

本文引用: 苏长英, 孙学会, 吴美龄. 桑葚提取物对脂多糖诱导的心肌细胞炎症反应和细胞凋亡的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(2): 125-129, 150.

[文章编号] 1007-3949(2022)30-02-0125-06

· 实验研究 ·

桑葚提取物对脂多糖诱导的心肌细胞炎症反应和细胞凋亡的影响

苏长英¹, 孙学会², 吴美龄³

(枣庄矿业集团中心医院 1. 急诊科, 2. 病案科, 山东省枣庄市 277500; 3. 枣庄市妇幼保健院健康管理中心, 山东省枣庄市 277500)

[关键词] 桑葚提取物; 脂多糖; 心肌细胞; 炎症反应; 细胞凋亡; S100 钙结合蛋白 B

[摘要] 目的 探讨桑葚提取物(ME)对脂多糖(LPS)致心肌细胞炎症反应和细胞凋亡的影响及分子机制。方法 以正常培养的 H9c2 细胞作为对照组; 用 10 mg/L LPS 处理的 H9c2 细胞作为 LPS 组; 分别用 50、100、200 mg/L 的 ME 处理 H9c2 细胞, 再用 10 mg/L LPS 处理, 作为 ME 低、中、高浓度组。将 si-NC、si-S100B 转染至 H9c2 细胞中, 再用 10 mg/L LPS 处理, 作为 LPS+si-NC 组、LPS+si-S100B 组; 将 pcDNA、pcDNA-S100B 转染至 H9c2 细胞中, 用 200 mg/L ME 处理, 再用 10 mg/L LPS 处理, 作为 LPS+ME+pcDNA 组、LPS+ME+pcDNA-S100B 组。酶联免疫吸附法检测肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6) 水平; 流式细胞术检测心肌细胞凋亡; Western blot 检测 Bcl-2、Bax、S100 钙结合蛋白 B (S100B) 的蛋白表达; 实时荧光定量 PCR 检测 S100B mRNA 表达水平。结果 不同浓度 ME 处理的心肌细胞中 TNF- α 、IL-6 的分泌水平降低, 细胞凋亡率显著降低, Bcl-2 表达水平显著升高, Bax 和 S100B 表达水平均显著降低, 且呈浓度依赖性。干扰 S100B 表达能抑制 LPS 诱导的心肌细胞炎症反应和细胞凋亡, S100B 过表达则逆转了 ME 对 LPS 诱导的心肌细胞炎症反应和细胞凋亡的抑制作用。结论 ME 可抑制 LPS 诱导的心肌细胞炎症反应和细胞凋亡, 其机制可能与下调 S100B 有关。

[中图分类号] R54

[文献标识码] A

Effect of mulberry extract on cardiomyocyte inflammatory response and apoptosis induced by lipopolysaccharide

SU Changying¹, SUN Xuehui², WU Meiling³

(1. Emergency Department, 2. Medical Record Department, Central Hospital of Zaozhuang Mining Group, Zaozhuang, Shandong 277500, China; 3. Health Management Center, Zaozhuang Maternal and Child Health Hospital, Zaozhuang, Shandong 277500, China)

[KEY WORDS] mulberry extract; lipopolysaccharide; cardiomyocyte; inflammatory response; apoptosis; S100 calcium binding protein B

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of mulberry extract (ME) on inflammatory response and apoptosis of cardiomyocytes induced by lipopolysaccharide (LPS) and its molecular mechanism. **Methods** H9c2 cells in normal culture were cultured as control group; H9c2 cells were treated with 10 mg/L LPS as LPS group; H9c2 cells were treated with 50, 100 and 200 mg/L ME, and then treated with 10 mg/L LPS, as low, medium and high concentration ME groups. After transfection of si-NC and si-S100B into H9c2 cells, the cells were treated with 10 mg/L LPS, as LPS+si-NC group and LPS+si-S100B group. After transfection of pcDNA and pcDNA-S100B into H9c2 cells, the cells were treated with 200 mg/L ME followed by 10 mg/L LPS, as LPS+ME+pcDNA group and LPS+ME+pcDNA-S100B group. The levels of tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Flow cytometry was used to detect apoptosis; Western blot was used to detect the expressions of Bcl-2, Bax and S100 calcium binding protein B (S100B); Real-time quantitative PCR was used to detect the expression of S100B mRNA. **Results** The levels of TNF- α and IL-6 in cardiomyocytes treated with different concentrations of ME were significantly decreased, the apoptosis rate was significantly decreased, the expression of Bcl-2 was significantly increased, the expression of Bax was

