

益母草碱对血管紧张素 II 诱导的心肌细胞肥大 p38 MAPK 信号通路和 miRNA-1 表达的影响

卢丽娜¹, 梁赵文², 罗建华¹, 李利¹, 袁露¹, 杨辉¹, 杨冬花^{1*}

(1. 贵州省人民医院, 贵阳 550002; 2. 贵阳中医学院第二附属医院, 贵阳 550003)

[摘要] **目的:**研究益母草碱对血管紧张素 II (angiotensin, Ang II) 诱导心肌细胞肥大的作用, 并分析其对 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK) 信号通路和微小 RNA-1 (microRNA-1, miRNA-1) 表达的影响。**方法:**以 Ang II (0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 诱导肥大心肌细胞。实验分为空白组, 模型组, p38 MAPK 抑制剂组 (SB203580, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 以及益母草碱低、中、高浓度组 (5, 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。以图像分析软件测量心肌细胞表面积; Folin-酚试剂法 (Lowry) 检测心肌细胞蛋白含量; 酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测细胞上清心房钠尿肽 (atrial natriuretic peptide, ANP) 含量; 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测心肌细胞 miRNA-1 mRNA 的表达水平; 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测心肌细胞内皮素-1 (endothelin-1, ET-1), p38 MAPK, 磷酸化 p38 MAPK (p-p38 MAPK), 肌细胞增强因子 2 (myocyte enhancer factor 2, MEF2), β -肌球蛋白重链 (β -myosin heavy chain, β -MHC) 和 α -肌球蛋白重链 (α -myosin heavy chain, α -MHC) 蛋白的表达水平。**结果:**与空白组比较, 模型组心肌细胞表面积、蛋白含量及细胞上清 ANP 含量明显升高 ($P < 0.05$), ET-1, p38 MAPK, p-p38 MAPK, MEF2 和 β -MHC 蛋白表达水平明显上调 ($P < 0.05$), α -MHC 蛋白及 miRNA-1 mRNA 的表达水平明显下调 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 益母草碱高浓度组明显减少肥大心肌细胞表面积、蛋白含量及细胞上清 ANP 含量 ($P < 0.05$); 下调 ET-1, p38 MAPK, p-p38 MAPK, MEF2 和 β -MHC 蛋白表达水平 ($P < 0.05$); 上调 α -MHC 蛋白及 miRNA-1 的表达水平 ($P < 0.05$)。**结论:**益母草碱高浓度组 (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 可抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大, 其机制可能与抑制 p38 MAPK 信号通路活化和上调 miRNA-1 的表达有关。

[关键词] 益母草碱; 心肌细胞肥大; p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK); 微小 RNA-1 (miRNA-1)

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2019) 03-0081-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190337

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181115.1030.033.html>

[网络出版时间] 2018-11-16 15:09

Effect of Leonurine on p38 MAPK Signaling Pathway and miRNA-1 in Cardiomyocyte Hypertrophy Induced by Ang II

LU Li-na¹, LIANG Zhao-wen², LUO Jian-hua¹, LI Li¹, YUAN Lu¹, YANG Hui¹, YANG Dong-hua^{1*}

(1. The People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang 550002, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Guiyang University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550003, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of leonurine on cardiomyocyte hypertrophy induced by angiotensin II (Ang II) and its effect on p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) signaling pathway and miRNA-1. **Method:** Cardiomyocyte hypertrophy was induced by Ang II (0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in primary neonatal cardiomyocytes. Experiments were designed in 6 groups as following: normal group, model group, p38 MAPK inhibitor group (SB203580, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), low-dose (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), middle-dose (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and high-dose (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group. The cardiomyocyte surface area was measured by image software, and the protein

[收稿日期] 20180719(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81560735)

