

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research熊果苷调控 Notch1/Hes1 通路对缺氧/复氧
诱导的心肌细胞损伤影响的研究The effect of arbutin on hypoxia/reoxygenation induced myocardial cell injury by
modulating the Notch1/Hes1 pathway

陈红芬, 吕孝欣, 张玉清

(山东第二医科大学 附属医院 心血管内一科,
山东 潍坊 261031)CHEN Hong - fen, LÜ Xiao - xin,
ZHANG Yu - qing(Department of Cardiovascular Internal
Medicine, The Second Hospital of
Shandong University, Weifang, 261031,
Shandong Province, China)基金项目:山东省重点研发计划基金资助项目
(2023 - YBSF - 015)作者简介:陈红芬(1977 -),女,副主任医师,
主要从事内科急危重症的救治工作
和研究

通信作者:张玉清,副主任医师

MP:13953604670

E - mail:udwchn@163. com

摘要:目的 探讨熊果苷调控 Notch1/Hes1 通路对缺氧/复氧(H/R)诱导的心肌细胞(H9C2)损伤的影响。方法 将H9C2细胞分为正常组、模型组、低、中、高剂量实验组(25.00、50.00、100.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的熊果苷)、抑制剂组{100.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的熊果苷 + 10.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ N-[N-(3,5-二氟苯乙酰基)-L-丙氨酸]-S-苯基甘氨酸叔丁酯(DAPT)}。正常组常规培养,其余各组均建立H/R诱导的H9C2细胞损伤模型,各给药组于造模前分别给予不同浓度熊果苷(12.50~200.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)预处理24 h。细胞计数(CCK-8)法与原位末端凋亡(TUNEL)分别检测细胞增殖与凋亡,JC-1法测线粒体膜电位,试剂盒检测活性氧(ROS)、乳酸脱氢酶(LDH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平,蛋白质印迹法检测 Notch1、Hes1、凋亡相关 B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、半胱天冬氨酸蛋白酶 3(caspase-3)蛋白表达。结果 25.00~200.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的熊果苷能够显著增加H/R诱导的H9C2细胞存活率($P < 0.05$),选择25.00、50.00、100.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的熊果苷作为低、中、高剂量进行后续实验。正常组、模型组、高剂量实验组、抑制剂组的肌酸激酶-MB(CK-MB)水平分别为(2.45 ± 0.39)、(8.72 ± 0.82)、(3.56 ± 0.42)和(5.48 ± 0.57) $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$;心肌肌钙蛋白 I(cTnI)水平分别为(22.58 ± 2.23)、(68.34 ± 5.96)、(30.12 ± 3.26)和(49.62 ± 5.15) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$;LDH 水平分别为(53.42 ± 5.44)、(163.72 ± 13.41)、(65.45 ± 6.57)和(98.33 ± 9.85) $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$;ROS 相对水平分别为1.01 ± 0.12、3.34 ± 0.35、1.46 ± 0.18 和2.24 ± 0.23;SOD 水平分别为(96.23 ± 8.12)、(24.31 ± 2.24)、(78.39 ± 7.93)和(43.78 ± 4.49) $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$;GSH-Px 水平分别为(74.82 ± 7.55)、(16.42 ± 1.83)、(61.32 ± 6.29)和(35.72 ± 3.38) $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$;MDA 水平分别为(15.45 ± 2.03)、(58.33 ± 5.57)、(21.56 ± 2.24)和(42.47 ± 4.13) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;细胞凋亡率分别为(2.45 ± 0.39)%、(29.86 ± 3.25)%、(9.86 ± 0.91)%和(21.34 ± 2.25)%;红/绿荧光强度比值分别为(5.78 ± 0.65)%、(1.42 ± 0.20)%、(4.89 ± 0.54)%和(2.85 ± 0.33)%;Notch1 蛋白表达分别为1.27 ± 0.12、0.34 ± 0.03、1.05 ± 0.08 和0.54 ± 0.05;Hes1 蛋白表达分别为0.95 ± 0.10、0.25 ± 0.03、0.81 ± 0.08 和0.57 ± 0.05;Bcl-2 蛋白表达分别为1.01 ± 0.11、0.31 ± 0.03、0.89 ± 0.08 和0.61 ± 0.06;Bax 蛋白表达分别为0.45 ± 0.04、1.34 ± 0.12、0.61 ± 0.06 和0.93 ± 0.09; caspase-3 蛋白表达分别为0.23 ± 0.03、0.91 ± 0.09、0.37 ± 0.04 和0.64 ± 0.06;正常组与模型组比较、模型组与低、中、高剂量实验组比较、高剂量实验组与抑制剂组比较,上述指标在统计学上均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 熊果苷通过激活 Notch1/Hes1 通路,抑制氧化应激,减轻H/R诱导的H9C2细胞损伤。

