

田蓊昔抗H9c2心肌细胞缺血再灌注损伤的作用机制研究

杨洁¹, 郑瑞芳², 都研文², 李海宁³, 李少将¹, 刘砥威^{2*}, 邢建国^{2*}

(1. 新疆医科大学, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002;
3. 石河子大学, 新疆 石河子 832000)

摘要: 本研究利用泛caspase抑制剂Z-VAD-FMK联合缺氧/复氧(hypoxia-reoxygenation, H/R)损伤建立大鼠H9c2心肌细胞程序性坏死模型, 并考察田蓊昔抗心肌缺血再灌注损伤的作用机制。采用CCK-8 (cell counting kit-8)测定细胞活力; 采用试剂盒法检测细胞培养上清中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)和细胞内超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD); Hoechst 33342/PI染色检测细胞死亡方式; 采用DCFH-DA、BBcellProbe™M61和JC-1探针依次检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)、线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)开放和线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)改变; ELISA法检测细胞分泌肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)释放情况; 分子对接技术锁定田蓊昔作用的分子靶标; Western blot检测相关蛋白表达。结果表明, 与对照组比较, H/R损伤诱导的模型组细胞活力下降, 程序性坏死率升高, LDH水平升高, SOD活性降低, ROS释放显著增多, mPTP开放, MMP降低, TNF- α 、IL-1 β 以及IL-6水平升高, 而田蓊昔则可剂量依赖性地改善这些因素变化。分子对接结果显示, 田蓊昔可与钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II(calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII)结合。Western blot结果显示, 与对照组比较, 模型组细胞p-CaMKII和磷酸化混合系结构域样蛋白(phospho-mixed lineage kinase domain-like protein, p-MLKL)表达水平显著升高; 与模型组比较, 田蓊昔则使这些蛋白表达水平降低。上述结果表明, 田蓊昔能够保护H9c2心肌细胞, 可能通过抑制CaMKII苏氨酸Thr287位点磷酸化, 抑制mPTP开放, 保护线粒体功能以阻止程序性坏死进行, 对H/R损伤治疗新方法的研究具有潜在价值。

关键词: 田蓊昔; 心肌缺血再灌注损伤; 程序性坏死; 钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II; 线粒体膜通透性转换孔
中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)04-1070-09

The mechanism of tilianin against ischemia-reperfusion injury of H9c2 cells

YANG Jie¹, ZHENG Rui-fang², DU Yan-wen², LI Hai-ning³, LI Shao-jiang¹,
LIU Di-wei^{2*}, XING Jian-guo^{2*}

(1. Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830002, China; 3. Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract: Z-VAD-FMK was combined with hypoxia-reoxygenation (H/R) injury to establish a necroptosis model of H9c2 cells to mimic the pathological changes of myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI) *in vitro* and to study the effect and mechanism of tilianin against myocardial ischemia-reperfusion injury. A cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect cell viability, and commercial kits were used to detect lactate dehydrogenase (LDH) and superoxide dismutase (SOD) in the cell culture supernatant. Hoechst 33342/PI immunofluorescence

收稿日期: 2020-10-19; 修回日期: 2020-11-27.

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(青年基金)资助项目(2020D01B50); 新疆维吾尔自治区公益性科研院所基本科研业务经费资助项目(ky2019099).

*通讯作者 Tel: 13999178585, E-mail: xjguodd@163.com; 3498921775@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1636

staining was used to detect cell death. DCFH-DA, BCellProbe™M61, and JC-1 probes were used to detect reactive oxygen species (ROS), mitochondrial permeability transition pore (mPTP), and mitochondrial membrane potential (MMP), respectively. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the release of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β), and interleukin-6 (IL-6). The results show that the cell viability, SOD activity, and MMP of the model group induced by H/R injury decreased, as compared with control group, but the necroptosis rate, LDH level, and ROS release increased significantly. Furthermore, mPTP of the model group cells opened, and TNF- α , IL-1 β , and IL-6 levels were significantly higher. Molecular docking modeling showed that tilianin can bind to calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII), and Western blot results showed that compared with control group, the expression levels of p-CaMKII and phospho-mixed lineage kinase domain-like protein increased in the model group, and tilianin could decrease the expression level of these proteins. The above results indicate that tilianin can protect H9c2 cells by inhibiting the phosphorylation of CaMKII at threonine 287, protecting mitochondrial function, and inhibiting the opening of mPTP to prevent necroptosis. This study has value for research on new methods to treat H/R injury.

Key words: tilianin; myocardial ischemia-reperfusion injury; necroptosis; calcium/calmodulin-dependent protein kinase II; mitochondrial permeability transition pore

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 每年导致全世界数百万人死亡, 严重危害人类健康^[1]。近年来, 尽管人们已在减少梗塞面积和缺血后损伤以及改善预后方面取得明显进步, 但早期再灌注仍是挽救缺血器官的唯一方法。然而, 对患者至关重要的早期再灌注却会引发严重不可逆性器官损伤, 亦称为心肌缺血再灌注损伤 (myocardium ischemia-reperfusion injury, MIRI), 其可增加梗死面积, 加重心肌损伤, 进而导致心功能不全^[2-3]。因此, 如何通过有效途径改善缺血再灌注对心肌细胞的损伤, 已成为当今的热门话题^[4]。

