

苦瓜皂苷 L 对异丙肾上腺素诱导的大鼠 H9c2 心肌细胞肥大的作用研究

李洪铭¹, 邱雨美¹, 谢梦蝶¹, 熊印华¹, 尚广彬², 涂珺², 汤喜兰¹(1. 江西科技师范大学药学院, 江西 南昌 330013; 2. 江西中医药大学中医基础理论分化发展研究中心, 江西 南昌 330004)

摘要: **目的** 探究苦瓜皂苷 L 对异丙肾上腺素诱导的大鼠 H9c2 心肌细胞肥大的保护作用及机制。**方法** (1)体外培养大鼠 H9c2 心肌细胞, 采用 MTT 法评价不同浓度的异丙肾上腺素(0.625、1.25、2.5、5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和不同浓度的苦瓜皂苷 L(1.625、3.125、6.25、12.5、25.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)对心肌细胞活力的影响。(2)采用异丙肾上腺素诱导心肌细胞肥大模型。实验分为正常组、模型组、苦瓜皂苷 L 干预组和苦瓜皂苷 L 单独组。分别通过细胞拍照结合 ImageJ 软件测量、荧光定量 PCR 法考察苦瓜皂苷 L 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对异丙肾上腺素诱导的心肌细胞表面积和心肌肥大相关胚胎基因 ANP、 β -MHC 及 α -SKA 表达的影响。在此基础上, 选择参与甘油磷脂代谢的酶 VI 组磷脂酶 A₂(PLA2G6)、二酰甘油激酶 ζ (DGKZ)、甘油磷酸胆碱磷酸二酯酶 1(GPCPD1)为指标, 评价苦瓜皂苷 L 对异丙肾上腺素诱导的心肌细胞上述 3 种酶基因表达的影响; 进一步以 PLA2G6 和 DGKZ 蛋白为指标, 采用 Western Blot 法考察苦瓜皂苷 L 对异丙肾上腺素诱导的心肌细胞 PLA2G6 和 DGKZ 蛋白表达的影响。**结果** (1)与正常组比较, 异丙肾上腺素(0.625~10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和苦瓜皂苷 L(1.625~25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)对心肌细胞活力没有明显影响($P>0.05$)。本研究选用异丙肾上腺素 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和苦瓜皂苷 L 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 进行实验。(2)与正常组比较, 模型组心肌细胞表面积增加($P<0.05$), 心肌肥大相关胚胎基因 ANP、 β -MHC、 α -SKA 表达上调($P<0.05$), PLA2G6、DGKZ、GPCPD1 mRNA 表达上调($P<0.05$), PLA2G6 和 DGKZ 蛋白表达增加($P<0.05$); 与模型组比较, 苦瓜皂苷 L 干预组能够降低心肌细胞表面积($P<0.05$), 下调心肌肥大相关胚胎基因 ANP、 β -MHC、 α -SKA 表达($P<0.05$), 下调 PLA2G6、DGKZ、GPCPD1 mRNA 表达($P<0.05$), 降低 PLA2G6 和 DGKZ 蛋白表达($P<0.05$)。**结论** 苦瓜皂苷 L 可缓解异丙肾上腺素诱导的心肌细胞肥大, 可能与其抑制甘油磷脂代谢酶 PLA2G6 和 DGKZ 的表达有关。

关键词: 苦瓜皂苷 L; 苦瓜; 心肌肥大; 异丙肾上腺素; 甘油磷脂代谢; 大鼠 H9c2 心肌细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)12-1762-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.12.005

The Effect of Momordicoside L on Isoproterenol Induced Hypertrophy in Rat H9c2 Cardiomyocytes

LI Hongming¹, QIU Yumei¹, XIE Mengdie¹, XIONG Yinhu¹, SHANG Guangbin², TU Jun², TANG Xilan¹(1. School of Pharmacy, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang 330013 Jiangxi, China; 2. Research Center for Differentiation and Development of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of momordicoside L on isoproterenol-induced hypertrophy in rat H9c2 cardiomyocytes. **Methods** (1) Rat H9c2 cardiomyocytes were cultured *in vitro*. The effects of both isoproterenol at different concentrations (0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and momordicoside L at different concentrations (1.625, 3.125, 6.25, 12.5, 25.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) on cardiomyocytes viability were evaluated by MTT

