

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2017)25-07-0688-05

Klotho 对脂多糖所致心肌损伤的作用及机制

刘萍, 杨雷

(南阳理工学院张仲景国医国药学院, 河南省南阳市 473004)

[关键词] Klotho; 心肌损伤; 氧化应激; 细胞凋亡; 核因子 κ B

[摘要] 目的 探讨 Klotho 对脂多糖(LPS)所致心肌损伤的影响及相关作用机制。方法 以大鼠胚胎 H9c2 心肌细胞系为研究对象,经不同浓度 Klotho 预处理后,加 1 g/L LPS 处理 6 h,检测细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)含量及细胞存活率来反映心肌细胞损伤。检测细胞培养液中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 β (IL- β)和白细胞介素 6(IL-6)的含量来反映心肌细胞的炎症反应。检测细胞中丙二醛(MDA)的含量以及超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性来反映细胞氧化应激水平。流式细胞术检测细胞凋亡情况。Western blot 检测核因子 κ B(NF- κ B) p65 和 p-NF- κ B p65 的蛋白表达水平。结果 Klotho 预处理可显著抑制 LPS 所致的心肌细胞存活率下降,抑制 LDH、TNF- α 、IL- β 、IL-6 释放,下调 MDA 的含量,升高 SOD、GSH-Px 的活性,抑制细胞凋亡,抑制 p-NF- κ B p65 的蛋白表达($P<0.05$)。结论 Klotho 可抑制 LPS 所致的心肌细胞损伤,其作用机制可能与抑制 NF- κ B 信号通路的活化,进而发挥抗炎、抗氧化应激,同时抑制细胞凋亡有关。

[中图分类号] R363.1

[文献标识码] A

Effect of Klotho on LPS-induced cardiomyocyte damage and its mechanism

LIU Ping, YANG Lei

(Zhang Zhongjing College of Traditional Chinese Medicine, Nanyang Institute of Technology, Nanyang, Henan 473004, China)

[KEY WORDS] Klotho; Cardiomyocyte damage; Oxidative stress; Apoptosis; NF- κ B

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect and mechanism of Klotho on lipopolysaccharide(LPS) induced cardiomyocyte damage. **Methods** H9c2 cells were pretreated with different concentrations of Klotho protein, then treated with 1 g/L LPS for 6 hours, and cardiomyocyte damage was estimated by detecting the content of lactate dehydrogenase (LDH) and cell viability. Inflammation was estimated by detecting the content of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin- β (IL- β), IL-6. The status of oxidative stress was measured by malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px). Cell apoptosis was measured with flow cytometry. The expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65 and p-NF- κ B p65 at protein levels were measured with Western blot assay. **Results** Klotho can alleviate LPS-induced decrease of cell viability, inhibit the release of LDH, TNF- α , IL- β , IL-6, down-regulate the content of MDA, enhance the activity of SOD, GSH-Px, suppress cell apoptosis and p-NF- κ B p65 protein expression ($P<0.05$). **Conclusion** Klotho can alleviate LPS-induced cardiomyocyte damage. And its mechanism may be related to the downregulation of NF- κ B activation, and protect H9c2 cells from LPS-induced inflammation, oxidative stress and cell apoptosis.

心肌损伤及心功能不全是脓毒症患者的常见并发症。研究显示,约有 40%~50% 脓毒症患者会合并心功能不全,且伴心功能不全的患者具有更高的死亡率^[1-2]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁的重要成分之一,是引起炎症反应和休克的关键分子,也是建立脓毒症模型的常

见手段。研究显示, LPS 可诱导心肌细胞炎症因子的释放,并导致心肌损伤^[3-4]。抗衰老蛋白 Klotho 具有抗氧化、抗凋亡等作用,可改善心血管、肾等多种器官的损伤^[5-7]。本研究以大鼠胚胎来源 H9c2 细胞系为对象,通过 LPS 诱导心肌损伤模型来观察 Klotho 对 LPS 所致心肌损伤的影响,从抗炎、抗氧化

[收稿日期] 2016-10-11

[修回日期] 2017-04-11

[作者简介] 刘萍,副教授,研究方向为神经生理学, E-mail 为 liuqsysucc@163.com。

应激及抗凋亡等方面初步探讨其作用机制,并检测其与核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路的关系。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

