

- Biol, 2012, 4(3): 1-3
- 4 Mao W L, Chen Y, Chen YM, *et al.* Changes of serum cytokine levels in patients with acute on chronic liver failure treated by plasma exchange[J]. J Clin Gastroenterol, 2011, 45(6): 551-555
- 5 Elsing C, Harenberg S, Stremmel W, *et al.* Serum levels of soluble Fas, nitric oxide and cytokines in acute decompensated cirrhotic hepatic patients[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(3): 421-425
- 6 Pan J, Ju J. Current perspectives on the JAK/STAT signaling pathway and its activating factors in liver fibrosis[J]. J Clin Hepatol, 2013, 29(5): 393-396
- 7 Radaeva S, Jaruga B, Hong F, *et al.* Interferon- α activates multiple STAT signals and down-regulates c-Met in primary human hepatocytes[J]. Gastroenterology, 2002, 122(4): 1020-1034
- 8 Giordanetto F, Kroemer RT. A three-dimensional model of suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1)[J]. Protein Eng, 2003, 16(2): 115-124
- 9 Qiu X, Guo G, Chen K, *et al.* A requirement for SOCS-1 and SOCS-3 phosphorylation in Bcr-Abl-induced tumorigenesis[J]. Neoplasia, 2012, 14(6): 547-558
- 10 Tamiya T, Kashiwagi I. Suppression of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T cell inflammation by SOCS1 and SOCS3[J]. Arterioscler Thromb Vase Biol, 2011, 31(5): 980-985
- 11 Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y, *et al.* Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer[J]. EMBO J, 1999, 18(8): 2127-2136
- 12 Dill MT, Makowska Z, Trincucci G, *et al.* Pegylated IFN- α regulates hepatic gene expression through transient Jak/STAT activation[J]. J Clin Invest, 2014, 124(4): 1568-1581
- 13 Cressman DE, DeAngelis RA, Ciliberto G, *et al.* Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice[J]. Science, 1996, 274(5291): 1379-1383
- 14 Hong F, Jaruga B, Kim WH, *et al.* Opposing roles of STAT1 and STAT3 in T cell-mediated hepatitis: regulation by SOCS[J]. J Clin Invest, 2002, 110(10): 1503-1513
- 15 Krebs DL, Hilton DJ. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling[J]. Stem Cells, 2001, 19(5): 378-387

(收稿日期: 2015-01-21)

(修回日期: 2015-02-12)

白藜芦醇通过下调 p-ERK1/2 抑制脂多糖诱导的 H9c2 细胞损伤

叶婷婷 王光宇 李 丽 马 建 魏 盟

摘要 目的 探讨白藜芦醇(resveratrol, RSV)是否通过下调 p-ERK1/2 发挥对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的 H9c2 细胞氧化损伤的保护作用及机制。**方法** 将 H9c2 细胞分为实验(Con)组, 脂多糖(LPS)组, 脂多糖+白藜芦醇 5 $\mu\text{mol/L}$ (L+R5)组, 脂多糖+白藜芦醇 10 $\mu\text{mol/L}$ (L+R10)组, 脂多糖+白藜芦醇 20 $\mu\text{mol/L}$ (L+R20)组, 脂多糖+白藜芦醇 50 $\mu\text{mol/L}$ (L+R50)组。其中对照组不做任何处理, L+R5 组、L+R10 组、L+R20 组、L+R50 组分别用 5、10、20、50 $\mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇预先处理 24h, 然后将 LPS 组、L+R5 组、L+R10 组、L+R20 组、L+R50 组和 10 $\mu\text{g/ml}$ 的脂多糖共同孵育 20min 和 12h。MTT 比色法检测 H9c2 细胞活力, Western blot 法检测 p-ERK1/2, ERK1/2 蛋白表达。**结果** LPS 降低 H9c2 细胞活力, 诱导细胞凋亡。RSV 上调 p-ERK1/2 蛋白表达, 成剂量依赖性。RSV 预处理能明显降低 LPS 对 H9c2 细胞的损伤。**结论** 白藜芦醇可能通过下调 p-ERK1/2 来减轻 LPS 引起的 H9c2 细胞损伤, 发挥其保护作用。

关键词 白藜芦醇 脂多糖 ERK1/2 H9c2 细胞

中图分类号 R5 文献标识码 A DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.10.031

Resveratrol Protects H9c2 Cells from Damage Induced by Lipopolysaccharide via Down-regulating the Phosphorylation of ERK1/2. Ye Tingting, Wang Guangyu, Li Li, *et al.* Department of Cardiology, Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China