收稿日期: 2021-06-28

作者简介: 李洪铭, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药心血管药理。Email: 1113958062@qq.com。通信作者: 汤喜兰, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 中药心血管药理。Email: tangxilan1983@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81960732, 81660692); 江西省自然科学基金项目(20181BAB215041); 江西科技师范大学博士启动基金项目(2017BSQD017); 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室开放项目(TCM-201911)。

method, respectively. (2) Isoproterenol was used to induce cardiomyocytes hypertrophy. After cultured for 24 h, H9c2 cardiomyocytes were divided into the normal group, model group, momordicoside L intervention group and momordicoside L alone group. The effects of momordicoside L on isoproterenol-induced cardiomyocytes hypertrophy were evaluated through measurement of cardiomyocytes surface area and expressions of hypertrophy-related fetal genes including ANP, β -MHC and α -SKA. We further observed the effects of momordicoside L on the expressions of glycerophospholipid metabolism enzymes including PLA2G6, DGKZ and GPCPD1 in isoproterenol-induced cardiomyocytes by fluorescence quantitative PCR and Western Blot, respectively. **Results** (1) Compared with the normal group, isoproterenol ($0.625 \sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and momordicoside L ($1.625 \sim 25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) had no significant effects on cell viability. In this study, isoproterenol $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and momordicoside L $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ were selected to perform the experiment. (2) Compared with the normal group, the cardiomyocytes surface area in the model group was increased ($P < 0.05$), the levels of ANP, β -MHC and α -SKA were upregulated ($P < 0.05$), the expressions of PLA2G6, DGKZ and GPCPD1 mRNA were upregulated ($P < 0.05$), the protein expressions of PLA2G6 and DGKZ were increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, momordicoside L intervention group reduced cardiomyocytes surface area ($P < 0.05$) as well as the levels of ANP, β -MHC and α -SKA ($P < 0.05$), downregulated the expressions of PLA2G6, DGKZ and GPCPD1 mRNA ($P < 0.05$), and decreased the protein expressions of PLA2G6 and DGKZ ($P < 0.05$). **Conclusion** Momordicoside L attenuates isoproterenol-induced cardiomyocytes hypertrophy by preventing the expressions of PLA2G6 and DGKZ. The anti-cardiac hypertrophy of momordicoside L may be related to its inhibition of glycerophospholipid metabolism.

Keywords: Momordicoside L; *momordica charantia*; cardiomyocyte hypertrophy; isoproterenol; glycerophospholipid metabolism; rat H9c2 cardiomyocytes

心肌肥大是心肌对缺血缺氧、压力或容量超负荷、激素等各种心血管刺激因子的代偿性反应，是高血压、心肌病、瓣膜病等多种心血管疾病共同的病理过程^[1]。临床上治疗心肌肥大主要以血管紧张素 I 转化酶抑制药、血管紧张素 II 受体阻断药、 β 受体阻断药等为主，但上述药物尚不能阻断或逆转心肌肥大的临床发展。心肌肥大的发生机制较为复杂。当前，脂质代谢异常已经成为仅次于高血压的心血管病危险因素^[2]。Tham 等^[3]研究发现扩张型心肌病小鼠心脏中的缩醛磷脂含量下降，心肌细胞膜的甘油磷脂可能参与了心肌肥大。研究^[4]表明参与甘油磷脂代谢的酶与心肌肥大相关，二酰甘油激酶 (DGKs) 同工酶与心肌肥大、高血压、糖尿病等多种疾病的发病有关。在内皮素-1 诱导的大鼠乳鼠心肌细胞肥大模型中，二酰甘油激酶 ζ 表达上调，其过表达可阻断内皮素-1 诱导的 PKC ϵ -ERK-AP1 信号通路激活而抑制心肌肥大^[5]。在小鼠心肌缺血再灌注损伤模型中，心肌特异性过表达 DGK- α 可激活 PKC ϵ 、ERK1/2 和 p70S6K 而加重心肌损伤^[6]。二酰甘油激酶被认为是治疗心肌肥大等疾病的潜在药物靶标^[4]。

苦瓜 (*momordica charantia* L.) 为葫芦科一年生植物，具有祛暑涤热、明目、解毒功能，主治暑热烦渴、消渴、赤眼疼痛、痢疾、疮痈肿毒^[7]。现代研究^[8-9]显示，苦瓜具有减肥、抗糖尿病、抗炎、抗肿瘤、抗菌、抗氧化、抗抑郁和抗溃疡等作用。苦瓜皂苷 L (*momordicoside* L) 是存在于苦瓜根、茎和果实中的葫芦烷型三萜类化合物 (见图 1)，是控制苦瓜苦味的主要活性成分之一^[10]。研究^[11]表明苦瓜皂苷 L 可抑制脂多糖 (LPS) 刺激的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 炎症因子 IL-6、TNF- α 、iNOS 和 COX-2 mRNA 上调，可抑制 α -淀粉酶和 β -葡萄糖苷酶的活性，具有良好的抗炎和降糖作用。目前，尚未见到苦瓜皂苷 L 对心肌肥大影响的研究报道。本研究采用异丙肾上腺素 (isoproterenol, ISO) 建立大鼠 H9c2 心肌细胞肥大模型，考察苦瓜皂苷 L 对心肌细胞肥大的影响并探讨其可能的机制，为苦瓜皂苷 L 防治心血管疾病的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株 大鼠 H9c2 细胞株，购自协和医科大学细胞实验中心。

