

三七总皂苷调控 SYK/NF- κ B 信号通路 减轻人主动脉瓣膜间质细胞钙化

李洪峥^{1,2}, 林国晟³, 张斌⁴, 孟真⁵, 李子昂⁴, 李秋忆¹, 崔晓珊¹, 于子凯^{1*}

(1. 中国中医科学院 西苑医院 国家中医心血管病临床医学研究中心, 北京 100091;

2. 中国中医科学院 广安门医院 博士后流动站, 北京 100053;

3. 福建中医药大学, 福建 福州 350122; 4. 中国医学科学院 阜外医院 冠心病中心, 北京 100037;

5. 中日友好医院 心脏科, 北京 100029)

摘要 利用生信分析、网络药理学和细胞实验验证,探讨三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponins,PNS)对钙化诱导的人主动脉瓣膜间质细胞永生化细胞(human valvular interstitial cells,hVICs)影响及潜在作用机制。该研究利用成骨诱导培养基(os-teogenic induction medium,OM)处理 hVICs 建立钙化性主动脉瓣疾病(calcific aortic valve disease,CAVD)细胞模型,设置对照组、模型组及 PNS(0.075、0.05、0.025 mg·mL⁻¹)组。CCK-8 法检测细胞活力;碱性磷酸酯酶(alkaline phosphatase,ALP)和茜素红 S 染色检测钙化诱导情况;Western blot 检测钙化相关蛋白 Runt 相关转录因子 2(runt-related transcription factor 2,RUNX2)、骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein 2,BMP2)、ALP 的蛋白表达情况。通过基因表达汇编(Gene Expression Omnibus,GEO)数据库筛选 CAVD 相关转录组数据集,结合 GeneCards 中 CAVD 的疾病靶点,利用本草组鉴、Batman-TCM 2.0、ETCM 3 个数据库检索三七活性成分及相关作用靶点,对交集表达基因进行蛋白-蛋白互作(protein-protein interaction,PPI)网络构建、基因本体论(Gene Ontology,GO)功能及京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)通路富集分析,筛选出核心通路脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase,SYK)/核因子 κ B(nuclear factor kappa-B,NF- κ B)信号通路。通过 Western blot 检测改善钙化效果最佳剂量的 PNS 对 SYK/NF- κ B 信号通路相关蛋白表达的影响,采用免疫荧光共定位检测 NF- κ B p65 蛋白入核情况,利用酶联免疫吸附试验试剂盒检测人肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)、人白细胞介素-10(interleukin-10,IL-10)的表达情况。研究结果提示,PNS 可降低钙化诱导 hVICs 的茜素红 S、ALP 阳性染色程度,并降低钙化相关蛋白 BMP2、ALP、RUNX2 的表达($P<0.05$, $P<0.01$),其中 0.075 mg·mL⁻¹的 PNS 效果最佳。GEO 数据库筛选出 1 416 个差异基因,GeneCards 筛选获得 5 646 个 CAVD 疾病靶点。从本草组鉴、Batman-TCM 2.0、ETCM 数据库得到 605 个 PNS 药物靶点,与 CAVD 靶点取交集后得到 130 个公共靶点,主要参与调节炎症反应、脂多糖介导的信号通路、转录的正调控、蛋白磷酸化过程、NF- κ B 信号通路的正调控等生物学过程,多在膜筏、高尔基体等区域发生,涉及到激酶活性调节、蛋白质结合等分子功能,与脂质促进动脉粥样硬化、NF- κ B 等信号通路密切相关。实验结果指出,PNS 可显著降低 NF- κ B p65 蛋白表达($P<0.05$),显著升高 I κ B α 的表达($P<0.01$),显著抑制 p-SYK($P<0.01$)、p-I κ B α ($P<0.01$)、p-NF- κ B p65($P<0.01$)、p-NF- κ B p50($P<0.01$)蛋白表达,显著降低 NF- κ B p65 蛋白的细胞核/质的荧光强度($P<0.01$),显著降低 TNF- α 在上清液中分泌($P<0.01$),显著促进抗炎因子 IL-10 在上清液中的分泌($P<0.01$)。由此可知,PNS 可以通过下调 I κ B α 、NF- κ B p65、NF- κ B p50 的表达,抑制 SYK、I κ B α 、NF- κ B p65、NF- κ B p50 的磷酸化,减少 NF- κ B p65 入核,降低 TNF- α 的表达,改善 hVICs 的钙化程度。

关键词 三七总皂苷; 钙化性主动脉瓣疾病; 主动脉瓣膜间质细胞; SYK/NF- κ B 信号通路

Panax notoginseng saponins mediated inhibition of human aortic valve interstitial cell calcification via SYK/NF- κ B pathway

LI Hong-zheng^{1,2}, LIN Guo-sheng³, ZHANG Bin⁴, MENG Zhen⁵, LI Zi-ang⁴, LI Qiu-yi¹, CUI Xiao-shan¹, YU Zi-kai^{1*}

(1. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Cardiology, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical

收稿日期 2025-09-03

基金项目 国家自然科学基金青年基金项目(82104679);中国中医科学院基本科研业务费优秀青年科技人才培养专项(ZZ15-YQ-004);中国中医科学院西苑医院能力提升项目(XYZX0101-37,YJMPSC202422);北京慢性病防治与健康教育研究会、中关村人才协会医工领域“未来人才”培养计划项目(MBRC0012025023)

通信作者 * 于子凯,博士,副研究员,主治医师,主要从事中西医结合防治心血管病的临床与基础研究,E-mail: ztyuzikai@163.com

作者简介 李洪峥,博士,主治医师,主要从事中西医结合防治心血管病的临床与基础研究,E-mail: 20180931809@bucm.edu.cn

Sciences, Beijing 100091, China; 2. Postdoctoral Research Station, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China; 3. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 4. Coronary Heart Disease Center, Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China; 5. Department of Cardiology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