[第一作者] 卢丽娜, 硕士, 主治医师, 从事老年医学研究, E-mail: lulina319@163.com

[通信作者] * 杨冬花, 博士, 主任医师, 从事中西医结合心血管病学研究, E-mail: niuniuc0204@126.com

contents were detected by Lowry. The concentrations of ANP in the culture supernatant were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression level of miRNA-1 was detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and the protein expression levels of endothelin-1 (ET-1), p38 MAPK, p-p38 MAPK, myocyte enhancer factor 2 (MEF2), β -myosin heavy chain (β -MHC), α -myosin heavy chain (α -MHC) were detected by Western blot. **Result:** Compared with normal group, the surface area of cardiomyocyte, the protein contents, the concentrations of ANP, and the protein expression levels of ET-1, p38 MAPK, p-p38 MAPK, MEF2, β -MHC in model group were higher ($P < 0.05$), but the protein expression levels of α -MHC and miRNA-1 were lower than those in normal group ($P < 0.05$). Compared with model group, the surface area of cardiomyocyte, the protein contents, the concentrations of ANP, and the protein expression levels of ET-1, p38 MAPK, p-p38 MAPK, MEF2, β -MHC in high-dose group were lower ($P < 0.05$), but the protein expression levels of α -MHC and miRNA-1 were higher than those in model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Leonurine ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) could inhibit cardiomyocyte hypertrophy induced by AngII, and the mechanism is related to the inhibition of activation of p38 MAPK signaling pathway and up-regulation the expression of miRNA-1.

[Key words] leonurine; cardiomyocyte hypertrophy; p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK); microRNA-1 (miRNA-1)

心肌肥大是心肌对各种病理性刺激的一种代偿性反应,包括生理性心肌肥大和病理性心肌肥大,生理性心肌肥大可增加心肌收缩力、维持心肌的正常功能,而持续的病理性心肌肥大可导致心肌重构和心力衰竭的发生,抑制病理性心肌肥大是心力衰竭防治的重要策略^[1]。中药具有生物活性成分丰富、靶点多的治疗优势^[2],从我国传统中药中寻找新的抗病理性心肌肥大药效物质,对心肌重构及心力衰竭防治具有重要意义。益母草碱是传统中药益母草的主要化学成分,除了传统治疗妇产科疾病外,还有保护心脏、神经及抗肿瘤等新的药理作用^[3],具有广阔的开发前景。有研究报道:益母草碱能提高急性心肌梗死大鼠心肌组织的抗氧化能力^[4];将益母草碱和阿司匹林拼合成新的多靶点化合物-3a,通过抗氧化、抗炎及抑制凋亡对缺氧心肌细胞有保护作用,并且明显提高药物效能^[5]。课题组前期研究结果也显示益母草碱能改善大鼠心脏结构和功能异常,有抑制心肌重构的作用^[6],但具体机制有待进一步研究。

心肌细胞通过细胞表面感受器感知刺激信号,或通过细胞因子激活多条信号通路,诱导心肌细胞肥大,逆转心肌细胞肥大,是防止心肌肥大进一步恶化的关键^[7]。研究发现,p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK) 信号通路和微小 RNA-1 (miRNA-1) 在心肌细胞肥大的病理生理过程中起重要作用,是抑制心肌肥大的潜在治疗靶点^[8-9]。益母草碱通过影响 p38 MAPK 信号通路和 miRNA-1 的表达抑制心肌细胞肥大,目前

尚未见报道。本研究通过体外血管紧张素 II (Ang II) 诱导心肌细胞肥大模型,观察益母草碱对心肌细胞肥大的抑制作用,并从 p38 MAPK 信号通路和 miRNA-1 的表达探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SD 新生 1~3 d 乳鼠 50 只,雌雄不限,贵州医科大学实验动物中心提供,许可证号 SYXK (黔)2012-0001。由贵州省人民医院伦理委员会审核通过,编号 2015032。