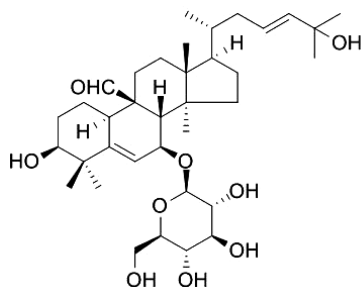


图1 苦瓜皂苷L的化学结构

Figure 1 Structural formula of momordicoside L

1.2 药品与试剂 异丙肾上腺素, 中国食品药品检定研究院, 批号: Z21N10X103254; 苦瓜皂苷 L, 上海源叶生物科技有限公司, 批号: T10N8Z47950; 胎牛血清, 美国 Gemini 公司, 批号: A15H74K; DMEM 高糖培养基、PBS 缓冲液、0.25% 胰蛋白酶消化液、MTT 试剂, 北京索莱宝科技有限公司, 批号分别为 SH30022.01、20200911、20200925、804W057; 总 RNA 提取试剂盒、PrimeScript RT reagent Kit、SYBR Premix Ex Taq 试剂盒, 日本 Takara 公司, 批号分别为: AJG1902A、AK4602、AK51599A; 兔 VI 组磷脂酶 A₂(PLA2G6)单克隆抗体、兔二酰甘油激酶 ζ(DGKZ)单克隆抗体, 美国 Abcam 公司, 批号分别为: GR3372638-2、GR3244376-3; 小鼠 β-actin 单克隆抗体, 美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, 批号为: #J2320; 羊抗兔二抗及羊抗小鼠二抗, 杭州华安生物技术有限公司, 批号分别为: G200109、G200911; RIPA 裂解缓冲液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、5×上样缓冲液、彩色预染蛋白质分子量标准、ECL 化学发光检测试剂盒、显影定影试剂, 碧云天生物技术研究, 批号分别为: 121619200504、120219201027、031720200603、011420201026、121720210308、042420201023; 电泳液、电转液、封闭用 BSA, 北京普利莱基因技术有限公司, 批号分别为: 2020J0JB1005、2020N1KB1006、2020D0JP1621。

1.3 实验仪器 MI52-N 倒置显微镜, 广州明美光电技术有限公司; WJ-III 二氧化碳培养箱, 上海新苗医疗器械制造有限公司; SW-CJ-1D 单人净化工作台, 浙江孚夏医疗科技有限公司; Spectra Max Plus384 全波长酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; NanoDrop-2000 核酸蛋白测定仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; T100™ Thermal Cycler PCR 仪、CFX96™ Real-Time PCR 仪、Mini-PROTEAN® Tetra Cell 电泳系统, 美国 Bio-rad 公司; TGL20M 台

式高速冷冻离心机, 盐城凯特实验仪器有限公司。

1.4 细胞培养 H9c2 心肌细胞采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中进行培养, 每 2 d 换液 1 次, 当细胞汇合至 80%~90% 时可进行实验。

1.5 异丙肾上腺素和苦瓜皂苷 L 对 H9c2 心肌细胞活力的影响 H9c2 心肌细胞以每孔 5×10^4 个的密度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL, 培养 24 h 后, 分别加入 0.625、1.25、2.5、5、10 μmol·L⁻¹ 的异丙肾上腺素或 1.625、3.125、6.25、12.5、25.0 μg·mL⁻¹ 的苦瓜皂苷 L, 正常组则加入 1% 的 DMSO, 每组 5 个复孔。药物作用 24 h, 吸去培养基, 加入 1 mg·mL⁻¹ 的 MTT 溶液, 每孔 50 μL, 37 ℃ 孵育 4 h 后, 弃去 MTT 溶液, 加入 DMSO 溶液, 每孔 150 μL。酶标仪 570 nm 下测定吸光度(A)值, 计算细胞增殖抑制率(IC)。IC(%)=(A_{正常组}-A_{加药组})/A_{正常组}×100%。

1.6 模型复制、实验分组及加药 基于“1.5”项下 MTT 实验结果并参考有关研究^[12]复制 H9c2 心肌细胞肥大模型, 以心肌细胞表面积增大和心肌肥大相关胚胎基因 ANP、β-MHC、α-SKA 表达上调提示模型复制成功。将对数生长期细胞接种于 35 mm 培养皿中, 心肌细胞表面积测量实验以 5×10^3 个细胞密度接种, 基因和蛋白表达实验以 1×10^5 个细胞密度接种, 培养 24 h 后随机分成 4 组。正常组, 加入与其他各组等体积的溶媒(1% 的 DMSO); 模型组, 加入异丙肾上腺素 10 μmol·L⁻¹; 苦瓜皂苷 L 干预组, 预先加入苦瓜皂苷 L 12.5 μg·mL⁻¹ 干预 1 h, 然后加入异丙肾上腺素 10 μmol·L⁻¹; 苦瓜皂苷 L 单独组, 加入苦瓜皂苷 L 12.5 μg·mL⁻¹。

