

# 氧化苦参碱通过调控 MAPK 信息通路改善醛固酮诱导的 心肌细胞损伤

杨李强, 孙爱华, 徐漪旋, 张彦燕, 潘迪, 陈妍, 陶玲\*, 沈祥春\*

(贵州医科大学, 贵州省高等学校天然药物药理与成药性评价特色重点实验室, 贵阳 550025)

**[摘要]** **目的:**研究氧化苦参碱(OMT)对醛固酮(ALD)诱导心肌细胞损伤的改善作用及其作用机制。**方法:**采用胰酶消化法和差速贴壁法分离和纯化新生大鼠心肌细胞进行培养,采用 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ALD建立心肌细胞损伤模型。实验分为空白组,模型组( $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ALD),ALD + OMT高浓度( $3.78 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )组,ALD + OMT低浓度( $1.89 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )组,ALD + JNK抑制剂(JNK I, $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )组,ALD + 阿司匹林(Asp, $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )组,即 OMT, JNK抑制剂和阿司匹林组先以相应药物预处理2 h后加入终浓度为 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ALD共同孵育24 h。二甲基噻唑蓝(MTT)法检测细胞存活率,Giemsa染色观察心肌细胞形态学变化情况。蛋白免疫印迹法(Western blot)及实时荧光定量PCR(Real-time PCR)分析 OMT对ALD诱导JNK蛋白表达水平,JNK磷酸化(p-JNK)水平及mRNA表达的影响。**结果:**与空白组比较,ALD可显著降低心肌细胞存活率( $P < 0.01$ )并改变细胞形态,OMT可显著改善醛固酮诱导的心肌细胞存活率降低( $P < 0.01$ )并使细胞恢复至正常形态;Western blot结果显示ALD可诱导JNK蛋白磷酸化水平升高( $P < 0.01$ ),而OMT可显著抑制ALD诱导的p-JNK表达增加( $P < 0.01$ );Real-time PCR结果显示,与空白组比较,ALD可诱导JNK mRNA表达增加( $P < 0.01$ ),使用OMT进行预处理后,各组基因表达均没有显著改变。**结论:**OMT对ALD诱导的心肌细胞损伤具有保护作用,其作用机制与抑制JNK蛋白磷酸化密切相关。

**[关键词]** 氧化苦参碱; 醛固酮; 心肌细胞损伤; MAPK信号系统; 磷酸化

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)15-0130-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017150130

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170511.0935.044.html>

**[网络出版时间]** 2017-05-11 9:35

## Protective Effect of Oxymatrine Against Cardiac Myocytes Injury Induced by Aldosterone via MAPK Signaling Pathway

YANG Li-qiang, SUN Ai-hua, XU Yi-ni, ZHANG Yan-yan, PAN Di,  
CHEN Yan, TAO Ling\*, SHEN Xiang-chun\*

(The High Educational Key Laboratory of Guizhou Province for Natural Medicinal Pharmacology and  
Druggability, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effect of oxymatrine (OMT) on cardiac myocytes injure induced by aldosterone and explore its mechanism. **Method:** The cardiomyocytes of neonatal rats were

**[收稿日期]** 20170325(007)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81560588);贵州省科学技术研究重点项目(黔科合JZ字[2015]2002号);教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-13-0747);贵州省高等学校科技创新人才团队项目(黔教合人才团队字[2014]31号);贵州省高层次创新型人才百层次人才项目(黔科合人才[2015]4029号);贵州省科技创新团队项目(黔科合人才团队[2015]4025号);贵州省大学生创新创业训练计划项目(201510660002)

