

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.14.012

参附注射液对异丙肾上腺素诱导的心肌细胞损伤模型中 SIRT1 去乙酰化修饰调控 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路的影响

黄淑敏^{1,2}, 廖晓倩², 范星宇², 王梓仪³, 胡志希²✉

1. 福建中医药大学附属第二人民医院, 福建省福州市五四路 282 号, 350003; 2. 湖南中医药大学; 3. 中国中医科学院广安门医院

[摘要] **目的** 从沉默信息调节因子 1 (SIRT1) 去乙酰化修饰调控高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) /Toll 样受体 4 (TLR4) /核因子 κ B (NF- κ B) 通路探讨参附注射液对异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌细胞损伤的影响及可能作用机制。**方法** 通过 CCK-8 法筛选盐酸异丙肾上腺素最佳干预浓度及干预时间、参附注射液药物最佳干预浓度。取对数生长的 H9c2 大鼠心肌细胞以 5×10^4 个细胞/孔, 分为正常组、模型组、参附注射液组、SIRT1 抑制剂组, 每组 3 个复孔。除正常组外其余各组细胞采用盐酸异丙肾上腺素诱导建立慢性心力衰竭细胞模型。造模后参附注射液组再加最佳干预浓度的参附注射液处理, SIRT1 抑制剂组造模后加 $1 \mu\text{mol/L}$ 的 SIRT1 抑制剂 EX-527 处理, 时间为筛选的最佳干预时间。采用 CCK-8 法检测各组细胞活性及计算抑制率; ELISA 法检测心肌细胞中烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化态/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸还原态 (NAD⁺/NADH) 值; 免疫荧光法检测心肌细胞 HMGB1 及 SIRT1 免疫荧光定位情况; 蛋白免疫印迹法检测心肌细胞乙酰化 HMGB1 蛋白表达, 细胞核、细胞质中 HMGB1 蛋白表达, 心肌细胞中 SIRT1、TLR4、髓样细胞分化因子 88 (MYD88)、NF- κ B p65 蛋白表达; RT-qPCR 法检测心肌细胞 SIRT1、HMGB1、TLR4、MYD88、NF- κ B p65 mRNA 表达。**结果** 最终选择盐酸异丙肾上腺素最佳干预浓度为 $300 \mu\text{mol/L}$, 干预时间为 48 h; 8% 为参附注射液最佳干预浓度。与正常组比较, 模型组心肌细胞活性、NAD⁺/NADH 值、细胞核 HMGB1 蛋白表达、心肌细胞 SIRT1 蛋白及 mRNA 表达均降低; 细胞抑制率、心肌细胞乙酰化 HMGB1 蛋白、细胞质 HMGB1 蛋白表达, 心肌细胞 TLR4、MYD88、NF- κ B p65 蛋白及 mRNA 表达, HMGB1 mRNA 表达均升高 ($P < 0.05$); 荧光定位显示, 模型组心肌细胞 HMGB1 含量增加并且定位在细胞核与细胞质中均有体现。与模型组和 SIRT1 抑制剂组比较, 参附注射液组上述各指标均显著改善 ($P < 0.05$); 荧光定位显示, 参附注射液组 SIRT1 含量增加, HMGB1 含量减少并且定位主要在细胞核。**结论** 参附注射液可以通过提高 SIRT1 表达以降低 HMGB1 乙酰化水平, 调控 HMGB1/TLR4/NF- κ B 通路从而抑制 HMGB1 的核易位达到改善心肌细胞损伤的作用。

[关键词] 慢性心力衰竭; 心肌细胞; 参附注射液; 沉默信息调节因子 1; 去乙酰化; 高迁移率族蛋白 B1

慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF) 是由于多种原因导致心脏结构和/或功能异常改变, 心室收缩或舒张功能不全的临床综合征, 属于严重的心脏疾病, 发病率与病程、年龄相关, 且有地区差异^[1]。高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 是一种重

要的炎症介质, 在细胞核内参与 DNA 修复、转录调控和基因组稳定等, 在细胞核外则启动炎症免疫应答^[2]。研究表明, HMGB1 血浆浓度在心力衰竭患者中升高, 并与疾病严重程度呈正相关, HMGB1 升高是心力衰竭患者死亡的预测指标^[3]。沉默信息调节因子 (SIRT) 是依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 的Ⅲ类组蛋白去乙酰化酶^[4], 沉默信息调节因子 1 (SIRT1) 可通过促进 HMGB1 去乙酰化, 抑制 HMGB1 的细胞外释放^[5]。SIRT1 的去乙

基金项目: 国家自然科学基金 (82274412, 81774208); 湖南省自然科学基金 (2020JJ4062, 2020JJ5408); 广东省重点领域研发计划项目 (2020B1111100001); 湖南省教育厅科学研究项目 (21A0230, 21B0361); 湖南省学位与研究生教育改革研究项目 (2020JGZX012)

✉ 通讯作者: 515800272@qq.com

酰化酶活性可通过烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化态(NAD⁺)与烟酰胺腺嘌呤二核苷酸还原态(NADH)比值(NAD⁺/NADH)来体现^[6]。

参附注射液是临床治疗 CHF 的常用中药注射剂。既往研究^[7-8]显示,参附注射液在提高 CHF 临床治疗总有效率方面具有优势,并且能明显改善 CHF 患者心悸、气短、水肿等临床症状。前期研究^[9]表明,参附注射液可以通过调控 HMGB1/Toll 样受体 4(TLR4)/核因子 κ B(NF- κ B)信号通路来改善 CHF 模型大鼠炎症损伤情况。本研究观察参附注射液是否可通过 SIRT1 调控 HMGB1 及其信号通路进而发挥减轻心肌细胞损伤的作用,以期参附注射液的临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

