

类叶升麻苷调控 Rnd3/NF- κ B 通路对缺氧/复氧诱导心肌细胞损伤的影响^Δ

杨 洋*, 李天发#, 王 军, 黄 珊, 凌学斌(海南医学院第一附属医院心血管内科, 海口 570102)

中图分类号 R965.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)05-0542-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.05.06



摘要 目的 探讨类叶升麻苷调控 Rho 家族 GTP 酶 3(Rnd3)/核因子 κ B(NF- κ B)通路对缺氧/复氧(H/R)诱导心肌细胞损伤的影响。方法 本实验将 H9c2 心肌细胞分为对照组(不给药、不造模)、H/R 组(仅造模)、H/R+AS-L 组、H/R+AS-M 组、H/R+AS-H 组(以上 3 组先分别给予 10、30、90 μ mol/L 类叶升麻苷,再造模)、H/R+pcDNA 组[先转染 pcDNA(空载体),再造模]、H/R+pcDNA-Rnd3 组[先转染 pcDNA-Rnd3(Rnd3 过表达载体)使 Rnd3 过表达,再造模]、H/R+AS-H+si-NC 组[先转染 si-NC(阴性对照),然后给予 90 μ mol/L 类叶升麻苷,再造模]、H/R+AS-H+si-Rnd3 组[先转染 si-Rnd3(Rnd3 小分子干扰 RNA)抑制 Rnd3 过表达,然后给予 90 μ mol/L 类叶升麻苷,再造模]。各组经相应处理后,检测细胞凋亡率和细胞中乳酸脱氢酶(LDH)释放量、丙二醛(MDA)水平、超氧化物歧化酶(SOD)活性、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平、白细胞介素 1 β (IL-1 β)水平、IL-6 水平、Rnd3 和 NF- κ B 亚基 p65(NF- κ B p65) mRNA 及蛋白的表达、活化胱天蛋白酶 3(Cleaved Caspase-3)和 Cleaved Caspase-9 蛋白表达的变化。结果 给予不同浓度类叶升麻苷均可降低 H/R 诱导 H9c2 心肌细胞凋亡率、Cleaved Caspase-3 和 Cleaved Caspase-9 蛋白表达水平、NF- κ B p65 mRNA 及蛋白表达水平、LDH 释放量和 MDA、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平,升高 SOD 活性和 Rnd3 mRNA 及蛋白表达水平($P<0.05$),且呈剂量依赖性。Rnd3 过表达可使 H/R 诱导 H9c2 心肌细胞凋亡率、NF- κ B p65、Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9 蛋白表达水平,LDH 释放量和 MDA、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平降低,使 Rnd3 蛋白表达水平和 SOD 活性升高($P<0.05$);而抑制 Rnd3 过表达,可减弱类叶升麻苷对 H/R 诱导 H9c2 心肌细胞的凋亡、氧化应激及炎症反应的抑制作用($P<0.05$)。结论 类叶升麻苷可通过促进 Rnd3 表达、抑制 NF- κ B p65 表达来调控 Rnd3/NF- κ B 通路,进而抑制心肌细胞凋亡、氧化应激及炎症反应,从而减轻 H/R 诱导的心肌细胞损伤。

关键词 类叶升麻苷; Rnd3/NF- κ B 通路; 缺氧/复氧; H9c2 心肌细胞; 细胞凋亡; 氧化应激; 炎症反应

Effects of acteoside on hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte damage by regulating the Rnd3/NF- κ B pathway

YANG Yang, LI Tianfa, WANG Jun, HUANG Shan, LING Xuebin (Dept. of Cardiovascular Medicine, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the effects of acteoside on hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced cardiomyocyte damage by regulating Rho family GTPase 3 (Rnd3)/nuclear factor κ B (NF- κ B) pathway. **METHODS** The H9c2 cardiomyocyte were divided into control group (no administration, no modeling), H/R group (only modeling), H/R+AS-L group, H/R+AS-M group, H/R+AS-H group (10, 30, 90 μ mol/L acteoside for above 3 groups firstly, and then modeling), H/R+pcDNA group [transfecting pcDNA (empty vector) firstly, and then modeling], H/R + pcDNA-Rnd3 group [overexpression of Rnd3 by transfecting pcDNA-Rnd3 (Rnd3 overexpression vector) firstly, and then modeling], H/R+AS-H+si-NC group [transfecting si-NC (negative control) firstly, and then giving 90 μ mol/L acteoside and modeling], H/R+AS-H+si-Rnd3 group [inhibiting overexpression of Rnd3 by transfecting si-Rnd3 (Rnd3 small interfering RNA) firstly, and then giving 90 μ mol/L acteoside and modeling]. After corresponding treatment, the apoptotic rate, release of lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA) level, the activity of superoxide dismutase (SOD), the level of tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6), mRNA and protein expression of Rnd3 and NF- κ B subunit p65 (NF- κ B p65), the expression of aspartate proteolytic enzyme 3 (Cleaved Caspase-3) protein and Cleaved Caspase-9 protein were detected. **RESULTS** Different concentrations of acteoside could reduce the apoptotic rate of H/R-induced H9c2 cardiomyocyte, the protein expressions of Cleaved Caspase-3 and Cleaved Caspase-9, mRNA and protein expressions of NF- κ B p65, the levels of LDH release and MDA, TNF- α , IL-1 β and IL-6, while increase the activity of SOD and mRNA and protein expressions of Rnd3 ($P<0.05$), in a dose-dependent manner. Overexpression of Rnd3 could decrease the apoptotic rate of H9c2 cardiomyocyte, protein expressions of NF- κ B p65, Cleaved Caspase-3 and Cleaved Caspase-9, the levels of LDH release, MDA, TNF- α , IL-1 β and IL-6, while increase the protein expression of Rnd3 and the activity of SOD ($P<0.05$). The inhibition overexpression of Rnd3 could weaken the inhibitory effects of acteoside on H/R-induced apoptosis of H9c2 cardiomyocyte,