**[第一作者]** 杨李强,在读硕士,从事心血管药理学实验研究,Tel:18302699421,E-mail:1246226286@qq.com

**[通讯作者]** \*陶玲,教授,从事心血管药理学实验研究,Tel:0851-88416160,E-mail:573793952@qq.com;

\*沈祥春,博士,教授,博士生导师,从事功能天然产物化学生物学、心脑血管药物药理研究,Tel:0851-88416149,E-mail:shenxiangchun@126.com

isolated and purified by trypsin digestion and differential adherence method for culture, and then  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ALD was used to establish myocardial injury models. The experiment was divided into blank group, model group ( $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ALD), ALD + OMT high dose group ( $3.78 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), ALD + OMT low dose group ( $1.89 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), ALD + JNK inhibitor group (JNK I,  $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), ALD + Aspirin group (Asp,  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). That is to say, in OMT, JNK inhibitor and Aspirin groups, after pre-treatment with corresponding medicines for 2 h, ALD with the final concentration of  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  was added for co-incubation for 24 h. Then MTT assay was used to detect the cell survival rate; the morphological changes of cardiac myocytes were observed by Giemsa staining; Western blot and Real-time PCR were used to analyze the effect of OMT on the protein and mRNA expression of JNK and p-JNK. **Result:** As compared with the blank group, ALD significantly reduced the survival rate of cardiac myocytes ( $P < 0.01$ ) and changed the cell morphology; OMT could reverse the decrease in survival rate of cardiac myocytes ( $P < 0.01$ ) and restore the cells to normal form; Western blot showed that ALD could increase the phosphorylation of JNK ( $P < 0.01$ ), while the expression of p-JNK was significantly down-regulated after pre-incubated with OMT as compared with ALD group ( $P < 0.01$ ). Real-time PCR results showed that the expression of JNK mRNA in ALD group was higher than that in normal control group ( $P < 0.01$ ), however no significant change of gene expression was observed in OMT group. **Conclusion:** OMT had protective effect on ALD-induced cardiac myocytes injury, and its mechanism may be closely related to inhibiting JNK protein phosphorylation.

[ **Key words** ] oxymatrine; aldosterone; cardiac myocytes injury; MAPK signaling pathway; phosphorylation

随着人口老龄化、饮食结构的改变和工作压力的增大,心血管系统疾病的发病率和死亡率逐年增加,已超越肿瘤疾病而位居世界第一<sup>[1]</sup>。心肌细胞作为一种终末分化的心脏功能细胞,其大量损伤将导致不可逆的心脏功能紊乱<sup>[2]</sup>。事实上,心肌缺血再灌注损伤、心力衰竭和心律失常等心血管系统疾病的发生发展均伴有不同程度的心肌细胞损伤<sup>[3]</sup>。因此,寻找治疗药物及其作用靶点以减少病理状态下的心肌细胞损伤对心脏疾病的治疗具有重要意义。研究证实过量的醛固酮(ALD)可通过增强血管紧张素 II 效应、增加炎症介质分泌、提高机体氧化应激水平及细胞因子释放等途径导致心室重构。相关研究也证实 ALD 可通过激活 MAPK 信号通路引起心肌细胞损伤<sup>[4-5]</sup>。

氧化苦参碱是从豆科植物苦参、山豆根和苦豆子中提取的喹诺里西啶类生物碱,具有抗炎、镇痛、抗心率失常等作用。已有实验表明,氧化苦参碱能够改善 ALD 诱导的心肌细胞损伤<sup>[6]</sup>,但其作用机制尚不明确。本实验使用 ALD 建立心肌细胞损伤模型,研究氧化苦参碱对 ALD 诱导心肌细胞损伤的保护机制。另外,前期研究证实阿司匹林可保护转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )刺激诱导的心肌细胞损伤,本课题采用对心血管疾病疗效明确的阿司匹林作为氧化苦参碱作用研究的阳性药进一步证实氧化苦参碱

对 ALD 诱导心肌细胞损伤的保护作用。

## 1 材料

**1.1 动物** 新生 1~3 d SD 大鼠,饲养于无毒塑料盒中,每天更换垫料 1 次,自由摄食和饮水,保持室内温度 18~22 °C,相对湿度 50%~70%,自然光照。以上动物均由贵州医科大学动物实验中心提供,动物合格证号 SCXK(黔)2012-0001。本研究获得贵州医科大学实验动物伦理委员会批准,所有实验研究均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