[Abstract] Using bioinformatics analysis, network pharmacology, and cellular experiments, this study investigated the effects and potential mechanisms of *Panax notoginseng* saponins (PNS) on osteogenic induction of immortalized human aortic valve interstitial cells (hVICs). A calcific aortic valve disease (CAVD) cell model was established by treating hVICs with osteogenic induction medium (OM). Experimental groups included a control group, a model group, and PNS treatment groups (0.075, 0.05, and 0.025 mg·mL⁻¹). Cell viability was assessed by the CCK-8 assay. Calcification was evaluated by alkaline phosphatase (ALP) and alizarin red S staining. Western blot was performed to measure the expression of calcification-related proteins runt-related transcription factor 2 (RUNX2), bone morphogenetic protein 2 (BMP2), and ALP. Transcriptomic datasets related to CAVD were obtained from the Gene Expression Omnibus (GEO) database, and CAVD disease targets were retrieved from GeneCards. Active components of PNS and their potential targets were collected from HERB, Batman-TCM 2.0, and ETCM databases. The intersecting genes were subjected to protein-protein interaction (PPI) network construction, Gene Ontology (GO) enrichment, and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analyses, identifying the spleen tyrosine kinase (SYK)/nuclear factor kappa-B (NF-κB) signaling pathway as a core pathway. Western blot was then used to assess the effects of PNS at the optimal concentration on SYK/NF-κB pathway-related proteins. NF-κB p65 nuclear translocation was examined by immunofluorescence co-localization, and ELISA was applied to measure tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-10 (IL-10) levels. Results showed that PNS reduced alizarin red S and ALP staining in calcification-induced hVICs and downregulated calcification-related proteins BMP2, ALP, and RUNX2 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), with the most significant effect observed at 0.075 mg·mL⁻¹. A total of 1 416 differentially expressed genes were identified from GEO, while 5 646 CAVD-related targets were obtained from GeneCards. From HERB, Batman-TCM 2.0, and ETCM, 605 PNS targets were collected, with 130 overlapping genes identified. These were mainly involved in inflammatory responses, lipopolysaccharide-mediated signaling, transcriptional regulation, protein phosphorylation, and NF-κB pathway activation, occurring primarily in membrane rafts and the golgi apparatus, with molecular functions such as kinase activity regulation and protein binding, and enriched in lipid metabolism, atherosclerosis, and NF-κB signaling pathways. Experimental validation showed that PNS significantly decreased NF-κB p65 expression ($P < 0.05$), significantly increased IκBα expression ($P < 0.01$), and markedly suppressed expression of p-SYK ($P < 0.01$), p-IκBα ($P < 0.01$), p-NF-κB p65 ($P < 0.01$), and p-NF-κB p50 ($P < 0.01$). PNS also significantly reduced NF-κB p65 nuclear/cytoplasmic fluorescence intensity ($P < 0.01$), decreased TNF-α secretion in the supernatant ($P < 0.01$), and promoted IL-10 secretion ($P < 0.01$). In conclusion, PNS ameliorates hVICs calcification by downregulating IκBα, NF-κB p65, and NF-κB p50 expression, inhibiting phosphorylation of SYK, IκBα, NF-κB p65, and NF-κB p50, reducing NF-κB p65 nuclear translocation, and suppressing TNF-α expression.

[Key words] *Panax notoginseng* saponins; calcific aortic valve disease; aortic valve interstitial cells; SYK/NF-κB signaling pathway

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20250926.802

钙化性主动脉瓣疾病 (calcific aortic valve disease, CAVD) 是以主动脉瓣叶纤维钙化病变为特征的心脏瓣膜病,可最终发展为重度主动脉瓣狭窄 (aortic valve stenosis, AS), 诱发晕厥、心力衰竭等不良事件,出现症状后两年病死率达 50%^[1-3]。流行病学研究显示,随着全球老龄化进程加速,CAVD 患病率呈显著上升趋势,已成为重大公共卫生负担^[4]。当前 CAVD 防治面临重大挑战,虽然他汀类药物曾被寄予厚望,但临床证据表明其无法有效延缓瓣膜钙化进程^[5]。迄今为止,临床上仍缺乏能够

阻断或逆转疾病进展的针对性药物^[6]。

从中医理论辨析,CAVD 的临床表现与病理机制符合“血瘀证”的基本特征。三七是活血化瘀中药的代表性药物之一,团队前期研究表明其主要有效成分三七总皂苷 (*Panax notoginseng* saponins, PNS) 在干预 CAVD 方面可起到改善主动脉瓣口面积、峰值流速,降低主动脉瓣钙化程度的作用^[7]。但是其具体作用机制仍需进一步探索。因此,本研究利用不同浓度 PNS 干预成骨诱导培养基 (osteogenic induction medium, OM) 诱导的人主动脉瓣膜

间质细胞永生化细胞(human valvular interstitial cells, hVICs),探索出对于改善 hVICs 钙化效果最佳剂量,而后结合 GeneCards 数据库、基因表达汇编(gene expression omnibus, GEO)数据库对 CAVD 疾病靶点进行挖掘,结合 PNS 有效成分的潜在作用靶点,探索 PNS 干预 CAVD 的潜在机制,并利用蛋白免疫印迹分析(Western blot)、酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫荧光共定位(immunofluorescence, IF)在钙化诱导的 hVICs 上进行验证,明确 PNS 干预 CAVD 的具体作用机制。

1 材料

1.1 细胞 hVICs(货号 HUM-iCell-c005)购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司。

1.2 药品与试剂 注射用血塞通(冻干)购自昆明制药集团股份有限公司(批号 2403B25)。原代主动脉瓣膜间质细胞专用培养基(货号 iCell-c005-002h)、iCell 间充质干细胞成骨诱导分化试剂盒(货号 iCell-MSCYD-002)购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司;细胞计数(cell counting kit-8, CCK-8)试剂盒(货号 C0038)、茜素红 S 染色液(0.2%, pH 8.3, 货号 C0140)购自上海碧云天生物技术有限公司;碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色(偶氮偶联法)试剂盒(货号 G1480)购自北京索莱宝科技有限公司;Runt 相关转录因子 2(Runt-related transcription factor 2, RUNX2)抗体(货号 AF5186)、骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)抗体(货号 AF5163)、脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, SYK)抗体(货号 AF5008)、p-SYK 抗体(货号 AF8404)、核因子 κ B 抑制蛋白 α (inhibitor of nuclear factor kappa B α , I κ B α)抗体(货号 AF5002)、磷酸化核因子 κ B(phospho-nuclear factor- κ B, p-NF- κ B) p50 抗体(货号 AF3219)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(货号 AF7018)、山羊抗兔二抗(货号 S0001)、山羊抗鼠二抗(货号 S0002)购自江苏亲和生物研究中心有限公司;phospho-I κ B α (p-I κ B α , Ser32/36)抗体(货号 68999-1-Ig)、NF- κ B p50 抗体(货号 14220-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司;NF- κ B p65 抗体(货号 ab32536)、p-NF- κ B p65 (S536)抗体(货号 ab76302)购自艾博抗(上海)贸易有限公司;人肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α , 货号 BMS2034TEN)、人白细胞