1.7 H9c2 心肌细胞表面积测量 药物作用 24 h 后, PBS 洗细胞 2 次, 运用 MShot Image Analysis System 对各组细胞进行拍照, 采用 ImageJ 软件测量心肌细胞表面积。

1.8 H9c2 心肌细胞肥大相关胚胎基因及甘油磷脂代谢相关酶基因表达 药物作用 24 h 后, 预冷 PBS 洗细胞 3 次, 收集细胞, 按照说明书提取细胞总 RNA, 测定 RNA 浓度并确定纯度。取 1 μg RNA 逆转录, 合成 cDNA。反应条件为: 37 ℃ 15 min, 85 ℃ 5 s。随后以 cDNA 为模板, 建立 qPCR 反应体系。根据 NCBI 数据库和 primer 3 软件设计引物, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 具体 PCR 引物序列见表 1。qPCR 反应条件为: 95 ℃ 30 s; 95 ℃ 10 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 40 个循环。结果分析以 18S rRNA 为内参基因, 10 倍稀释制作内参

基因和目的基因标准曲线, 稀释范围为 $1\sim 10^{-5}$, 根据标准曲线计算心肌肥大相关胚胎基因 ANP、 β -MHC、 α -SKA 以及甘油磷脂代谢途径相关酶基因 PLA2G6、DGKZ、甘油磷酸胆碱磷酸二酯酶 1(GPCPD1) 的表达量。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for fluorescence quantitative PCR

基因	上游引物	下游引物
ANP	5'-TCTCCATCACCAAGGGCTTC-3'	5'-TGACCTCATCTTCTACCGGC-3'
β -MHC	5'-GAGTTCGGCGAGTCAAAGA-3'	5'-AGCCTCTCGGTCATCTCCTT-3'
α -SKA	5'-GAAGACCTGTACGCCAACA-3'	5'-TCCACACTGAGTACTTGCGC-3'
PLA2G6	5'-ATGCCCCGAATGCTTCTGAA-3'	5'-TGGTGTGTCCCATGCTCTC-3'
DGKZ	5'-TGCCCCCTGGATGCTTCAAC-3'	5'-GGTCCATTCCGTCACACACT-3'
GPCPD1	5'-TGAGAGAAGCGCTGGAATCC-3'	5'-TTGTTGAGTTCCCTGCACCA-3'
18S rRNA	5'-GGCCGTCTTCTAGTTGGTGA-3'	5'-TGAGCCAGTTCAGTGTAGCG-3'

1.9 H9c2 心肌细胞甘油磷脂代谢相关酶蛋白 PLA2G6 和 DGKZ 蛋白表达 药物作用 24 h 后, 预冷 PBS 洗细胞 3 次, 收集并裂解细胞, 测定蛋白浓度并进行蛋白变性。取 40 μg 蛋白在 10% 分离胶进行 100 V 恒压电泳, 随后 90 V 恒压转膜 100 min。5% BSA 封闭 1 h 后分别加入 PLA2G6 一抗 (1:2 000)、DGKZ 一抗 (1:2 000)、 β -actin 一抗 (1:500), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 室温二抗孵育 30 min。采用 ECL 化学发光检测试剂进行暗室曝光、显影和定影, 并扫描条带, 运用 ImageJ 软件进行分析。

1.10 统计学处理方法 计量资料以均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm s_x$) 表示, 应用 GraphPad prism 8.0 进行统计分析。多组间比较符合正态分布且方差齐时用单因素方差分析, 然后进行 Student Newman-Keuls 多重比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度的异丙肾上腺素对 H9c2 心肌细胞活力的影响 如表 2 所示, 与正常组比较, 异丙肾上腺素在 $0.625\sim 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内对 H9c2 心肌细胞没有明显毒性 ($P > 0.05$)。参考相关研究^[12], 本研究选用异丙肾上腺素 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 用于诱导心肌细胞肥大模型。

2.2 不同浓度的苦瓜皂苷 L 对 H9c2 心肌细胞活力的影响 如表 3 所示, 与正常组比较, 苦瓜皂苷 L 在 $1.625\sim 25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内对 H9c2 心肌细胞没有明显毒性 ($P > 0.05$)。本研究选用苦瓜皂苷 L $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 用于评价苦瓜皂苷 L 对异丙肾上腺素诱导的心肌细胞肥大的影响。

表 2 异丙肾上腺素对 H9c2 心肌细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s_x$, $n=5$)

Table 2 Effects of isoproterenol on cell viability in H9c2 cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s_x$, $n=5$)

组别	药物浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	A 值
正常组	—	0.636 ± 0.014
异丙肾上腺素组	0.625	0.631 ± 0.039
	1.25	0.686 ± 0.013
	2.5	0.643 ± 0.027
	5	0.628 ± 0.013
	10	0.632 ± 0.067

表 3 苦瓜皂苷 L 对 H9c2 心肌细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s_x$, $n=5$)

