

瓜蒌皮提取物基于 PI3K/Akt/NO 信号通路保护缺氧/复氧损伤心肌细胞的机制

楚冬海^{1,2}, 张振秋^{2*}

(1. 辽宁科技学院 生物医药与化学工程学院, 辽宁 本溪 117004;

2. 辽宁中医药大学 药学院, 辽宁 大连 116600)

[摘要] **目的:** 研究磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/一氧化氮(PI3K/Akt/NO)信号通路在瓜蒌皮提取物保护心肌细胞缺氧/复氧损伤中的作用。**方法:** 以 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 诱导心肌细胞建立缺氧/复氧损伤模型, 实验分为正常组、模型组、瓜蒌皮提取物组及抑制剂组。采用噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞活力; 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测心肌细胞中一氧化氮(NO)的释放量及内皮型一氧化氮合酶(eNOS), 诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的活性水平; 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测细胞中 Akt, eNOS, iNOS mRNA 表达水平; 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定 Akt, 磷酸化 Akt(p-Akt), eNOS, iNOS 蛋白表达水平。**结果:** 与正常组比较, 模型组心肌细胞活力明显下降($P < 0.01$), 心肌细胞 NO 释放量减少($P < 0.01$), 心肌细胞中 p-Akt, Akt 及 eNOS mRNA 和蛋白表达显著降低($P < 0.01$), 而 iNOS mRNA 和蛋白表达显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 瓜蒌皮提取物预处理 24 h 后能改善心肌细胞形态, 明显提高心肌细胞活力($P < 0.01$)。瓜蒌皮提取物能促进 p-Akt, Akt 及 eNOS mRNA 和蛋白表达($P < 0.01$), 抑制 iNOS mRNA 和蛋白的表达($P < 0.01$), 增加心肌细胞 NO 的释放量($P < 0.01$)。PI3K 抑制剂 LY294002 与瓜蒌皮提取物联合处理后, 逆转了瓜蒌皮提取物对心肌细胞的上述作用, 导致细胞存活率下降。**结论:** 瓜蒌皮提取物可能通过激活 PI3K/Akt 信号通路上调 eNOS, 下调 iNOS 的表达, 增加内源性 NO 的基础含量水平, 发挥抗凋亡作用, 从而改善缺氧/复氧损伤诱导的心肌细胞损伤。

[关键词] 瓜蒌皮提取物; 缺氧/复氧损伤; 心肌细胞; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/一氧化氮(PI3K/Akt/NO)

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)22-0042-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192104

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190717.1516.008.html>

[网络出版时间] 2019-07-18 09:29

Mechanism of Trichosanthis Pericarpium Aqueous Extract in Protecting H9c2 Cardiomyocytes from Hypoxia/Reoxygenation Injury via PI3K/Akt/NO Signaling Pathway

CHU Dong-hai^{1,2}, ZHANG Zhen-qiu^{2*}

(1. School of Biomedical and Chemical Engineering, Liaoning Institute of Science and Technology, Benxi 117004, China;

2. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Trichosanthis Pericarpium aqueous extract (TPAE) in protecting H9c2 cells from hypoxia/reoxygenation (H/R) injury by activating phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B/nitric oxide (PI3K/Akt/NO) signaling pathway. **Method:** The $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ was used to

[收稿日期] 20190403(018)

[基金项目] 辽宁省自然科学基金项目(20180551223); 辽宁省教育厅科研项目(L2017lkyfwdf-05); 辽宁省大学生创新训练项目(201811430070)