大多数研究人员认为, 凋亡是响应 MIRI 的主要细胞死亡形式^[5,6]。然而, Zhou 等^[7,8]研究表明, 另一种有别于凋亡的细胞死亡方式——程序性坏死 (necroptosis) 是 MIRI 模型中细胞死亡主要方式。程序性坏死相关基因缺失可阻止约 50% 的细胞死亡^[9]。程序性坏死而非凋亡将决定 MIRI 对心脏的损伤程度, 并引发心脏重塑。钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII) 在心脏中含量很高, 且其活性过高与心肌死亡有关, 包括 MIRI^[10]。研究发现, 程序性坏死可通过磷酸化 CaMKII 的苏氨酸 287 位点, 导致线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 大量开放, 线粒体功能受损, 线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 降低, 从而进一步增强 CaMKII 的活性, 引起心肌细胞膨胀和破裂, 释放内容物, 并引发一系列炎症反应^[11,12]。已有研究表明, 亲环素 D (cyclophilin-D, CypD) 作为 mPTP 的一个关键调节因子, 当其被沉默后可明显减轻 CaMKII 参与的心肌细胞坏死, 证实了程序性坏死是经由 CaMKII 磷酸化并通过 mPTP 开放来执行的^[13,14]。CaMKII 介导的程序性坏

死有可能为心肌损伤相关疾病治疗提供新的靶点。

田蓊昔 (tilianin) 是新疆地产民族药香青兰 (*Dracocephalum moldavica* L.) 的主要活性成分, 属黄酮类化合物, 常用于心、脑血管疾病的治疗, 其中主要通过抵抗氧化损伤和炎症反应发挥显著的抗 MIRI 作用^[15-17]。Jiang 等^[18]研究结果表明, 田蓊昔可经由线粒体 ROS/CaMKII 特异性调控途径抑制心肌细胞死亡。但田蓊昔是否通过抑制 CaMKII Thr287 位点磷酸化导致的 mPTP 开放, 来保护遭受 MIRI 的心肌细胞免于程序性坏死还未被证实。因此, 本研究通过采用泛 caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 联合缺氧/复氧 (hypoxia-reoxygenation, H/R) 损伤, 建立 MIRI 心肌细胞程序性坏死模型, 并进而探究田蓊昔保护 H9c2 心肌细胞 MIRI 的分子机制。

材料与方法

药品与试剂 田蓊昔 (HPLC 纯度 98%) 由新疆维吾尔自治区药物研究所自制 (批号: 20170805), 具体制备方法见文献^[19]; DMEM 低糖培养基和 0.25% 胰酶-EDTA, HyClone 公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和无糖 DMEM, Gibco 公司; 厌氧袋, 日本三菱; Z-VAD-FMK, 美国 Selleck 公司; Hoechst33342 和碘化丙啶 (propidium iodide, PI), Sigma 公司; mPTP 开放检测试剂盒, 上海 BestBio 贝博生物; DCFH-DA 活性氧 ROS 荧光探针、线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 、IL-6 检测试剂盒、RIPA (强) 裂解液和苯甲基磺酰氟 (phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF), 北京索莱宝科技有限公司; 细胞增殖及细胞毒性检测

试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 和广谱磷酸酶抑制剂, 美国博士德生物; BCA 蛋白定量试剂盒, 美国 Thermo Fisher Pierce 公司; 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 细胞毒性检测试剂盒和 SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒, 碧云天生物技术有限公司; 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所; CaMKII、p-CaMKII (Thr287) 和混合系结构域样蛋白 (mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL) 抗体, Abcam 公司; p-MLKL 抗体, Cell Signaling Technology 公司; GAPDH 抗体、辣根酶标记的山羊抗小鼠 IgG 和辣根酶标记的山羊抗兔 IgG, 中国中杉金桥公司。

仪器 细胞培养箱和细胞成像工作站 Evos FLoid (美国 Thermo Fisher 公司); 多功能微孔板检测仪 (瑞士 TECAN SPARK 公司); 电泳仪和电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司); 多功能成像系统 (法国 VILBER 公司); 台式高速冷冻离心机 TGL-16k (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

细胞株及细胞培养 大鼠心肌细胞 (H9c2) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 培养于含 10% FBS 的 DMEM 低糖培养基中。当细胞生长至融合度达 80%~90% 时, 用 0.25% 胰酶-EDTA 溶液消化细胞, 并将其置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中进行传代培养。

H/R 损伤细胞模型建立及分组给药 H9c2 细胞随机分为对照组 (control 组)、Z-VAD-FMK^[20] 联合缺氧/复氧模型组 (model) 及田蓟昔给药组 (2.5、5 和 10 μg·mL⁻¹)。用 50 μmol·L⁻¹ Z-VAD-FMK 处理 24 h, 缺氧缺糖 6 h, 复氧复糖 3 h, 构建 H/R 损伤模型, 以此模拟 MIRI 中 H9c2 细胞程序性坏死的病理变化, 田蓟昔处理组在缺氧复氧前 12 h 进行给药。

细胞活力检测 用含 10% FBS 的 DMEM 低糖培养基将 H9c2 细胞调整为 1×10⁴ 个/孔, 接种于 96 孔板中, 细胞贴壁 24 h 后, 每组分别加入不同浓度田蓟昔 (终质量浓度为 0.625、1.25、2.5、5、10、20 和 40 μg·mL⁻¹), 作用 24 h 后, 每孔加入 10% CCK-8/DMEM 混合液 100 μL, 置于 37 °C 培养箱中孵育 2 h。实验同时设立无细胞空白组和有细胞无药对照组, 每组均设 6 个复孔。酶标仪在 450 nm 波长处测定各组吸光度值 (optical density, A), 并按如下公式计算细胞存活率 (cell viability, CV)。

$$CV(\%) = \frac{A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}}{A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}}$$

Hoechst 33342/PI 双染色法检测细胞死亡方式 使用 Hoechst 33342/PI 双染色法评估细胞程序性坏死情况。将 H9c2 心肌细胞接种在 6 孔板中, 每孔 1×10⁵ 个细胞, 培养 24 h, 50 μmol·L⁻¹ Z-VAD-FMK 预处理

