

三七皂苷 R1 对异丙肾上腺素诱导的 H9c2 心肌细胞肥大的保护作用

朱婷¹, 冯玉², 殷乐章^{1,2}, 王晓静², 肖静¹, 孙冰¹

(1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所药理毒理中心, 北京 100193)

(2. 山东中医药大学药学院, 山东济南 250355)

摘要: 本文探索了三七皂苷 R1 对异丙肾上腺素诱导的 H9c2 心肌细胞肥大的保护作用, 并验证了其对于心肌肥厚的治疗效果。实验以 H9c2 心肌细胞为模型, 应用 ISO 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 诱导心肌细胞肥大, 观察三七皂苷 R1 对心肌肥厚的影响。用 MTT 法检测心肌细胞活力; 应用实时定量 RT-PCR 法检测胚胎型基因 ANP、 β -MHC 及炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的 mRNA 表达水平; 应用 Western blot 法检测 p65、p-p65、I- κ B α 蛋白含量; 荧光分光光度法检测 Caspase-3 活性。结果表明, 三七皂苷 R1 能够有效地抑制 ISO 诱导的心肌细胞肥大, 并增强心肌细胞活力; 降低了 ANP、 β -MHC mRNA 的表达水平; 同时抑制了炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β mRNA 表达, 以及 p65 磷酸化的活化, 并促进了 I- κ B α 的激活; 也抑制了 Caspase-3 的活性。可见, 三七皂苷 R1 对 ISO 诱导的 H9c2 心肌细胞肥大有一定的保护作用, 而且能够有效地抑制心肌肥厚, 其机制可能与抑制 NF- κ B 相关的炎症信号通路有关。

关键词: 三七皂苷; 异丙肾上腺素; H9c2 细胞; 心肌肥厚; 炎症因子; NF- κ B 信号通路

文章编号: 1673-9078(2018)10-1-7

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.10.001

Protection against Isoproterenol-induced Hypertrophy in H9c2

Cardiomyocytes by Notoginsenoside R1

ZHU Ting¹, FENG Yu², YIN Yue-zhang^{1,2}, WANG Xiao-jing², XIAO Jing¹, SUN Bing¹

(1. Research Center for Pharmacology and Toxicology, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)(2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

Abstract: The protection of notoginsenoside R1 against isoproterenol-induced hypertrophy in rats H9c2 cardiomyocyte was investigated, and its therapeutic effect on cardiac hypertrophy was also verified. The H9c2 cardiomyocytes was induced by ISO 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to observe the effect of notoginsenoside R1 on cardiac hypertrophy. The viability of cardiomyocytes was detected by MTT assay, and the mRNA levels of ANP, β -MHC, TNF- α , IL-6 and IL-1 β were detected by real-time RT-PCR. Western blot was used to detect the protein levels of p65, p-p65, I- κ B α ; Fluorometric assay kit was used to detect caspase-3 activity. The results showed that, notoginsenoside R1 is effective in inhibiting ISO-induced cardiomyocyte hypertrophy, which manifests increased cardiomyocyte viability, decreased ANP, β -MHC, TNF- α , IL-6 and IL-1 β mRNA levels, activated I- κ B α protein level, inhibited p65 phosphorylation and decreased Caspase-3 activity. Therefore, notoginsenoside R1 exhibits a protection against ISO-induced H9c2 cardiomyocyte hypertrophy and can effectively inhibit cardiac hypertrophy, and its underlying mechanism may be associated with attenuation of the NF- κ B signaling pathway.

Key words: notoginsenoside; isoproterenol; H9c2 cells; hypertrophy; inflammatory factors; NF- κ B signaling pathway

心肌肥厚是导致心力衰竭发生和发展的重要病理基础, 是心血管疾病患者发病率和死亡率增加的一个

收稿日期: 2018-06-27

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81302769; 81202526); 北京市自然科学基金资助项目 (47144226)

作者简介: 朱婷 (1991-), 女, 博士, 研究方向: 心血管药理

通讯作者: 肖静 (1980-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 心血管药理;

孙冰 (1979-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 心血管药理

重要原因。心肌肥厚是由多种刺激引起的多方面复杂的临床综合征, 与多种病理特征有关, 包括心脏收缩功能和舒张功能衰退, 心肌细胞死亡, 心肌炎症和心脏纤维化重塑的增加等^[1,2]。研究表明, 炎症反应不仅参与了心肌肥厚的发生发展过程, 并且与心室重构密切相关。炎症因子在心室重构过程中起到重要作用, 包括诱导心肌细胞肥大、胚胎基因表达、心肌细胞凋亡和心肌纤维化等^[3]。异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)

