

- 116(11): 1226-1233.
- [19] TABAS I. The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2010, 107(7): 839-850.
- [20] CHEN M T, HUANG R L, OU L J, et al. Pollen Typhae total flavone inhibits endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in human aortic-vascular smooth muscle cells through down-regulating PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP pathway [J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25(8): 604-612.
- [21] GALBIATI F, VOLONTE D, ENGELMAN J A, et al. Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade [J]. *EMBO J*, 1998, 17(22): 6633-6648.
- [22] PARK W Y, PARK J S, CHO K A, et al. Up-regulation of caveolin attenuates epidermal growth factor signaling in senescent cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(27): 20847-20852.
- [23] JIA L, WANG L, WEI F, et al. Effects of Caveolin-1-ERK1/2 pathway on endothelial cells and smooth muscle cells under shear stress [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2020, 245(1): 21-33.
- [24] 诸骏仁, 高润霖, 赵水平, 等. 中国成人血脂异常防治指南(2016年修订版) [J]. *中国循环杂志*, 2016, 31(10): 937-953.
- [25] EMINI V B, PERROTTA P, DE MEYER G R A, et al. Animal models of atherosclerosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 5(816): 3-13.

【责任编辑：侯丽颖】

丹参酮 II A 减轻棕榈酸诱导的心肌细胞凋亡及内质网应激

王亚丹, 艾景雪, 高瑞, 李运丽, 张海波
(河南大学第一附属医院心内三科, 河南开封 475000)

摘要:【目的】探讨丹参酮 II A 对棕榈酸诱导心肌细胞脂毒性损伤模型内质网应激凋亡的影响。【方法】将对数期 H9c2 细胞分 6 组, 即对照组, 棕榈酸 (400 $\mu\text{mol/L}$) 组, 丹参酮 II A 20 $\mu\text{mol/L}$ 组和棕榈酸+丹参酮 II A (5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 组, 另外引入棕榈酸+CCT020312 组与棕榈酸+CCT020312+丹参酮 II A 20 $\mu\text{mol/L}$ 组考察通路激活状态。细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 法测定 H9c2 细胞活力; 流式细胞术测定细胞凋亡情况; 实时定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 法检测细胞内质网应激相关分子葡萄糖调控蛋白 78 (GRP78)、转录激活因子 4 (ATF4) 和 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白 (CHOP) 的 mRNA 表达水平; 蛋白免疫印迹 (Western Blot) 法检测细胞 GRP78、ATF4、CHOP、Caspase-3、Caspase-9、Caspase-12、蛋白激酶 RNA 样内质网激酶 (PERK)、磷酸化 PERK (p-PERK)、真核生物翻译起始因子 2 α (eIF2 α)、磷酸化 eIF2 α (p-eIF2 α) 的蛋白表达水平。【结果】与对照组比较, 棕榈酸组细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$), GRP78、ATF4、CHOP mRNA 和蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$), H9c2 细胞的凋亡率升高, p-PERK/PERK 和 p-eIF2 α /eIF2 α 比例也显著增大 ($P < 0.01$), 凋亡相关分子 Caspase-3、Caspase-9 和 Caspase-12 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$)。不同浓度丹参酮 II A 作用后, 与棕榈酸组比较, 棕榈酸+丹参酮 II A (5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 组细胞存活率显著升高 ($P < 0.01$), GRP78、ATF4、CHOP mRNA 和蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), H9c2 细胞的凋亡率降低, p-PERK/PERK 和 p-eIF2 α /eIF2 α 比例也显著减小 ($P < 0.01$), Caspase-3、Caspase-9 和 Caspase-12 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 均具有剂量依赖性, 且棕榈酸+丹参酮 II A 10 $\mu\text{mol/L}$ 组 ($P < 0.05$) 和棕榈

收稿日期: 2020-06-12

作者简介: 王亚丹 (1982-), 女, 硕士, 主治医师; E-mail: wyd13592133542@163.com

通讯作者: 艾景雪 (1989-), 女, 硕士, 住院医师; E-mail: 362456141@qq.com

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (编号: 2018020313)

酸+丹参酮 II A 20 $\mu\text{mol/L}$ 组 ($P < 0.05$) 变化显著。加入 PERK 通路激活剂 CCT020312 作用后, 与棕榈酸组比较, 棕榈酸+CCT020312 组的 p-PERK/PERK 和 p-eIF2 α /eIF2 α 比例, 细胞凋亡率, GRP78、ATF4、CHOP 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$); 再经过丹参酮 II A 处理, 与棕榈酸+CCT020312 组比较, 棕榈酸+CCT020312+丹参酮 II A 组的 p-PERK/PERK 和 p-eIF2 α /eIF2 α 比例, 细胞凋亡率, GRP78、ATF4、CHOP 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著回降 ($P < 0.05$)。【结论】丹参酮 II A 可减轻心肌细胞脂毒性损伤, 其机制与其通过抑制 PERK 信号通路活化来减轻棕榈酸诱导的心肌 H9c2 细胞凋亡, 并且控制内质网应激反应有关。

关键词: 丹参酮 II A; 脂毒性损伤; 凋亡; 内质网应激; PERK 信号通路; 棕榈酸; 心肌细胞

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)08-1685-08

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.08.027

Tanshinone II A Reduces Palmitic Acid-Induced Cardiomyocyte Apoptosis and Endoplasmic Reticulum Stress