[收稿日期] 2020-02-27

[修回日期] 2020-05-18

[作者简介] 苏长英, 副主任医师, 研究方向为心血管疾病急诊, E-mail 为 3198250679@qq.com。

significantly decreased, and the expression of S100B was significantly decreased, with concentration-dependent manner ($P < 0.05$). Interference of S100B expression inhibited LPS-induced inflammatory response and apoptosis of cardiomyocytes. Overexpression of S100B reversed the inhibitory effect of ME on LPS-induced inflammatory response and apoptosis of cardiomyocytes. **Conclusion** ME can inhibit LPS-induced inflammatory response and apoptosis of cardiomyocytes, and its mechanism may be related to the down-regulation of S100B.

脓毒症是由感染引发的全身炎症反应综合征,心脏是最易受损器官之一,近年来研究发现中药及其活性成分在预防、治疗脓毒症中起到了重要的作用^[1]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性菌的主要致病成分,其可激活多种细胞释放炎症介质,引起全身炎症反应^[2]。桑葚是药食两用的果实,其主要活性成分包括白藜芦醇、黄酮、花色苷、多糖等,具有免疫调节、抗氧化、抗肿瘤等作用^[3]。研究显示桑葚提取物对四氯化碳、酒精肝损伤有显著的保护作用^[4]。桑葚提取物(mulberry extract, ME)可抑制炎症相关因子表达,从而减弱促炎症反应,发挥抗炎功效^[5]。然而ME对LPS致心肌细胞炎症反应和细胞凋亡的影响及其机制尚不清楚。S100钙结合蛋白B(S100 calcium binding protein B, S100B)是钙敏感结合蛋白家族成员之一,S100B在多柔比星诱导损伤的心肌细胞中表达明显增加且促进心肌细胞凋亡^[6]。干扰S100B表达能够通过抑制炎症损伤和调节凋亡相关蛋白而抑制多柔比星诱导的心肌细胞凋亡^[7]。本研究旨在探讨ME对LPS致心肌细胞炎症反应和细胞凋亡的影响及其机制是否与S100B有关。

1 材料和方法

1.1 细胞、试剂与仪器

心肌细胞H9c2购自上海名劲生物科技公司。RPMI-1640培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司;LPS购自北京寰宇科创生物科技发展有限公司;ME购自西安斯诺特生物技术有限公司;Trizol、反转录试剂盒及荧光定量PCR试剂盒购自美国Progema公司;蛋白提取试剂盒、BCA试剂盒、RIPA蛋白裂解液、SDS-PAGE试剂盒购自碧云天生物技术研究所以;凋亡检测试剂盒购自北京Solarbio公司;酶联免疫吸附试剂盒购自上海继锦化学科技有限公司;Lipofectamine™ 2000转染试剂购自美国Invitrogen公司。酶标仪购自美国Thermo公司;流式细胞仪购自美国Bio-Rad公司。

1.2 细胞培养、处理及分组

心肌细胞H9c2用含10%胎牛血清的RPMI-

1640培养基在37℃、5%CO₂条件下培养,每2天换液1次,待细胞融合至90%左右时,进行消化传代。取对数生长期H9c2细胞,用10 mg/L LPS处理H9c2细胞作为LPS组;正常培养的细胞作为对照(Con)组;分别用50、100、200 mg/L的ME处理H9c2细胞,再用10 mg/L LPS处理,作为ME低(L)、中(M)、高(H)浓度组。将si-NC、si-S100B转染至H9c2细胞,再用10 mg/L LPS处理,作为LPS+si-NC组、LPS+si-S100B组;将pcDNA、pcDNA-S100B转染至H9c2细胞,用200 mg/L的ME处理,再用10 mg/L LPS处理,作为LPS+ME+pcDNA组、LPS+ME+pcDNA-S100B组。