是一种 β -肾上腺素能激动剂, 特定剂量可以诱导心肌肥厚, 使心肌中促炎因子如肿瘤坏死因子 (TNF- α) 和白介素-6 (IL-6) 表达增强, 同时促进核转录因子- κ B (NF- κ B) 的表达, 已广泛用于建立心肌肥厚实验模型^[4,5]。

三七总皂苷是人参属中药三七的主要有效活性成分^[6,7]。三七皂苷 R1 (notoginsenoside R1), 是一种从三七中分离出的主要成分和新型植物雌激素, 具有抗炎, 抗氧化和抗凋亡性质^[8~10]。之前的研究表明, 三七皂苷 R1 能明显抑制多种炎症因子的产生, 减轻内毒素小鼠心脏功能紊乱症状^[11], 但其对心肌肥厚的影响少有报导。因此, 本实验的主要目的为通过异丙肾上腺素刺激心肌细胞诱导心肌肥大的发生, 观察三七皂苷 R1 对心肌细胞肥大的影响。首先, 采用不同给药剂量给予三七皂苷 R1, 观察不同给药剂量对 ISO 诱导的心肌细胞肥大的影响。基于炎症反应在心肌肥厚发展病程中占有重要地位, 本实验从组织形态学、分子生物学等多个水平, 探讨三七皂苷 R1 对心肌肥厚及心肌炎症反应的作用, 为进一步深入研究其机制提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞

H9c2 心肌细胞购自中国科学院细胞库 (中国上海)。

1.1.2 药品与试剂

三七皂苷 R1, 购自上海融禾医药科技发展有限公司, 产品批号: 161020; ISO, 购自 Sigma 公司, 产品批号: 16504; 所有组织培养物质购自 GIBCO 公司; I- κ B α 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司, 批号为: K0711; p65、p-p65 抗体购自 CST 公司, 批号分别为: 8242 和 3033; RT-PCR 试剂盒购自鼎国昌盛生物技术有限公司, 批号为: TER010-2; western 试剂盒购自康维世纪生物科技有限公司, 批号为: 26912F; 荧光测定试剂盒购自 BioVision 公司, 批号为: K105-100; 其他试剂均为国产分析纯, 水为去离子水。

1.2 方法

1.2.1 细胞模型的建立

如文献^[12]所述进行培养, 首先将细胞分为正常对照组, ISO (20 μ g/mL) 组及三七皂苷 R1 不同浓度 (5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M) 给药组, 测定各项指标后, 选择最佳给药浓度 (25 μ M) 进行后续实验。

给药组加入选择性 NF- κ B 拮抗剂吡咯烷二硫代氨基甲酸酯 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC) 预先培养 30 min 后加入三七皂苷 R1, 1 h 后加入 ISO, 24 h 后进行各项指标测定。实验共分为 6 组: ①正常对照组; ②三七皂苷 R1 组 (25 μ M); ③PDTC 组; ④ISO 组 (20 μ g/mL); ⑤ISO+三七皂苷 R1 组; ⑥ISO+三七皂苷 R1+PDTC 组。用以检测三七皂苷 R1 对 NF- κ B 介导的抗炎和抗凋亡作用。

1.2.2 MTT 法检测细胞活力

使用 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT) 测定法, 如上所述^[12]评估细胞活力。

1.2.3 细胞表面积的测量

为了研究三七皂苷 R1 对 ISO 诱导的心肌肥大的保护作用, 将细胞置于 6 孔板中。如上所述^[12]进行培养和处理。将预处理的细胞用 PBS 洗涤两次, 然后固定在 4% 多聚甲醛中。10 min 后, 用 0.1% Triton X-100 (V/V, 加在 PBS 中) 洗涤三次, 除去残留的多聚甲醛。然后在 1:100 稀释液 (含有 2% BSA 和 0.1% Triton X-100 的 PBS) 中加入 Actin-Tracker Green。六孔板中的细胞在室温黑暗条件下培养 30~60 min, 0.1% Triton X-100 除去过量的 Actin-Tracker Green。在装有 200 \times 放大倍率数码相机的倒置显微镜下观察细胞, 每孔随机捕获 5 张照片, 并使用 Image J 软件测量单个细胞表面积。