介素-10(interleukin-10, IL-10, 货号 88-7106-88)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;AF647 标记山羊抗兔 IgG(H+L)(货号 A0468)购自上海碧云天生物技术有限公司;抗荧光淬灭封片液[含 4',6-联脒-2'-苯基吲哚(4',6-diamidino-2'-phenylindole, DA-PI)](货号 P0131)购自上海碧云天生物技术有限公司;二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白检测试剂盒(货号 23225)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.3 仪器 倒置显微镜 型号 DM6000B, 徕卡显微镜系统(上海)贸易有限公司];冷冻离心机 型号 neofuge 15R, 力康生物医疗科技控股有限公司];共聚焦显微镜平台 型号 STELLARIS, 徕卡显微镜系统(上海)贸易有限公司];酶标仪 型号 Multiskan FC, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司];凝胶成像系统 型号 ChemiDocTM XRS+, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司];电泳仪 型号 Mini-PRO TEAN Tetra Cell, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司];小型转印槽(半干转印) 型号 Trans-Blot SD, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司];基础型电泳电源 型号 PowerPac Basic Power Supply, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司]。

2 方法

2.1 CCK-8 测定细胞活力 取正常生长的 hVICs, 以每孔 4×10^3 个的密度接种于 96 孔板中, 设置对照组(接种细胞、不加 OM)、模型组(接种细胞、加 OM)和 PNS 组(加 OM 及 0.01、0.025、0.05、0.075、0.1、0.25、0.5、0.75、1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PNS), PNS 干预 24 h, 每组 3 个复孔。每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL , 将培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 4 h, 采用酶标仪测定 450 nm 处吸光度, 计算细胞活力。

2.2 细胞分组、造模与给药 待 hVICs 融合度达到 80% 时, 使用 0.25% 胰蛋白酶进行消化与传代, 采用原代主动脉瓣膜间质细胞专用培养基重悬, 调节细胞数至每毫升 1×10^5 个接种于细胞培养瓶或 96 孔板内。设置对照组、模型组和 PNS 不同剂量(0.075、0.05、0.025 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)组。模型组与 PNS 不同剂量组在细胞生长至 80% 时, 弃掉专用培养基, 予 OM 诱导分化 3 周, 其中每 3 d 换用 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热后的新鲜 OM。PNS 组在造模的第 20 天, 予分化培养基的同时给予药物。

2.3 碱性磷酸酶染色评估钙化情况 吸去 12 孔板

中的培养基,用 1×磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)清洗 3~4 次,沥去多余水分。使用 4℃ 预冷的 ALP 固定液固定 1 min 后,用蒸馏水洗涤,沥去多余水分。取 B1、B2 按 1:1 比例混匀,即为 ALP 孵育液,滴加 ALP 孵育液覆盖细胞,置于 37℃ 恒温箱孵育 20 min。取出后,用蒸馏水洗。沥去多余水分后,在倒置显微镜下观察和拍照。

2.4 茜素红 S 染色评估钙化情况 将 12 孔板中细胞用 1×PBS 洗 3 次,95% 乙醇固定 10 min 后再用 1×PBS 洗 3 次。加入适量茜素红 S 染色液,37℃ 烘箱孵育 30 min,蒸馏水充分洗涤,随后即可在倒置显微镜下观察和拍照。

2.5 PNS 活性成分及靶点获取 从本草组鉴 HERB (<http://herb.ac.cn/>)^[8]、Batman-TCM 2.0 (<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>)^[9]、ETCM (<http://www.temip.cn/ETCM/>)^[10] 3 个数据库以“Sanqi”“三七”“*Panax notoginseng*”为检索词,检索中药三七活性成分及相关作用靶点。

2.6 主动脉瓣钙化靶点数据获取 以“calcific aortic valve disease”为关键词,从 GeneCards 数据库(<http://www.genecards.org/>)进行检索^[11],并从 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中查找,获取到 GSE77287 数据集并下载转录组测序数据,取交集获得 CAVD 靶点。

2.7 活性化合物与疾病靶点的交集 将 PNS 中活性成分的靶点和 CAVD 的靶点取交集,使用 Jvenn 平台绘制韦恩图^[12],得到 PNS-CAVD 的交集靶点。

2.8 蛋白-蛋白互作(PPI)网络构建 将交集靶点导入到 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)中,获取目标蛋白的 PPI 网络,交互程度的分析标准是“置信度(0.7)”。在 Cytoscape 3.9.1 中,通过对 PPI 的可视化处理,建立 PPI。选择介数中心性、接近中心性和平均最短路径长度高于 PPI 网络中相应中值的目标节点,并预测可能的核心目标,以供进一步研究。

2.9 基因本体论(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)途径分析 利用 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行 KEGG 与 GO 分析^[13]。利用 GO 进行生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)及分子作用(molecular function, MF)的研究。通过对 KEGG 信