1.3 酶联免疫吸附法检测TNF- α 、IL-6的分泌水平

各组心肌细胞培养48 h后取上清,参考ELISA试剂盒说明书操作,检测肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)的分泌水平。

1.4 流式细胞术检测心肌细胞凋亡

各组心肌细胞培养48 h后用预冷的PBS洗2次,与500 μ L结合缓冲液混合。加入10 μ L Annexin V-FITC,再加入5 μ L PI,混匀后避光孵育10 min。用流式细胞仪检测心肌细胞凋亡率。

1.5 Western blot 检测Bcl-2、Bax、S100B的蛋白表达

提取各组心肌细胞总蛋白,BCA试剂盒进行蛋白定量。蛋白上样量为60 μ g,SDS-PAGE凝胶电泳后,经电转将蛋白转移至PVDF膜上。用5%脱脂牛奶室温封闭90 min,分别加入对应的一抗,4℃孵育过夜,PBS洗3次,每次5 min;再加入二抗,室温孵育2 h,PBS洗涤3次,每次10 min,后进行曝光显影,再浸入定影液,洗去残液,晾干,拍照。将胶片用凝胶分析软件处理,测定蛋白条带的灰度值,目的条带和GAPDH条带灰度的比值为蛋白表达水平。

1.6 荧光定量PCR检测S100B mRNA的表达

各组心肌细胞培养48 h后,提取总RNA,进而将RNA反转录成cDNA,以 β -actin为内参,循环条件为:95℃ 30 s,60℃ 30 s;72℃ 30 s,共40个循环;60℃延长5 min。相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。S100B上游引物为:5'-ATGATGGAGACG-GCGAATG-3',下游引物为:5'-GCTACAACACGGCT-

GGAAAG-3'; β -actin 上游引物为:5'-TGGCACCCAG-CACAATGAA-3',下游引物为:5'-TAAGTCATAGTC-CGCCTAGAAG CA-3'。

1.7 统计学分析

计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组比较采用 *t* 检验,多组间比较行单因素方差分析,组间的两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

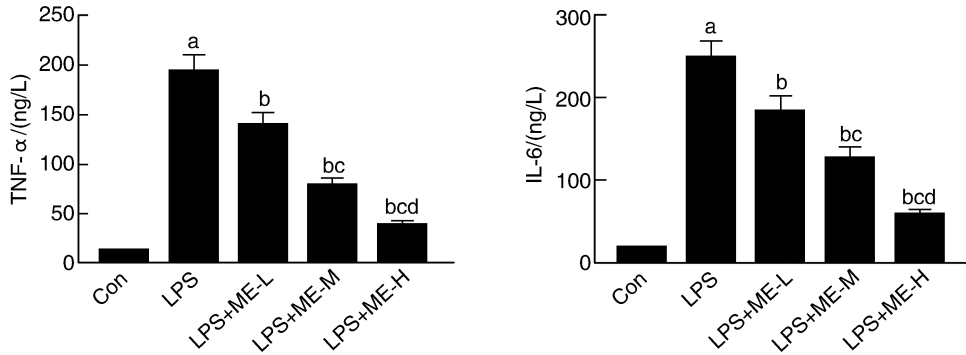


图 1. ME 对 LPS 致心肌细胞炎症反应的影响 ($n=3$)

a 为 $P<0.05$,与 Con 组比较;b 为 $P<0.05$,与 LPS 组比较;c 为 $P<0.05$,与 LPS+ME-L 组比较;d 为 $P<0.05$,与 LPS+ME-M 组比较。

Figure 1. Effect of ME on inflammatory response of cardiomyocyte induced by LPS ($n=3$)