**1.2 药物及试剂** ALD,噻唑蓝(MTT),JNK 抑制剂(SP600125)(美国 Sigma 公司,批号分别为 A9477,321E0512,081M1140V);氧化苦参碱(OMT,南京泽郎医药科技有限公司,批号 20120210);阿司匹林(上海晶纯生化科技股份有限公司,批号 D1316056)。药物溶于二甲基亚砜(DMSO)作为母液,-20 °C 保存,使用时根据实验需要加入无血清 DMEM 培养基稀释至相应浓度。DMEM 培养基和胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为 216549,1315148);姬姆萨原液(Gimesa,索莱宝公司,批号 201501113);抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(英国 Abcam 公司,批号 ab9485);JNK 及其磷酸化多克隆抗体(美国 ImmunoWay 公司,批号分别为 B4101,B5601);RNA 提取试剂盒和逆转录试剂盒

(日本 Takara 公司,批号分别为 AK703,AK5301);引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

**1.3 仪器** SW-CJ-1F 型双面净化工作台(苏州佳宝净化工程设备有限公司),HF240 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(上海力申科学仪器有限公司),Microfuge 20R 型台式高速冷冻离心机(太仓市医疗机械厂),DMi 1 型倒置显微镜(德国徕卡科技公司),DG 530 型酶联免疫检测仪(华东电子集团医疗装备有限公司),Universal Hood II 型凝胶成像系统仪及 CFX Connect Optics Module 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),702 型立式超低温冰箱(美国赛默飞世尔科技公司)。

## 2 方法

**2.1 原代大鼠心肌细胞的分离提取及培养** 剪取 1~3 d 内新生 SD 乳鼠心脏,用眼科剪将其剪成约 1 mm<sup>3</sup> 大小的组织块,加入 0.08% 胰蛋白酶,吸管吹打组织块直至其消化为白色半透明状为止,自然沉淀,收集上清,将收集的细胞悬液以 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 7 min,弃上清后加入含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基制成单细胞悬液。将细胞滤液接种于培养瓶内,置于 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱差速贴壁 1.5 h 获取心肌细胞。细胞培养前 3 d 加入 1% 的 5-溴脱氧尿苷(5-BrdU)以抑制心肌成纤维细胞的增殖。

### 2.2 实验分组与药物干预

**2.2.1 确定氧化苦参碱对 ALD 诱导心肌细胞损伤的保护作用** 共分为 5 组:空白组,模型组(ALD, 1 × 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>),阿司匹林组(1 × 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>),氧化苦参碱高浓度组(3.78 × 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup>),氧化苦参碱低浓度组(1.89 × 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup>)。

**2.2.2 确定氧化苦参碱对 ALD 诱导心肌细胞损伤的保护作用与 MAPK 信号通路的相关性** 实验共分为 6 组,分别是空白组,模型组(ALD, 1 × 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>),氧化苦参碱高浓度组(3.78 × 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup>),氧化苦参碱低浓度组(1.89 × 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup>),JNK 抑制剂组(JNK I, 5 × 10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup>)及阿司匹林组(1 × 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>)。心肌细胞先加入各组实验药物预处理 2 h,再加入终浓度为 1 × 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup> 的模型组共同孵育 24 h。

**2.3 MTT 实验检测细胞存活率** 将差速贴壁后的心肌细胞悬液接种于 96 孔板中(1 × 10<sup>6</sup> 个/mL),于 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h 后换液,36 h 后按上述分组进行药物干预。药物作用完毕后,每孔加入 MTT 溶液 20 μL,37 ℃ 继续培养 4 h 后弃掉上清液,每孔加入 DMSO 150 μL,震荡 10 min,结晶充分

溶解后,在酶联免疫检测仪 490 nm 波长处测定各孔吸光度 A,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = \frac{(A_{\text{实验组}} - A_{\text{阴性组}})}{(A_{\text{空白组}} - A_{\text{阴性组}})} \times 100\%$$

**2.4 Gimesa 染色观察细胞形态** 心肌细胞接种于 24 孔板中,按分组加入药物处理。磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 次后,使用 4% 多聚甲醛固定 15 min;再次使用 PBS 洗 3 次,加入 Gimesa 染液染色 15 min。PBS 清洗后待其自然干燥,倒置显微镜下观察结果并拍照。