24 h, 加入不同浓度田蓟昔 (终质量浓度为 2.5、5 和 10 μg·mL⁻¹) 作用 12 h 后, 缺氧缺糖 6 h, 复氧复糖 3 h。PBS 洗细胞 2 次, 并加入 Hoechst 33342 和 PI。然后, 将细胞置于 37 °C 恒温箱孵育 20~30 min, 荧光显微镜观察并拍照。显示红色和暗蓝色荧光的细胞被定义为程序性坏死阳性。Image J 软件计数程序性坏死阳性细胞。

LDH 和 SOD 检测 将 H9c2 细胞接种于 6 孔板, 随机分为对照组、模型组和田蓟昔给药组 (终质量浓度为 2.5、5 和 10 μg·mL⁻¹), 除对照组, 其余各组均加入 Z-VAD-FMK 24 h 后, 按照上述分组细胞给药造模, 分别收集细胞培养基上清。按照说明书检测细胞上清中 LDH 含量 (与吸光度成正相关) 及细胞 SOD 活力。

LDH 吸光度 = 样品吸光度 - 背景空白对照吸光度

SOD 活力 (U·mgprot⁻¹) =

$$\frac{\text{SOD抑制率}/50\% \times \text{反应体系稀释倍数}}{\text{待测样本蛋白浓度}}$$

ROS 检测 将 H9c2 细胞按 1×10⁴ 个/孔接种于 96 孔板, 按照上述分组细胞给药造模, 弃上清, 无血清培养基洗细胞 2 次, 每孔加入 100 μL 用无血清培养基稀释至 10 μmol·L⁻¹ DCFH-DA, 37 °C 培养箱中避光孵育 30 min。弃培养液, PBS 洗细胞 3 次以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。每孔加入 PBS 100 μL 后, 使用酶标仪在激发波长 488 nm 和发射波长 525 nm 条件下检测 ROS 探针荧光强度。

mPTP 开放测定 将 H9c2 细胞接种于 6 孔板, 同上述 5 组细胞给药造模, 弃各组上清液, 加入 PBS 洗涤 2 次, 胰酶消化后, 每孔加 0.5 mL 含血清培养液终止消化, 离心, HBSS 洗细胞 2 次, 弃上清。按试剂盒说明书配制 BBcellProbe M61 染色工作液, 每孔加入 5 μL, 并充分混匀, 加入淬灭剂 5 μL 混匀, 37 °C 避光孵育 15 min。1 000×g 离心 5 min, 弃上清, 用 500 μL HBSS 重悬细胞, 酶标仪在激发波长 488 nm 和发射波长 525 nm 处检测探针荧光强度。

MMP 检测 将 H9c2 细胞接种于 6 孔板, 同上述 5 组细胞给药造模后, 按试剂盒说明书配制 JC-1 (1×) 染色工作液, 每孔加入 1 mL 细胞培养液和 1 mL JC-1 (1×) 染色工作液, 混匀, 在 37 °C 细胞培养箱中孵育 20 min。JC-1 (1×) 染色缓冲液洗涤 2 次后, 加入细胞培养液, 荧光显微镜观察并拍照。

ELISA 检测细胞上清 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平 将 H9c2 细胞按每孔 1×10⁵ 个接种于 6 孔板中, 同上述 5 组细胞给药造模后, 收集细胞上清, 1 000×g 低温 (4 °C) 离心 10 min 后, 取上清备用。次日, 选用相应大鼠 ELISA 检测试剂盒分别检测上清中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平。

分子对接技术 使用Chem3D Pro 14.0软件对田蓊昔进行分子力场优化。从Protein Data Bank数据库中下载相应靶点的蛋白文件,使用Autodock Vina 1.1.2进行分子对接,以每个对接结果结合能最低的构象作为稳定构象。运行环境为Ubuntu 18.04 LTS。

蛋白免疫法 (Western blot) 检测相关蛋白表达 将对数生长期H9c2细胞接种于6孔板中,放置在37℃、5%的CO₂细胞培养箱中培养。次日,加入50 μmol·L⁻¹ Z-VAD-FMK预处理24 h,加入不同浓度田蓊昔(终质量浓度为2.5、5和10 μg·mL⁻¹)作用12 h后,缺氧缺糖6 h,复氧复糖3 h。弃细胞上清,预冷PBS洗涤2次,加入RIPA(强)裂解液(含1% PMSF和1% 蛋白磷酸酶抑制剂)冰上裂解30 min。12 000 r·min⁻¹低温离心10 min后,BCA试剂盒测定蛋白样品浓度,并按比例加入蛋白上样缓冲液,95℃金属浴煮5 min以使蛋白变性。经SDS-多聚丙烯酰胺凝胶电泳后,电转至PVDF膜上。5%脱脂奶粉封闭膜后分别加入一抗p-CaMKII、CaMKII、MLKL、p-MLKL和GAPDH,4℃冰箱孵育过夜。TBST洗膜3次,加入相应HRP标记的IgG二抗室温孵育1~2 h,用底物化学发光液试剂盒在化学发光成像系统中采图,得到各蛋白免疫印迹条带,并用EvolutionCapt软件分析条带灰度。

统计学分析 各项实验至少进行3次独立平行实验,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据分析和作图采用Graph-Pad Prism 8.0统计软件进行。多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结果