[第一作者] 楚冬海, 在读博士, 从事天然药物化学研究, E-mail: chubotany@sina.cn

[通信作者] * 张振秋, 教授, 博士生导师, 从事中药质量标准规范化研究, E-mail: zhangzhenqiu@sina.com

induce the model of H9c2 cardiomyocytes H/R injury in the experiments. The cultured H9c2 cardiomyocytes were randomly divided into normal group, H/R group (model group) and inhibition group (LY294002, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). In the H/R + TPAE group, $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TPAE was added to the cultures at 24 h before H/R exposure. Cell viability was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The amounts of NO, endothelial nitric oxide synthase (eNOS), and induced nitric oxide synthase (iNOS) were tested by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kits. Reverse transcription-quantitative real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) was performed to analyze relative mRNA expressions of Akt, eNOS and iNOS. Western blot was used to detect the expressions of Akt, p-Akt (Ser 473), eNOS, and iNOS. **Result:** Compared with the normal control group, the cell viability significantly decreased in the model control group ($P < 0.01$), the release of NO was obviously down-regulated ($P < 0.01$), the mRNA and protein expressions of p-Akt, Akt, eNOS were remarkably decreased ($P < 0.01$), while those of iNOS were up-regulated ($P < 0.01$). Compared with the H/R group, the pretreatment with TPAE remarkably improved the morphological lesion of cardiomyocytes, enhanced cell viability ($P < 0.01$), increased the expressions of Akt, p-Akt (Ser 473) and eNOS ($P < 0.01$), decreased the expression of iNOS ($P < 0.01$), and increased the release of NO ($P < 0.01$). The PI3K inhibitor LY294002 was used. Obviously, cardioprotection of Trichosanthis Pericarpium aqueous extract was blocked by co-treatment LY294002, and cell viability was correspondingly reversed. **Conclusion:** TPAE can protect H9c2 cardiomyocytes from H/R injury by activating PI3K/Akt signaling pathway, which might be related to the up-regulation of the mRNA and protein expressions of eNOS, the down-regulation of the level of iNOS, and the increase of the production of physiological amounts of NO.

[**Key words**] Trichosanthis Pericarpium aqueous extract; hypoxia/reoxygenation injury; cardiomyocytes; phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B/nitric oxide (PI3K/Akt/NO)

冠心病 (CHD) 是冠状动脉血管发生动脉粥样硬化病变而引起血管腔狭窄或阻塞,造成心肌缺血、缺氧或坏死而导致的心脏病^[1]。临床上主要有药物治疗、经皮冠状动脉介入治疗及冠状动脉旁路移植术;但是在恢复心肌血流的同时,由于氧自由基大量产生,导致心肌凋亡通路激活,可能会加重心肌细胞结构及功能的损伤,即心肌缺血/再灌注损伤 (MI/RI)。MI/RI 降低了缺血性心脏病的治疗效果,增加了患者负担。因此,寻找有效的方法防治 MI/RI 成为亟待解决的问题^[2]。

瓜蒌首载于《神农本草经》,有清肺涤痰、宽胸散结、润燥滑肠功效,主治肺热咳嗽、胸痹心痛、消渴等^[3]。张仲景在《金匮要略》的专篇《胸痹心痛短气病脉证治》论述“胸痹之病,喘息咳唾,胸背痛,短气,寸口脉沉而迟,关上小紧数,瓜蒌薤白白酒汤主之”^[4]。瓜蒌皮富含黄酮、多糖、氨基酸及蛋白质等多种化学成分^[5-7],具有抗氧化、抗炎、抗凋亡及提升免疫力等作用,能够多靶点、整体协同发挥作用,在治疗冠心病心肌缺血方面具有巨大优势^[8]。目前研究多集中在瓜蒌复方类中药^[9-10],在细胞水平对瓜蒌皮单味药治疗冠心病、心肌缺血再灌注损伤、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通

路下游效应器内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 及诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的作用机制研究较少。PI3K/Akt 信号通路是真核细胞中信号转导的一条重要通路,是再灌注损伤挽救激酶通路之一,在细胞的生长、增殖、分化、凋亡及能量代谢等过程中发挥重要的作用^[11-12]。本研究以连二亚硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 诱导大鼠 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧损伤模拟心肌缺血再灌注损伤模型,探讨 PI3K/Akt/NO 信号通路在瓜蒌皮提取物对缺氧复氧损伤心肌细胞的作用机制,为瓜蒌皮临床治疗心肌缺血再灌注损伤提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞 大鼠子一代 H9c2 心肌细胞,购于上海子实生物科技有限公司。

