

- 9** Han X, Chen H, Gong H, et al. Autolysosomal degradation of cytosolic chromatin fragments antagonizes oxidative stress-induced senescence [J]. J Biol Chem, 2020;295(14):4451-63.
- 10** Kwon OC, Song JJ, Yang Y, et al. SGK1 inhibition in glia ameliorates pathologies and symptoms in Parkinson disease animal models [J]. EMBO Mol Med, 2021;13(4):1-26.
- 11** 王昆,罗小娜,李时光,等. Nr2/HO-1 信号通路在 6-羟基多巴胺帕金森病模型大鼠神经损伤中的作用[J]. 中国医药生物技术, 2019;14(3):237-44.
- 12** 马骏,王彬,王述菊,等. 电针“风府、太冲”穴对帕金森病模型大鼠内质网应激相关蛋白表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2019;34(7):772-7.
- 13** 任倩薇,孟凡刚. 左旋多巴诱导的帕金森病异动症模型研究现状与展望[J]. 中华实验外科杂志, 2019;36(8):1351-4.
- 14** 陈叶萍,孙秀萍. 温针灸法配合功能训练改善老年帕金森病患者吞咽功能障碍分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019;21(1):200-2.
- 15** Yu SW, Lin SH, Tsai CC, et al. Acupuncture effect and mechanism for treating pain in patients with Parkinson's disease[J]. Front Neurol, 2019;10(1):1-8.
- 16** 王述菊,王中明,马骏,等. 电针对帕金森病模型大鼠黑质内质网应激相关基因表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2017;28(6):1497-500.
- 17** Maekawa H, Inoue T, Ouchi H, et al. Mitochondrial damage causes inflammation via cGAS-STING signaling in acute kidney injury[J]. Cell Rep, 2019;29(5):1261-73.
- 18** Li N, Wang W, Jiang WY, et al. Cytosolic DNA-STING-NLRP3 axis is involved in murine acute lung injury induced by lipopolysaccharide[J]. Clin Transl Med, 2020;10(7):1-18.
- 19** 申明琪,张丁宁. 脑苷肌肽对缺氧缺血性脑病新生大鼠 cGAS/STING 通路及海马神经元凋亡的影响[J]. 现代药物与临床, 2020;35(10):1943-9.
- 20** 李倩,周君梅. cGAS-cGAMP-STING 信号通路在神经系统疾病中的研究进展[J]. 中国医药生物技术, 2019;14(5):445-8.

[2022-02-17 修回]

(编辑 杜娟)

人参皂苷 Rg3 对血管紧张素Ⅱ诱导小鼠心肌成纤维细胞增殖及胶原合成的影响

陈文明 李朝富 石蓓 (遵义医科大学附属医院心血管内科,贵州 遵义 563099)

[摘要] 目的 研究人参皂苷 Rg3 对血管紧张素(Ang)Ⅱ诱导的小鼠心肌成纤维细胞(CFs)增殖与胶原合成的影响,探讨人参皂苷 Rg3 是否具有对抗心肌纤维化的作用。**方法** 用胰酶消化,差速贴壁、分离纯化 CFs,用波形蛋白(Vimentin)免疫荧光法鉴定 CFs;建立 Ang Ⅱ诱导的 CFs 增殖模型。实验分为正常对照组(无血清 DMEM),模型组(Ang Ⅱ),人参皂苷 Rg3 组共 3 组;人参皂苷 Rg3 预处理 1 h,加入 Ang Ⅱ共同作用 24 h,采用 EdU 试剂盒检测 CFs 的增殖情况;羟脯氨酸法检测细胞胶原分泌水平;Western 印迹检测 CFs 中增殖细胞核抗原(PCNA)、胶原蛋白(Col)I 的表达情况。**结果** 成功提取新生大鼠原代 CFs, Vimentin 显著阳性;与正常对照组比较,模型组 CFs 增殖和胶原分泌明显增加,PCNA、Col I 蛋白表达水平明显升高;与模型组相比,人参皂苷 Rg3 组 CFs 增殖和胶原分泌水平较明显降低,PCNA、Col I 蛋白表达水平明显降低。**结论** 人参皂苷 Rg3 通过抑制 Ang Ⅱ诱导的 CFs 增殖和胶原蛋白合成,进而发挥抗心肌纤维化作用。