1 田蓊昔可改善H/R损伤的H9c2细胞活力

如图1A所示,0.625、1.25、2.5、5、10、20和40 μg·mL⁻¹

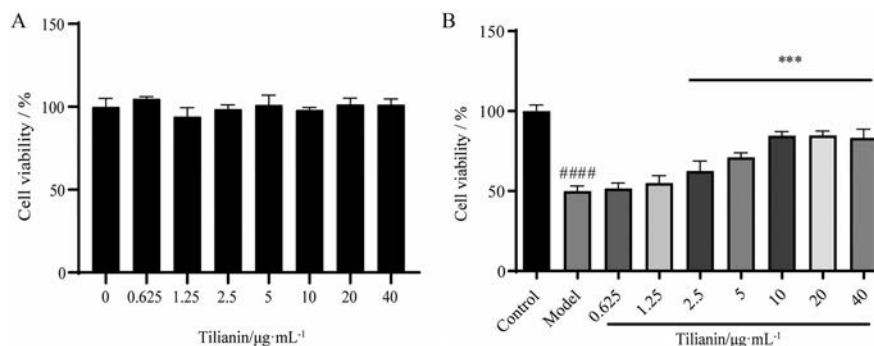


Figure 1 Protective effect of tilianin on Z-VAD-FMK-H/R H9c2 cells. A: H9c2 cells were treated with tilianin (0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, and 40 μg·mL⁻¹) for 24 h, respectively, cell viability was determined by CCK-8 assay; B: The effect of tilianin on the survival rate of H9c2 cells injured by Z-VAD-FMK-H/R. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. #### $P < 0.0001$ vs control group; *** $P < 0.001$ vs model group. H/R: Hypoxia-reoxygenation

田蓊昔作用于H9c2细胞24 h,对细胞存活率均无明显影响。为了确定田蓊昔对H/R损伤是否具有改善作用,本研究用Z-VAD-FMK作用于H9c2心肌细胞24 h,给相应浓度田蓊昔后,H/R损伤。结果发现(图1B),与对照组比,模型组细胞活力明显下降($P < 0.0001$);与模型组比,田蓊昔的质量浓度分别为2.5、5、10、20和40 μg·mL⁻¹时,细胞存活率明显升高($P < 0.001$)。上述结果说明,田蓊昔可改善H/R损伤,使H9c2细胞活力增强。由于田蓊昔浓度分别为20和40 μg·mL⁻¹时,细胞活力与10 μg·mL⁻¹组比没有统计学意义,因此,后续实验选用的田蓊昔质量浓度分别为2.5、5和10 μg·mL⁻¹。

2 田蓊昔呈剂量依赖性抑制H/R损伤诱导的H9c2细胞程序性坏死

为了检测田蓊昔对H/R损伤H9c2细胞程序性坏死率的影响,本实验采用Hoechst 33342/PI双染色法进行细胞染色。程序性坏死的细胞膜完整性在早期已被破坏,可被Hoechst 33342染成暗蓝色,而PI染料不能进入细胞膜完整的正常细胞和凋亡细胞中,因此坏死细胞可被PI染料染色成红色。如图2所示,与对照组比,不加Z-VAD-FMK的H/R组无明显坏死细胞,而加Z-VAD-FMK的H/R组坏死细胞数明显增多($P < 0.0001$),说明Z-VAD-FMK可诱导H/R损伤的细胞程序性坏死。与模型组(+Z-VAD-FMK)比,田蓊昔在2.5~10 μg·mL⁻¹范围内可剂量依赖性地减少H9c2细胞坏死率($P < 0.01$)。

3 田蓊昔对H/R损伤的H9c2细胞LDH和SOD水平的影响

采用LDH和SOD试剂盒方法评估细胞损伤程度。如图3A所示,与对照组比,模型组细胞中LDH含量显著升高($P < 0.0001$);而与模型组比,田蓊昔低、中、高剂量给药组则显著降低LDH水平($P < 0.01$),说

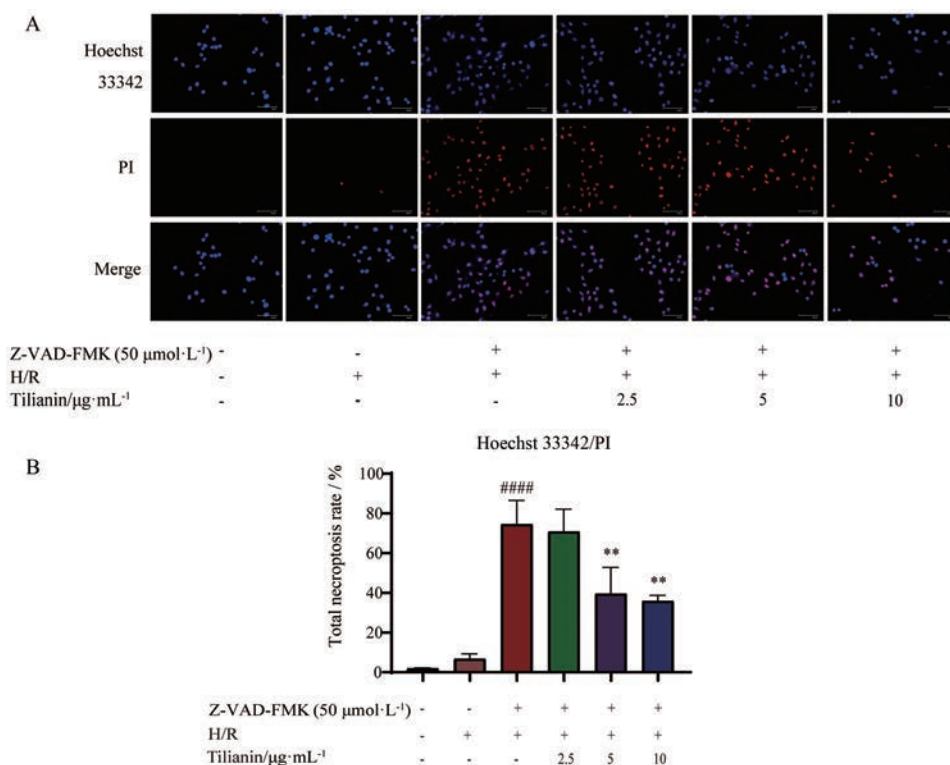


Figure 2 Tilianin dose-dependently inhibits necroptosis in H9c2 cells injured by Z-VAD-FMK-H/R. A: Cell nuclei stained by Hoechst 33342/PI, bar: 100 μm; B: Total necroptosis rates by Image J based on the cell nuclei images. $n = 3, \bar{x} \pm s$. #### $P < 0.0001$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group

