

当归多糖促进大鼠心肌细胞系 H9c2 增殖

杨萍, 代天, 张苏川*

(江汉大学附属医院(武汉市第六医院) 心血管内科, 湖北 武汉 430015)

摘要:目的 研究当归多糖(APS)对大鼠心肌细胞系 H9c2 增殖和凋亡的影响。方法 将大鼠心肌细胞系 H9c2 分为对照组(control组)、阿霉素(ADR)诱导 H9c2 细胞复制扩张性心肌病心肌细胞组(ADR组)、APS 干预(APS组)、转染 anti-miR-NC(APS+anti-miR-NC组)及转染 anti-miR-4701-3p(APS+anti-miR-4701-3p组)。采用流式细胞计量术检测细胞凋亡,Western blot 检测 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、细胞核相关抗原 Ki-67(Ki-67)、增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白表达,酶联免疫(ELISA)法检测 B 型脑钠肽(BNP)水平,细胞计数试剂盒 8(CCK-8)法检测细胞的增殖,实时定量 PCR(RT-qPCR)检测微小 RNA-4701-3p(miR-4701-3p)表达。结果 阿霉素明显提高 H9c2 细胞的 BNP 含量、细胞凋亡率、Bax 蛋白水平,显著降低 Bcl-2 蛋白表达量($P<0.05$)。当归多糖明显增加阿霉素诱导后 H9c2 细胞的细胞活力、Ki-67、PCNA、Bcl-2 蛋白表达量和 miR-4701-3p 表达量,显著减少细胞的凋亡率、Bax 蛋白表达量($P<0.05$)。敲减 miR-4701-3p 明显降低当归多糖作用的扩张性心肌病 H9c2 细胞的细胞活力、Ki-67、PCNA、Bcl-2 蛋白水平,而显著提高其凋亡率、Bax 蛋白表达量($P<0.05$)。结论 当归多糖通过上调 miR-4701-3p 的表达,促进阿霉素诱导的扩张性心肌病大鼠心肌细胞系 H9c2 增殖。

关键词: 阿霉素;细胞系 H9c2;miR-4701-3p;B 型脑钠肽

中图分类号:R542.2 文献标志码:A

Angelica polysaccharide promotes the proliferation of rat cardiomyocyte line H9c2

YANG Ping, DAI Tian, ZHANG Su-chuan*

(Department of Cardiovascular Medicine, the Affiliated Hospital of Jiangnan University (Wuhan Sixth Hospital), Wuhan 430015, China)

Abstract: Objective To study the effect of angelica polysaccharide on proliferation and apoptosis of rat cardiomyocyte line H9c2. **Methods** Rat cardiomyocyte H9c2 was divided into a control group (Control group), doxorubicin (ADR) induced H9c2 cell replication dilated cardiomyopathy cardiomyocyte group (ADR group), APS intervention (APS group), transfection anti-miR-NC (APS+anti-miR-NC group) and transfected anti-miR-4701-3p (APS+anti-miR-4701-3p group). Flow cytometry was applied to determine apoptosis, Western blot was employed to test B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 related X protein (Bax), nuclear related antigen Ki-67 (Ki-67) and proliferation cell nuclear antigen (PCNA) protein expression, enzyme-linked immunoassay (ELISA) method was used to detect B-type brain natriuretic peptide (BNP) level. Cell proliferation was detected by commercially available kit 8 (CCK-8), and real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to analyze the microRNA-4701-3p (miR-4701-3p) expression. **Results** Adriamycin significantly increased BNP content, apoptosis rate, and Bax protein level in H9c2 cells, and greatly reduced Bcl-2 protein expression ($P<0.05$). Angelica polysaccharide obviously increased

H9c2 cell viability, Ki-67, PCNA, Bcl-2 protein expression and miR-4701-3p expression after doxorubicin induction, and remarkably reduced cell apoptosis and Bax protein expression ($P < 0.05$). Knockdown of miR-4701-3p significantly reduced the cell viability, Ki-67, PCNA, and Bcl-2 protein levels of dilated cardiomyopathy H9c2 cells treated with angelica polysaccharide, while significantly increased its apoptosis rate and Bax protein expression ($P < 0.05$). **Conclusions** Angelica polysaccharide up-regulates the expression of miR-4701-3p, promotes the proliferation of adriamycin-induced rat cardiomyocyte line H9c2.

