

· 基础研究 ·

二甲双胍对脂多糖诱导的大鼠心肌细胞 H9C2 损伤的保护机制

高 婷^{1,2}, 陈 忠^{2*}¹上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; ²上海健康医学院附属第六人民医院东院心内科, 上海 201306

[摘要] 目的: 研究二甲双胍(metformin, Met)对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的大鼠心肌细胞 H9C2 损伤的保护作用及机制。方法: 心肌细胞 H9C2 按照不同处理方式分为对照组、LPS 组及 3 种不同浓度 Met 与 LPS 联合培养组。培养 24 h 后采用 MTT 法测定各组细胞活力, 流式细胞技术检测各组细胞凋亡和活性氧水平, 蛋白质印迹法检测各组 Caspase3、BCL2、BAX、腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, t-AMPK)、磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(phosphorylated adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, p-AMPK)、Beclin1、Parkin 的蛋白表达。结果: 和 LPS 单独处理组相比, Met 与 LPS 联合培养降低了 LPS 诱导的细胞活力增强和细胞凋亡增多, 降低了 BCL2、BAX 蛋白表达, Caspase3 表达未降低; p-AMPK、Beclin1、Parkin 蛋白表达增加, 细胞活性氧水平降低。结论: Met 可能通过活化 AMPK 途径, 增加细胞自噬、减少活性氧产生, 减轻脂多糖对细胞的损伤, 保护心肌细胞。

[关键词] 二甲双胍; 脂多糖; 脓毒症; 线粒体**[中图分类号]** R631**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)09-1298-06**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190907

Protective mechanism of metformin on injury of rat cardiomyocyte H9C2 induced by lipopolysaccharide

Gao Ting^{1,2}, Chen Zhong^{2*}¹College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; ²Department of Cardiology, the Sixth People's Hospital East Affiliated to Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai 201306, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the protective mechanism of metformin (Met) on rat cardiomyocytes H9C2 injury induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods:** Rat cardiomyocytes H9C2 were divided into Control group, LPS group, Met of different concentrations added with LPS group, according to different treatments. Cells were cultured for 24 hours. MTT was used to detect the cell viability, and intracellular reaction oxygen species and apoptosis were detected by the flow cytometry. The protein levels of Caspase3, BCL2, BAX, t-AMPK (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase), p-AMPK (phosphorylated adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase), Beclin1 and Parkin were measured by Western blot. **Results:** Compared with LPS treatment alone, combine of Met and LPS decreased cell viability and apoptosis induced by LPS. The expressions of BCL2 and BAX proteins were decreased, while the Caspase3 protein expression was not decreased. And the expressions of p-AMPK, Beclin1 and Parkin proteins were increased, and the level of reactive oxygen species was deduced. **Conclusion:** Met may increase autophagy and reduce the production of reactive oxygen species by activating AMPK pathway, alleviate the damage of LPS to cells and protect myocardial cells.

[Key words] metformin; lipopolysaccharide; sepsis; mitochondria

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(09): 1298-1303]

[基金项目] 上海市浦东新区科经委项目(PKJ2018-Y53)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhongchen7498@hotmail.com

脓毒症是一种全身性炎症反应性疾病, 脓毒症进展很快并可危及生命, 这也是其病死率较高的主要原因^[1]。越来越多的研究表明心衰是脓毒症的一种常见并发症^[2-3]。脓毒症引起的心肌功能障碍也

是脓毒症患者的主要死亡原因^[4]。然而脓毒症引起心肌功能障碍的原因目前仍未阐明。研究发现,心肌细胞产生的促炎性因子和凋亡在心肌功能障碍的发病机制中起到了至关重要的作用^[5-6]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)已经被广泛应用于诱导心肌细胞炎症和凋亡^[7]。因此,应用LPS引起的心肌细胞炎症反应和凋亡可以作为研究脓毒症引起的心肌功能障碍的有效模型。

二甲双胍(metformin, Met)是一种治疗糖尿病的药物,它可以通过降低糖异生来提高外周组织吸收和利用葡萄糖,减低肝葡萄糖输出,降低肠道吸收碳水化合物,增强机体对胰岛素的灵敏度^[8-9]。除了降血糖作用外, Met在各种组织中表现出抗氧化特性和降低脂质氧化的作用^[10-11]。此外, Met已经被证明对细胞具有保护作用,可以直接对心肌细胞和线粒体起作用,因此其不依赖于胰岛素的增敏作用^[12]。