**2.5 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测 JNK 与 p-JNK 蛋白表达水平** 培养的心肌细胞经药物处理后,弃去培养基并加入 RIPA 裂解液,将细胞刮下提取总蛋白。使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。取蛋白 35 μg,使用 Loading buffer 定容至 30 μL,使用 SDS-PAGE 分离蛋白,用湿转法将其转至聚偏氟乙烯膜上,1% 牛血清白蛋白封闭后,加一抗(1:1 000)与二抗(1:5 000)孵育,使用化学发光剂 ECL 处理后曝光显影并拍照。使用 GAPDH 作为内参,结果以灰度值比值表示。

**2.6 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)测定 JNK 的 mRNA 表达** 使用试剂盒提取各组细胞总 RNA,取其 1 μg 进行逆转录生成 cDNA,将逆转录后的 cDNA 与 PCR 反应液配制后采用两步法进行 PCR 扩增。JNK 序列上游为 5'-GGAGGAGCGAAC TAAGAATGG-3',下游为 5'-ATTGACAGACGGCG AAGAGA-3',长度 103 bp;GAPDH 引物序列上游为 5'-GACATGCCCGCTGGAGAAAC-3',下游为 5'-AGCCAGGATGCCCTTTAGT-3',长度 92 bp。第一步:95 ℃ 预变性 30 s,循环 1 次;第二步:PCR 反应阶段,95 ℃ 退火 5 s,60 ℃ 延伸 30 s,循环 40 次。根据 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法,以 GAPDH 为参照进行 JNK mRNA 表达的相对定量分析。

**2.7 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 统计学软件分析实验数据,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异比较采用多个样本均数比较的单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 MTT 法检测氧化苦参碱对 ALD 诱导心肌细胞损伤的影响** 心肌细胞经模型组处理 24 h 后,细胞增殖活力显著减少( $P < 0.01$ )。与模型组比较,氧化苦参碱高、低浓度组细胞存活率显著升高( $P < 0.01$ )。见表 1。

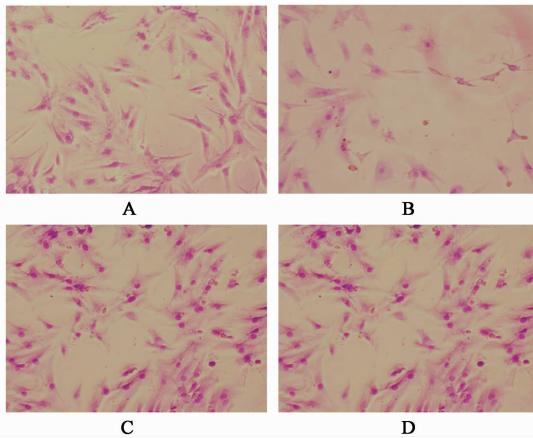
表 1 氧化苦参碱对 ALD 诱导心肌细胞损伤的保护作用 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Table 1 Protected effect of oxymatrine on cardiomyocyte cell injury induced by ALD ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

组别	浓度/mol·L <sup>-1</sup>	A
空白	-	0.460 ± 0.053
模型	1.00 × 10 <sup>-5</sup>	0.359 ± 0.015 <sup>1)</sup>
阿司匹林	1.00 × 10 <sup>-5</sup>	0.411 ± 0.027 <sup>2)</sup>
氧化苦参碱	3.78 × 10 <sup>-4</sup>	0.401 ± 0.011 <sup>2)</sup>
	1.89 × 10 <sup>-4</sup>	0.394 ± 0.030 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (表 3, 4 同)。

**3.2 对 ALD 诱导心肌细胞形态变化的影响** 心肌细胞经 Gimesa 染液处理后,细胞核被染为蓝紫色,细胞浆染成淡红色。空白组细胞细胞核多偏向一侧,细胞呈多角形或梭型且轮廓清楚;而模型组的细胞胞核居中、胞体膨大,细胞核轮廓模糊,细胞间隙明显增大,表现出细胞损伤的形态学特征;经高、低浓度氧化苦参碱预保护后,细胞形态接近于正常。见图 1。



A. 空白组;B. 模型组;C. 氧化苦参碱 3.78 × 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> 组;D. 氧化苦参碱 1.89 × 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> 组

图 1 氧化苦参碱对 ALD 诱导心肌细胞形态变化的影响(姬姆萨, × 100)

