

人参皂苷 Rg₁ 对心肌细胞氧化应激损伤的抑制作用

石洪洋¹, 董 慧², 刘 嘉¹, 崔笑天², 郭 毅³, 洪 兰^{2*}

1. 延边大学农学院 食品与生物科学系, 吉林 延吉 133002

2. 延边大学医学院 生理学与病理生理学教研室, 吉林 延吉 133002

3. 长春中医药大学附属医院, 吉林 长春 130000

摘要: **目的** 通过构建 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞氧化应激模型, 观察人参皂苷 Rg₁ 对氧化应激的抑制作用, 并探讨 miR-499c 是否参与人参皂苷 Rg₁ 抑制氧化应激的作用机制。 **方法** 采用 600 μmol/L 的 H₂O₂ 诱导 H9c2 细胞氧化应激模型, 给予人参皂苷 Rg₁ 预处理 24 h, 检测乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性及丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平和线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 变化; 采用 Western blotting 检测凋亡相关蛋白表达。采用 Lipofiter 3.0 将 miR-499c 转染至 H9c2 细胞再制备 H₂O₂ 诱导的氧化应激模型, 给予人参皂苷 Rg₁ (40 μmol/L) 预处理 24 h, 检测 miR-499c 表达、ROS 水平和 MMP 变化。 **结果** 人参皂苷 Rg₁ 显著降低 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞中 LDH 漏出率、MDA 和 ROS 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 显著升高 SOD 活性和 MMP ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 显著上调 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 显著下调 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cystein-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3) 和 cleaved Caspase-9 蛋白表达水平 ($P < 0.01$ 、 0.001)。人参皂苷 Rg₁ 显著增加 H9c2 细胞中 miR-499c 表达 ($P < 0.05$)。转染 miR-499c 后, 人参皂苷 Rg₁ 组 ROS 水平进一步降低 ($P < 0.05$), MMP 进一步升高 ($P < 0.05$)。 **结论** 人参皂苷 Rg₁ 通过降低 MMP 丢失和 ROS 生成, 抑制由 H₂O₂ 诱导 H9c2 细胞的氧化应激损伤和细胞凋亡, 其作用机制可能与 miR-499c 相关。

关键词: 人参皂苷 Rg₁; 心肌细胞; 氧化应激; 凋亡; miR-499c

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)24-8117-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.24.016

Inhibition effect of ginsenoside Rg₁ on oxidative stress injury in cardiomyocytes

SHI Hong-yang¹, DONG Hui², LIU Jia¹, CUI Xiao-tian², GUO Yi³, HONG Lan²

1. Department of Food and Biological Sciences, School of Agriculture, Yanbian University, Yanji 133002, China

2. Department of Physiology and pathophysiology, Medical School, Yanbian University, Yanji 133002, China

3. Affiliated Hospital of Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130000, China

Abstract: **Objective** To observe the inhibition effect of ginsenoside Rg₁ on H₂O₂-induced oxidative stress in H9c2 cardiomyocytes, and discuss whether miR-499c involved in the mechanism of ginsenoside Rg₁ inhibition of oxidative stress. **Methods** The oxidative stress model of H9c2 cardiomyocytes was induced by 600 μmol/L H₂O₂, ginsenoside Rg₁ were pretreated for 24 h. Lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) activities and malondialdehyde (MDA), reactive oxygen species (ROS) levels and mitochondrial membrane potential (MMP) changes were detected; Western blotting was used to detect the expressions of apoptosis-related proteins. Lipofiter 3.0 was used to transfect miR-499c into H9c2 cells, and then H₂O₂-induced oxidative stress model was established, ginsenoside Rg₁ (40 μmol/L) was pretreated for 24 h, and miR-499c expression, ROS level and MMP changes were detected. **Results** Ginsenoside Rg₁ significantly decreased the leakage rate of LDH, MDA and ROS levels in H9c2 cells induced by H₂O₂ ($P < 0.05$, 0.01 , 0.001), significantly increased SOD activity and MMP ($P < 0.05$, 0.01 , 0.001), significantly increased B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein expression level ($P < 0.05$, 0.01 , 0.001), significantly decreased Bcl-2 associated X protein (Bax), cleaved

收稿日期: 2023-08-24

基金项目: 吉林省教育厅科学技术研究项目 (JKH20220533KJ)

作者简介: 石洪洋 (2000—), 男, 硕士研究生, 从事心血管药理研究。Tel: 13561582695 E-mail: 1246971985@qq.com

*通信作者: 洪 兰 (1982—), 女, 副教授, 从事心血管药理及心血管疾病保护机制研究。Tel: 13843367990

cysteine aspartate protease-3 (cleaved Caspase-3) and cleaved Caspase-9 protein expression levels ($P < 0.01$, 0.001). Ginsenoside Rg₁ significantly increased the expression of *miR-499c* in H9c2 cells ($P < 0.05$). After transfection with *miR-499c*, the level of ROS in ginsenoside Rg₁ group was further decreased ($P < 0.05$), and MMP was further increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Ginsenoside Rg₁ can inhibit oxidative stress injury and apoptosis of H9c2 cells induced by H₂O₂ by reducing MMP loss and ROS production, and its mechanism may be related to *miR-499c*.

Key words: ginsenoside Rg₁; cardiomyocytes; oxidative stress; apoptosis; *miR-499c*

人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎, 具有提高免疫力^[1]、改善心血管功能^[2]、缓解疲劳和抗氧化^[3]等多种功效。人参皂苷 Rg₁ 是人参主要活性成分之一, 具有显著的抗氧化、抗肿瘤等作用^[4-6]。氧化应激是急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 发生心室重构的关键因素, 最终导致线粒体功能损伤和细胞凋亡^[7]。但人参皂苷 Rg₁ 对 H₂O₂ 诱导心肌细胞的氧化应激是否起保护作用尚不清楚。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是由 20~25 个核苷酸组成的非编码 RNA, 具有调节基因表达等功能。研究发现, 人参皂苷通过调节 miRNA 的表达发挥抗氧化应激的作用, *miR-499* 是一类与抑制氧化应激损伤有关的 RNA^[8], 已被证明在心血管疾病的发病和进展中发挥作用^[9], 包括心肌肥大^[10]、缺血性心脏病^[11]等。*miR-499* 已被确定为 AMI 和心力衰竭的潜在生物标志物^[12-13]。*miR-499c* 是和 *miR-499* 同源的一种特殊 RNA, 由德克萨斯 A&M 大学发现, 可以将多种干细胞诱导转化为心肌细胞^[14], 但 *miR-499c* 是否具有对心肌细胞的保护作用尚不清楚, 并且其是否参与人参皂苷 Rg₁ 的抗氧化机制更不甚清楚。故本研究旨在探究人参皂苷 Rg₁ 对心肌细胞氧化应激损伤的抑制作用, 并通过体外构建 H9c2 细胞的 *miR-499c* 转染模型, 探讨人参皂苷 Rg₁ 通过 *miR-499c* 参与氧化应激的抑制作用, 以评估其在心脑血管疾病治疗中的潜在价值。

