

人参皂苷Rg3通过miR-23a-3p/FIH/HIF-1 α 轴保护缺氧损伤心肌细胞的机制研究

陈禹阳 王慧敏 金景姬*

吉林大学生命科学学院, 中国·吉林 长春 130012

摘要: 目的: 探讨人参皂苷 Rg3 调控脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, HU-MSC) 改善缺氧损伤心肌细胞的作用及其分子机制。方法: 采用 CCK-8 法筛选 Rg3 最佳作用浓度, 建立 HU-MSC 与 H9C2 细胞共培养及缺氧损伤模型; 通过 miRNA 高通量测序筛选关键差异 miRNA, 采用双荧光素酶报告基因实验验证 miR-23a-3p 与 FIH 的靶向关系, 并结合 RT-qPCR、Western blot 及免疫荧光检测相关分子表达及细胞损伤变化。结果: Rg3 可促进 H9C2 细胞增殖, 并增强 HU-MSC 促 H9C2 细胞增殖作用。miRNA 测序显示, Rg3 显著上调 HU-MSC 中 miR-23a-3p 表达。双荧光素酶报告基因实验表明, FIH 是 miR-23a-3p 的直接靶基因。缺氧可下调 H9C2 细胞 miR-23a-3p 表达, 而 Rg3 可逆转其变化, 抑制 FIH 表达, 上调 HIF-1 α 及 VEGFB 表达, 改善细胞形态和 F-actin 骨架损伤, 并提高 CKM、cTnI 及 LDHA 等心肌功能相关基因的表达。结论: 人参皂苷 Rg3 可通过调控 HU-MSC 功能, 激活 miR-23a-3p/FIH/HIF-1 α 信号轴, 增强心肌细胞对缺氧的适应能力, 减轻缺氧诱导的细胞损伤, 为缺血性心血管疾病的防治提供实验依据。

关键词: 人参皂苷 Rg3; 心肌缺氧损伤; 脐带间充质干细胞; miR-23a-3p; FIH; HIF-1 α

Mechanism of Ginsenoside Rg3 Protecting Hypoxia-Induced Cardiomyocyte Injury via the miR-23a-3p/FIH/HIF-1 α Axis

Chen Yuyang, Wang Huimin, Jin Jingji*

School of Life Sciences, Jilin University, China Jilin Changchun 130012

Abstract: Objective: To investigate the protective effect of ginsenoside Rg3 on hypoxia-induced cardiomyocyte injury and its underlying mechanism. Methods: H9C2 cells and human umbilical cord mesenchymal stem cells (HU-MSCs) were used to establish a co-culture and hypoxia injury model. Cell viability was determined by CCK-8 assay. Differential miRNAs were identified by miRNA sequencing, and the interaction between miR-23a-3p and factor inhibiting HIF-1 (FIH) was verified by dual-luciferase reporter assay. The miR-23a-3p/FIH/HIF-1 α signaling pathway was analyzed by RT-qPCR, Western blotting, and immunofluorescence. Results: Rg3 promoted H9C2 cell proliferation and enhanced the protective effect of HU-MSCs. Rg3 upregulated miR-23a-3p, directly inhibited FIH, activated HIF-1 α signaling, reversed hypoxia-induced miR-23a-3p downregulation, improved F-actin organization, and increased the expression of CKM, cTnI, and LDHA. Conclusion: Ginsenoside Rg3 protects against hypoxia-induced cardiomyocyte injury by activating the miR-23a-3p/FIH/HIF-1 α signaling axis through regulation of HU-MSC function.

