



厦门大学学报(自然科学版)
Journal of Xiamen University(Natural Science)
ISSN 0438-0479,CN 35-1070/N

《厦门大学学报(自然科学版)》网络首发论文

题目: 瓜蒌皮水提物通过 PI3K/Akt/eNOS 信号通路抑制缺血缺氧大鼠原代心肌细胞的凋亡
作者: 杨玉婕, 薛慧文, 胡超群, 孙笛洋, 董振飞, 赵启韬
收稿日期: 2021-08-04
网络首发日期: 2022-04-24
引用格式: 杨玉婕, 薛慧文, 胡超群, 孙笛洋, 董振飞, 赵启韬. 瓜蒌皮水提物通过 PI3K/Akt/eNOS 信号通路抑制缺血缺氧大鼠原代心肌细胞的凋亡[J/OL]. 厦门大学学报(自然科学版).
<https://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1070.N.20220422.2004.002.html>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

研究简报

瓜蒌皮水提物通过 PI3K/Akt/eNOS 信号通路抑制缺血缺氧大鼠原代心肌细胞的凋亡

杨玉婕¹, 薛慧文¹, 胡超群¹, 孙笛洋¹, 董振飞², 赵启韬²✉

(1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355; 2. 山东中医药大学中医学院, 山东 济南 250355)

*通信作者 qitaozhao@163.com

摘要 以激活磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) /蛋白激酶 B (Akt) /内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 信号通路、抑制心肌细胞凋亡为切入点, 探究瓜蒌皮水提物 (TP-W) 保护心肌缺血的机制。分离大鼠心肌细胞, 通过缺氧气体+无血清培养液培养制造缺血缺氧损伤模型; 培养液中同时添加 PI3K 特异性抑制剂 (LY294002) 和 TP-W 处理细胞, 利用倒置相差显微镜观察细胞形态, 噻唑兰 (MTT) 法、末端标记 (TUNEL) 法检测细胞存活率及凋亡率, 免疫荧光联合免疫印迹方法定位、定量地检测细胞内 PI3K、Akt 及 eNOS 的表达水平和激活程度。结果显示: 对上述缺血缺氧损伤的心肌细胞, TP-W 可显著改善其生长状态, 降低其凋亡率; 同时显著上调 PI3K 等蛋白表达水平及激活程度; 但这些效果均可被 LY294002 显著削弱。可见, 激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路、抑制心肌细胞凋亡可能是 TP-W 抗心肌缺血的重要机制, 也是中药“开胸除痹”的关键生物学内涵。

关键词 瓜蒌皮; 水提物; 原代心肌细胞; 大鼠; PI3K/Akt/eNOS 信号通路; 缺血缺氧

中图分类号 R96 文献标志码 A DOI: 10.6043/j.issn.0438-0479.202108004

Water extraction of *Trichosanthis pericarpium* inhibits the apoptosis of ischemic and hypoxic primary cardiomyocytes in rat by regulating PI3K/Akt/eNOS signaling pathway

YANG Yujie¹, XUE Huiwen¹, HU Chaoqun¹, SUN Diyang¹, DONG Zhenfei², ZHAO Qitao²✉

(1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

Abstract On the basis of previous studies, this study focused on the regulation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B(Akt)/endothelial nitric oxide synthase (eNOS) signaling pathway to explore the mechanism of water extraction of *Trichosanthis pericarpium* (TP-W) inhibiting myocardial apoptosis and protecting myocardial ischemia. To reveal the scientific connotation of "opening the chest and removing arthralgia". Rat cardiomyocytes were isolated. In order to simulate the living environment of cardiomyocytes during AMI *in vivo*, cardiomyocytes were cultured in anoxic gas (5%CO₂, 94%N₂, 1%O₂) in serum-free medium to create the model of ischemia-hypoxia injury. The cells were treated with PI3K specific inhibitor (LY294002) and TP-W at the same time. The morphological changes of the cells were observed by inverted phase contrast microscopy, the survival rate was measured by MTT method, cardiomyocyte apoptosis was detected by TUNEL staining. Western blotting and immunofluorescence was used to detect the expression of PI3K, Akt and eNOS protein expression and phosphorylation level. The results showed that TP-W could significantly improve the growth state, increase survival rate and reduce apoptosis rate of myocardial cells injured by ischemia and hypoxia. Meanwhile, the expression and phosphorylation level of PI3K and other proteins were significantly up-regulated. However, these effects can be significantly reduced by LY294002. In conclusion, activation of PI3K/Akt/eNOS signaling pathway and inhibition of myocardial cell

收稿日期: 2021-08-04

基金项目: 国家自然科学基金 (81573852); 山东省自然科学基金 (ZR2019BH017)

网络首发时间: 2022-04-24 09:09:05 网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1070.N.20220422.2004.002.html>

apoptosis may be an important mechanism of TP-W against myocardial ischemia, as well as the key biological connotation of traditional Chinese medicine "opening the chest and removing arthralgia".