Key words: adriamycin; cell line H9c2; miR-4701-3p; BNP

扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy)是一种严重的疾病,特征是心室扩张和心脏功能障碍。作为人类最常见的心肌病形式,扩张型心肌病约占所有心肌病的60%,也是心力衰竭和心脏移植的主要原因^[1-2]。现阶段,扩张型心肌病的临床治疗尚未获得令人满意的结果,并且患者的预后极差,其5年生存率低于50%^[3-4]。因此,有必要进一步开发新的治疗策略来改善扩张型心肌病。当归是一种常用的中药,具有造血、抗氧化、抗感染、免疫调节、抗细胞凋亡和抑制血小板聚集的药理活性^[5]。当归多糖(angelica polysaccharide, APS)是从当归根中提取的主要的水溶性成分,可以通过激活转录因子6(activating transcription factor-6, ATF6)减轻内质网应激诱导的大鼠心肌细胞系 H9c2 凋亡,从而保护心脏免受缺血性损伤^[5]。当归多糖还能以浓度依赖方式减少缺氧-复氧诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡,改善细胞的氧化应激损伤^[6]。但是,目前尚无有关当归多糖对扩张型心肌病影响及机制的报告。微小 RNA(microRNA, miRNA)-4701-3p 是重要的 miRNA 之一,其调节功能已在各种癌中被报道^[7]。既往研究表明,miR-4701-3p 在扩张性心脏病患者中相较于正常对照高表达^[8]。但是,miR-4701-3p 是否参与当归多糖对扩张性心脏病大鼠心肌细胞的调节仍不清楚。因此,本研究以大鼠心肌细胞 H9c2 为对象,利用阿霉素(adriamycin, ADR)诱导心肌细胞损伤,模拟扩张型心肌病,评价当归多糖在细胞增殖和凋亡中的功能及潜在分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系与试剂

鼠源 H9c2 细胞系(中科院上海细胞库),当归多糖 APS(Solarbio 公司);ADR(辉瑞制药有限公司);Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)培

养基(Gibco 公司);anti-miR-4701-3p 及阴性对照 anti-miR-NC(广州锐博公司);B 型脑钠肽(B-type natriuretic peptide, BNP)酶联免疫(ELISA)试剂盒(北京华英生物技术研究所);Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(BestBio 公司);抗 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、抗 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、抗细胞核相关抗原 Ki-67(nuclear associated antigen Ki67, Ki-67)、抗增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)抗体(Abcam 公司);实时定量 PCR(quantitative real-time PCR, RT-qPCR)相关试剂盒(TaKaRa 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、分组与处理:用含 10%胎牛血清和 1%青链霉素双抗的 DMEM 培养基,在饱和湿度、37 °C 和 5% CO₂ 的细胞培养箱中常规培养 H9c2 细胞。将 H9c2 细胞分为对照组(control 组)、ADR 诱导 H9c2 细胞复制扩张性心脏病心肌细胞组(ADR 组)。当归多糖(angelica polysaccharide, APS)干预(APS 组)、转染 anti-miR-NC(APS+anti-miR-NC 组)及转染 anti-miR-4701-3p(APS + anti-miR-4701-3p 组)。转染时按照 Lipofectamine 2000 转染试剂的步骤,在细胞汇合至 60%的 H9c2 细胞中转染 anti-miR-4701-3p 和 anti-miR-NC,根据分组进行其他处理。其中,control 组为正常培养的细胞,ADR 组用 3 mg/L ADR 作用 H9c2 细胞 12 h,APS 组用 250 mg/L 当归多糖预处理细胞 24 h,之后进行 ADR 损伤,APS+anti-miR-NC 组或 APS+anti-miR-4701-3p 组细胞转染 anti-miR-NC 或 anti-miR-4701-3p,使用 250 mg/L 当归多糖处理 24 h 后,进行 ADR 损伤。

1.2.2 流式细胞计量术检测细胞凋亡:收集各组 H9c2 细胞,用冷磷酸盐缓冲液洗涤 2 次,在 400 μL 结合缓冲液中悬浮细胞,将细胞浓度调整为 1×10^6