Fig.1 Protected effect of oxymatrine on morphologic change of cell injury induced by ALD(Gimesa, × 100)

**3.3 ALD 诱导心肌细胞损伤与 MAPK 信号通路的相关性** 本实验通过 Western blot 检测 ALD 诱导心肌细胞 p-JNK, JNK, p-p38 及 p38 蛋白表达变化,探讨 ALD 诱导心肌细胞损伤是否与 MAPK 信号通路有关。心肌细胞经 ALD(1 × 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>) 处理 24 h 后,细胞活力降低 ( $P < 0.01$ )。JNK 抑制剂(5 × 10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup>), p38 MAPK 抑制剂(1 × 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>) 预处理后均可明显抑制 ALD 导致的心肌细胞

活力下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表 2。

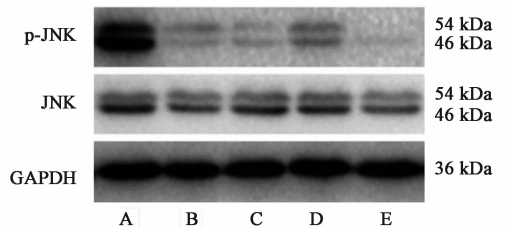
表 2 ERK 1, JNK 1, p38 MAPK 1 对 ALD 诱导心肌细胞损伤的保护作用 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Table 2 Protected effect of ERK1/2 I, JNK I, p38 MAPK I in cardiac myocytes injury induced by ALD ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

组别	浓度/mol·L <sup>-1</sup>	A
空白	-	0.590 ± 0.053
模型	1 × 10 <sup>-5</sup>	0.449 ± 0.035 <sup>1)</sup>
JNK 1	5 × 10 <sup>-6</sup>	0.571 ± 0.034 <sup>3)</sup>
p38 MAPK 1	1 × 10 <sup>-5</sup>	0.497 ± 0.027 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.4 对 ALD 诱导 MAPK 信号通路蛋白 JNK 表达的影响** ALD 作用心肌细胞 24 h 后 p-JNK 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ );经氧化苦参碱, JNK 抑制剂或阿司匹林预处理心肌细胞 2 h, 可显著抑制 ALD 诱导的 p-JNK 增加 ( $P < 0.01$ )。见图 2 及表 3。



A. 模型组;B. 空白组;C. 氧化苦参碱 3.78 × 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> 组;D. 氧化苦参碱 1.89 × 10<sup>-4</sup> mol·L<sup>-1</sup> 组;E. 阿司匹林组

图 2 各组 p-JNK 及 JNK 蛋白的表达电泳

Fig.2 Expression of p-JNK and JNK protein in each groups

表 3 氧化苦参碱对 ALD 诱导心肌细胞 p-JNK 及 JNK 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 3 Effect of oxymatrine on ALD-induced p-JNK, JNK protein levels ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

组别	浓度/mol·L <sup>-1</sup>	p-JNK/JNK	JNK/GAPDH
空白	-	1	1
模型	1.00 × 10 <sup>-5</sup>	2.61 ± 0.18 <sup>1)</sup>	1.03 ± 0.10
氧化苦参碱	3.78 × 10 <sup>-4</sup>	1.11 ± 0.14 <sup>2)</sup>	1.01 ± 0.09
	1.89 × 10 <sup>-4</sup>	1.18 ± 0.12 <sup>2)</sup>	0.98 ± 0.07
阿司匹林	1.00 × 10 <sup>-5</sup>	0.94 ± 0.14 <sup>2)</sup>	1.03 ± 0.03

**3.5 对 ALD 诱导的 JNK mRNA 表达的影响** 细胞经 ALD 处理后, JNK mRNA 表达显著升高 ( $P < 0.01$ )。经氧化苦参碱及相应蛋白抑制剂预处理 2 h 后,与模型组比较, JNK mRNA 表达水平没有显著性变化。见表 4。

#### 4 讨论

心肌细胞是心脏组织搏动的根源,作为一种不

表 4 氧化苦参碱对 ALD 诱导的 JNK mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 4 Regulated effect of oxymatrine on JNK mRNA expression in cardiac myocytes injury induced by ALD ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