WANG Ya-Dan, AI Jing-Xue, GAO Rui, LI Yun-Li, ZHANG Hai-Bo

(Dept. 3 of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Henan University, Kaifeng 475000 Henan, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of tanshinone II A on endoplasmic reticulum stress-apoptosis in palmitic acid induced myocardial cell injury model. **Methods** The H9c2 cells at logarithmic phase were divided into control group, palmitic acid (400 $\mu\text{mol/L}$) group, tanshinone II A 20 $\mu\text{mol/L}$ group, and palmitic acid plus tanshinone II A (5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$) groups, moreover palmitic acid plus CCT020312 group and palmitic acid plus CCT020312 plus tanshinone II A group were added for exploring the activation situation of pathway. The viability of H9c2 cells was detected by cell count kit 8 (CCK-8) assay. The apoptosis of H9c2 cells was detected by flow cytometry. The mRNA expression levels of endoplasmic reticulum stress-related molecule glucose-regulated protein 78 (GRP78), activating transcription factor 4 (ATF4), CCAAT/enhancer binding protein homologues protein (CHOP) were determined by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The protein expression levels of molecules GRP78, ATF4, CHOP, Caspase-3, Caspase-9, Caspase-12, protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), phosphorylated PERK (p-PERK), eukaryotic translation initiation factor alpha two (eIF2 α), phosphorylated eIF2 α (p-eIF2 α) were determined by Western blotting assay. **Results** Compared with the control group, H9c2 cell survival rate of palmitic acid group was decreased significantly ($P < 0.01$), mRNA and protein expression levels of GRP78, ATF4 and CHOP in H9c2 cells were significantly increased ($P < 0.01$), H9c2 cell apoptosis rate was increased significantly ($P < 0.01$), p-PERK/PERK and p-eIF2 α /eIF2 α ratios also were increased significantly ($P < 0.01$), and protein expression levels of Caspase-3, Caspase-9 and Caspase-12 were significantly increased ($P < 0.01$). After treatment with tanshinone II A at different concentrations, compared with the palmitic acid group, the H9c2 cell survival rate of the palmitic acid plus tanshinone II A (5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$) groups were increased, mRNA and protein expression levels of GRP78, ATF4 and CHOP were decreased, apoptosis rate of H9c2 cells was decreased, ratios of p-PERK/PERK and p-eIF2 α /eIF2 α were decreased, and protein expression levels of Caspase-3, Caspase-9 and Caspase-12 were decreased, all the trends being in dose-dependent mode, the differences being significant in palmitic acid plus tanshinone II A 10 $\mu\text{mol/L}$ group ($P < 0.05$) and palmitic acid plus tanshinone II A 20 $\mu\text{mol/L}$ group ($P < 0.05$). After treatment with PERK pathway activator CCT020312, compared with the palmitic acid (400 $\mu\text{mol/L}$) group, the ratios of p-PERK/PERK and p-eIF2 α /eIF2 α , the apoptosis rate and the mRNA and protein expression levels of GRP78, ATF4 and CHOP were significantly increased in the palmitic acid plus CCT020312 group ($P < 0.05$). After tanshinone II A treatment, compared with the palmitic acid plus CCT020312 group, the ratios of p-PERK/PERK and p-eIF2 α /eIF2 α , the apoptosis rate and the mRNA and protein expression levels of GRP78, ATF4 and CHOP in the palmitic acid plus CCT020312 plus tanshinone II A group were significantly decreased

($P < 0.05$). **Conclusion** Tanshinone Ⅱ A is effective for alleviating lipotoxic myocardial cell injury, and its mechanism is related with reducing palmitic acid-induced H9c2 cell apoptosis and controlling endoplasmic reticulum stress response by inhibiting activation of PERK signaling pathway.

Keywords: tanshinone Ⅱ A; lipotoxic injury; apoptosis; endoplasmic reticulum(ER) stress; PERK signaling pathway; palmitic acid; myocardial cells

肥胖可造成系统性代谢紊乱,是循环系统疾病的重要危险因素^[1]。富含高脂肪食物的饮食,尤其是饱和脂肪,会加重肥胖和脂毒性心肌病的风险^[2],且脂质积累程度与心脏功能障碍有关^[3]。如何干预脂毒性心肌病对心血管疾病的预防具有重要的研究意义。丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎,味苦、性微寒,入心、肝经,具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈功效,是常用的改善心血管疾病的中药^[4-5]。丹参酮ⅡA是从丹参中提取的天然活性成分。已有研究表明:丹参酮ⅡA对心肌组织的缺血-再灌注损伤具有显著的修复作用^[6-7];丹参酮ⅡA预处理1周后的心肌缺血大鼠模型中,梗死面积明显减小^[8];丹参酮ⅡA可防止缺氧诱导的H9c2心肌细胞线粒体功能障碍^[9],可通过上调microRNA-133和激活蛋白激酶B(Akt)保护H9c2细胞免受氧化应激诱导的细胞死亡^[10],也可通过磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPKs)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)依赖的自噬途径保护心肌梗死后心衰^[11];丹参酮ⅡA可以通过减轻内质网应激抑制心肌细胞的凋亡^[12-13]。鉴于丹参酮ⅡA具有较为明确的心肌保护作用,本研究进一步探讨丹参酮ⅡA对棕榈酸诱导的H9c2心肌细胞脂毒性损伤模型的保护作用及机制,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞 大鼠胚胎心肌细胞H9c2(CM-0089),购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药物、试剂与仪器 丹参酮ⅡA(CAS: 568-72-9,分子量: 294.33)购自上海源叶生物科技有限公司,批号: B20257。棕榈酸购自上海源叶生物科技有限公司,批号: JS688093;细胞计数试剂盒8(CCK-8)、胰蛋白酶、膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)双染细胞凋亡检测试剂盒、10%十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯

酰胺凝胶电泳(PAGE)试剂、聚偏氟乙烯(PVDF)膜、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG、电化学发光(ECL)检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);10 mg/mL RNaseA(上海翊圣生物科技有限公司);RNA纯化系统(Qiagen公司);SuperScript RNase H-逆转录酶(美国Invitrogen公司);随机六聚体(美国Sigma-Aldrich公司);SYBR Green Master Mix(美国Thermo Fisher公司);葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、转录激活因子4(ATF4)、CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)、Caspase-3、Caspase-9、Caspase-12、蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)、磷酸化PERK(p-PERK)、真核生物翻译起始因子2 α (eIF2 α)、磷酸化eIF2 α (p-eIF2 α)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(美国CST公司)。Multiskan Sky酶标仪购自美国Thermo Fisher公司;FACSCalibur流式细胞仪购自美国Becton Dickinson公司;ABI Prism 7000 PCR系统购自Applied Biosystems公司;ChemiDoc XRS+高灵敏化学发光成像系统购自美国Bio-Rad公司。

1.3 CCK-8法测定细胞活力 用胰酶消化对数期H9c2细胞后,收集并计数,重悬细胞并接种于96孔板,分6组。即:①对照组:不做任何处理;②棕榈酸(400 $\mu\text{mol/L}$)组: H9c2细胞培养24 h后,用400 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸诱导细胞;③丹参酮ⅡA 20 $\mu\text{mol/L}$ 组: H9c2细胞培养24 h后,用20 $\mu\text{mol/L}$ 丹参酮ⅡA诱导细胞;④棕榈酸(400 $\mu\text{mol/L}$)+丹参酮ⅡA(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)3个浓度组: H9c2细胞培养24 h后,用400 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸诱导细胞,24 h后,分别加入不同浓度(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)的丹参酮ⅡA处理细胞。按照CCK-8试剂盒的操作说明,在含对应药物的100 μL 培养基中培养22 h,加入10 μL CCK-8继续培养2 h,用酶标仪检测每个孔在450 nm波长处的吸光度,然后检测各组的H9c2细胞存活率。每组设置3个复孔进行实验。

1.4 流式细胞术测定细胞凋亡情况 分组同

“1.3”项。用体积分数70%乙醇4℃过夜固定H9c2细胞,然后加入RNaseA和PI 4℃染色过夜,再按照Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒说明书的方法操作,最后应用流式细胞仪测定细胞凋亡率。AnnexinV-FITC(-)/PI(-)(左下)为正常细胞,AnnexinV-FITC(+)/PI(-)细胞(右下)为早期凋亡细胞,AnnexinV-FITC(+)/PI(+)(右上)为晚期凋亡细胞,AnnexinV(-)/PI(+)(左上)为坏死细胞。实验重复3次。

1.5 实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)法检测心肌细胞GRP78、ATF4、CHOP mRNA表达 分组同“1.3”项。用RNA纯化系统提取总RNA。用SuperScript RNase H-逆转录酶和随机六聚体合成cDNA。在ABI Prism 7000系统中,使用SYBR Green Master Mix反应体系和引物在优化浓度下进行PCR反应。GRP78、ATF4、CHOP和管家基因GAPDH的序列如下:GRP78正向引物序列为5'-GAAACTGCCGAGGCGTAT-3',反向引物序列为5'-ATGTTCTTCTCTCCCTCTCTCTTA-3';ATF4正向引物序列为5'-TCCGAATGGCTGGCTGTGG-3',反向引物序列为5'-AGTGTAGTCTGGCTTCCTATCTCC-3';CHOP正向引物序列为5'-GGAAACAGAGTGCTCATTCCTCC-3',反向引物序列为5'-CTGCTTGAGCCGTTTCATTCTC-3';GAPDH正向引物序列为5'-GGGTGTGAACCACGAGAAAT-3',反向引物序列为5'-ACTGTGGTCATGAGCCCTTC-3'。反应条件:95℃5 min;95℃30 s,60℃30 s,重复40个循环。每个基因均生成标准曲线,扩增效率为90%~100%。通过阈值比较,确定基因表达的相对定量。结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。所有结果均以GAPDH为内参进行归一化。

1.6 蛋白免疫印迹(Western Blotting)法检测心肌细胞GRP78、ATF4、CHOP、Caspase-3、Caspase-9、Caspase-12、PERK、p-PERK、eIF2 α 、p-eIF2 α 蛋白表达 分组同“1.3”项。收集细胞,与细胞裂解缓冲液、蛋白酶抑制剂、去磷酸化酶抑制剂在冰上混合20 min,收集裂解液,以4℃以13 000×g离心5 min,取上清。使用BCA蛋白定量试剂盒测量蛋白质的浓度。取30 μ g蛋白,加热变性,经10%SDS-PAGE分离后转移到PVDF膜。使用体积分数2%牛血清白蛋白(BSA)室温封闭1 h。加入GRP78抗体4℃孵育过夜。加入羊抗