1 材料

1.1 细胞

H9c2 细胞 (批号 CL-0089) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药品与试剂

人参皂苷 Rg₁ (质量分数 ≥ 98%, 批号 SG8330) 购自北京索莱宝科技有限公司; 30% H₂O₂ (批号 C04045101) 购自南京化学试剂股份有限公司; 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒 (批号 C0016)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)

检测试剂盒 (批号 S0131S)、总超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性检测试剂盒 (批号 S0101S)、线粒体膜电位检测试剂盒 (批号 C2006) 均购自上海碧云天生物科技有限公司; CCK-8 试剂 (批号 C0037) 购自美国 Invigentech 公司; B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体 (批号 EPR17509)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体 (批号 E63)、剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cysteine-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3) 抗体 (批号 EPR21032) 均购自英国 Abcam 公司; cleaved Caspase-9 抗体 (批号 9507S)、β-actin 抗体 (批号 12620)、山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 7074) 均购自美国 CST 公司; Lipofiter 3.0 转染试剂 (批号 HB-LF3-1000)、*miR-499c* 转染质粒 (目的基因序列 3'-ACAGACTTGCTGTGANGTTCACGTGGAGAGG-AGTTAAACATCACTGCAAGTCTTAACAGCCGC-CCGCCCAAGGCACAGGGGACAGGGCCCCTAT-AGTGAGTCNTATTAAAA-5') 购自上海汉恒生物科技有限公司; DMEM 液体培养基 (批号 C3103-0500)、特级胎牛血清 (批号 C04001-050)、胰蛋白酶-EDTA (批号 C3530-0100)、青链双抗 (批号 C3420-0100) 均购自上海逍鹏生物科技有限公司; 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 试剂盒 (批号 C3890) 购自美国 APE×BIO 公司; 心房钠尿肽 (atrial natriuretic peptide, ANP, 批号 D04B) 购自北京北方生物技术研究所有限公司。

1.3 仪器

Forma™ 型直热式 CO₂ 培养箱、Heraguard™ ECO 型超净工作台、MicroCL 17 型微量离心机、EVOS M700 型荧光倒置显微镜、Varioskan LUX 型多功能酶标仪 (美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

复苏 H9c2 细胞, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养, 当细胞融合度达 80%~90% 时传代。

用胰蛋白酶消化细胞, 1:3 进行传代接种。继续培养, 调整传代后的细胞密度为 5×10^4 个/mL, 用于后续实验。

2.2 CCK-8 法测定细胞存活率

2.2.1 氧化应激模型条件 将 H9c2 细胞铺于 96 孔板内, 每孔 100 μ L, 培养 24 h 后, 分别给予 0、75、150、300、600、1200 μ mol/L 的 H_2O_2 处理细胞 20 min^[15]。每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液继续培养 2 h, 测定吸光度 (*A*) 值, 计算细胞存活率。

2.2.2 人参皂苷 Rg_1 对 H9c2 细胞存活率的影响 将 H9c2 细胞铺于 96 孔板内, 每孔 100 μ L, 培养 24 h 后, 分别加入 0、10、20、40、80 μ mol/L 的人参皂苷 Rg_1 处理细胞 24 h。每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液继续培养 2 h, 测定 *A* 值, 计算细胞存活率。

2.2.3 人参皂苷 Rg_1 对氧化应激模型细胞存活率的影响 将 H9c2 细胞铺于 96 孔板内, 每孔 100 μ L, 培养 24 h。设置对照组、模型组、人参皂苷 Rg_1 (10、20、40、80 μ mol/L) 组和 ANP (1 nmol/L) 组, 人参皂苷 Rg_1 组加入不同浓度的药物处理 24 h, ANP 组加入药物处理 20 min; 模型组和各给药再加入 600 μ mol/L 的 H_2O_2 处理 20 min 制备氧化应激模型, 对照组加入不含药物不含 H_2O_2 的培养基。每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液继续培养 2 h, 测定 *A* 值, 计算细胞存活率。

2.3 人参皂苷 Rg_1 对氧化应激模型细胞 LDH 漏出率的影响

将 H9c2 细胞铺于 6 孔板内, 每孔 1500 μ L, 设置对照组、模型组和人参皂苷 Rg_1 (10、20、40、80 μ mol/L) 组, 按“2.2.3”项下方法给药后, 取培养液上清, 2500 r/min 离心 5 min, 取上清液 25 μ L, 按照试剂盒说明书检测 LDH 活性。

2.4 人参皂苷 Rg_1 对氧化应激模型细胞 SOD 活性和 MDA 水平的影响

将 H9c2 细胞铺于 6 孔板内, 每孔 1500 μ L, 按“2.3”项下方法分组和给药后, 按照试剂盒说明书检测 SOD 活性和 MDA 水平。

2.5 人参皂苷 Rg_1 对氧化应激模型细胞 ROS 水平的影响

将 H9c2 细胞铺于 6 孔板内, 每孔 1500 μ L, 按“2.2.3”项下方法分组和给药后, 用稀释后的 DCFH-DA 重悬细胞, 调节细胞密度为 1×10^6 个/mL。孵育 20~30 min, 每隔 3~5 min 颠倒混匀 1 次, 使探针和细胞充分接触。选择 488 nm 激发波长, 525 nm

发射波长, 用荧光显微镜观察荧光强弱。

2.6 人参皂苷 Rg_1 对氧化应激模型细胞线粒体膜电位的影响

将 H9c2 细胞铺于 6 孔板内, 每孔 1500 μ L, 按“2.2.3”项下方法分组和给药后, 各孔加入培养液和 JC-1 染色工作液各 1 mL, 充分混匀, 避光孵育 20 min, 加入 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次后, 通过荧光显微镜观察并拍照记录。

2.7 人参皂苷 Rg_1 对氧化应激模型细胞凋亡相关蛋白表达的影响

将 H9c2 细胞铺于 6 孔板内, 每孔 1500 μ L, 按“2.3”项下方法分组和给药后, 收集细胞, BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h, 加入一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 加入二抗孵育 1 h, ECL 化学发光, 将 PVDF 膜放入曝光盒中, 在 UVP 凝胶成像系统上观察条带并拍照。