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81860075)

* 主治医师,硕士。研究方向:心血管内科起搏电生理、心肌梗死药物治疗。电话:0898-66528127。E-mail:yym85@126.com

通信作者:主任医师,博士。研究方向:心血管内科冠状动脉介入治疗。电话:0898-66528127。E-mail:2223084306@qq.com

oxidative stress and inflammatory reaction ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS** Acteoside could regulate Rnd3/NF- κ B pathway by promoting the expression of Rnd3 and inhibiting the expression of NF- κ B p65, inhibit cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress and inflammation reaction so as to relieve the H/R-induced cardiomyocyte damage.

KEYWORDS acteoside; Rnd3/NF- κ B pathway; hypoxia/reoxygenation; H9c2 cardiomyocyte; cell apoptosis; oxidative stress; inflammatory reaction

急性心肌梗死是一种临床常见的心脏疾病,恢复冠状动脉血流是其主要治疗措施,但当心肌组织恢复血流时,心肌组织损伤可能会加重而引起心肌缺血再灌注损伤^[1]。缺氧可引起心肌细胞凋亡从而加重心肌组织损伤^[2]。研究表明,中药及其活性成分具有抗炎、抗氧化等作用,并可用于减轻心肌缺血再灌注损伤^[3-4]。类叶升麻苷(acteoside)是肉苁蓉的主要活性成分,基础研究表明其对小鼠具有神经保护、调节免疫、抗炎、改善学习记忆等作用^[5]。研究发现,Rho家族GTP酶3(Rho family GTPase 3, Rnd3)在肝脏缺血再灌注损伤中表达下调,上调其表达可抑制核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)通路的活化从而减轻肝脏缺血再灌注损伤^[6]。本研究采用缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)诱导大鼠H9c2心肌细胞建立心肌缺血再灌注损伤模型,探讨类叶升麻苷是否通过调控Rnd3/NF- κ B通路进而影响H/R诱导的心肌细胞损伤过程。

1 材料

1.1 主要仪器

StepOnePlus型实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪购自美国ABI公司;FACS Calibur型流式细胞仪购自美国Beckman Coulter有限公司;DYCP-44N型快速凝胶电泳槽购自北京六一生物科技有限公司。

1.2 主要药品与试剂

类叶升麻苷(纯度 $\geq 98\%$,货号SA8050)、Annexin V-FITC/PI试剂盒(批号20190115)购自北京索莱宝科技有限公司;DMEM培养基(批号20190203)、胎牛血清(批号20190205)、Trizol试剂(批号20190216)、反转录PCR试剂(批号20190101)、实时荧光定量PCR试剂(批号20181203)购自美国Thermo Fisher Scientific公司;Lipofectamine 2000转染试剂(批号20181223)购自美国Invitrogen有限公司;空载体pcDNA、Rnd3过表达载体pcDNA-Rnd3、Rnd3小分子干扰RNA(si-Rnd3)及其阴性对照(si-NC)购自上海吉玛制药技术有限公司;血清乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒(批号分别为20181220、20190103、20181116)购自南京建成生物工程研究所;肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、IL-6检测试剂盒(批号分别为20181118、20181005、20181018)购自上海酶联生物科技有限公司;兔抗鼠Rnd3抗体(批号20190103)、NF- κ B亚基p65(NF- κ B p65)抗体(批号20190105)、磷酸盐缓冲

液(PBS,批号20181215)、结合缓冲液(批号20181224)、RIPA裂解液(批号20181118)、聚偏二氟乙烯膜(批号20181123)、TBST(批号20181018)购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗鼠活化胱天蛋白酶3抗体(Cleaved Caspase-3,批号20190107)、Cleaved Caspase-9抗体(批号20190111)、内参GAPDH抗体(批号20190110)与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗(批号20190114)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 细胞