1.2.4 实时定量 RT-PCR 法检测 ANF、 β -MHC、TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA 表达

实时定量 RT-PCR 法检测心房利钠因子 (Atrial natriuretic factor, ANF)、 β -肌球蛋白重链 (beta-myosin heavy chain, β -MHC)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β) 的 mRNA 表达水平。使用 Trizol 试剂分离总 RNA。用 Prime Script RT Master Mix 试剂盒合成 cDNA。使用 SYBR green premix 进行实时聚合酶链反应。使用以下引物进行 cDNA 扩增: ANF: 5'-AGCATGGGCTCCTTCTCCAT-3'(forward) 和 5'-TGGCCTGGAAGCCAAAAG-3'(reverse); β -MHC: 5'-CCTACAAGTGGCTGCCTGTGT-3'(forward) 和 5'-ATGGACTGATTCTCCCGATCTG-3'(reverse); TNF- α : 5'-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA-3'(forward) 和 5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'(reverse); IL-1 β : 5'-CAACCAAC AAGTGATATTCTCCATG-3'(forward) 和 5'-GATCCACACTCTCCAGCTGCA-3'(reverse); IL-6: 5'-GAGGAT ACCACTCCCAACAGACC-3'(forward) 和 5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'(reverse); GAPDH:

5'-AACGACCCCTTCATTGAC-3' (forward) 和 5'-TCCACGACATACTCAGCAC-3' (reverse); 使用 delta delta CT 方法, 所有基因表达均与内参照基因(即 GAPDH) 的标准化相同, 使用任意单位显示相对 mRNA 水平, 并将对照组的值定义为 1。实验结果由荧光定量 PCR 分析软件 Applied Biosystems Primer Express Software (version 2.0) 自动进行统计和计算^[11]。

1.2.5 western blot 法检测 I- κ B α 、p65、p-p65 蛋白表达

如前所述^[12]进行细胞裂解物制备, 收集总蛋白。用 BCA 法蛋白定量。取等量样本上样于 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 将蛋白质转移至 PVDF 膜上, 摇床封闭 1 h, 然后加入甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、NF- κ B α 抑制蛋白 (inhibitor of NF- κ B α , I- κ B α)、p65 和 phosphorylation p65 (p-p65) 的一抗(均为 1:1000 稀释), 4 °C 过夜。次日, 室温下 TBST 洗膜, 二抗孵育 1 h 后洗膜, 曝光显影。以 GAPDH 作内参, 灰度分析。

1.2.6 荧光分光光度法检测 Caspase-3 活性

根据制造商的说明书, 使用荧光测定试剂盒测定含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteiny aspartate specific proteinase-3, caspase-3)活性。使用具有 400 nm 激发波长和 505 nm 发射波长的 Fluoroskan Ascent FL

荧光计读取样品的荧光强度。

1.2.7 统计学方法

应用 SPASS 17.0 统计软件分析处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 进行各组间比较。以 $p < 0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 三七皂苷 R1 对细胞活力的影响

为了检测 ISO 和三七皂苷 R1 的细胞毒性作用, 在 5, 10, 25 和 50 μ M 三七皂苷 R1 作用下, 将 H9c2 细胞与指定浓度的 ISO (20 μ g/mL) 一起培养 24 h。然后, 使用 MTT 法检测细胞活力。

表 1 结果所示, 随着 ISO 浓度 (0~20 μ M) 的增加, 细胞活力逐渐降低。而给予不同浓度三七皂苷 R1 (0, 5, 10, 25 和 50 μ M), 各组之间的细胞活力没有显著差异 ($p > 0.05$)。此外, 与空白对照组相比, 用 ISO 处理过的 H9c2 细胞的细胞活力降低了约 40% ($p < 0.05$)。然而, 三七皂苷 R1 以浓度依赖方式 (5, 10 和 25 μ M) 抑制了这种降低 ($p < 0.05$)。值得注意的是, 25 μ M 三七皂苷 R1 处理组细胞活力提高到约 93%。然而, 较高浓度 (50 μ M) 的三七皂苷 R1 不能进一步提高细胞活力。

表 1 三七皂苷 R1 对心肌细胞活力的影响

Table 1 Effects of notoginsenoside R1 on the viability of cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s$, n=5)