Abstract Objective To investigate whether resveratrol (RSV) protects H9c2 cells against lipopolysaccharide (LPS) induced oxidative injury partly through ERK1/2 signaling pathway. **Methods** H9c2 cells were divided into six groups: control, LPS (10 $\mu\text{g/ml}$ lipopolysaccharide), L+R5 (10 $\mu\text{g/ml}$ lipopolysaccharide + 5 $\mu\text{mol/L}$ resveratrol), L+R10 (10 $\mu\text{g/ml}$ lipopolysaccharide + 10 $\mu\text{mol/L}$ res-

作者单位: 200233 上海交通大学附属第六人民医院

通讯作者: 魏盟, 教授, 主任医师, 博士生导师, 电子信箱: weimeng19571223@163.com

veratrol), L + R20 (10 μ g/ml lipopolysaccharide + 20 μ mol/L resveratrol), L + R50 (10 μ g/ml lipopolysaccharide + 50 μ mol/L resveratrol). H9c2 cells from group L + R5, L + R10, L + R20, L + R50 were pretreated with resveratrol. Then, cells from group LPS, L + R5, L + R10, L + R20, L + R50 were incubated with LPS for 20 min and 12 hours. MTT were used to detect cell proliferation. The protein level of ERK1/2, and phosphorylation of ERK1/2 was measured by Western blot respectively. **Results** Compared with control, LPS significantly reduced cell proliferation ($P < 0.05$), increased ($P < 0.01$) cell death, and up-regulated the level of phosphorylation of ERK1/2 ($P < 0.01$). Pretreatment of resveratrol attenuated the inhibition of LPS on cell viability and down-regulated the level of phosphorylation of ERK1/2. **Conclusion** Resveratrol may exert its cytoprotection effects on LPS-induced H9c2 cells via down regulating the activation of p-ERK1/2

Key words Resveratrol; Lipopolysaccharide; H9c2 cardiomyocytes; p-ERK1/2

脓毒性休克是全身感染的最严重的表现,是全世界发生率和病死率的一个主要原因。严重的心血管功能障碍是脓毒性休克引起死亡的重要原因。在败血症早期炎症因子激增的过程中,心功能障碍的分子基础尚未了解^[1]。尽管诊断、抗生素治疗及支持治疗的不断进步,病死率一直居高不下,严重影响慢性病患者和老年人^[2]。

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性细菌膜的主要构成成分,已被证明在炎症病理生理级联反应的起始中起关键作用^[3]。主要是通过激活 Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)产生多效性细胞因子/趋化因子,从而调节炎性、固有免疫和随后的适应性免疫应答^[4]。白藜芦醇(resveratrol, RSV)是一种具有多种生物学效应的非黄酮类多酚化合物。具有抗炎、抗血小板、胰岛素增敏和降脂特性。已有证据表明了 RSV 在高血压、动脉粥样硬化、脑卒中、缺血性心脏疾病、心律失常、糖尿病性心肌病,以及心脏衰竭的动物模型中有心脏保护作用^[5]。ERK1/2(the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2)是丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族中的成员之一,与细胞内炎症反应有关^[6]。本研究以 H9c2 细胞为模拟心肌细胞,研究白藜芦醇对脂多糖诱导 H9c2 细胞炎症时 p-ERK1/2 通路的影响。

对象与方法

1. 细胞株与主要试剂:大鼠心肌细胞株 H9c2(2-1)购自中国科学院细胞库。p-ERK1/2, ERK1/2 抗体(Cell Signaling Technology)。脂多糖和白藜芦醇(Sigma),胎牛血清(Biowest),DMEM 培养基(Gibco)。Western blot 及 IP 裂解液、BCA 蛋白浓度检测试剂盒、PMSF 和 BSA(碧云天公司),磷酸酶抑制剂(罗氏公司),二抗兔抗(博奥森公司)。

2. 主要仪器: EPOCH 型酶标仪(BioTek), PowerPac M universal 电泳装置(Bio-Rad), Image Quant LAS4000 mini 成像系统(general electric)。

3. 实验分组:细胞培养 24h, 各组加入不同浓度白藜芦醇

处理 24h, 再加入 LPS 处理 20min 和 12h。实验分组:①对照组:加入 10% 血清 DMEM 培养基;②LPS 组:加入终浓度为 10 μ g/ml 的 LPS;③L + R5 组:预先加入 5 μ mol/L 白藜芦醇处理 24h, 再加入终浓度为 10 μ g/ml 的 LPS;④L + R10 组:预先加入 10 μ mol/L 白藜芦醇处理 24h, 再加入终浓度为 10 μ g/ml 的 LPS;⑤L + R20 组:预先加入 20 μ mol/L 白藜芦醇处理 24h, 再加入终浓度为 10 μ g/ml 的 LPS;⑥L + R50 组:预先加入 50 μ mol/L 白藜芦醇处理 24h, 再加入终浓度为 10 μ g/ml 的 LPS。