1 材料和方法

1.1 材料

大鼠心肌细胞株H9C2(ATCC细胞库,美国);胎牛血清、青霉素/链霉素、DMEM培养基、胰蛋白酶(Gibco公司,美国);LPS(Peprotech公司,美国);Met(Sigma公司,美国);MTT试剂盒(北京索莱宝公司);细胞凋亡检测试剂盒和ROS检测试剂盒(上海翊圣公司);BCA蛋白定量试剂盒(杭州碧云天公司);抗Cleaved Caspase 3、BCL2、BAX、磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(phosphorylated adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, p-AMPK)、腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, t-AMPK)、Beclin1、Parkin、GAPDH抗体(Abcam公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

以10%FBS、1%青霉素/链霉素混合液的DMEM培养基,37℃CO₂恒温培养箱培养H9C2细胞。待细胞生长至80%,胰酶消化,接种至6孔板中培养。将细胞分为对照组(无LPS和Met处理)、LPS组、LPS+Met(1 mmol/L)组、LPS+Met(2 mmol/L)组、LPS+Met(5 mmol/L)组。待细胞长至80%,以含1 μg/mL LPS或1 μg/mL LPS与相应浓度的Met联合作用24 h,每组3个复孔。

1.2.2 细胞活力检测

根据四唑盐比色法(MTT)试剂盒操作说明书检

测各组细胞存活率。酶标仪检测各组细胞在490 nm处的吸光度值,细胞存活率=(实验组吸光度值-空白组吸光度值)/(对照组吸光度值-空白组吸光度值)×100%。

1.2.3 细胞凋亡和ROS检测

用不含EDTA的胰酶消化H9C2细胞,于300 g、4℃离心5 min。去液体后,加入新配制的1×Binding Buffer重悬细胞,并调节细胞浓度至1×10⁶个/mL。取100 μL细胞悬液和400 μL PBS混匀于流式检测管中,加入5 μL Annexin V-Alexa Fluor 488和10 μL PI,轻轻混匀。在避光、室温条件下反应15 min,用流式细胞仪检测细胞凋亡。

细胞处理结束后,无血清培养基稀释DCFH-DA,配制工作液,浓度为10 μmol/L。去除细胞培养液,每孔加入1 mL DCFH-DA工作液,37℃恒温培养箱中孵育30 min。用无血清细胞培养基洗涤细胞,充分去除多余的DCFH-DA。流式细胞仪检测细胞活性氧水平。

1.2.4 Western blot检测

细胞处理后,用细胞裂解液提取细胞蛋白,BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,统一蛋白上样量。12%聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)进行电泳;转膜、封闭后,分别孵育Caspase3、BCL2、BAX、p-AMPK、t-AMPK、Beclin1、Parkin、GAPDH抗体过夜;次日,TBST洗涤后分别加入对应的羊抗兔或羊抗鼠二抗室温孵育1 h;TBST洗涤后加上ECL显色液,凝胶成像分析仪进行显影。GAPDH为内参蛋白,用Image J软件分析各条带的灰度值,并计算其与内参抗体的比值。

1.3 统计学方法

所有实验结果均来自3次以上独立实验。采用GraphPad 7.0软件进行统计学分析,以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组均数比较采用单因素方差检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Met对H9C2细胞活力的影响

采用MTT法对细胞活性进行检测,与对照组相比,LPS能明显增加H9C2细胞的活力;LPS+Met(1 mmol/L)组细胞活力低于LPS诱导组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。LPS+Met(2 mmol/L)组、LPS+Met(5 mmol/L)组细胞活力明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$),且随着Met浓度增加,抑制作用逐渐增强(图1)。