组别	剂量	细胞活力/%
正常对照		99.13 \pm 5.67
异丙肾上腺素	0 μ g/mL	99.12 \pm 7.56
异丙肾上腺素	0.002 μ g/mL	93.53 \pm 1.71
异丙肾上腺素	0.02 μ g/mL	90.10 \pm 6.82
异丙肾上腺素	0.2 μ g/mL	81.07 \pm 5.48 [#]
异丙肾上腺素	2 μ g/mL	76.35 \pm 8.67 [#]
异丙肾上腺素	20	61.22 \pm 2.37 [#]
三七皂苷 R1	0 μ M	99.30 \pm 5.33
三七皂苷 R1	5 μ M	98.21 \pm 6.22
三七皂苷 R1	10 μ M	101.87 \pm 5.28
三七皂苷 R1	25 μ M	101.41 \pm 6.28
三七皂苷 R1	50 μ M	103.93 \pm 3.98
异丙肾上腺素+三七皂苷 R1 5 μ M	20 μ g/mL	74.64 \pm 3.14 [*]
异丙肾上腺素+三七皂苷 R1 10 μ M	20 μ g/mL	84.36 \pm 6.76 [*]
异丙肾上腺素+三七皂苷 R1 25 μ M	20 μ g/mL	92.85 \pm 4.74 [*]
异丙肾上腺素+三七皂苷 R1 50 μ M	20 μ g/mL	93.75 \pm 5.49 [*]

注: 与对照组相比[#] $p < 0.05$; 与 ISO 处理组相比^{*} $p < 0.05$ (下同)。

表2 三七皂苷 R1 对 ANF 和 β -MHC mRNA 水平的影响Table 2 Effects of Notoginsenoside R1 on mRNA level of ANF and β -MHC ($\bar{x} \pm s$, n=5)

组别	剂量/($\mu\text{g/mL}$)	ANF mRNA	β -MHC mRNA
正常对照		1.00 \pm 0.24	1.00 \pm 0.31
异丙肾上腺素	20	10.89 \pm 1.58 [#]	9.92 \pm 0.73 [#]
异丙肾上腺素+三七皂苷 R1 5 μM	20	8.91 \pm 1.33*	8.38 \pm 0.99*
异丙肾上腺素+三七皂苷 R1 10 μM	20	6.28 \pm 0.87*	5.45 \pm 0.87*
异丙肾上腺素+三七皂苷 R1 25 μM	20	5.16 \pm 0.18*	4.35 \pm 0.38*
异丙肾上腺素+三七皂苷 R1 50 μM	20	5.73 \pm 1.19*	4.48 \pm 0.33*

2.2 三七皂苷 R1 对 ANF 和 β -MHC mRNA 水平的影响

病理性心肌肥厚主要表现为心肌细胞肥大、原始胚胎基因表达增强,是心血管疾病的共同病理特征。ANP 和 β -MHC 是重要的心肌细胞肥大标志物。ANP 作为心肌细胞肥大标志物之一,在正常成年哺乳动物的心肌中几乎无表达,但在心肌肥厚动物的心肌中表达较高。因此 ANP 表达量的多少,可以准确地反映心肌肥厚的程度^[13]。

心肌纤维主要由肌球蛋白构成,是心肌的主要收缩蛋白, α -MHC 和 β -MHC 作为肌球蛋白的两种表达形式分别主要存在于大鼠心室肌及胚胎期^[14]。压力超负荷引起的心肌机械牵张或神经体液因子产生,使心肌细胞肥大从而上 β -MHC 的表达,而 β -MHC 的下调又可以使肌球蛋白 ATP 酶活性低,从而导致心脏收缩速率下降,最终导致心力衰竭^[15]。因此, β -MHC 也被视为心肌肥厚的分子标志。

因此本实验通过测定 ANP 和 β -MHC 以评价三七皂苷 R1 对心肌细胞肥大程度的影响。表 2 结果所示,ISO(20 $\mu\text{g/mL}$)显著增加了 ANF 和 β -MHC 的 mRNA