2.2 ME 对 LPS 致心肌细胞凋亡的影响

与对照组相比,LPS 组心肌细胞凋亡率显著升高,Bcl-2 表达水平显著降低,Bax 表达水平显著升高($P<$

0.05);与 LPS 组相比,ME 低、中、高浓度组心肌细胞凋亡率显著降低,Bcl-2 表达水平显著升高,Bax 表达水平显著降低,且呈浓度依赖性($P<0.05$;图 2)。

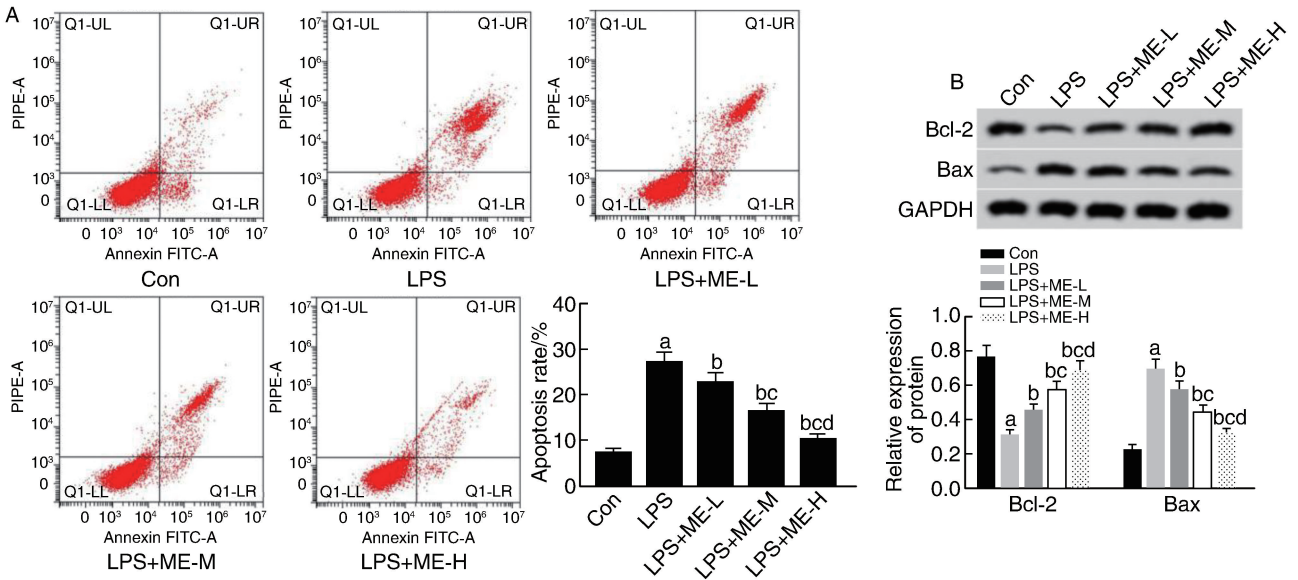


图 2. ME 对 LPS 致心肌细胞凋亡的影响 ($n=3$)

A 为流式细胞仪检测心肌细胞凋亡率,B 为 Western blot 检测心肌细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax。

a 为 $P<0.05$,与 Con 组比较;b 为 $P<0.05$,与 LPS 组比较;c 为 $P<0.05$,与 LPS+ME-L 组比较;d 为 $P<0.05$,与 LPS+ME-M 组比较。

Figure 2. Effect of ME on apoptosis of cardiomyocyte induced by LPS ($n=3$)