息的丰富度分析,可以找到一些关键的生物学功能相关分子机制,将 GO 和 KEGG 数据上传至生物信息学平台进行可视化分析。

2.10 ELISA 检测细胞上清中炎症因子分泌情况 收集各组细胞上清液,按照试剂盒说明书要求,分别检测细胞上清液中 TNF- α 和 IL-10 的分泌水平。

2.11 Western blot 检测钙化与 SYK/NF- κ B 信号通路相关蛋白表达 将状态良好的 hVICs 从培养瓶中消化下来,以 1.0×10^5 个每皿种在大皿中,经 OM 与 PNS-H 干预后,弃去培养基,收集各组细胞,分别提取细胞总蛋白,使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,加入 5% 脱脂牛奶,室温条件下在摇床封闭 2 h。经 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min 后,弃掉 TBST,分别加入相应抗体(1:1 000 稀释 BMP2 抗体,1:1 000 稀释 RUNX2 抗体,1:1 000 稀释 SYK 抗体,1:2 000 稀释 p-SYK 抗体,1:1 000 稀释 I κ B α 抗体,1:6 000 稀释 p-I κ B α 抗体,1:5 000 稀释 NF- κ B p65 抗体,1:1 000 稀释 NF- κ B p65 phospho S536 抗体,1:20 000 稀释 NF- κ B p50 抗体,1:1 000 稀释 p-NF- κ B p50 抗体,1:5 000 稀释 β -actin 抗体),4℃ 摇床过夜孵育。回收一抗后,用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min 后,弃掉 TBST,加入二抗(山羊抗鼠二抗、山羊抗兔二抗稀释比例均为 1:5 000),室温条件下摇床孵育 2 h,加入 ECL 发光试剂显影并拍照,采用 ImageJ 软件分析条带灰度值。

2.12 IF 检测 将状态良好的 hVICs 从培养瓶中消化下来,以每皿 1.0×10^5 个的数量种在共聚焦小皿中,经 OM 与 PNS 干预后,弃去培养基,使用 PBS 清洗细胞 3 次,每次 5 min。而后使用免疫染色固定液固定细胞 20 min,弃去免疫染色固定液,使用 PBS 清洗细胞 3 次,每次 5 min。使用免疫染色通透液 10 min,弃去免疫染色通透液,使用 PBS 清洗细胞 3 次,每次 5 min。以 1:300 配制 NF- κ B p65 抗体,4℃ 过夜孵育,后弃掉一抗,用 PBS 清洗细胞 3 次,每次 5 min,而后加入以 PBS 配制的 AF647 标记山羊抗兔 IgG (H+L) (1:500 稀释),室温条件下避光孵育 2 h。弃掉荧光二抗,在避光条件下,用 PBS 清洗细胞 3 次,每次 5 min,加入含 DAPI 的抗荧光淬灭封片液,用激光共聚焦显微镜观察,用 ImageJ 统计荧光量。

2.13 统计学分析 用 SPSS 27 软件进行统计分析,用 GraphPad Prism 10 软件绘图。计量数据资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据比较用单因素方差分析,组间两两比较用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 PNS 浓度选择 与对照组比较,模型组细胞活力显著降低($P < 0.01$),提示细胞受损严重;与模型组相比,0.05、0.075 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PNS 可显著提高细胞活力($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$),且 PNS 在 0.01 ~ 0.075 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内呈剂量相关性,提示 PNS 对钙化诱导的 hVICs 具有保护作用。因此,选择 0.075、0.05、0.025 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PNS 分别作为高、中、低剂量用于后续效应验证,见表 1。

3.2 PNS 抑制 hVICs 的 ALP、茜素红 S 染色阳性程度 通过 ALP 与茜素红 S 对各组 hVICs 进行染色。OM 诱导干预后的 hVICs 具有成骨钙化能力,ALP 染色呈现蓝色阳性、茜素红 S 染色呈现红色阳性。

表 1 三七总皂苷对人主动脉瓣膜间质细胞永生细胞活力影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of *Panax notoginseng* saponins on viability of immortalized hVICs($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	细胞活力/%
对照	—	100.40 ± 0.66
模型	—	45.70 ± 2.78 ²⁾
PNS	0.01	45.73 ± 1.76
	0.025	49.28 ± 1.71
	0.05	52.32 ± 2.62 ³⁾
	0.075	53.94 ± 2.49 ⁴⁾
	0.1	50.99 ± 3.13
	0.25	50.55 ± 2.47
	0.5	46.40 ± 1.50
	0.75	43.90 ± 1.80
	1.0	39.50 ± 1.79

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~5 同)。

PNS 会减少成骨诱导过程中的钙化,且呈现一定的剂量依赖关系——随着 PNS 浓度的增加,细胞钙化程度降低,见图 1、2。

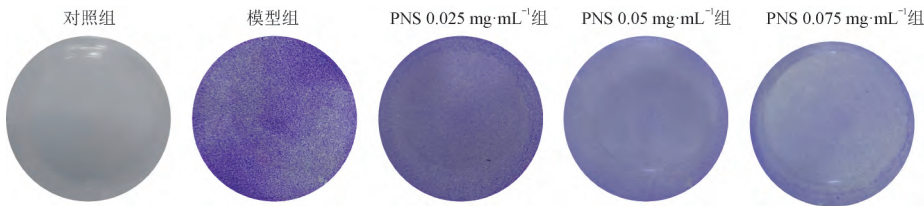
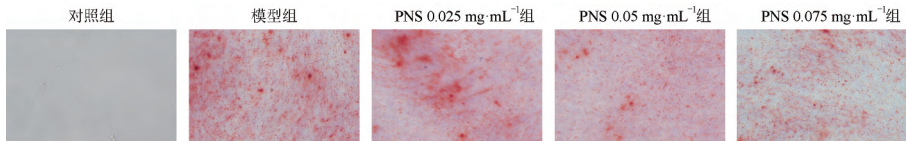


图 1 不同剂量三七总皂苷干预钙化诱导的 hVICs 的 ALP 染色($\times 40$)

Fig.1 ALP staining of calcification-induced hVICs treated with different doses of *Panax notoginseng* saponins ($\times 40$)



标尺为 100 μm 。

图 2 不同剂量 PNS 干预钙化诱导的 hVICs 的茜素红 S 染色($\times 200$)

Fig.2 Alizarin red S staining of calcification-induced hVICs treated with different doses of PNS ($\times 200$)

3.3 PNS 抑制 hVICs 钙化相关蛋白表达 Western blot 结果显示,与对照组比较,模型组钙化相关蛋白 BMP2、RUNX2、ALP 表达水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,PNS 各剂量组钙化相关蛋白表达水平均有所降低。其中,0.075 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PNS 可显著降低 BMP2、RUNX2、ALP 蛋白的表达($P < 0.01$),0.05 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PNS 可显著降低 ALP 蛋白的表达

($P < 0.05$),0.025 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PNS 虽可降低钙化相关蛋白的表达,但是差异无统计学意义,见表 2。由此可知,0.075 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PNS 抑制钙化相关蛋白 BMP2、RUNX2、ALP 表达效果最佳,干预钙化诱导的 hVICs 效果最为明显,见图 3。