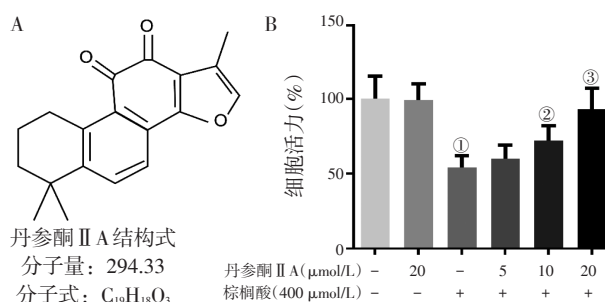
兔IgG-HRP孵育1 h。最后,采用ECL化学发光检测试剂盒显色,用高灵敏化学发光检测仪观察电泳条带。ATF4、CHOP、Caspase-3、Caspase-9、Caspase-12、PERK、p-PERK、eIF2 α 、p-eIF2 α 、GAPDH检测方法同上。

1.7 统计方法 采用SPSS 19.0统计软件进行数据分析,所有计量资料均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以单因素方差分析(One-way ANOVA)方法进行多组比较,两两比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丹参酮II A逆转了棕榈酸诱导的H9c2细胞存活率的降低 图1结果显示:与对照组比较,丹参酮II A 20 μ mol/L组的细胞存活率无显著性差异($P > 0.05$),而棕榈酸(400 μ mol/L)组的细胞存活率显著降低($P < 0.01$);与棕榈酸(400 μ mol/L)组比较,不同浓度丹参酮II A(5、10、20 μ mol/L)与棕榈酸共处理组的细胞存活率以剂量依赖性方式回升,且棕榈酸+丹参酮II A 10 μ mol/L组($P < 0.05$)和棕榈酸+丹参酮II A 20 μ mol/L组($P < 0.01$)细胞存活率回升有统计学意义。

2.2 丹参酮II A缓解了棕榈酸诱导的H9c2细胞内质网应激 图2-A结果显示:与对照组比较,丹参酮II A 20 μ mol/L组细胞的GRP78、ATF4和CHOP的mRNA水平无显著性差异($P > 0.05$),而棕榈酸(400 μ mol/L)组细胞的GRP78、ATF4和



A. 丹参酮II A的化学结构; B. 丹参酮II A对棕榈酸处理的H9c2细胞活力的影响($n = 3$)

-: 未处理; +: 处理

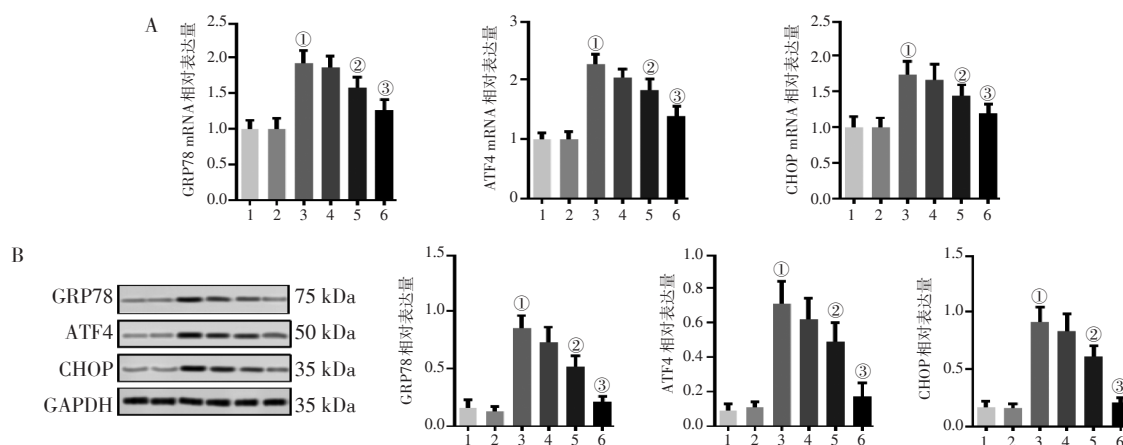
① $P < 0.01$, 与对照组(不做任何处理)比较; ② $P < 0.05$, ③ $P < 0.01$, 与棕榈酸(400 μ mol/L)组比较

图1 丹参酮II A对棕榈酸诱导的H9c2细胞存活率的影响
Figure 1 Effects of tanshinone II A on survival rate of palmitic acid-induced H9c2 cells

CHOP的mRNA水平显著升高($P < 0.01$);与棕榈酸(400 $\mu\text{mol/L}$)组比较,不同浓度丹参酮II A(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)与棕榈酸共处理组细胞的GRP78、ATF4和CHOP的mRNA水平以剂量依赖性方式回降,且棕榈酸+丹参酮II A 10 $\mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.05$)和棕榈酸+丹参酮II A 20 $\mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.01$)细胞的GRP78、ATF4和CHOP的mRNA水平回降显著。

图2-B结果显示:与对照组比较,丹参酮II A 20 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞的GRP78、ATF4和CHOP的蛋白