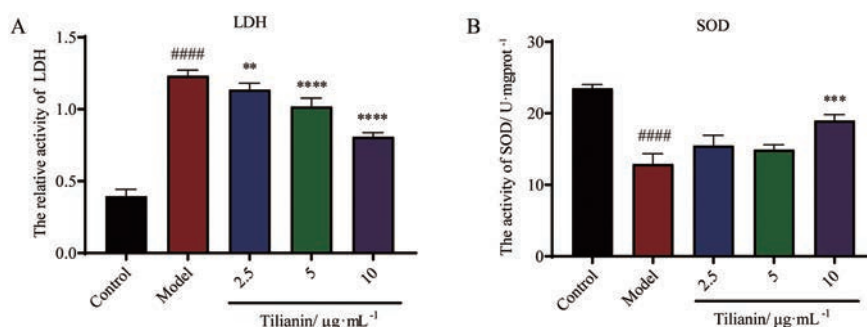


Figure 3 The protective effects of tilianin on H9c2 cells injured by Z-VAD-FMK-H/R. A: Lactate dehydrogenase (LDH) level; B: Super-oxide dismutase (SOD) level. $n = 3, \bar{x} \pm s$. #### $P < 0.0001$ vs control group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs model group

明田蓯昔能够减轻或恢复 H9c2 细胞的 H/R 损伤。如图 3B 所示, 与对照组比, 模型组细胞 SOD 活性显著降低 ($P < 0.0001$); 而与模型组比, 田蓯昔高剂量给药组的 SOD 活性显著上升 ($P < 0.001$)。该结果表明, 田蓯昔能够上调 H9c2 细胞中的 SOD 活性。

4 田蓯昔抑制 H/R 损伤的 H9c2 细胞 ROS 释放

为了进一步评估田蓯昔氧化应激能力, 本研究以 DCFH-DA 为探针对 H/R 损伤 H9c2 细胞内 ROS 释放量进行了检测。结果发现 (图 4), 与对照组比, 模型组细胞内 ROS 含量显著升高 ($P < 0.0001$), 但分别加入 2.5、5 和 10 μg·mL⁻¹ 田蓯昔后, 细胞内 ROS 水平较

模型组明显降低; 而且, 10 μg·mL⁻¹ 田蓯昔抑制 ROS 效果最为明显 ($P < 0.0001$)。这些结果提示, 田蓯昔可通过抑制 ROS 释放抵抗 H/R 诱导的细胞氧化应激反应。

5 田蓯昔对 H/R 损伤的 H9c2 细胞 mPTP 开放的影响

为了评价 mPTP 开放情况, 本实验先采用 BBcell-Probe™M61 探针标记细胞, 然后用酶标仪检测其荧光强度。mPTP 开放时, 荧光淬灭剂进入线粒体使探针荧光强度减弱, 即平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI) 值降低。结果 (图 5) 发现, 与对照组比, 模型组细胞 MFI 值降低, 则 mPTP 开放 ($P < 0.0001$);

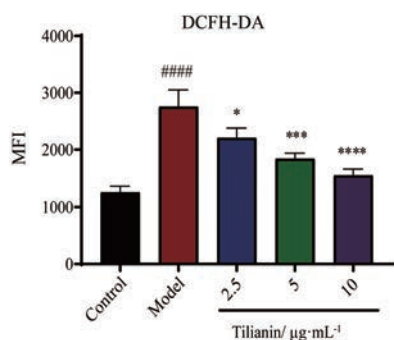


Figure 4 Inhibitory effects of tiliainin on reactive oxygen species (ROS) release in H9c2 cells injured by Z-VAD-FMK-H/R. Expression of ROS was detected in H9c2 cells by DCFH-DA fluorescence probe. $n = 3, \bar{x} \pm s$. #### $P < 0.0001$ vs control group; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs model group. MFI: Mean fluorescence intensity

与模型组比, 田薊昔预保护可使H9c2细胞MFI值升高, 表明mPTP被部分关闭。

6 田薊昔对H/R损伤的H9c2细胞线粒体膜电位的影响

为了评价线粒体功能, 对线粒体膜电位进行JC-1标记。JC-1是一种广泛用于检测线粒体膜电位的理想荧光探针。在线粒体膜电位较高时, JC-1聚集在线粒体基质中, 发射光以红色荧光为主; 在线粒体膜电位较低时, JC-1以单体形式存在, 不能聚集在线粒体基质中, 发射光以绿色荧光为主。红绿荧光相对比例常被用来衡量线粒体膜电位变化。图6发现, 与对照组比, Z-VAD-FMK与H/R诱导的模型组细胞红色荧光向绿色荧光转移, 线粒体膜电位降低($P < 0.0001$); 与模型组比, 田薊昔预保护可减少红色荧光向绿色荧光转移, 表明线粒体膜电位升高($P < 0.01$)。