H9c2 大鼠心肌细胞(货号:ZQ0102)购自中乔新舟有限公司。细胞培养条件:H9c2 细胞培养于含 10% FBS+1% 双抗的 DMEM 培养基中,37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。

1.2 药物

参附注射液(主要成分:红参、附片,辅料为聚山梨酯,10 ml/支,华润三九雅安药业有限公司,批号:201106AK05)。

1.3 主要试剂及仪器

盐酸异丙肾上腺素(批号:HY-B0468/CS-2582),MedChemExpress 公司;SIRT1 抑制剂 EX-527(批号:A4181),APEX BIO 公司;DMEM 培养基(批号:D5796),Sigma 公司;胰酶消化液(批号:AWC0232)、细胞冻存液(批号:AWC0229),Abiowell 公司;胎牛血清(批号:10099141),Gibco 公司;CCK-8 试剂盒(批号:NU679),日本同仁化学研究所;双抗(批号:SV30010)、NAD⁺/NADH 检测试剂盒(批号:S0175),上海碧云天生物技术有限公司;HMGB1(批号:ab1825,ab228624)、乙酰基赖氨酸(acetyl Lysine,批号:ab190479)、髓样细胞分化因子 88(MYD88,批号:ab219413)、增殖细胞核抗原兔多克隆抗体(PCNA,批号:0205-2-AP),Abcam 公司;SIRT1 抗体(批号:60303-1-Ig),PTG 公司;TLR4(批号:19811-1-AP)、NF- κ B p65(批号:10745-1-AP)、GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)兔多克隆抗体(批号:10494-1-AP)、SIRT1 鼠多克隆抗体(批号:60303-1-Ig)、HRP 羊抗兔 IgG(批号:SA00001-2)、HRP 羊抗鼠 IgG

(批号:SA00001-1),美国 Proteintech 公司;mRNA 逆转录试剂盒(批号:CW2569)、miRNA 逆转录试剂盒(批号:CW2141),北京康为世纪生物科技有限公司;Trizol 试剂(批号:15596026),美国 Thermo 公司。

H1650R 型台式高速冷冻离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;PW-812 型全自动酶标洗板机、MB-530 型多功能酶标分析仪,深圳市汇松科技发展有限公司;DYY-6C 型电泳仪、DYCZ-40D 型转膜仪,北京六一仪器厂;ChemiScope6100 型化学发光成像系统,上海勤翔科学仪器有限公司;PIKOREAL96 型荧光定量 RCP 仪、SPL0960 型荧光 PCR 板,美国 Thermo 公司。

1.4 实验药物浓度及干预时间的筛选

采用 CCK-8 法检测各药物对 H9c2 大鼠心肌细胞生长的影响。盐酸异丙肾上腺素干预浓度为 0、100、200、300、400、500、700、1000 μ mol/L 8 种,将正常 H9c2 心肌细胞按每个浓度设 3 个复孔。以 5×10^4 个细胞/孔密度接种于 12 孔板内,每孔 500 μ l,每孔加入 30 μ l 的 CCK-8,分别孵育 24 h、48 h 后于酶标仪分析 450 nm 处吸光度(OD)值。选择细胞活性(OD 均值)接近 1 的为最佳干预浓度和时间。

参附注射液干预浓度分别为 0、4%、8%、12%、16%、20% 共 6 种浓度,将正常 H9c2 心肌细胞按每个浓度设 3 个复孔,培养方式同上,培养时间为盐酸异丙肾上腺素最佳干预时间,酶标仪分析 450 nm 处 OD 值,并计算抑制率。抑制率=[(对照孔 OD 值-实验孔 OD 值)/(对照孔 OD 值-空白孔 OD 值)] $\times 100\%$,实验孔是指含有细胞的培养基、CCK-8 溶液和待测物质的培养孔,对照孔则是指含有细胞的培养基、CCK-8 溶液但不含有待测物质的培养孔,空白孔则是不含细胞和待测物质的培养基、CCK-8 溶液。

再将 H9c2 心肌细胞用最佳干预浓度的盐酸异丙肾上腺素干预,培养时间为最佳干预时间,后加入干预浓度分别为 0、4%、8%、12%、16%、20% 的参附注射液,每个浓度设 3 个复孔,培养方式和时间同上,酶标仪检测 OD 值,并计算抑制率,方法同上。选择对正常 H9c2 心肌细胞活性影响最小,对损伤的 H9c2 心肌细胞改善作用最好的浓度为参附注射液最佳干预浓度。

1.5 细胞分组及干预方法

取对数生长的 H9c2 大鼠心肌细胞以 5×10^4 个细胞/孔,进行如下分组处理:1) 正常组:细胞不做

任何处理；2) 模型组：细胞加入最佳干预浓度的盐酸异丙肾上腺素处理，以最佳干预时间干预后建立 CHF 细胞模型^[10]；3) 参附注射液组：细胞造模成功后，再加最佳干预浓度的参附注射液干预，时间为最佳干预时间；4) SIRT1 抑制剂组：细胞造模成功后，再加 1 μmol/L 的 SIRT1 抑制剂 EX-527 干预，时间为最佳干预时间。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 心肌细胞活性及抑制率 各组细胞干预筛选时间后，采用 CCK-8 法检测，方法同上。