个/mL。之后加入 5 μ L Annexin V-FITC, 轻轻混匀后于 4 $^{\circ}$ C 避光反应 15 min, 加入 10 μ L PI 并轻轻混匀, 于 4 $^{\circ}$ C 避光反应 5 min, 置流式细胞仪进行细胞凋亡分析。

1.2.3 Western blot 检测 Bcl-2、Bax、Ki-67、PCNA 表达: 向各组 H9c2 细胞中加入 RIPA 裂解液, 进行蛋白的提取。将提取的蛋白于沸水中变性 10 min, 并吸取 30 μ g 进行 12% 的 SDS-PAGE 电泳, 转膜。膜用 5% 脱脂奶粉封闭液封闭, 之后与抗 Bcl-2、抗 Bax、抗 Ki-67、抗 PCNA 和抗 β 肌动蛋白 (β -actin) 一抗, 在 4 $^{\circ}$ C 条件下孵育过夜。第 2 天, 将膜与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 一起孵育 2 h, 再通过 ELC 化学发光液显色、显影, 通过 Image J 软件分析 Bcl-2、Bax、Ki-67、PCNA 蛋白的水平。

1.2.4 ELISA 法检测 BNP 水平: 构建扩张性心脏病大鼠心肌细胞模型时, 收集 control 组和 ADR 组 H9c2 细胞上清液, 按照 ELISA 试剂盒的说明, 检测 BNP 水平。

1.2.5 CCK-8 法检测细胞增殖: 收集各组 H9c2 细胞, 以 1×10^4 个/孔的数量接种于 96 孔板, 向培养 48 h 后的细胞中加入 10 μ L CCK-8 溶液, 孵育 1 h, 于酶标仪测定细胞在 450 nm 波长处的吸光度 A 值,

来表示细胞活力。

1.2.6 RT-qPCR 检测 miR-4701-3p 表达: 收集各组 H9c2 细胞, 加入 Trizol 试剂提取细胞总 RNA。通过 PrimeScriptTM RT 试剂盒进行反转录, 得到 cDNA。通过 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒进行 PCR 反应。miR-4701-3p 的表达以 U6 为参照, 由 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算得出。miR-4701-3p 引物序列为 5'-CCACCACACCTACCCCTTGT-3' (F) 和 5'-ACACCACACCCATCACCCAT-3' (R), U6 引物序列为 5'-CTGGTAGGGTGCTCGCTTCGGCAG-3' (F) 和 5'-CAACTGGTGTCGTGGAGTCGGC-3' (R)。

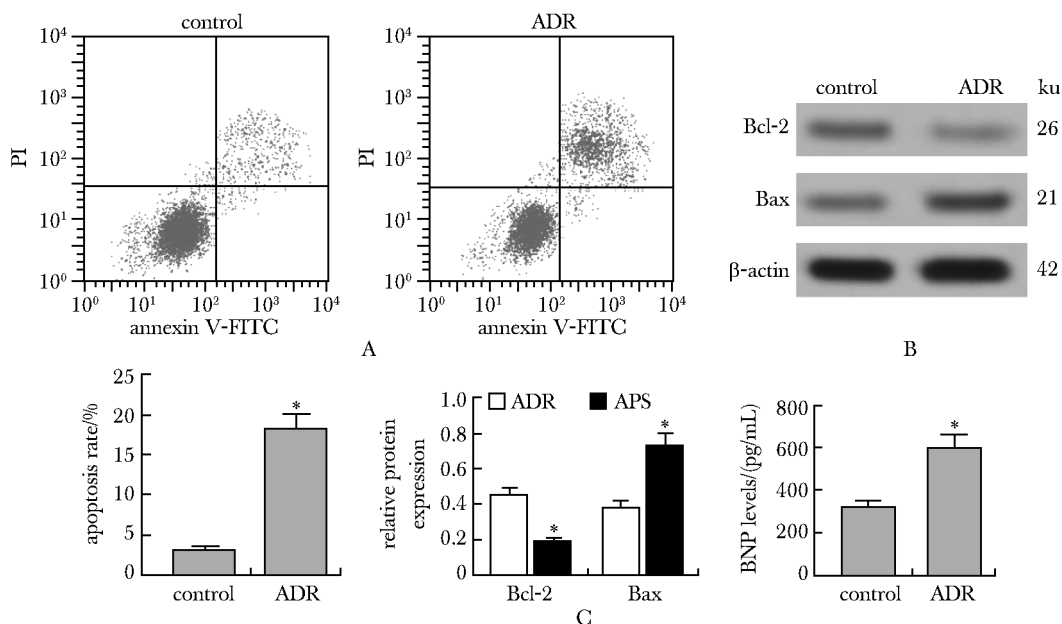
1.3 统计学分析

数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计和分析, 结果以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 SNK- q 检验。