2.8 PCR 检测 miR-499c 表达

将 H9c2 细胞铺于 6 孔板内, 每孔 1500 μ L, 设置对照组和人参皂苷 Rg_1 (40 μ mol/L) 组, 给予药物干预 24 h 后, 使用无酶的 EP 管收集细胞, 于通风橱内加入 1 mL Trizol, 颠倒混匀。加入氯仿, 混匀, 室温静置。4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min。取出 EP 管置于冰上, 用无酶枪头将上清液小心吸取至新的 EPA 管中。加入同体积异丙醇, 混匀, 室温静置。4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清。加入 75% 乙醇, 颠倒使 RNA 浮起。4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 无菌风吹干。加入 10~20 μ L DEPC 水, 静置 5 min, 吹打混匀, 测量 RNA 浓度。

2.9 miR-499c 转染

将 4 μ L miR-499c 质粒稀释到 250 μ L DMEM 培养基中, 轻轻吹打混匀。取另一离心管, 加入 250 μ L 无血清 DMEM 培养基, 再加入 10 μ L Lipofiter3.0, 轻轻吹打混匀, 室温放置 5 min。将以上 2 只离心管溶液混合, 吹打混匀, 室温孵育 20 min。将 500 μ L 混合溶液均匀加入到 6 孔板中, “8”字摇晃均匀。培养 6 h 后, 更换含血清的细胞培养液继续培养。设置模型组、人参皂苷 Rg_1 + H_2O_2 组、miR-499c + H_2O_2 组、人参皂苷 Rg_1 + miR-499c + H_2O_2 组, 模型组加入 600 μ mol/L 的 H_2O_2 处理细胞 20 min 制备氧化应激模型; 人参皂苷 Rg_1 + H_2O_2 组加入 40 μ mol/L 人参皂苷 Rg_1 处理 24 h, 再制备氧化应激模型; miR-499c + H_2O_2 组将 miR-499c 转染

到 H9c2 细胞 72 h, 再制备氧化应激模型: 人参皂苷 Rg_1 + miR-499c + H_2O_2 组将 miR-499c 转染到 H9c2 细胞 72 h, 再加入 $40 \mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg_1 处理 24 h, 最后制备氧化应激模型。按“2.5”“2.6”项下方法检测细胞 ROS、线粒体膜电位水平。

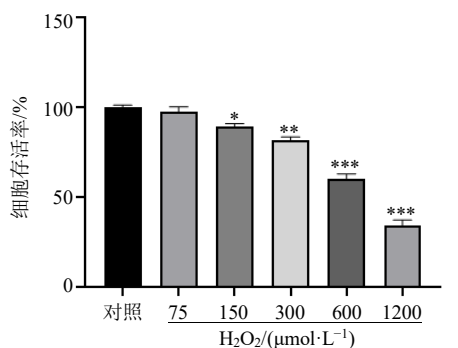
2.10 统计学分析

实验数据用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学处理, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 H9c2 氧化应激模型制备

如图 1 所示, $75 \sim 1200 \mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理 H9c2 细胞 20 min, 细胞存活率降低, 并呈剂量相关性。 $600 \mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理细胞 20 min 后, 细胞存活率显著降低至 $(60.39 \pm 2.87)\%$ ($P < 0.001$)。因此, 选用 $600 \mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 作为制备氧化应激模型条件。

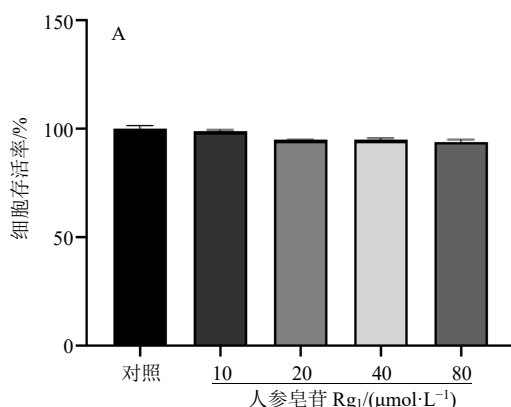


与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

图 1 H_2O_2 对 H9c2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of H_2O_2 on cell viability of H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 图 3~7 同

$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as figs. 3~7

图 2 人参皂苷 Rg_1 对 H9c2 细胞 (A)、 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞 (B) 存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of ginsenoside Rg_1 on cell viability of H9c2 cells (A) and H_2O_2 -induced H9c2 cells (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

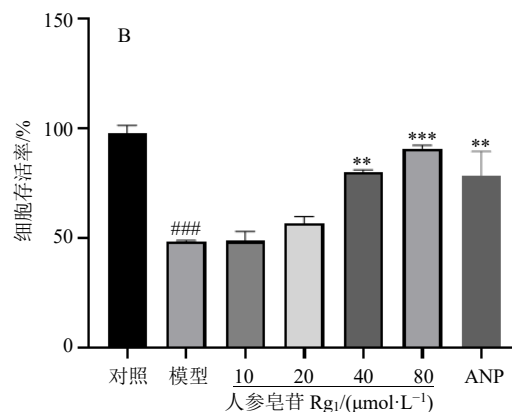
3.2 人参皂苷 Rg_1 对 H9c2 细胞氧化应激损伤的抑制作用

3.2.1 人参皂苷 Rg_1 对氧化应激模型细胞存活率的影响 如图 2-A 所示, 不同浓度的人参皂苷 Rg_1 处理 H9c2 细胞 24 h 后, 细胞存活率无明显影响, 表明人参皂苷 Rg_1 对 H9c2 细胞无毒性作用。如图 2-B 所示, 与对照组比较, 模型组细胞存活率明显降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 人参皂苷 Rg_1 (40 、 $80 \mu\text{mol/L}$) 组细胞存活率显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), 且呈剂量相关性。本团队前期研究工作中发现 ANP 可以抑制 H9c2 细胞氧化应激损伤且具有心肌保护作用, 因此利用 ANP 作为阳性对照发现, ANP 对氧化应激模型 H9c2 细胞存活率作用与 $40 \mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg_1 的作用相近^[16]。

3.2.2 人参皂苷 Rg_1 对 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞 LDH 漏出率的影响 如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组细胞 LDH 漏出率显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组 LDH 漏出率均明显降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 且呈剂量相关性。