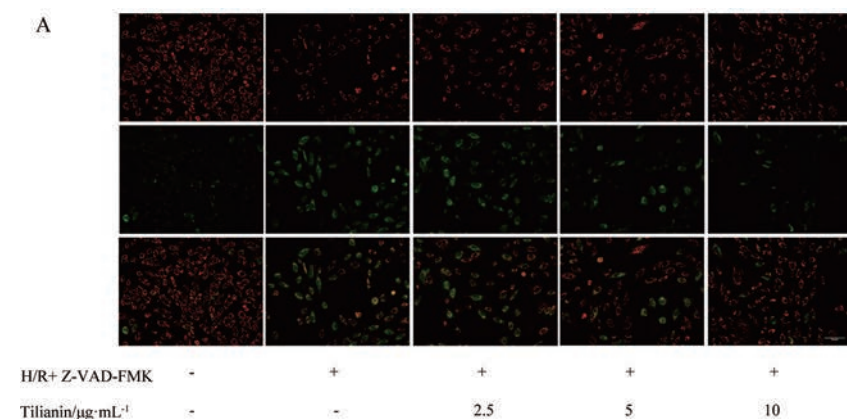


Figure 6 Effects of tiliainin on mitochondrial membrane potential (MMP) in H9c2 cells injured by Z-VAD-FMK-H/R. A: Cell images stained by the lipophilic cationic probe JC-1. Red signal indicates JC-1 in mitochondria, and green signal indicates cytosolic JC-1. Scale bar: 125 μm ; B: Quantitative analysis of MMP based on the cell images stained by JC-1. $n = 3, \bar{x} \pm s$. #### $P < 0.0001$ vs control group; ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ vs model group

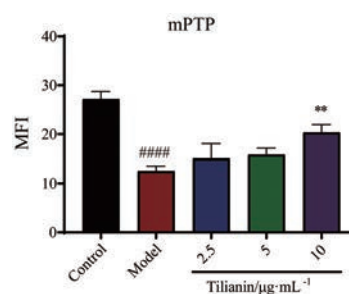


Figure 5 Effect of tiliainin on the opening of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) in H9c2 cells injured by Z-VAD-FMK-H/R. The mPTP opening rate was assayed in H9c2 cells by a kit of mitochondrial permeability transition pore. $n = 3, \bar{x} \pm s$. #### $P < 0.0001$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group

7 田薊昔对H/R损伤的H9c2细胞分泌TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的影响

如图7所示, 与对照组比, 模型组细胞上清中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平明显升高($P < 0.01$); 加入2.5、5和10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 田薊昔后, 与模型组比, TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平均呈剂量依赖性降低, 且10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 田薊昔的调节作用最为明显($P < 0.01$)。上述结果表明, 程序性坏死能够诱导H9c2心肌细胞发生炎症反应, 而田薊昔则能部分抑制此炎症反应。

8 田薊昔分子对接

分子对接结果如图8显示, 田薊昔上的第5位氧原子可与CaMKII的B链第97位谷氨酸和第140位谷氨酸形成两条较强氢键(2.78和2.93 \AA)。第6位氧原子可与CaMKII的B链第20位亮氨酸形成一个弱的氢键(3.02 \AA)。第9位氧原子可与CaMKII的B链第93位缬氨酸分别形成一条较强氢键和一条弱氢键(2.68和3.09 \AA)。

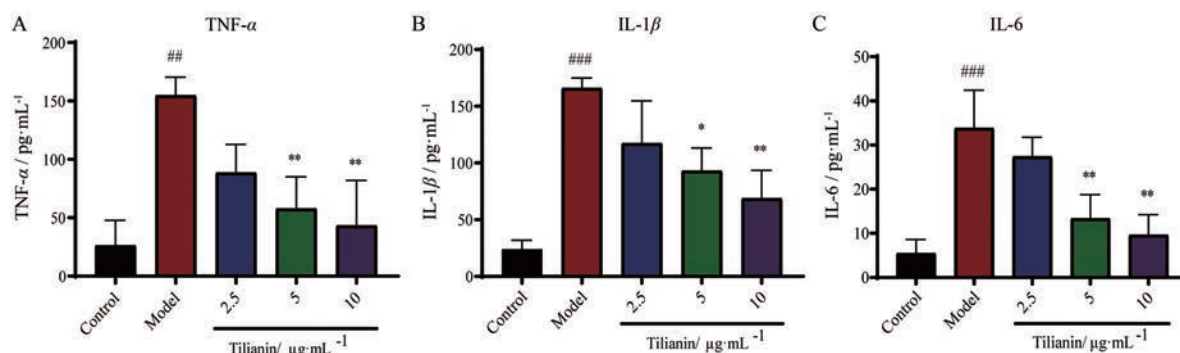


Figure 7 Inhibitory effects of tilianin on tumor necrosis factor- α (TNF- α , A), interleukin-1 β (IL-1 β , B), and interleukin-6 (IL-6, C) in H9c2 cells injured by Z-VAD-FMK-H/R. The secretion of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in the supernatant of H9c2 cells was measured by ELISA. $n = 3, \bar{x} \pm s$. ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs model group

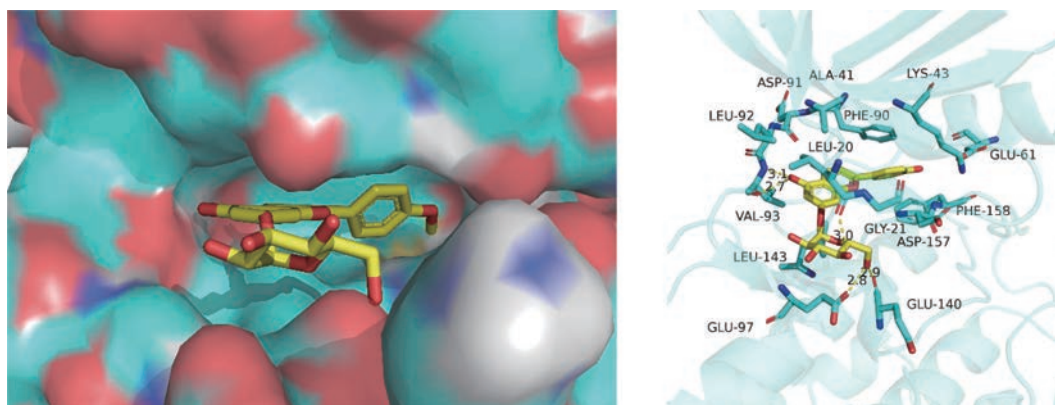


Figure 8 The results of molecular docking between tilianin and calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)