1.2 药物与试剂 瓜蒌皮药材收集于河北省安国市,经辽宁中医药大学中药鉴定教研室李峰教授鉴定为葫芦科植物栝楼的干燥成熟果皮; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (美国百灵威科技有限公司,纯度 85%); NO, eNOS, iNOS 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (上海联硕科技有限公司,批号均为 201804); 兔抗大鼠 Akt, 磷酸化 (p)-Akt (Ser 473), eNOS, iNOS, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (美国 Cell Signaling

Technology 公司,批号均为 BC18AA0047);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 二抗,牛血清白蛋白(BSA)(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 B0802, P2300);噻唑蓝(MTT), SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 CA1020, P1200);二甲基亚砷(DMSO, 美国 Sigma 公司,批号 201806270285);DMEM 高糖培养基,胎牛血清(FBS),0.25% 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司,批号均为 G18032);1% 青霉素-链霉素双抗、磷酸盐缓冲液(PBS)(美国 Hyclone 公司,批号分别为 J180012, J170035);细胞裂解液, EZ-10 DNAaway RNA 小量提取试剂盒, PCR 引物, 动物全蛋白提取试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号分别为 D612002, B518651, B662204, 600530-53]; ProtoScript® II 反转录试剂盒(美国 NEB 公司,批号 0041509);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国 Merck Millipore 公司,批号 421302);BCA 蛋白浓度测定试剂盒, ECL 化学发光试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 P0007, N1410);实验用水为超纯水。

1.3 仪器 Thermo HERAcell 150i 型 CO₂ 细胞培养箱, NanoDrop 2000 型微量分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司); MR18.22 型超速低温离心机(法国 Jouan 公司); CP225D 型微量电子天平(德国 Sartorius 公司); Infinite M200 型多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司); BD FACSVerse 型流式细胞仪(美国 BD 公司); Stratagene Mx 3000P 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Agilent 公司); JY200C 型电泳仪(北京君意电泳设备有限公司); Tanon-5200 型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 药物制备及溶液配制 称取干燥的瓜蒌皮粉末 100.0 g, 加入蒸馏水 1 000 mL 浸泡 30 min, 煎煮 2 h, 8 层纱布过滤^[13]。滤渣重复提取 2 次, 合并滤液, 减压浓缩至 100 mL, 再经真空冷冻干燥, 即得样品(得率为 19.5%), 于 4 °C 保存备用。

精密称取干燥的瓜蒌皮水提物 20.0 mg, 溶于 DMEM 高糖培养基中, 配制成 2.0 g·L⁻¹ 的储存液, 0.22 μm 滤器过滤除菌, 置于 4 °C 冰箱备用^[13]。根据后续的实验需求, 以 DMEM 高糖培养基稀释成相应终质量浓度(50 mg·L⁻¹)。

精密称取 Na₂S₂O₄ 30.72 mg, 溶于 PBS 溶液 15.0 mL 中, 配成 10 mmol·L⁻¹ Na₂S₂O₄ 储备液, 再

用 PBS 稀释成规定浓度, 避光, 现用现配^[14]。

2.2 细胞培养 取 H9c2 心肌细胞, 用含 10% FBS, 1% 双抗的 DMEM 高糖培养基(以下简称培养液)于 37 °C 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养(以下培养条件相同), 适时换液。当细胞覆盖率达到 80% 以上时, 即可进行传代。传代至第 5 代时, 取对数生长期细胞进行实验。在每次实验前, 吸弃各培养瓶中的培养液, 换 0.5% FBS 的培养液“饥饿”12 h, 进行心肌细胞同步化处理^[15]。

2.3 细胞造模、分组及给药 根据文献报道及前期实验工作^[16-17], 心肌细胞的缺氧/复氧模型按照 2.2 项下方法培养细胞。将培养液吸出, 用 PBS 洗涤对数生长期细胞 1 ~ 2 次后换上 2.5 mmol·L⁻¹ Na₂S₂O₄ 溶液, 置于 37 °C 5% CO₂ 95% 空气细胞培养箱内 30 min, 造成细胞缺氧; 再将缺氧培养基换成培养液置于 37 °C 5% CO₂ 95% 空气细胞培养箱内 4 h, 使细胞复氧。