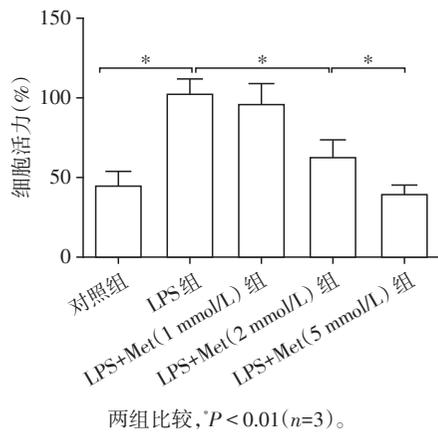


图1 Met对细胞活力的影响

Figure 1 The effect of metformin on viability of H9C2 cells

2.2 Met对H9C2细胞凋亡的影响

采取流式细胞术对细胞晚期凋亡数进行检测。与对照组相比,LPS组凋亡细胞数明显增多,LPS+Met(1 mmol/L)组细胞晚期凋亡比例显著低于LPS组,差异有统计学意义($P < 0.01$);LPS+Met(2 mmol/L)组、LPS+Met(5 mmol/L)组同样可以降低LPS引起的晚期凋亡,但与LPS+Met(1 mmol/L)组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$,图2)。

2.3 Met对细胞凋亡相关蛋白BAX、BCL2、Caspase3的影响

与对照组相比,LPS组BAX、BCL2蛋白表达显

著增加,差异有统计学意义($P < 0.01$,图3)。LPS+Met(1 mmol/L)组BAX、BCL2蛋白水平显著下降($P < 0.01$),随着Met浓度的上升,BAX逐渐减少,差异皆有统计学意义($P < 0.01$);但LPS+Met(5 mmol/L)组BCL2蛋白表达有所回升,与LPS组差异无统计学意义($P > 0.05$)。LPS组Caspase3表达显著升高($P < 0.01$),但LPS+Met(1 mmol/L)组、LPS+Met(2 mmol/L)组、LPS+Met(5 mmol/L)组与LPS组相比,Caspase3蛋白表达未降低,差异无统计学意义($P > 0.05$)。最终蛋白相对含量均以目的蛋白/GAPDH校正。

2.4 Met对H9C2细胞p-AMPK以及t-AMPK表达的影响

采用蛋白质印迹法检测H9C2细胞磷酸化AMPK(p-AMPK)以及总AMPK(t-AMPK)水平。与对照组相比,LPS组p-AMPK水平升高($P < 0.05$,图4),加用2 mmol/L、5 mmol/L Met处理后的p-AMPK水平显著增加,并且差异有统计学意义($P < 0.01$)。而t-AMPK表达无明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$)。最终蛋白相对含量均以目的蛋白/GAPDH校正。

2.5 Met对H9C2细胞自噬相关蛋白Beclin1、Parkin的影响

进一步研究Met是否可以逆转LPS引起的

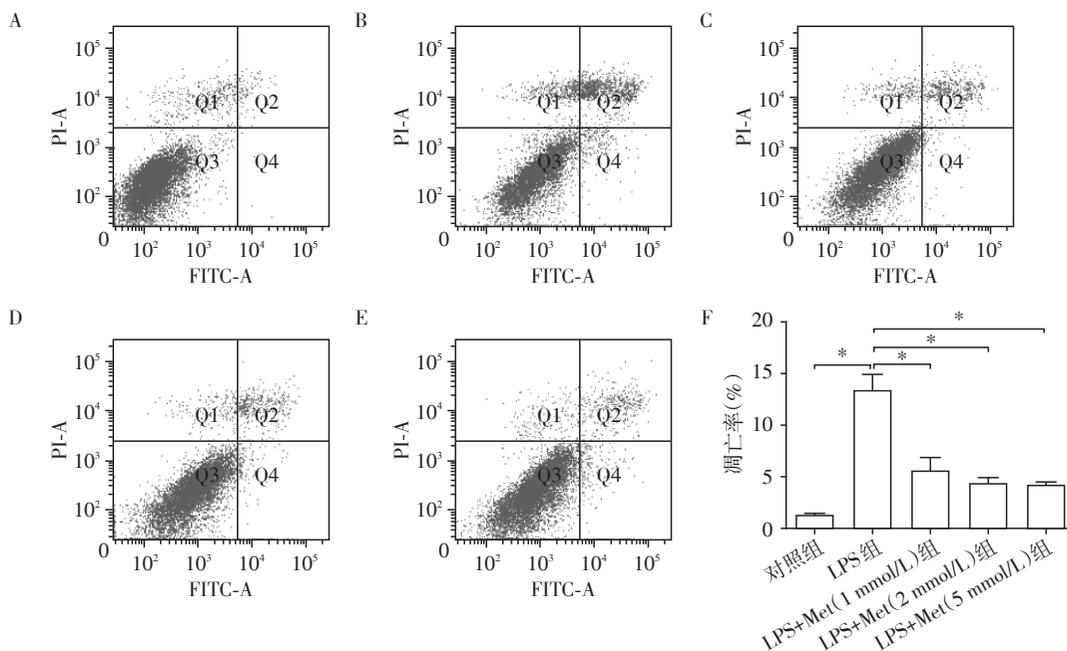
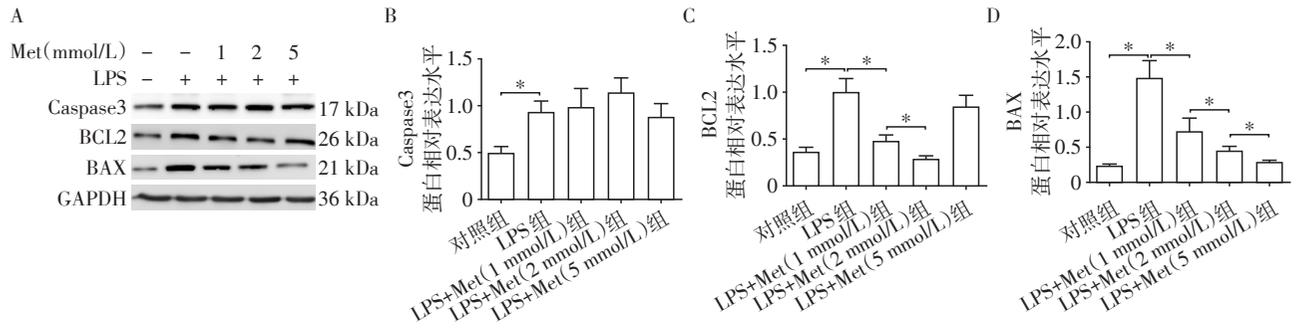