1.2 药物及试剂 异丙肾上腺素(上海禾丰制药有限公司,批号 41141201);Ang II,胰酶(美国 Sigma 公司,批号分别为 A107852, T6424);益母草碱(上海思域化工科技有限公司,批号 24697-74-3,纯度 97%);胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号 10099141);1640 培养基,青链霉素混合液(美国 Hyclone 公司,批号分别为 30035, 30064);二甲基亚砜(DMSO,北京索莱宝科技有限公司,批号 0231);心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide, ANP)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 H180);p38 MAPK 抑制剂(上海碧云天生物技术有限公司,批号 S1863);内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 抗体, p38 MAPK 抗体, p-p38 MAPK 抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab117757, ab197348, ab4822);肌细胞增强因子 2 (myocyte enhancer factor 2, MEF2) 抗体, β -肌球蛋白重链(β -myosin heavy chain, β -MHC) 抗体, α -MHC 抗体, β -肌动蛋白(β -actin) 抗体(美国 Santa 公司,批号分别为 sc-13917, sc-53089, sc-168676, sc-13468);

trizol 总 RNA 提取试剂(北京天根生化科技有限公司,批号 TGDP405-02);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)相关检测试剂盒(日本 TaKaRa 公司,批号分别为 DP405-02, RR047B, RR82LR, 3427Q);引物均由美国 Invitrogen 公司设计和合成。

1.3 仪器 ZS-2 型酶标仪(北京新凤机电公司), 17-AC 型 CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司), CKX53 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司), SW-CJ-1D 型超净工作台(上海苏净实业有限公司), ABI7500 型 Real-time PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司), EPS-300 型蛋白电泳仪(上海天能科技有限公司), Mini Trans-Blot 型蛋白转印系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 心肌细胞原代培养 参考文献[10]方法,取乳鼠心室肌,以 0.1% 胰蛋白酶和 0.04% 胶原酶 II 消化,差速贴壁法除去贴壁的成纤维细胞,未贴壁的心肌细胞则以含 10% 胎牛血清加青链霉素混合液和 DMEM 培养液稀释成 1×10^8 个/L,同时加入 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ BrdU 抑制非心肌细胞增殖,接种于 6 孔培养板,然后培养 24 h。更换无血清培养基 24 h 后,倒置显微镜观察心肌细胞形态。原代心肌细胞镜下呈梭形、三角形以及多边形等,部分融合,细胞搏动率大于 95%,并且搏动同步化。

2.2 肥大心肌细胞模型制备 原代心肌细胞加入 Ang II (终浓度 $0.1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用 48 h 诱导心肌细胞肥大^[10]。

2.3 实验分组及给药 实验分为正常组,模型组, p38 MAPK 抑制剂组(p38 抑制剂组),益母草碱低、中、高浓度组。根据研究报道^[11-13]及预实验结果,益母草碱低、中、高浓度组及 p38 MAPK 抑制剂组以及给药浓度分别为低浓度组 $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,中浓度组 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,高浓度组 $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以及 p38 抑制剂组 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。益母草碱和 p38 MAPK 抑制剂先经直径 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌。正常组和模型组仅加培养液培养,3 组益母草碱组则分别给予低、中、高浓度益母草碱和培养液培养,p38 抑制剂组给予 p38 MAPK 抑制剂和培养液培养。加药后细胞培养 72 h,同时设 5 个平行孔。

2.4 心肌细胞表面积的测定 加药 72 h 后,倒置显微镜观察心肌细胞形态,并以图像分析软件 Image-Pro Plus6.0 计算心肌细胞表面积。每个实验孔选择拍摄 5 个视野($\times 200$ 倍),测量 5 张照片上所有能测量的心肌细胞,得到细胞的表面积,计算平

均值。

2.5 心肌细胞蛋白含量的检测 将培养板各孔中的培养液吸去,以 D-Hanks 液反复快速冲洗 3 次,然后加入适量的 1% SDS 溶解细胞,以 Lowry 法测细胞蛋白质含量(按每孔约 5×10^5 个细胞数计算)。

2.6 ELISA 检测细胞上清 ANP 含量 吸出培养板中的培养液,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗,以 ELISA 法检测细胞上清 ANP 含量,按试剂盒说明书操作方法进行指标检测。