1.6.2 ELISA 法检测心肌细胞中 NAD⁺/NADH 水平 每组选取约 1×10⁶ 个细胞，吸净培养液，用移液器加入 200 μl 的 NAD⁺/NADH 试剂盒提取液，并轻轻吹打，以促进细胞的裂解，后严格按说明书操作。

1.6.3 心肌细胞 HMGB1、SIRT1 荧光定位检测

采用免疫荧光染色。各组去除培养基，PBS 清洗，加入 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min 后用 PBS 冲洗再加入 0.3% 曲拉通，37 ℃、30 min 通透后用 PBS 冲洗，用 5% BSA 37 ℃ 封闭 60 min，按照一定比例稀释 [HMGB1 (1:50)、SIRT1 (1:50)] 一抗，4 ℃ 过夜，后滴加 50 μl HRP 羊抗兔和 HRP 羊抗鼠 IgG 标记荧光抗体，37 ℃ 孵育 90 min，PBS 冲洗后用 DAPI 工作液 37 ℃ 染核 10 min，PBS 冲洗后用缓冲甘油封片，荧光显微镜下观察。

1.6.4 心肌细胞乙酰化 HMGB1 蛋白表达，心肌细胞核、细胞质中 HMGB1 蛋白表达，心肌细胞中 SIRT1、MYD88、TLR4、NF-κB p65 蛋白表达 采用蛋白免疫印迹法检测。各组心肌细胞处理筛选时间后，收集细胞，用 BCA 试剂盒测得蛋白浓度。电泳恒定电压 75 V，时间为 130 min，待溴酚蓝电泳至胶底部时终止电泳。5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h 后，用 PBST 将一抗按照一定比例稀释 [HMGB1 (1:3000)、acetyl Lysine (1:1000)；HMGB1 (1:1000)、PCNA (1:5000)、SIRT1 (1:5000)、TLR4 (1:750)、MYD88 (1:2000)、NF-κB p65 (1:2000)、GAPDH (1:3000)]，将膜与一抗一起孵育，4 ℃ 过夜，次日室温放置 30 min，孵育结束，1×PBST 洗 3 次，每次 10 min。用 1×PBST 稀释 HRP 标记的二抗 [HRP 羊抗鼠 IgG (1:6000)]，将稀释后的二抗与膜共同室温孵育 90 min。使用 ECL 化学发光液与膜孵育 1 min，用滤纸吸尽液体，用塑封膜将膜包裹杂交膜，在凝胶成像系统成像，定量分析比较目的蛋白与内参照蛋白的灰度值。乙

酰化 HMGB1 蛋白表达用 acetyl Lysine 蛋白表达来表示，以 HMGB1 为参照；PCNA 在细胞核内稳定表达，因此细胞核 HMGB1 蛋白表达以 PCNA 为内参；细胞质中 HMGB1 蛋白表达及心肌细胞中 SIRT1、MYD88、TLR4、NF-κB p65 蛋白表达以 GAPDH 为内参。

1.6.5 心肌细胞 SIRT1 及 HMGB1/TLR4/NF-κB 信号通路相关因子 mRNA 表达 采用 RT-qPCR 法检测。各组细胞处理后，收集细胞采用 Trizol 提取组织总 RNA，以组织总 mRNA 为模板，逆转录 cDNA。引物由北京擎科生物科技有限公司合成，引物序列见表 1。通过各目的因子基因片段的扩增曲线，确定 Ct 值。

表 1 引物序列信息

Table 1 Information of primer sequences

基因	序列	产物长度
SIRT1	上游 AGTTCTATACCCCATGAAGTGC	137 bp
	下游 GCATACTCGCCACCTAACCT	
HMGB1	上游 GGCGGCTGTTTGTGACAT	135 bp
	下游 ACCCAAAATGGGCAAAAGCA	
TLR4	上游 GGCTTCTAACCTCAACGACCT	112 bp
	下游 ATGATTCTTTGCCTGAGTTGCTT	
MYD88	上游 ACTGTATGAAGTGAAGGACCGCATC	71 bp
	下游 ACTCCTGTTTCTGCTGCTTGCCTA	
NF-κB	上游 CACCAAAGACCCACCTCACCG	155 bp
	下游 CTTGCTCCAGGTCTCGCTTC	
GAPDH	上游 ACAGCAACAGGCTGGTGGAC	252 bp
	下游 TTTGAGGCTGCAGCGAAGCTT	

注：SIRT1，沉默信息调节因子 1；HMGB1，高迁移率族蛋白 B1；TLR4，Toll 样受体 4；MYD88，髓样细胞分化因子 88；NF-κB，核因子 κB；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

1.7 统计学方法

运用 SPSS 24.0 软件进行统计分析。计量数据均符合正态分布以均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较方差齐的采用 LSD 检验，方差不齐的采用 Tamhane's T^2 检验。计数资料用率 (%) 表示。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。采用 GraphPad Prism 8.0 软件执行绘图操作。

2 结果

2.1 盐酸异丙肾上腺素最佳干预浓度及时间筛选结果

图 1 示，不同浓度盐酸异丙肾上腺素对心肌细胞有不同程度的生长抑制作用，选择 OD 均值接近 1 且 OD 均值较高的为最佳浓度和最佳干预时间，最终选择盐酸异丙肾上腺素干预浓度为 300 μmol/L，干预时间为 48 h。

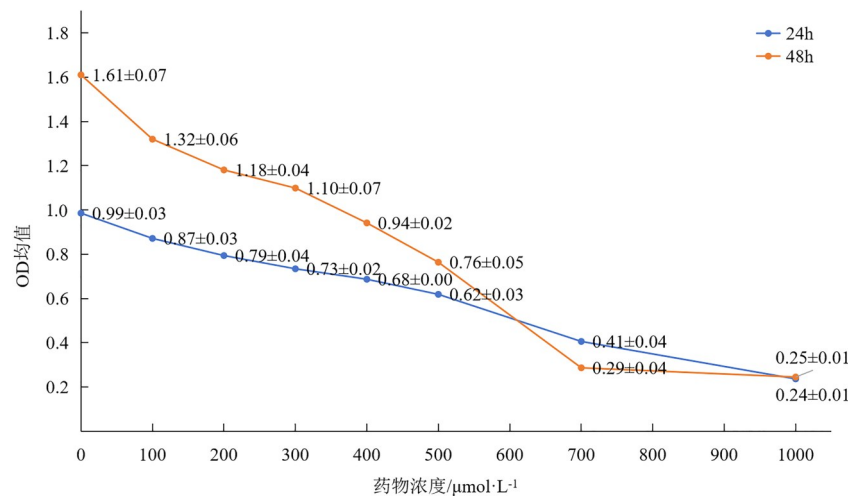


图1 不同浓度盐酸异丙肾上腺素对大鼠H9c2心肌细胞孵育24 h、48 h时OD值趋势图 ($\bar{x}\pm s$)
Figure 1 Trends in OD value of rat H9c2 cardiomyocytes incubated with different concentrations of isoproterenol hydrochloride for 24 h and 48 h ($\bar{x}\pm s$)