图2 Met对细胞凋亡的影响

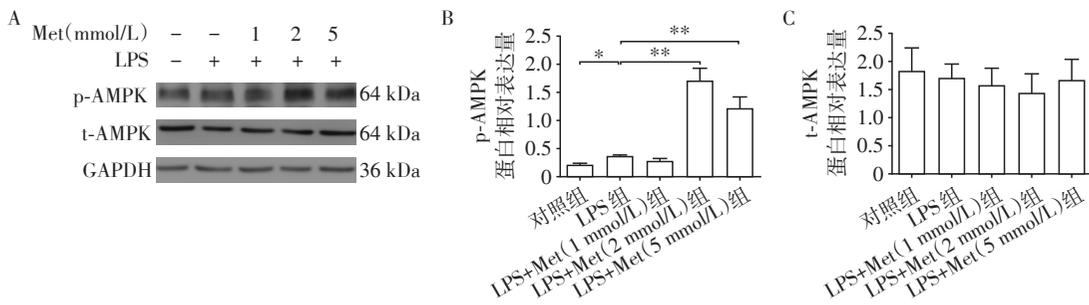
Figure 2 The effect of metformin on apoptosis of H9C2 cells



A: Western blot 检测 Caspase3、BCL2、BAX 的表达; B: Caspase3 蛋白相对表达水平; C: BCL2 蛋白相对表达水平; D: BAX 蛋白相对表达水平。两组比较, $P < 0.01 (n=3)$ 。

图3 Met对细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Figure 3 The effect of metformin on the expression of proteins related to cell apoptosis



A: Western blot 检测 p-AMPK、t-AMPK 的表达; B: p-AMPK 蛋白相对表达水平; C: t-AMPK 蛋白相对表达水平。两组比较, $P < 0.05$, $^{**}P < 0.01 (n=3)$ 。

图4 Met对p-AMPK和t-AMPK蛋白表达的影响

Figure 4 The effect of metformin on the expression of p-AMPK and t-AMPK proteins

H9C2细胞自噬蛋白减少。1 mmol/L Met显著逆转了LPS引起的自噬蛋白Beclin1和Parkin的降低($P < 0.01$,图5),而给予2 mmol/L、5 mmol/L Met处理后,Beclin1表达随着Met浓度升高而下降,但均显著高于LPS诱导组,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。最终蛋白相对含量均以目的蛋白/GAPDH校正。