水平无显著性差异($P > 0.05$),而棕榈酸(400 $\mu\text{mol/L}$)组细胞的GRP78、ATF4和CHOP的蛋白水平升高显著($P < 0.01$);与棕榈酸(400 $\mu\text{mol/L}$)组比较,不同浓度丹参酮II A(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)与棕榈酸共处理组细胞的GRP78、ATF4和CHOP的蛋白水平以剂量依赖性方式回降,且棕榈酸+丹参酮II A 10 $\mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.05$)和棕榈酸+丹参酮II A 20 $\mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.01$)细胞的GRP78、ATF4和CHOP的蛋白水平回降显著。



注: H9c2细胞用丹参酮II A、棕榈酸处理。A. RT-qPCR法检测GRP78、ATF4和CHOP的mRNA表达的结果($n = 3$); B. 蛋白免疫印记法检测GRP78、ATF4和CHOP的蛋白表达的结果($n = 3$)

1. 对照组; 2. 丹参酮II A 20 $\mu\text{mol/L}$ 组; 3. 棕榈酸(400 $\mu\text{mol/L}$)组; 4. 棕榈酸+丹参酮II A 5 $\mu\text{mol/L}$ 组; 5. 棕榈酸+丹参酮II A 10 $\mu\text{mol/L}$ 组; 6. 棕榈酸+丹参酮II A 20 $\mu\text{mol/L}$ 组

① $P < 0.01$, 与对照组比较; ② $P < 0.05$, ③ $P < 0.01$, 与棕榈酸(400 $\mu\text{mol/L}$)组比较

图2 丹参酮II A对棕榈酸诱导的H9c2细胞内质网应激的影响

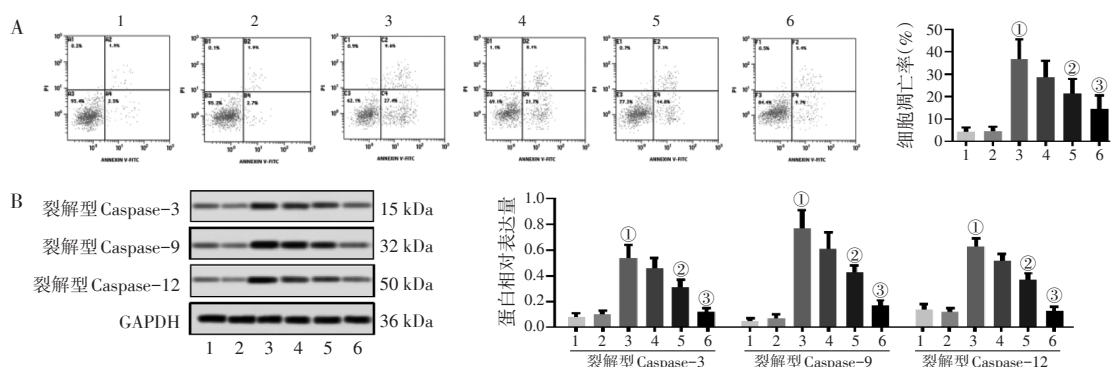
Figure 2 Effects of tanshinone II A on endoplasmic reticulum stress in palmitic acid-induced H9c2 cells

2.3 丹参酮II A抑制了棕榈酸诱导的心肌细胞的凋亡 图3-A结果显示:与对照组比较,丹参酮II A 20 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞的凋亡率无显著性差异($P > 0.05$),而棕榈酸(400 $\mu\text{mol/L}$)组细胞凋亡率显著升高($P < 0.01$);与棕榈酸(400 $\mu\text{mol/L}$)组比较,不同浓度丹参酮II A(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)与棕榈酸共处理组细胞的凋亡率以剂量依赖性方式回降,且棕榈酸+丹参酮II A 10 $\mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.05$)和棕榈酸+丹参酮II A 20 $\mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.01$)细胞的凋亡率回降显著。

图3-B结果显示:与对照组比较,丹参酮II A 20 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞的Caspase-3、Caspase-9和Caspase-12的蛋白表达水平无显著性差异($P > 0.05$),而棕榈酸(400 $\mu\text{mol/L}$)组的这3种蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$);与棕榈酸(400 $\mu\text{mol/L}$)

组比较,不同浓度丹参酮II A(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)与棕榈酸共处理组细胞的Caspase-3、Caspase-9和Caspase-12蛋白表达水平以剂量依赖性方式回降,且棕榈酸+丹参酮II A 10 $\mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.05$)和棕榈酸+丹参酮II A 20 $\mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.01$)细胞的凋亡率回降显著。

2.4 丹参酮II A阻碍了棕榈酸诱导的H9c2细胞PERK信号通路的磷酸化 图4结果显示:与对照组比较,丹参酮II A 20 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞的p-PERK/PERK和p-eIF2 α /eIF2 α 比例无显著性变化($P > 0.05$),而棕榈酸(400 $\mu\text{mol/L}$)组细胞p-PERK/PERK和p-eIF2 α /eIF2 α 比例显著增大($P < 0.01$);与棕榈酸(400 $\mu\text{mol/L}$)比较,不同浓度丹参酮II A(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)与棕榈酸共处理组细胞p-PERK/PERK和p-eIF2 α /eIF2 α 比例以剂量依赖性方式回降,且