2 结果

2.1 阿霉素诱导大鼠心肌细胞 H9c2 凋亡

与对照组比较, ADR 组 H9c2 细胞中 BNP 含量、细胞凋亡率和 Bax 蛋白水平显著升高, 而 Bcl-2 蛋白表达量明显降低 ($P < 0.05$) (图 1)。



A. flow cytometry to detect cell apoptosis; B. Western blot to detect the relative expression of Bcl-2 and Bax protein; * $P < 0.05$ compared with control group

图 1 阿霉素诱导大鼠心肌细胞 H9c2 凋亡

Fig 1 Adriamycin-induced apoptosis of rat cardiomyocyte H9c2

2.2 当归多糖对扩张性心肌病大鼠心肌细胞 H9c2 增殖的影响

与 ADR 组比较, APS 组 H9c2 细胞的 Ki-67、PCNA 蛋白表达量显著升高, 细胞活力明显增加 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.3 当归多糖对扩张性心肌病大鼠心肌细胞 H9c2 凋亡的影响

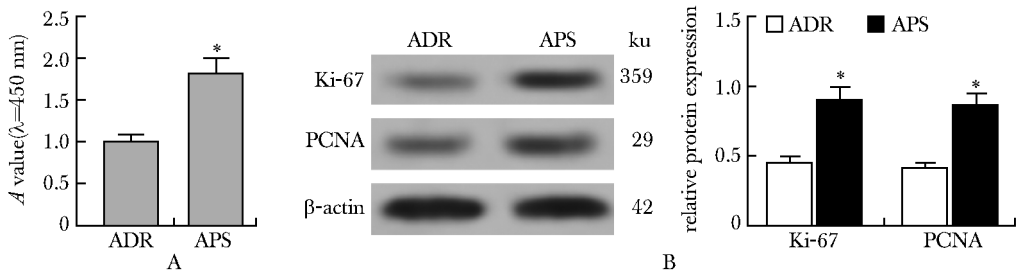
与 ADR 组比较, APS 组细胞的凋亡率显著降低, Bcl-2 蛋白表达量明显增加, Bax 蛋白表达量显著减少 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.4 当归多糖对 miR-4701-3p 在扩张性心肌病大鼠心肌细胞 H9c2 中表达的影响

APS 组 H9c2 细胞中 miR-4701-3p 表达量为 1.62 ± 0.16 , 显著高于 ADR 组的 1.00 ± 0.09 ($P < 0.05$)。