3.2.3 人参皂苷 Rg_1 对 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞 MDA 水平和 SOD 活性的影响 如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组细胞 MDA 水平显著升高 ($P < 0.001$), SOD 活性显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组 MDA 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 人参皂苷 Rg_1 (20 、 40 、 $80 \mu\text{mol/L}$) 组 SOD 活性显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), 且呈剂量相关性。

3.2.4 人参皂苷 Rg_1 对 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞 ROS 水平的影响 如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组细胞 ROS 水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比



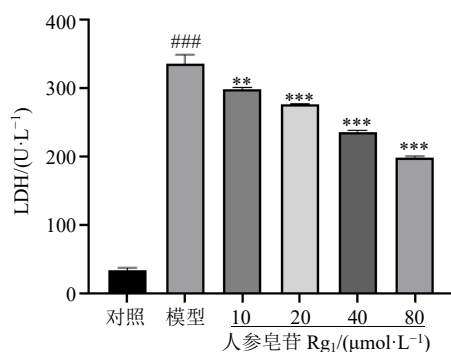


图 3 人参皂苷 Rg₁ 对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞 LDH 漏出率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of ginsenoside Rg₁ on leakage rate of LDH in H₂O₂-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

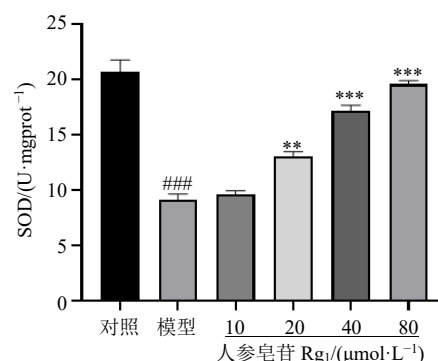
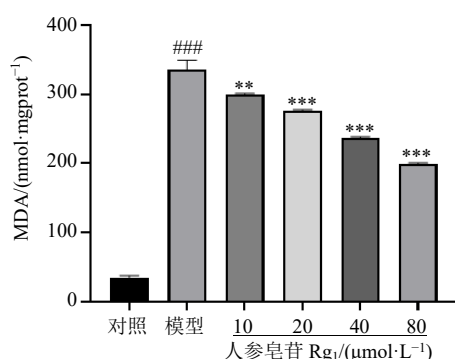


图 4 人参皂苷 Rg₁ 对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞 MDA 水平和 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of ginsenoside Rg₁ on MDA level and SOD activity in H₂O₂-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

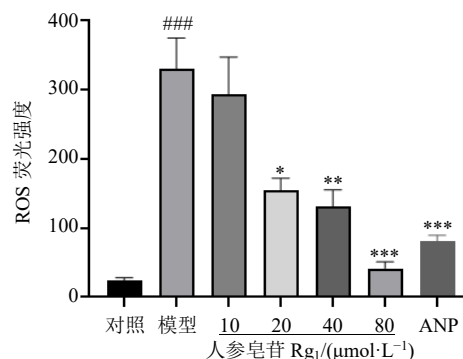
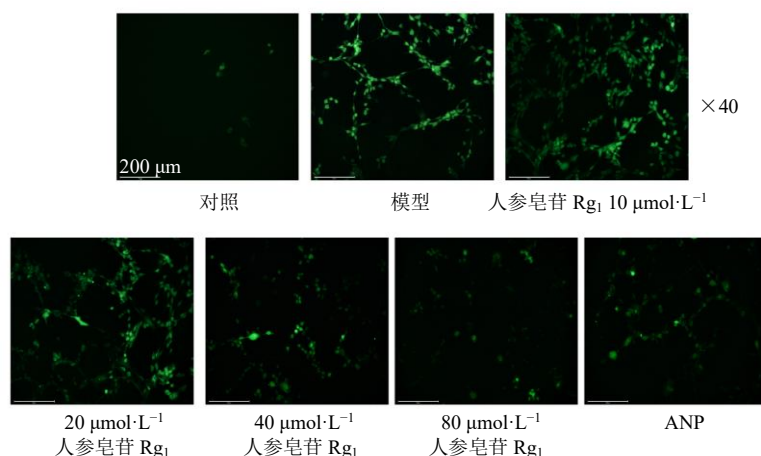


图 5 人参皂苷 Rg₁ 对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of ginsenoside Rg₁ on ROS level in H₂O₂-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