关键词:熊果苷;缺氧/复氧;Notch1/Hes1 通路;发状分裂相关增强子1通路;心肌细胞损伤

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.07.008

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2026)07-0947-07

Abstract: Objective To investigate the effect of arbutin on hypoxia/reoxygenation (H/R) – induced injury of cardiomyocytes (H9C2) through the neurogenic locus notch homolog protein 1 (Notch1)/hair cell enhancer of split 1 (Hes1) signaling pathway. **Methods** An H/R – induced H9C2 cell injury model was established. The optimal intervention concentration of arbutin was screened by pretreating cells with various concentrations (12.50 – 200.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). H9C2 cells were divided into a normal group, a model group, experimental – L, M, H groups (25.00, 50.00, and 100.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ arbutin, respectively), and an inhibitor group {100.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ arbutin + 10.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ N – [N – (3,5 – difluorophenacetyl) – L – alanyl] – S – phenylglycine t – butyl ester (DAPT)}. Cells in the normal group were cultured under normal conditions, while H/R models were established in the remaining groups. All treatment groups received arbutin pretreatment at concentrations ranging from 12.50 to 200.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24 hours before modeling. Cell proliferation was detected by the CCK – 8 assay, and apoptosis was assessed by TUNEL assay; mitochondrial membrane potential was measured by JC – 1; reactive oxygen species (ROS), lactate dehydrogenase (LDH), glutathione peroxidase (GSH – Px), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) levels were detected using kits. Expression of Notch1, Hes1, Bcl – 2, Bax, and caspase – 3 was detected by Western blot. **Results** Arbutin at concentrations of 25.00 – 200.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ significantly increased the survival rate of H/R – induced H9C2 cells ($P < 0.05$). Arbutin at 25.00, 50.00, and 100.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ was selected as the low, medium, and high doses for subsequent experiments. The creatine kinase isoenzyme MB (CK – MB) levels in the normal group, model group, experimental – H group, and inhibitor group were (2.45 ± 0.39), (8.72 ± 0.82), (3.56 ± 0.42), and (5.48 ± 0.57) $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the cTnI levels were (22.58 ± 2.23), (68.34 ± 5.96), (30.12 ± 3.26), and (49.62 ± 5.15) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; the LDH levels were (53.42 ± 5.44), (163.72 ± 13.41), (65.45 ± 6.57), and (98.33 ± 9.85) $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; the relative ROS levels were 1.01 ± 0.12 , 3.34 ± 0.35 , 1.46 ± 0.18 , and 2.24 ± 0.23 , respectively; the SOD levels were (96.23 ± 8.12), (24.31 ± 2.24), (78.39 ± 7.93), and (43.78 ± 4.49) $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectively; the GSH – Px levels were (74.82 ± 7.55), (16.42 ± 1.83), (61.32 ± 6.29), and (35.72 ± 3.38) $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectively; the MDA levels were (15.45 ± 2.03), (58.33 ± 5.57), (21.56 ± 2.24), and (42.47 ± 4.13) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; the apoptosis rates were (2.45 ± 0.39)%, (29.86 ± 3.25)%, (9.86 ± 0.91)%, and (21.34 ± 2.25)%, respectively; the red/green fluorescence intensity ratios were (5.78 ± 0.65)%, (1.42 ± 0.20)%, (4.89 ± 0.54)%, and (2.85 ± 0.33)%, respectively; the Notch1 protein expression levels were 1.27 ± 0.12 , 0.34 ± 0.03 , 1.05 ± 0.08 , and 0.54 ± 0.05 , respectively; the Hes1 protein expression levels were 0.95 ± 0.10 , 0.25 ± 0.03 , 0.81 ± 0.08 , and 0.57 ± 0.05 , respectively; the Bcl – 2 protein expression levels were 1.01 ± 0.11 , 0.31 ± 0.03 , 0.89 ± 0.08 , and 0.61 ± 0.06 , respectively; the Bax protein expression levels were 0.45 ± 0.04 , 1.34 ± 0.12 , 0.61 ± 0.06 , and 0.93 ± 0.09 , respectively; and the caspase – 3 protein expression levels were 0.23 ± 0.03 , 0.91 ± 0.09 , 0.37 ± 0.04 , and 0.64 ± 0.06 , respectively. Comparisons between the normal group and the model group, between the model group and the experimental – L, M, H groups, and between the experimental – H group and the inhibitor group all showed statistically significant differences for the above indicators (all $P < 0.05$). **Conclusion** Arbutin alleviates H/R – induced H9C2 cell injury by activating the Notch1/Hes1 pathway and inhibiting oxidative stress.