水平 ($p < 0.05$),说明 ISO (20 $\mu\text{g/mL}$) 对大鼠心肌细胞已造成严重的肥大损伤;而随着三七皂苷 R1 浓度的升高 (5, 10 和 25 μM),这种升高作用被明显降低 ($p < 0.05$),与模型组相比,ANF 分别降低了 18.18%、42.33%、52.62%; β -MHC 分别降低了 15.52%、45.06%、56.15%。然而,较高浓度的三七皂苷 R1 (50 μM) 并没有进一步降低 ANF 和 β -MHC 的 mRNA 水平 ($p > 0.05$),与 25 μM 组相比,仅相差 9.95% 和 2.9%。可能是由于 25 μM 已经为三七皂苷 R1 治疗心肌细胞肥大的最佳给药剂量。

2.3 三七皂苷 R1 保护心肌免受 ISO 诱导的肥大

形态学分析进一步研究了三七皂苷 R1 对 ISO 诱导的心肌肥大的保护作用。与对照组相比,ISO 诱导后,心肌细胞表面积会增大,应用三七皂苷 R1 (5, 10, 25 和 50 μM) 能够有效防止 ISO 诱导的心肌细胞肥大,与模型组相比,分别降低 18.02%、21.81%、24.50%、26.39%。然而,不同浓度的三七皂苷 R1 对于阻止心肌细胞表面积并没有显著差异 (表 3)。

表3 ISO 和/或三七皂苷 R1 对心肌细胞大小的变化

Table 3 Changes in cardiomyocyte size in response to ISO or Notoginsenoside R1 ($\bar{x} \pm s$, n=5)

组别	剂量/($\mu\text{g/mL}$)	细胞面积(Arbitrary units)
正常对照		99.30 \pm 5.84
异丙肾上腺素	20	162.10 \pm 16.30 [#]
异丙肾上腺素+三七皂苷 R1 5 μM	20	132.89 \pm 8.58*
异丙肾上腺素+三七皂苷 R1 10 μM	20	126.74 \pm 9.89*
异丙肾上腺素+三七皂苷 R1 25 μM	20	122.38 \pm 6.44*
异丙肾上腺素+三七皂苷 R1 50 μM	20	119.32 \pm 5.55*

2.4 三七皂苷 R1 对心肌细胞中 ISO 诱导的炎症的影响

据文献报道,心肌炎症因子表达的下调可以降低

心室重塑的发生率,对心力衰竭具有保护作用^[16]。炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等) 是诱发心血管疾病的常见因素之一。在病理情况下,心肌易受到各种因素刺激,生理状态下的平衡被打破,促使促炎因子大量产生、心肌肥厚及心肌纤维化产生^[17]。

表4 三七皂苷R1对TNF- α 、IL-1 β 和IL-6 mRNA水平的影响

Table 4 Effects of ISO and/or Notoginsenoside R1 on the mRNA levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 ($\bar{x}\pm s$, n=5)

组别	剂量/($\mu\text{g/mL}$)	TNF- α mRNA	IL-1 β mRNA	IL-6 mRNA
正常对照		1.00 \pm 0.93	1.10 \pm 0.22	0.99 \pm 0.21
异丙肾上腺素	20	19.72 \pm 2.29 [#]	4.11 \pm 0.83 [#]	7.70 \pm 1.12 [#]
三七皂苷 R1 25 μM		1.02 \pm 0.90	1.23 \pm 0.15	1.13 \pm 0.26
异丙肾上腺素+三七皂苷 R1 25 μM	20	6.44 \pm 1.61 [*]	2.82 \pm 0.62 [*]	3.34 \pm 0.47 [*]

另外,炎症因子的调控与NF- κB 相关,NF- κB 可被LPS、TNF- α 等炎症因子激活,促进心室重构的发展。已有研究报道,在心肌组织中NF- κB 通路的阻断在预防高血压心肌肥厚中具有良好的应用前景^[18]。

因此本实验通过测定TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的mRNA水平以评价三七皂苷R1对心肌炎症因子表达影响。表4结果所示,与正常对照组相比,单独给予三七皂苷R1对TNF- α 、IL-1 β 和IL-6 mRNA水平并无显著性差异($p>0.05$)。然而,细胞暴露于ISO时,各炎症因子mRNA表达水平显著增加($p<0.05$)。三七皂苷R1处理后,TNF- α 、IL-1 β 和IL-6 mRNA水平被显著抑制($p<0.05$),与模型组相比,分别降低67.34%、31.39%、56.62%,表明三七皂苷R1有效抑制心肌炎症因子mRNA水平表达,减少心肌肥厚发生。