2.2 参附注射液药物浓度筛选结果

表2示,参附注射液作用于H9c2心肌细胞48 h后发现,浓度为16%及20%参附注射液与浓度为0时比较,细胞活性显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且抑制率显著提高,说明当参附注射液浓度 $\geq 16\%$ 时会对细胞出现明显抑制作用。表3示,0、12%、16%、20%浓度的参附注射液细胞活性(OD均值)均较低,4%和8%浓度时OD均值接近于1,说明浓度 $\geq 12\%$ 的参附注射液对盐酸异丙肾上腺素诱导H9c2心肌细胞损伤无改善作用,而8%浓度比4%浓度抑制率低,说明8%浓度的参附注射液对心肌损伤改善最明显,所以选择8%为最佳干预浓度。

表2 不同浓度参附注射液干预正常H9c2心肌细胞48 h后细胞活性及抑制率比较

Table 2 Comparison of cell activity and inhibition rate of different concentrations of Shenfu Injection in the intervention of normal H9c2 cardiomyocytes after 48 h			
浓度/%	样本数	细胞活性/OD均值, $\bar{x}\pm s$	抑制率/%
0	3	1.18±0.07	0
4	3	1.17±0.03	1.13
8	3	1.14±0.07	3.69
12	3	1.00±0.05	15.21
16	3	0.83±0.05 ^{a)}	29.55
20	3	0.58±0.04 ^{b)}	50.56

注: a) 与参附注射液浓度为0比较, $P<0.05$; b) 与参附注射液浓度为0比较, $P<0.01$ 。

2.3 各组心肌细胞活性、抑制率及细胞中NAD+/NADH值比较

表4示,与正常组比较,模型组细胞活性和

表3 不同浓度参附注射液干预盐酸异丙肾上腺素诱导H9c2心肌细胞损伤48 h后细胞活性及抑制率比较

Table 3 Comparison of cell activity and inhibition rate of different concentrations of Shenfu Injection in the intervention of isoproterenol hydrochloride-induced H9c2 cardiomyocyte injury after 48 h

浓度/%	样本数	细胞活性/OD均值, $\bar{x}\pm s$	抑制率/%
0	3	0.82±0.04	30.68
4	3	0.98±0.10	16.64
8	3	1.03±0.08	12.41
12	3	0.86±0.02	27.24
16	3	0.74±0.03	37.32
20	3	0.53±0.06	55.39

表4 各组H9c2心肌细胞活性、抑制率及NAD+/NADH值比较
Table 4 Comparison of H9c2 cardiomyocyte activity, inhibition rate and NAD+/NADH value in each group

组别	样本数	细胞活性/OD均值, $\bar{x}\pm s$	抑制率/%	NAD+/NADH
正常组	3	1.29±0.09	0	1.12±0.05
模型组	3	0.91±0.11 ^{a)}	29.41 ^{a)}	0.61±0.06 ^{a)}
参附注射液组	3	1.10±0.06 ^{b)}	14.76 ^{b)}	0.84±0.07 ^{b)}
SIRT1抑制剂组	3	0.81±0.07 ^{c)}	37.70 ^{c)}	0.48±0.05 ^{c)}

注: NAD+/NADH, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化态/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸还原态; SIRT1, 沉默信息调节因子1。

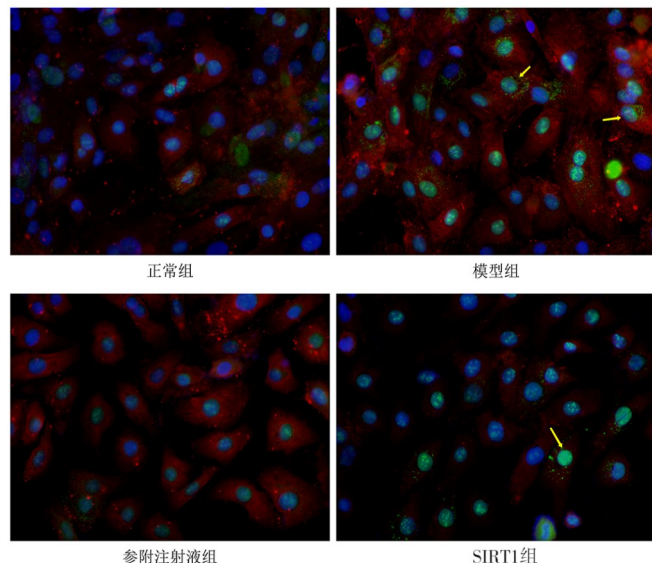
a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与参附注射液组比较, $P<0.05$ 。

NAD+/NADH值降低,抑制率升高($P<0.05$)。与模型组比较,参附注射液组细胞活性和NAD+/NADH值升高,抑制率降低($P<0.05$)。与参附注射液组比较,SIRT1抑制剂组细胞活性和NAD+/