胎牛血清 (FBS) 及 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司; LPS 购自 Sigma 公司; Klotho 蛋白购自美国 R&D 公司; 大鼠胚胎来源 H9c2 细胞系购自中国科学院上海细胞库; NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 和 β -actin 抗体购自美国 Abcam 公司; CCK-8 细胞增殖分析试剂盒购自日本同仁化学研究所; 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 及谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 细胞凋亡检测试剂盒购自凯基公司; 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 β (interleukin- β , IL- β) 和 IL-6 检测试剂盒购自美国 BD 公司; 其余试剂均为国产市售分析纯。

1.2 细胞培养、分组和处理

H9c2 细胞用含 10% FBS DMEM 培养基培养于 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱, 每隔 1 天换液, 每 3~5 天用胰酶消化传代。取对数生长期细胞消化后接种于 6 孔板中, 待细胞生长至 60%~80% 融合时, 将细胞随机分为 5 组: 空白对照组 (Ctrl 组); LPS 组, 培养基中加入 1 g/L LPS 诱导 6 h; Klotho 高剂量组 (H-KL 组), 培养基中加入 10.0 μ mol/L Klotho + 1 g/L LPS; Klotho 中剂量组 (M-KL 组), 培养基中加入 1.0 μ mol/L Klotho + 1 g/L LPS; Klotho 低剂量组 (L-KL), 培养基中加入 0.1 μ mol/L Klotho + 1 g/L LPS。各组细胞经相应处理后进行后续实验分析。

1.3 CCK-8 法测定细胞活力

取对数生长期细胞接种于 96 孔板中 (密度为 2×10^3 个/孔), 经相应处理后, 每孔加入 CCK-8 试剂 10 μ L, 置于培养箱中继续培养 2 h。用酶标仪检测各孔在 450 nm 波长处的吸光度值 (OD)。每组设 3 个复孔取均值, 另设单孔只加入培养基作空白对照。

1.4 LDH、MDA、SOD、GSH-Px 及 TNF- α 、IL- β 、IL-6 的检测

各组细胞经相应处理后, 依据说明书进行相关检测。LDH、MDA、SOD 及 GSH-Px 的检测依据南京建成生物工程研究所提供的试剂盒检测说明书进行。TNF- α 、IL- β 、IL-6 的检测依据美国 BD 公司提

供的 ELISA 试剂盒检测说明书进行。

1.5 Annexin V/PI 双染色法检测细胞凋亡

用不含 EDTA 的胰酶消化各组细胞后, 离心收集细胞。加 PBS 漂洗 3 次, 然后加结合缓冲液重悬细胞, 加入 Annexin V-FITC 室温条件下避光孵育 10 min。然后避光加入 PI 继续反应 5 min。流式细胞仪检测荧光强度, 检测条件: Ex=488 nm, Em=530 nm。

1.6 Western blot 测定蛋白表达水平

裂解收集各组细胞蛋白, 用 BCA 蛋白定量试剂盒对各组蛋白进行定量。依据定量结果, 调整上样蛋白总量为 80 μ g, 并加入 4 倍体积的上样缓冲液进行 SDS-PAGE 电泳。而后通过电转将蛋白转移至 PVDF 膜上, 加 5% 脱脂牛奶室温条件下封闭 90 min, 然后加入相应比例的一抗置于 4℃ 孵育过夜, 复温后加 TBST 洗涤 3 次 \times 5 min; 然后加入相对应的二抗室温条件下孵育 120 min, 加 TBST 洗涤 3 次 \times 10 min, 暗室中显影, 定影并冲洗胶片。结果采用 Image J 进行灰度分析。

1.7 统计学处理

所得数据采用 SPSS17.0 统计学软件进行统计学分析。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析, 各组均数间的两两比较用 Bonferroni 校正的 t 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Klotho 抑制 LPS 所致心肌细胞损伤的作用

CCK-8 细胞活力检测的结果显示, 不同浓度 Klotho 蛋白预处理可明显改善 LPS 所致的细胞活力降低, 且 Klotho 蛋白预处理可显著降低培养基中 LDH 的含量; 两者均呈剂量依赖性 (图 1; $P < 0.05$)。结果说明 Klotho 可抑制 LPS 所致的心肌细胞损伤。

2.2 Klotho 抑制 LPS 所致心肌细胞炎症反应

不同浓度的 Klotho 蛋白预处理可明显抑制 LPS 所致的细胞炎症因子 TNF- α 、IL- β 和 IL-6 的释放, Klotho 蛋白浓度在 1.0 μ mol/L 及 10.0 μ mol/L 时, 差异具有统计学意义 (图 2; $P < 0.05$)。结果说明 Klotho 可抑制 LPS 所致心肌细胞炎症因子的释放。