本研究所用大鼠心肌细胞株H9c2购自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC)。

2 方法

2.1 分组、造模和给药

本实验将H9c2心肌细胞分为对照组、H/R组、H/R+AS-L组、H/R+AS-M组、H/R+AS-H组、H/R+pcDNA组、H/R+pcDNA-Rnd3组、H/R+AS-H+si-NC组、H/R+AS-H+si-Rnd3组。(1)对照组:将H9c2心肌细胞接种于6孔板(1×10^4 个/孔),于37℃、5%CO₂的正常培养箱内培养24h,不进行造模;H/R组:参考文献[7]进行H/R造模,将H9c2心肌细胞接种于6孔板(1×10^4 个/孔),置于缺氧环境(37℃、5%CO₂、 $< 6\%$ O₂的培养箱)中培养24h,然后将其置于37℃、5%CO₂的正常培养箱内复氧培养6h;H/R+AS-L组、H/R+AS-M组、H/R+AS-H组:另取H9c2心肌细胞分别给予低、中、高浓度(10、30、90 μ mol/L)的类叶升麻苷处理^[8],然后参照“H/R组”进行H/R处理。(2)H/R+pcDNA组、H/R+pcDNA-Rnd3组:采用脂质体转染法分别将pcDNA(空载体)、pcDNA-Rnd3(使Rnd3过表达)转染至H9c2心肌细胞,转染成功后参照“H/R组”进行H/R处理。(3)H/R+AS-H+si-NC组、H/R+AS-H+si-Rnd3组:采用脂质体转染法分别将si-NC(阴性对照)、si-Rnd3(抑制Rnd3过表达)转染至H9c2心肌细胞,转染成功后给予90 μ mol/L的类叶升麻苷处理^[8],然后参照“H/R组”进行H/R处理。每组设9个复孔。

2.2 细胞凋亡率的检测

采用FACS Calibur流式细胞仪检测。收集各组建模、给药后的H9c2心肌细胞,加入预冷PBS洗涤,弃上清液后加入500 μ L结合缓冲液,然后分别加入5 μ L Annexin V-FITC试剂与5 μ L PI试剂,充分混匀后室温避光孵育10 min,于1 h内检测细胞凋亡率。严格按照试剂盒说明书进行操作。

2.3 LDH释放量、MDA水平、SOD活性检测

采用相应试剂盒检测。收集各组建模、给药后的

H9c2心肌细胞培养液,以3 000 r/min离心5 min,收集上清液,检测LDH释放量;另将RIPA裂解液加入各组H9c2心肌细胞中进行细胞裂解,检测MDA水平和SOD活性。严格按照试剂盒说明书进行操作。

2.4 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平检测

采用酶联免疫吸附试验法检测。收集各组造模、给药后的H9c2心肌细胞培养液,以3 000 r/min离心5 min,收集上清液,检测TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平。严格按照试剂盒说明书进行操作。

2.5 Rnd3、NF- κ B p65 mRNA表达水平检测

采用StepOnePlus实时荧光定量PCR仪检测。取各组造模、给药后的H9c2心肌细胞,加入1 mL Trizol试剂提取细胞总RNA,反转录合成cDNA,再以GAPDH作为内参,进行实时荧光定量PCR扩增。反应体系:10 \times PCR缓冲液2.5 μ L, MgSO₄ 2.5 μ L, dNTPs 2.5 μ L, 正反向引物各0.5 μ L, cDNA 2 μ L, RNase-Free ddH₂O补足体系至25 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环40次。采用Quantity One软件进行分析,以目的基因条带与内参基因条带的比值表示Rnd3、NF- κ B p65 mRNA表达水平。PCR引物序列和产物长度见表1。

表1 PCR引物序列和产物长度

基因	引物序列	产物长度, bp
Rnd3	上游:5'-CTATGACCAGGGGCAAATA-3'	89
	下游:5'-GGCATCGTGATGGACTCCG-3'	
NF- κ B p65	上游:5'-ATTCTGACCTTGCCTATCTAC-3'	68
	下游:5'-AAATCCTCCCAAACTCC-3'	
GAPDH	上游:5'-AACGGATTGGTTCGTATTG-3'	494
	下游:5'-GGAAGATGGTATGGGATT-3'	

2.6 Rnd3、NF- κ B p65、Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9蛋白表达水平检测

采用Western blot法检测。取各组造模、给药后的H9c2心肌细胞,加入500 μ L RIPA裂解液提取细胞总蛋白后,加入5 \times 十二烷基硫酸钠上样缓冲液于沸水中煮10 min使蛋白变性。取变性蛋白,按照每孔40 μ g的密度进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳;转移至聚偏二氟乙烯膜后室温封闭2 h,加入Rnd3、NF- κ B p65、Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9一抗稀释液与内参GAPDH抗体稀释液(稀释度分别为1:1 000、1:1 000、1:800、1:800、1:2 000),4 $^{\circ}$ C孵育24 h;TBST洗涤,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗(稀释度为1:3 000)后室温孵育1 h,暗室内曝光显影。应用Image J软件进行分析,以目的蛋白条带与内参蛋白条带灰度值比值表示蛋白表达水平。

2.7 统计学分析

采用SPSS 21.0统计学软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD- t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 类叶升麻苷对H/R诱导H9c2心肌细胞凋亡及Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9蛋白表达的影响