2.3 ME 对 LPS 致心肌细胞中 S100B 表达的影响

与对照组相比,LPS 组心肌细胞中 S100B

mRNA 和蛋白表达水平显著升高($P<0.05$);与 LPS 组相比,ME 低、中、高浓度组心肌细胞中 S100B mR-

NA 和蛋白表达水平显著降低,且呈浓度依赖性($P < 0.05$;图 3)。

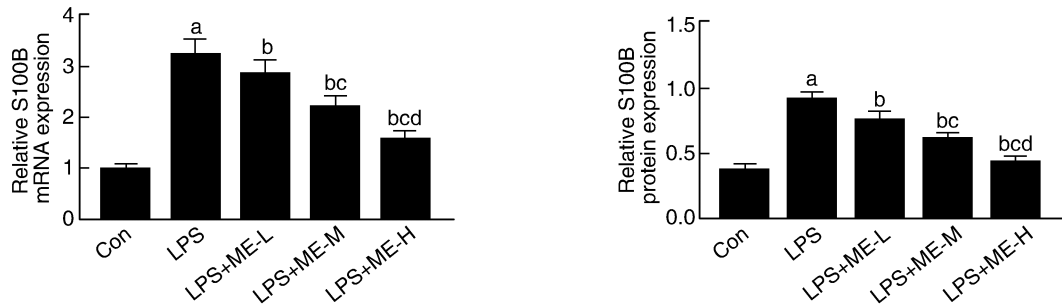


图 3. ME 对 LPS 致心肌细胞中 S100B 表达的影响 ($n=3$)

a 为 $P < 0.05$, 与 Con 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 LPS 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 LPS+ME-L 组比较; d 为 $P < 0.05$, 与 LPS+ME-M 组比较。

Figure 3. Effect of ME on the expression of S100B in cardiomyocyte induced by LPS ($n=3$)

2.4 干扰 S100B 表达对 LPS 致心肌细胞炎症反应和细胞凋亡的影响

与 LPS+si-NC 组相比, LPS+si-S100B 组心肌细

胞中 S100B、Bax 表达水平、TNF- α 、IL-6 水平、细胞凋亡率显著降低, Bcl-2 表达水平显著升高 ($P < 0.05$; 图 4)。

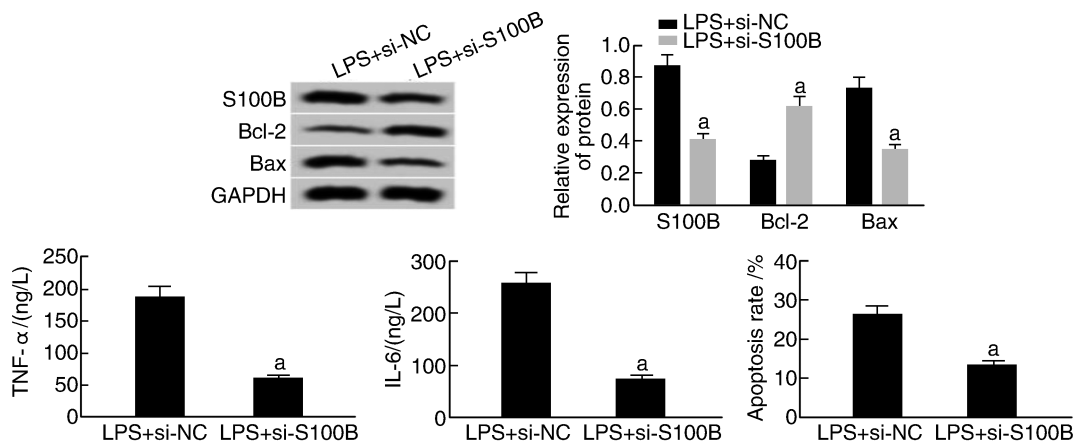


图 4. 干扰 S100B 表达对 LPS 致心肌细胞损伤的影响 ($n=3$)

a 为 $P < 0.05$, 与 LPS+si-NC 组比较。

Figure 4. Effect of interference with S100B expression on LPS-induced cardiomyocyte injury ($n=3$)

2.5 S100B 过表达逆转 ME 对 LPS 致心肌细胞炎症反应和细胞凋亡的作用

与 LPS 组相比, LPS+ME 组心肌细胞中 S100B、Bax 表达水平、TNF- α 、IL-6 水平、细胞凋亡率显著降低, Bcl-2 表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与 LPS+ME+pcDNA 组相比, LPS+ME+pcDNA-S100B 组心肌细胞中 S100B、Bax 表达水平、TNF- α 、IL-6 水平、细胞凋亡率显著升高, Bcl-2 表达水平显著降低 ($P < 0.05$; 图 5)。