2.5 敲减 miR-4701-3p 对当归多糖作用的扩张性心肌病大鼠心肌细胞 H9c2 增殖的影响

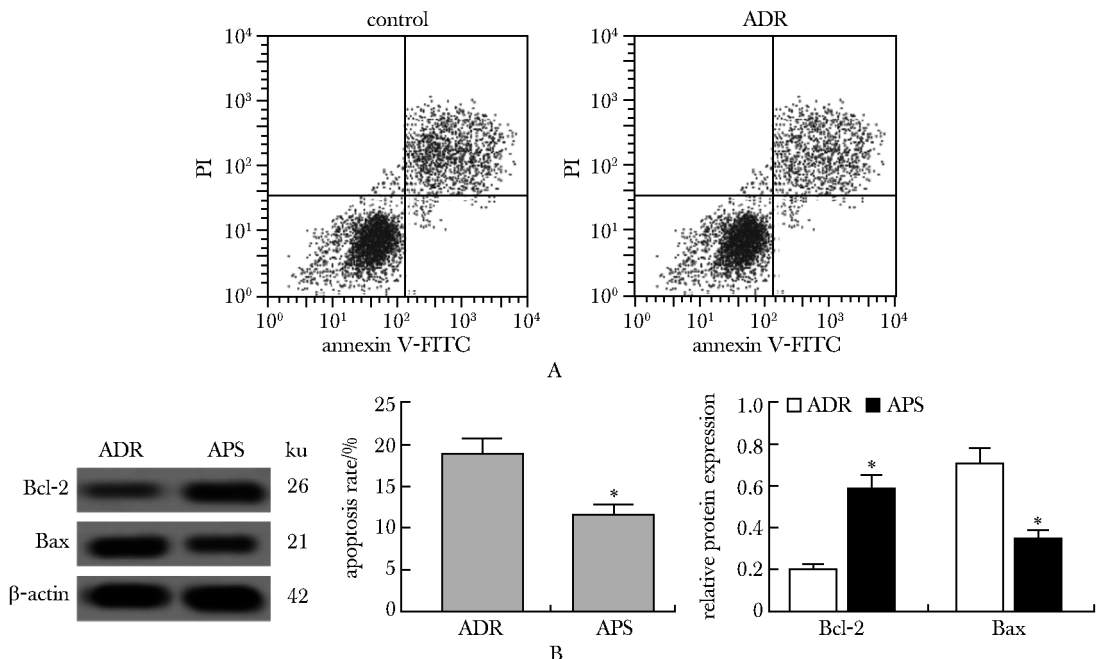
与 APS 组比较, APS+anti-miR-NC 组细胞 H9c2 的 Ki-67、PCNA 蛋白表达量、细胞活力、miR-4701-3p 表达量无明显变化; APS+anti-miR-4701-3p 组 H9c2



A. MTT detected cell viability; B. Western blot to detect the relative expression Ki-67 and PCNA protein; * $P < 0.05$ compared with ADR group

图 2 当归多糖对扩张性心肌病大鼠心肌细胞 H9c2 增殖的影响

Fig 2 Effect of angelica polysaccharide on the expression of H9c2 proliferation-related protein in dilated cardiomyopathy rats



A. flow cytometry to detect cell apoptosis; B. Western blot to detect the relative expression of Bcl-2 and Bax protein; * $P < 0.05$ compared with ADR group

图 3 当归多糖对扩张性心肌病大鼠心肌细胞 H9c2 凋亡的影响

Fig 3 Effect of angelica polysaccharide on cardiomyocyte H9c2 apoptosis in dilated cardiomyopathy rats

细胞内 Ki-67、PCNA 蛋白水平明显降低,细胞活力显著降低,miR-4701-3p 表达量明显减少($P<0.05$) (图 4)。

2.6 敲减 miR-4701-3p 对当归多糖作用的扩张性心肌病大鼠心肌细胞 H9c2 凋亡的影响

与 APS 组比较,APS+anti-miR-NC 组细胞 H9c2 的凋亡率、Bcl-2、Bax 蛋白水平无显著变化;APS+anti-miR-4701-3p 组细胞 H9c2 的凋亡率明显增加,Bcl-2 蛋白表达量显著减少,Bax 蛋白表达量明显升高($P<0.05$) (图 5)。