[关键词] 人参皂苷 Rg3;心肌成纤维细胞;增殖;胶原

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9202(2023)08-1913-05;doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2023.08.032

心肌纤维化是冠心病、心力衰竭及高血压等心血管疾病发生心室重构的重要机制之一^[1]。引起心肌纤维化的因素很多,肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)的过度激活是导致心肌纤维化的重要因素之一。血管紧张素(Ang)Ⅱ是 RAAS 中重要的生物学效应分子,可引起心肌成纤维细胞(CFs)增殖和胶原蛋白合成,从而导致心肌纤维化^[2-4]。课

基金项目:贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzjkj2019-1-096);贵州省高层次创新人才培养(黔科合人才〔2015〕4025);遵义市科技计划(科技支撑)项目(遵义市科合 HZ 字〔2020〕227 号)

第一作者:陈文明(1980-),男,硕士,高级实验师,主要从事冠心病发病机制及药物干预研究。

题组前期研究发现人参皂苷 Rg3 能够抑制大鼠颈动脉损伤后内膜增生、诱导平滑肌细胞凋亡^[5],但关于人参皂苷 Rg3 是否能够抑制 Ang Ⅱ诱导 CFs 的增殖研究甚少。本研究人参皂苷 Rg3 对 Ang Ⅱ诱导的 CFs 增殖和胶原合成的影响,并探讨其潜在的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF 级 C57 小鼠,雌雄不限,6~8 周龄,18~20 g,由遵义医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂及仪器 人参皂苷 Rg3(上海笃玛生物科技有限公司,生产批号:ZL20161016);胎牛血清(MRC 公司,澳大利亚);DMEM 培养基、青

霉素/链霉素双抗、胰酶(HyClone 公司,美国);谷氨酰胺、无钙镁 D-Hanks 液、Ⅱ型胶原酶(Sigma 公司,美国);免疫荧光封闭液、DyLight594 标记的二抗 IgG、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的二抗 IgG、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色液、Triton X-100 均(江苏碧云天生物技术有限公司);波形蛋白(Vimentin)单克隆抗体(Cell Signaling 公司,美国);增殖细胞核抗原(PCNA)、胶原蛋白(Col) I 一抗抗体(博士德生物技术科技有限公司)。

1.3 CFs 的培养 细胞培养实验步骤参照参考文献^[6]总结后进行:C57 小鼠经肝素化处理后脱颈处死,用酒精消毒后,于超净台中小鼠取出心脏并迅速置于装有含双抗的无钙镁-Hanks 缓冲液的玻璃皿中,尽可能除去结缔组织和心房,将心脏置于 EP 管,加入无钙镁 D-Hanks 缓冲液,剪碎,加消化液后,移至青霉素小瓶或带塞锥形瓶中,置于 37℃ 水浴中,并调节到适当的转速进行消化。收集消化液离心,弃去上清,加适量含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM/M199 进行细胞贴壁,培养 90 min,由于 CFs 贴壁速度快的特性,利用差速贴壁原理将 CFs 与其他细胞分离(其中贴壁细胞中 90% 以上为成纤维细胞)。取 P3 代细胞用于后续实验。

1.4 免疫荧光法鉴定 CFs 取 3 代生长状态良好的细胞,制成 1×10^5 的细胞混悬液,然后接种于 24 孔板,待 CFs 长至 50%~60% 融合时,吸出培养液,加入 1 ml 的 4% 多聚甲醛,室温固定 10 min,加入 0.1% Triton X-100,冰上孵育 2 min。加入 10% 驴血清 37℃ 封闭 1 h。加入一抗 Vimentin(1:200),4℃ 过夜。加入二抗 IgG(1:1 000),室温避光 1.5 h,加入 DAPI(1:1 000),室温避光 20 min,在荧光倒置显微镜下观察并拍照。