组别	浓度/mol·L <sup>-1</sup>	JNK
空白	-	1.000 ± 0.119
模型	1.00 × 10 <sup>-5</sup>	1.700 ± 0.158 <sup>1)</sup>
氧化苦参碱	3.78 × 10 <sup>-4</sup>	1.760 ± 0.140
	1.89 × 10 <sup>-4</sup>	1.632 ± 0.132
阿司匹林	1.00 × 10 <sup>-5</sup>	1.830 ± 0.115

可再生的终末分化细胞,心肌细胞的损伤将会引起不可逆的心脏功能障碍,进而导致一系列的心血管疾病,如心绞痛、心律失常及心脏衰竭等<sup>[7]</sup>。研究心肌细胞损伤过程的发生、发展机制,同时寻找有效防治药物对心血管疾病防治理论与临床治疗都具有重大意义。

目前认为肾素-血管紧张素-ALD 系统 (RAAS) 是心肌损伤的核心危险因素之一<sup>[8-9]</sup>。现已证实心脏可自身合成 ALD,且在心肌细胞和心肌成纤维细胞内存在大量的 ALD 受体<sup>[10]</sup>,大量实验和临床证据表明,ALD 可引起心肌组织损伤,包括细胞肥大、纤维化或心肌凋亡<sup>[11-13]</sup>。ALD 也可以通过非基因途径诱导心肌细胞损伤,其中就包括激活 MAPK 信号通路磷酸化。目前 MAPKs 家族中研究最多的有 3 个主要成员,即 ERK, JNK 和 p38MAPK,是多种信号转导途径的共同作用部位<sup>[14-15]</sup>。其中 JNK 蛋白参与细胞对辐射、渗透压、温度变化等应激反应,是各种应激原诱导细胞信号转导的关键分子。研究报道在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞凋亡过程中,MAPK 家族 (JNK, ERK, p38MAPK) 的磷酸化显著增加<sup>[16]</sup>; WANG 等<sup>[17]</sup>证实可通过抑制 MAPK 信号通路激活保护 H9c2 心肌细胞免于化学缺氧诱导的损伤。本实验室前期研究显示,MAPK 信号激活对心血管疾病的发生发展有很大的促进作用<sup>[18-20]</sup>。

在本实验中,ALD (1 × 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup>) 处理 24 h 后,心肌细胞损伤明显,主要表现在,心肌细胞活力降低,LDH 外露量增加,细胞形态发生明显改变。使用 JNK, p38, ERK 抑制剂进行预保护,可显著改善 ALD 诱导的心肌细胞活性下降,从而验证了 ALD 诱导心肌细胞损伤与 MAPK 信号通路的激活密切相关。另外,Western blot 结果证实,ALD 处理细胞 24 h 后,p-JNK 表达明显增加。Real-time PCR 分析结果显示,ALD 还可以引起心肌细胞 JNK mRNA

表达升高,说明其有可能是通过基因水平和蛋白水平共同来诱导心肌细胞损伤过程。

氧化苦参碱,一种从苦参干燥根中提取的生物碱。近年来,随着对氧化苦参碱研究的不断深入,发现其具有抗心律失常、强心、降压和保护移植心肌等作用。本实验采用 MTT 法和 Giemsa 染色观察氧化苦参碱对 ALD 诱导的心肌细胞损伤的保护作用。实验结果表明氧化苦参碱可提高心肌细胞存活率,并且能保护细胞膜的结构和功能,维持心肌细胞正常形态,改善 ALD 诱导的心肌细胞的损伤。机制方面,心肌细胞经氧化苦参碱预处理 2 h 后,可明显抑制 ALD 诱导的 p-JNK 表达水平增加,而总 JNK 蛋白的表达与模型组比较,无显著差异。可以得出,氧化苦参碱改善 ALD 诱导的心肌细胞损伤,其作用机制可能与抑制 JNK 磷酸化有关。Real-time PCR 结果显示,与模型组比较,加入氧化苦参碱后,对各组基因表达均没有显著改变,可以推测氧化苦参碱主要从蛋白水平调控 MAPK 的表达,对其基因水平没有影响。

综上所述,氧化苦参碱对 ALD 诱导的心肌细胞损伤的保护作用与抑制 MAPK 信号通路蛋白 JNK 的磷酸化水平密切相关,以上发现为氧化苦参碱应用于心血管疾病的防治提供新的理论基础。

[参考文献]

[1] 王羿,徐旖旎,江滢. 环维黄杨星 D 对高交感活性诱导心肌细胞损伤的保护作用[J]. 中药材, 2014, 37 (9):1632-1635.