与对照组比较,H/R组H9c2心肌细胞的凋亡率和Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9蛋白表达水平显著升高($P<0.05$);与H/R组比较,H/R+AS-L组、H/R+AS-M组、H/R+AS-H组H9c2心肌细胞的凋亡率和Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9蛋白表达水平显著降低($P<0.05$),表明成功建立心肌缺血再灌注损伤模型;与H/R+AS-L组比较,H/R+AS-M组、H/R+AS-H组H9c2心肌细胞的凋亡率和Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9蛋白表达水平降低更显著($P<0.05$);与H/R+AS-M组比较,H/R+AS-H组H9c2心肌细胞的凋亡率和Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9蛋白表达水平降低更显著($P<0.05$)。结果见表2、图1。

表2 类叶升麻苷对H/R诱导H9c2心肌细胞凋亡及Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	细胞凋亡率/%	Cleaved Caspase-3蛋白	Cleaved Caspase-9蛋白
对照组	5.99 \pm 0.73	0.27 \pm 0.04	0.29 \pm 0.04
H/R组	27.99 \pm 4.35 ^a	0.90 \pm 0.03 ^a	0.92 \pm 0.03 ^a
H/R+AS-L组	18.88 \pm 0.99 ^b	0.69 \pm 0.04 ^b	0.76 \pm 0.04 ^b
H/R+AS-M组	15.17 \pm 0.82 ^{bc}	0.53 \pm 0.03 ^{bc}	0.60 \pm 0.05 ^{bc}
H/R+AS-H组	12.06 \pm 1.08 ^{bcd}	0.41 \pm 0.03 ^{bcd}	0.44 \pm 0.03 ^{bcd}
F	135.593	457.627	374.520
P	<0.05	<0.05	<0.05

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与H/R组比较, $P<0.05$;c:与H/R+AS-L组比较, $P<0.05$;d:与H/R+AS-M组比较, $P<0.05$

3.2 类叶升麻苷对H/R诱导H9c2心肌细胞炎症反应及氧化应激的影响

与对照组比较,H/R组H9c2心肌细胞的LDH释放量和MDA、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平显著升高,SOD活性显著降低($P<0.05$);与H/R组比较,H/R+AS-L组、H/R+AS-M组、H/R+AS-H组H9c2心肌细胞的LDH释放量和MDA、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平显著降低,SOD活性显著升高($P<0.05$);与H/R+AS-L组比较,H/R+AS-M组、H/R+AS-H组H9c2心肌细胞的LDH释放量和MDA、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平及SOD活性的上述变化程度更显著($P<0.05$);与H/R+AS-M组比较,H/R+AS-H组H9c2心肌细胞的LDH释放量和MDA、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平及SOD活性的上述变化程度更显著($P<0.05$)。结果见表3。

3.3 类叶升麻苷对H/R诱导H9c2心肌细胞中Rnd3、NF- κ B mRNA及蛋白表达的影响

与对照组比较,H/R组H9c2心肌细胞中Rnd3 mRNA及蛋白表达水平显著降低,NF- κ B p65 mRNA及蛋白表达水平显著升高($P<0.05$);与H/R组比较,H/R+AS-L组、H/R+AS-M组、H/R+AS-H组H9c2心肌细胞中Rnd3 mRNA及蛋白表达水平显著升高,NF- κ B p65 mRNA及蛋白表达水平显著降低($P<0.05$);与H/R+