2.5 三七皂苷 R1 对心肌细胞中 p65 磷酸化和 I- $\kappa\text{B}\alpha$ 的影响

NF- κB (Nuclear factor- kappa B)是一种存在于真核细胞中的转录因子,在炎症反应中发挥重要作用。据相关文献报道,NF- κB 信号通路可作为心肌肥厚的潜在治疗靶点^[19]。P50和p65作为NF- κB 家族的两个亚单位以二聚体的形式存在于胞浆内,是其活性的主要表现形式。而作为蛋白复合体的I κB 蛋白激酶通过

介导I κB 的激活进而活化I κB 磷酸化激酶,导致I κB 发生构象改变并降解,NF- κB 激活并移位进入细胞核促进核因子转录^[20]。

Western blot结果显示,ISO引起NF- κB p65亚基磷酸化的增加,I- $\kappa\text{B}\alpha$ 水平降低。相反的是,p65磷酸化和I- $\kappa\text{B}\alpha$ 水平的降低在25 μM 三七皂苷R1预处理下明显反转($p<0.05$),与模型组相比,p65降低71.32%,I- $\kappa\text{B}\alpha$ 增加37.61%(图1、表5)。结果表明,ISO不仅是诱导心肌肥大导致心肌损伤的有力刺激因子,而且是I- $\kappa\text{B}\alpha$ 降解和p65磷酸化的炎症启动因子,促使NF- κB 信号通路的激活。

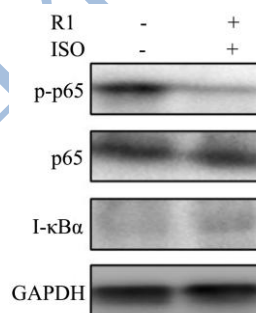


图1 三七皂苷R1对心肌细胞p65、p-p65及I- $\kappa\text{B}\alpha$ 蛋白表达的影响

Fig.1 The effects of Notoginsenoside R1 on p65, p-p65 and I- $\kappa\text{B}\alpha$ in cardiomyocytes

表5 三七皂苷R1对心肌细胞p65、p-p65及I- $\kappa\text{B}\alpha$ 蛋白表达的影响

Table 5 The effects of Notoginsenoside R1 on p65, p-p65 and I- $\kappa\text{B}\alpha$ in cardiomyocytes($\bar{x}\pm s$, n=5)

组别	剂量/($\mu\text{g/mL}$)	p65磷酸化水平(p-p65/p65)	I- $\kappa\text{B}\alpha$ 表达量(I- $\kappa\text{B}\alpha$ /GAPDH)
异丙肾上腺素	20	1.36 \pm 0.12	0.68 \pm 0.15
异丙肾上腺素+三七皂苷 R1 25 μM	20	0.39 \pm 0.19 [*]	1.09 \pm 0.2 [*]

2.6 三七皂苷 R1 对心肌细胞肥大的抑制作用与NF- κB 信号传导有关

随着NF- κB 的活化,其下游炎症因子如TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的水平升高。在这些炎症因子中,TNF- α 一方面通过促进IL-6等的表达进一步促使炎症的发生,另一方面激活Caspase诱导的凋亡促进心肌重塑的发生^[21]。

将H9c2细胞用PDTC(NF- κB 的特异性抑制剂)处理30 min,给予三七皂苷R1(25 μM)1 h,然后用ISO(20 $\mu\text{g/mL}$)处理24 h。

如表6所示,与空白对照组相比,ISO显著提高了ANF mRNA的水平($p<0.05$)。给予三七皂苷R1后,这种升高会被显著降低($p<0.05$),与模型组相比,ANF降低55.04%;在PDTC共同处理下,这种抑制又被显著反转($p<0.05$),与模型+给药组相比,ANF升高22.46%。与三七皂苷R1对ANF活性的抑制作

用相似,三七皂苷 R1 显著抑制 ISO 诱导的 Caspase-3 的表达 ($p<0.05$),与模型组相比, Caspase-3 降低 47.37%;而与 PDTC 共同处理时,这种抑制又会被显著反转 ($p<0.05$),与模型+给药组相比, Caspase-3 升

高 34.46%。另外,单独用三七皂苷 R1 对 ANF 和 Caspase-3 的表达没有显著影响 ($p>0.05$)。这些数据表明,三七皂苷 R1 对 ISO 诱导的心肌肥大的抑制作用与 NF- κ B 的抑制密切相关。