2.3 Klotho 对 LPS 所致心肌细胞氧化应激反应的影响

1g/L LPS 处理 H9c2 细胞, 可致 MDA 的含量增加, 同时 SOD 及 GSH-Px 的活性降低; 而细胞经 1.0 μ mol/L 及 10.0 μ mol/L Klotho 蛋白预处理之后, MDA 的含量降低, SOD 及 GSH-Px 的活性增加, 差异具有统计学意义 (图 3; $P < 0.05$)。结果说明 Klotho 可抑制 LPS 所致氧化应激反应。

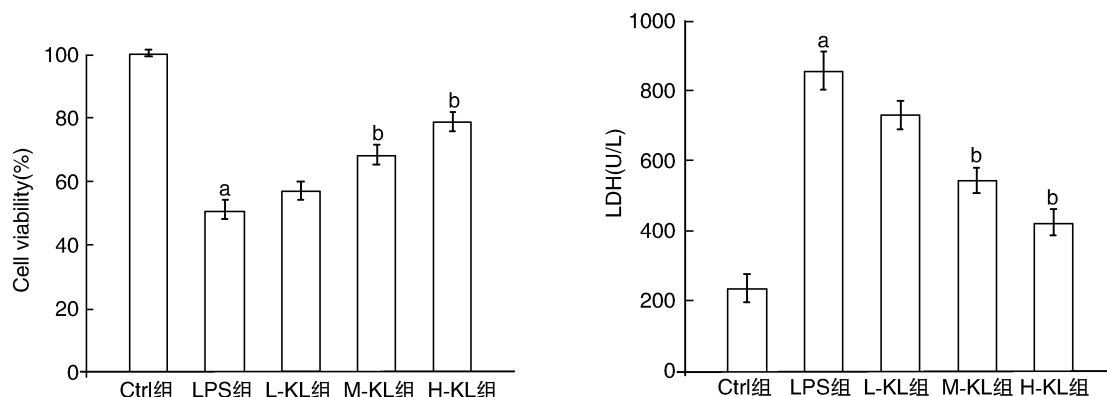


图 1. Klotho 对 LPS 所致 H9c2 细胞损伤的影响 ($n=6$) a 为 $P<0.05$, 与 Ctrl 组比较; b 为 $P<0.05$, 与 LPS 组比较。

Figure 1. Effect of Klotho on LPS-induced H9c2 cell injury ($n=6$)

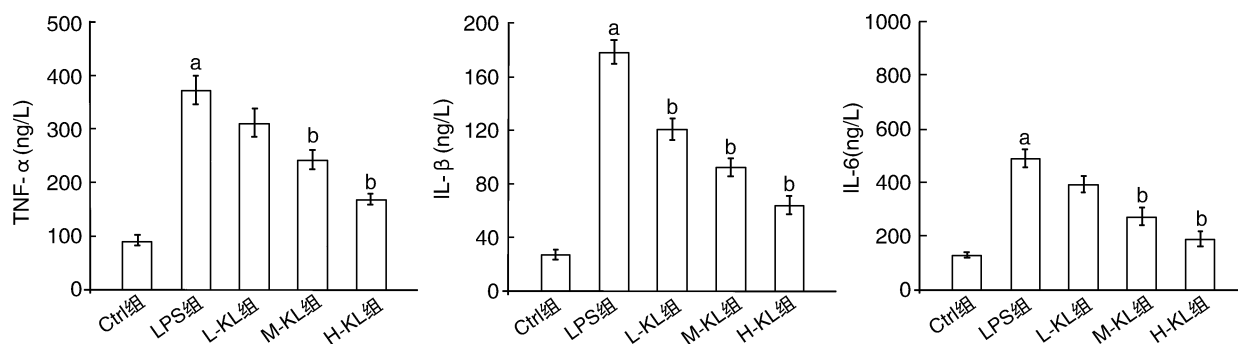


图 2. Klotho 对 LPS 所致 H9c2 细胞炎症因子释放的影响 ($n=6$) a 为 $P<0.05$, 与 Ctrl 组比较; b 为 $P<0.05$, 与 LPS 组比较。

Figure 2. Effect of Klotho on LPS-induced rise in pro-inflammatory cytokines ($n=6$)