9 田蓊昔对H/R损伤的H9c2细胞p-CaMKII、CaMKII、p-MLKL及MLKL蛋白表达的影响

本研究对CaMKII和p-CaMKII表达进行了检测。结果显示,与对照组比,Z-VAD-FMK处理后的H/R组细胞p-CaMKII蛋白水平明显升高($P < 0.0001$);但与模型组比,田蓊昔预保护可显著下调p-CaMKII蛋白水平(图9A)。坏死标志蛋白p-MLKL亦显示类似表达趋势(图9B)。

讨论

缺血性心脏病被视为世界范围内死亡和残疾的主要原因。随着药物生物学和介入疗法的发展与创新,缺血性心脏病预后得到了显著改善。然而,心肌缺血/再灌注损伤在临床实践中仍然是一个挑战,其可增加心肌梗塞面积,增强心肌纤维化,并加重心脏功能障碍^[21]。目前,已有研究^[22]证实,田蓊昔对大鼠MIRI具有保护作用,但缺血再灌注诱发心肌细胞程序性坏死的机制仍不明确。程序性坏死是缺血再灌注损伤诱导的主要死亡方式,其特征是细胞肿胀,细胞膜和细胞器破裂,细胞溶解^[23],且不依赖caspase途径来执行。程

序性坏死决定着MIRI对心脏的损伤程度。因此,本研究通过联合Z-VAD-FMK与H/R损伤建立了H9c2心肌细胞程序性坏死模型,并且从LDH释放、SOD活性、细胞内ROS释放、线粒体膜电位改变、mPTP开放、Hoechst 33342/PI双染以及蛋白表达等方面证实了该模型的成功构建。同时,本研究也从以上方面证明了田蓊昔对心肌细胞程序性坏死模型的保护作用。

本实验还通过分子对接技术预测田蓊昔可与CaMKII形成氢键。CaMKII是一种丝氨酸-苏氨酸激酶,在心肌和其他可兴奋组织中含量很高。在基础条件下,CaMKII倾向于失活;但当细胞内Ca²⁺升高时,可使CaMKII活化,导致线粒体膜电位去极化,进而增加心肌细胞死亡^[24]。已有研究^[14]证明,mPTP是CaMKII坏死途径的关键下游效应物,其主要调控线粒体功能,并通过对mPTP开放的影响,激活多个应激信号进而诱导心肌细胞死亡。据报道^[25],MLKL Ser358位点磷酸化标志程序性坏死的启动。因此,本研究通过检测p-MLKL的蛋白表达水平,来进一步验证程序性坏死的发生。本研究表明,Z-VAD-FMK联合H/R损伤后,p-CaMKII和p-MLKL表达明显增多,从蛋白水平证明

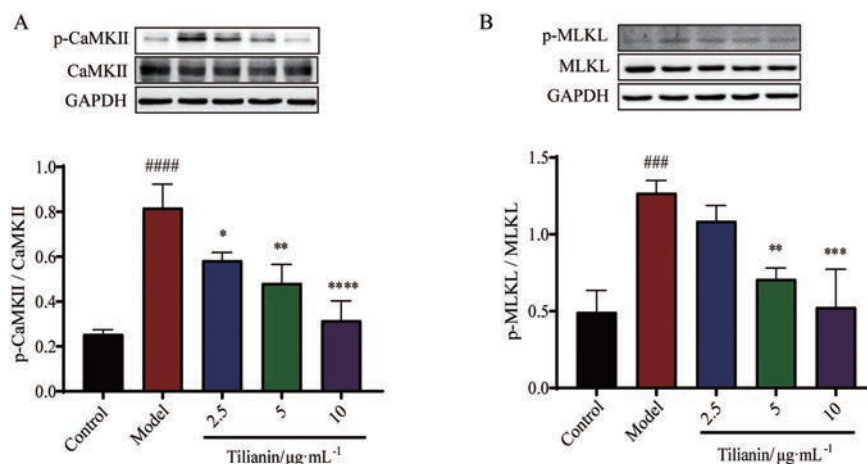


Figure 9 Tiliainin inhibited the activation of p-CaMKII protein in H9c2 cells injured by Z-VAD-FMK-H/R. A: The expression of CaMKII and p-CaMKII protein; B: The expression of MLKL and p-MLKL protein. $n = 3, \bar{x} \pm s$. #### $P < 0.0001$, ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs model group. CaMKII: Ca^{2+} /calmodulin dependent kinase II; MLKL: Mixed lineage kinase domain-like protein

了程序性坏死已启动,且细胞线粒体膜通透性转换孔开放明显,线粒体膜电位降低,导致线粒体肿胀至破裂,细胞内容物释放,并引发周围强烈的炎症反应,释放炎症因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6;田蓟苷给药后,可呈剂量依赖性下调p-CaMKII和p-MLKL蛋白表达水平,保护线粒体免受损伤,并减少炎症因子释放,最终保护心肌细胞免于程序性坏死。因此推断,田蓟苷可能通过抑制CaMKII Thr287位点磷酸化来适当关闭线粒体膜通透性转换孔,抑制程序性坏死,进而对H/R损伤的H9c2细胞产生保护作用。