3.4 CAVD 与 PNS 靶点预测 在 GEO 数据库中,通过对 GSE77287 数据集进行挖掘(3 例 normal,

表 2 三七总皂苷对人主动脉瓣膜间质细胞永生化细胞钙化相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of *Panax notoginseng* saponins on the relative expression of calcification-related proteins on immortalized hVICs($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	BMP2	RUNX2	ALP
对照	—	1.000 $\pm$ 0.086	1.000 $\pm$ 0.409	1.000 $\pm$ 0.281 5
模型	—	2.046 $\pm$ 0.147 ²⁾	2.980 $\pm$ 0.132 ²⁾	2.960 $\pm$ 0.312 2 ²⁾
PNS	0.025	1.840 $\pm$ 0.293	2.738 $\pm$ 0.273	2.256 $\pm$ 0.482 3
	0.050	1.537 $\pm$ 0.164	2.177 $\pm$ 0.391	1.930 $\pm$ 0.388 1 ³⁾
	0.075	1.110 $\pm$ 0.255 ⁴⁾	1.213 $\pm$ 0.457 ⁴⁾	1.096 $\pm$ 0.160 3 ⁴⁾

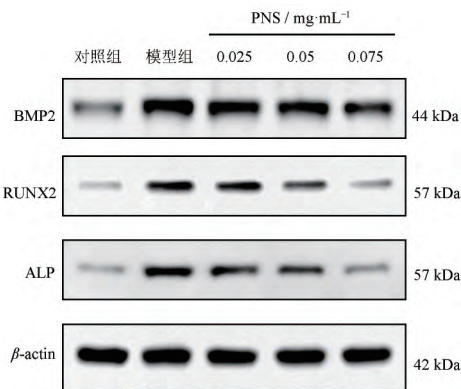


图 3 不同剂量三七总皂苷干预钙化诱导的 hVICs 后钙化相关蛋白 BMP2、RUNX2、ALP 的表达

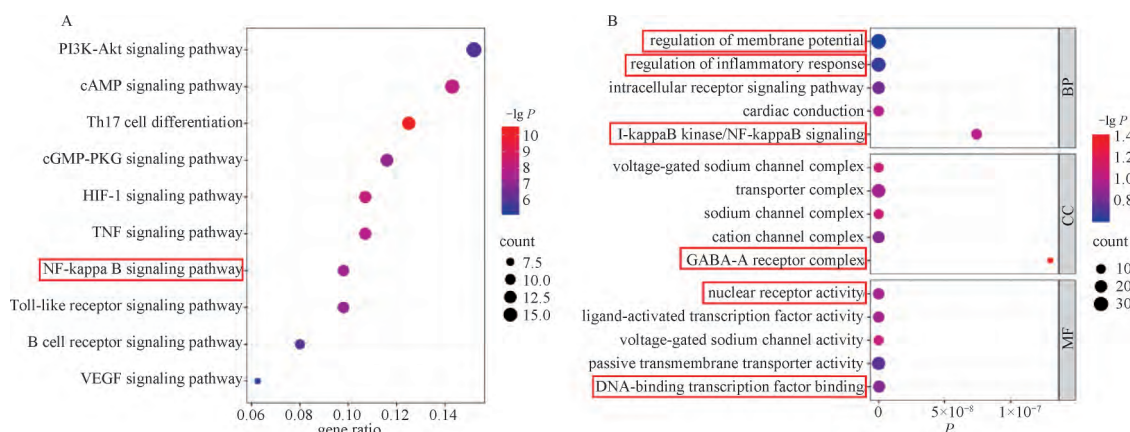
Fig. 3 Expression of calcification-related proteins BMP2, RUNX2, and ALP in calcification-induced hVICs after intervention with different doses of *Panax notoginseng* saponins

3 例 CAVD) 分析,共获得 1 416 个差异基因,其中包括了 1 060 个下调基因,356 个上调基因,见中国知网增强出版附加材料图 1A、1B。在 GeneCards 以“calcific aortic valve disease”为关键词,检索疾病相关靶点,共得到 5 646 个靶点。从本草组鉴、Batman-TCM 2.0、ETCM 上得到三七相关靶点,去除重复项后共得到 605 个药物靶点,与 CAVD 靶点取交集后得到 130 个公共靶点,见中国知网增强出版附加材料图 1C。PPI 网络关系见中国知网增强出版附加材料图 1D。

3.5 GO 富集与 KEGG 富集分析 利用 DAVID 数据库对 130 个交集靶点基因做 GO 功能富集和 KEGG 通路分析。按 $P<0.01$ 筛选出相关信号通路,选择前 10 个条目进行展示,在微生信平台可视化柱状图,其纵轴表示富集条目的数量,横轴反映条目名称。KEGG 富集分析结果提示,PNS 主要通过磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B(phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase B,PI3K-Akt) 信号通路、环磷

酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate,cAMP) 信号通路、辅助性 T 细胞 17(T helper 17,Th17) 分化、核因子 κB (nuclear factor kappa-B,NF- κB) 信号通路等,对 CAVD 起到治疗作用,见图 4A。设置 $P<0.01$,筛选出每个条目的前 5 条结果展示,GO 分析提示,PNS 干预 CAVD 主要参与调节炎症反应、细胞膜功能调节、细胞内受体信号通路、心脏收缩、I κB /NF- κB 信号通路等生物学过程,多在电压门离子通道复合物、离子通道复合物、GABA-A 受体复合物等区域发生,涉及到核受体活性、配体激活的转录因子活性、电压门控钠通道活性、被动跨膜转运蛋白活性、DNA 结合转录因子结合等分子功能,见图 4B。其中,脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase,Syk)、I κB 、NF- κB p50 蛋白等广泛富集在 NF- κB 通路基因中,见中国知网增强出版附加材料图 2。鉴于此,本研究综合 GO 与 KEGG 富集分析情况,针对 SYK/NF- κB 信号通路探索 PNS 治疗 CAVD 的具体机制。