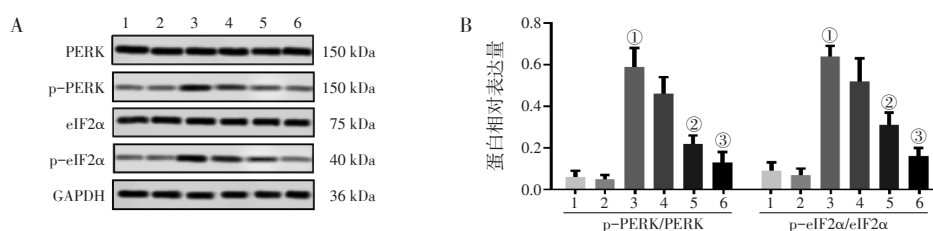
注: H9c2细胞用丹参酮ⅡA、棕榈酸处理。A. 流式细胞术检测细胞凋亡的结果($n=3$); B. 蛋白免疫印记法检测凋亡相关蛋白表达的结果($n=3$)

1. 对照组; 2. 丹参酮ⅡA 20 $\mu\text{mol/L}$ 组; 3. 棕榈酸(400 $\mu\text{mol/L}$)组; 4. 棕榈酸+丹参酮ⅡA 5 $\mu\text{mol/L}$ 组; 5. 棕榈酸+丹参酮ⅡA 10 $\mu\text{mol/L}$ 组; 6. 棕榈酸+丹参酮ⅡA 20 $\mu\text{mol/L}$ 组

① $P < 0.01$, 与对照组比较; ② $P < 0.05$, ③ $P < 0.01$, 与棕榈酸(400 $\mu\text{mol/L}$)组比较

图3 丹参酮ⅡA对棕榈酸诱导的H9c2细胞凋亡的影响

Figure 3 Effects of tanshinone II A on apoptosis of palmitic acid-induced H9c2 cells



注: H9c2细胞用丹参酮ⅡA、棕榈酸处理。A、B. 蛋白免疫印记法检测PERK激活状态的结果($n=3$)

1. 对照组; 2. 丹参酮ⅡA 20 $\mu\text{mol/L}$ 组; 3. 棕榈酸(400 $\mu\text{mol/L}$)组; 4. 棕榈酸+丹参酮ⅡA 5 $\mu\text{mol/L}$ 组; 5. 棕榈酸+丹参酮ⅡA 10 $\mu\text{mol/L}$ 组; 6. 棕榈酸+丹参酮ⅡA 20 $\mu\text{mol/L}$ 组

① $P < 0.01$, 与对照组比较; ② $P < 0.05$, ③ $P < 0.01$, 与棕榈酸(400 $\mu\text{mol/L}$)组比较

图4 丹参酮ⅡA对棕榈酸诱导的H9c2细胞PERK信号通路磷酸化的影响

Figure 4 Effects of tanshinone II A on phosphorylation of PERK signaling pathway in palmitic acid-induced H9c2 cells

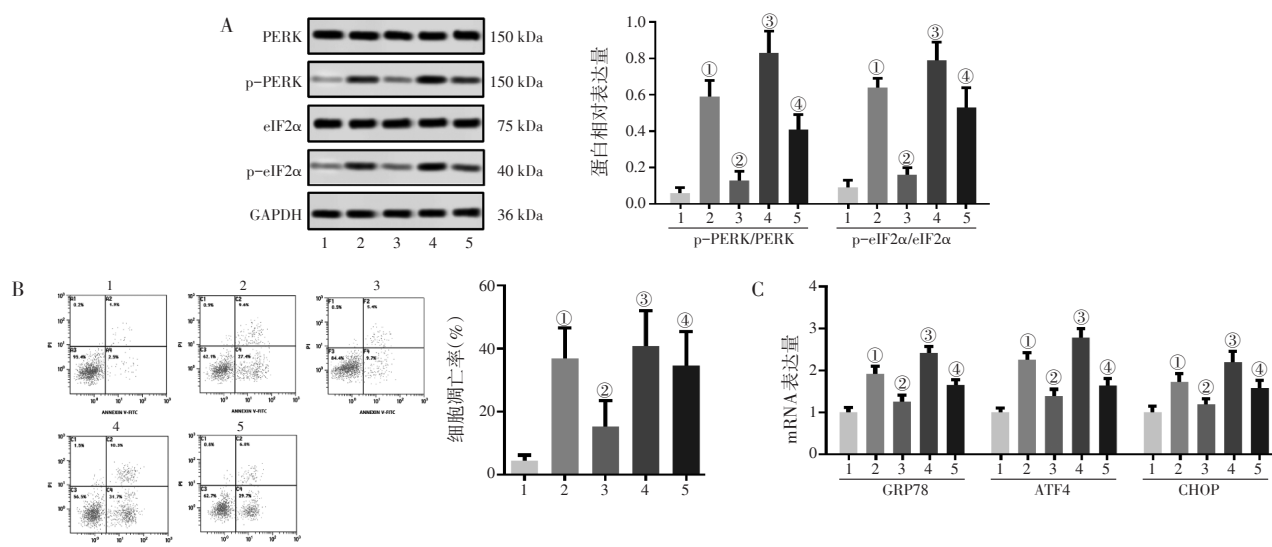
棕榈酸+丹参酮ⅡA 10 $\mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.05$)和棕榈酸+丹参酮ⅡA 20 $\mu\text{mol/L}$ 组($P < 0.01$)细胞p-PERK/PERK和p-eIF2α/eIF2α比例回降显著。