1.5 噻唑蓝(MTT)检测人参皂苷 Rg3 对 CFs 增殖情况 取 3 代生长状态良好的 CFs,以 $1 \times 10^5/ml$ 密度接种到 96 孔板中,每孔 200 μl ,实验组分别加入不同浓度(25、50、100 $\mu mol/L$)的人参皂苷 Rg3。正常对照组加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液。设置 6 个复孔,作用 24 h 后,取出 96 孔板,每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 10 μl ,继续在 CO₂ 孵箱中培养 4 h,即有甲臜生成,弃掉上清液。每孔加入二甲基亚砜(DMSO)150 μl ,摇床上避光振荡 10 min,使其充分溶解,用酶标仪在 570 nm 波长处测定吸光度(A)。另设空白组,不加入细胞,其余操作相同。每组设 6 个复孔。根据下公式计算细胞存活率:细胞存活率(A 药物组-A 空白组)/(A 正常对照组-A 空白组)×100%。

1.6 EdU 试剂盒法检测人参皂苷 Rg3 对 Ang II 诱导的 CFs 增殖情况 实验分 3 组,即正常对照组(无血清 DMEM),模型组(1 $\mu mol/L$ Ang II),人参皂苷 Rg3 组(50 $\mu mol/L$ Rg3+1 $\mu mol/L$ Ang II)。取 3 代生长状态良好的 CFs,待 CFs 长至约 75% 后,将培养基换成无血清 DMEM,于 37℃ 5% CO₂ 培养箱培养 24 h,加入人参皂苷 Rg3(50 $\mu mol/L$)孵育 1 h,再加入 Ang II(1 $\mu mol/L$)共同孵育 24 h,按照 EdU 试剂盒说明书操作步骤进行,增殖细胞的核呈绿色,在荧光倒置显微镜下观察,计算每组 EdU 阳性细胞数占细胞总数的比例与正常对照组 EdU 阳性细胞数占细胞总数的比例相比。

1.7 羟脯氨酸消化法检测细胞培养液中胶原水平

CFs 按照 1.6 分组处理后,收集细胞培养液,根据消化法试剂盒说明书进行操作,双蒸水调零,用酶标仪在 550 nm 波长处检测各组培养液上清吸光度。羟脯氨酸含量($\mu g/ml$)=(实验组培养液上清的吸光度值-空白管上清吸光度值)/(标准品上清吸光度值-空白管上清吸光度值)×标准品浓度(5 $\mu g/ml$)×各组样本稀释倍数。

1.8 Western 印迹检测 PCNA 和 Col I 蛋白表达情况 CFs 按照 1.6 分组处理后,提取各组细胞总蛋白并二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,提取的总蛋白与蛋白上样缓冲液(4×)按 4×1 比例混匀,经蛋白变性后,等量上样,进行电泳,然后用聚偏氟乙烯(PVDF)膜电转,5% 的脱脂牛奶封闭 1.5 h,加入一抗(兔抗大鼠 PCNA 和 Col I 浓度稀释均为 1:200),4℃ 孵育过夜,二抗孵育 1 h,用显色剂电化学发光试剂(ECL)显色、曝光。Image Pro Plus 软件分析蛋白条带灰度值,结果以各组目的蛋白与内参 β -actin 表达量的比值表示蛋白表达水平。

1.9 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行方差分析,两两比较采用 LSD-t 法。

2 结 果

2.1 CFs 的分离培养与鉴定 小鼠 CFs 在培养 30~50 min 后大多数细胞已贴壁,其中部分开始伸出伪足,伸展成梭形、多边形,胞体较大,胞核清晰且大,通常含 1~3 个核呈椭圆形,胞质透明,呈薄片状,无自发性搏动。CFs 生长迅速,2~3 d 即可铺满培养瓶的 80%~90%,细胞排列紧密,见图 1。Vimentin 作为一种中间纤维,主要存在于间质细胞中,被认为是中胚层起源细胞(如白细胞和成纤维细胞)的特征性标志。在心脏中仅 CFs 为间质细胞,因此 Vimentin 可以作为鉴定 CFs 的标志物。在免

疫荧光显微镜下可见围绕细胞核的红色丝状网络状结构,即细胞内 Vimentin 表达为阳性,蓝色部分为 DAPI 染核情况,Vimentin 阳性细胞的数量占细胞总数的 98% 以上,表明所获 CFs 可用于后续实验,见图 2。

