

三七总皂苷调节能量代谢干预 心肌细胞肥大的效应机制研究*

罗凯², 张腾^{1,2**}, 陈瑜^{1,2**}

(1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院 上海 200437;

2. 上海市中医药研究院中西医结合临床研究所 上海 200437)

摘要:目的 探讨三七总皂苷(Panax notoginsenosides, PNS)调节能量代谢干预心肌细胞肥大的效应和机制。方法 采用异丙肾上腺素(Isoprenaline, ISO)诱导原代心肌细胞肥大模型,探讨PNS干预心肌细胞肥大的效应及能量代谢相关机制。将新生乳鼠心脏进行心肌细胞分离培养,随机分为正常组、ISO模型组、PNS低剂量组及PNS高剂量组。正常组和ISO模型组给予生理盐水;PNS低、高剂量组分别给予50 μg/mL及200 μg/mL PNS;孵育30 min后,ISO模型组和PNS低、高剂量组给予10 μmol/L ISO,正常组给予等体积生理盐水。培养72 h后,测定各组心肌细胞横截面积,ATP含量及脑钠肽(Brain natriuretic peptide, BNP)、过氧化物酶体增殖物激活受体-δ(peroxisome proliferators-activated receptors-δ, PPAR-δ)、长链酰基辅酶A脱氢酶(Long chain acyl-CoA dehydrogenase, LCAD)、中链酰基辅酶A脱氢酶(Medium chain acyl-CoA dehydrogenase, MCAD)等基因表达水平、PPAR-δ蛋白表达及miRNA-199a表达水平。结果 与正常组比较,ISO模型组心肌细胞横截面积显著增大,ATP水平显著降低,miRNA-199a表达及BNP mRNA表达水平显著上调,PPAR-δ、LCAD、MCAD mRNA表达水平显著下调,PPAR-δ蛋白水平显著下调;与ISO模型组比较,PNS低、高剂量组心肌细胞横截面积显著减小,ATP水平显著升高,miRNA-199a表达及BNP mRNA表达水平显著下调,LCAD、MCAD mRNA表达水平显著上调,PPAR-δ蛋白水平显著上调。结论 PNS具有显著直接抑制心肌细胞肥大的效应;PNS干预MiR-199a/PPAR-δ调控、改善心肌能量代谢可能是其抑制心肌细胞肥大的作用机制之一。

关键词:三七总皂苷 异丙肾上腺素 心肌细胞肥大 能量代谢

doi: 10.11842/wst.20190409005 中图分类号: R285 文献标识码: A

根据2019年3月发布的《中国心血管病报告2018》显示,近十年来,我国心血管病死亡率一直位居各类疾病首位,并且发病率呈现不断上升趋势^[1]。作为多种心血管疾病形成过程中共同病理表型之一的

心肌细胞肥大也越来越多的受到医学界的关注。心肌细胞肥大是心肌细胞对各种内外因素诱导的生物学压力增加所作出的反应,其特点是心肌细胞体积增大,直径增宽,长度增加,肌节数量增多,并且与心肌

收稿日期:2019-04-09

修回日期:2019-10-07

* 上海市教育委员会“上海市高校特聘教授(东方学者)跟踪计划”(GZ2015011):高血压等心血管病发病的microRNA调控与中医药干预作用机制研究,负责人:张腾;上海市卫生和计划生育委员会关于进一步加快中医药事业发展三年行动计划(2018年-2020年)(ZY(2018-2020)-CCCX2004-07):中医药防治高血压及靶器官损伤的优势效应机制研究,负责人:张腾;上海市科学技术委员会优秀学术带头人计划(19XD1403700):三七皂苷干预视网膜新生血管的优势效应机制研究;负责人:陈瑜。

** 陈瑜,教授,博士研究生导师,主要研究方向:中西医结合临床;张腾,教授,博士研究生导师,主要研究方向:中西医结合心血管疾病临床与基础研究。

肥厚和心衰的发生密切相关^[2]。三七是五加科植物三七的干燥根和根茎,味甘、性温、微苦,最早明确记载于《本草纲目》之中,迄今有数百年的临床应用历史。《医学衷中参西录》记载:“三七,善化瘀血,又善止血妄行,病愈后不致瘀血留于经络。”三七具有化瘀止血、活血定痛的功效。PNS是中药三七最主要活性成分之一,具有抗炎、抗凝、抗氧化、抗凋亡、抗心律失常、减少心肌耗氧量等多种药理活性,其相关制剂临床广泛应用于心血管疾病的防治^[3,4]。近年来,有研究报道PNS能够显著降低心肌损伤小鼠的心肌细胞横截面积,提示PNS可能具有抑制心肌细胞肥大,抗心肌肥厚的效应^[5,6],然而有关其作用机制尚未见深入的研究报道。亦有报道,心肌细胞肥大与能量代谢紊乱关系密切^[7]。因此,本实验从能量代谢途径发掘并探索PNS抑制心肌细胞肥大效应可能的分子机制,以期为其临床应用和推广提供扎实理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂

新生1-3天C57BL/6J乳鼠(由购自斯莱克动物有限公司的成年C57BL/6J小鼠繁育所得);小鼠心肌细胞分离试剂盒(Thermo Scientific);三七总皂苷(纯度≥98%)(上海泛亚生物医药集团);异丙肾上腺素(纯度≥99%)(东京化成工业株式会社);罗丹明-鬼笔环肽染料(Thermo Scientific);ATP检测试剂盒(碧云天生物科技);miRNA逆转录试剂盒(Qiagen);5xPrime Script RT Master Mix (TaKaRa);SYBR GREEN (Roche);PPAR- δ 一抗(Thermo Scientific, PA1-823A);PPAR- δ 二抗(Thermo Scientific, SH253595)。

1.2 实验仪器

荧光化学发光凝胶成像仪(美国UVP公司);多功能酶标仪(BioTek公司);倒置荧光显微镜(Leica, DM6000B);实时荧光定量PCR系统(Roche);细胞培养箱(Thermo Scientific);微量紫外分光光度计(Shimadzu)。

1.3 细胞分离及模型制备

新生1-3天C57BL/6J乳鼠,75%的医用酒精皮肤消毒,沿左侧肋弓下缘将肋弓与胸腔分离,使心脏暴露于体外,用镊子迅速离断心脏,于HBSS缓冲液中(不含Ca²⁺、Mg²⁺)将心脏残血浸涤干净并剪碎,每个心脏置于备有木瓜蛋白酶200 μ L和嗜热菌蛋白酶10 μ L

混合液的EP管中,37℃震荡消化30 min,3000 rcf常温离心3 min,去上清液留心肌细胞沉淀物,每管加入HBSS缓冲液1 mL将沉淀吹打均匀,室温放置5 min终止消化反应,2000 rcf常温离心3 min,去上清留沉淀,每管加入含1%青链霉素和10%胎牛血清的DMEM培养基1 mL将沉淀吹打均匀,将各个EP管中含有的心肌细胞的培养基置于50 mL离心管中混匀,调整细胞浓度为 5×10^5 /mL,接种至12孔培养板,1000 μ L/孔,37℃条件下置于5%二氧化碳培养箱中孵育。待心肌细胞贴壁(约24 h)后,将上清连同没有贴壁的心肌细胞吸出,重新加入DMEM培养基继续孵育。利用ISO(10 μ mol/L)在二氧化碳培养箱5% CO₂,37℃环境中培养孵育72 h,制备心肌细胞肥大模型。

1.4 分组给药

将心肌细胞随机分为4组:①正常组:加入等体积的生理盐水溶液;②模型组:等体积生理盐水+ISO 10 μ mol/L;③PNS低剂量组:PNS 50 mg/L + ISO 10 μ mol/L;④PNS高剂量组:PNS 200 mg/L + ISO 10 μ mol/L。PNS干预后30 min给予ISO,在二氧化碳培养箱5% CO₂,37℃环境中培养孵育72 h。

1.5 心肌细胞病理染色及横截面积计算

心肌细胞孵育72 h后吸去培养基,用PBS清洗细胞10 min×2次,1% Triton 200 μ L透明化浸泡3 min, PBS清洗细胞10 min×2次,10% BSA 200 μ L孵育20 min,5 μ g/mL罗丹明-鬼笔环肽200 μ L室温避光孵育20 min, PBS清洗细胞10 min×2次,0.1 mg/mL DAPI 200 μ L溶液室温孵育1 min,对细胞核进行复染,400倍荧光显微镜下观察拍摄细胞形态。每孔观察5个视野,每个视野测5-10个细胞,应用image J软件计算心肌细胞横截面积,取其平均值。

1.6 总RNA抽取及miRNA、基因表达分析

心肌细胞孵育72 h后吸去培养基,9%生理盐水清洗,每孔分别加入500 μ L Trizol吹打,室温放置5 min;离心取上清,加入氯仿100 μ L,温和振荡室温放置20 min;离心取上清,加入异丙醇250 μ L,振荡混匀室温放置15 min;离心弃上清,RNA沉于管底加入75%乙醇500 μ L,振荡混匀室温放置5 min;离心弃上清,室温晾干10 min,每管加入DEPC水50 μ L溶解,完成总RNA提取。计算总RNA浓度,进行逆转录,获取cDNA。利用SYBG法进行Real-Time PCR检测。