NADH 值降低, 抑制率升高 ($P<0.05$)。

2.4 各组大鼠心肌细胞 HMGB1、SIRT1 荧光定位检测结果

H9c2 心肌细胞中 HMGB1 免疫荧光阳性信号为绿色, SIRT1 免疫荧光阳性信号为红色, 核染信号为蓝色。图 2 示, 与正常组比较, 模型组 HMGB1 含量增加并且定位在细胞核与细胞质中均有体现, 表明心力衰竭细胞诱导 HMGB1 乙酰化从细胞核向细胞质中迁移; 与模型组比较, 参附注射液组 SIRT1 含量增加, HMGB1 含量减少并且定位主要在细胞核, 表明参附注射液可增加 HMGB1 去乙酰化, 抑制心力衰竭细胞诱导 HMGB1 核转移; 与参附注射液组比较, SIRT1 抑制剂组 SIRT1 含量明显减少, HMGB1 含量增加并且定位在细胞核与细胞



注: 高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 免疫荧光阳性信号为绿色, 沉默信息调节因子 1 (SIRT1) 免疫荧光阳性信号为红色, 核染信号为蓝色, 图中黄色箭头指示为 HMGB1 转移到细胞外。

图 2 各组 H9c2 心肌细胞中 HMGB1、SIRT1 免疫荧光染色荧光定位结果 ($\times 400$)

Figure 2 Fluorescence localization of HMGB1 and SIRT1 in H9c2 cardiomyocytes of each group ($\times 400$)

表 5 各组 H9c2 心肌细胞乙酰化 HMGB1 蛋白及细胞核、细胞质中 HMGB1 蛋白相对表达量比较

Table 5 Comparison of protein expression of acetylated HMGB1 in H9c2 cardiomyocytes and HMGB1 in nucleus and cytoplasm in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	乙酰化 HMGB1 蛋白/HMGB1	细胞核 HMGB1 蛋白/PCNA	细胞质 HMGB1 蛋白/GAPDH
正常组	3	0.04 $\pm$ 0.01	0.37 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.01
模型组	3	0.34 $\pm$ 0.00 ^{a)}	0.15 $\pm$ 0.01 ^{a)}	0.26 $\pm$ 0.02 ^{a)}
参附注射液组	3	0.27 $\pm$ 0.01 ^{b)}	0.29 $\pm$ 0.02 ^{b)}	0.16 $\pm$ 0.02 ^{b)}
SIRT1 抑制剂组	3	0.53 $\pm$ 0.03 ^{c)}	0.11 $\pm$ 0.02 ^{c)}	0.21 $\pm$ 0.03 ^{c)}

注: HMGB1, 高迁移率族蛋白 B1; PCNA, 增殖细胞核抗原; GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与参附注射液组比较, $P<0.05$ 。

质中均有体现, 表明 SIRT1 的减少可诱导 HMGB1 乙酰化从细胞核向细胞质中迁移。

2.5 各组心肌细胞乙酰化 HMGB1 蛋白表达及心肌细胞核、细胞质 HMGB1 蛋白表达比较

表 5 示, 与正常组比较, 模型组心肌细胞乙酰化 HMGB1 蛋白及心肌细胞质 HMGB1 蛋白表达明显升高, 心肌细胞核 HMGB1 蛋白表达降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 参附注射液组心肌细胞乙酰化 HMGB1 蛋白及细胞质 HMGB1 蛋白表达明显降低, 细胞核 HMGB1 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 与参附注射液组比较, SIRT1 抑制剂组心肌细胞乙酰化 HMGB1 蛋白及细胞质 HMGB1 蛋白表达明显升高, 细胞核 HMGB1 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。

2.6 各组心肌细胞中 SIRT1、MYD88、TLR4、NF- κ B p65 蛋白表达比较

表 6 示, 与正常组比较, 模型组心肌细胞 SIRT1 蛋白表达降低, TLR4、MYD88、NF- κ B p65 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 参附注射液组心肌细胞 SIRT1 蛋白表达升高, MYD88、TLR4、NF- κ B p65 蛋白表达降低 ($P<0.05$); 与参附注射液组比较, SIRT1 抑制剂组 SIRT1 蛋白表达降低, TLR4、MYD88、NF- κ B p65 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。各组 H9c2 细胞 SIRT1、TLR4、MYD88、NF- κ B p65 蛋白电泳图见图 3。

2.7 各组心肌细胞中 SIRT1、HMGB1、TLR4、MYD88、NF- κ B p65 mRNA 表达比较

表 7 示, 与正常组比较, 模型组心肌细胞 SIRT1 mRNA 表达降低, HMGB1、TLR4、MYD88、NF- κ B p65 mRNA 表达升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 参附注射液组心肌细胞 SIRT1 mRNA 表达升高, 其余指标均降低 ($P<0.05$); 与参附注射液组比较, SIRT1 抑制剂组 SIRT1 mRNA 表达降低, 其余指标均升高 ($P<0.05$)。

表 6 各组 H9c2 心肌细胞中 SIRT1、TLR4、MYD88、NF-κB p65 蛋白表达比较

Table 6 Comparison of SIRT1, TLR4, MYD88 and NF-κB p65 protein expressions in H9c2 cardiomyocytes of each group (/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	SIRT1	TLR4	MYD88	NF-κB p65
正常组	3	0.19±0.01	0.05±0.00	0.06±0.00	0.05±0.010
模型组	3	0.11±0.01 ^{a)}	0.13±0.02 ^{a)}	0.15±0.01 ^{a)}	0.22±0.02 ^{a)}
参附注射液组	3	0.16±0.01 ^{b)}	0.08±0.02 ^{b)}	0.11±0.01 ^{b)}	0.14±0.01 ^{b)}
SIRT1 抑制剂组	3	0.06±0.01 ^{c)}	0.23±0.02 ^{c)}	0.24±0.01 ^{c)}	0.28±0.01 ^{c)}