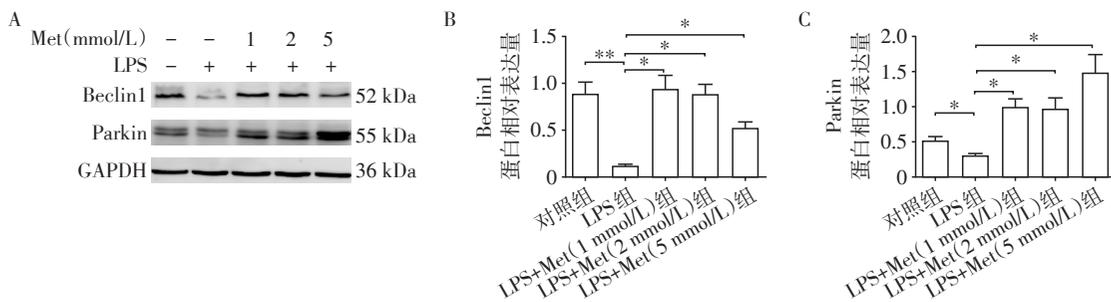
2.6 Met对H9C2细胞内ROS生成的影响

通过流式细胞术检测细胞内ROS的表达含量。LPS组细胞内ROS的产生量明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$,图6);1 mmol/L Met显著降

低细胞内ROS的产生($P < 0.01$),2 mmol/L、5 mmol/L Met同样可以降低LPS引起的ROS含量的升高。

3 讨论

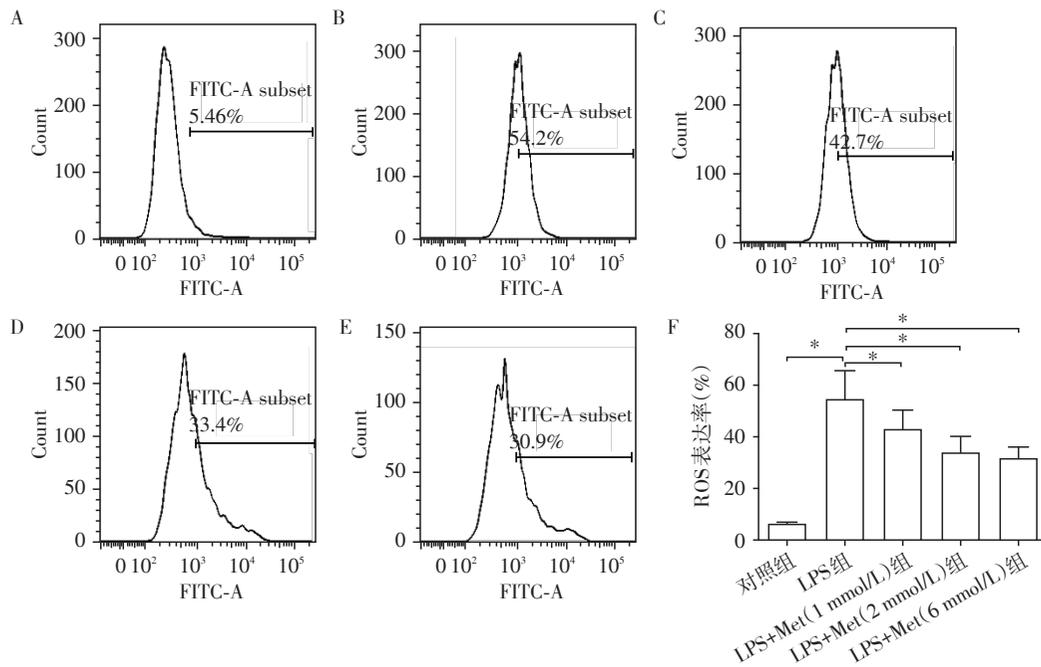
脓毒症导致心肌损伤的机制还未完全明确,脓毒症损伤心肌组织的结构和功能,目前认为可能与线粒体功能障碍、氧化应激等有关^[13-14]。Met是临床用于治疗2型糖尿病、肥胖型多囊卵巢综合征的常用药,可降低2型糖尿病患者心血管疾病的发生率。Met对肺癌等多种肿瘤细胞也有促凋亡及抑



A: Western blot 检测 Beclin1、Parkin 的表达; B: Beclin1 蛋白相对表达水平; C: Parkin 蛋白相对表达水平。两组比较, $^{*}P < 0.01 (n=3)$ 。