根据前期瓜蒌皮提取物给药剂量的筛选及预实验^[17], 按照 2.2 项下方法培养细胞, 随机分为正常组: 正常培养, 不进行缺氧复氧处理; 模型组(H/R 组): 细胞缺氧 30 min, 复氧 4 h; 瓜蒌皮提取物组(50 mg·L⁻¹): 药物预孵育 24 h, 然后造成缺氧 30 min, 复氧 4 h; 抑制剂组(LY294002, 10 μmol·L⁻¹): 抑制剂与瓜蒌皮提取物(50 mg·L⁻¹)共同预孵育 24 h, 然后造成缺氧 30 min, 复氧 4 h。

2.4 各组细胞活力的检测 按照 2.2 项下方法培养细胞。取对数生长期的心肌细胞, 以 1 × 10⁵ 个/mL 的密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μL, 按照 2.3 项下方法进行随机分组、给药预处理及造模。复氧后, 根据 MTT 说明书, 处理结束后的各组细胞每孔加入 MTT 溶液(5 g·L⁻¹)20 μL, 避光孵育 4 h; 吸去培养液, 加入 DMSO 150 μL 涡旋振荡 10 min, 使结晶充分溶解; 用酶标仪在 570 nm 波长处测定吸光度 A。另设空白组, 加入相应量培养液和 MTT, DMSO 试剂但不加入细胞。每种处理设 6 个复孔, 实验重复 3 次。根据以下公式计算存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_1 - A_0) / (A_2 - A_0) \times 100\%$$

式中 A₁ 是实验组的吸光度; A₂ 是正常组的吸光度; A₀ 是空白组吸光度。

2.5 ELISA 检测各组细胞 NO 释放量及 eNOS, iNOS 活性水平 取对数生长期细胞, 以 1 × 10⁵ 个/mL 的密度接种于 24 孔板, 每孔 0.5 mL。按照 2.3 项下方法进行随机分组、给药预处理及造模。

复氧后,取各组心肌细胞上清液按试剂盒说明书检测 NO 释放量;预冷 PBS 洗涤细胞后加入细胞裂解液,30 min 后收集细胞裂解液,按试剂盒说明书检测 eNOS, iNOS 的活性水平。

2.6 Real-time PCR 检测各组细胞中 Akt, eNOS, iNOS mRNA 表达水平 取对数生长期细胞,以 1×10^5 个/mL 的密度接种于 24 孔板,每孔 0.5 mL。将细胞按照 2.3 项下方法进行随机分组、给药预处理及造模。复氧后,以 EZ-10 DNAaway RNA 小量提取试剂盒提取心肌细胞总 RNA,采用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计分析 RNA 纯度和含量。取 RNA 1 μ g,采用 cDNA 试剂盒反转录合成 cDNA;以 GAPDH 为内参,分别对 Akt, eNOS, iNOS 进行扩增,引物序列见表 1。Real-time PCR 扩增反应体系为 20 μ L,反应条件为 50 $^{\circ}$ C 激活 2 min;95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 20 s,59 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 45 个循环。以 GAPDH 作为参比基因,运用相对定量法 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)^[19],计算各目标基因的相对表达量。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列	产物/bp
Akt	上游 5'-TCACCTCTGAGACCGACACC-3'	110
	下游 5'-CCGTTCACTGTCCACACTC-3'	
eNOS	上游 5'-GGGATTCTGGCAAGACCGAT-3'	151
	下游 5'-TTGTCCAAACTCCACGCT-3'	
iNOS	上游 5'-TTCCTCAGGCTTGGGTCTTGT-3'	213
	下游 5'-ATCCTGTGTTGTTGGGCTGG-3'	
GAPDH	上游 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'	143
	下游 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'	

2.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测各组细胞中 Akt, p-Akt (Ser 473), eNOS, iNOS 的蛋白表达水平 取对数生长期细胞,以 1×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板,每孔 1.5 mL。将细胞按照 2.3 项下方法进行随机分组、给药预处理及造模。复氧后,采用动物全蛋白提取试剂盒提取心肌细胞总蛋白并用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。取蛋白 24 μ g,经 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜上,用 5% BSA 封闭 30 min 后,分别加入 Akt, p-Akt (Ser 473), eNOS, iNOS, 内参 GAPDH 抗体 (1:5 000),于 4 $^{\circ}$ C 冰箱静置 12 h;TBST 洗涤 2 次,加入二抗 (1:1 万),室温摇床孵育 2 h;采用 ECL 试剂盒曝光显色,凝胶成像系