3 讨论

脓毒症是一种临床常见的危重疾病, 心肌损伤

是脓毒症疾病中最为普遍的并发症, 中西医结合是治疗脓毒症心肌损伤的新方向^[8]。研究表明 LPS 可诱导心肌细胞炎症反应和细胞凋亡的发生^[9-10]。本研究发现, LPS 处理的心肌细胞中 TNF- α 、IL-6 水平显著升高, 细胞凋亡率显著升高, 表明 LPS 可诱导心肌细胞炎症反应和细胞凋亡。研究表明 ME 具有抗炎作用, 其可减少 LPS 诱导的促炎细胞因子 TNF- α 、IL-6 的分泌^[11]。ME 可降低乙酰氨基酚引起的肝脏炎症和氧化应激, 对乙酰氨基酚诱导的大鼠肝损伤有保护作用^[12]。ME 也可保护胰腺 β 细胞免于过氧化氢诱导的细胞凋亡^[13]。本研究用不同浓度 ME 处理 LPS 作用的心肌细胞, TNF- α 、IL-6 水平显著降低, 细胞凋亡率显著降低, Bcl-2 表达水

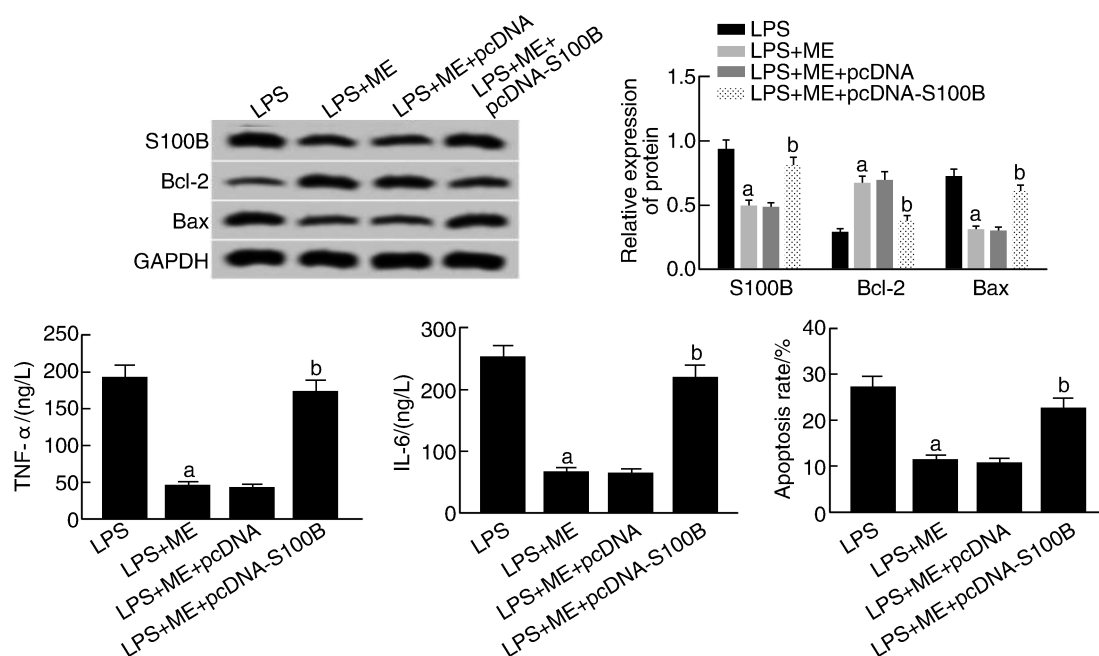


图 5. S100B 过表达逆转 ME 对 LPS 致心肌细胞损伤的作用 ($n=3$)

a 为 $P<0.05$, 与 LPS 组比较; b 为 $P<0.05$, 与 LPS+ME+pcDNA 组比较。

Figure 5. S100B overexpression reverses the effect of ME on LPS-induced cardiomyocyte injury ($n=3$)