2.7 Real-time PCR 检测心肌细胞 miRNA-1 mRNA 的表达水平 trizol 抽提心肌细胞总 RNA,逆转录 cDNA,SYBR Green I Real-time PCR 测定 miRNA-1 的表达量,以 U6 作为内参对照。miRNA-1(67 bp)上游引物 5'-TGGAATGTAAAGAAGTGTGTAT-3',下游引物 5'-GGCCAACCGCGAGAAGATG-3'; U6(62 bp)上游引物 5'-CTCGCTTCGGCAG CACA-3',下游引 5'-AACGCTTACGAATTTGC GT-3'。PCR 反应按以下程序进行:95 °C 30 s,40 个 PCR 循环(95 °C 10 s,72 °C 5 min,60 °C 60 s,95 °C 15 s)。每个样本检测 3 个复孔。数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测心肌细胞 ET-1, p38 MAPK, p-p38 MAPK, MEF2, β -MHC, α -MHC 蛋白的表达水平 将各组心肌细胞以预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次,加入细胞裂解液冰上裂解 30 min,4 °C 条件 $1 \text{ 万} \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min 后取细胞上清,以 BCA 法测定蛋白浓度。制备 SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行蛋白电泳,1 h 后将蛋白转印至 PVDF 膜,以 1% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h。加入一抗(1:1 000)4 °C 孵育过夜,洗涤后加入二抗(1:5 000),化学发光试剂法发光显影。采用 Gel-Pro analyzer4 图像分析软件测定各带的灰度值做定量分析,结果以各组目的蛋白与内参(β -actin)表达量的比值表示

2.9 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,方差齐时,均数的两两比较采用 SNK-q 法,方差不齐时,均数的两两比较采用 Tamhane's 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对肥大心肌细胞表面积的影响 与正常组比较,模型组心肌细胞表面积明显增大($P < 0.05$);与模型组比较,高浓度组和 p38 MAPK 抑制剂组心肌细胞表面积均明显缩小($P < 0.05$)。高剂量组和

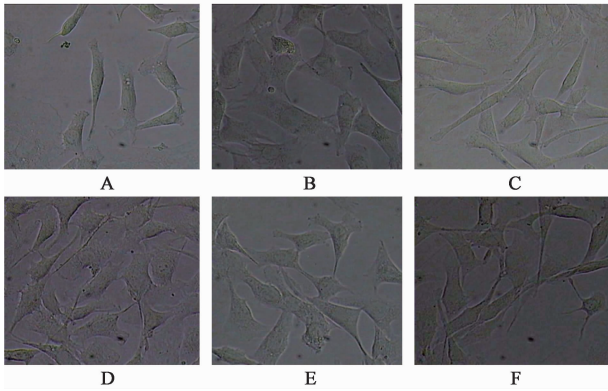
p38 MAPK 抑制剂组心肌细胞表面积比较无显著性差异。见表 1, 图 1。

表 1 益母草碱对肥大心肌细胞表面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of leonurine on surface area of cardiomyocyte in cardiomyocyte hypertrop ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞表面积/ μm^2
空白	-	6 716.80 \pm 853.52
模型	-	11 992.40 \pm 1872.18 ¹⁾
益母草碱	5	8 653.40 \pm 990.51 ²⁾
	10	10 731.20 \pm 1 593.42
	20	10 520.60 \pm 999.76
p38 MAPK 抑制剂	10	8 769.80 \pm 869.47 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 ~ 4 同)。



A. 正常组; B. 模型组; C. p38 MAPK 抑制剂组; D. 益母草碱低浓度组; E. 益母草碱中浓度组; F. 益母草碱高浓度组 (图 2 同)

图 1 益母草碱对肥大心肌细胞表面积的影响 (倒置显微镜, $\times 200$)

Fig.1 Effect of leonurine on cell surface area in cardiomyocyte hypertrophy detected by inverted microscope (inverted microscope, $\times 200$)