本研究在前期田蓟苷对缺血再灌注中大鼠心肌保护作用研究基础上,联合Z-VAD-FMK与H/R损伤建立了心肌细胞程序性坏死模型,并证实了田蓟苷可能通过调控CaMKII磷酸化水平以及改善mPTP来发挥抗程序性坏死的作用,为田蓟苷抗心肌缺血再灌注损伤作用提供了科学依据。

作者贡献: 杨洁是本文的第一作者,负责实验操作及论文初稿撰写;邢建国和刘砥威为本文的通讯作者,负责实验设计和把关以及稿件修改等工作;郑瑞芳负责实验设计;都研文、李海宁和李少将参与数据分析及讨论。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Garcia-Nino WR, Correa F, Rodriguez-Barrena JI, et al. Cardio-protective kinase signaling to subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria is mediated by caveolar structures [J]. Basic Res Cardiol, 2017, 112: 15.
- [2] Perrelli MG, Pagliaro P, Penna C. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: role of mitochondria and reac-
- [3] Zou CC, Hong GJ, Yan HY. Predicting and validating the mechanism of trichosanthes mediated anti-myocardial ischemia-reperfusion injury by network pharmacology [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 1234-1240.
- [4] Li G, Xing XY, Zhang MS, et al. Research progress in epigenetic regulation of myocardial ischemia/reperfusion injury by traditional Chinese medicine [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 1047-1053.
- [5] Zhou H, Zhu PJ, Wang J, et al. Pathogenesis of cardiac ischemia reperfusion injury is associated with CK2 α -disturbed mitochondrial homeostasis via suppression of FUNDC1-related mitophagy [J]. Cell Death Differ, 2018, 25: 1080-1093.
- [6] Fearnhead HO, Vandenabeele P, Vanden BT. How do we fit ferroptosis in the family of regulated cell death [J]. Cell Death Differ, 2017, 24: 1991-1998.
- [7] Zhou H, Zhu P, Guo J, et al. Ripk3 induces mitochondrial apoptosis via inhibition of FUNDC1 mitophagy in cardiac IR injury [J]. Redox Biol, 2017, 13: 498-507.
- [8] Wang K, Liu F, Liu CY, et al. The long noncoding RNA NRF regulates programmed necrosis and myocardial injury during ischemia and reperfusion by targeting miR-873 [J]. Cell Death Differ, 2016, 23: 1394-1405.
- [9] Zhou H, Li DD, Zhu PJ, et al. Inhibitory effect of melatonin on necroptosis via repressing the Ripk3-PGAM5-CypD-mPTP pathway attenuates cardiac microvascular ischemia-reperfusion injury [J]. J Pineal Res, 2018, 65: e12503.
- [10] Mattiazzi A, Bassani RA, Escobar AL, et al. Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015, 308: H1177-H1191.
- [11] Zhang T, Zhang Y, Cui M, et al. CaMKII is a RIP3 substrate mediating ischemia- and oxidative stress-induced myocardial

tive oxygen species [J]. World J Cardiol, 2011, 3: 186-200.

- necroptosis [J]. Nat Med, 2016, 22: 175-182.
- [12] Luedde M, Lutz M, Carter N, et al. RIPK3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodelling after myocardial infarction [J]. Cardiovasc Res, 2014, 103: 206-216.
- [13] Luczak ED, Anderson ME. CaMKII oxidative activation and the pathogenesis of cardiac disease [J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 73: 112-116.
- [14] Joiner ML, Koval OM, Li J, et al. CaMKII determines mitochondrial stress responses in heart [J]. Nature, 2012, 491: 269-273.
- [15] Yuan Y, Cao WJ, Hong Y, et al. Tiliainin pretreatment prevents myocardial ischemia-reperfusion injury *via* preservation of mitochondrial function in rat heart [J]. Phytomedicine, 2017, 34: 106-114.
- [16] Guo XH, Cao WJ, Yao JM, et al. Cardioprotective effects of tiliainin in rat myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Mol Med Rep, 2015, 11: 2227-2233.
- [17] Zeng C, Jiang W, Zheng RF, et al. Cardioprotection of tiliainin ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury: role of the apoptotic signaling pathway [J]. PLoS One, 2018, 13: e0193845.
- [18] Jiang H, Fang J, Xing J, et al. Tiliainin mediates neuroprotection against ischemic injury by attenuating CaMKII-dependent mitochondrion-mediated apoptosis and MAPK/NF- κ B signaling [J]. Life Sci, 2019, 216: 233-245.
- [19] Ma LY. Effect of Tiliainin on the Angiogenesis after Stroke in Brain Tissue of Rats [D]. Xinjiang: Xinjiang Medical University (新疆医科大学), 2018.
- [20] Zhu P, Hu S, Jin Q, et al. Ripk3 promotes ER stress-induced necroptosis in cardiac IR injury: a mechanism involving calcium overload/XO/ROS/mPTP pathway [J]. Redox Biol, 2018, 16: 157-168.
- [21] Binder A, Ali A, Chawla R, et al. Myocardial protection from ischemia-reperfusion injury post coronary revascularization [J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2015, 13: 1045-1057.
- [22] Guo X, Cao W, Fan X, et al. Mechanism and protective effects of tiliainin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2013, 19: 168-172.
- [23] Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1833: 3448-3459.
- [24] Feng N, Anderson ME. CaMKII is a nodal signal for multiple programmed cell death pathways in heart [J]. J Mol Cell Cardiol, 2017, 103: 102-109.
- [25] Wang H, Sun L, Su L, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3 [J]. Mol Cell, 2014, 54: 133-146.