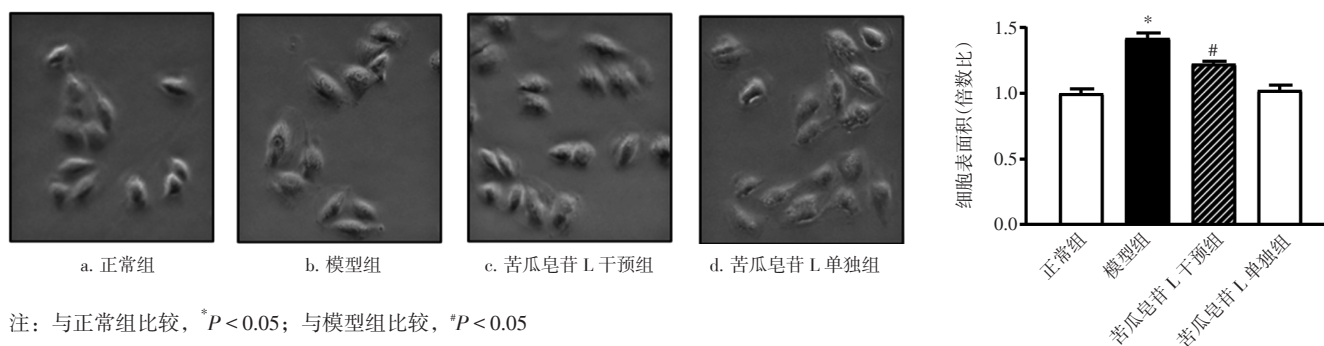
Table 3 Effects of momordicoside L on cell viability in H9c2 cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s_x$, $n=5$)

组别	药物浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	A 值
正常组	—	0.589 ± 0.023
苦瓜皂苷 L 组	1.625	0.586 ± 0.048
	3.125	0.605 ± 0.019
	6.25	0.594 ± 0.041
	12.5	0.597 ± 0.038
	25	0.566 ± 0.025

2.3 苦瓜皂苷 L 对异丙肾上腺素诱导的 H9c2 心肌细胞表面积的影响 如图 2 所示, 与正常组比较, 异丙肾上腺素模型组的细胞表面积明显增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 苦瓜皂苷 L 干预组的细胞表面积明显降低 ($P < 0.05$)。结果表明, 苦瓜皂苷 L 能够抑制异丙肾上腺素诱导的 H9c2 心肌细胞表面积增加。另外, 苦瓜皂苷 L 单独组对 H9c2 心肌细胞表面积无明显影响, 与正常组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 苦瓜皂苷 L 对异丙肾上腺素诱导的 H9c2 心肌细胞肥大相关胚胎基因表达的影响 如图 3 所示, 与正常组比较, 异丙肾上腺素模型组的心肌细胞肥大相关胚胎基因 ANP、 β -MHC 及 α -SKA 表达明显上调 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 给予苦瓜皂苷 L 干预后, 上述 3 个基因的表达明显下调 ($P < 0.05$)。结果表明, 苦瓜皂苷 L 抑制异丙肾上腺素诱导的 H9c2 心肌细胞肥大相关胚胎基因 ANP、 β -MHC 及 α -SKA 表达上调。另外, 与正常组比较, 苦瓜皂苷 L 单独组的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

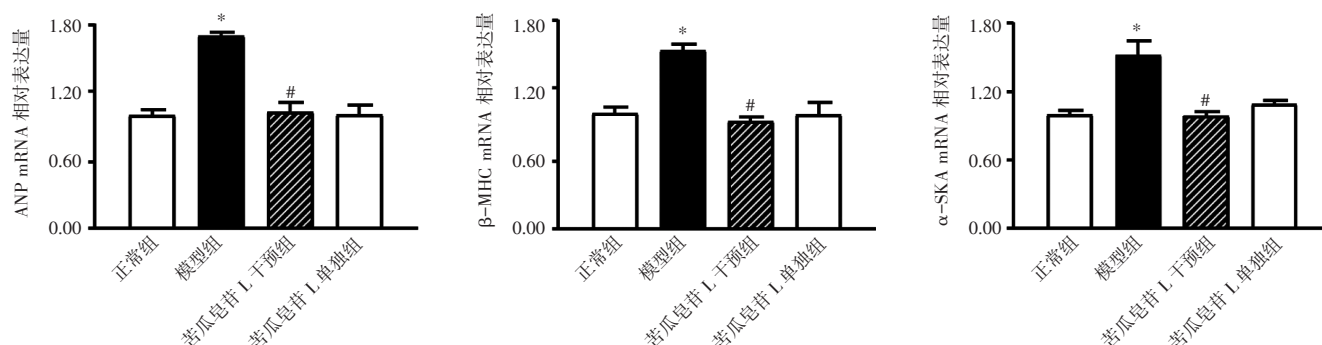
2.5 苦瓜皂苷 L 对异丙肾上腺素诱导的 H9c2 心肌细胞甘油磷脂代谢相关酶基因表达的影响 如图 4 所示, 与正常组比较, 异丙肾上腺素模型组中甘油磷脂代谢的酶基因 PLA2G6、DGKZ 和 GPCPD1 表达



注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$

图2 苦瓜皂苷L对异丙肾上腺素诱导的H9c2心肌细胞表面积的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