统采集图像并保存,以 Image J 1.46r 软件分析目的蛋白条带的相对灰度值,以表示其表达水平。

2.8 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,计量资料符合正态性及方差齐性检验,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 5.0 软件绘制柱形图,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD-*t* 检验,设定检验水平为 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对缺氧/复氧损伤心肌细胞活力的影响 与正常组比较,心肌细胞经缺氧/复氧后,细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$),表明缺氧/复氧模型复制成功。50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 瓜蒌皮提取物单独预处理后,与模型组比较,细胞存活率升高;与 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 瓜蒌皮提取物组比较,PI3K 特异性抑制剂 LY294002 预处理后抑制了细胞活性 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 瓜蒌皮提取物对 H9c2 心肌细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Trichosanthis Pericarpium aqueous extract (TPAE) on cell viability of H9c2 cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
正常	-	100.00 \pm 4.45
模型	-	69.95 \pm 2.92 ¹⁾
瓜蒌皮提取物	50	89.65 \pm 2.18 ²⁾
抑制剂	10 ⁵⁾	79.55 \pm 2.79 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与瓜蒌皮提取物组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;⁵⁾ 表示单位为 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 3 ~ 5 同)。

3.2 对缺氧/复氧损伤细胞中 NO, eNOS 及 iNOS 的影响 与正常组比较,模型组细胞中 NO 释放量, eNOS 水平均显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 瓜蒌皮提取物单独预处理 24 h 后,NO 含量, eNOS 水平显著升高 ($P < 0.01$);抑制剂 LY294002 预处理后,在相同浓度的瓜蒌皮水提物预处理条件下 LY294002 (+) 和 LY294002 (-) 组之间比较,NO 含量和 eNOS 活性水平均明显降低 ($P < 0.05$);而各组细胞 iNOS 的活性水平与 eNOS 的变化趋势相反。见表 3。

3.3 对缺氧/复氧损伤细胞中 Akt, eNOS 及 iNOS mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组细胞中 Akt, eNOS 的 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 瓜蒌皮提取物单独预处理 24 h 后, Akt, eNOS 的 mRNA 表达水平显著升高

表 3 瓜蒌皮提取物对心肌细胞 NO 释放量及 eNOS, iNOS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of TPAE on NO, eNOS and iNOS levels of H9c2 cardiomyocytes after H/R ($\bar{x} \pm s, n = 8$) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NO	eNOS	iNOS
正常	-	14.50 ± 0.78	5.50 ± 0.12	2.47 ± 0.12
模型	-	9.54 ± 0.94 ¹⁾	3.83 ± 0.57 ¹⁾	4.32 ± 0.08 ¹⁾
瓜蒌皮提取物	50	12.70 ± 0.22 ²⁾	4.70 ± 0.76 ²⁾	3.59 ± 0.13 ²⁾
抑制剂	10 ⁵⁾	10.85 ± 0.11 ³⁾	4.32 ± 0.29 ³⁾	3.99 ± 0.14 ³⁾

($P < 0.01$); 抑制剂 LY294002 预处理后, 在相同浓度的瓜蒌皮水提物预处理条件下 LY294002 (+) 和 LY294002 (-) 组之间相比, Akt, eNOS 的 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 而各组细胞 iNOS 的活性水平与 eNOS 的变化趋势相反。见表 4。

表 4 瓜蒌皮提取物对心肌细胞 Akt, eNOS 及 iNOS mRNA 相对表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of TPAE on Akt, eNOS and iNOS mRNA expression of H9c2 cardiomyocytes after H/R ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Akt	eNOS	iNOS
正常	-	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.06
模型	-	0.84 ± 0.03 ¹⁾	0.51 ± 0.02 ¹⁾	1.57 ± 0.05 ¹⁾
瓜蒌皮提取物	50	1.30 ± 0.08 ²⁾	0.93 ± 0.06 ²⁾	1.11 ± 0.01 ²⁾
抑制剂	10 ⁵⁾	0.94 ± 0.09 ⁴⁾	0.61 ± 0.03 ⁴⁾	1.42 ± 0.03 ⁴⁾