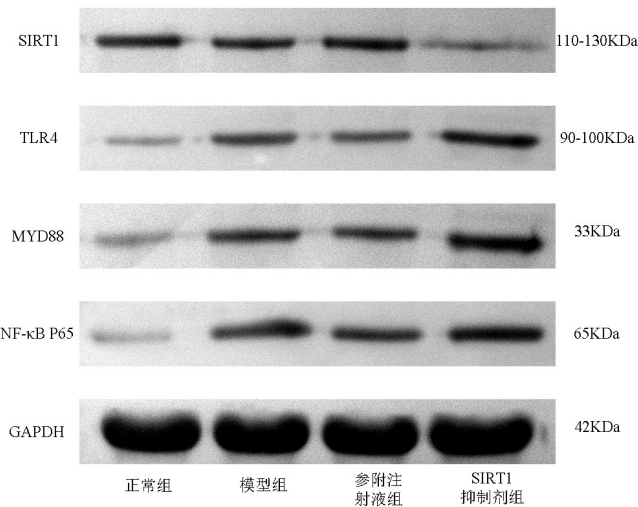
注：SIRT1，沉默信息调节因子 1；TLR4，Toll 样受体 4；MYD88，髓样细胞分化因子 88；NF-κB p65，核因子 κB p65；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶。
a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与参附注射液组比较， $P<0.05$ 。

表 7 各组 H9c2 细胞中 SIRT1、HMGB1、TLR4、MYD88、NF-κB p65 mRNA 表达比较

Table 7 Comparison of SIRT1, HMGB1, TLR4, MYD88 and NF-κB p65 mRNA expressions in H9c2 cells of each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	SIRT1	HMGB1	TLR4	MYD88	NF-κB p65
正常组	3	0.98±0.11	1.06±0.22	0.93±0.17	0.98±0.09	1.23±0.29
模型组	3	0.26±0.05 ^{a)}	2.98±0.41 ^{a)}	2.98±0.57 ^{a)}	3.80±0.77 ^{a)}	5.55±0.78 ^{a)}
参附注射液组	3	0.44±0.04 ^{b)}	1.68±0.10 ^{b)}	1.86±0.31 ^{b)}	1.66±0.17 ^{b)}	2.26±0.41 ^{b)}
SIRT1 抑制剂组	3	0.14±0.03 ^{c)}	4.67±0.59 ^{c)}	4.68±0.60 ^{c)}	6.32±0.76 ^{c)}	6.46±1.16 ^{c)}

注：SIRT1，沉默信息调节因子 1；HMGB1，高迁移率族蛋白 B1；TLR4，Toll 样受体 4；MYD88，髓样细胞分化因子 88；NF-κB p65，核因子 κB p65。
a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与参附注射液组比较， $P<0.05$ 。



注：SIRT1，沉默信息调节因子 1；TLR4，Toll 样受体 4；MYD88，髓样细胞分化因子 88；NF-κB p65，核因子 κB p65；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

图 3 各组 H9c2 细胞 SIRT1、TLR4、MYD88、NF-κB p65 蛋白电泳图

Figure 3 Electrophoresis of SIRT1, TLR4, MYD88 and NF-κB p65 proteins in H9c2 cells of each group

3 讨论

随着人口老龄化的发展，CHF 的患者总数将大幅上升^[11]。目前已经证实，炎症参与了不同类型 CHF 的发展过程，并且 CHF 患者左心室功能不全程度与炎症生物标志物之间存在相关性^[12]。HMGB1 是重要的致炎因子，主要由坏死或损伤的细胞被动

释放或单核/巨噬细胞主动分泌而来^[13]。HMGB1 通过受体 TLR4 介导的通路激活 NF-κB，活化的 NF-κB 转移至细胞核，参与调控多种靶基因，诱导内皮细胞中黏附分子的产生，增强成纤维细胞、白细胞炎症反应，促进血管细胞分泌促炎因子及趋化因子，从而发挥促炎作用^[14]。HMGB1 的核质易位是炎症过程中 HMGB1 活性释放的关键步骤，抑制细胞外 HMGB1 水平可减轻炎症反应。有研究^[15]发现，保留 HMGB1 在细胞核中的表达可以减轻压力超负荷性心力衰竭期间心肌细胞的 DNA 损伤，改善心室重构和心脏功能障碍；在细胞外，HMGB1 作为损伤相关分子模式引发炎症反应，最终导致组织损伤。而 HMGB1 的翻译后修饰，如磷酸化和乙酰化，参与了 HMGB1 的易位和分泌^[16-17]。

SIRT 是在酵母中首次发现的 NAD⁺依赖性脱乙酰化酶，属于组蛋白脱乙酰基酶Ⅲ类，与 DNA 共享一个高度保守的 NAD⁺结合催化结构域^[5]。在心肌细胞中 SIRT1 参与细胞凋亡、代谢等，可发挥抗炎、减少细胞凋亡、抗氧化应激等作用^[18]。SIRT1 可以作用于 NF-κB，减少其与核内炎性基因结合，从而减少炎性因子的产生^[19]。研究^[5]发现，SIRT1 通过促进 HMGB1 去乙酰化，抑制 HMGB1 的细胞外释放，这表明 SIRT1 能通过去乙酰化调控 HMGB1 及其通路的活性，可见 SIRT1 在 CHF 发生发展过程中发挥着重要作用。