Key words: arbutin; hypoxia/reoxygenation; neurogenic locus notch homolog protein 1/hair cell enhancer of split 1 pathway; myocardial cell injury

心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia – reperfusion injury, MIRI) 是指心脏缺血后血流恢复对心肌造成的损伤, 发生在急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI)、冠心病等经皮冠状动脉介入治疗、冠状动脉成形术等术后, 可致永久性残疾甚至死亡^[1]。

目前 MIRI 尚无有效治疗方法。MIRI 涉及氧化应激、细胞凋亡及线粒体功能障碍, 抑制氧化应激、改善线粒体功能是减轻心肌细胞凋亡的关键^[2]。Notch 基因 1 (neurogenic locus notch homolog protein 1, Notch1)/发状分裂相关增强子 1 (hair cell enhancer of split 1,

Hes1)通路参与心肌细胞存活、血管生成及分化调控,激活 Notch1/Hes1 通路,可缓解氧化应激与线粒体紊乱,减轻 MIRI^[3]。熊果苷提取自杜鹃花科熊果属植物,具抗氧化、抗炎、抗肿瘤等药理活性,对糖尿病心肌病、高血压心肌纤维化等有良好治疗作用^[4-5]。然而,熊果苷对缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)诱导的心肌细胞损伤的影响及机制尚不清楚。本研究以 H9C2 细胞为对象,探讨熊果苷是否通过调控 Notch1/Hes1 通路减轻 H/R 诱导的心肌细胞损伤,为 MIRI 治疗提供实验依据。

材料与方法

1 材料

细胞 心肌细胞 H9C2(SNL-029),购自湖北武汉尚恩生物技术有限公司。

药品与试剂 熊果苷,规格:每瓶 100 mg,纯度:≥98%,批号:202306,货号:A4256、Notch1 抑制剂 N-[N-(3,5-二氟苯乙酰基)-L-丙氨酰]-S-苯基甘氨酸叔丁酯{N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester, DAPT},规格:每瓶 50 mg,纯度:≥98%,批号:202303,货号:D5942,均由美国 Merck 公司生产;TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒、CCK-8 细胞活力/毒性检测试剂盒,均由湖北武汉尚恩生物技术有限公司生产;活性氧(reactive oxygen species, ROS)测试盒(化学荧光法)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒、肌酸激酶-MB(creatine kinase-MB, CK-MB)ELISA 试剂盒、心肌肌钙蛋白 I(cardiac troponin I, cTnI)ELISA 试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1 法)试剂盒,均由上海酶联生物科技有限公司生产;Notch1、Hes1、凋亡相关 B 淋巴细胞瘤 2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、半胱天冬氨酸蛋白酶 3(cysteiny aspartate specific proteinase-3, caspase-3)抗体购自 Elabscience 公司。

仪器 IX51 倒置荧光显微镜,日本奥林巴斯公司产品;M200 PRO-多功能酶标仪,瑞士 Tecan 公司产

品;EC3600 凝胶成像仪,美国 UVP 公司产品;Gel Doc EZ-Bio-Rad 凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养及药物浓度筛选^[6]

H9C2 细胞培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素(双抗)的高糖 DMEM 培养基中,置于 37℃、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中常规培养,每 2~3 天传代 1 次,取对数生长期细胞进行实验。建立 H/R 细胞模型, H9C2 细胞先缺氧 6 h(95% N₂、5% CO₂ 条件下培养),然后再复氧培养 6 h(95% O₂、5% CO₂ 条件下培养),正常组在正常条件下(95% O₂、5% CO₂)培养。使用终浓度为 12.50、25.00、50.00、100.00 和 200.00 μmol·L⁻¹ 的熊果苷预先处理 H9C2 细胞 2 h,再进行缺氧复氧处理, CCK-8 试剂检测细胞存活率。

2.2 细胞分组及处理方法^[7]

将 H9C2 细胞分为正常组、模型组、低、中、高剂量实验组、抑制剂组。正常组与模型组,不做任何处理;低、中、高剂量实验组,在 H/R 前分别使用 25.00、50.00 和 100.00 μmol·L⁻¹ 的熊果苷处理细胞 24 h,抑制剂组在 H/R 前使用 100.00 μmol·L⁻¹ 的熊果苷与 10.00 μmol·L⁻¹ Notch1 抑制剂 DAPT 共同处理细胞 24 h。

2.3 ELISA 检测 CK-MB、cTnI、LDH 水平^[8]

将各组处理的细胞接种于 6 孔板中培养 24 h 后,离心后取上清,按照 ELISA 试剂盒说明书,检测各组 CK-MB、LDH 和 cTnI 水平。

2.4 试剂盒检测 MDA、GSH-Px、SOD 水平^[9]