3.6 PNS 抑制 hVICs SYK/NF- κB 信号通路 与对照组比较,模型组 SYK/NF- κB 信号通路相关蛋白 p-SYK($P<0.01$)、p-I $\kappa\text{B}\alpha$ ($P<0.01$)、NF- κB p65($P<0.01$)、p-NF- κB p65($P<0.01$)、NF- κB p50($P<0.01$)、p-NF- κB p50($P<0.01$) 蛋白表达水平显著升高,I $\kappa\text{B}\alpha$ 相比对照组而言显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,OM 诱导的 hVICs 经 $0.075\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 PNS 干预后,p-SYK($P<0.01$)、p-I $\kappa\text{B}\alpha$ ($P<0.01$)、NF- κB p65($P<0.05$)、p-NF- κB p65($P<0.01$)、p-NF- κB p50($P<0.01$) 蛋白表达水平显著降低,而 PNS 干预后 I $\kappa\text{B}\alpha$ 的相对表达量显著升高($P<0.01$)。可知, $0.075\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 PNS 在不改变 SYK 总蛋白的情况下,可抑制其磷酸化进程,促进 I $\kappa\text{B}\alpha$ 的表达,抑制 NF- κB p65 的表达,并抑制 I $\kappa\text{B}\alpha$ 、NF- κB p65、NF- κB p50 的磷酸化,见图 5、表 3。



方框内容代表支持本文后续通路相关的蛋白检测依据。A.KEGG 分析; B.GO 分析 [生物过程(BP)、细胞组分(CC)、P 分子功能(MF)]。

图 4 基于交集靶点预测三七总皂苷干预 CAVD 的潜在作用机制与通路

Fig.4 Prediction of potential mechanisms and pathways of *Panax notoginseng* saponins intervention in CAVD based on intersection targets

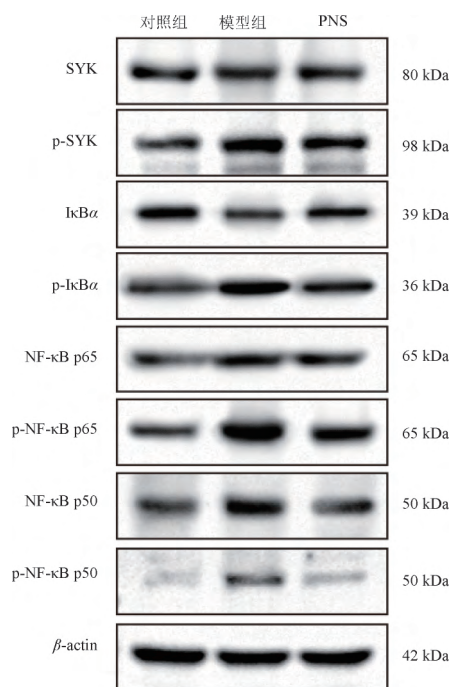


图 5 三七总皂苷干预 SYK/NF-κB 信号通路相关蛋白的表达

Fig. 5 Expression of SYK/NF-κB signaling pathway-related proteins after *Panax notoginseng* saponins intervention

3.7 PNS 抑制 hVICs NF-κB p65 入核 经钙化诱导后, NF-κB p65 蛋白的细胞核/细胞质荧光强度显著升高($P < 0.01$), 而 $0.075 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PNS 处理后, NF-κB p65 蛋白在细胞核的荧光强度较细胞质荧光强度显著降低($P < 0.01$), 统计结果见表 4。可知, 钙化诱导促进 hVICs 的 NF-κB p65 蛋白从细胞

质进入细胞核, PNS 干预后, NF-κB p65 蛋白的入核量降低, PNS 抑制了 NF-κB p65 入核, 见图 6。

3.8 PNS 调控 hVICs 上清炎症因子分泌 经钙化诱导后, 细胞上清液中促炎因子 TNF- α 的表达量显著升高($P < 0.01$), 抗炎因子 IL-10 的表达量显著降低($P < 0.01$)。经 $0.075 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PNS 干预后, 促炎因子 TNF- α 的表达量较模型组显著降低($P < 0.01$), 抗炎因子 IL-10 的表达量较模型组显著升高($P < 0.01$)。PNS 抑制了钙化诱导的 hVICs 促炎因子释放, 并促进了抗炎因子释放, 见表 5。

4 讨论

CAVD 是导致 AS 的主要病理基础, 已成为全球心血管疾病发病率和病死率的重要诱因。当前全球 CAVD 的患病人群约 900 万人, 随着老龄化的进程, 在过去的 20 年里, 死于钙化性主动脉狭窄的人数持续上升^[14]。该疾病的病理进程呈现渐进性特征, 约 25% 的老年人群存在早期表现为主动脉瓣小叶纤维化增厚的瓣膜硬化的病理改变, 进而逐步发展为伴有显著纤维钙化病变的症状性 AS^[13]。随着疾病的进展, 患者只能接受外科主动脉瓣置换术/修补术和经导管主动脉瓣置换术, 尚缺乏经临床验证有效的药物治疗方案——这一治疗现状直接导致全球每年需实施约 40 万例主动脉瓣置换手术^[14], 消耗大量医疗资源, 仅美国每年的相关医疗支出就高达 100 亿美元^[17]。时空多组学图谱揭示, 炎症是诱发 CAVD 进展的重要因素之一^[18], 而针对糖酵解、

表 3 三七总皂苷对 hVICs SYK/NF-κB 信号通路相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

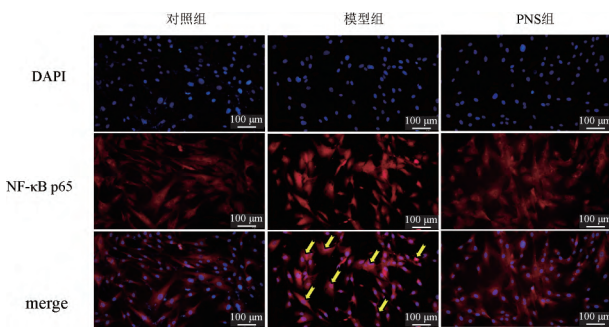
Table 3 Effect of *Panax notoginseng* saponins on the relative expression of SYK/NF-κB signaling pathway-related proteins on immortalized hVICs($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 /mg·mL ⁻¹	p-SYK/SYK	SYK	p-IκBα/IκBα	IκBα	p-NF-κB p65 /NF-κB p65	NF-κB p65	p-NF-κB p50 /NF-κB p50	NF-κB p50
对照	-	1.000±0.018	1.000±0.065	1.000±0.059	1.000±0.015	1.000±0.063	1.000±0.063	1.000±0.021	1.000±0.141
模型	-	1.672±0.066 ²⁾	1.068±0.045	1.722±0.055 ²⁾	0.708±0.048 ¹⁾	2.194±0.238 ²⁾	1.478±0.095 ²⁾	2.905±0.082 ²⁾	1.497±0.146 ²⁾
PNS	0.075	1.332±0.036 ⁴⁾	1.027±0.111	1.395±0.099 ⁴⁾	0.878±0.024 ⁴⁾	1.328±0.100 ⁴⁾	1.178±0.084 ³⁾	1.431±0.106 ⁴⁾	1.206±0.178