依据 CHF 临床症状, 可将其归于中医学“心悸”“怔忡”“水肿”等范畴。《金匱要略·水气病脉证》云:“心水者, 其身重而少气……其人阴肿”, 指出阳气不足, 虚弱无力, 无法温煦水湿, 致气机阻滞, 饮停心下则为心悸, 聚他处则为水肿。因此, 心阳虚弱、水饮内停为 CHF 发生的主要病因病机。参附注射液出自古方参附汤, 由人参、附子两味药组成, 方中人参大补元气、复脉固脱、益气摄血; 附子回阳救逆、补火助阳。二者同用具有益气温阳、回阳救逆、温通心脉等多重功效, 广泛应用于心脑血管疾病, 不仅能显著增加血管灌流量、减轻心肌的组织损伤, 而且还具有明确的抗炎作用^[20]。

本研究结果显示, 盐酸异丙肾上腺素诱导的 H9c2 心肌细胞抑制率明显上升, 加用参附注射液后可以明显改善细胞抑制率, 表明参附注射液有显著的干预效果。从免疫荧光定位结果来看, 在异丙肾上腺素诱导的 H9c2 心肌细胞中 HMGB1 在细胞核与细胞质中均有体现, 表明异丙肾上腺素诱导的 H9c2 心肌细胞可以使 HMGB1 从细胞核向细胞质中迁移; SIRT1 抑制剂干预后 HMGB1 含量增加, 定位在细胞核与细胞质中均有体现, 表明 HMGB1 从细胞核向细胞质中迁移与 SIRT1 的减少相关。参附注射液干预后, 异丙肾上腺素诱导的 H9c2 心肌细胞中 HMGB1 定位以细胞核表达为主, 表明参附注射液可以起到抑制异丙肾上腺素诱导的 H9c2 心肌细胞中 HMGB1 从细胞核向细胞质转移的作用。去乙酰化酶活性可通过 NAD⁺/NADH 比值来体现, 比值越高说明其去乙酰化程度越高。从本研究 NAD⁺/NADH 值分析, 异丙肾上腺素诱导的 H9c2 心肌细胞及 SIRT1 抑制剂组去乙酰化水平明显下降, 而参附注射液可以提升其去乙酰化水平。从蛋白及 mRNA 表达情况来看, 异丙肾上腺素诱导的 H9c2 心肌细胞及 SIRT1 抑制剂干预后心肌细胞中 SIRT1 蛋白及 mRNA 表达减少, 而 HMGB1 mRNA 表达增加, 且其蛋白在细胞核中表达减少, 细胞质中表达增加, 表明异丙肾上腺素可抑制 SIRT1 蛋白表达, 增加 HMGB1 蛋白的乙酰化, 使 HMGB1 从细胞核向细胞质中迁移。参附注射液干预后, 异丙肾上腺素诱导的 H9c2 心肌细胞中 SIRT1 蛋白、mRNA 表达增加, HMGB1 乙酰化显著减少并且以细胞核表达为主, 心肌细胞 TLR4、MYD88、NF- κ B p65 蛋白及 mRNA 表达降低, 表明参附注射液可以增加 SIRT1 蛋白及 mRNA 表达, 减少 HMGB1 乙酰化, 调控 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路相关因子抑制 HMGB1 转移。

综上, HMGB1 发挥炎症作用的前提是发生乙酰化, 且乙酰化导致 HMGB1 由细胞核向细胞质转移。而参附注射液可以通过调控 SIRT1 降低 HMGB1 乙酰化水平从而抑制 HMGB1 的核易位, 达到改善异丙肾上腺素诱导的 H9c2 心肌细胞损伤的作用, 但参附注射液调控 HMGB1 乙酰化的具体作用靶点不清楚, 仍需进一步明确。

参考文献

- [1] 邱伯雍, 王永霞. 慢性心力衰竭流行病学及防治研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2017, 31(6): 619-621.
- [2] PELLEGRINI L, FOGLIO E, PONTEMEZZO E, et al. HMGB1 and repair: focus on the heart [J]. Pharmacol Ther, 2019, 196: 160-182. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.12.005.
- [3] VOLZ HC, LAOHACHEWIN D, SCHELLBERG D, et al. HMGB1 is an independent predictor of death and heart transplantation in heart failure[J]. Clin Res Cardiol, 2012, 101(6): 427-435.
- [4] HAIGIS MC, SINCLAIR DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance [J]. Annu Rev Pathol, 2010, 5: 253-295. doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092250.
- [5] KIM YM, PARK EJ, KIM JH, et al. Ethyl pyruvate inhibits the acetylation and release of HMGB1 via effects on SIRT1/STAT signaling in LPS-activated RAW264.7 cells and peritoneal macrophages [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 41: 98-105. doi: 10.1016/j.intimp.2016.11.002.
- [6] WANG T, YANG B, JI R, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids alleviate hepatic steatosis-induced inflammation through Sirt1-mediated nuclear translocation of NF- κ B p65 subunit in hepatocytes of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2017, 71: 76-82. doi: 10.1016/j.fsi.2017.09.064.
- [7] 周亚滨, 夏兆晨, 张晶晶, 等. 中药注射液治疗心力衰竭疗效研究的网状 Meta 分析[J]. 中国循证医学杂志, 2021, 21(9): 1067-1074.
- [8] 徐琛, 吴志勇, 陆寒梅. 参附注射液治疗心肾阳虚型慢性心衰临床观察[J]. 中国中医药现代远程教育, 2019, 17(19): 88-90.
- [9] 黄淑敏, 廖晓倩, 范星宇, 等. 基于 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路探讨参附注射液对慢性心力衰竭大鼠的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(20): 5556-5563.
- [10] 杨梦, 胡思远, 李琳, 等. 基于“以方测证”探讨异丙肾上腺素诱导慢性心衰小鼠模型的中医证型及证候本质[J]. 中药药理与临床, 2024, 40(2): 101-108.
- [11] PELLICORI P, KHAN MI, GRAHAM FJ, et al. New perspectives and future directions in the treatment of heart failure[J]. Heart Fail Rev, 2020, 25(1): 147-159.