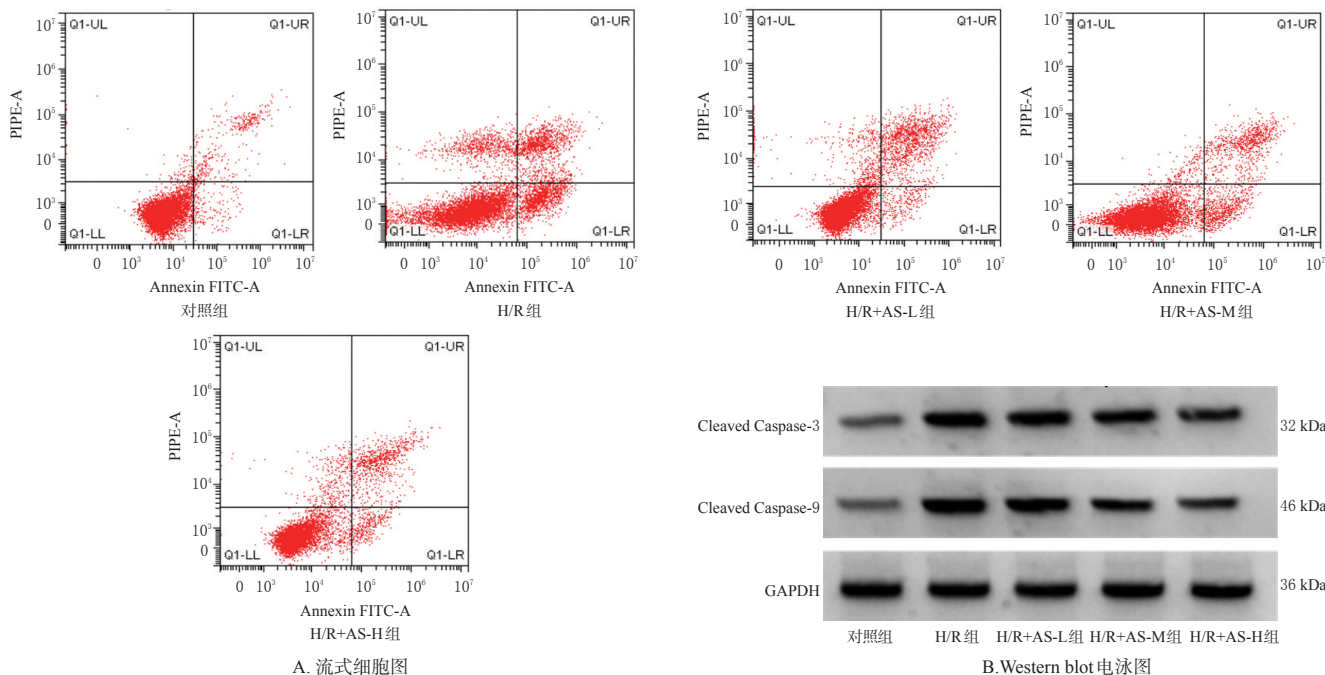


图1 各组H9c2心肌细胞的凋亡流式细胞图和Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9蛋白表达电泳图

表3 类叶升麻苷对H/R诱导H9c2心肌细胞炎症反应及氧化应激的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	LDH/(U/L)	MDA/(nmol/mL)	SOD/(U/mL)	TNF- α /(μ g/mL)	IL-1 β /(μ g/mL)	IL-6/(pg/mL)
对照组	22.33 \pm 3.59	14.10 \pm 1.30	68.14 \pm 6.92	285.19 \pm 42.93	138.34 \pm 11.59	60.19 \pm 5.62
H/R组	91.91 \pm 5.98 ^a	58.53 \pm 4.73 ^a	13.33 \pm 0.88 ^a	883.24 \pm 49.91 ^a	601.72 \pm 47.09 ^a	187.68 \pm 8.22 ^a
H/R+AS-L组	70.47 \pm 6.02 ^b	46.40 \pm 2.41 ^b	23.81 \pm 2.06 ^b	643.23 \pm 27.31 ^b	430.29 \pm 28.39 ^b	164.79 \pm 5.87 ^b
H/R+AS-M组	50.72 \pm 4.74 ^{bc}	35.14 \pm 3.23 ^{bc}	34.35 \pm 3.31 ^{bc}	555.30 \pm 25.62 ^{bc}	333.09 \pm 25.25 ^{bc}	133.37 \pm 7.14 ^{bc}
H/R+AS-H组	34.68 \pm 2.74 ^{bcd}	24.58 \pm 3.02 ^{bcd}	46.51 \pm 1.89 ^{bcd}	425.55 \pm 26.67 ^{bcd}	233.52 \pm 25.25 ^{bcd}	106.25 \pm 8.15 ^{bcd}
F	303.173	279.112	300.491	357.731	325.931	447.520
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与H/R组比较, $P < 0.05$; c: 与H/R+AS-L组比较, $P < 0.05$; d: 与H/R+AS-M组比较, $P < 0.05$

AS-L组比较, H/R+AS-M组、H/R+AS-H组H9c2心肌细胞中Rnd3、NF- κ B p65 mRNA及蛋白表达水平的上述变化程度更显著($P < 0.05$); 与H/R+AS-M组比较, H/R+AS-H组H9c2心肌细胞中Rnd3、NF- κ B p65 mRNA及蛋白表达水平的上述变化程度更显著($P < 0.05$)。结果见图2、表4。

3.4 Rnd3过表达对H/R诱导H9c2心肌细胞凋亡、氧化应激及炎症反应的影响

转染pcDNA-Rnd3使Rnd3过表达后, 与H/R+pcDNA组比较, H/R+pcDNA-Rnd3组H9c2心肌细胞中Rnd3蛋白表达水平、SOD活性显著升高, 而细胞凋亡率及细胞中NF- κ B p65、Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9蛋白表达水平, LDH释放量和MDA、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平显著降低($P < 0.05$)。结果见图3、表5。

3.5 抑制Rnd3过表达联合类叶升麻苷对H/R诱导H9c2心肌细胞凋亡、氧化应激及炎症反应的影响

转染si-Rnd3抑制Rnd3过表达后再给予90 μ mol/L的类叶升麻苷, 与H/R+AS-H+si-NC组比较, H/R+AS-H+si-Rnd3组H9c2心肌细胞中Rnd3蛋白表达水平、SOD活性显著降低, 而细胞凋亡率及细胞中NF- κ B p65、