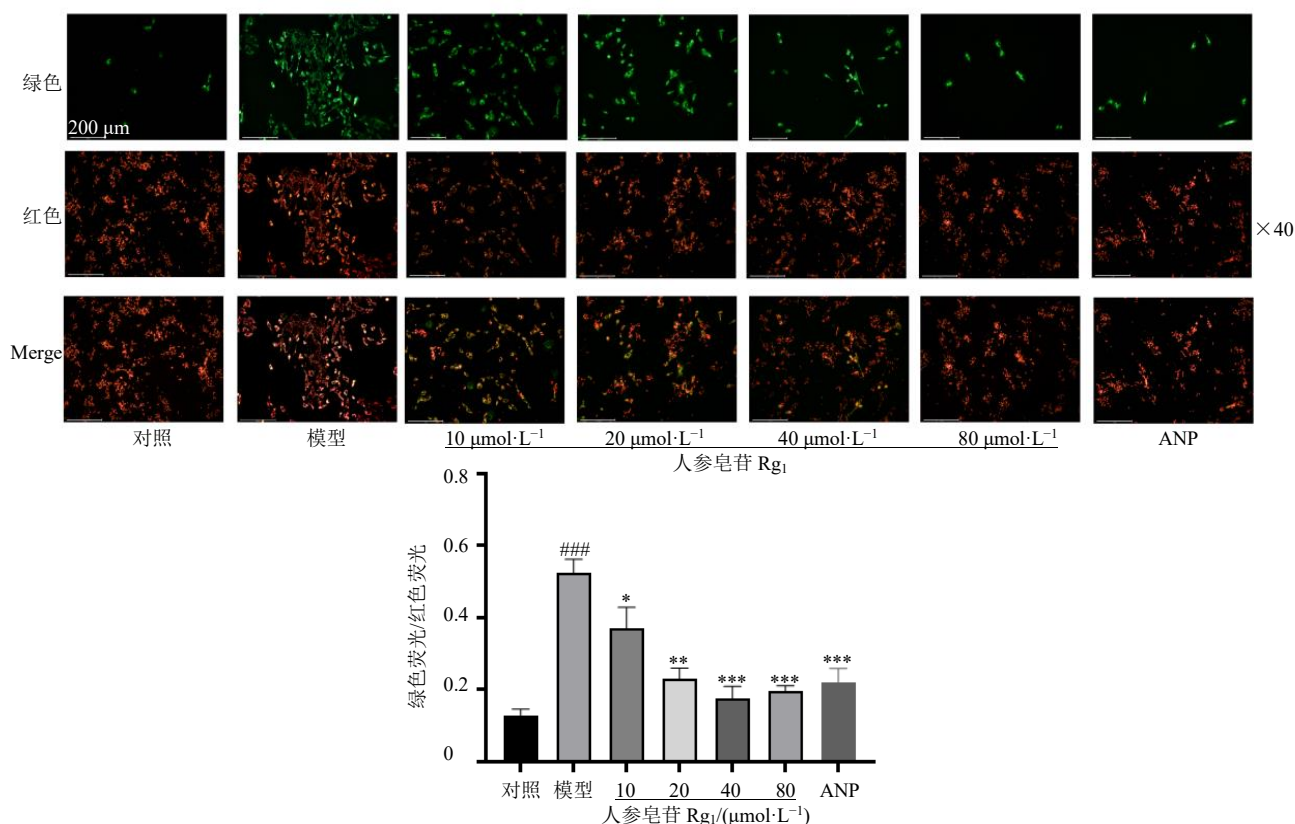
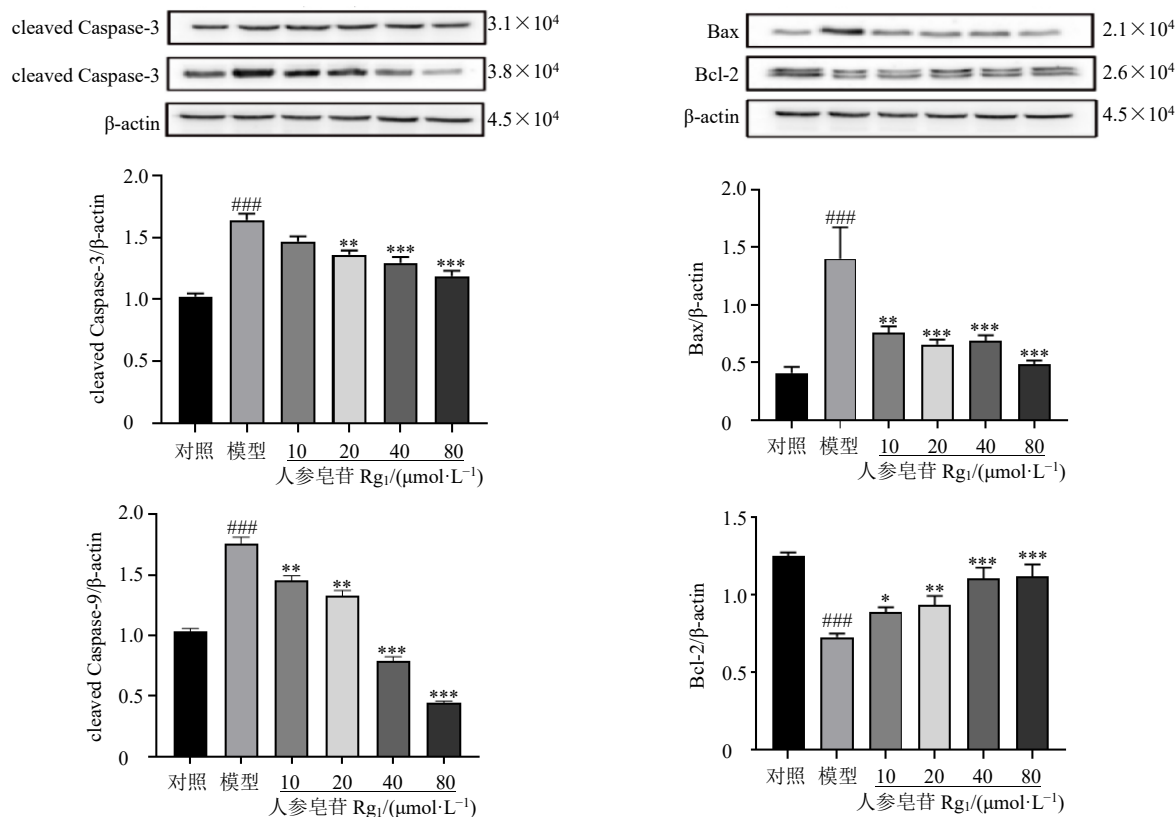
3.3 人参皂苷 Rg₁ 对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

如图 7 所示,与对照组比较,模型组 cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 和 Bax 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.001$), Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$);与模型组比较,各给药组 cleaved

较,人参皂苷 Rg₁ (20、40、80 μmol/L) 组和 ANP 组 ROS 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001),且呈剂量相关性。

3.2.5 人参皂苷 Rg₁ 对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞线粒体膜电位的影响 氧化应激可以引起细胞线粒体膜电位的改变,导致线粒体损伤,进而引起细胞凋亡及坏死。如图 6 所示,与对照组比较,模型组细胞绿/红色荧光比值升高 ($P < 0.001$),表明 H9c2 细胞线粒体膜电位降低;与模型组比较,各给药组绿/红色荧光比值显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001),表明人参皂苷 Rg₁ 和 ANP 均可以使 H₂O₂ 引起的 H9c2 细胞线粒体膜电位恢复。

Caspase-9 和 Bax 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$ 、0.001), Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001);人参皂苷 Rg₁ (20、40、80 μmol/L) 组 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$ 、0.001)。提示人参皂苷 Rg₁ 可以减少 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞凋亡。

图 6 人参皂苷 Rg₁ 对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 6 Effect of ginsenoside Rg₁ on mitochondrial membrane potential in H₂O₂-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 7 人参皂苷 Rg₁ 对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 7 Effect of ginsenoside Rg₁ on apoptosis-related protein expressions in H₂O₂-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 人参皂苷 Rg₁ 对 H9c2 细胞 miR-499c 表达的影响

为探讨人参皂苷 Rg₁ 对 H9c2 细胞抗氧化的作用机制,首先观察人参皂苷 Rg₁ 对 H9c2 细胞内 miR-499c 表达的影响。如图 8 所示,与对照组比较,人参皂苷 Rg₁ 组 miR-499c 表达显著升高 ($P < 0.05$)。