[2] CHU M, Koshman Y E, Samarel A M. Mechanotransduction in cardiac hypertrophy and ischemia[J]. Translational Cardiology, 2012, 10 (6): 151-184.

[3] WANG L, QIAN L. MiR-24 regulates intrinsic apoptosis pathway in mouse cardiomyocytes[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e85389.

[4] 梁远红,周燕,刘烈,等. 慢病毒介导的 RNA 干扰对醛固酮过负荷心肌梗死大鼠心脏重构的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(10): 2120-2122.

[5] Ashton A W, Le T Y, Gomez-Sanchez C E, et al. Role of nongenomic signaling pathways activated by aldosterone during cardiac reperfusion injury[J]. Mol Endocrinol, 2015, 29(8): 1144-1155.

[6] 陈妍,温佳敏,徐旖旎,等. 氧化苦参碱对醛固酮诱导心肌细胞损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(19): 76-80.

[7] Lal H, Ahmad F, Parikh S, et al. TNNI3K, a novel cardiac-specific kinase, emerging as a molecular target

- for the treatment of cardiac disease[J]. *Circ J*, 2014, 78(7):1514-1519.
- [ 8 ] Grebe J L, Mecca A P, Lingis M, et al. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7) [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(2):736-742.
- [ 9 ] Messaoudi S, Gravez B, Tarjus A, et al. Aldosterone-specific activation of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor *in vivo* [J]. *Hypertension*, 2013, 61(2):361-367.
- [10] Ayuzawa N, Nagase M, Ueda K, et al. Rac1-mediated activation of mineralocorticoid receptor in pressure overload-induced cardiac injury [J]. *Hypertension*, 2016, 67(1):99-106
- [11] Le H H, Khatib C, Mombled M, et al. Impact of aldosterone antagonists on sudden cardiac death prevention in heart failure and post-myocardial infarction patients: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2):e0145958.
- [12] Alessia B, Valentina C, Jeson S, et al. Aldosterone predicts cardiovascular, renal, and metabolic disease in the general community: a 4-year follow-up[J]. *J Am Heart Assoc*, 2015, 4(12):e002505.
- [13] Montes-Cobos E, LI X, Fischer H J, et al. Inducible knock-down of the mineralocorticoid receptor in mice disturbs regulation of the renin-angiotensin aldosterone system and attenuates heart failure induced by pressure overload[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11):e0143954.
- [14] 高黎,赵志英. MAPK 信号转导通路及其意义[J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(53):25-27.
- [15] 陈建勇,王聪,王娟,等. MAPK 信号通路研究进展[J]. 中国医药科学, 2011, 1(8):32-34.
- [16] Park E S, KANG J C, JANG Y C, et al. Cardioprotective effects of rhamnetin in H9c2 cardiomyoblast cells under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(3):552-560.
- [17] WANG G, CUI J, GUO Y F. Cyclosporin A protects H9c2 cells against chemical hypoxia-induced injury via inhibition of MAPK signaling pathway[J]. *Int Heart J*, 2016, 57(4):483-489.
- [18] 付凌云,黄海烽,徐旖旎,等. 氧化苦参碱抑制 p38MAPK 磷酸化改善醛固酮诱导心肌成纤维细胞增殖[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(22):103-106.
- [19] 刘小红,杨李强,徐旖旎,等. 氧化苦参碱保护醛固酮诱导的心肌细胞损伤作用机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(21):108-110.
- [20] 文波,令狐克刚,徐旖旎,等. 艳山姜挥发油抑制 JNK1/2/3 磷酸化对 ox-LDL 诱导的 HAECs 损伤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(22):112-115.

[责任编辑 周冰冰]