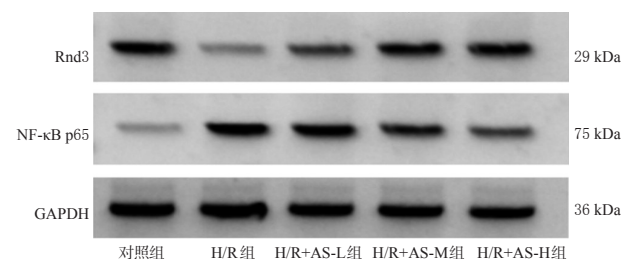


图2 各组H9c2心肌细胞中Rnd3、NF- κ B p65蛋白表达电泳图

表4 类叶升麻苷对H/R诱导H9c2心肌细胞中Rnd3、NF- κ B mRNA及蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	Rnd3		NF- κ B p65	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
对照组	1.00 \pm 0.02	0.87 \pm 0.04	1.00 \pm 0.00	0.22 \pm 0.02
H/R组	0.29 \pm 0.05 ^a	0.24 \pm 0.02 ^a	4.28 \pm 0.22 ^a	0.91 \pm 0.05 ^a
H/R+AS-L组	0.46 \pm 0.04 ^b	0.42 \pm 0.04 ^b	3.22 \pm 0.46 ^b	0.74 \pm 0.02 ^b
H/R+AS-M组	0.64 \pm 0.05 ^{bc}	0.56 \pm 0.04 ^{bc}	2.44 \pm 0.29 ^{bc}	0.56 \pm 0.06 ^{bc}
H/R+AS-H组	0.83 \pm 0.03 ^{bcd}	0.74 \pm 0.05 ^{bcd}	1.35 \pm 0.14 ^{bcd}	0.38 \pm 0.05 ^{bcd}
F	456.437	365.727	224.384	362.489
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与H/R组比较, $P < 0.05$; c: 与H/R+AS-L组比较, $P < 0.05$; d: 与H/R+AS-M组比较, $P < 0.05$

Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9 蛋白表达水平, LDH 释放量和 MDA、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平显著升高 ($P < 0.05$)。结果见图 4、表 6。

4 讨论

研究表明,心肌细胞炎症反应、氧化应激及过度凋亡等均与心肌缺血再灌注损伤有关,但其病因及致病机制尚未完全阐明^[9]。临床常采用药物、介入与外科手术等进行治疗,可改善心肌缺血症状,但不能从根本上治愈心肌缺血再灌注损伤;而中药的副作用较小、治疗效果较好,可减轻心肌缺血再灌注损伤,但其作用机制尚未阐明^[10-11]。

类叶升麻苷可通过增强乙酰胆碱转移酶活性从而减轻缺糖缺氧诱导的神经细胞损伤,抑制氧化应激反应

从而减轻谷氨酸诱导的神经细胞损伤,抑制炎症反应从而改善脑缺血再灌注损伤大鼠的学习记忆能力^[12-14]。本研究结果显示,H/R 诱导后 H9c2 心肌细胞的凋亡率和 Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9 蛋白表达水平升高,与既往研究结果相似^[15],提示成功建立心肌缺血再灌注损伤模型;给予类叶升麻苷可减少 H/R 诱导的 H9c2 心肌细胞的凋亡,且呈剂量依赖性,提示类叶升麻苷可抑制 H/R 诱导的心肌细胞凋亡。本研究还发现,类叶升麻苷能逆转 H/R 诱导的 H9c2 心肌细胞中 LDH 释放量、MDA 水平升高,SOD 活性降低,与既往研究结果相似^[16],提示类叶升麻苷可抑制 H/R 诱导的心肌细胞的氧化应激反应从而减轻细胞氧化损伤;同时,类叶升麻苷能逆转 H/R 诱导的 H9c2 心肌细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6