2.5 丹参酮ⅡA通过调节PERK信号通路缓解棕榈酸诱导的心肌细胞凋亡和内质网应激 为了进一步验证丹参酮ⅡA对PERK信号通路的影响,本研究引入PERK通路激活剂CCT020312进行实验,增加棕榈酸(400 $\mu\text{mol/L}$)+CCT020312(3 $\mu\text{mol/L}$)组与棕榈酸(400 $\mu\text{mol/L}$)+CCT020312(3 $\mu\text{mol/L}$)+丹参酮ⅡA(20 $\mu\text{mol/L}$)组。图5-A结果显示:与对照组比较,棕榈酸组细胞的p-PERK/PERK和p-eIF2α/eIF2α比例显著增大($P < 0.01$);与棕榈酸组比较,棕榈酸+丹参酮ⅡA 20 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞的p-PERK/PERK和p-eIF2α/eIF2α比例显著减小($P < 0.01$),而棕榈酸+CCT020312组细胞的

p-PERK/PERK和p-eIF2α/eIF2α比例显著回升($P < 0.05$);与棕榈酸+CCT020312组和棕榈酸+丹参酮ⅡA组比较,棕榈酸+CCT020312+丹参酮ⅡA组的p-PERK/PERK和p-eIF2α/eIF2α比例显著回降($P < 0.05$)。同样,我们也考察了细胞凋亡率(图5-B)和内质网应激相关的GRP78、ATF4和CHOP的mRNA表达水平(图5-C),得到了与上述信号通路结果相一致的结果。这些实验进一步证实了丹参酮ⅡA通过调节PERK信号通路缓解棕榈酸诱导的心肌细胞凋亡和内质网应激。

3 讨论

肥胖是包括代谢综合征和心肌病等在内一系列疾病的危险因素,其脂毒性是一个重要方面^[14]。肥胖和脂质积累会加快心血管系统的非脂肪细胞



注: H9c2 细胞用丹参酮 II A、棕榈酸和抑制剂 CCT020312 处理。A. 蛋白免疫印记法检测 PERK 激活状态的结果($n=3$); B. 流式细胞术检测细胞凋亡的结果($n=3$); C. RT-qPCR 法检测 GRP78、ATF4 和 CHOP 的 mRNA 相对表达的结果($n=3$)

1. 对照组; 2. 棕榈酸($400 \mu\text{mol/L}$)组; 3. 棕榈酸+丹参酮 II A $20 \mu\text{mol/L}$ 组; 4. 棕榈酸+ CCT020312 组; 5. 棕榈酸+ CCT020312+丹参酮 II A $20 \mu\text{mol/L}$ 组

① $P < 0.01$, 与对照组比较; ② $P < 0.05$, ③ $P < 0.01$, 与棕榈酸($400 \mu\text{mol/L}$)组比较; ④ $P < 0.05$, 与棕榈酸+丹参酮 II A $20 \mu\text{mol/L}$ 组比较

图5 丹参酮 II A 通过调节 PERK 信号通路对棕榈酸诱导的 H9c2 细胞凋亡和内质网应激的影响

Figure 5 Effects of tanshinone II A on apoptosis and endoplasmic reticulum stress in palmitic acid-induced H9c2 cells by modulating the PERK signaling pathway

中过多脂质的积累, 导致细胞功能障碍和细胞死亡, 造成脂毒性心肌病^[14]。棕榈酸是最常见的饱和长链脂肪酸, 在包括心肌细胞在内的许多细胞类型中都能触发细胞凋亡^[15]。故本研究选择棕榈酸 $400 \mu\text{mol/L}$ 刺激 H9c2 心肌细胞构建心肌细胞脂毒性损伤模型。在此细胞模型上, 流式细胞术检测发现, 与对照组比较, 棕榈酸 $400 \mu\text{mol/L}$ 组心肌细胞存活率、凋亡率明显升高($P < 0.01$), 说明在体外环境中棕榈酸可通过诱导心肌细胞凋亡而发挥脂毒性作用。

内质网是脂代谢密切相关的细胞器^[16]。内质网稳态的破坏使大量错误或者未折叠蛋白质在内质网中聚集, 激活相应的信号通路, 引起一系列的细胞反应, 即内质网应激。一方面, 内质网应激通过调节参与脂质合成或修饰关键酶的表达水平来影响脂质代谢; 另一方面, 内质网应激诱导的细胞凋亡或细胞膜组件的异常合成可介导心肌细胞脂毒性损伤。有研究发现, 以棕榈酸为代表的心肌脂毒性诱导过程中, 发生的内质网应激激活了葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、真核生物翻译起

始因子 2α (eIF2α)、蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PERK)、CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白 (CHOP) 和 Caspase 蛋白等相关凋亡通路^[2]。由此推测, 内质网应激信号通路的激活及其相关蛋白的表达调控可能是心肌细胞脂毒性损伤的机制之一, 减轻心肌细胞内质网应激有望延缓脂毒性心肌病的发生发展。本研究结果显示, 与对照组比较, 棕榈酸组细胞内质网应激相关蛋白 GRP78、ATF4、CHOP mRNA 和蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$), p-PERK/PERK 和 p-eIF2α/eIF2α 比例也显著增大($P < 0.01$), 凋亡相关蛋白 Caspase-3、Caspase-9 和 Caspase-12 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$)。不同浓度丹参酮 II A 作用后, H9c2 细胞的存活率升高, H9c2 细胞的凋亡率降低, 内质网应激凋亡相关蛋白的表达水平降低(均 $P < 0.01$)。加入 PERK 通路激活剂 CCT020312 作用后, 与棕榈酸组比较, 棕榈酸+CCT020312 组的 p-PERK/PERK 和 p-eIF2α/eIF2α 比例, 细胞凋亡率, GRP78、ATF4、CHOP 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$); 再经过丹参酮 II A 处