表 4 三七总皂苷对 hVICs NF-κB p65 入核的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of *Panax notoginseng* saponins on the nuclear translocation of NF-κB p65 in immortalized hVICs($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·mL ⁻¹	细胞核/细胞质中 NF-κB p65
对照	-	1.077±0.067
模型	-	1.705±0.081 ²⁾
PNS	0.075	1.199±0.087 ⁴⁾



黄色箭头指向模型组中入核 NF-κB p65 蛋白; 标尺为 100 μm。

图 6 三七总皂苷干预钙化诱导的 hVICs 后 NF-κB p65 表达位置(免疫荧光; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig.6 Localization of NF-κB p65 expression in calcification-induced hVICs after *Panax notoginseng* saponins intervention(immunofluorescence; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 5 三七总皂苷对 hVICs 上清液中炎症因子表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of *Panax notoginseng* saponins on the expression of inflammatory factors on immortalized hVICs($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·mL ⁻¹	TNF-α/pg·mL ⁻¹	IL-10/pg·mL ⁻¹
对照	-	19.680±1.786	30.350±2.880
模型	-	80.260±9.659 ²⁾	12.480±1.437 ²⁾
PNS	0.075	44.500±3.737 ⁴⁾	23.360±1.617 ⁴⁾

NF-κB 等信号通路的抗炎治疗能够有效延缓成骨钙化的进程^[9]。因此,进一步探索抗炎相关药物在治疗 CAVD 中的作用机制具有重要意义。

中药因其多成分、多靶点的作用特点,与 CAVD 复杂病理机制相契合,在 CAVD 的防治中具有显著

优势^[2]。中药三七 *P. notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 为五加科人参属植物,始载于明代《本草纲目》,有散瘀止血、消肿定痛的功效^[21],皂苷、黄酮、多糖、氨基酸等是三七的主要有效成分^[22-24]。临床研究指出,口服三七粉可预防心瓣膜病变术后的血栓形成^[25]。PNS 及其他三七制剂还可通过 NF-κB 介导的炎症通路、NLRP3 介导的自噬通路等,发挥降低剪切应力,抗炎、抗血栓形成,抗动脉粥样硬化等作用^[26-28]。间质细胞钙化是 CAVD 发展的核心病理环节,以 ALP、茜素红 S 等钙化相关染色阳性,及 ALP、BMP2、RUNX2 等钙化相关蛋白表达升高为主要体现^[29]。本团队前期研究证实,PNS 可改善间质细胞钙化^[3]。基础研究进一步证实,PNS 可降低 ALP、p-NF-κB p65/NF-κB p65 的表达^[30],抑制 NF-κB 通路活化^[31],降低炎症反应。本研究综合运用 GEO 数据库挖掘与网络药理学的方法指出,PNS 干预 CAVD 与 NF-κB 信号通路有关,尤其与广泛富集在 NF-κB 通路的 SYK、TNF 等基因有关。鉴于此,考虑 PNS 可能通过 SYK/NF-κB 信号通路对 CAVD 间质细胞钙化发挥治疗作用。

SYK 是一种非受体酪氨酸激酶,通常被 TNF-α 等促炎因子激活后触发促炎信号,激活免疫受体,进而通过磷酸化 NF-κB 上游信号分子,促进 IκBα 的降解,释放 NF-κB(p65/p50 二聚体)入核^[32-33]。NF-κB 入核后,进一步促进 TNF-α 等促炎因子和 BMP2、RUNX2 等促钙化基因的表达,加速瓣膜间质细胞钙化。同时,NF-κB 入核后还可促进 SYK 的转录,形成正反馈循环,放大炎症信号。本研究利用 PNS 干预 OM 诱导的 hVICs 钙化,体外实验结果指出,PNS 可抑制 SYK 蛋白磷酸化,减轻其对下游通路的激活,并下调 IκBα、NF-κB p65、NF-κB p50 蛋白的表达,抑制 NF-κB 上游信号分子 IκBα 及 NF-κB p65、NF-κB p50 的磷酸化进程。并且进一步抑制 NF-κB p65 入核,减少 TNF-α 的释放。同时也阻断

了 TNF- α 诱发的 SYK/NF- κ B 信号通路激活,进一步降低钙化相关蛋白 ALP、BMP2、RUNX2 的表达,抑制了间质细胞钙化。

由于目前尚缺乏针对 CAVD 的标准阳性对照药物^[6],且本研究主要聚焦于 PNS 调控 hVICs 的作用机制,因此未设置阳性对照组。后续研究将结合 CAVD 领域最新进展,在药效学评价中引入潜在治疗 CAVD 的抗钙化药物,通过对比分析 PNS 的作用效果及通路特异性,进一步明确其临床转化价值。