各引物如表1和表2所示。

表1 用于mRNA表达分析的引物

名称	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
LCAD	CTCGGCCGATGTTCTCATT	TCTCGGCTTTCTCCCATTC
MCAD	ATTCCGGAGAGTTGTGGTGG	TAGCAGTCTGCACCCCTGTA
BNP	GAACAATCCACGATGCAGAAGC	TCTGCCAAAGCAGCTTGAA
PPAR- δ	CAAACCCACGGTAAAGGCGG	TGGCTGTTCATGACTGACC
GAPDH	CCGGTCTGAGTATGTCGT	CCTTTTGGCTCCACCCTTC

1.7 心肌细胞ATP水平分析

心肌细胞孵育72 h后吸去培养基,9%生理盐水清洗,4℃环境按150 μ L/孔加ATP细胞裂解液,4℃离心取上清(即ATP样品),按照20 μ L/孔,将样品加入检测孔中,利用多功能酶标仪检测样品中ATP浓度,利用BCA法测定样品中蛋白浓度,计算样品单位心肌细胞ATP含量=样品ATP浓度/样品蛋白含量,计算各组单位心肌细胞所含ATP的相对比值。

1.8 蛋白提取及表达水平分析

心肌细胞孵育72 h后吸去培养基,9%生理盐水清洗,裂解心肌细胞,收集上清,BCA法测蛋白浓度,配SDS凝胶,每个凝胶孔加入蛋白样品20 μ g进行电泳分离,80 V电泳约25 min,120 V电泳约80 min,切取目的条带所在的凝胶进行湿式电转膜,30 mA持续转膜约12 h,将转膜后的印迹膜用TBST缓冲液洗膜10 min \times 2次,10%牛血清球蛋白封闭2 h,一抗(1:500,PA1-823A)4℃孵育过夜,TBST缓冲液洗膜10 min \times 2次,二抗(1:5000,SH253595)室温孵育2 h,TBST缓冲液洗膜10 min \times 2次,DAB法显色、成像,Launch visionworksLS分析软件分析测定PPAR- δ 与 β -actin的灰度值,取PPAR- δ / β -actin比值为蛋白水平进行统计学分析。

1.9 统计学方法

采用SPSS18.0软件进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准误(mean \pm SEM)表示,组间比较采用两独立样本的t检验,结果取 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

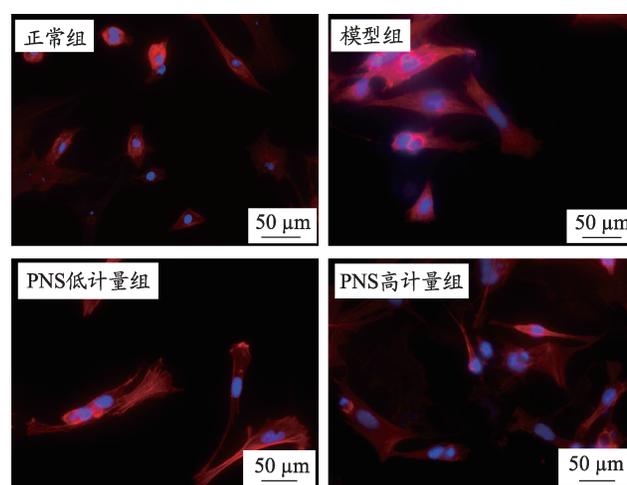
2 结果

2.1 PNS对ISO诱导的原代心肌细胞肥大具有显著直接抑制效应

罗丹明-鬼笔环肽可以特异性的识别心肌细胞内的肌动蛋白微丝,对心肌细胞进行染色在荧光显微镜下可呈现红色,以示意心肌细胞轮廓;心肌细胞核因DAPI染色可呈现为蓝色,代表心肌细胞数量。如图1所示,400倍镜下,正常组心肌细胞体积较小,细胞呈现圆形或小梭形;模型组心肌细胞体积增大,最短径

表2 用于miRNA表达分析的引物

miRNAs	引物序列(5'-3')
mmu-miR-199a	CCCAGTGTTCAGACTACCTGTTC
5 s	GATCTCGTCTGATCTCGGAAGC

图1 心肌细胞罗丹明-鬼笔环肽染色($\times 400$)表3 心肌细胞横截面积(mean \pm SEM)