- [12]ZHANG Y, BAUERSACHS J, LANGEER HF. Immune mechanisms in heart failure[J]. Eur J Heart Fail, 2017, 19(11):1379-1389.
- [13]TSUNG A, KLUNE JR, ZHANG X, et al. HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor 4 dependent reactive oxygen species production and calcium mediated signaling[J]. Exp Med, 2007, 204 (12):2913-2933.
- [14]GORDON JW, SHAW JA, KIRSHENBAUM LA. Multiple facets of NF- κ B in the heart: to be or not to NF- κ B[J]. Circ Res, 2011, 108(9):1122-1132.
- [15]FUNAYAMA A, SHISHIDO T, NETSU S, et al. Cardiac nuclear high mobility group box 1 prevents the development of cardiac hypertrophy and heart failure[J]. Cardiovasc Res, 2013, 99(4):657-664.
- [16]ZAMORA R, BARCLAY D, YIN J, et al. HMGB1 is a central driver of dynamic pro-inflammatory networks in pediatric acute liver failure induced by acetaminophen[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):5971.
- [17]QI Z, ZHANG Y, QI S, et al. Salidroside inhibits HMGB1 acetylation and release through upregulation of SIRT1 during inflammation[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 9821543. doi: 10.1155/2017/9821543.
- [18]D'ONOFRIO N, SERVILLO L, BALESTRIERI ML. SIRT1 and SIRT6 signaling pathways in cardiovascular disease protection[J]. Antioxid Redox Signal, 2018, 28 (8):711-732.
- [19]JIA Y, GAO P, CHEN H, et al. SIRT1 suppresses PMA and ionomycin-induced ICAM-1 expression in endothelial cells[J]. Sci China Life Sci, 2013, 56(1): 19-25.
- [20]曾德金. 参附注射液的药理研究及临床应用进展[J]. 中西医结合研究, 2019, 11(3):159-161.

Effect of *Shenfu Injection* (参附注射液) on SIRT1 Deacetylation-modified Regulation of HMGB1/TLR4/NF- κ B Pathway in Isoproterenol-induced Cardiomyocyte Injury Model

HUANG Shumin^{1,2}, LIAO Xiaoqian², FAN Xingyu², WANG Ziyi³, HU Zhixi²

1. The Second People's Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350003; 2. Hunan University of Chinese Medicine; 3. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences

ABSTRACT Objective To investigate the effect and possible mechanism of *Shenfu Injection* (参附注射液) on rat cardiomyocyte injury induced by isoproterenol from the perspective of regulating the high mobility group protein B1 (HMGB1)/Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor κ B (NF- κ B) pathway through the deacetylation modification of silent information regulator 1 (SIRT1). **Methods** The optimal concentration and intervention duration of isoproterenol hydrochloride and the optimal intervention concentration of *Shenfu Injection* were screened out by CCK-8 method. Logarithmically growing H9c2 rat cardiomyocytes were taken at 5×10^4 cells/well and divided into normal group, model group, *Shenfu Injection* group, and SIRT1 inhibitor group, with 3 replicates in each group. Except for the normal group, the cells in the other groups were induced by isoproterenol hydrochloride to establish a chronic heart failure cell model. After modeling, the *Shenfu Injection* group was given *Shenfu Injection* at the optimal intervention concentration, and the SIRT1 inhibitor group was given 1 μ mol/L of SIRT1 inhibitor EX-527, for optimal intervention duration. CCK-8 assay was used to detect the cell activity and calculate the inhibitory rate. ELISA assay was used to detect the nicotinamide adenine dinucleotide oxidation state/nicotinamide adenine dinucleotide reduction state (NAD⁺/NADH) in cardiomyocytes. Immunofluorescence was used to detect the immunofluorescence localization of HMGB1 and SIRT1 in cardiomyocytes. Western blotting was used to detect the protein expression of acetylated HMGB1 in cardiomyocytes, HMGB1 in the nucleus and cytoplasm, and SIRT1, TLR4, myeloid differentiation factor 88 (MYD88) and NF- κ B p65 in cardiomyocytes. RT-qPCR was used to detect the mRNA expression of SIRT1, HMGB1, TLR4, MYD88 and NF- κ B p65 in cardiomyocytes. **Results** The optimal intervention concentration of isoproterenol hydrochloride was 300 μ mol/L, and the intervention duration was 48 hours; 8% was the optimal intervention concentration of *Shenfu Injection*. Compared to those in the normal group, the cell activity, NAD⁺/NADH value, nuclear HMGB1 protein expression, cardiomyocyte SIRT1 protein and mRNA expression in the model group decreased, while the cell inhibition rate, cardiomyocyte acetylated HMGB1 and cytoplasmic HMGB1 protein expression, cardiomyocyte TLR4, MYD88, NF- κ B p65 protein and mRNA expression all increased ($P < 0.05$); fluorescence localization showed that the content of HMGB1 in cardiomyocytes in the model group increased and was localized in both the nucleus and cytoplasm. Compared to the model group and the SIRT1 inhibitor group, the *Shenfu Injection* group showed significant improvements in all the above indicators ($P < 0.05$); fluorescence localization showed that the SIRT1 content increased in the *Shenfu injection* group, while the HMGB1 content decreased, and was mainly located in the nucleus. **Conclusion** *Shenfu Injection* can improve myocardial cell damage by increasing SIRT1 expression to reduce the acetylation level of HMGB1, regulating the HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway and inhibiting the nuclear translocation of HMGB1.

Keywords chronic heart failure; myocardial cells; *Shenfu Injection* (参附注射液); silent information regulator 1; deacetylation; high mobility group protein B1

(收稿日期: 2024-03-05; 修回日期: 2024-04-25)

[编辑: 邓媛]