4. MTT 法检测细胞存活率:将培养的 H9c2 细胞密度调至 5×10^7 /L, 每孔 200 μ l 接种于 96 孔板中, 每组设 3 个复孔。待细胞生长至 80% 融合后, 按上述进行分组处理。处理结束后, 每孔加入 MTT 20 μ l 培养 4h, 弃去上清, 每孔加入 150 μ l 的二甲基亚砜, 摇床震荡 15min。待结晶物充分溶解后, 用酶标仪于波长 490nm 处测吸光度值。

5. Western blot 法检测蛋白表达及磷酸化水平:细胞处理后, 用含有 1% PMSF 和 10% 磷酸酶抑制剂的细胞裂解液裂解细胞。用蛋白浓度检测试剂盒进行蛋白定量。10% SDS-PAGE 胶进行电泳, 并将蛋白转移到 PVDF 膜。5% BSA 室温下封闭 3h。4 $^{\circ}$ C 孵育一抗 p-ERK1/2、ERK1/2、 β -Actin 过夜。TBST 缓冲液洗涤 5 次, 每次 10min。室温下孵育兔抗 2h, TBST 缓冲液洗涤 5 次, 每次 10min。Image Quant LAS4000 显影。

6. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计分析软件。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组均数间的比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同浓度 RSV 对 LPS 抑制 H9c2 细胞增殖的影响:用不同浓度 RSV (5、10、20、50 μ mol/L) 预先处理 H9c2 细胞 24h, 再用 LPS 10 μ g/ml 处理 12h, MTT 检测细胞活力, 与 Con 组相比, LPS 刺激能对 H9c2 增殖产生明显抑制($P < 0.01$), 而不同浓度的白藜芦醇均能显著降低 LPS 对 H9c2 细胞增殖的抑制(图 1)。

2. 不同时间点 LPS 诱导 H9c2 心肌细胞 p-ERK1/2 的影响:用 LPS 10 μ g/ml 不处理, 及处理 5、10、20、30、60min 后, 评估不同时间点 LPS (10 μ g/ml

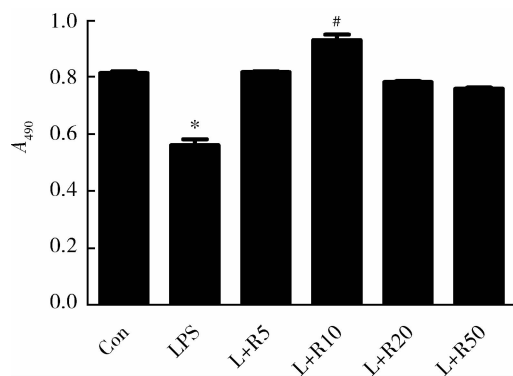


图1 MTT 法检测细胞增殖

与 Con 组比较, * $P < 0.01$; 与 LPS 组比较, # $P < 0.01$

ml) 诱导 H9c2 心肌细胞 p-ERK1/2 的影响。用 Western blot 法检测 ERK1/2 蛋白表达及磷酸化水平。结果显示, LPS 刺激 H9c2 心肌细胞 20min, p-ERK1/2 表达量最高(图2)。