表 6 三七皂苷 R1 对心肌细胞肥大的影响与 NF- κ B 信号传导有关

Table 6 The effects of Notoginsenoside R1 on hypertrophy in cardiomyocytes is associated with NF- κ B signalling

组别	剂量/(μ g/mL)	ANF mRNA	Caspase-3 活性
正常对照		1.00 \pm 0.21	0.99 \pm 0.06
三七皂苷 R1		1.14 \pm 0.45	1.22 \pm 0.13
异丙肾上腺素	20	9.52 \pm 1.03 [#]	5.89 \pm 0.76 [#]
PDTC		1.01 \pm 0.23	1.18 \pm 0.09
异丙肾上腺素+三七皂苷 R1 25 μ M	20	4.28 \pm 0.46 [*]	3.10 \pm 0.34 [*]
异丙肾上腺素+三七皂苷 R1 25 μ M+PDTC	20	5.52 \pm 0.61 ^{&}	4.73 \pm 0.58 ^{&}

注:与对照组相比[#] $p<0.05$;与 ISO 处理组相比^{*} $p<0.05$;与 ISO+三七皂苷 R1 组相比[&] $p<0.05$ 。

3 结论

3.1 本文在成功制备 ISO 致心肌细胞肥大模型的基础上,探究了三七皂苷 R1 对大鼠 H9c2 细胞心肌肥大的保护作用,结果显示:三七皂苷 R1 各剂量组自身对心肌细胞活力并无明显差异,但给予 ISO 处理后,三七皂苷 R1 各剂量组明显抑制了 ISO 所致的细胞活力的降低,并显著降低 ISO 所致的 ANF 和 β -MHC 的 mRNA 表达水平,心肌细胞表面积统计结果也显示三七皂苷 R1 有明显的改善心肌细胞肥大的作用。

3.2 在上述研究结果基础上,从炎症方面探究了三七皂苷 R1 对大鼠 H9c2 心肌细胞的保护作用。结果表明,ISO 不仅是诱导心肌肥大导致心肌损伤的有力刺激因子,而且是 I- κ B α 降解和 p65 磷酸化的炎症启动因子,促使 NF- κ B 信号通路的激活。数据还显示,随着 NF- κ B 的活化,其下游炎症因子如 TNF- α , IL-6 和 IL-1 β 的水平升高。在这些炎症因子中, TNF- α 的上调可以直接导致细胞凋亡,如通过心肌细胞中 Caspase-3 的激活所证实。此外,与三七皂苷 R1 类似, NF- κ B 抑制剂 PDTC 也部分抑制了 ISO 诱导的 ANF mRNA 的表达。同时, PDTC 抑制了 ISO 诱导的心肌细胞中 Caspase-3 的活化。因此,三七皂苷 R1 可以通过阻断 NF- κ B 信号通路来保护心肌细胞以免 ISO 诱导的心肌肥大。

3.3 总之,本研究表明,三七皂苷 R1 预处理能改善细胞存活力,降低心肌细胞面积,减弱 ISO 引起的炎性细胞因子的产生,抑制心肌细胞中 NF- κ B 的活化。虽然三七皂苷 R1 预处理显著抑制了 ISO 诱导的心肌功能障碍和心肌细胞中的炎症因子表达,但是三七皂苷 R1 对心肌肥厚的治疗作用的研究尚不完善。因此,需要进行更全面的研究来验证三七皂苷 R1 治疗心肌