平显著升高, Bax 表达水平显著降低。表明 ME 可以抑制炎症因子的释放, 抑制心肌细胞凋亡; 对 LPS 诱导的心肌细胞炎症反应和细胞凋亡具有保护作用。

研究发现 S100B 参与调控心肌肥厚、心肌细胞凋亡等, 可作为治疗心血管疾病有前景的干预靶点^[14]。S100B 过表达通过成纤维细胞生长因子受体 1 增加了 TNF- α 和 IL-1 β 的表达水平^[15]。S100B 沉默可改善缺血性中风大鼠模型的神经功能恢复并抑制海马细胞凋亡^[16]。穿心莲内酯通过促进自噬和下调 S100B 表达来保护小鼠星形胶质细胞免受缺氧损伤^[17]。本研究结果显示, 干扰 S100B 表达, TNF- α 、IL-6 水平显著降低, 细胞凋亡率显著降低, Bcl-2 表达水平显著升高, Bax 表达水平显著降低。说明干扰 S100B 表达可抑制 LPS 诱导的心肌细胞炎症反应和细胞凋亡。且 ME 处理的心肌细胞中 S100B 表达水平显著降低, S100B 过表达能逆转 ME 对 LPS 诱导的心肌细胞炎症反应和凋亡的抑制作用。提示 ME 可能通过下调 S100B 抑制心肌细胞炎症反应和凋亡。

综上所述, ME 可抑制 LPS 诱导的心肌细胞炎症反应和细胞凋亡, 其机制可能与 S100B 有关, 这将为心肌细胞炎症反应和凋亡引起的相关疾病的防治提供新途径和新思路。

[参考文献]

- [1] 王慧玲, 李越华. 中药治疗脓毒症研究进展[J]. 山东中医杂志, 2016, 35(2): 175-176.
- [2] 何丹, 赵亚楠, 陈丹, 等. 白藜芦醇对脂多糖诱导细胞炎症衰老的抑制作用及机制[J]. 华西药理学杂志, 2019, 34(4): 352-355.
- [3] 孙乐, 张小东, 郭迎迎. 桑葚的化学成分和药理作用研究进展[J]. 人参研究, 2016, 28(2): 49-54.
- [4] 张兰兰, 何承辉, 古丽斯坦·阿吾提, 等. 桑椹提取物对小鼠急性肝损伤保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(15): 149-152.
- [5] 朱翠玲, 陈铭, 汪孟涵, 等. 桑葚提取物体外抗炎作用及机制的研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(4): 61-66.
- [6] 韩尧辉, 潘皓, 毛俊倩, 等. S100B 在多柔比星诱导心肌细胞损伤中的表达及作用[J]. 江苏大学学报(医学版), 2013, 23(3): 216-219.
- [7] 张静, 张凯, 张永靖. 干扰 S100 钙结合蛋白 B 表达对多柔比星诱导心肌细胞凋亡的影响及相关机制[J]. 世界临床药物, 2019, 40(1): 29-33.
- [8] 刘敏, 罗苑苑, 林新锋. 中西医结合治疗脓毒症心肌损伤的研究进展[J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(4): 200-202.
- [9] 李萌芳, 陈隆望, 胡系意, 等. 黄芩苷对脂多糖诱导的 H9C2 心肌细胞炎症的保护作用及机制研究[J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28(8): 983-988.

(下转第 146 页)