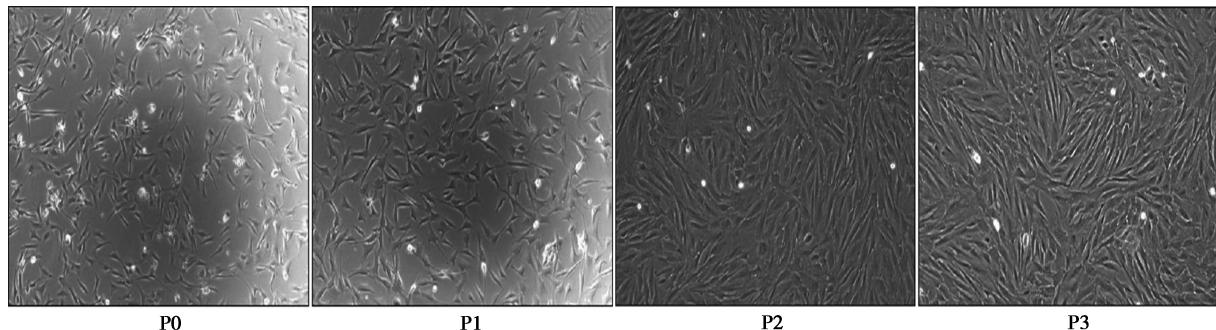


图 1 CFs 的分离培养 P0 ~ P3 代细胞($\times 200$)

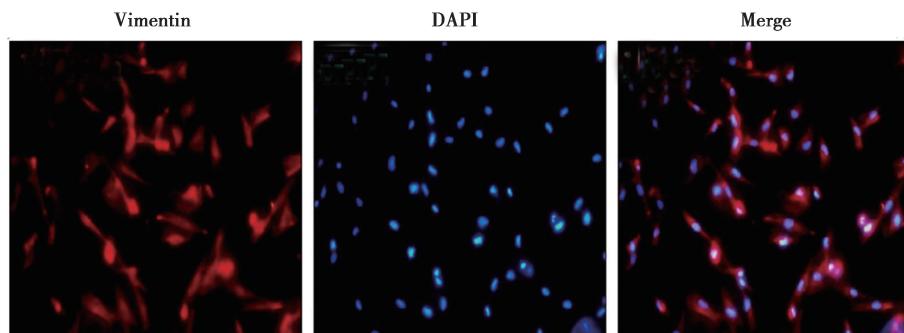


图 2 免疫荧光鉴定 CFs($\times 400$)

2.2 人参皂苷 Rg3 对 CFs 活性的影响 与正常对照组 [$(99.6 \pm 8.21)\%$] 相比,不同剂量 (25 、 50 、 $100 \mu\text{mol/L}$) 人参皂苷 Rg3 处理 CFs 活性无统计学差异 [$(98.9 \pm 4.69)\%$ 、 $(99.0 \pm 6.98)\%$ 、 $(99.3 \pm 5.31)\%$, $P > 0.05$]。表明人参皂苷 Rg3 在 25 ~ $100 \mu\text{mol/L}$ 的剂量范围内无细胞毒性作用。因此,选择人参皂苷 Rg3 $50 \mu\text{mol/L}$ 为后续实验浓度。

2.3 人参皂苷 Rg3 对 Ang II 诱导的 CFs 胶原分泌的影响 羟脯氨酸在 Col I 中约占 13.4% ,仅有极少量存在于弹性蛋白中,并且不存在于其他蛋白质中,所以细胞上清液中的羟脯氨酸含量可用于反映 CFs 胶原分泌水平。与正常对照组 [$(0.739 \pm 0.021)\text{ mg/L}$] 相比,模型组 CFs 胶原分泌增加 [$(1.474 \pm 0.033)\text{ mg/L}$, $P < 0.01$];人参皂苷 Rg3 干预后,CFs 胶原分泌水平较模型组降低 [$(0.867 \pm 0.027)\text{ mg/L}$, $P < 0.01$]。

2.4 人参皂苷 Rg3 对 Ang II 诱导的 CFs 增殖相关蛋白 PCNA 和 Col I 表达的影响 与正常对照组相比,模型组 CFs 增殖相关蛋白 PCNA 和 Col I 显著上调 ($P < 0.01$);与模型组相比,加入人参皂苷 Rg3 后,PCNA、