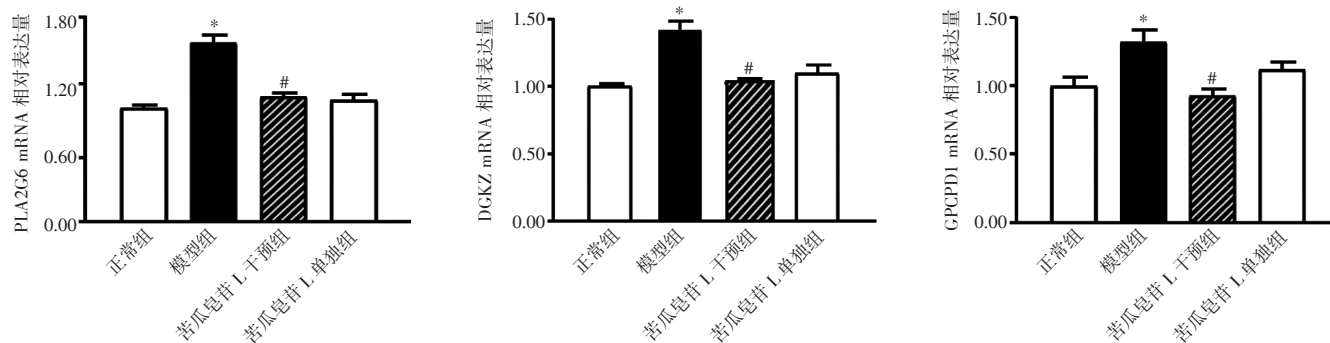
Figure 2 Effect of momordicoside L on the surface area of H9c2 cardiomyocytes induced by isoproterenol($\bar{x} \pm s$, $n=6$)



注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$

图3 苦瓜皂苷L对异丙肾上腺素诱导的H9c2心肌细胞肥大相关胚胎基因表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 3 Effects of momordicoside L on the expressions of hypertrophy-related fetal genes in isoproterenol induced H9c2 cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)



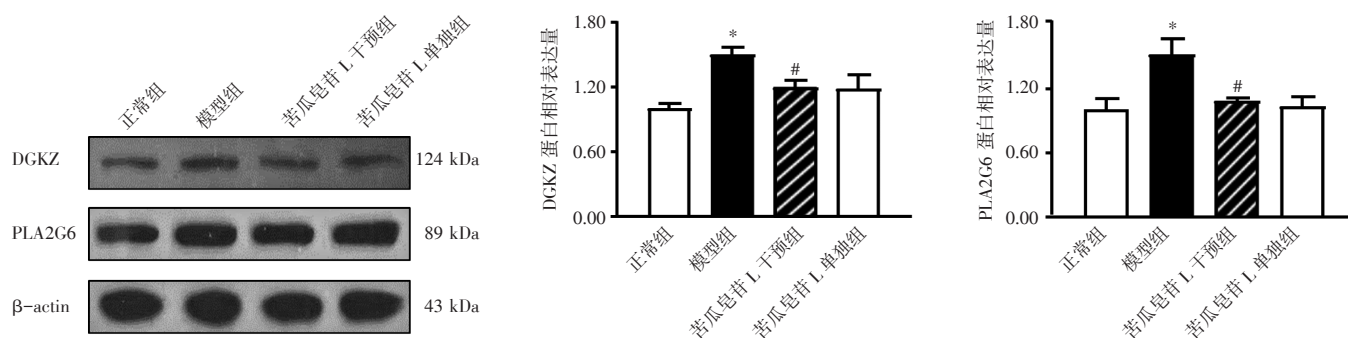
注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$

图4 苦瓜皂苷L对异丙肾上腺素诱导的H9c2心肌细胞甘油磷脂代谢相关酶基因表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 4 Effects of momordicoside L on the mRNA expressions of glycerophospholipid metabolism enzymes in isoproterenol induced H9c2 cardiomyocytes($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

上调($P < 0.05$)。与模型组比较，苦瓜皂苷L可下调H9c2心肌细胞中PLA2G6、DGKZ和GPCPD1基因表达($P < 0.05$)。结果表明，苦瓜皂苷L可抑制异丙肾上腺素诱导的H9c2心肌细胞甘油磷脂代谢相关酶基因PLA2G6、DGKZ和GPCPD1表达上调。另外，与正常组比较，苦瓜皂苷L单独组的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.6 苦瓜皂苷L对异丙肾上腺素诱导的心肌细胞PLA2G6和DGKZ蛋白表达的影响 如图5所示，与正常组比较，异丙肾上腺素模型组细胞中参与甘油磷脂代谢的酶蛋白PLA2G6和DGKZ表达均明显上调($P < 0.05$)。与模型组比较，苦瓜皂苷L可明显下调H9c2心肌细胞中PLA2G6和DGKZ蛋白表达($P < 0.05$)。结果表明，苦瓜皂苷L可抑制异丙肾上腺素



注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$

图 5 苦瓜皂苷 L 对异丙肾上腺素诱导的 H9c2 心肌细胞 PLA2G6 和 DGKZ 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Figure 5 Effects of momordicoside L on the protein expressions of PLA2G6 and DGKZ in isoproterenol induced H9c2 cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

腺素诱导的 H9c2 心肌细胞甘油磷脂代谢相关酶蛋白 PLA2G6 和 DGKZ 表达上调。另外，与正常组比较，苦瓜皂苷 L 单独组的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