Keywords: Ginsenoside Rg3; Hypoxia-induced cardiomyocyte injury; Human umbilical cord mesenchymal stem cells; miR-23a-3p; FIH; HIF-1 α

0 引言

心肌缺血缺氧损伤是心肌梗死、心力衰竭等心血管疾病的重要病理基础, 持续缺氧可导致氧化应激、能量代谢紊乱及心肌细胞损伤。因此, 寻找安全、有效的心肌保护策略具有重要意义^[1]。人参皂苷 Rg3 是人参的重要活性成分, 具有抗氧化、抗炎、抗凋亡及改善能量代谢等药理作用, 可减轻心肌缺血缺氧损伤, 但其作用机制尚未完全阐明^[2-3]。间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 具有旁分泌调节和组织修复作用, 中药活性成分预处理可进一步增强其生物学功能, 为中医药与细胞治疗相结合提供

了新的研究思路^[4]。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类重要的转录后调控分子, 可通过结合靶基因 mRNA 3'UTR 调控基因表达, 在心肌缺氧损伤过程中发挥重要作用。其中, miR-23a-3p 参与细胞缺氧应答及心血管稳态调控^[5-6]。低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 是细胞缺氧应答的关键转录因子, 其活性受 HIF-1 抑制因子 (factor inhibiting HIF-1, FIH) 负向调控, 因此, miR-23a-3p/FIH/HIF-1 α 信号轴可能是改善心肌缺氧损伤的重要调控靶点^[7-8]。

基于此,本研究采用 H9C2 细胞缺氧模型,结合 HU-MS-C 共培养体系及 miRNA 高通量测序技术,探讨人参皂苷 Rg3 对缺氧损伤心肌细胞的保护作用,并阐明 miR-23a-3p/FIH/HIF-1 α 信号轴在其中的调控机制,为人参皂苷 Rg3 防治缺血性心血管疾病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 抗体及人参皂苷 Rg3

HIF-1 α 、FIH、VEGFB、VEGFC、LDHA、p21、 β -Actin 及 Tubulin 抗体购自商业公司; GAPDH 抗体由本实验室制备; HRP 标记二抗购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。20 (S)-人参皂苷 Rg3 购自成都曼思特生物科技有限公司,溶于 DMSO 配制为 100 mg/mL 储备液,-20 $^{\circ}$ C 保存,使用前稀释至所需浓度。

1.2 细胞培养

H9C2、HUVEC、HEK293T 及 HU-MS-C 按常规条件培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养。

1.3 质粒构建

根据 TargetScan 预测的 miR-23a-3p 与 FIH mRNA 3'UTR 结合位点构建 FIH 3'UTR 野生型和突变型荧光素酶报告质粒,所用引物如下: FIH-3'UTR wt-Luc-F, CTGCAAGGCGATTAAGTTGG; FIH-3'UTR wt-Luc-R, GTGGACGAAGTACCGAAAGG; FIH-3'UTR mut-Luc-F, CAATGCTGGGAGATGTCATTGCAGT; FIH-3'UTR mut-Luc-R, ACTGCAATGACATCTCCC AGCATTG。

1.4 CCK-8 检测

H9C2 细胞经不同浓度 Rg3 处理 48 h 后,采用 CCK-8 法检测细胞活力。

1.5 Western blot 检测

提取细胞总蛋白,经 SDS-PAGE 电泳和转膜后孵育相应一抗及 HRP 标记二抗,ECL 显色,ImageJ 软件进行灰度分析。

1.6 RT-qPCR 检测

提取总 RNA 并反转录为 cDNA,采用 RT-qPCR 检测基因表达,以 GAPDH 和 U6 为内参,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算相对表达量。

1.7 双荧光素酶报告基因实验

将 FIH 3'UTR 野生型或突变型报告质粒与 miR-23a-3p 过表达质粒共转染 HEK293T 细胞,48 h 后检测荧光素酶活性。

1.8 miRNA 高通量测序

HU-MS-C 经 20 μ mol/L Rg3 处理 48 h 后提取总 RNA,进行 miRNA 高通量测序及生物信息学分析。

1.9 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9.5 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。所有实验均独立重复至少 3 次。

2 结果

2.1 Rg3 增强 HU-MS-C 促进 H9C2 细胞增殖作用

CCK-8 结果显示(图 1A),5~40 μ mol/L Rg3 均可促进 H9C2 细胞增殖,其中 20 μ mol/L 作用最明显;80 μ mol/L 未见进一步增强,因此后续实验选用 20 μ mol/L 作为干预浓度。共培养结果显示(图 1B),Rg3 可促进 H9C2 细胞增殖,HU-MS-C 进一步增强其促增殖作用,且 Rg3 预处理 HU-MS-C 后该作用进一步增强(P<0.05)。