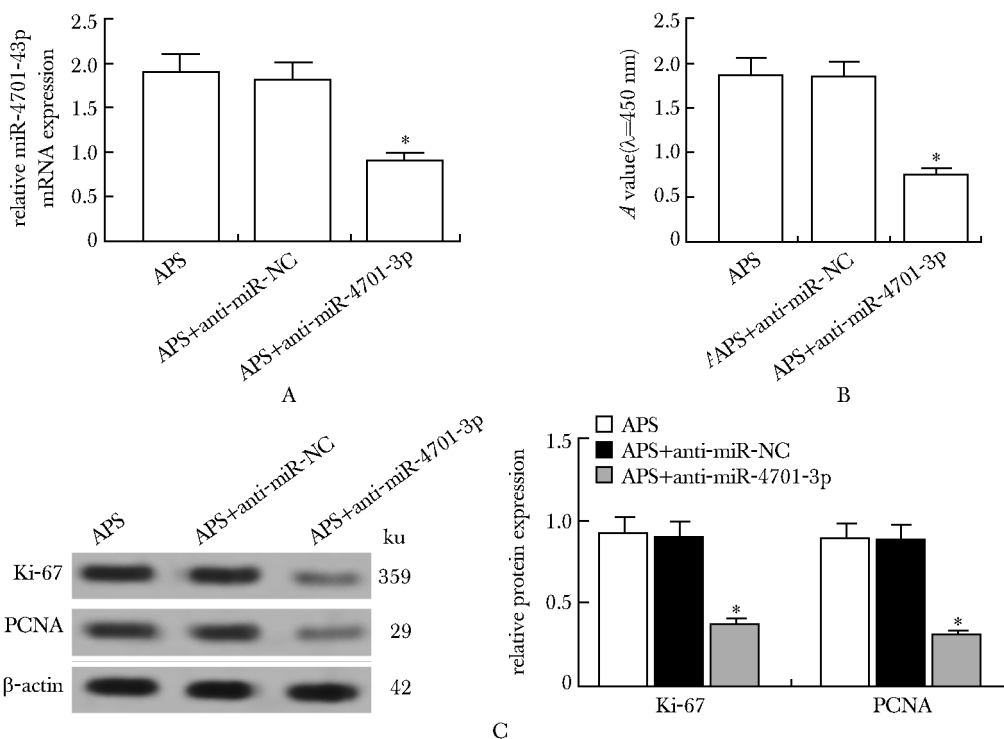
3 讨论

现阶段,扩张型心肌病的病因和发病机制仍不清楚。本研究采用阿霉素诱导大鼠心肌细胞 H9c2 损伤,以构建扩张型心肌病模型^[9],结果发现,阿霉素的使用导致心肌细胞 H9c2 的凋亡率和促凋亡蛋白 Bax 的蛋白表达量增加,抗凋亡蛋白 Bcl-2 的蛋白表达量减少,并且,细胞中 BNP 含量升高,与报

道^[10-11]相符,因此,后续实验在此模型的基础上探讨当归多糖的作用和机制。

当归多糖在心脏疾病方面表现出一定的预防和治疗作用,例如缺氧-复氧导致 H9c2 心肌细胞凋亡增加,而当归多糖可以起到减少其凋亡,产生保护缺氧-复氧损伤心肌细胞的效果^[12]。在缺氧条件下,当归多糖的预处理通过下调 miR-22 的表达,促进细胞增殖和抑制细胞凋亡,从而减轻 H9c2 细胞损伤^[13]。然而,当归多糖对阿霉素损伤大鼠心肌细胞 H9c2 的保护作用尚未得到充分报道。本实验中,当归多糖可以增加阿霉素诱导后 H9c2 细胞的细胞活力,并减少细胞的凋亡,提示当归多糖可能对阿霉素诱导的大鼠心肌细胞 H9c2 损伤发挥保护和治疗作用。

