌重构信号激酶和转录因子^[13,14]。其也能刺激心肌成纤维细胞增生,激活

细胞外基质金属蛋白酶,导致心肌基质重构^[15]。

本研究表明,橙皮素能够有效减少LPS诱导的H9C2心肌细胞ROS产生,降低心肌细胞氧化应激水平。这从理论上减少了ROS相关下游促心肌损伤和促心肌重构通路激活的可能,当然还需要进一步的机制实验和在体实验来深入探讨。

参考文献

- 中华医学会心血管病分会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南2014[J]. 中华心血管病杂志, 2014, 42(2): 98-122
- Mann DL. The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls [J]. Circ Res, 2011, 108(9): 1133-1145
- Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes [J]. Exp Mol Med, 2013, 45: e66
- Ye L, Chan FL, Chen S, et al. The citrus flavonone hesperetin inhibits growth of aromatase-expressing MCF-7 tumor in ovariectomized athymic mice [J]. J Nutr Biochem, 2012, 23(10): 1230-1237
- Yoshida H, Takamura N, Shuto T, et al. The citrus flavonoids hesperetin and naringenin block the lipolytic actions of TNF- α in mouse adipocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(3): 728-732
- Trivedi PP, Kushwaha S, Tripathi DN, et al. Cardioprotective effects of hesperetin against doxorubicin-induced oxidative stress and DNA damage in rat [J]. Cardiovasc Toxicol, 2011, 11(3): 215-225
- Deng W, Jiang D, Fang Y, et al. Hesperetin protects against cardiac remodelling induced by pressure overload in mice [J]. J Mol Histol, 2013, 44(5): 575-585
- 邓伟, 刘源, 魏丽, 等. 橙皮素对血管紧张素II诱导H9C2心肌细胞肥大的影响[J]. 医学研究杂志, 2014, 43(10): 36-39
- Tsushima K, Osawa T, Yanai H, et al. IRF3 regulates cardiac fibrosis but not hypertrophy in mice during angiotensin II-induced hypertension [J]. FASEB J, 2011, 25(5): 1531-1543
- Ha T, Li Y, Hua F, et al. Reduced cardiac hypertrophy in toll-like receptor 4-deficient mice following pressure overload [J]. Cardiovasc Res, 2005, 68(2): 224-234
- Charalambous BM, Stephens RC, Feavers IM, et al. Role of bacterial endotoxin in chronic heart failure: the gut of the matter [J]. Shock, 2007, 28(1): 15-23
- Hafstad AD, Nabeebaccus AA, Shah AM. Novel aspects of ROS signalling in heart failure [J]. Basic Res Cardiol, 2013, 108(4): 359
- Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 301(6): H2181-2190
- Zhou LY, Liu JP, Wang K, et al. Mitochondrial function in cardiac hypertrophy [J]. Int J Cardiol, 2013, 167(4): 1118-1125
- Purnomo Y, Piccart Y, Coenen T, et al. Oxidative stress and transforming growth factor- β 1-induced cardiac fibrosis [J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2013, 13(2): 165-172

(收稿日期: 2014-05-16)

(修回日期: 2014-06-03)