Col I 表达量明显下调 ($P < 0.01$),见图 3、表 1。

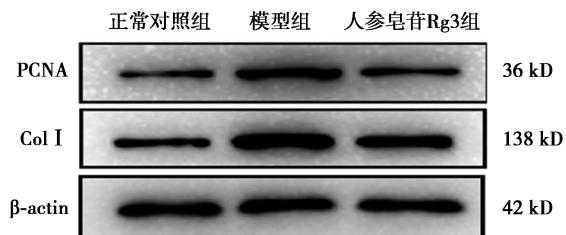


图 3 人参皂苷 Rg3 处理 CFs 增殖相关蛋白表达

表 1 各组 CFs 增殖相关蛋白 PCNA、Col I 表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	PCNA	Col I
正常对照组	0.475 ± 0.021	0.543 ± 0.012
模型组	$1.083 \pm 0.035^{1)}$	$1.153 \pm 0.018^{1)}$
人参皂苷 Rg3 组	$0.601 \pm 0.019^{2)}$	$0.877 \pm 0.033^{2)}$

与正常对照组比较;¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较;²⁾ $P < 0.01$

2.5 人参皂苷 Rg3 对 Ang II 诱导的 CFs 增殖的影响 在荧光显微镜下观察,视野中的蓝色区域为细

胞核着色,可用于计数视野中的细胞总数;绿色部分为 EdU 标记正在复制的 DNA,EdU 阳性率可代表细胞增殖率。与正常对照组 [(1.000±0.000)%] 比较,模型组 CFs EdU 阳性率明显升高 [(3.437±

0.079)% , $P<0.01$] ;加入人参皂苷 Rg3 处理后,与模型组相比,CFs EdU 阳性率明显降低 [(1.346±0.058)% , $P<0.01$] ,见图 4。