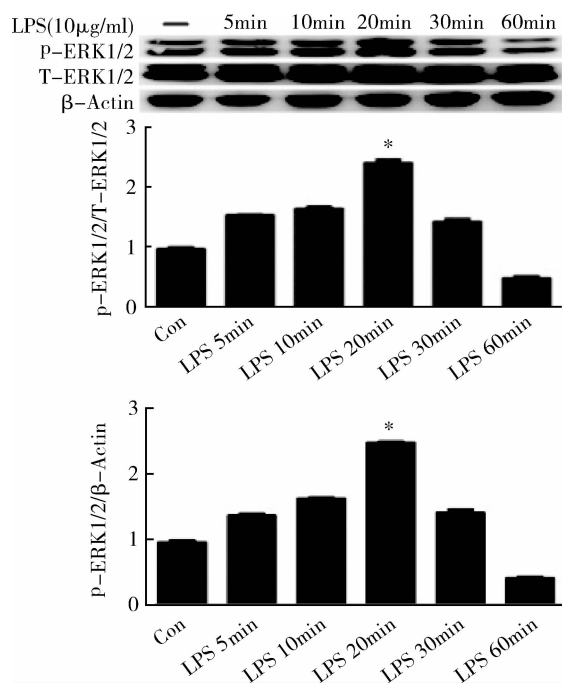


图2 不同时间点 LPS 诱导 H9c2 心肌细胞 p-ERK1/2 的影响

与 Con 组比较, * $P < 0.01$

3. 不同浓度 RSV 对 LPS 诱导 H9c2 心肌细胞 p-ERK1/2 的影响: 用不同浓度 RSV (5、10、20、50 $\mu\text{mol/L}$) 处理 H9c2 细胞 24 h, 再用 LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ 处理 20min, 用 Western blot 法检测 ERK1/2 蛋白表达及磷酸化水平。结果显示, 不同浓度 RSV 均对 p-ERK1/2 表达水平产生显著影响(图3)。

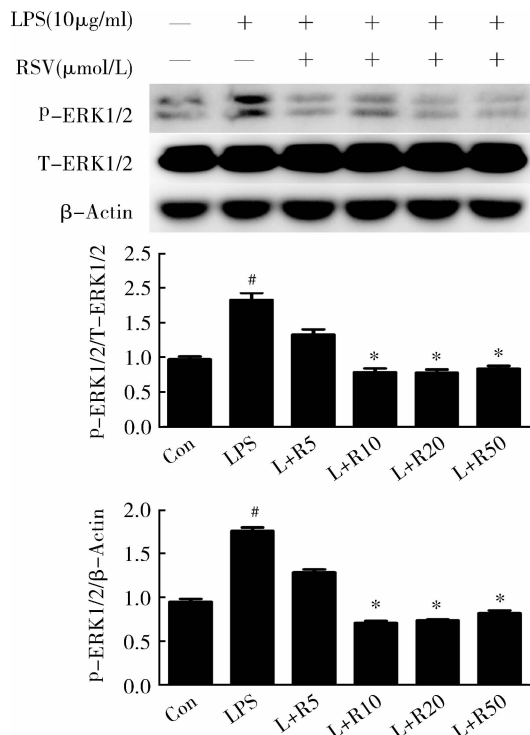


图3 不同浓度 RSV 对 LPS 诱导 H9c2 心肌细胞 p-ERK1/2 的影响

与 Con 组比较, # $P < 0.01$; 与 LPS 组比较, * $P < 0.01$

讨 论

本研究从浓度依赖性首次证明了白藜芦醇能够减少 LPS 诱导的 H9c2 心肌细胞 p-ERK1/2 表达水平, 减轻 LPS 对 H9c2 细胞增殖的抑制。从而保护心肌细胞, 抑制心肌细胞炎症反应。

脓毒症性休克与心功能障碍密切相关, 减少全身炎症反应能够改善心肌功能。证据表明, NF- κ B 控制炎症介质的表达, NF- κ B 激活的一个关键步骤是 I κ B α 的退化^[8]。脂多糖通过 I κ B α 的降解和 NF- κ B p65 蛋白亚基的磷酸化刺激经典的 NF- κ B 途径活化, 随后 NF- κ B p65 从细胞质易位至细胞核, 并触发大量的基因编码, 以便刺激经典的 NF- κ B 途径活化炎症介质^[9]。丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 家族, 包括胞外信号调节的 c-Jun 氨基末端激酶 1 和 2 (JNK) 和 p38 MAPK, 在细胞命运决定中起重要作用^[10]。证据还表明, 活性氧 (ROS) 有助于 LPS 刺激 MAPK 在心肌细胞中的信号通路^[11]。这些研究结果都符合 MAPK 信号通路和氧化应激在败血症中引起心肌收缩功能障碍的重要作用。

LPS 能够引起细胞炎症反应^[12]。因高浓度 LPS 对细胞损伤严重, 根据一些研究结果, 选取了 10 $\mu\text{g/ml}$

ml^[12,13]。一系列研究表明,白藜芦醇已在体内外研究中描述不同的生物活性和药理活性^[14]。流行病学研究表明,白藜芦醇可能有益于一些急性和慢性炎症性疾病的治疗^[15]。p-ERK1/2 属于丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路 3 条经典亚族通路之一,本实验室先前研究了 RSV 在 p38MAPK 信号通路中的作用^[16]。RSV 是否调控 c-Jun 氨基末端激酶信号通路抑制 LPS 诱导的 H9c2 细胞氧化损伤需要进一步研究。

本研究表明,白藜芦醇能够减轻 LPS 对 H9c2 细胞增殖的抑制作用,下调 LPS 诱导的 ERK1/2 磷酸化,起到心肌保护作用。但是,白藜芦醇调节 p-ERK1/2 信号通路的上下游靶点及机制目前尚不清楚,将成为下一步的研究目标。