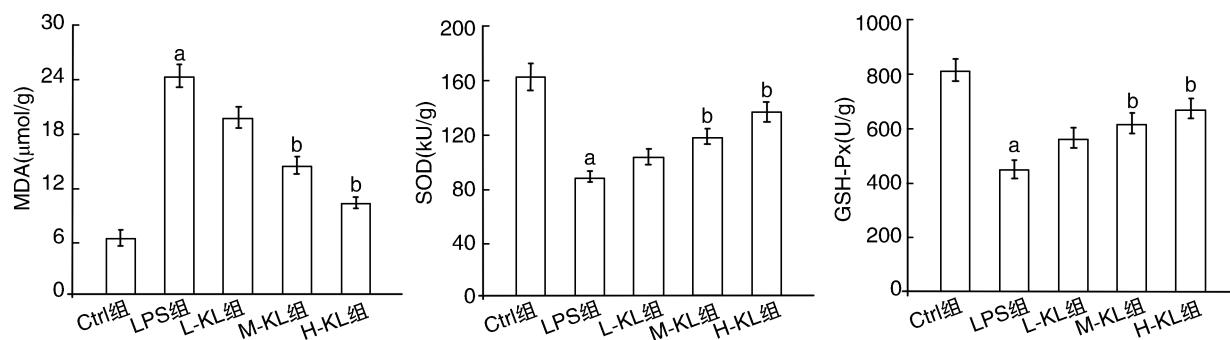


图 3. Klotho 对 LPS 所致 H9c2 细胞氧化应激反应的影响 ($n=6$) a 为 $P<0.05$, 与 Ctrl 组比较; b 为 $P<0.05$, 与 LPS 组比较。

Figure 3. Effect of Klotho on LPS-induced oxidative stress ($n=6$)

2.4 Klotho 对 LPS 所致心肌细胞凋亡的影响

采用流式细胞 AnnexinV/PI 双染法检测 Klotho 对 LPS 所致细胞凋亡的影响。图 4 显示, 1 g/L LPS 处理 H9c2 细胞, 可致细胞早期凋亡率显著上升。而细胞经 1.0 μ mol/L 及 10.0 μ mol/L Klotho 蛋白预处理之后, 细胞早期凋亡率明显降低, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。结果说明 Klotho 可抑制 LPS

所致细胞凋亡。

2.5 Klotho 对 LPS 所致心肌细胞 NF- κ B 活性的影响

1 g/L LPS 处理 H9c2 细胞, 可致磷酸化 NF- κ B p65 蛋白表达升高, 而细胞经 1.0 μ mol/L 及 10.0 μ mol/L Klotho 蛋白预处理之后, 磷酸化 NF- κ B p65 蛋白表达显著降低 (图 5; $P<0.05$)。结果说明 Klotho 可抑制 LPS 所致 NF- κ B 信号通路的激活。