3.5 miR-499c 在人参皂苷 Rg₁ 抑制 H₂O₂ 诱导 H9c2 细胞氧化应激损伤中的作用

3.5.1 miR-499c 在人参皂苷 Rg₁ 抑制 H₂O₂ 诱导 H9c2 细胞氧化应激时对 ROS 生成的影响 如图 9 所示,与模型组比较,人参皂苷 Rg₁+H₂O₂ 组、miR-499c+H₂O₂ 组细胞中 ROS 荧光强度显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01),表明 miR-499c 和人参皂苷 Rg₁ 均可以

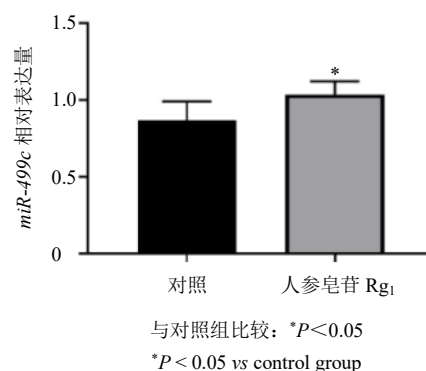
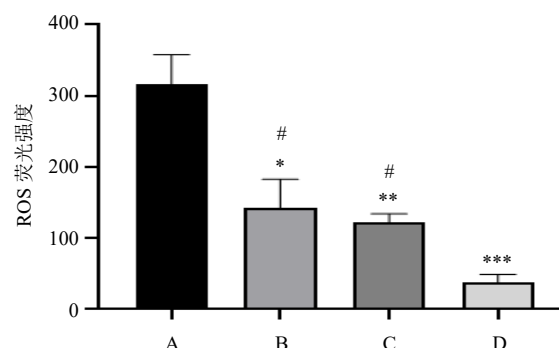
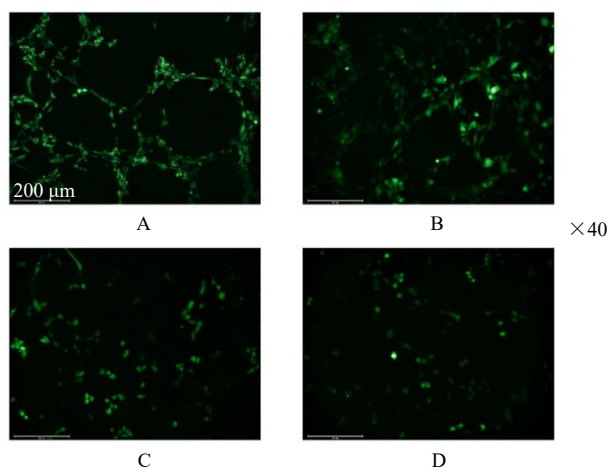


图 8 人参皂苷 Rg₁ 对 H9c2 细胞 miR-499c 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of ginsenoside Rg₁ on miR-499c expression in H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-模型组 B-miR-499c+H₂O₂ 组 C-人参皂苷 Rg₁+H₂O₂ 组 D-人参皂苷 Rg₁+miR-499c+H₂O₂ 组 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与人参皂苷 Rg₁+miR-499c+H₂O₂ 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 图 10 同
A-model group B-miR-499c + H₂O₂ group C-ginsenoside Rg₁ + H₂O₂ group D-ginsenoside Rg₁ + miR-499c + H₂O₂ group * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs ginsenoside Rg₁ + miR-499c + H₂O₂ group, same as fig. 10

图 9 miR-499c 在人参皂苷 Rg₁ 抑制 H₂O₂ 诱导 H9c2 细胞氧化应激时对 ROS 生成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of miR-499c on ROS production in resistance of ginsenoside Rg₁ to H₂O₂-induced oxidative stress in H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

抑制 ROS 的生成。人参皂苷 Rg₁+miR-499c+H₂O₂ 组 ROS 荧光强度进一步降低,提示 miR-499c 可能参与人参皂苷 Rg₁ 抑制细胞氧化应激损伤。

3.5.2 miR-499c 在人参皂苷 Rg₁ 抑制 H₂O₂ 诱导 H9c2 细胞 MMP 降低的影响 如图 10 所示,与模型组比较,人参皂苷 Rg₁+H₂O₂ 组、miR-499c+H₂O₂ 组绿/红色荧光比值显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01),表明人参皂苷 Rg₁ 和 miR-499c 均可以使 H₂O₂ 引起的 H9c2 细胞线粒体膜电位恢复;人参皂苷 Rg₁+miR-499c+H₂O₂ 组绿/红色荧光比值进一步降低,提示 miR-499c 可能参与人参皂苷 Rg₁ 抑制细胞氧化应激损伤。

4 讨论

在心血管疾病中,氧化应激是 AMI 的重要促发因素之一。一些抗氧化剂药物已被证实可以预防和治疗 AMI^[17],但尚未达到满意的效果。人参皂苷 Rg₁ 是人参中的重要生物活性成分,在体内外具有抗衰老、神经保护^[18]等多种生物活性。本研究重点探讨了人参皂苷 Rg₁ 对 H9c2 细胞的抗氧化作用及其机制。采用 H₂O₂ 诱导心肌细胞氧化应激模型是最常见的氧化应激模型制备方法,本研究发现,600 μmol/L 的 H₂O₂ 诱导 H9c2 细胞 20 min,能达到最佳氧化应激模型,与先前的研究结果一致^[19]。