收集各组处理的细胞,根据试剂盒说明分别检测细胞 MDA、GSH-Px 和 SOD 水平。

2.5 荧光探针法 ROS 水平检测^[10]

将细胞培养物接种于 96 孔板上,去除培养基,按照 1:1 000 用无血清培养液稀释 2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA),加入 150 μL 稀释好的 DCFH-DA 溶液,37℃ 避光孵育 30 min,去除未进入细胞内的 DCFH-DA 溶液,荧光显微镜观察并拍照。

2.6 TUNEL 染色检测细胞凋亡^[11]

收集各组处理的细胞,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤三次,4% 多聚甲醛在 4℃ 下固定 30 min,使用 TUNEL 染色试剂盒,按照制造商的说明对细胞进行染色,再使用

4',6'-二脒基-2-苯基吲哚(4',6'-diamidino-2-phenylindole, DAPI)复染细胞核,荧光显微镜下观察细胞凋亡。

2.7 JC-1 法检测线粒体膜电位^[12]

将各组处理的细胞接种至6孔板, PBS洗涤细胞, 加入适量JC-1工作液, 细胞培养箱37℃孵育15 min, 1 500 r·min⁻¹ 4℃离心3 min, PBS洗涤后再重悬细胞, 用荧光显微镜观察。用红/绿荧光强度比值表示线粒体膜电位。

2.8 蛋白质印迹法检测 Notch1、Hes1、Bcl-2、Bax、caspase-3 蛋白表达^[13]

收集各组处理的细胞, 用放射免疫沉淀法裂解细胞, 提取总蛋白, 使用二喹啉甲酸蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度, 将蛋白20 μg于15%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将分离的蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭30 min, 加入Notch1、Hes1、Bcl-2、Bax、caspase-3一抗, 4℃孵育过夜, 洗膜后, 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(Immunoglobulin G, IgG), 室温孵育1 h, 以β-肌动蛋白(Beta-actin, β-actin)为内参, 凝胶成像系统分析蛋白相对表达。

3 统计学处理

用SPSS 25.0版进行统计分析。数据已验证具有方差齐性, 多组中指标差异性比较和多组内两两组间的进一步差异性比较分别采用单因素方差分析法、SNK-q法分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料以率(%)表示。

结 果

1 药物浓度筛选

与正常组比较, 模型组H9C2细胞存活率显著降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 25.00、50.00、100.00、200.00 μmol·L⁻¹的熊果苷处理的H9C2细胞存活率显著增加($P < 0.05$); 其中100.00、200.00 μmol·L⁻¹的熊果苷处理的细胞存活率较高, 但两者无明显差异, 选择25.00、50.00、100.00 μmol·L⁻¹的熊果苷作为低、中、高浓度进行后续实验, 见表1。

2 各组细胞心肌标志物水平

与正常组比较, 模型组CK-MB、cTnI、LDH水平显著升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 随着药物浓度的增加, 低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组CK-MB、cTnI、LDH水平依次降低($P < 0.05$); 与高

剂量实验组比较, 抑制剂组CK-MB、cTnI、LDH水平显著升高($P < 0.05$), 见表2。

3 各组细胞氧化应激水平

与正常组比较, 模型组MDA、ROS水平显著升高, GSH-Px、SOD水平显著降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组MDA、ROS水平随着药物浓度增加而降低, GSH-Px、SOD水平随着药物浓度增加而升高($P < 0.05$); 与高剂量实验组比较, 抑制剂组MDA、ROS水平显著升高, GSH-Px、SOD水平显著降低($P < 0.05$), 见表3。

4 各组细胞凋亡

与正常组比较, 模型组细胞凋亡率显著升高, 红/绿荧光强度比值降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组细胞凋亡率依次降低, 红/绿荧光强度比值依次升高($P < 0.05$); 与高剂量实验组比较, 抑制剂组细胞凋亡率显著升高, 红/绿荧光强度比值显著降低($P < 0.05$), 见表4。

5 各组细胞蛋白表达

与正常组相比, 模型组Notch1、Hes1、Bcl-2表达水平显著降低, Bax、caspase-3表达水平显著升高($P < 0.05$); 与模型组相比, 随着药物浓度增加, 低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组Notch1、Hes1、Bcl-2表达水平依次升高, Bax、caspase-3表达水平依次降低($P < 0.05$); 与高剂量实验组比较, 抑制剂组Notch1、Hes1、Bcl-2表达水平显著降低, Bax、caspase-3表达水平显著升高($P < 0.05$), 见图1和表5。

表1 熊果苷对H9C2细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of arbutin on H9C2 cell proliferation($\bar{x} \pm s$)

Arbutin concentration (μmol·L ⁻¹)	Cell viability (%)
Normal	98.32 ± 1.65
Model	67.22 ± 6.15 [*]
12.50	69.63 ± 5.33
25.00	76.78 ± 5.61 [#]
50.00	85.32 ± 5.72 [#]
100.00	94.42 ± 5.08 [#]
200.00	96.61 ± 4.52 [#]

Normal group: Normal treatment; Model group: H9C2 cells were subjected to hypoxia for 6 h (cultured in 95% N₂, 5% CO₂) followed by reoxygenation for 6 h (cultured in 95% O₂, 5% CO₂); Compared with normal group, ^{*} $P < 0.05$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$.