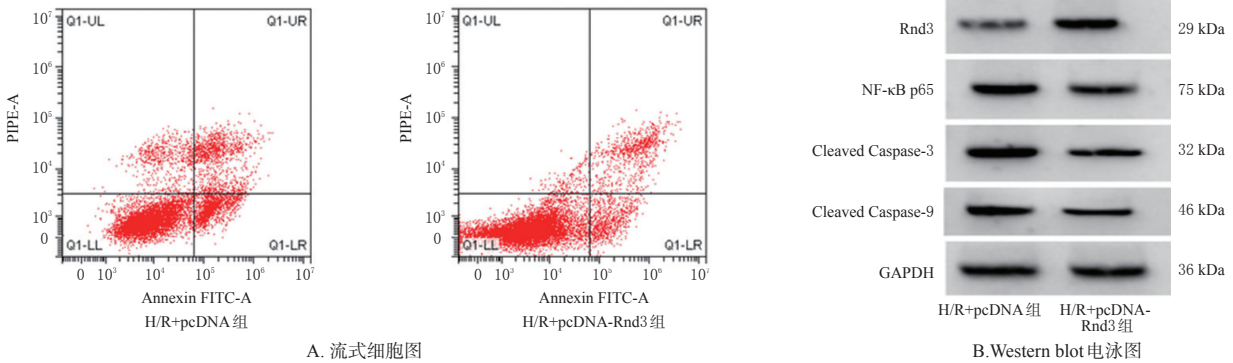


图3 Rnd3 过表达前后的凋亡流式细胞图和相关蛋白表达电泳图

表5 Rnd3 过表达对 H/R 诱导 H9c2 心肌细胞凋亡、氧化应激及炎症反应的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	Rnd3 蛋白	NF- κ B p65 蛋白	细胞凋亡率/%	Cleaved Caspase-3 蛋白	Cleaved Caspase-9 蛋白	LDH/(U/L)	MDA/(nmol/mL)	SOD/(U/mL)	TNF- α /(μ g/mL)	IL-1 β /(μ g/mL)	IL-6/(pg/mL)
H/R+pcDNA 组	0.23 \pm 0.02	0.91 \pm 0.03	27.42 \pm 4.59	0.91 \pm 0.03	0.93 \pm 0.04	91.44 \pm 5.90	58.78 \pm 3.92	13.62 \pm 1.13	883.23 \pm 44.77	602.94 \pm 61.48	186.54 \pm 6.42
H/R+pcDNA-Rnd3 组	0.47 \pm 0.03	0.66 \pm 0.05	19.09 \pm 0.85	0.66 \pm 0.03	0.72 \pm 0.04	64.41 \pm 4.81	39.35 \pm 2.03	25.22 \pm 2.49	637.64 \pm 39.03	404.83 \pm 32.35	147.68 \pm 6.96
<i>t</i>	19.969	12.862	5.353	17.678	11.137	10.653	13.204	12.727	12.405	8.555	12.312
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

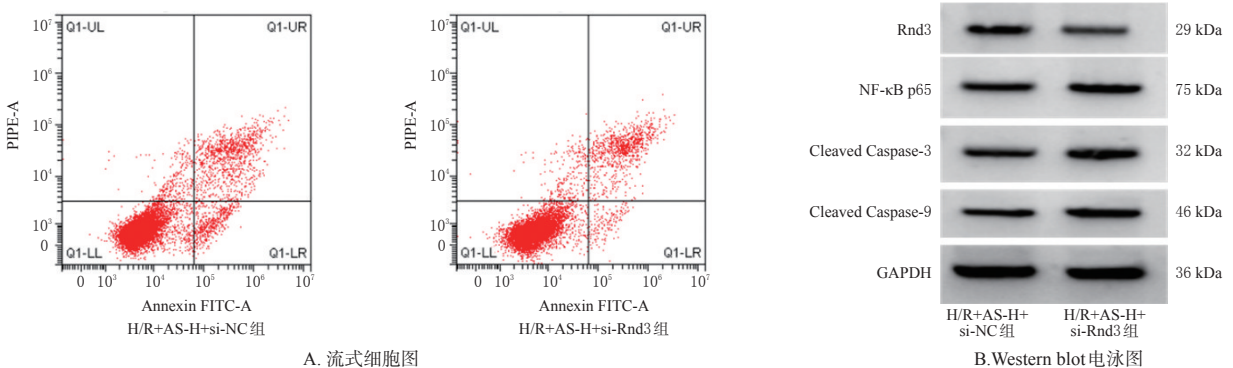


图4 抑制 Rnd3 过表达前后类叶升麻苷作用下的凋亡流式细胞图和相关蛋白表达电泳图

表6 抑制 Rnd3 过表达前后类叶升麻苷对 H/R 诱导 H9c2 心肌细胞凋亡、氧化应激及炎症反应的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	Rnd3 蛋白	NF- κ B p65 蛋白	细胞凋亡率/%	Cleaved Caspase-3 蛋白	Cleaved Caspase-9 蛋白	LDH/(U/L)	MDA/(nmol/mL)	SOD/(U/mL)	TNF- α /(μ g/mL)	IL-1 β /(μ g/mL)	IL-6/(pg/mL)
H/R+AS-H+si-NC 组	0.73 \pm 0.02	0.38 \pm 0.05	12.03 \pm 0.78	0.41 \pm 0.06	0.44 \pm 0.02	33.20 \pm 2.36	24.55 \pm 1.85	46.37 \pm 1.90	426.77 \pm 16.02	232.36 \pm 20.11	106.10 \pm 8.63
H/R+AS-H+si-Rnd3 组	0.55 \pm 0.03	0.65 \pm 0.02	17.31 \pm 0.67	0.57 \pm 0.04	0.71 \pm 0.04	54.24 \pm 2.92	35.91 \pm 3.91	29.57 \pm 3.29	587.83 \pm 17.42	362.30 \pm 14.97	142.01 \pm 9.69
<i>t</i>	14.977	15.041	15.405	6.656	18.112	16.812	7.879	13.266	20.416	15.549	8.302
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

水平升高,与既往研究结果相似^[17],且呈剂量依赖性,提示类叶升麻苷可抑制炎症反应从而减轻H/R诱导心肌细胞的炎症损伤。

Rnd3属于Rho蛋白家族成员,是Rho蛋白激酶1的抑制物,其在细胞凋亡、肌动蛋白骨架形成等方面发挥重要的调控作用^[18]。研究表明,Rnd3表达上调可通过抑制NF- κ B通路相关蛋白表达从而抑制心肌细胞凋亡及氧化应激,减轻心肌缺血再灌注损伤;Rnd3表达下调可通过激活NF- κ B通路从而促进神经细胞凋亡^[19]。NF- κ B通路过度活化可造成心肌细胞损伤,抑制其激活可减轻心肌细胞损伤^[20]。本研究结果显示,H/R诱导H9c2心肌细胞中Rnd3 mRNA及蛋白表达水平降低、NF- κ B p65 mRNA及蛋白表达水平升高,而类叶升麻苷处理后细胞中上述指标水平逆转,提示类叶升麻苷可能通过调控Rnd3/NF- κ B通路从而减轻心肌缺血再灌注损伤。同时本研究结果显示,Rnd3过表达可通过抑制NF- κ B通路的活化从而抑制H/R诱导H9c2心肌细胞的凋亡、炎症反应及氧化应激,而抑制Rnd3过表达可激活NF- κ B通路从而减弱类叶升麻苷对H/R诱导H9c2心肌细胞的凋亡、炎症反应及氧化应激的抑制作用,提示Rnd3/NF- κ B通路可能是类叶升麻苷治疗心肌缺血再灌注损伤的潜在通路。