表 5 瓜蒌皮提取物对心肌细胞 p-Akt, Akt, eNOS 及 iNOS 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of TPAE on p-Akt, Akt, eNOS and iNOS protein expression of H9c2 cardiomyocytes after H/R ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

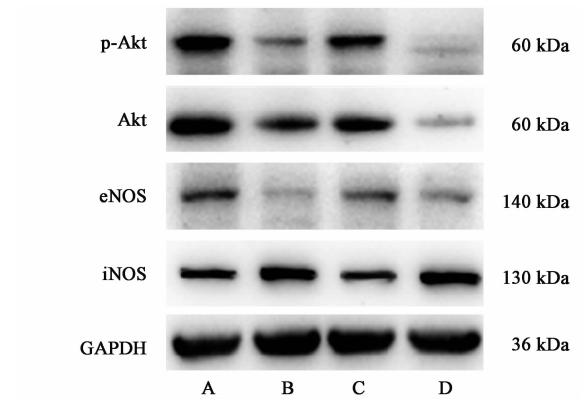
组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	p-Akt/GAPDH	Akt/GAPDH	p-Akt/Akt	eNOS/GAPDH	iNOS/GAPDH
正常	-	1.000 ± 0.021	1.000 ± 0.061	1.002 ± 0.062	1.000 ± 0.014	1.000 ± 0.043
模型	-	0.404 ± 0.008 ¹⁾	0.656 ± 0.006 ¹⁾	0.616 ± 0.005 ¹⁾	0.490 ± 0.006 ¹⁾	1.447 ± 0.005 ¹⁾
瓜蒌皮提取物	50	0.737 ± 0.038 ²⁾	0.759 ± 0.047 ²⁾	0.974 ± 0.059 ²⁾	0.811 ± 0.015 ²⁾	0.893 ± 0.022 ²⁾
抑制剂	10 ⁵⁾	0.188 ± 0.015 ⁴⁾	0.299 ± 0.019 ⁴⁾	0.631 ± 0.042 ⁴⁾	0.564 ± 0.007 ⁴⁾	1.484 ± 0.082 ⁴⁾

4 讨论

心肌缺血、缺氧可导致心肌代谢功能异常和结构破坏, 从而引发胸痛或胸部不适, 属中医“胸痹”“真心痛”的范畴^[18]。临床上主要采用药物治疗法、经皮冠状动脉介入治疗及冠状动脉旁路移植术等治疗心肌缺血; 但是在心肌血流恢复的同时, 由于氧自由基大量产生, 导致心肌凋亡通路激活, 可能会加重心肌细胞结构及功能的损伤, 即心肌缺血再灌注损伤 (MI/RI)^[18-19]。由于诱发 MI/RI 的原因较为

复杂, 涉及到氧化应激、细胞凋亡、钙超载和能量代谢等^[11], 目前尚未发现安全有效的治疗方法。因此, 寻找有效的药物来预防和治疗心肌缺血性疾病对于临床实践有着重要的意义。

瓜蒌皮富含黄酮、多糖、氨基酸及蛋白质等多种化学成分, 具有抗氧化、抗炎、抗凋亡及提升免疫力等作用, 能够多靶点地整体协同发挥作用, 在治疗冠心病方面具有巨大优势^[20-21]。



A. 正常组; B. 模型组; C. 瓜蒌皮提取物组; D. 抑制剂组

图 1 各组心肌细胞中 p-Akt, Akt, eNOS 及 iNOS 蛋白表达的电泳
Fig. 1 Electrophoretic diagrams of protein expressions of p-Akt, Akt, eNOS, iNOS in H9c2 cardiomyocytes

研究证实 PI3K/Akt 是再灌注损伤挽救激酶

(RISK) 信号通路的重要组成部分之一^[11]。其中, eNOS 是 PI3K/Akt 信号通路的下游效应器之一, 磷酸化激活后的 Akt 导致 eNOS 活化, 生成内源性 NO, 在心肌缺血再灌注损伤中发挥重要作用^[22]。