综上,PNS 可以通过下调 I κ B α 、NF- κ B p65、NF- κ B p50 的表达,并抑制 SYK、I κ B α 、NF- κ B p65、NF- κ B p50 的磷酸化,减少 NF- κ B p65 入核,进而抑制 TNF- α 的表达,改善 hVICs 的钙化。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] LEON M B, SMITH C R, MACK M, et al. Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery [J]. N Engl J Med, 2010,363(17):1597.
- [2] OTTO C M, NEWBY D E, HILLIS G S. Calcific aortic stenosis: a review [J]. J Am Med Assoc, 2024,332(23):2014.
- [3] YI B, ZENG W, LV L, et al. Changing epidemiology of calcific aortic valve disease: 30-year trends of incidence, prevalence, and deaths across 204 countries and territories [J]. Aging (Albany NY), 2021,13(9):12710.
- [4] SMALL A M, YUTZEY K E, BINSTADT B A, et al. Unraveling the mechanisms of valvular heart disease to identify medical therapy targets: a scientific statement from the american heart association [J]. Circulation, 2024,150(6):e109.
- [5] MOURA L M, RAMOS S F, ZAMORANO J L, et al. Rosuvastatin affecting aortic valve endothelium to slow the progression of aortic stenosis [J]. J Am Coll Cardiol, 2007,49(5):554.
- [6] COWELL S J, NEWBY D E, PRESCOTT R J, et al. A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis [J]. N Engl J Med, 2005,352(23):2389.
- [7] 李洪峰,刘天娇,商祖诚,等.三七总皂苷抑制 JNK/c-Jun 信号通路干预钙化性主动脉瓣疾病的效应及机制研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2024,47(11):1550.
- [8] FANG S, DONG L, LIU L, et al. HERB: a high-throughput experiment- and reference-guided database of traditional Chinese medicine [J]. Nucleic Acids Res, 2021,49(D1):D1197.
- [9] KONG X, LIU C, ZHANG Z, et al. BATMAN-TCM 2.0: an enhanced integrative database for known and predicted interactions between traditional Chinese medicine ingredients and target proteins [J]. Nucleic Acids Res, 2024,52(D1):D1110.
- [10] XU H Y, ZHANG Y Q, LIU Z M, et al. Etem: an encyclopaedia of traditional Chinese medicine [J]. Nucleic Acids Res, 2019,47(D1):D976.
- [11] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The genecards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. Curr Protoc Bioinform, 2016,54:1.30.1.
- [12] PHILIPPE B, JÉRÔME M, FRÉDÉRIC E, et al. Jvenn: an interactive venn diagram viewer [J]. BMC Bioinform, 2014, 15:293.
- [13] DENNIS G J R, SHERMAN B T, HOSACK D A, et al. David: database for annotation, visualization, and integrated discovery

- [14] COFFEY S, ROBERTS-THOMSON R, BROWN A, et al. Global epidemiology of valvular heart disease [J]. Nat Rev Cardiol, 2021,18(12):853.
- [15] TASTET L, ALI M, PIBAROT P, et al. Grading of aortic valve calcification severity and risk stratification in aortic stenosis [J]. J Am Heart Assoc, 2024,13(15):e035605.
- [16] ZILLA P, BRINK J, HUMAN P, et al. Prosthetic heart valves: catering for the few [J]. Biomaterials, 2008,29(4):385.
- [17] MOORE M, CHEN J, MALLOW P J, et al. The direct health-care burden of valvular heart disease: evidence from US national survey data [J]. Clinicoecon Outcomes Res, 2016,8:613.
- [18] SCHLOTTER F, HALU A, GOTO S, et al. Spatiotemporal multi-omics mapping generates a molecular atlas of the aortic valve and reveals networks driving disease [J]. Circulation, 2018,138(4):377.
- [19] WANG S, YU H, GAO J, et al. PALMD regulates aortic valve calcification via altered glycolysis and NF- κ B-mediated inflammation [J]. J Biol Chem, 2022,298(5):101887.
- [20] 黄琴,王玥,李晓蓉,等.小檗碱抑制钙盐诱导主动脉瓣膜间质细胞成骨分化 [J]. 中国中药杂志, 2022,47(11):3059.
- [21] 王梅,尹旻臻,彭华胜.三七的基原、产区及其传播考证:基于明清文献史料 [J]. 中国中药杂志, 2025,50(11):2938.
- [22] 石礼平,张国壮,刘丛盛,等.三七化学成分和药理作用研究概况及质量标志物的预测 [J]. 中国中药杂志, 2023,48(8):2059.
- [23] 王莹,褚扬,李伟,等.三七中皂苷成分及其药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(9):1381.
- [24] 杨杰,王艳林,杨迪,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS 和 HPLC-DAD 的三七黄酮类成分定性定量研究 [J]. 中国中药杂志, 2023,48(13):3462.
- [25] 刘宏胜,张万祥,王铭革.口服三七粉对心瓣膜病变术后预防血栓形成的临床观察 [J]. 中草药, 2002, 33(7):1.
- [26] LIU L, LI J, WANG Y, et al. Effects of Panax notoginseng saponins on alleviating low shear induced endothelial inflammation and thrombosis via Piezo1 signalling [J]. J Ethnopharmacol, 2024,335:118639.
- [27] YUAN Z, LIAO Y, TIAN G, et al. Panax notoginseng saponins inhibit zymosan A induced atherosclerosis by suppressing integrin expression, FAK activation and NF- κ B translocation [J]. J Ethnopharmacol, 2011,138(1):150.
- [28] ZHOU Z, HE M, ZHAO Q, et al. Panax notoginseng saponins attenuate neuroinflammation through txnip-mediated NLRP3 inflammasome activation in aging rats [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2021,22(10):1369.
- [29] 赵全公,王国坤,徐志云.虾青素通过激活 Nrf2/HO-1 通路抑制瓣膜间质细胞钙化 [J]. 药学实践与服务, 2025, 43(6):283.
- [30] 沈磊,董林,贺福义,等.三七总皂苷调节 RAGE/MAPK/NF- κ B 信号通路对糖尿病骨质疏松大鼠骨密度及骨代谢的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2024,44(23):5768.
- [31] 蒋斯,周彪,李晔,等.三七总皂苷通过 p38MAPK/NF- κ B 信号通路对大鼠牙髓炎的抗炎作用 [J]. 免疫学杂志, 2024, 40(9):716.
- [32] SHIN D, KIM S, LEE H, et al. PCSK9 stimulates Syk, PKC δ , and NF- κ B, leading to atherosclerosis progression independently of LDL receptor [J]. Nat Commun, 2024,15(1):2789.
- [33] LI S, ZHANG Y, LU R, et al. Peroxiredoxin 1 aggravates acute kidney injury by promoting inflammation through Mincle/Syk/NF- κ B signaling [J]. Kidney Int, 2023,104(2):305.

责任编辑 杨驰