表2 各组细胞心肌标志物水平比较($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of cardiac marker levels in cells of each group($\bar{x} \pm s$)

Group	CK-MB($U \cdot mL^{-1}$)	cTnI($ng \cdot L^{-1}$)	LDH($U \cdot L^{-1}$)
Normal	2.45 $\pm$ 0.39	22.58 $\pm$ 2.23	53.42 $\pm$ 5.44
Model	8.72 $\pm$ 0.82 [*]	68.34 $\pm$ 5.96 [*]	163.72 $\pm$ 13.41 [*]
Experimental-L	6.61 $\pm$ 0.56 [#]	53.47 $\pm$ 5.54 [#]	121.38 $\pm$ 10.34 [#]
Experimental-M	5.28 $\pm$ 0.58 ^{#△}	42.28 $\pm$ 4.34 ^{#△}	84.32 $\pm$ 8.56 ^{#△}
Experimental-H	3.56 $\pm$ 0.42 ^{#△▲}	30.12 $\pm$ 3.26 ^{#△▲}	65.45 $\pm$ 6.57 ^{#△▲}
Inhibitor	5.48 $\pm$ 0.57 [□]	49.62 $\pm$ 5.15 [□]	98.33 $\pm$ 9.85 [□]

Normal group: Normal treatment; Model group: H9C2 cells were subjected to hypoxia for 6 h (cultured in 95% N₂, 5% CO₂) followed by reoxygenation for 6 h (cultured in 95% O₂, 5% CO₂); Experimental-L group: Treatment with 25.00 μ mol $\cdot$ L⁻¹ arbutin for 24 h before H/R; Experimental-M: Treatment with 50.00 μ mol $\cdot$ L⁻¹ arbutin for 24 h before H/R; Experimental-H: Treatment with 100.00 μ mol $\cdot$ L⁻¹ arbutin for 24 h before H/R; Inhibitor group: Co-treatment with 100.00 μ mol $\cdot$ L⁻¹ arbutin and 10.00 μ mol $\cdot$ L⁻¹ DAPT for 24 h before H/R; CK-MB: Creatine kinase-MB, cTnI: Cardiac troponin I, LDH: Lactate dehydrogenase, Compared with normal group, ^{*}*P* < 0.05; Compared with model group, [#]*P* < 0.05; Compared with Experimental-L group, [△]*P* < 0.05; Compared with Experimental-M group, [▲]*P* < 0.05; Compared with Experimental-H group, [□]*P* < 0.05.

表3 各组细胞氧化应激水平比较($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of oxidative stress levels in cells of each group($\bar{x} \pm s$)

Group	Relative ROS level	SOD($U \cdot mg^{-1}$)	GSH-Px($U \cdot mg^{-1}$)	MDA(μ mol $\cdot$ L ⁻¹)
Normal	1.01 $\pm$ 0.12	96.23 $\pm$ 8.12	74.82 $\pm$ 7.55	15.45 $\pm$ 2.03
Model	3.34 $\pm$ 0.35 [*]	24.31 $\pm$ 2.24 [*]	16.42 $\pm$ 1.83 [*]	58.33 $\pm$ 5.57 [*]
Experimental-L	2.56 $\pm$ 0.24 [#]	38.56 $\pm$ 3.74 [#]	32.61 $\pm$ 3.72 [#]	45.22 $\pm$ 4.31 [#]
Experimental-M	1.85 $\pm$ 0.21 ^{#△}	56.28 $\pm$ 5.67 ^{#△}	45.43 $\pm$ 4.68 ^{#△}	31.36 $\pm$ 3.35 ^{#△}
Experimental-H	1.46 $\pm$ 0.18 ^{#△▲}	78.39 $\pm$ 7.93 ^{#△▲}	61.32 $\pm$ 6.29 ^{#△▲}	21.56 $\pm$ 2.24 ^{#△▲}
Inhibitor	2.24 $\pm$ 0.23 [□]	43.78 $\pm$ 4.49 [□]	35.72 $\pm$ 3.38 [□]	42.47 $\pm$ 4.13 [□]

Dose and *n* refer to table 2. ROS: Reactive oxygen species, SOD: Superoxide dismutase, GSH-Px: Glutathione peroxidase, MDA: Malondialdehyde, Compared with normal group, ^{*}*P* < 0.05; Compared with model group, [#]*P* < 0.05; Compared with Experimental-L group, [△]*P* < 0.05; Compared with Experimental-M group, [▲]*P* < 0.05; Compared with Experimental-H group, [□]*P* < 0.05.