图5 Met对Beclin1和Parkin蛋白表达的影响

Figure 5 The effect of metformin on expression of Beclin1 and Parkin proteins



A: 对照组; B: LPS组; C: LPS+ Met(1 mmol/L)组; D: LPS+ Met(2 mmol/L)组; E: LPS+ Met(5 mmol/L)组; F: 各组细胞ROS水平定量分析。两组比较, * $P < 0.01$ ($n=3$)。

图6 Met对细胞内ROS产生的影响

Figure 6 The effect of metformin on the cellular ROS generated

制细胞增殖的作用,并且通过自噬作用防止肿瘤生成^[15-17]。本研究中,LPS诱导的心肌细胞H9C2脓毒症模型组细胞凋亡增加,经Met治疗后,细胞凋亡率及凋亡相关蛋白表达均明显减少,证明Met可通过减少细胞凋亡,减轻脓毒症对细胞的损伤,从而保护细胞。

脓毒症会导致线粒体功能障碍,出现氧化应激反应,包括ROS产生过多、线粒体自噬受损等。有研究发现,减少线粒体ROS的产生,可以抑制凋亡信号通路^[18]。Met能够减轻高糖所导致的心功能不全,减少ROS产生,减轻线粒体损伤^[19]。Met还能够诱发自噬,并能修复多种被其他途径抑制的线粒体自噬作用^[20]。AMPK是一种能量感受器,在细胞能量稳态调节中起到关键作用^[21]。AMPK同时被认为是心脏能量代谢的关键调节因子,AMPK的磷酸化参与心肌细胞能量代谢并可以减轻心肌细胞损伤^[22-23]。王振等^[24]研究发现,在氧化应激条件下,脂联素可通过AMPK/mTOR通路抑制大鼠髓核细胞的凋亡。最近研究表明,AMPK激活可以减轻H9C2细胞在缺氧和复氧过程中的炎症反应^[25],并抑制缺血再灌注引起的心肌细胞凋亡^[26]。

有研究证明,3 $\mu\text{mol/L}$ 和5 $\mu\text{mol/L}$ Met均能增加高糖培养的H9C2细胞活力^[19],0.1 mmol/L Met能减轻阿霉素对H9C2细胞活力的抑制作用,而1 mmol/L

Met并没有缓解阿霉素对细胞活力的影响^[27]。本研究采用的Met浓度为1、2、5 mmol/L,降低了H9C2细胞的活力。由此认为高浓度Met可能会影响H9C2细胞的活力。因此,Met浓度对H9C2细胞活力的影响以及细胞活力降低对细胞的影响还有待进一步研究。

在本研究中,LPS引起细胞凋亡和ROS水平升高,而Met明显减少了细胞凋亡,并降低了活性氧水平;同时Met显著增加了自噬相关蛋白Beclin1和Parkin以及p-AMPK的蛋白水平。本研究结果提示,Met可以激活AMPK途径,改善自噬作用以及抑制ROS产生。因此推测Met可能通过AMPK信号通路调节自噬、凋亡及氧化应激反应,减轻LPS引起的H9C2细胞的损伤。

综上所述,激活AMPK通路可能是Met对LPS诱导的脓毒症心肌细胞损伤的保护机制,这将为脓毒症心肌病的治疗提供新方法;而关于较高浓度Met对细胞活力和凋亡的双重影响最终是否会为心肌细胞带来益处有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Sammon JD, Klett DE, Sood A, et al. Sepsis after major cancer surgery[J]. J Surg Res. 2015, 193(2): 788-794
 [2] Merx M, Weber C. Sepsis and the heart[J]. Circulation, 2007, 116(7): 793-802