组别	例数	心肌细胞面积(μm^2)
正常组	5	925 \pm 51
模型组	5	3471 \pm 393*
PNS低剂量组	5	2419 \pm 198#
PNS高剂量组	5	1522 \pm 239#

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$ 。

增宽,长度增加,心肌细胞轮廓呈现为大梭形、长方形;与模型组比较,PNS低、高剂量组心肌细胞体积不同程度变小。

应用image J软件计算心肌细胞横截面积。如表3所示,与正常组比较,模型组心肌细胞横截面积显著增大($P < 0.05$);与模型组比较,PNS低、高剂量组心肌细胞横截面积显著减小($P < 0.05$)。

2.2 PNS显著下调心肌细胞肥大相关因子mRNA表达

如图2所示,Real-Time PCR分析结果显示:与正常组比较,模型组心肌细胞BNP mRNA表达水平显著

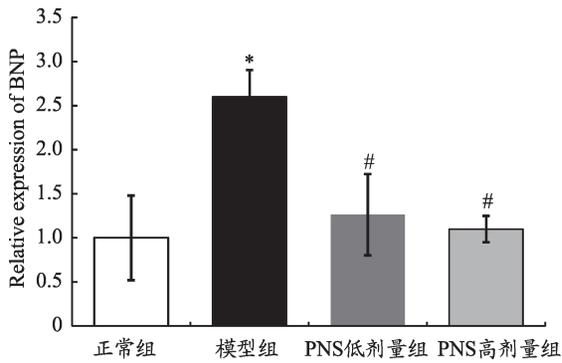


图2 心肌细胞BNP mRNA表达水平

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

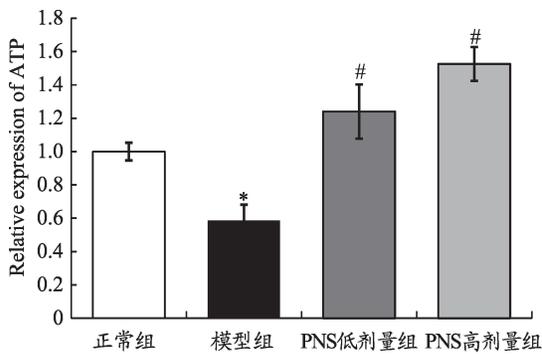


图3 心肌细胞ATP水平

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

上调($P < 0.05$);与模型组比较,PNS低、高剂量组心肌细胞BNP mRNA表达水平显著下调($P < 0.05$)。

2.3 PNS显著升高心肌细胞ATP水平

如图3所示,与正常组比较,模型组心肌细胞ATP水平显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,PNS低、高剂量组心肌细胞ATP水平显著升高($P < 0.05$)。

2.4 PNS显著上调心肌细胞脂肪酸 β 氧化相关因子

mRNA表达

如图4所示,Real-Time PCR分析结果显示:与正常组比较,模型组心肌细胞PPAR- δ 、MCAD、LCAD mRNA表达水平显著下调($P < 0.05$);与模型组比较,PNS低剂量组心肌细胞MCAD、LCAD mRNA表达水平显著上调,PNS高剂量组心肌细胞PPAR- δ 、MCAD、LCAD mRNA表达水平显著上调($P < 0.05$)。

2.5 PNS显著上调心肌细胞PPAR- δ 蛋白水平

如图5所示,Western blotting分析结果显示:与正常组比较,模型组心肌细胞PPAR- δ 蛋白水平显著下调($P < 0.05$);与模型组比较,PNS低、高剂量组心肌细胞PPAR- δ 蛋白水平显著上调($P < 0.05$)。

2.6 PNS显著下调心肌细胞miRNA-199a表达

如图6所示,Real-Time PCR分析结果显示:与正常组比较,模型组心肌细胞miRNA-199a表达水平显著上调($P < 0.05$);与模型组比较,PNS低、高剂量组心肌细胞miRNA-199a表达水平显著下调($P < 0.05$)。

3 讨论

祖国医学中并无与心肌细胞肥大直接对应的中医病名,但根据其病因病机和临床表现可将其归属于中医的心悸、怔忡、胸痹等范畴,其病机多样,瘀血阻滞是发病的重要环节之一。基于病因病机及临床特点,后世医家在总结前人经验基础上,对这类疾病往往采用不同的治疗方式,其中“活血化瘀”是常用的治法之一。无论是古方还是现代临床用药,三七都是活血化瘀治法中重要的组成部分,PNS是三七中最主要也是研究最多的活性成分之一^[8]。