3.2 对肥大心肌蛋白质含量、细胞上清 ANP 含量的影响 与正常组比较,模型组心肌细胞蛋白质含量、细胞上清 ANP 含量明显上升 ($P < 0.05$);与模型组比较,高浓度组和 p38 MAPK 抑制剂组蛋白质含量、细胞上清 ANP 含量明显降低,差异有显著性 ($P < 0.05$),而高浓度组和 p38 MAPK 抑制剂组心肌细胞蛋白质含量、细胞上清 ANP 含量比较无显著性差异。见表 2。

3.3 对肥大心肌细胞 miRNA-1 mRNA 表达的影响

与正常组比较,模型组 miRNA-1 mRNA 的表达明显下调 ($P < 0.05$);与模型组比较,高浓度组和 p38 MAPK 抑制剂组心肌细胞 miRNA-1 mRNA 的表达明显上调 ($P < 0.05$),而高浓度组和 p38 MAPK 抑制剂组心肌细胞 miRNA-1 mRNA 表达差异无统计学意义。见表 3。

表 2 益母草碱对肥大心肌细胞蛋白质含量和细胞上清 ANP 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of leonurine on protein contents and contents of ANP in cardiomyocyte hypertrop ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	蛋白质含量/ μg	ANP/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	9.68 \pm 2.11	22.62 \pm 6.72
模型	-	19.04 \pm 2.19 ¹⁾	174.85 \pm 19.02 ¹⁾
益母草碱	5	14.24 \pm 2.90 ²⁾	75.03 \pm 12.79 ²⁾
	10	18.58 \pm 1.83	167.69 \pm 18.91
	20	18.21 \pm 2.00	163.52 \pm 15.25
p38 MAPK 抑制剂	10	14.92 \pm 1.68 ²⁾	80.98 \pm 13.09 ²⁾

表 3 益母草碱对肥大心肌细胞 miRNA-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of leonurine on miRNA-1 mRNA in cardiomyocyte hypertrophy ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	miRNA-1
空白	-	1.05 \pm 0.12
模型	-	0.40 \pm 0.07 ¹⁾
益母草碱	5	0.80 \pm 0.09 ²⁾
	10	0.41 \pm 0.07
	20	0.42 \pm 0.08
p38 MAPK 抑制剂	10	0.78 \pm 0.09 ²⁾

3.4 对肥大心肌细胞 p38 MAPK 信号通路相关蛋白质表达影响 与正常组比较,模型组心肌细胞 ET-1, p38 MAPK, p-p38 MAPK, MEF2 及 β -MHC 蛋白的表达水平明显上调, α -MHC 蛋白的表达水平明显下调 ($P < 0.05$);与模型组比较,高浓度组和 p38 MAPK 抑制剂组心肌细胞 ET-1, p38 MAPK, p-p38 MAPK, MEF2 及 β -MHC 蛋白的表达水平明显下调, α -MHC 蛋白的表达水平明显上调 ($P < 0.05$),而高浓度组和 p38 MAPK 抑制剂组心肌细胞上述蛋白的表达水平组间比较差异无显著性。见表 4, 图 2。

4 讨论

心肌细胞肥大是心肌肥大的重要病理改变,其中主要包括心肌细胞体积增大、蛋白质合成增加,同时伴随 ANP, B 型利钠肽 (BNP) 等标志物表达上调,收缩型 α -MHC 向胚胎型 β -MHC 转化等^[14]。ET-1 是心肌细胞肥大的刺激因子,在心衰衰竭时表达明显增强^[15]。本研究以 Ang II 诱导乳鼠心肌细胞,结果显示模型组心肌细胞出现细胞表面积、蛋白含量明显高于正常心肌细胞,细胞上清 ANP 含量进一步升高, ET-1, β -MHC 蛋白质的表达水平明显上调,而