- [3] Yang P, Han Y, Gui L, et al. Gastrodin attenuation of the inflammatory response in H9C2 cardiomyocytes involves inhibition of NF- κ B and MAPKs activation via the phosphatidylinositol 3-kinase signaling[J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(8):1124-1133
- [4] Maeder M, Fehr T, Rickli H, et al. Sepsis-associated myocardial dysfunction - diagnostic and prognostic impact of cardiac troponins and natriuretic peptides [J]. *Chest*, 2006, 129(5):1349-1366
- [5] Zanotti-Cavazzoni SL, Hollenberg SM. Cardiac dysfunction in severe sepsis and septic shock[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2009, 15(5):392-397
- [6] Ayala A, Perl M, Venet F, et al. Apoptosis in sepsis: mechanisms, clinical impact and potential therapeutic targets [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(19):1853-1859
- [7] Zhou H, Yuan Y, Liu Y, et al. Icariin protects H9c2 cardiomyocytes from lipopolysaccharide - induced injury via inhibition of the reactive oxygen species-dependent c-Jun N-terminal kinases/nuclear factor-kappa B pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(6):4327-4332
- [8] Klip A, Leiter LA. Cellular mechanism of action of metformin[J]. *Diabetes Care*, 1990, 13(6):696-704
- [9] Cusi K, Consoli A, Defronzo RA. Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81(11):4059-4067
- [10] Faure P, Rossini E, Wiernsperger N, et al. An insulin sensitizer improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity in high fructose-fed rats[J]. *Diabetes*, 1999, 48(2):353-357
- [11] Kanigür-Sultuybek G, Güven M, Onaran I, et al. The effect of metformin on insulin receptors and lipid peroxidation in alloxan and streptozotocin induced diabetes [J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 1995, 6(3/4):271-280
- [12] Bhamra GS, Hausenloy DJ, Davidson SM, et al. Metformin protects the ischemic heart by the Akt-mediated inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening [J]. *Basic Res Cardiol*, 2008, 103(3):274-284
- [13] Kwon OK, Lee W, Kim SJ, et al. In-depth proteomics approach of secretome to identify novel biomarker for sepsis in LPS-stimulated endothelial cells [J]. *Electrophoresis*, 2015, 36(23):2851-2858
- [14] Luo Q, Yang AK, Cao Q, et al. 3,3-Diindolylmethane protects cardiomyocytes from LPS - induced inflammatory response and apoptosis [J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2018, 19(1):71
- [15] Liu YY, Hu XN, Shan XE, et al. Rosiglitazone metformin adduct inhibits hepatocellular carcinoma proliferation via activation of AMPK/p21 pathway [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19(1):13
- [16] De Santi M, Baldelli G, Diotallevi AA, et al. Metformin prevents cell tumorigenesis through autophagy - related cell death [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):66
- [17] Luo Z, Zhu TT, Luo W, et al. Metformin induces apoptotic cytotoxicity depending on AMPK/PKA/GSK-3 beta-mediated c-FLIPL degradation in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11:681-689
- [18] Huang Q, Zhou HJ, Zhang H, et al. Thioredoxin-2 inhibits mitochondrial ROS Generation and ASK1 activity to maintain cardiac function [J]. *Circulation*, 2015, 131(12):1082
- [19] 王光宇, 毕亚光, 刘向东, 等. 二甲双胍对高糖培养H9c2细胞 Connexin43 表达的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(7):920-924
- [20] Song YM, Lee WK, Lee YH, et al. Metformin restores Parkin-mediated mitophagy, suppressed by cytosolic p53 [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(1):122
- [21] Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(9):1016-1023
- [22] Liu Z, Chen JM, Huang H, et al. The protective effect of trimetazidine on myocardial ischemia/reperfusion injury through activating AMPK and ERK signaling pathway [J]. *Metabolism*, 2016, 65(3):122-130
- [23] Zaha VG, Qi DK, Su KN, et al. AMPK is critical for mitochondrial function during reperfusion after myocardial ischemia [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 91:104-113
- [24] 王 振, 胡峻铮, 范卫民. 脂联素通过 AMPK/mTOR 通路抑制 H₂O₂ 诱导的大鼠髓核细胞凋亡及细胞外基质退变 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(7):72-77, 105
- [25] Chen X, Li X, Zhang WY, et al. Activation of AMPK inhibits inflammatory response during hypoxia and reoxygenation through modulating JNK-mediated NF-kappa B pathway [J]. *Metabolism*, 2018, 83:256-270
- [26] Li F, Zheng X, Fan X, et al. YiQiFuMai powder injection attenuates ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis through AMPK activation [J]. *Rejuvenation Res*, 2016, 19(6):495-508
- [27] Kobashigawa LC, Xu YC, Padbury JF, et al. Metformin protects cardiomyocyte from doxorubicin induced cytotoxicity through an AMP-activated protein kinase dependent signaling pathway: an *in vitro* study [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8):e104888