理,与棕榈酸+CCT020312组比较,棕榈酸+CCT020312+丹参酮ⅡA组的p-PERK/PERK和p-eIF2 α /eIF2 α 比例,细胞凋亡率,GRP78、ATF4、CHOP的mRNA和蛋白表达水平均显著回降($P < 0.05$)。提示丹参酮ⅡA通过抑制内质网应激通路蛋白PERK和eIF2 α 的磷酸化下调了棕榈酸诱导的H9c2细胞内质网应激相关蛋白GRP78、ATF4和CHOP的表达,起到抑制棕榈酸诱导的H9c2细胞凋亡的作用。结果表明,丹参酮ⅡA可修复棕榈酸刺激的心肌细胞损伤,其作用机制与减轻棕榈酸引起的内质网应激性凋亡有关。

综上所述,本课题体外研究结果证明了棕榈酸能启动内质网应激,激活PERK信号通路,诱导心肌细胞凋亡,引起心肌细胞脂毒性损伤,而丹参酮ⅡA可阻断该通路,抑制心肌细胞脂毒性损伤。本研究初步通过体外实验探讨了丹参酮ⅡA抗心肌细胞脂毒性作用,为今后在体内和动物实验环境中研究丹参酮ⅡA对脂毒性心肌病的干预机制提供了可靠的实验依据。

参考文献:

- [1] CIRULLI E T, GUO L, LEON SWISHER C, et al. Profound perturbation of the metabolome in obesity is associated with health risk[J]. *Cell Metab*, 2019, 29(2): 488-500.
- [2] ZOU L, LI X, WU N, et al. Palmitate induces myocardial lipotoxic injury via the endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5): 6934-6939.
- [3] HAFFAR T, AKOUMI A, BOUSETTE N. Lipotoxic palmitate impairs the rate of beta-oxidation and citric acid cycle flux in rat neonatal cardiomyocytes[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(5): 969-981.
- [4] WANG L, MA R, LIU C, et al. *Salvia miltiorrhiza*: a potential red light to the development of cardiovascular diseases[J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(7): 1077-1097.
- [5] 万新焕,王瑜亮,周长征,等.丹参化学成分及其药理作用研究进展[J]. *中草药*, 2020, 51(3): 788-798.
- [6] YANG G L, JIA L Q, WU J, et al. Effect of tanshinone Ⅱ A on oxidative stress and apoptosis in a rat model of fatty liver[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(5): 4639-4646.
- [7] YUAN X, JING S, WU L, et al. Pharmacological postconditioning with tanshinone Ⅱ A attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats by activating the phosphatidylinositol 3-kinase pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(3): 973-977.
- [8] ZHANG Z, HE H, QIAO Y, et al. Tanshinone Ⅱ A pretreatment protects H9c2 cells against anoxia/reoxygenation injury: involvement of the translocation of Bcl-2 to mitochondria mediated by 14-3-3 β [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 3583921.
- [9] JIN H J, LI C G. Tanshinone Ⅱ A and cryptotanshinone prevent mitochondrial dysfunction in hypoxia-induced H9c2 cells: association to mitochondrial ROS, intracellular nitric oxide, and calcium levels[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 610694.
- [10] GU Y, LIANG Z, WANG H, et al. Tanshinone Ⅱ A protects H9c2 cells from oxidative stress-induced cell death via microRNA-133 upregulation and Akt activation[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(2): 1147-1152.
- [11] ZHANG X, WANG Q, WANG X, et al. Tanshinone Ⅱ A protects against heart failure post-myocardial infarction via AMPKs/mTOR-dependent autophagy pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108599.
- [12] HU H, ZHAI C, QIAN G, et al. Protective effects of tanshinone Ⅱ A on myocardial ischemia reperfusion injury by reducing oxidative stress, HMGB1 expression, and inflammatory reaction[J]. *Pharm Biol*, 2015, 53(12): 1752-1758.
- [13] FENG J, LI S, CHEN H. Tanshinone Ⅱ A ameliorates apoptosis of cardiomyocytes induced by endoplasmic reticulum stress[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2016, 241(18): 2042-2048.
- [14] SLETTEN A C, PETERSON L R, SCHAFFER J E. Manifestations and mechanisms of myocardial lipotoxicity in obesity[J]. *J Intern Med*, 2018, 284(5): 478-491.
- [15] PARK M, SABETSKI A, KWAN CHAN Y, et al. Palmitate induces ER stress and autophagy in H9c2 cells: implications for apoptosis and adiponectin resistance[J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(3): 630-639.
- [16] HAN J, KAUFMAN R J. The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity[J]. *Journal of Lipid Research*, 2016, 57(8): 1329-1338.

【责任编辑:侯丽颖】