表 4 益母草碱对肥大心肌细胞 p38 MAPK 信号通路相关蛋白质表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of leonurine on relative protein in p38 MAPK signaling pathway in cardiomyocyte hypertrophy ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ET-1 / $\beta\text{-actin}$	p38 MAPK / $\beta\text{-actin}$	p-p38 MAPK / $\beta\text{-actin}$	MEF2 / $\beta\text{-actin}$	$\beta\text{-MHC}$ / $\beta\text{-actin}$	$\alpha\text{-MHC}$ / $\beta\text{-actin}$
空白	-	0.34 ± 0.18	0.38 ± 0.11	0.02 ± 0.01	0.38 ± 0.22	0.35 ± 0.08	1.54 ± 0.25
模型	-	1.45 ± 0.46 ¹⁾	1.30 ± 0.17 ¹⁾	0.11 ± 0.04 ¹⁾	1.91 ± 0.16 ¹⁾	1.07 ± 0.19 ¹⁾	0.46 ± 0.16 ¹⁾
益母草碱	5	0.86 ± 0.30 ²⁾	0.74 ± 0.29 ²⁾	0.04 ± 0.01 ²⁾	1.06 ± 0.23 ²⁾	0.59 ± 0.18 ²⁾	1.03 ± 0.22 ²⁾
	10	1.42 ± 0.47	1.18 ± 0.36	0.11 ± 0.01	1.65 ± 0.33	1.03 ± 0.16	0.53 ± 0.17
	20	1.38 ± 0.36	1.12 ± 0.33	0.10 ± 0.02	1.63 ± 0.33	0.99 ± 0.24	0.54 ± 0.15
p38 抑制剂	10	0.91 ± 0.29 ²⁾	0.79 ± 0.24 ²⁾	0.05 ± 0.02 ²⁾	1.23 ± 0.43 ²⁾	0.62 ± 0.14 ²⁾	0.94 ± 0.19 ²⁾

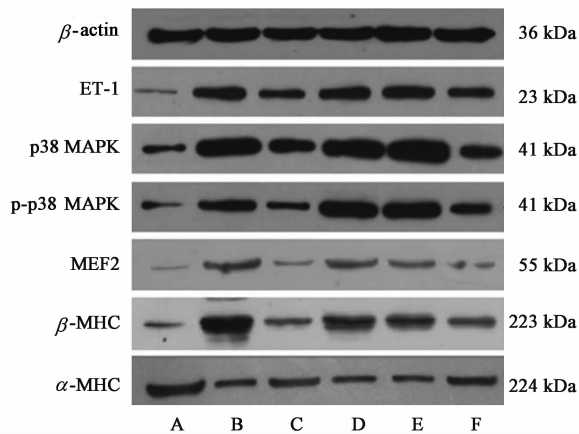


图 2 肥大心肌细胞 p38 MAPK 信号通路相关蛋白质表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of relative protein in p38 MAPK signaling pathway in cardiomyocyte hypertrophy

$\alpha\text{-MHC}$ 蛋白质的表达明显下调。结果提示乳鼠心肌细胞在 Ang II 刺激下出现了心肌细胞肥大的改变,造模成功。为明确益母草碱是否有抑制心肌细胞肥大的作用,实验分别给予低、中、高浓度益母草碱(5, 10, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)干预肥大心肌细胞,发现高浓度益母草碱能明显减少肥大心肌细胞细胞面积、蛋白含量、细胞上清 ANP 含量,抑制 ET-1, $\beta\text{-MHC}$ 蛋白质表达水平,上调 $\alpha\text{-MHC}$ 蛋白质表达水平,低、中浓度益母草碱效果不明显。结果提示高浓度益母草碱(20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)能抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大。

心肌细胞肥大涉及复杂的信号通路。心力衰竭时,肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活,细胞因子 ET-1 分泌增加,可刺激 p38 MAPK 信号通路活化促进心肌细胞肥大发生发展^[15]。MAPK 信号通路介导心脏发育、代谢和疾病发生,是影响心脏生理和病理的重要信号通路, p38 MAPK 为其家族成员之一^[16]。p38 MAPK 蛋白质磷酸化是 p38 MAPK 信号通路活化的表现,可激活下游转录调节因子 MEF2 表达增加,胚胎基因表达上调,促使心肌肥大发生,