参考文献

- 1 Frazier WJ, Xue J, Luce WA, *et al.* MAPK signaling drives inflammation in LPS-stimulated cardiomyocytes: the route of crosstalk to G-protein-coupled receptors [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50071
- 2 Chalupka AN, Talmor D. The economics of sepsis [J]. *Crit Care Clin*, 2012, 28(1): 57-76
- 3 Mann DL, Topkara VK, Evans S, *et al.* Innate immunity in the adult mammalian heart: for whom the cell tolls [J]. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 2010, 121(34-50; discussion 50-31
- 4 Rhee SH. Lipopolysaccharide: basic biochemistry, intracellular signaling, and physiological impacts in the gut [J]. *Intest Res*, 2014, 12(2): 90-95
- 5 Zordoky BN, Robertson IM, Dyck JR. Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(6): 1155-1177
- 6 Gu W, Song L, Li X M, *et al.* Mesenchymal stem cells alleviate airway inflammation and emphysema in COPD through down-regulation

- of cyclooxygenase-2 via p38 and ERK MAPK pathways [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(8733
- 7 Takeuchi K, del Nido PJ, Poutias DN, *et al.* Vesnarinone restores contractility and calcium handling in early endotoxemia [J]. *Circulation*, 2000, 102(Suppl 3): Iii365-369
- 8 Schmitz ML, Mattioli I, Buss H, *et al.* NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels [J]. *Chembiochem*, 2004, 5(10): 1348-1358
- 9 Hall G, Singh IS, Hester L, *et al.* Inhibitor-kappaB kinase-beta regulates LPS-induced TNF-alpha production in cardiac myocytes through modulation of NF-kappaB p65 subunit phosphorylation [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(5): H2103-2111
- 10 Andreka P, Tran T, Webster K A, *et al.* Nitric oxide and promotion of cardiac myocyte apoptosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2004, 263(1-2): 35-53
- 11 Angeloni C, Hrelia S. Quercetin reduces inflammatory responses in LPS-stimulated cardiomyoblasts [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012(837104
- 12 Pan LL, Liu XH, Gong QH, *et al.* S-Propargyl-cysteine (SPRC) attenuated lipopolysaccharide-induced inflammatory response in H9c2 cells involved in a hydrogen sulfide-dependent mechanism [J]. *Amino Acids*, 2011, 41(1): 205-215
- 13 Yang Z, Liu Y, Deng W, *et al.* Hesperetin attenuates mitochondria-dependent apoptosis in lipopolysaccharide-induced H9C2 cardiomyocytes [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(5): 1941-1946
- 14 Bradamante S, Barenghi L, Villa A. Cardiovascular protective effects of resveratrol [J]. *Cardiovasc Drug Rev*, 2004, 22(3): 169-188
- 15 Shakibaei M, Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol addiction: to die or not to die [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53(1): 115-128
- 16 李丽,赵清,李永光,等. 白藜芦醇通过下调 p38MAPK 磷酸化抑制脂多糖诱导的 H9c2 细胞死亡[J]. *实用医学杂志*, 2014, 30(2): 199-201

(收稿日期:2015-03-06)

(修回日期:2015-03-18)

(上接第 99 页)

- 11 Nakamura M, Makabe T, Ichikawa M, *et al.* Non-gated vessel wall imaging of the internal carotid artery using radial scanning and fast spin echosequence: evaluation of vessel signal Intensity by flow rate at 3.0 tesla [J]. *Nihon Hoshasen Gijutsu Gakkai Zasshi*, 2013, 69(11): 1261-1265
- 12 Halcox JP, Roy C, Tubach F, *et al.* C-reactive protein levels in patients at cardiovascular risk: EURICA study [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2014, 14(1): 25-26
- 13 Amer MS, Khater MS, Omar OH, *et al.* Association between Framingham risk score and subclinical atherosclerosis among elderly with both type 2 diabetes mellitus and healthy subjects [J]. *Am J Cardio-*

vasc Dis, 2014, 4(1): 14-19

- 14 Yurtdas M, Yaylali YT, Kaya Y, *et al.* Increased plasma high-sensitivity c-reactive protein and myeloperoxidase levels may predict ischemia during myocardial perfusion imaging in slow coronary flow[J]. *Arch Med Res*, 2014, 45(1): 63-69
- 15 Camsari A, Ozcan T, Ozer C, *et al.* Carotid artery intima-media thickness correlates with intravascular ultrasound parameters in patients with slow coronary flow[J]. *Atherosclerosis*, 2008, 200(2): 310-314

(收稿日期:2015-04-22)

(修回日期:2015-05-04)