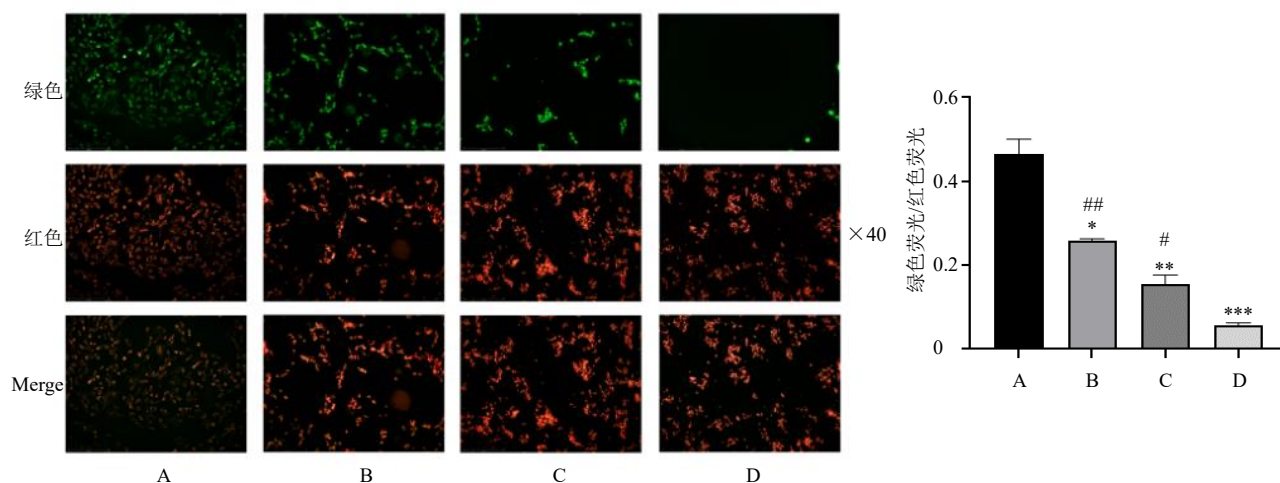


图 10 miR-499c 在人参皂苷 Rg₁ 抑制 H₂O₂ 诱导 H9c2 细胞线粒体膜电位降低的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effect of miR-499c on decrease of mitochondrial membrane potential in resistance of ginsenoside Rg₁ to H₂O₂-induced oxidative stress in H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

正常状态下, 机体内氧化与抗氧化处于一种动态平衡, 但在患病或衰老等状态时会出现因自由基水平升高而导致的病理现象^[20]。人体内有抗氧化防御系统, 包括内源性抗氧化剂 SOD。总 SOD 活性可以反映机体对氧化应激的抗氧化能力, 研究表明, 氧化应激会引起 SOD 的活性增加, 但当氧化应激过度时, SOD 活性会下降^[21]。当细胞受到氧化应激时, 引起细胞膜损伤的氧化应激反应, MDA 迅速积累^[22]。本研究发现, 人参皂苷 Rg₁ 增加了 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞中 SOD 活性, 同时减少 MDA 水平。表明人参皂苷 Rg₁ 作为外源性抗氧化剂, 通过增加内源性抗氧化剂的活性起到抗氧化作用。

ROS 是机体内最常见的自由基^[23], ROS 产生过量时能引起线粒体功能障碍, 表现为线粒体的形态变化和功能障碍。线粒体膜电位的破坏是线粒体功能障碍的主要标志。线粒体膜电位的丢失导致线粒体电子传递链缺陷、代谢耗氧量减少, 从而抑制细胞脂质、蛋白质等的正常功能^[24]。结果显示, H₂O₂ 诱导 H9c2 细胞 ROS 的生成和线粒体膜电位丢失, 而人参皂苷 Rg₁ 降低了 ROS 生成, 同时抑制线粒体膜电位丢失, 表明人参皂苷 Rg₁ 通过抑制自由基的生成和线粒体膜电位的丢失, 从而起到抑制氧化应激损伤的作用。

Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 家族蛋白的典型代表, 它们在细胞凋亡过程中发挥重要的调节作用^[25]。当细胞内 Bax 高表达时, 细胞对死亡信号敏感, 促进细胞凋亡。当 Bcl-2 高表达时, Bcl-2 与 Bax 形成异源二聚体, 抑制细胞凋亡^[26]。所以细胞内 Bax/Bcl-2 的

比例对决定细胞凋亡的敏感性起到重要作用。在细胞凋亡过程中, 线粒体被认为是处于凋亡调控的中心位置。在线粒体通路中, 如 Bax 被激活后发生寡聚化, 并插入线粒体膜, 引起线粒体膜通透性改变, 释放线粒体内促凋亡因子, 如细胞色素 C (cytochrome C, Cyt C) 等。当 Cyt C 释放到胞内后, 形成凋亡复合体, 凋亡复合体通过招募并激活 Pro-Caspase-9, 形成 Caspase-9 全酶。Caspase-9 全酶进一步激活效应 Caspase-3 和 Caspase-7, 启动 Caspase 级联反应, 切割细胞中 α -tubulin、Actin 等超过 100 种的底物, 最终导致细胞凋亡^[27]。Caspase 家族是细胞凋亡的重要执行者, 其主要功能是促进凋亡信号的放大和传递^[28]。在本研究中, 人参皂苷 Rg₁ 下调 Bax 和上调 Bcl-2 表达, 呈剂量相关性地降低 Bax/Bcl-2 的比例, 同时人参皂苷 Rg₁ 减少 cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 蛋白表达。提示人参皂苷 Rg₁ 可能通过抑制 Caspases, 进而调控 Bax 与 Bcl-2 蛋白家族, 从而抑制细胞凋亡。

研究发现, miRNA 可以调节多种基本细胞功能包括细胞凋亡和坏死, 这是 AMI 中的 2 个关键细胞事件^[29-30]。其中 miRNA-499 可以保护心肌细胞免受 AMI 诱导的凋亡作用^[31]。其他研究也证实, miR-499 通过靶向程序性细胞死亡因子 4 (programmed cell death 4, PDCD4)、钙调磷酸酶和动力蛋白来保护心肌细胞免受缺血/再灌注诱导的细胞凋亡^[32]。血浆 miR-499 被证明通过靶向 PDCD4 促进内皮炎症, PDCD14 抑制下游核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)/肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF-

α) 信号通路^[33]。提示 miR-499 可能作为治疗 AMI 血管炎症的潜在靶标^[34]。miRNA-499c 是在前期工作中发现的一种具有将非心肌细胞诱导为心肌细胞功能的 miRNA。本研究发现预处理人参皂苷 Rg₁ 可以增加 H9c2 细胞 miR-499c 的表达。同时转染 miRNA-499c 后再预处理人参皂苷 Rg₁ 后发现, 与单纯转染 miR-499c 或单纯预处理人参皂苷 Rg₁ 相比, ROS 显著降低和线粒体膜电位恢复明显。提示人参皂苷 Rg₁ 可能通过 miRNA-499c 对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞氧化应激起抑制作用。