NO 作为调节心血管系统功能的气体信号分子, 在血管收舒、细胞增殖凋亡、氧化应激、炎症反应等心血管疾病中发挥着重要的作用^[23]。NOS 是 NO 合成的限速酶, 在心肌缺血再灌注过程中, 随着 NOS 的活性及基因多态性的改变, NO 的产量会发生变化, 导致其作用具有两面性^[24]。研究报道, eNOS 分布于心肌细胞、血管内皮细胞、心内膜中, 其活性依赖于 Ca^{2+}/CaM , 在正常生理条件下根据需要产生生理浓度水平的 NO, 弥散至血管平滑肌, 扩张局部血管、调节机体炎症和氧化应激水平, 发挥生理保护作用^[25-26]; iNOS 表达于中性粒细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞、心肌细胞中, 其活性不依赖于 Ca^{2+}/CaM , 在生理条件下几乎无活性, 当受到炎症因子、脂多糖、氧化应激等刺激时, iNOS 大量表达, 且催化产生大量的 NO (大约是 eNOS 催化产生的 1 000 倍), 促进肿瘤坏死因子- α 释放, 影响线粒体电子转移, 破坏细胞代谢, 诱发细胞凋亡, 抑制心肌舒缩, 产生毒性作用^[24, 27]。因此, 本实验采用化学法诱导 H9c2 心肌细胞缺氧 30 min, 再复氧 4 h 模拟心肌缺血再灌注损伤, 瓜蒌皮水提物预处理 24 h, 主要研究瓜蒌皮是否通过 PI3K/Akt 信号通路调节 eNOS, iNOS 的表达及 NO 的水平保护缺氧复氧心肌细胞的凋亡。

本实验的结果表明, 瓜蒌皮提取物可以激活 PI3K/Akt 信号通路, 上调 p-Akt(Ser 473) 及 t-Akt 的表达水平, 提高缺氧复氧心肌细胞的活力, 发挥心肌细胞保护作用, 而使用 PI3K 专属性抑制剂 LY294002 后, 瓜蒌皮的保护作用显著下降。本实验通过 Real-time PCR 检测心肌细胞 eNOS, iNOS mRNA 的相对表达水平, 结果显示, 在 H9c2 心肌细胞缺氧复氧模型中, 瓜蒌皮能够上调 eNOS mRNA, 下调 iNOS mRNA 的表达水平; 加入 PI3K 专属性抑制剂 LY294002 后, eNOS mRNA 表达水平下降, iNOS mRNA 的表达水平升高; 利用 Western blot 技术分析 H9c2 心肌细胞 eNOS, iNOS 蛋白表达, 发现其变化规律与各自 mRNA 的变化趋势一致。本实验中, 与模型组相比, 瓜蒌皮预处理 24 h 后 eNOS 活性水平升高, iNOS 活性水平降低, NO 的释放量增加, 这与孙娟等^[28]的研究结果相符。此外, 实验结果显示, 模型组与正常组相比及抑制剂组与瓜蒌皮

提取物组相比, eNOS 活性水平均降低, iNOS 活性水平均升高, 但心肌细胞 NO 释放量均显著降低, 可能原因有①缺氧时心肌细胞缺乏合成 NO 所必需的氧分子; ②缺氧时局部乳酸堆积, PH 降低, eNOS 活性被抑制; ③复氧时大量氧自由基生成, NO 被氧化成硝酸盐或亚硝酸盐; ④iNOS 激活诱导后数小时才能产生 NO, 且释放速度慢。

以上结果说明瓜蒌皮能够通过 PI3K/Akt 信号通路激活 eNOS, 抑制 iNOS 的表达, 增加内源性 NO 的基础含量水平, 发挥抗凋亡作用, 从而保护缺氧复氧损伤的心肌细胞。瓜蒌皮中发挥保护作用的具体功效物质基础是下一步需要解决的问题。

[参考文献]