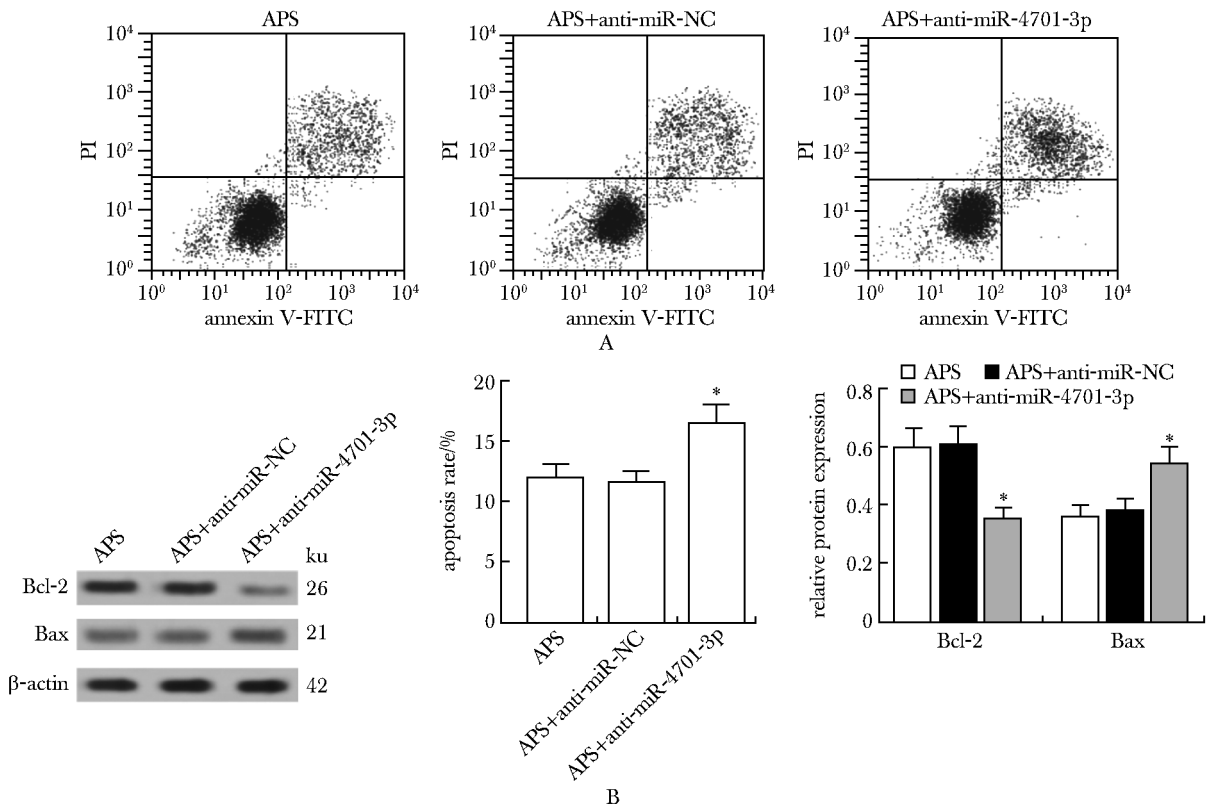
以前的研究证明了 miR-4701-3p 在扩张性心肌病患者中高表达^[8]。结直肠癌 HCT116 中的 miR-4701-3p 被异恶唑衍生物 SHU00238 显著下调,miR-4701-3p 可以逆转 SHU00238 对 HCT116 细



A. qRT-PCR detected the expression of miR-4701-3p; B. MTT detected cell viability; C. Western blot to detect the relative expression of Ki-67 and PCNA protein; * $P<0.05$ compared with APS group

图 4 敲减 miR-4701-3p 对当归多糖作用的扩张性心肌病大鼠心肌细胞 H9c2 增殖的影响

Fig 4 Effect of knockdown of miR-4701-3p on the expression of H9c2 proliferation-related protein in cardiomyocytes of dilated cardiomyopathy rats treated with angelica polysaccharides



A. flow cytometry to detect cell apoptosis; B. Western blot to detect the relative expression of Bcl-2 and Bax protein; *P<0.05 compared with APS group

图5 敲减 miR-4701-3p 对当归多糖作用的扩张性心脏病大鼠心肌细胞 H9c2 凋亡的影响

Fig 5 Effect of miR-4701-3p knockdown on cardiomyocyte H9c2 apoptosis in dilated cardiomyopathy rats treated with angelica polysaccharide

胞凋亡的影响^[14]。这项研究首次揭示了,当归多糖处理明显上调了阿霉素诱导的 H9c2 细胞中 miR-4701-3p 的表达水平。更重要的是,敲减 miR-4701-3p 明显减弱当归多糖作用的扩张性心脏病 H9c2 细胞的细胞活力、Ki-67、PCNA、Bcl-2 蛋白水平,而增强其凋亡率、Bax 蛋白表达量,可见当归多糖预处理对阿霉素诱导的 H9c2 细胞的保护作用被敲减 miR-4701-3p 所逆转。综合这些结果,说明当归多糖通过上调 miR-4701-3p,使细胞增殖增

加和细胞凋亡减少,来保护 H9c2 细胞免受阿霉素诱导的损伤。

总之,当归多糖对阿霉素诱导的扩张型心脏病 H9c2 细胞损伤模型具有保护作用。当归多糖的预处理可通过上调 miR-4701-3p,促进细胞增殖和抑制细胞凋亡来保护心肌细胞免受阿霉素诱导的损伤。这为了解当归多糖的心肌保护作用提供了证据,并为深入探讨使用当归多糖预防和治疗扩张型心脏病提供了理论依据。

参考文献:

[1] Athanasios B, Konstantinos R, Aris A. Current perspectives on the diagnosis and management of dilated cardiomyopathy, beyond heart failure: a cardiomyopathy clinic doctor's point of view[J]. Hellenic J Cardiol, 2018, 59: 254-261.