表4 各组细胞凋亡率和线粒体膜电位比较($\bar{x} \pm s$)Table 4 Comparison of apoptosis rate and mitochondrial membrane potential in cells of each group($\bar{x} \pm s$)

Group	Apoptosis rate (%)	Red/green fluorescence intensity ratio (%)
Normal	2.45 $\pm$ 0.39	5.78 $\pm$ 0.65
Model	29.86 $\pm$ 3.25 [*]	1.42 $\pm$ 0.20 [*]
Experimental-L	24.54 $\pm$ 2.42 [#]	2.34 $\pm$ 0.32 [#]
Experimental-M	16.45 $\pm$ 1.23 ^{#△}	3.78 $\pm$ 0.41 ^{#△}
Experimental-H	9.86 $\pm$ 0.91 ^{#△▲}	4.89 $\pm$ 0.54 ^{#△▲}
Inhibitor	21.34 $\pm$ 2.25 [□]	2.85 $\pm$ 0.33 [□]

Dose and *n* refer to table 2. Compared with normal group, ^{*}*P* < 0.05; Compared with model group, [#]*P* < 0.05; Compared with Experimental-L group, [△]*P* < 0.05; Compared with Experimental-M group, [▲]*P* < 0.05; Compared with Experimental-H group, [□]*P* < 0.05.

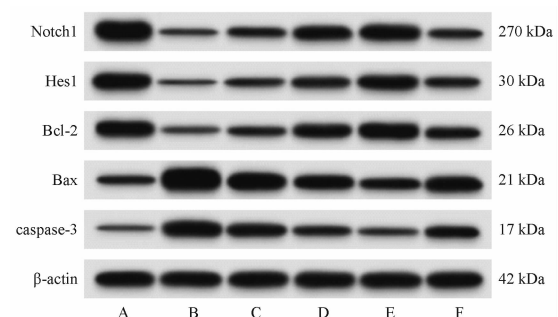


图1 Notch1、Hes1、Bcl-2、Bax和caspase-3蛋白表达条带
Figure 1 Bands of protein expressions of Notch1, Hes1, Bcl-2, Bax and caspase-3

A: Normal group; B: Model group; C: Experimental-L group; D: Experimental-M group; E: Experimental-H group; F: Inhibitor group; Notch1: Neurogenic locus notch homolog protein 1, Hes1: hairy and enhancer of split 1, Bcl-2: B-cell lymphoma-2, Bax: Bcl-2 associated X protein, caspase-3: Cysteine-specific aspartate protease-3.

表5 各组细胞 Notch1、Hes1、Bcl-2、Bax、caspase-3 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of Notch1, Hes1, Bcl-2, Bax, and caspase-3 protein expression in cells of each group($\bar{x} \pm s$)

Group	Notch1	Hes1	Bcl-2	Bax	caspase-3
Normal	1.27 ± 0.12	0.95 ± 0.10	1.01 ± 0.11	0.45 ± 0.04	0.23 ± 0.03
Model	0.34 ± 0.03 *	0.25 ± 0.03 *	0.31 ± 0.03 *	1.34 ± 0.12 *	0.91 ± 0.09 *
Experimental - L	0.56 ± 0.05 #	0.43 ± 0.04 #	0.53 ± 0.05 #	1.05 ± 0.15 #	0.72 ± 0.07 #
Experimental - M	0.82 ± 0.06 #△	0.62 ± 0.06 #△	0.71 ± 0.06 #△	0.83 ± 0.08 #△	0.55 ± 0.05 #△
Experimental - H	1.05 ± 0.08 #△▲	0.81 ± 0.08 #△▲	0.89 ± 0.08 #△▲	0.61 ± 0.06 #△▲	0.37 ± 0.04 #△▲
Inhibitor	0.54 ± 0.05 □	0.57 ± 0.05 □	0.61 ± 0.06 □	0.93 ± 0.09 □	0.64 ± 0.06 □

Dose and n refer to table 2. Notch1: Neurogenic locus notch homolog protein 1, Hes1: hairy and enhancer of split 1, Bcl-2: B-cell lymphoma-2, Bax: Bcl-2 associated X protein, caspase-3: Cysteinyl aspartate specific proteinase-3, Compared with normal group, * $P < 0.05$; Compared with model group, # $P < 0.05$; Compared with Experimental - L group, △ $P < 0.05$; Compared with Experimental - M group, ▲ $P < 0.05$; Compared with Experimental - H group, □ $P < 0.05$.