心肌肥大常见于各种复杂的心血管疾病，心肌肥大若不加治疗最终会发展为心衰。心肌肥大是以心肌细胞体积增大、蛋白合成增多、肌小节重构以及心肌肥大相关胚胎基因表达上调为特征^[13]。苦瓜的化学成分主要为苷类、三萜类、生物碱类、甾类、多糖、蛋白质及类固醇等^[14]。研究^[15]表明苦瓜提取物具有增强心脏功能，减小心肌缺血/再灌注损伤的梗死面积，降低血清胆固醇水平的作用，对于辅助治疗心血管疾病和糖尿病等疾病具有良好的前景。黄文蔚等^[16]考察了苦瓜总皂苷治疗异丙肾上腺素诱导的心衰大鼠的作用，结果发现苦瓜总皂苷可改善心衰大鼠心肌组织中 Caspase-3 和 MMP-2 表达，降低炎症反应，保护心脏。目前，有关苦瓜及其提取物的研究报道较为多见，而苦瓜活性成分尤其是三萜类皂苷活性成分的应用报道少见。本研究结果首次证实苦瓜皂苷 L 可降低异丙肾上腺素诱导的心肌细胞表面积增加，抑制心肌肥大相关胚胎基因 ANP、 β -MHC、 α -SKA 表达上调。

近年研究^[3-4]发现甘油磷脂代谢与心肌肥大密切相关，一些甘油磷脂代谢途径相关的酶可能参与心肌肥大的发生发展。Takahashi 等^[5]研究显示二酰甘油激酶 ζ mRNA 在大鼠乳鼠心肌细胞肥大模型中表达上调。Moon 等^[17]研究发现心衰患者心脏线粒体中的钙非依赖性磷脂酶 A_2 (iPLA $_2$) 活性增强，导致有毒的羟基二十碳四烯酸产物 (HETEs) 增多，从而打开线

粒体膜通透性转换孔 (mPTP)，导致线粒体功能障碍，加重心衰。Huang 等^[18]研究认为抑制胞质型 PLA $_2$ 可抑制胆固醇介导的 H9c2 心肌细胞线粒体功能障碍，防治扩张型心肌病。二酰甘油激酶 ζ 和磷脂酶 A_2 等甘油磷脂代谢酶已经成为心血管疾病的重要防治靶点^[4,19]。

苦瓜具有良好的调节脂质代谢的作用，而苦瓜皂苷成分可能是其调节脂质代谢的主要活性成分之一^[20]。研究表明苦瓜总皂苷具有改善 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗作用^[21]；可降低 2 型糖尿病大鼠心脏组织中脂联素受体 1 (AdipoR1) 的表达，改善心脏功能^[22]；可激活 2 型糖尿病小鼠肝脏组织 AMPK 磷酸化而调节糖脂代谢^[23]。葫芦烷三萜类皂苷成分也被证实具有改善胰岛素敏感性，调节胰岛素代谢信号通路，缓解糖尿病小鼠糖脂代谢紊乱的作用^[24-25]。本研究在证实苦瓜皂苷 L 具有抑制 H9c2 心肌细胞肥大的基础上，进一步根据文献，选取了甘油磷脂代谢途径相关的酶 PLA2G6、DGKZ、GPCPD1 为指标，考察了苦瓜皂苷 L 对异丙肾上腺素诱导的 H9c2 心肌细胞甘油磷脂代谢的影响。研究结果表明在异丙肾上腺素诱导 H9c2 心肌细胞肥大模型中，心肌细胞 PLA2G6、DGKZ mRNA 水平和蛋白表达均上调，这与文献报道^[5,17]有一致之处，说明苦瓜皂苷 L 可抑制异丙肾上腺素诱导的心肌细胞 PLA2G6、DGKZ 表达上调。另外，文献研究^[26]表明 GPCPD1 (GDE5) 在胚胎心脏中高度表达，参与骨骼肌的分化，但目前尚未见到 GPCPD1 与心肌肥大的直接报道。本研究发现异丙肾上腺素可诱导 H9c2 心肌细胞 GPCPD1 mRNA 表达上调，而苦瓜皂苷 L 可抑制异丙肾上腺素诱导的心肌细胞 GPCPD1 mRNA 表达上调。因此，苦瓜皂苷 L 可抑制异丙肾上腺素诱导的心肌细