该信号通路可被 p38 MAPK 特异性抑制剂 SB203580 阻断^[8,17]。本实验结果也显示高浓度益母草碱能下调 ET-1 蛋白质的表达水平,推测益母草碱可能通过 p38 MAPK 信号通路抑制心肌细胞肥大。为验证这一假设,本研究进一步检测了 p38 MAPK, p-p38 MAPK 及 MEF2 蛋白的表达水平,结果显示,肥大心肌细胞 p38 MAPK, p-p38 MAPK 及 MEF2 蛋白的表达水平明显升高,而高浓度益母草碱明显抑制 p38 MAPK, p-p38 MAPK 及 MEF2 蛋白质的表达水平,与 p38 MAPK 抑制剂组结果相似。实验结果提示益母草碱可能通过抑制 p38 MAPK 信号通路活化逆转心肌细胞肥大。

miRNAs 是一类内源性单链小非编码 RNA,通过与靶基因 mRNA 完全或不完全互补结合,在转录后水平抑制蛋白质翻译或 mRNA 降解调控基因的表达^[18]。miRNA-1 作为 miRNAs 家族成员之一,在细胞和组织的生长发育、分化、增殖及凋亡中起着重要的作用,同时也参与心肌纤维化、心肌细胞肥大等心肌重构病理生理过程^[19]。研究发现,miRNA-1 在肥大心肌细胞中表达下降,与 BNP 一样可作为心力衰竭标志物^[9],恢复 miRNA-1 的表达是抑制心肌细胞肥大潜在的治疗靶点^[20]。临床研究也发现,给予 β 受体阻滞剂治疗心力衰竭患者 12 月后,miRNA-1 的表达较治疗前明显升高,心肌重构得以改善^[21]。本研究结果显示,与正常心肌细胞比较,肥大心肌细胞 miRNA-1 的表达明显降低,而高浓度益母草碱可显著升高肥大心肌细胞 miRNA-1 的表达水平,提示高剂量益母草碱可能通过上调 miRNA-1 的表达抑制心肌细胞肥大。研究发现,miRNAs 可调控细胞信号通路,而信号通路对 miRNAs 的功能发挥也有调节作用,二者存在 Cross-talk 关系^[22]。本研究结果也显示 p38 MAPK 抑制剂组 miRNA-1 的表达明显上调,而 Karakikes 等^[20]发现 miRNA-1 能抑制 p38 MAPK 信号通路活化逆转心肌重构。提示 p38

MAPK 信号通路和 miRNA-1 之间可能存在相互调节作用,具体作用机制有待于进一步研究。

根据文献及本实验研究结果推测,心力衰竭时,由于肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活,细胞因子 ET-1 分泌增加,激活 p38 MAPK 信号通路,p38 MAPK 蛋白表达增加、蛋白磷酸化,刺激下游 MEF2 蛋白的表达水平进一步升高,p38 MAPK 蛋白表达增加和蛋白磷酸化后可抑制 miRNA-1 的表达水平,进而心肌细胞肥大标记物 ANP 分泌增加,收缩型 α -MHC 向胚胎型 β -MHC 的转化,促使心肌细胞肥大发生发展。高浓度益母草碱可能通过抑制 p38 MAPK 信号通路活化,上调 miRNA-1 的表达逆转心肌细胞肥大。由于 miRNAs 与细胞信号通路之间存在 Cross-talk 关系,是否益母草碱能通过上调 miRNA-1 的表达抑制 p38 MAPK 信号通路逆转心肌细胞肥大,拟下一步设计 miRNA-1 模拟剂和抑制剂对 p38 MAPK 信号通路的影响予以证实,进一步为益母草碱多途径、多靶点发挥抑制心肌细胞肥大提供理论依据。

[参考文献]

[1] ZHANG R H, LIU Z K, YANG D S, et al. Phytochemistry and pharmacology of the genus *Leonurus*: the herb to benefit the mothers and more [J]. *Phytochemistry*, 2018, 147:167-183.