体内心肌细胞发生肥大的过程中,一方面心脏在感受压力和容量负荷增加等不良刺激后会直接诱导

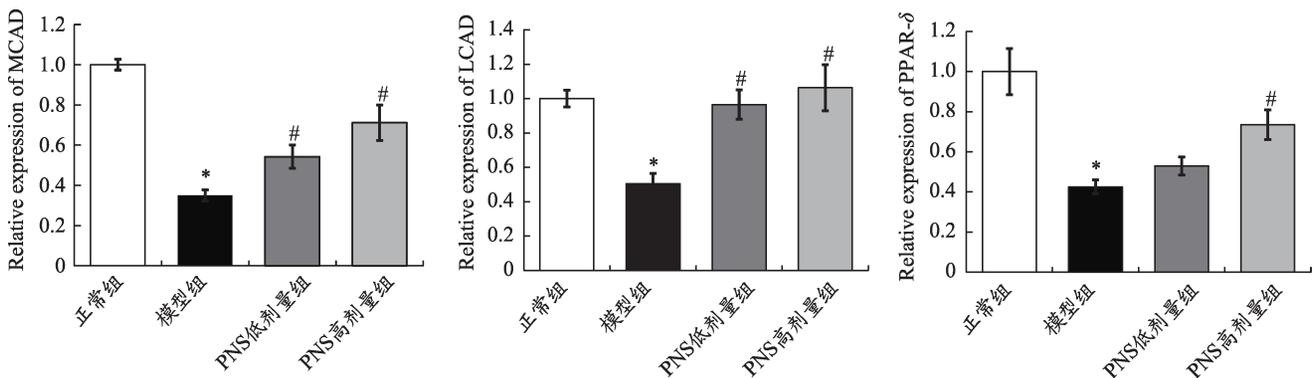


图4 心肌细胞MCAD、LCAD、PPAR- δ mRNA表达水平

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

心肌细胞发生肥大;另一方面心脏感受不良刺激后处于氧化应激状态,激活 ROS 系统,促使炎症细胞释放大炎症因子作用于心肌细胞肥大相关受体,导致炎症周围心肌细胞发生肥大,炎症因子也可以促进成纤维细胞增殖,使心肌发生纤维化,进而激活心肌细胞肥大相关受体,加快心肌细胞肥大进程^[9,10]。在前期实验研究中观察到,PNS 能够显著降低心肌损伤小鼠的心肌细胞横截面积,提示 PNS 可能具有抑制心肌细胞肥大的效应。心肌组织主要由心肌细胞和成纤维细胞组成,并且病理状态下心肌内富含各种炎症细胞,基于心肌细胞肥大发生的分子学机制,单纯的小鼠体内实验并不能系统准确的阐述 PNS 是否具有直接抑制心肌细胞肥大的效应。对此,本实验基于 PNS 在小鼠体内抑制心肌细胞肥大有效的前提下,对原代心肌细胞进行分离,将心肌组织中绝大多数的成纤维细胞、炎症细胞进行消化剔除,最大比例的保留原代心肌细胞后,在成功复制原代心肌细胞肥大模型基础上,继续探讨 PNS 是否具有直接抑制心肌细胞肥大的效应。实验结果显示,给予不同剂量的 PNS 后,ISO 诱导的心肌细胞横截面积显著减小,心肌细胞肥大相关因子 BNP 的 mRNA 表达水平显著下调。提示 PNS 具有显著直接抑制心肌细胞肥大的效应。

生理状态下,心肌细胞活动所需要的能量 60%–90% 来自脂肪酸 β 氧化,10%–40% 来自葡萄糖有氧氧化,少量来自酮体、氨基酸分解^[11]。病理状态下,心肌细胞内能量底物由脂肪酸向葡萄糖转换,脂肪酸 β 氧化减少,糖酵解增加^[12]。糖酵解虽然能够在短时间内迅速提供能量,暂时满足心肌细胞对能量的需求,但是这种产能方式产能效率低下。由于糖酵解过程中会产生大量乳酸,使细胞内环境发生改变,ATP 此时大多用于维持内环境中 Na^+ 、 Ca^{2+} 等离子的转运,用于心肌细胞收缩的供能减少,导致心脏效率下降,发生心肌细胞肥大、心肌肥厚^[2]。ATP 又称三磷酸腺苷,是机体的直接供能物质,ATP 发生水解时,形成 ADP 并释放一个磷酸根,同时释放能量。脂肪酸、葡萄糖、蛋白质给机体供能,都要通过代谢转化成为 ATP 实现^[13]。因此 ATP 可以直接反映心肌细胞最终的能量生成。有研究报道^[14],心肌细胞肥大发生时伴有 ATP 生成减少,提示心肌细胞肥大可能与能量代谢异常存在密切关系。本实验在 PNS 具有显著直接抑制心肌细胞肥大效应的基础上进一步对心肌细胞能量代谢进行探索。实验通过对原代心肌细胞中 ATP 含量进行测定,以此