- 氨酸对老年冠心病病人病情的影响[J]. 实用老年医学, 2017, 37(5): 454-457.
- [4] CHEN T, XING J Y, LIU Y S, et al. Effects of telmisartan on vascular endothelial function, inflammation and insulin resistance in patients with coronary heart disease and diabetes mellitus[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(1): 909-913.
- [5] RAZA A, STEINBERG K, TARTAGLIA J, et al. Enhanced external counterpulsation therapy: past, present, and future[J]. *Cardiol Rev*, 2017, 25(2): 59-67.
- [6] BUSCHMANN E E, HILLMEISTER P, PERSSON A B, et al. Short-term external counter pulsation augments cerebral blood flow and tissue oxygenation in chronic cerebrovascular occlusive disease[J]. *Eur J Neurol*, 2018, 25(11): 1326-1332.
- [7] SARDINA P D, MARTIN J S, AVERY J C, et al. Enhanced external counter pulsation (EECP) improves biomarkers of glycemic control in patients with non-insulin-dependent type II diabetes mellitus for up to 3 months following treatment[J]. *Acta Diabetol*, 2016, 53(5): 745-752.
- [8] 周福亮, 贾大林. 内皮细胞特异分子-1 在心血管疾病中的研究进展[J]. *解剖科学进展*, 2018, 24(5): 554-557.
- [9] HAO F, ZHANG H J, ZHU J Y, et al. Association between vaspin level and coronary artery disease in patients with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2016, 113: 26-32.
- [10] 张健瑜, 梁茜, 许兆延. 冠状动脉微循环障碍的研究现状及性别差异[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(8): 850-855.
- [11] QIN X X, DENG Y Y, WU D D, et al. Does enhanced external counter pulsation (EECP) significantly affect myocardial perfusion: a systematic review & Meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0151822.
- [12] 谭永锦, 谭锦业, 苏小红, 等. 增强型体外反搏对冠心病支架置入术后患者心肌微循环阻力的影响[J]. *中国心血管病研究*, 2019, 17(5): 431-435.
- [13] 孙刚, 吴宇红, 张学芳, 等. 增强型体外反搏对不稳定型心绞痛患者经皮冠状动脉介入治疗后血流的短期效应与安全性[J]. *岭南心血管病杂志*, 2018, 24(1): 9-13.
- [14] 滕晓焕, 赵兰蒂. 增强型体外反搏在心脏康复中的应用[J]. *安徽医药*, 2020, 24(2): 217-220.
- [15] 赵海燕, 王晓非. Endocan 在呼吸系统和心血管系统疾病中作用的研究进展[J]. *医学综述*, 2018, 24(17): 3345-3349.
- [16] 刘琨, 赵云峰, 李公豪. 瑞舒伐他汀对 CHD 患者血清 Vaspin、ROCK 活性及 FMD 影响及其临床意义[J]. *中国心血管病研究*, 2017, 15(7): 655-659.
- [17] 张宝伟, 王好, 沈冬丽, 等. 丝氨酸蛋白酶抑制物 vaspin 对缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡的影响[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2017, 27(5): 408-411.
- (此文编辑 文玉珊)

(上接第 129 页)

- [10] 杨春华, 王珂, 魏振衡, 等. TAGLN2 基因 siRNA 对脂多糖诱导的 H9C2 心肌细胞凋亡及氧化损伤的机制研究[J]. *临床内科杂志*, 2019, 36(4): 267-270.
- [11] JUNG S, LEE M S, CHOI A J, et al. Anti-inflammatory effects of high hydrostatic pressure extract of mulberry (morus alba) fruit on LPS-stimulated RAW264.7 cells[J]. *Molecules*, 2019, 24(7): E1425.
- [12] HORNG C T, LIU Z H, HUANG Y T, et al. Extract from mulberry (morus australis) leaf decelerate acetaminophen induced hepatic inflammation involving downregulation of myeloid differentiation factor 88 (MyD88) signals[J]. *J Food Drug Anal*, 2017, 25(4): 862-871.
- [13] LEE J S, KIM Y R, PARK J M, et al. Mulberry fruit extract protects pancreatic β -cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis via antioxidative activity[J]. *Molecules*, 2014, 19(7): 8904-8915.
- [14] 陈跃武, 陈家显, 陈磊, 等. S100B 在心血管疾病中的作用[J]. *海南医学院学报*, 2019, 25(7): 557-560.
- [15] ZHU L, WENG Z, SHEN P, et al. S100B regulates inflammatory response during osteoarthritis via fibroblast growth factor receptor 1 signaling[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(6): 4855-4864.
- [16] ZHANG J H, LI J K, MA L L, et al. RNA interference-mediated silencing of S100B improves nerve function recovery and inhibits hippocampal cell apoptosis in rat models of ischemic stroke[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(10): 8095-8111.
- [17] DU J, ZHANG C, NA X, et al. Andrographolide protects mouse astrocytes against hypoxia injury by promoting autophagy and S100B expression[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2018, 51(6): e7061.
- (此文编辑 曾学清)