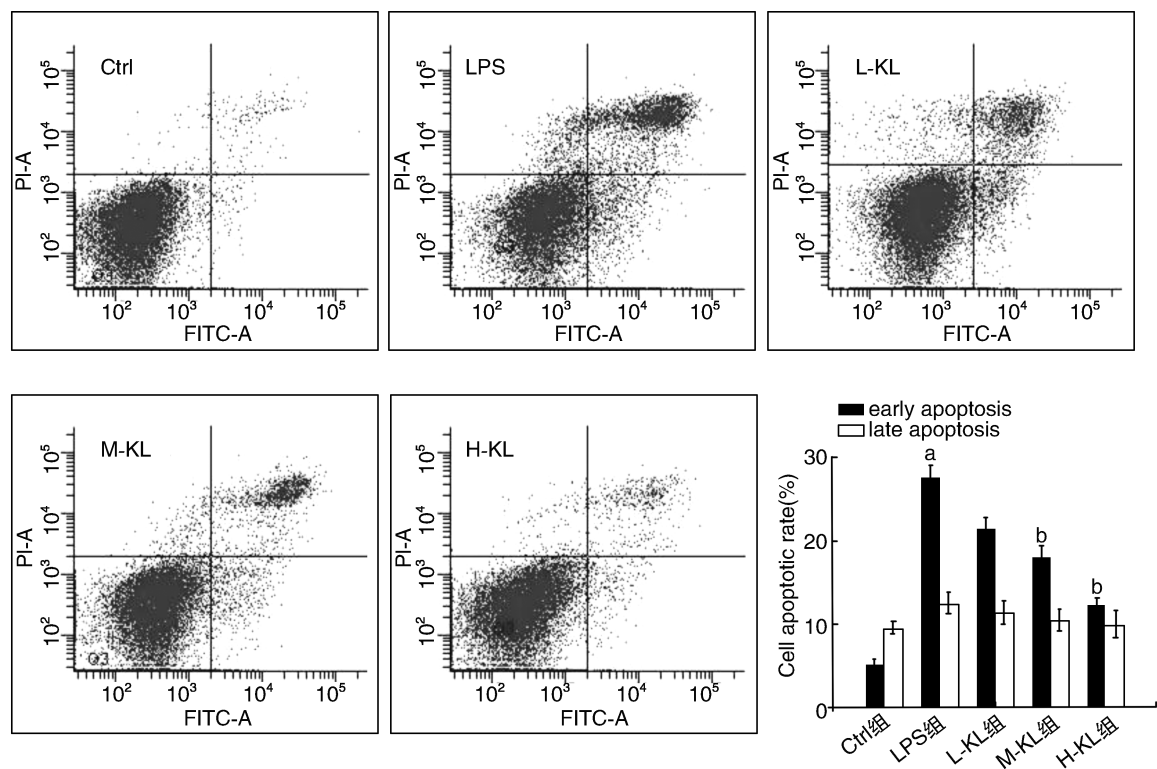


图 4. Klotho 对 LPS 所致 H9c2 细胞凋亡的影响($n=6$) a 为 $P<0.05$, 与 Ctrl 组比较; b 为 $P<0.05$, 与 LPS 组比较。
Figure 4. Effect of Klotho on LPS-induced H9c2 cell apoptosis($n=6$)

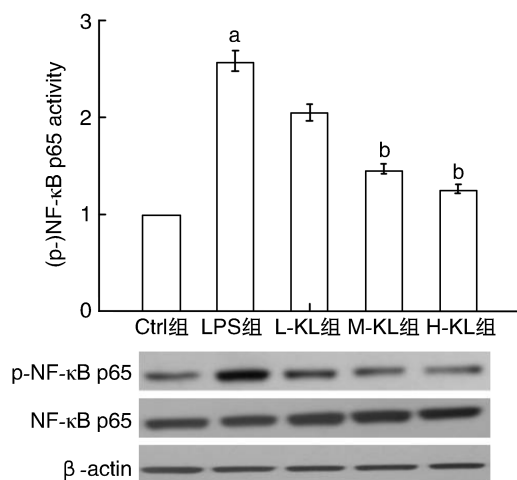


图 5. Klotho 对 LPS 所致 H9c2 细胞 NF-κB 活性的影响($n=6$) a 为 $P<0.05$, 与 Ctrl 组比较; b 为 $P<0.05$, 与 LPS 组比较。
Figure 5. Effect of Klotho on LPS-induced activation of NF-κB pathway in H9c2 cells($n=6$)

3 讨论

LPS 是一种重要的致炎因子,炎症反应过度可导致多器官功能的异常,故而 LPS 是诱导脓毒症及研究相关心功能障碍的常见模型分子。本研究以

LPS 刺激大鼠胚胎 H9c2 心肌细胞系建立心肌细胞损伤模型,并在此基础上研究 Klotho 蛋白对心肌细胞损伤的作用。结果发现 LPS 可显著降低细胞存活率,并诱导 LDH 的释放;而采用不同浓度的 Klotho 蛋白预处理细胞之后可提高细胞存活率,抑制 LDH 的释放。结果提示 LPS 可诱导建立心肌细胞损伤模型,且 Klotho 蛋白可改善 LPS 所致的心肌损伤。

本文进一步研究了 Klotho 改善 LPS 所致的心肌损伤所涉及的作用机制。LPS 作为一种致炎因子,可激活炎症信号通路。研究表明,LPS 所致急性肺损伤中伴随着炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的释放^[8]。TNF- α 可通过相关信号通路诱导细胞凋亡及坏死^[9-11]。此外,LPS 所致心肌损伤还与氧化应激反应相关,LPS 可导致心肌细胞中 NADH 氧化酶及过氧化物的生成,过氧化物过度生成可造成细胞的广泛损伤,如膜脂质过氧化等,进而减少细胞存活率^[12-13]。本研究从炎症介质释放、氧化应激水平及细胞凋亡等 3 个方面系统研究了 Klotho 改善 LPS 所致的心肌损伤所涉及的作用机制。结果显示,Klotho 可明显抑制 LPS 所致心肌细胞炎症因子(TNF- α 、IL- β 和 IL-6)的释放;同时减低 MDA 的含量,并增加细胞内抗氧化系统 SOD 及 GSH-Px 的活