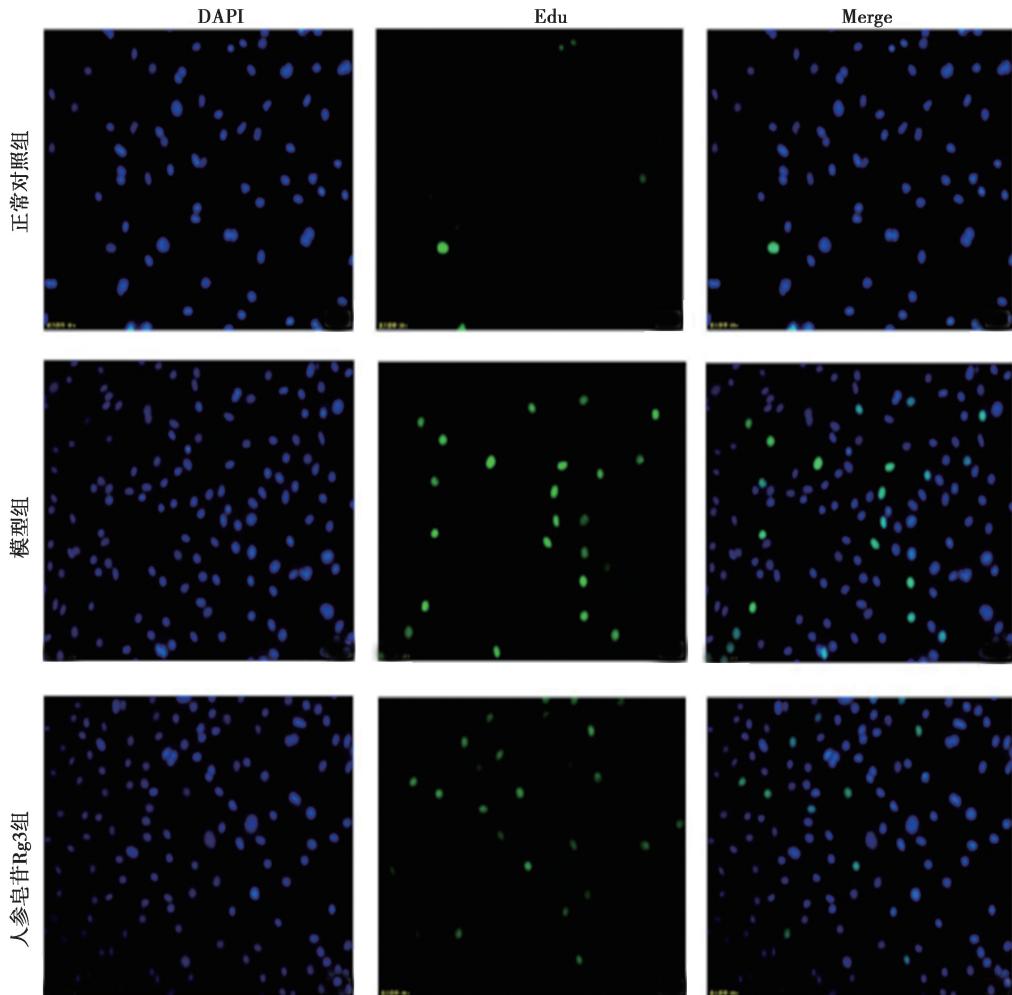


图 4 EdU 检测人参皂苷 Rg3 对 CFs 增殖的影响 ($\times 400$)

3 讨 论

本研究结果提示,人参皂苷 Rg3 可抑制心肌纤维化,继而改善心室重构。

大量临床及基础实验研究证明,心肌过度纤维化是心肌重构过程的重要一环,心肌纤维化是在各种压力应激等病理因素刺激下,机体为应对这一过程产生的反应,主要表现为 CFs 大量增殖,并合成分泌胶原 I、Ⅲ 及细胞外基质堆积,形成纤维瘢痕^[7,8];在一定程度上 CFs 增殖,基质、胶原分泌,即适应性纤维化能维持心脏组织结构完整性并防止心脏破裂发生;然而持续、长期、过度的心肌成纤维细胞增殖、分泌会造成心肌僵硬化,影响心脏的舒张、收缩功能,尤其是舒张功能,从而“吞噬”掉部分心功能,逐渐发展为心衰,因此抑制 CFs 的过度增殖可

以在一定程度上挽救部分心功能^[9]。既往研究提示,RAAS 不恰当的过度激活是心肌发生纤维化的“始作俑者”,其系统激活分泌的 Ang II 是引起 CFs 过度增殖的主要物质之一^[10,11]。本研究通过 Ang II 做模拟压力应激因素诱导 CFs 增殖,发现 CFs 的增殖能力明显增强,这与既往^[12]报道相符。但予以人参皂苷 Rg3 干预后,CFs 原本上调的增殖能力和 Col 的合成分泌均受到明显的抑制。说明人参皂苷 Rg3 是通过抑制 Ang II 诱导 CFs 的增殖作用,抑制心肌纤维化。

4 参考文献

- 1 谭昭充,洪葵. 心肌细胞与成纤维细胞间电耦联的研究进展 [J]. 临床心血管病杂志,2019;35(9):861-3.

- 2 吴学平,李志宏,王新艳,等. 心肌梗死后心脏修复与心肌细胞再生的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志,2019;27(10):899-904.
- 3 Linmao L,Wang H,Li B,*et al*. A critical role of cardiac fibroblast-derived exosomes in activating renin angiotensin system in cardiomyocytes[J]. J Mol Cell Cardiol,2015;89:268-79.
- 4 杨昌,黄煜,何庆. 调控血管紧张素转化酶 2-血管紧张素(1-7)-Mas 轴是心脏重构和心力衰竭治疗的新靶点[J]. 中华危重病急救医学,2019;31(11):1425-8.
- 5 陈文明,赵永超,刘国围,等. 人参皂苷 Rg3 对大鼠颈动脉损伤后内膜增生及平滑肌细胞凋亡的影响[J]. 中草药,2018;49(13):3082-6.
- 6 Ackersjohnson M,Li PY,Holmes AP,*et al*. A simplified, langendorff-free method for concomitant isolation of viable cardiac myocytes and non-myocytes from the adult mouse heart[J]. Circ Res,2016;119(8):909-20.
- 7 张召才,杨英珍,陈灏珠. 心肌纤维化的研究进展[J]. 临床心血管病杂志,2004;20(1):58-60.
- 8 Kawel BN,McClelland RL,Zemrak F,*et al*. Hypertrabeculated left ventricular myocardium in relationship to myocardial function and fibrosis:the multi-ethnic study of atherosclerosis[J]. Radiology,2017;284:667-75.
- 9 Morine KJ,Qiao X,York S,*et al*. Bone morphogenetic protein 9 reduces cardiac fibrosis and improves cardiac function in heart failure [J]. Circulation,2018;138:513-26.
- 10 寿鸿飞,刘晶,刘天龙,等. 黄芪三萜皂苷对心肌重构细胞模型的保护作用[J]. 实用医学杂志,2019;35(9):18-22.
- 11 Liu Y,Gao L,Guo S,*et al*. Kaempferol alleviates angiotensin II-induced cardiac dysfunction and interstitial fibrosis in mice[J]. Cell Physiol Biochem,2017;43:2253-63.
- 12 Wu X,Liu Y,An J,*et al*. Piperlongumine inhibits Angiotensin II-induced extracellular matrix expression in cardiac fibroblasts[J]. J Cell Biochem,2018;119(12):10358-64.