综上所述,类叶升麻苷可抑制H/R诱导H9c2心肌细胞的凋亡、氧化应激及炎症反应从而减轻细胞损伤,其作用机制可能与促进Rnd3表达、抑制NF- κ B p65表达有关,但其具体作用机制尚需进一步研究。

参考文献

[1] YE B Z, CHEN X D, DAI S S, et al. Emodin alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting gasdermin D-mediated pyroptosis in cardiomyocytes[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 975-990.

[2] SUN S M, WANG P F. Coptisine alleviates ischemia/reperfusion-induced myocardial damage by regulating apoptosis-related proteins[J]. *Tissue Cell*, 2020, 66: 101392.

[3] WU Y, FAN Z J, CHEN Z J, et al. Astragaloside IV protects human cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation injury by regulating miR-101a[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 470(1/2): 41-51.

[4] SUN H Y, LING S K, ZHAO D S, et al. Ginsenoside Re treatment attenuates myocardial hypoxia/reoxygenation injury by inhibiting HIF-1 α ubiquitination[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 532041.

[5] 谭雪,高莉,任佳,等.类叶升麻苷对SAMP8小鼠学习记忆及脑组织神经递质水平的影响[J].*中华行为医学与脑科学杂志*, 2019, 28(9): 842-847.

[6] MOU T, LUO Y H, HUANG Z T, et al. Inhibition of microRNA-128-3p alleviates liver ischaemia-reperfusion injury in mice through repressing the Rnd3/NF- κ B axis[J]. *Innate Immun*, 2020, 26(6): 528-536.

[7] 冯彦景,李艳君,殷智晔,等. miR-6216对缺氧/复氧H9c2心肌细胞损伤的影响[J].*西部医学*, 2020, 32(10): 1454-1460.

[8] 张振丽,任启正,孟祥智,等.类叶升麻苷调控CREG表达对oxLDL诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用[J].*中国药师*, 2020, 23(9): 1725-1730.

[9] ZUO Y H, HAN Q B, DONG G T, et al. Panax ginseng polysaccharide protected H9c2 cardiomyocyte from hypoxia/reoxygenation injury through regulating mitochondrial metabolism and risk pathway[J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 699.

[10] CHANG X, ZHANG T, MENG Q Y, et al. Quercetin improves cardiomyocyte vulnerability to hypoxia by regulating SIRT1/TMBIM6-related mitophagy and endoplasmic reticulum stress[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 5529913.

[11] SUN J, YU X H, HUANGPU H Q, et al. Ginsenoside Rb3 protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury via activating the antioxidation signaling pathway of PERK/Nrf2/HMOX1[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 254-261.

[12] 高莉,彭晓明,霍仕霞,等.类叶升麻苷对缺糖缺氧诱导PC12细胞损伤的保护作用[J].*中成药*, 2015, 37(8): 1821-1823.

[13] 彭晓明,霍仕霞,高莉,等.类叶升麻苷对谷氨酸损伤PC12细胞的保护作用[J].*医药导报*, 2015, 34(3): 302-305.

[14] 任佳,高莉,谭雪,等.类叶升麻苷对脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力及炎症因子的影响[J].*中国中医药信息杂志*, 2019, 26(4): 47-51.

[15] 张宁,马竞,武国利.风轮菜总黄酮联合miR-702-5p抑制物对缺氧/复氧诱导的心肌细胞损伤的影响[J].*实用药物与临床*, 2021, 24(1): 23-28.

[16] 庄道禹,李萌,杨光远,等.雷诺嗪对缺氧/复氧诱导H9c2心肌细胞氧化应激损伤的影响[J].*心血管康复医学杂志*, 2020, 29(5): 565-569.

[17] 雷蓉,李阳春,袁芳桃,等.鸭跖草提取物通过调控NADPH氧化酶4(Nox4)抑制缺氧/复氧心肌细胞凋亡及炎症因子表达[J].*中华微生物学和免疫学杂志*, 2020, 40(9): 668-676.

[18] XU Y R, GUO W G, ZENG D, et al. Inhibiting miR-205 alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury by regulating oxidative stress, mitochondrial function, and apoptosis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 9986506.

[19] DONG H M, SUN Q, ZHANG Y, et al. Genetic deletion of Rnd3 suppresses apoptosis through NF- κ B signaling in the brain[J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(2): 595-605.

[20] 刘婷婷,刘丽,林文果,等.氧化苦参碱通过NF- κ B信号通路减轻缺氧复氧大鼠心肌细胞损伤[J].*中国循证心血管医学杂志*, 2020, 12(9): 1129-1133.

(收稿日期:2021-08-30 修回日期:2021-12-14)
(编辑:舒安琴)