- [1] 高润霖, 陈在嘉. 冠心病[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1-2.
- [2] 李全生, 张东伟, 贾连群, 等. 中医药对缺血再灌注损伤心肌保护作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(5): 1-4.
- [3] 黄堃编. 神农本草经[M]. 北京: 中医古籍出版社, 1982: 167-168.
- [4] 张机. 金匱要略方论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 26.
- [5] 吴翠, 巢志茂. 瓜蒌质量的过程控制系统[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(2): 230-234.
- [6] 李欣, 唐力英, 许静, 等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap 高分辨质谱的中药瓜蒌化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(1): 201-210.
- [7] 王辉俊, 柯樱, 叶冠. 活性导向分离瓜蒌皮中具有抗血管紧张素转化酶作用的成分[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(16): 3131-3135.
- [8] 徐启祥. 瓜蒌提取物的制备及其抗心肌缺血一再灌注损伤作用的研究[D]. 芜湖: 皖南医学院, 2018.
- [9] 李俊平, 郭丽丽, 陈中, 等. 丹蒌片对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(1): 95-100.
- [10] 郭建恩, 米树斌, 闫秀川, 等. 瓜蒌薤白半夏汤对 ApoE 小鼠血脂代谢、氧化应激和主动脉 Lox-1 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(4): 752-757.
- [11] 郑显杰, 庞力智, 寇俊萍, 等. 中药抗心肌缺血再灌注损伤的信号通路研究进展[J]. 药学进展, 2015, 39(6): 425-436.
- [12] 冷雪, 臧安缘, 李其芳. 人参皂苷 Rg₁ 通过 PI3K/Akt/eNOS 信号通路调控异丙肾上腺素致急性心肌缺血大鼠心肌的抗氧化作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 145-150.
- [13] 陈昌喆, 段磊, 王贤, 等. 瓜蒌皮提取液对大鼠缺血心

- 肌的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(23): 6723-6725.
- [14] 李小兰, 方方, 朱伟飞. 不同状态下连二亚硫酸钠的稳定性研究[J]. 纺织科技进展, 2014, 2: 71-73.
- [15] 操全霞. α -硫辛酸对 H9c2 心肌细胞缺氧及缺氧/复氧损伤的保护作用及其机制探讨[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2016.
- [16] 许蜀闽, 王培勇, 马红英. 连二亚硫酸钠在建立培养细胞的无氧环境中的应用[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(4): 359-360.
- [17] 楚冬海, 张振秋. 瓜蒌皮提取物对缺氧/复氧损伤 H9c2 心肌细胞的保护作用及其机制研究[J]. 中国药房, 2019, 30(8): 1072-1078.
- [18] 张幼怡, 吴立玲. 心血管病理生理学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2009: 56.
- [19] 李立美, 智光. 心血管病理生理学[M]. 5 版. 北京: 人民军医出版社, 2013: 66.
- [20] 高兆慧. 瓜蒌皮干预大鼠急性心肌缺血药效学研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2015.
- [21] 孙娟. 瓜蒌皮干预急性心肌梗死的药效与机制研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2013.
- [22] Brix B, Mesters J R, Pellerin L, et al. Endothelial cell-derived nitric oxide enhances aerobic glycolysis in astrocytes via HIF-1 α -mediated target gene activation[J]. J Neurosci, 2012, 32(28): 9727-9735.
- [23] Moncada S, Higgs E A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance[J]. Eur J Clin Invest, 1991, 21(4): 361-374.
- [24] 杨梅, 格日力. 一氧化氮与心肌缺血[J]. 青海医学院学报, 2006, 27(4): 282-285.
- [25] 沈毅弘. 一氧化氮合酶(NOS)及其基因表达在心肌缺血再灌注过程中动态变化的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2001.
- [26] 凌娜佳. 一氧化氮、一氧化氮合酶在心肌缺血再灌注损伤不同阶段的表达及作用[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(22): 3976-3978.
- [27] 马雯奂, 韩丹, 方伟蓉, 等. 一氧化氮在心肌缺血再灌注损伤中的调节作用及相关治疗药物研究进展[J]. 药学进展, 2016, 40(2): 96-103.
- [28] 孙娟, 赵启韬, 黄臻辉, 等. 瓜蒌皮对急性心肌缺血大鼠的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(3): 114-116.

[责任编辑 周冰冰]