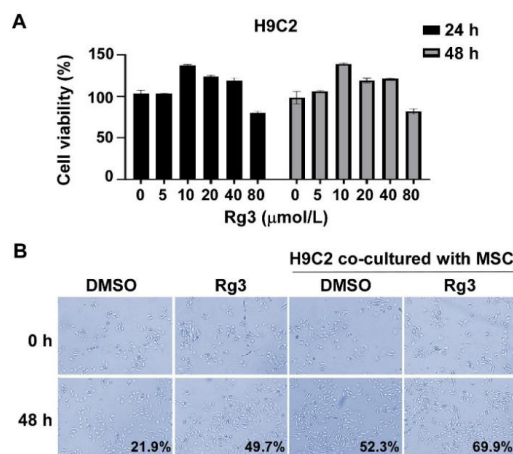


图1 人参皂苷Rg3增强HU-MS-C对H9C2细胞的促增殖作用

2.2 miRNA 测序筛选 Rg3 调控的关键 miRNA 及其对 FIH 的调控作用

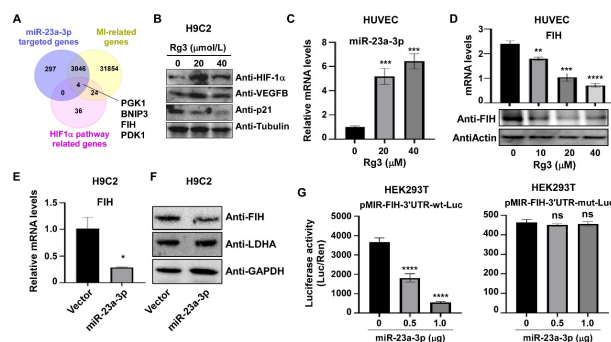


图2 Rg3调控HU-MS-C中miRNA表达及HIF-1 α 信号通路

miRNA 测序显示,Rg3 处理后 HU-MS-C 中多种 miRNA 差异表达,其中 miR-23a-3p 显著上调。Jvenn 交集分析筛选获得 FIH 等候选靶基因,并确定 FIH 作为后续研究对象(图 2A)。Western blot 结果显示,Rg3 上调

HIF-1 α 和 VEGFB 表达, 下调 p21 表达 (图 2B)。进一步研究发现, Rg3 剂量依赖性上调 HUVEC 细胞 miR-23a-3p 表达, 并抑制 FIH mRNA 及蛋白表达 (图 2C、2D); 过表达 miR-23a-3p 同样降低 H9C2 细胞 FIH 表达 (图 2E、2F)。TargetScan 预测 miR-23a-3p 与 FIH 3'UTR 存在保守结合位点, 双荧光素酶实验进一步证实 FIH 是其直接靶基因 (图 2G)。

2.3 Rg3 逆转缺氧诱导的 miR-23a-3p 表达下调并减轻 H9C2 细胞损伤

缺氧 6h 和 12h 后, HIF-1 α mRNA 及蛋白表达均升高, 提示 H9C2 细胞缺氧模型构建成功 (图 3A、3B)。缺氧显著下调 miR-23a-3p 表达, Rg3 干预可逆转其下降趋势 (图 3C、3D)。同时, Rg3 上调 CKM、cTnI 和 LDHA 等心肌功能相关基因表达 (图 3E), 提示其可减轻缺氧诱导的心肌细胞损伤。