胞 PLA2G6、DGKZ、GPCPD1 的表达。苦瓜皂苷 L 抑制心肌细胞肥大可能与其抑制 PLA2G6、DGKZ、GPCPD1 等甘油磷脂代谢酶的表达有关。

综上, 苦瓜皂苷 L 可能通过抑制甘油磷脂代谢相关的酶 PLA2G6、DGKZ、GPCPD1 的表达而缓解心肌细胞肥大, 深入的机制有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] GALLO S, VITACOLONNA A, BONZANO A, et al. ERK: a key player in the pathophysiology of cardiac hypertrophy. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9): 2164.
- [2] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2020 概要[J]. 中国循环杂志, 2021, 36(6): 521-545.
- [3] THAM Y K, HUYNH K, MELLETT N A, et al. Distinct lipidomic profiles in models of physiological and pathological cardiac remodeling, and potential therapeutic strategies[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2018, 1863(3): 219-234.
- [4] SAKANE F, MIZUNO S, KOMENOI S. Diacylglycerol kinases as emerging potential drug targets for a variety of diseases: an update [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2016, 4: 82.
- [5] TAKAHASHI H, TAKEISHI Y, SEIDLER T, et al. Adenovirus-mediated overexpression of diacylglycerol kinase- ζ inhibits endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy[J]. *Circulation*, 2005, 111(12): 1510-1516.
- [6] SASAKI T, SHISHIDO T, KADOWAKI S, et al. Diacylglycerol kinase α exacerbates cardiac injury after ischemia/reperfusion[J]. *Heart Vessels*, 2014, 29(1): 110-118.
- [7] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(第14卷)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 558-561.
- [8] 金灵玲, 唐婷, 邢旺兴. 苦瓜的化学成分及其药理作用[J]. 健康研究, 2015, 35(1): 23-24, 27.
- [9] 李慧华, 徐希明. 苦瓜籽活性成分的药理研究进展[J]. 中医药信息, 2019, 36(1): 125-129.
- [10] DESHAWARE S, GUPTA S, SINGHAL R S, et al. Debitting of bitter gourd juice using β -cyclodextrin: mechanism and effect on antidiabetic potential[J]. *Food Chem*, 2018, 262: 78-85.
- [11] PERERA W H, SHIVANAGOUDRA S R, PÉREZ J L, et al. Anti-inflammatory, antidiabetic properties and in silico modeling of cucurbitane-type triterpene glycosides from fruits of an indian cultivar of *Momordica charantia* L[J]. *Molecules*, 2021, 26(4): 1038.
- [12] TANG G, SHEN Y, GAO P, et al. Klotho attenuates isoproterenol-induced hypertrophic response in H9C2 cells by activating Na^+/K^+ -ATPase and inhibiting the reverse mode of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2018, 54(3): 250-256.
- [13] NAKAMURA M, SADOSHIMA J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(7): 387-407.
- [14] 范戎, 许敏, 马晓霞, 等. 苦瓜属植物的化学成分与药理活性研究进展[J]. 云南中医学院学报, 2014, 37(6): 93-100.
- [15] CZOMPA A, GYONGYOSI A, SZOKE K, et al. Effects of *Momordica charantia* (Bitter Melon) on Ischemic Diabetic Myocardium[J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 488.
- [16] 黄文蔚, 洪李锋, 祝聪聪, 等. 苦瓜总皂苷对慢性心衰大鼠 Caspase-3 和 MMP-2 表达影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(7): 38-42.
- [17] MOON S H, LIU X, CEDARS A M, et al. Heart failure-induced activation of phospholipase $\text{iPLA}_2\gamma$ generates hydroxyeicosatetraenoic acids opening the mitochondrial permeability transition pore[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(1): 115-129.
- [18] HUANG J P, CHENG M L, WANG C H, et al. Therapeutic potential of cPLA2 inhibitor to counteract dilated-cardiomyopathy in cholesterol-treated H9C2 cardiomyocyte and MUNO rat[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 160: 105201.
- [19] WANG J, TAN G J, HAN L N, et al. Novel biomarkers for cardiovascular risk prediction[J]. *J Geriatr Cardiol*, 2017, 14(2): 135-150.
- [20] KINOSHITA H, OGATA Y. Effect of bitter melon extracts on lipid levels in japanese subjects: a randomized controlled study[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 4915784.
- [21] 马春宇, 王慧娇, 于洪宇, 等. 苦瓜总皂苷对 2 型糖尿病大鼠胰岛胰岛素信号转导通路的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(3): 289-294.
- [22] 刘紫燕, 朱定君, 王丽媛, 等. 苦瓜总皂苷对 2 型糖尿病大鼠心肌脂联素受体 1 表达及心功能的影响[J]. 长春中医药大学学报, 2017, 33(1): 40-43.
- [23] WANG Q, WU X, SHI F, et al. Comparison of antidiabetic effects of saponins and polysaccharides from *Momordica charantia* L. in STZ-induced type 2 diabetic mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 744-750.
- [24] HAN J H, TUAN N Q, PARK M H, et al. Cucurbitane triterpenoids from the fruits of *Momordica charantia* improve insulin sensitivity and glucose homeostasis in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, 62(7): e1700769.
- [25] JIANG B, JI M, LIU W, et al. Antidiabetic activities of a cucurbitane-type triterpenoid compound from *Momordica charantia* in alloxan-induced diabetic mice[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(5): 4865-4872.
- [26] OKAZAKI Y, OHSHIMA N, YOSHIKAWA I, et al. A novel glycerophosphodiester phosphodiesterase, GDE5, controls skeletal muscle development via a non-enzymatic mechanism[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(36): 27652-27663.

(编辑: 修春)