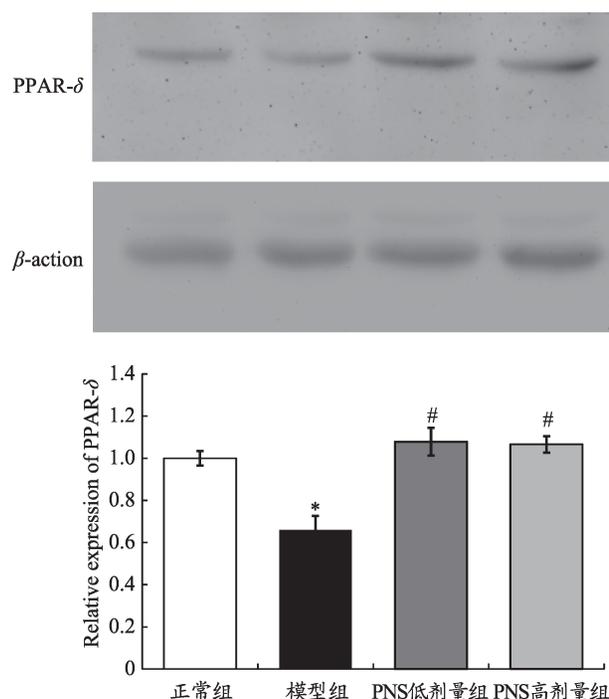


图5 心肌细胞 PPAR- δ 蛋白水平

注:1为正常组;2为模型组;3为 PNS 低剂量组;4为 PNS 高剂量组;与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

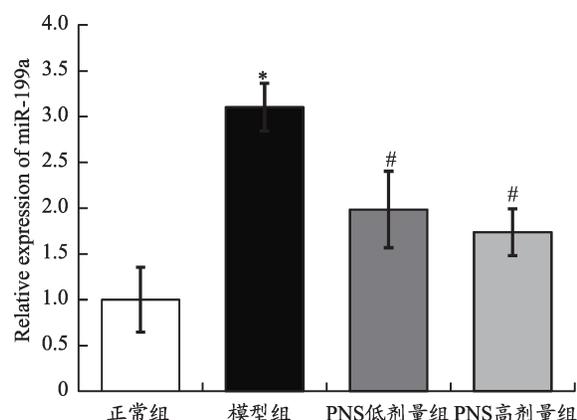


图6 心肌细胞 miRNA-199a 表达水平

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

反映心肌细胞能量代谢情况。实验结果显示,ISO 诱导的心肌细胞在肥大过程中 ATP 水平显著降低;给予不同剂量的 PNS 后,ATP 水平显著升高。提示 PNS 可能通过改善心肌细胞能量代谢,发挥抑制心肌细胞肥大的效应。

正常状态下,甘油三酯可以在胞质内分解为甘油和脂肪酸。中链和长链脂肪酸需要转化为脂酰 COA,在肉碱脂酰转移酶 I 催化下与肉碱结合形成脂酰肉碱才能转运进入线粒体内,进行脂肪酸 β 氧化,生成大量

ATP^[15]。心脏病理状态下,心肌细胞及线粒体内的酶活性和代谢发生显著变化,影响脂酰COA由胞质向线粒体内转运速率,使参与脂肪酸 β 氧化的底物水平下降,导致ATP生成减少,产能降低。LCAD和MCAD是肉碱脂酰转移酶I重要组成部分,二者分别协助长链脂肪酸和中链脂肪酸进入线粒体,在脂肪酸 β 氧化过程中发挥着重要作用^[16]。有研究报道心肌细胞肥大过程中,LCAD和MCAD活性降低,造成线粒体外膜上的肉碱脂酰转移酶I表达下降,影响脂酰COA与肉碱结合形成脂酰肉碱,使脂酰COA由胞质向线粒体内转运速率降低,线粒体摄取脂酰COA功能出现障碍^[17]。实验采用Real-Time PCR分析心肌细胞中LCAD、MCAD的mRNA表达。结果显示,ISO诱导心肌细胞肥大过程中,心肌细胞中LCAD、MCAD的mRNA表达水平显著下调;给予不同剂量PNS后心肌细胞中LCAD、MCAD的mRNA表达水平显著上调。提示PNS可能通过上调LCAD、MCAD的表达,促进脂肪酸代谢,增加心肌细胞能量生成。