性,增强细胞对氧自由基的清除而发挥保护作用。此外,细胞凋亡的检测结果显示,经 Klotho 预处理后,细胞的早期凋亡率明显降低。

NF- κ B 信号通路是介导炎症反应发生的重要通路,前期研究表明,LPS 可通过促进 I κ B α 的磷酸化及 NF- κ B p65 的核转位激活 NF- κ B 信号通路,介导炎症反应的发生^[14-15]。关于 Klotho 蛋白的功能学研究则显示,Klotho 可抑制 NF- κ B 的核转位,调控 NF- κ B 信号通路的活性^[16]。故而本研究进一步检测了在 LPS 诱导的心肌细胞损伤模型中,Klotho 与 NF- κ B 信号通路的关系。结果显示,预孵 Klotho 可明显抑制 NF- κ B p65 的磷酸化。提示 Klotho 改善 LPS 所致心肌细胞损伤与 NF- κ B 信号通路密切相关,但是其具体的作用机制还有待进一步深入的研究。

[参考文献]

- [1] Alvarez S, Vico T, Vanasco V. Cardiac dysfunction, mitochondrial architecture, energy production, and inflammatory pathways: Interrelated aspects in endotoxemia and sepsis [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 81(Pt B): 307-314.
- [2] Cappelletti S, Ciallella C, Aromatario M, et al. Takotsubo cardiomyopathy and sepsis [J]. *Angiology*, 2017, 68(4): 288-303.
- [3] Bai T, Hu X, Zheng Y, et al. Resveratrol protects against lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction by enhancing SERCA2a activity through promoting the phospholamban oligomerization [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016, 311(4): H1 051-062.
- [4] Yuan Y, Zhou H, Wu QQ, et al. Puerarin attenuates the inflammatory response and apoptosis in LPS-stimulated cardiomyocytes [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(2): 415-420.
- [5] Kim JH, Hwang KH, Park KS, et al. Biological role of anti-aging protein Klotho [J]. *J Lifestyle Med*, 2015, 5(1): 1-6.
- [6] 常晋瑞, 孙娜, 南瑛, 等. Klotho 的研究进展 [J]. *生理科学进展*, 2015, 46(4): 245-249.
- [7] Liu TY, Chen SB. Sarcandra glabra combined with lycopene protect rats from lipopolysaccharide induced acute lung injury via reducing inflammatory response [J]. *Biomed Pharm*, 2016, 84: 34-41.
- [8] Kapás L, Bohnet SG, Traynor TR, et al. Spontaneous and influenza virus-induced sleep are altered in TNF- α double-receptor deficient mice [J]. *J Appl Physiol* (1985), 2008, 105(4): 1 187-198.
- [9] Ni HM, McGill MR, Chao X, et al. Caspase inhibition prevents tumor necrosis factor- α -induced apoptosis and promotes necrotic cell death in mouse hepatocytes in vivo and in vitro [J]. *Am J Pathol*, 2016, 186(10): 2 623-636.
- [10] Welsh K, Milutinovic S, Ardecky RJ, et al. Characterization of potent SMAC mimetics that sensitize cancer cells to TNF family-induced apoptosis [J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0161 952.
- [11] Saini NK, Sinha R, Singh P, et al. Mce4A protein of mycobacterium tuberculosis induces pro inflammatory cytokine response leading to macrophage apoptosis in a TNF- α dependent manner [J]. *Microb Pathog*, 2016, 100: 43-50.
- [12] Zhang ZH, Yu Y, Wei SG, et al. Centrally administered lipopolysaccharide elicits sympathetic excitation via NAD(P) H oxidase-dependent mitogen-activated protein kinase signaling [J]. *J Hyper-tens*, 2010, 28(4): 806-816.
- [13] Al-Shabany AJ, Moody AJ, Foey AD, et al. Intracellular NAD⁺ levels are associated with LPS-induced TNF- α release in pro-inflammatory macrophages [J]. *Biosci Rep*, 2016, 36(1): e00301.
- [14] Wang J, Luo H, Yang L, et al. Baicalein induces apoptosis and reduces inflammation in LPS-stimulated keratinocytes by blocking the activation of NF- κ B: implications for alleviating oral lichen planus [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2016, 62(7): 55-60.
- [15] Huang WC, Lai CL, Liang YT, et al. Phloretin attenuates LPS-induced acute lung injury in mice via modulation of the NF- κ B and MAPK pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 40: 98-105.
- [16] Buendía P, Ramírez R, Aljama P, et al. Klotho prevents translocation of NF- κ B [J]. *Vitam Horm*, 2016, 101: 119-150.

(此文编辑 朱雯霞)