[2] 朱广旋,左建丽,许林,等.中药有效成分逆转左室心肌肥厚的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(17):228-234.

[3] 梁博志,罗建华,杨冬花,等.益母草碱作用及机制研究进展[J]. *贵阳中医学院学报*, 2017, 39(4):93-96.

[4] 徐玉平,钱海兵,朱依淳.益母草碱对急性心肌梗死大鼠的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(17):113-116.

[5] GAO H, YANG X, GU X, et al. Synthesis and biological evaluation of the codrug of Leonurine and Aspirin as cardioprotective agents [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(19):4650-4654.

[6] 梁赵文,罗建华,杨冬花,等.益母草碱对慢性心力衰竭心肌重构大鼠心房利钠肽、血管紧张素 II 影响的研究[J]. *贵州医药*, 2016, 40(12):1235-1238.

[7] 刁爱芹,潘爱萍.机械刺激诱导心肌细胞肥大的分子机制[J]. *医学综述*, 2013, 19(22):4074-4077.

[8] WU Q Q, NI J, ZHANG N, LIAO H H, et al. Andrographolide protects against aortic banding-induced experimental cardiac hypertrophy by inhibiting MAPKs

signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8:808.

[9] Busch A, Eken S M, Maegdefessel L. Prospective and therapeutic screening value of non-coding RNA as biomarkers in cardiovascular disease [J]. *Ann Transl Med*, 2016, 4(12):236.

[10] 周颖,陈游洲,乔树宾. Apelin 对血管紧张素 II 诱导的心肌细胞肥大的作用及其机制[J]. *中国循环杂志*, 2014, 29(9):733-737.

[11] 刘新华. 益母草碱的合成及其对心血管保护作用的研究[D]. 上海:复旦大学, 2009.

[12] 高欢. 益母草碱衍生物的合成及心肌保护作用研究[D]. 长春:吉林大学, 2015.

[13] 吕林懋. 心肌成纤维细胞来源的 exosome 在血管紧张素-2 诱导的心肌肥大中的作用及机制研究[D]. 济南:山东大学, 2015.

[14] 周恒,唐其柱,邓伟,等. 血管紧张素 II 诱导的新生小鼠心肌细胞肥大模型[J]. *医学研究杂志*, 2015, 44(11):26-30.

[15] Archer C R, Robinson E L, Drawnel F M, et al. Endothelin-1 promotes hypertrophic remodelling of cardiac myocytes by activating sustained signalling and transcription downstream of endothelin type A receptors [J]. *Cell Signal*, 2017, 36:240-254.

[16] Javadov S, Jang S, Agostini B. Crosstalk between mitogen-activated protein kinases and mitochondria in cardiac diseases: therapeutic perspectives [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 144(2):202-225.

[17] WANG S, DING L, JI H, et al. The role of p38 MAPK in the development of diabetic cardiomyopathy[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7):1037.

[18] 杨晋静,王敬萍,张月安,等. miRNA 在心室重塑中的调控作用[J]. *中华医学杂志*, 2015, 95(29):2408-2410.

[19] DUAN L, XIONG X, LIU Y, et al. miRNA-1: functional roles and dysregulation in heart disease[J]. *Mol Biosyst*, 2014, 10(11):2775-2782.

[20] Karakikes I, Chaanine A H, Kang S, et al. Therapeutic cardiac-targeted delivery of miR-1 reverses pressure overload-induced cardiac hypertrophy and attenuates pathological remodeling [J]. *J Am Heart Assoc*, 2013, 2(2):e000078.

[21] Sucharov C C, Kao D P, Port J D, et al. Myocardial microRNAs associated with reverse remodeling in human heart failure[J]. *JCI Insight*, 2017, 2(2):e89169.

[22] 魏运荣,卢清显,卢清君. MicroRNA 与细胞信号转导通路研究进展[J]. *生物技术通报*, 2010, 2:28-32.

[责任编辑 周冰冰]