综上, 人参皂苷 Rg₁ 通过抑制 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞 ROS 的生成, 从而减少线粒体膜电位的丢失和线粒体氧化应激, 最终抑制细胞氧化应激和细胞凋亡, 此作用可能与 miRNA-499c 有关。本研究为人参有效成分开发新的心脑血管疾病药物提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Verma T, Sinha M, Bansal N, *et al.* Plants used as antihypertensive [J]. *Nat Prod Bioprospect*, 2021, 11(2): 155-184.
- [2] Kennedy D O. Phytochemicals for improving aspects of cognitive function and psychological state potentially relevant to sports performance [J]. *Sports Med*, 2019, 49(Suppl 1): 39-58.
- [3] Zhou P, Xie W J, He S B, *et al.* Ginsenoside Rb₁ as an anti-diabetic agent and its underlying mechanism analysis [J]. *Cells*, 2019, 8(3): 204.
- [4] Han Y L, Li X W, Yang L, *et al.* Ginsenoside Rg₁ attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury due to inhibition of NOX2-mediated calcium homeostasis dysregulation in mice [J]. *J Ginseng Res*, 2022, 46(4): 515-525.
- [5] 张浩然, 叶安琪, 张跃伟, 等. 人参皂苷衍生化及生物活性研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(14): 4554-4567.
- [6] 李渊, 顾守美, 刘小虎, 等. 人参皂苷 Rg₁ 对移植性白血病模型小鼠的作用 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(12): 2571-2577.
- [7] Webster K A. Stress hyperglycemia and enhanced sensitivity to myocardial infarction [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2008, 10(1): 78-84.
- [8] Sun S H, Ruan Y, Yan M J, *et al.* Ferulic acid alleviates oxidative stress-induced cardiomyocyte injury by the regulation of miR-499-5p/p21 signal cascade [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 1921457.
- [9] Guo R, Feng Z Y, Yang Y L, *et al.* Association of a miR-499 SNP and risk of congenital heart disease in a Chinese population [J]. *Cell Mol Biol*, 2018, 64(10): 108-112.
- [10] Alihemmati A, Ebadi F, Moghadaszadeh M, *et al.* Effects of high-intensity interval training on the expression of microRNA-499 and pro- and anti-apoptotic genes in doxorubicin-cardiotoxicity in rats [J]. *J Electrocardiol*, 2019, 55: 9-15.
- [11] Wang J X, Jiao J Q, Li Q, *et al.* miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1 [J]. *Nat Med*, 2011, 17(1): 71-78.
- [12] Xin Y Y, Yang C J, Han Z J. Circulating miR-499 as a potential biomarker for acute myocardial infarction [J]. *Ann Transl Med*, 2016, 4(7): 135.
- [13] Yao Y X, Du J, Cao X Q, *et al.* Plasma levels of microRNA-499 provide an early indication of perioperative myocardial infarction in coronary artery bypass graft patients [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e104618.
- [14] Kochegarov A, Moses A, Lian W, *et al.* A new unique form of microRNA from human heart, microRNA-499c, promotes myofibril formation and rescues cardiac development in mutant axolotl embryos [J]. *J Biomed Sci*, 2013, 20(1): 20.
- [15] Hong L, Xi J K, Zhang Y D, *et al.* Atrial natriuretic peptide prevents the mitochondrial permeability transition pore opening by inactivating glycogen synthase kinase 3β via PKG and PI3K in cardiac H9c2 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 695(1/2/3): 13-19.
- [16] 洪兰, 洪英姬, 金红花. 糖原合成酶激酶 3β 介导心房钠尿肽对 H9c2 心肌细胞线粒体保护作用的研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 26(13): 7-11.
- [17] DiNicolantonio J J, Lavie C J, Fares H, *et al.* Meta-analysis of carvedilol versus beta 1 selective beta-blockers (atenolol, bisoprolol, metoprolol, and nebivolol) [J]. *Am J Cardiol*, 2013, 111(5): 765-769.
- [18] Zhong S J, Wang L, Gu R Z, *et al.* Ginsenoside Rg₁ ameliorates the cognitive deficits in D-galactose and AlCl₃-induced aging mice by restoring FGF2-Akt and BDNF-TrkB signaling axis to inhibit apoptosis [J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(8): 1048-1055.
- [19] 洪兰. 缺氧对心房钠尿肽分泌的影响及心肌保护作用研究 [D]. 延吉: 延边大学, 2012.
- [20] 张德莉, 朱圣姬, 罗光富, 等. 自由基与 DNA 氧化损伤的研究进展 [J]. *三峡大学学报: 自然科学版*, 2004, 26(6): 563-567.
- [21] McCord J M, Edeas M A. SOD, oxidative stress and human pathologies: A brief history and a future vision [J]. *Biomed Pharmacother*, 2005, 59(4): 139-142.
- [22] Jacobs P J, Oosthuizen M K, Mitchell C, *et al.* Oxidative stress in response to heat stress in wild caught Namaqua

- rock mice, *Micaelamys namaquensis* [J]. *J Therm Biol*, 2021, 98: 102958.
- [23] Yang S S, Lian G J. ROS and diseases: Role in metabolism and energy supply [J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 467(1/2): 1-12.
- [24] Gülçin İ, Elmastaş M, Aboul-Enein H Y. Antioxidant activity of clove oil—A powerful antioxidant source [J]. *Arab J Chem*, 2012, 5(4): 489-499.
- [25] Zhang Y, Yang X, Ge X H, *et al*. Puerarin attenuates neurological deficits via Bcl-2/Bax/cleaved caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 726-733.
- [26] Moradipour A, Dariushnejad H, Ahmadizadeh C, *et al*. Dietary flavonoid carvacrol triggers the apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells via the p53/Bax/Bcl-2 axis [J]. *Med Oncol*, 2022, 40(1): 46.
- [27] Fan T J, Han L H, Cong R S, *et al*. Caspase family proteases and apoptosis [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2005, 37(11): 719-727.
- [28] Kuida K. Caspase-9 [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, 32(2): 121-124.
- [29] Ambros V. microRNA pathways in flies and worms: Growth, death, fat, stress, and timing [J]. *Cell*, 2003, 113(6): 673-676.
- [30] Skommer J, Rana I, Marques F Z, *et al*. Small molecules, big effects: The role of microRNAs in regulation of cardiomyocyte death [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(7): e1325.
- [31] Agiannitopoulos K, Pavlopoulou P, Tsamis K, *et al*. Expression of miR-208b and miR-499 in Greek patients with acute myocardial infarction [J]. *In Vivo*, 2018, 32(2): 313-318.
- [32] Li Y Q, Lu J H, Bao X M, *et al*. miR-499-5p protects cardiomyocytes against ischaemic injury via anti-apoptosis by targeting PDCD4 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(24): 35607-35617.
- [33] Zhang Y H, He K, Shi G. Effects of microRNA-499 on the inflammatory damage of endothelial cells during coronary artery disease via the targeting of PDCD4 through the NF- κ B/TNF- α signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(1): 110-124.
- [34] Shi Y, Han Y, Niu L, *et al*. MiR-499 inhibited hypoxia/reoxygenation induced cardiomyocytes injury by targeting SOX6 [J]. *Biotechnol Lett*, 2019, 41(6/7): 837-847.

[责任编辑 李亚楠]