讨 论

本研究核心目的是探讨熊果苷对 H/R 诱导的 H9C2 心肌细胞损伤的影响及是否通过调控 Notch1/Hes1 通路发挥作用,为 MIRI 的药物干预提供新的实验依据。MIRI 作为心肌缺血再灌注治疗后的严重并发症,其发病与氧化应激、心肌细胞凋亡及线粒体功能障碍密切相关。熊果苷作为具有多重药理活性的酚类化合物,已被证实可改善心肌纤维化、抑制心肌损伤,但在 H/R 诱导的心肌细胞损伤中的作用及机制尚未明确^[13]。本研究结果显示,不同浓度的熊果苷预处理 H/R 诱导的细胞,线粒体膜电位升高,细胞凋亡率明显减少,ROS、MDA、Bax、caspase-3 蛋白表达显著降低,GSH-Px、SOD 水平、Bcl-2 表达明显升高,提示熊果苷可抑制氧化应激,减少细胞凋亡,保护 H/R 处理的 H9C2 细胞损伤。与郭峰等^[14]研究中雷诺嗪通过调控凋亡相关蛋白保护 H/R 诱导的心肌细胞损伤的机制一致,进一步佐证了抗氧化、抗凋亡是天然产物发挥心肌保护作用的重要途径;与既往熊果苷在 LPS 诱导的心肌损伤中抑制 ROS 累积、caspase-3 表达的研究^[15]相呼应,提示熊果苷的心肌保护作用具有一致性,但其调控的信号通路存在组织损伤类型特异性。CK-MB 主要存在于心肌细胞中,心肌细胞受损时,CK-MB 会迅速释放入血,其升高程度与心肌损伤范围相关,可用于评估病情严重程度及预后^[16]。cTnl 是心肌细胞特有的蛋白质,正常情况下血液中含有量极低。心肌细胞膜受损后,cTnl 释放入血,是诊断心肌损伤的“金标准”,尤其适用于早期诊

断和危险分层^[17]。LDH 广泛存在于心、肝、肾、骨骼肌等多种组织细胞中,心肌损伤时,其水平升高,可结合 CK-MB、cTnl 综合评估心肌损伤^[18]。本研究结果显示,不同浓度的熊果苷预处理 H/R 诱导的细胞,CK-MB、cTnl、LDH 水平显著降低,提示熊果苷可减轻心肌损伤,主要与提高抗氧化能力,降低心肌细胞凋亡有关。然而,其具体作用机制还有待进一步验证。

Notch1/Hes1 通路作为调控心肌细胞存活、抗氧化应激的关键通路,其激活可有效减轻 MIRI,已有研究证实藁本内酯可通过激活该通路减轻 H/R 诱导的心肌细胞损伤^[19],武菲菲等^[20]也发现熊果苷可通过激活 Notch1 相关通路抑制心肌细胞凋亡,为本研究机制探索提供了理论支撑。本研究进一步证实,H/R 诱导的 H9C2 细胞中 Notch1、Hes1 表达显著下调,熊果苷预处理可显著上调二者表达,而加入 Notch1 抑制剂 DAPT 后,熊果苷的心肌保护效应被显著逆转,结合双通路调控趋势,明确熊果苷是通过激活 Notch1/Hes1 通路,介导氧化应激抑制和细胞凋亡减少,从而减轻 H/R 诱导的心肌细胞损伤,补充了熊果苷在 MIRI 中的作用机制,也丰富了 Notch1/Hes1 通路的调控网络。综上,本研究明确熊果苷可通过激活 Notch1/Hes1 通路,抑制氧化应激及细胞凋亡,减轻 H/R 诱导的 H9C2 心肌细胞损伤,为熊果苷作为 MIRI 潜在治疗药物提供了可靠的细胞实验依据。未来可进一步构建动物实验模型,验证熊果苷在体内的心肌保护效应及剂量依赖性,探索其药代动力学特征与给药方案;同时深入挖掘 Notch1/Hes1 通路下游具体调控靶点,明确熊果苷与该通路的结合位点,为其临床转化应用奠定基础,也为 MIRI 的多靶点治疗提供新的思路与方向。

本研究提示:熊果苷通过激活 Notch1/Hes1 通路,抑制氧化应激及细胞凋亡,减轻 H/R 诱导的 H9C2 细胞损伤。本研究从细胞模型阐明熊果苷对心肌缺血再灌注损伤的治疗作用,其临床应用仍需结合动物模型做进一步验证。

参考文献:

- [1] WELT F G P, BATCHELOR W, SPEARS J R, *et al.* Reperfusion injury in patients with acute myocardial infarction: JACC scientific statement[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2024, 83(22):2196—2213.
- [2] MA S, SONG Y, XU Y, *et al.* Mild therapeutic hypothermia alleviated myocardial ischemia/reperfusion injury via targeting SLC25A10 to suppress mitochondrial apoptosis[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2024, 17(4):946—958.
- [3] WANG L, LAI S, ZOU H, *et al.* Ischemic preconditioning/ischemic postconditioning alleviates anoxia/reoxygenation injury via the Notch1/Hes1/VDAC1 axis[J/OL]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2022, 36(11):e23199. 2022-8-17 [2025-09-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35975741/>.
- [4] 徐银丽, 黄玉婷, 徐臣年, 等. 熊果苷调控 ROCK/JNK 通路对自发性高血压大鼠主动脉氧化应激及纤维化的作用研究[J]. *中国心血管病研究*, 2023, 21(2):144—148.
- [5] SIVASANGARI S, ASAIKUMAR L, VENNILA L. Arbutin prevents alterations in mitochondrial and lysosomal enzymes in isoproterenol-induced myocardial infarction: An *in vivo* study[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2021, 40(1):100—112.
- [6] CHEN J, ZHANG G, GUO A, *et al.* Sevoflurane attenuates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury by regulating miR-4454[J]. *Toxicol Res (Camb)*, 2024, 13(6):219—232.
- [7] 张会雨, 辛高杰, 陈原原, 等. 人参皂苷 Rg1 通过 miR-155/Notch1/Hes1 通路调控自噬减轻 HL-1 细胞缺氧/复氧损伤的机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(23):6450—6458.
- [8] 刘田静, 陈向云, 朱璨, 等. 理气活血滴丸通过 HIF-1 α 信号通路减轻缺氧复氧诱导的 H9C2 心肌细胞凋亡[J]. *药物评价研究*, 2025, 48(5):1124—1133.
- [9] 覃川, 侯成香, 王盛柯, 等. 基于 Nr2 信号通路探讨 α -硫辛酸减轻 IR-HepG2 细胞氧化应激改善胰岛素抵抗[J]. *贵州医科大学学报*, 2025, 50(8):1132—1143.
- [10] 张婷, 王翠翠, 朱聪, 等. 苜蓿酰胺通过 miR-214-3p/GPX4 通路诱导 K562/ADR 细胞铁死亡的机制研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2025, 33(4):1007—1015.
- [11] 乔芬, 曾丽红, 支亦博, 等. 瑞马唑仑通过抑制 NLRP3 炎症小体活化减轻心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞损伤的研究[J]. *检验医学与临床*, 2025, 22(16):2183—2189, 2194.
- [12] 林博, 叶馨怡, 李羽茜. 沉默 METTL3 促进脓毒症小鼠脑微血管内皮细胞线粒体自噬的机制研究[J]. *局解手术学杂志*, 2025, 34(6):465—470.
- [13] NALBAN N, SANGARAJU R, ALAVALA S, *et al.* Arbutin attenuates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by inhibiting TLR-4/NF- κ B pathway in mice[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2020, 20(3):235—248.
- [14] 郭峰, 蒋广恩, 林军. 雷诺嗪对缺氧/复氧诱导的 H9c2 心肌细胞损伤的保护作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(16):1837—1876.
- [15] 梅丽军, 周紫微, 赵婧莎, 等. 熊果苷缓解脂多糖诱导的 H9c2 心肌氧化应激、细胞凋亡及炎症反应[J]. *免疫学杂志*, 2023, 39(12):1028—1033.
- [16] SHEN S, HE F, CHENG C, *et al.* Uric acid aggravates myocardial ischemia-reperfusion injury via ROS/NLRP3 pyroptosis pathway[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133:110990. 2020-11-21 [2025-09-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33232925/>.
- [17] LIU W, CHENG L, LI X, *et al.* Short-term pretreatment of naringin isolated from Citrus wilsonii Tanaka attenuates rat myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2022, 395(9):1047—1059.
- [18] WEI X H, CHEN J, WU X F, *et al.* Salvianolic acid B alleviated myocardial ischemia-reperfusion injury via modulating SIRT3-mediated crosstalk between mitochondrial ROS and NLRP3[J/OL]. *Phytomedicine*, 2025, 136:156260. 2024-11-14 [2025-09-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39579610/>.
- [19] 李丽华, 张宁, 徐颖, 等. 藜本内酯调节 Notch1/Hes1 信号通路对缺氧/复氧心肌细胞损伤的影响[J]. *河北医学*, 2025, 31(9):1497—1502.
- [20] 武菲菲, 徐臣年, 金屏, 等. Notch1/NRG1 通路在熊果苷抑制心肌细胞凋亡、减轻心肌纤维化中的作用机制研究[J]. *解放军医药杂志*, 2022, 34(7):1—6.

(本文编辑:王珊 收稿日期 2025-09-22)