PPAR- δ 是心肌细胞内重要的转录调节因子之一,可以激活与脂肪酸摄取、氧化相关的多种基因的表达,与心肌细胞脂肪酸代谢密切相关^[15]。有研究报道在心肌细胞脂肪酸代谢过程中,PPAR- δ 可能通过调控其下游靶基因LCAD和MCAD的活性,影响脂肪酸 β 氧化^[18]。实验采用Real-Time PCR分析心肌细胞中PPAR- δ 的mRNA表达。结果显示,ISO诱导心肌细胞肥大过程中,心肌细胞中PPAR- δ 的mRNA表达水平显著下调;给予不同剂量PNS后,心肌细胞中PPAR- δ 的mRNA表达水平出现不同程度上调,其中

以PNS高剂量组为显著上调。由于PPAR- δ 在脂肪酸代谢过程中,可能与微小RNA(microRNA,miRNA)存在密切联系,实验采用Western Blotting进一步分析PPAR- δ 蛋白水平。结果显示,ISO诱导心肌细胞肥大过程中,心肌细胞PPAR- δ 蛋白水平显著下调;给予不同剂量PNS后,心肌细胞PPAR- δ 蛋白水平显著上调。提示PNS可能通过上调PPAR- δ 促进LCAD、MCAD的表达。

MiRNA属于非编码微小RNA,作用于靶基因mRNA分子3'端非编码区域,通过负性调控或直接降解mRNA,参与蛋白合成和表达,影响生物活动的进程^[19]。研究报道心脏超负荷和缺氧状态下可能存在miRNA-199a表达水平的上调,进而抑制PPAR- δ 活化,限制细胞内脂肪酸 β 氧化速率,影响能量代谢,诱导心肌细胞肥大^[20]。实验结果显示,ISO诱导心肌细胞肥大过程中,心肌细胞miRNA-199a表达水平显著上调;给予不同剂量PNS后,miRNA-199a表达水平显著下调。提示PNS下调心肌细胞miRNA-199a的表达,上调其靶基因PPAR- δ 的表达,可能是PNS改善心肌能量代谢,增强脂肪酸 β 氧化的作用机制之一。

综上所述PNS具有显著直接抑制心肌细胞肥大的效应;PNS干预MiR-199a/PPAR- δ 调控、改善心肌能量代谢可能是其抑制心肌细胞肥大的作用机制之一。PNS改善能量代谢抑制心肌细胞肥大过程中是否涉及葡萄糖有氧氧化、糖酵解等其他能量代谢途径尚需要进一步探索研究。这将为改善心肌肥厚、防治心衰提供新的视点和思路。

参考文献

- Hu S, Gao R, Liu L S, et al. Summary of the 2018 Report on Cardiovascular Diseases in China. *Chinese Circulation Journal*, 2019, 34(3): 209-220.
- Tomi T, Pasi T. The role of cardiac energy metabolism in cardiac hypertrophy and failure. *Experimental Cell Research*, 2017, 360(1): 12-18.
- 杨娟,袁一征,尉广飞,等.三七植物化学成分及药理作用研究进展. *世界科学技术-中医药现代化*, 2017, 19(10): 1641-1647.
- 杨琴波,崔金刚,王培伟,等.三七总皂苷防治异丙肾上腺素诱导的心肌损伤实验研究. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2017, 15(20): 2534-2539.
- 谢辉,陈俊.三七总皂苷对心肌细胞肥大及凋亡的影响. *山西医药杂志*, 2010, 39: 1059-1060.
- 陈少贤,肖定璋,杨轶,等.三七总皂苷抗心肌细胞肥大与成纤维细胞生长因子诱导早期反应蛋白14的关系. *岭南心血管病杂志*, 2015: 21(4): 544-548.
- Tuomainen T, Tavi P. The role of cardiac energy metabolism in cardiac hypertrophy and failure. *Experimental Cell Research*, 2017: S0014482717301787.
- 宁冰冰,陈瑜,张腾.三七及其主要皂苷组分在心血管疾病中的作用研究进展. *中国中医药信息杂志*, 2017, 24(10): 126-129.
- Lin C, Guangpu F, Fang W, et al. Protective Role for LPA3 in Cardiac Hypertrophy Induced by Myocardial Infarction but not by Isoproterenol. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8: 356.
- Testa M, Yeh M, Lee P, et al. Circulating levels of cytokines and their

- endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *Am Coll Cardiol*, 1996, 28: 964–971.
- 11 Stanley WC, Chandler MP. Energy metabolism in the normal and failing heart: potential for therapeutic interventions. *Heart Fail Rev*, 2002, 7(2): 115–130.
 - 12 Ingwall J S. On the control of metabolic remodeling in mitochondria of the failing heart. *Circ Heart Fail*, 2009, 2: 275–277.
 - 13 Osterholt M, Nguyen TD, Schwarzer M, *et al.* Alterations in mitochondrial function in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart Failure Reviews*, 2013, 18(5): 645–656.
 - 14 Lopaschuk G D, Jaswal J S. Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte development during, differentiation, and maturation postnatal. *Cardiovasc Pharmacol*, 2010, 56: 130–140.
 - 15 Lopaschuk G D, Belke D D, Gamble J, *et al.* Schonekess, Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1213: 263–276.
 - 16 Sack M N, Rader T A, Park S, *et al.* Fatty acid oxidation enzyme gene expression is down-regulated in the failing heart. *Circulation*, 1996, 94(11): 2837–2842.
 - 17 Fillmore N, Mori J, Lopaschuk G. Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy. *Br. J. Pharmacol*, 2014(171): 2080–2090.
 - 28 Margherita B, Matteo A, Amirhossein S, *et al.* PPAR Agonists and Metabolic Syndrome: An Established Role?. *Molecular Sciences*, 2018, 19: 1197.
 - 19 Mendell J T, Olson E N. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*, 2012, 148(6): 1172–1187.
 - 20 Hamid A, Stefanos L, Ellen D A, *et al.* The hypoxia-inducible microRNA cluster miR-199a~214 targets myocardial PPAR- δ and impairs mitochondrial fatty acid oxidation. *Cell Metabolism*, 2013, 18: 341–354.

Panax Notoginsenosides Regulates Energy Metabolism and Attenuates Cardiomyocyte Hypertrophy

Luo Kai², Zhang Teng^{1,2}, Chen Yu^{1,2}

(1. Yueyang Hospital/Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200437;

2. Clinical Research Institute of Integrative Medicine/Shanghai Academy of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200437)

Abstract: Objective: The current study aimed to illustrate the effect of Panax notoginsenosides (PNS) on cardiac hypertrophy. Meanwhile, the implication of energy metabolism in PNS-mediated anti-hypertrophic effects was investigated. Methods Primary cardiomyocytes were isolated from neonatal rats and subject to Isoprenaline (ISO) incubation to induce cardiac hypertrophy. Isolated cardiomyocytes were randomly divided into the experimental groups including normal control group, ISO-challenged group, ISO-challenged and low-dose PNS treatment group (PNSL) and ISO-challenged and PNS high-dose treatment group (PNSH). The PNS was administered at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The normal group and the ISO-challenged group were given saline solution in the same volume. Thirty minutes after the incubation, ISO group and the PNS-treated groups were given ISO at 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$. The normal control group was given the same amount of saline solution. After 72 h incubation, the cross-sectional area (CSA) of cardiomyocytes, ATP level, the mRNA expression of brain natriuretic peptide (BNP), peroxisome proliferators-activated receptors- δ (PPAR- δ), long chain acyl-CoA dehydrogenase (LCAD) and medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD), the protein level of PPAR- δ protein and the expression level of miRNA-199a were examined. Results Compared to that from the normal control group, the CSA of cardiomyocytes was significantly increased in the ISO-challenged group. Meanwhile, the level of ATP was significantly decreased in the ISO-challenged group. The expression level of miRNA-199a and the mRNA expression of BNP were significantly up-regulated in ISO-challenged group. The mRNA expression level of PPAR- δ , LCAD and MCAD was significantly down-regulated in ISO-challenged group. The protein level of PPAR- δ was significantly decreased in ISO-challenged group. Compared to that from the ISO-challenged group, the CSA of cardiomyocytes in PNS group was significantly reduced. Moreover, the level of ATP

was significantly increased in PNS group. The expression levels of miRNA-199a and BNP were significantly down-regulated in PNS group. The mRNA expression levels of LCAD and MCAD were significantly up-regulated in PNS group. The protein level of PPAR- δ was significantly increased in PNS group. Conclusion PNS directly attenuates ISO-induced cardiomyocyte hypertrophy in part through increasing ATP level in the cardiomyocytes. In addition, targeted regulation of MiR-199a/PPAR- δ is involved in the anti-hypertrophic effect of PNS in the cardiomyocytes.

Keywords: Panax notoginsenosides, Isoprenaline, Cardiomyocyte hypertrophy, Energy metabolism

(责任编辑: 闫 群, 责任译审: 钱灵姝)