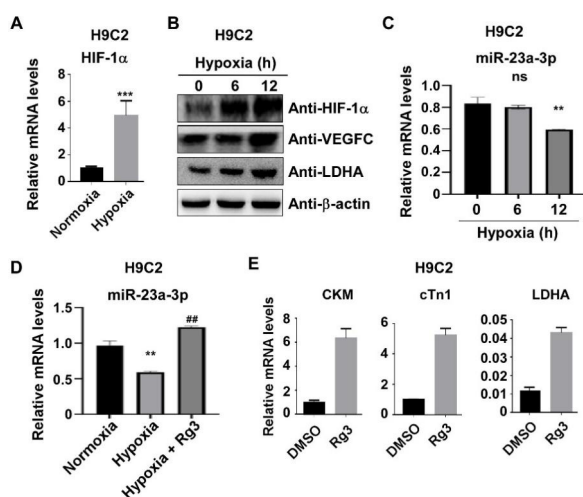


图3 Rg3减轻H9C2细胞缺氧损伤并恢复miR-23a-3p表达

3 讨论

人参皂苷 Rg3 具有抗氧化、抗炎、抗凋亡及改善能量代谢等药理活性, 在心血管保护中具有良好的应用前景^[1-3]。本研究发现, Rg3 不仅可促进 H9C2 细胞增殖, 还可增强 HU-MSC 促进 H9C2 细胞增殖的作用, 提示其兼具直接保护心肌细胞和改善 HU-MSC 功能的双重作用。

miRNA 参与心肌缺氧损伤的调控^[5-6]。本研究通过 miRNA 测序发现, Rg3 显著上调 HU-MSC 中 miR-23a-3p 表达, 并证实其可直接靶向抑制 FIH, 促进 HIF-1 α 及其下游 VEGFB 表达。同时, Rg3 上调 CKM、cTnI 和 LDHA 表达, 提示其可能通过激活 miR-23a-3p/FIH/HIF-1 α 信号轴增强心肌细胞缺氧适应能力。

本研究主要基于体外细胞模型, 尚缺乏动物实验验证, HU-MSC 来源外泌体是否介导 miR-23a-3p 转运及

其在 Rg3 心肌保护中的作用仍需进一步研究。综上, Rg3 可通过调控 HU-MSC 功能激活 miR-23a-3p/FIH/HIF-1 α 信号轴, 减轻缺氧诱导的心肌细胞损伤, 为其防治缺血性心血管疾病提供了实验依据。

参考文献:

- [1] Davidson SM, Ferdinandy P, Andreadou I, et al. Multitarget strategies to reduce myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol.* 2019, 73(1): 89-99.
- [2] Kim JH. Pharmacological and medical applications of Panax ginseng and ginsenosides: a review for use in cardiovascular diseases. *J Ginseng Res.* 2018, 42(3): 264-269.
- [3] Zhao J, Yan Z, Guan C, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits Ang II-induced cardiac fibrosis via the GLP-1 receptor signaling pathway. *Folia Histochem Cytobiol.* 2026, 64(1): 60-74.
- [4] Liu Y, Wang M, Yu Y, et al. Advances in the study of exosomes derived from mesenchymal stem cells and cardiac cells for the treatment of myocardial infarction *Cell Commun Signal.* 2023 Aug 14, 21(1): 202.
- [5] Evin L, Sigutova R, Sulc P, et al. Serum levels of miR-21, miR-23a, miR-142-5p, and miR-126 in chronic failure with reduced ejection fraction: a case-control study. *Front Cardiovasc Med.* 2025 May 15; 12: 1529451.
- [6] Liu Y, Chen J, Xiong J, et al. Potential cardiac-derived exosomal miRNAs involved in cardiac healing and remodeling after myocardial ischemia-reperfusion injury. *Sci Rep.* 2024 Oct 16, 14(1): 24275.
- [7] Liu J, Gao Y, Zhang X. A patent review on hypoxia-inducible factor (HIF) modulators (2021-2023). *Expert Opin Ther Pat.* 2024, 34(8): 651-664.
- [8] Rahman MA, Rahaman KA, Harrath AH. Hypoxia-inducible factor-1 α in cardiovascular disease, mechanistic insights, pathophysiological roles, and therapeutic targeting strategies. *Biochem Pharmacol.* 2026, 246: 117753.

基金项目: 吉林省科技发展计划项目, No.20210204153YY。

作者简介: 陈禹阳 (1995-), 男, 汉族, 吉林长春人, 硕士学历, 博士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学。

* 通讯作者: 金景姬 (1962-), 女, 朝鲜族, 吉林延吉人, 博士学历, 教授, 研究方向: 人参皂苷在抗肿瘤、延缓衰老及改善心肌损伤中的作用及其机制研究。