[2021-12-17 修回]
(编辑 杜娟)

基于 Wnt/β-catenin 通路探究上调 miR-132 对认知功能障碍模型大鼠的干预效果

赵金慧 滕文 刘婵媛 金涛 陈汉华

(武汉科技大学附属武汉市武昌医院精神心理科,湖北 武汉 430071)

[摘要] 目的 探究上调微小 RNA-132 (miR-132) 对认知功能障碍模型大鼠的干预效果及相关机制。方法 选取 40 只雄性大鼠,10 只为正常组,其余 30 只建立认知功能障碍模型,并分为模型组、下调组、上调组,下调组尾部静脉注射 30 mg/kg 下调(antago)miR-132,上调组尾部静脉注射 30 mg/kg 上调(ago)miR-132,正常组、模型组尾部静脉注射等量生理盐水。检测各组学习、记忆能力,RT-PCR 法检测 miR-132 表达,免疫透射比浊法检测神经生长因子(NGF)β、S100β 水平,原位末端标记方法(TUNEL)检测神经元细胞凋亡率,酶联免疫吸附试验检测白细胞介素(IL)-1β、肿瘤坏死因子(TNF)-α、总抗氧化能力(TAOC)、过氧化脂质(LPO)水平,Western 印迹法检测性别决定区 Y 框蛋白(SOX)2、无翅型 MMTV 整合位点家族成员(Wnt)3a、β-连环蛋白(catenin)、人类重组蛋白(Beclin)-1、人微管相关蛋白轻链(LC)3-II 表达。结果 上调组表达显著高于模型组、下调组($P < 0.05$)。上调组 miR-132、SOX2、Wnt3a、β-catenin 表达、NGFβ 水平、记忆成绩显著高于模型组、下调组($P < 0.05$)。结论 上调认知功能障碍模型大鼠 miR-132 表达,大鼠学习、记忆能力有效改善,NGFβ、S100β 水平受到调控,大鼠脑组织炎症反应、氧化应激损伤程度减轻,神经元细胞凋亡率下降,其机制可能是 Wnt/β-catenin 通路蛋白及自噬蛋白表达受到调控。

[关键词] 认知功能障碍;微小 RNA-132;炎症反应;氧化应激;细胞凋亡

[中图分类号] R741.02 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9202(2023)08-1917-04;doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2023.08.033

临床医学将介于衰老与老年痴呆之间的认知损伤状态定义为认知功能障碍,主要是指机体语言、记忆、执行、判断等认知功能损伤^[1,2]。老年人群为认知功能障碍的高发群体,患者多表现为记忆障碍、认知障碍等,严重威胁患者生活质量^[3,4]。药物治疗

基金项目:湖北省卫生和计划生育委员会联合基金项目
(WJ2018H0092)

通信作者:陈汉华(1971-),男,主任医师,主要从事抑郁症与强迫障碍研究。

第一作者:赵金慧(1986-),女,主治医师,主要从事精神障碍研究。

为常用的治疗认知功能障碍的手段,但尚无一种特效的治疗认知功能障碍的药物,因此越来越多的专家学者致力于认知功能障碍发病机制、临床治疗的研究,以期寻找新的治疗靶点^[5~7]。本研究建立认知功能障碍大鼠模型,靶向调控微小 RNA-132 (miR-132) 表达,旨在探究干预效果及相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料 选取 40 只 SD 健康雄性大鼠[中国医药研究开发中心有限公司,使用许可证号:SYXK