[2] Mitrut R, Stepan AE, Pirici D. Histopathological aspects of the myocardium in dilated cardiomyopathy. [J]. Curr Health Sci J, 2018, 44: 243-249.

- [3] Nakamori S, Dohi K, Ishida M, *et al.* Native T1 mapping and extracellular volume mapping for the assessment of diffuse myocardial fibrosis in dilated cardiomyopathy[J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2018, 11: 48-59.
- [4] Du G, Chen J, Wang Y, *et al.* Differential expression of STAT-3 in subtypes of oral lichen planus: a preliminary study[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2018, 125: 236-243.
- [5] Niu X, Zhang J, Ni J, *et al.* Network pharmacology-based identification of major component of *Angelica sinensis* and its action mechanism for the treatment of acute myocardial infarction [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38. doi: 10.1042/BSR20180519.
- [6] 霍礼超, 李梦丽, 乔成栋. 当归多糖对缺氧-复氧损害 H9c2 心肌细胞的保护作用[J]. *岭南心血管病杂志*, 2019, 25: 579-585.
- [7] 热斯拉特·艾力木. 维医异常黑胆质型消化系统肿瘤患者外周血共性 miRNA 标记物的研究[D]. 2015:22.
- [8] 曾志鹏. microRNA-451a 在扩张型心肌病患者免疫异常中的作用及机制研究[D]. 华中科技大学, 2017:2.
- [9] 朱文晖, 朱芳, 张白雪, 等. LY294002 对扩张型心肌病大鼠模型心肌结构及心功能的影响[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2018, 43: 35-40.
- [10] 郑博宇, 俸艳英, 阳志军. 缬沙坦对阿霉素所致心肌损伤保护作用的相关机制研究[J]. *广西医科大学学报*, 2019, 36: 533-537.
- [11] Xie D, Liao Y, Wu B, *et al.* Cardiac Nestin⁺ cells derived from early stage of dilated cardiomyopathy enhanced the survival of the doxorubicin-injured cardiac muscle HL-1 cells[J]. *Int Heart J*, 2018, 59: 180-189.
- [12] 霍礼超, 李梦丽, 乔成栋. 当归多糖对缺氧-复氧损害导致的 H9c2 心肌细胞能量代谢障碍的保护作用[J]. *河北医学*, 2019, 25: 568-572.
- [13] Hui P, Linlin Z. *Angelica sinensis*, polysaccharide protects rat cardiomyocytes H9c2 from hypoxia-induced injury by down-regulation of microRNA-22 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 225-231.
- [14] Wang HY, Ma YR, Lin YF, *et al.* SHU00238 promotes colorectal cancer cell apoptosis through miR-4701-3p and miR-4793-3p[J]. *Front Genet*, 2020, 10: 1320-1326.

本刊稿件格式要求(3)

3.1 参考文献:应为正式发表的论文或书籍,且应为亲自阅读过的主要文献。

3.1.1 引用期刊格式:

[文献序号]. 著者. 文献题名[J]. 刊名, 出版年, 卷号: 起页-止页.

-外国人名书写格式:姓在前/名在后、姓全称/名缩写;3位以内作者须写全,3位以上作者列前3位,后加“等”或“et al.”。

-外文刊名书写格式:按照 PubMed 格式规范缩写。

例:[1] Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, *et al.* Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B[J]. *N Engl J Med*, 1975, 292: 767-770.

[2] 杨汀, 王辰, 庞宝森, 等. 比较地塞米松和色甘酸钠对哮喘豚鼠气道重建的作用[J]. *基础医学与临床*, 2004, 24:633-636.

3.1.2 引用书籍格式:

[文献序号]. 析出文献著者. 析出文献题名[M]//专著著者(或编者). 专著书名. 版次(第1版不著录). 出版地: 出版者, 出版年: 析出文献起页-止页.

例:[1] 章静波. 癌细胞行为的分子基础[M]//柳惠图, 王永潮, 桑建利. 分子细胞生物学. 北京: 高等教育出版社, 2012: 501-505.

3.1.3 引用电子期刊:需注明 doi 号。

3.1.4 引用毕业论文:需注明“学校所在城市:学校名称,出版年:所引用起页-止页。”。