肥大的病理机制,为其进一步临床应用提供理论基础。

参考文献

- [1] Issei Komuro. Molecular mechanism of cardiac hypertrophy and development [J]. Japanese Circulation Journal, 2001, 65(5): 353-358
- [2] I. Shimizu, Tohru Minamino. Physiological and pathological cardiac hypertrophy [J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2016, 97: 245-262
- [3] Hedayat M, Mahammadi M J, Hedayat M, et al. Proinflammatory cytokines in heart failure: double edged swords [J]. Heart Fail Rev, 2010, 15(6): 543-562
- [4] Debabrata Chowdhury, Anjana Devi Tangutur, Tarak Nath Khatua, et al. A proteomic view of isoproterenol induced cardiac hypertrophy: prohibitin identified as a potential biomarker in rats [J]. Journal of Translational Medicine, 2013, 11: 130
- [5] Molojavvi A, Lindecke A, Raupach A, et al. Myoglobin-deficient mice activate a distinct cardiac gene expression program in response to isoproterenol-induced hypertrophy [J]. Physiological Genomics, 2010, 41(2): 137-145
- [6] 孙雯怡,彭康宁,李洋洋,等.三七总皂苷预处理对肾缺血再灌注损伤大鼠 NF- κ B p65、IL-1 β 表达的影响[J].中药药理与临床,2017,33(5):58-62
- [7] SUN Wen-yi, PENG Kang-ning, LI Yang-yang, et al. Effects of *Panax notoginseng* saponins pretreatment on expressions of NF- κ B p65 and IL-1 β in rats with renal ischemia reperfusion injury [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2017, 33(5): 58-62
- [7] 王瑞幸,戴毫,穆云萍,等.三七皂苷 R1 对肺高压大鼠肺动脉

- 平滑肌细胞 SOCE 的抑制作用[J].中国药理学通报,2015, 31(10):1463-1468
- WANG Rui-xing, DAI Mao, MU Yun-ping, et al. Inhibition of notoginsenoside R1 on SOCE in pulmonary arterial smooth muscle cells of pulmonary hypertension rats [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2015, 31(10): 1463-1468
- [8] Zhang H S, Wang S Q. Notoginsenoside R1 from *Panaxnotoginseng* inhibits TNF- α -induced PAI-1 production in human aortic smooth muscle cells [J]. Vascular Pharmacol, 2006, 44(4): 224-230
- [9] Chen W X, Wang F, Liu Y Y, et al. Effect of notoginsenoside R1 on hepatic microcirculation disturbance induced by gut ischemia and reperfusion [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(1): 29-37
- [10] Liu W J, Tang H T, Jia Y T, et al. Notoginsenoside R1 attenuates renal Ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Shock, 2010, 34(3): 314-320
- [11] Sun B, Xiao J, Sun X B, Wu Y. Notoginsenoside R1 attenuates cardiac dysfunction in endotoxemic mice: an insight into oestrogen receptor activation and PI3K/Akt signaling [J]. British Journal of Pharmacology, 2013, 168(7): 1758-1770
- [12] Li Y F, Shen D, Tang XM, et al. Chlorogenic acid prevents isoproterenol-induced hypertrophy in neonatal rat myocytes [J]. Toxicology Letters, 2014, 226(3): 257-263
- [13] Garcia S, Akbar MS, Ali SS, et al. N-terminal pro B-type natriuretic peptide predicts mortality in patients with left ventricular hypertrophy [J]. Int J Cardiol., 2010, 143(3): 349-352
- [14] Shalitin N, Friedman M, Schlesinger H, et al. The effect of angiotensin II on myosin heavy chain expression in cultured myocardial cells [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim., 1996, 32(9): 573-578
- [15] Knoll R, Marston S. On mechanosensation, actin/myosin interaction and hypertrophy [J]. Trends Cardiovasc Med., 2012, 22(1): 17-22
- [16] Gupta S, Young D, Maitra R K, et al. Prevention of cardiac hypertrophy and heart failure by silencing of NF- κ B [J]. J Mol Biol., 2008, 375(3): 637-649
- [17] Avlas O, Fallach R, Shainberg A, et al. Toll-like receptor 4 stimulation initiates an inflammatory response that decreases cardiomyocyte contractility [J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(7): 1895-1909
- [18] Jones WK, Brown M, Ren X, et al. NF- κ B as an integrator of diverse signaling pathways: the heart of myocardial signaling [J] Cardiovasc Toxicol, 2003, 3(3): 229
- [19] Moura L M, Rochacalves F, Zamorano J L, et al. New cardiovascular biomarkers: clinical implications in patients with valvular heart disease [J]. Expert Review of Cardiovascular Therapy, 2008, 6(7): 945-954
- [20] Puncell N H, Molkenin J D. Is nuclear factor κ B an attractive therapeutic target for treating cardiac hypertrophy [J]. Circulation, 2003, 108: 638-640
- [21] Gottschall PE, Yu X. Cytokines regulate gelatinase A and B (matrix metalloproteinase 2 and 9) activity in cultured rat astrocytes [J]. J Neurochem., 1995, 64(4): 1513-1520