Key words *Trichosanthis pericarpium*; water extraction; primary cardiomyocyte; rat; PI3K/Akt/eNOS signaling pathway; ischemia-hypoxia

心肌缺血是多种心血管疾病(CVD)的常见症状及首要死因,严重危害人类健康^[1]。该症状属于中医的“胸痹、心痛”范畴,“开胸除痹、祛痰散结”为其主要的治则治法^[2]。瓜蒌皮(*Trichosanthis pericarpium*)是葫芦科植物栝楼(*T. Kirilowii* Maxim.)及双边栝楼(*T. rosthornii* Harms)的干燥成熟果皮,是中医治疗胸痹、心痛的首选药材^[3]。该药始载于《神农本草经》,药用历史达 2000 多年^[4]。《本草思辨录》记载:“栝楼实之长,在导痰浊下行,故结胸胸痹非此不治”^[5]。瓜蒌薤白白酒汤、瓜蒌薤白半夏汤等为《金匮要略》中记载的经典方剂,主治痰浊壅塞胸膈、胸阳痹阻、胸背疼痛、不得安卧的胸痹证,疗效独特而显著^[6]。现代中医临床也广泛用瓜蒌注射液、瓜蒌含片等成药治疗冠心病、心绞痛及心肌梗塞等,安全有效,且不良反应轻微^[7]。然而,由于作用机制及物质基础不明,其疗效的提高及进一步的开发利用受到了严重限制。

我们前期系列药效评估研究表明,瓜蒌皮对急性心肌缺血(AMI)大鼠干预效果显著^[8-9];而且该药材干预 AMI 的有效成分富集于其水提物(TP-W)中,其脂溶性提取物效果不明显^[10-11]。而且,我们发现该药材具有较强的抗氧化活性。对于高血脂合并 AMI 大鼠,其水煎液可显著升高其血浆中超氧化物歧化酶(SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)及过氧化氢酶(CAT)水平,显著降低其中脂质过氧化物(LPO)及氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)的含量;对单纯 AMI 大鼠,也可显著降低其心肌组织丙二醛(MDA)的含量,增强其中 SOD 活性^[11-12]。对体外缺血缺氧的心肌细胞,其水溶性成分(含 TP-W、水提醇沉部位)在改善其生长状态,提高其存活率的同时,显著提高了细胞内 T-AOC,降低其中自由基(T-ROS)及总超氧化物(superoxide)的水平^[10]。因而,我们推测:增强机体抗氧化能力,纠正 AMI 后异常的氧化应激状态,可能是该药材的主要作用机制。

研究证实,磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/内皮型一氧化氮合酶(eNOS)信号通路是维持细胞生存的关键通路,其中任何一种信号蛋白的异常,都会严重影响细胞的生存^[13-14]。生理条件下,PI3K 诱导 Akt 磷酸化,p-Akt 导致下游 eNOS 的磷酸化^[15]。p-eNOS 以 L-精氨酸为底物,在四氢生物喋呤(BH4)辅助下合成 NO。而在氧化应激状态下,BH4 被自由基、过氧化物所氧化,从而使 eNOS 蛋白解偶联失活,转而催化产生 O²而不是 NO,从而导致细胞凋亡^[16]。AMI 发生后,由于线粒体呼吸链电子传递中断、缺血区补体系统的激活及儿茶酚胺自动氧化等,心肌细胞活性氧(ROS)、活性氮(RON)等产量急剧增加,从而使 PI3K、Akt、eNOS 等蛋白失活,导致心肌细胞的大量凋亡^[17]。瓜蒌皮是否通过其自身的抗氧化作用,清除自由基、保护上述蛋白、激活该通路,从而发挥抑制心肌细胞凋亡、保护心肌缺血的作用?现未见相关报道。

为此,本研究模拟 AMI 时体内血液环境,采用大鼠原代心肌细胞制造缺血缺氧损伤模型,并利用 PI3K 特异性抑制剂 LY294002 阻断细胞内上述通路。在这种状态下,研究 TP-W 对细胞凋亡的抑制作用,以及对 PI3K/Akt/eNOS 信号通路的调控作用,以期探明瓜蒌皮是否通过激活上述通路,抑制心肌细胞凋亡,从而发挥心肌缺血的保护作用。

1 材料

1.1 动物

新生 1~3 d 的 Wistar 大鼠乳鼠,雌雄兼用,动物合格证号 SCXK(鲁)20150007。

1.2 药品、仪器与试剂

瓜蒌皮购自瓜蒌道地产区——山东省济南市长清区马山瓜蒌种植基地,经山东中医药大学药学院生药系郭庆梅教授鉴定,质量上乘。

GentleMACS 全自动组织处理器 (130093235, 美天旋), 倒置相差显微镜 (DMI3000B, Leica), 激光共聚焦显微镜 (LSM510, 蔡司)。

心肌细胞解离试剂盒 (130098373, 德国 Miltenyi Biotec); 胎牛血清 (FBS, 10099141, Gibco); 高糖 DMEM (1645799, Gibco); 二甲基亚砜 (DMSO, D2650, Sigma); 牛血清白蛋白 (ED0017, 思科捷); PI3K 特异性抑制剂 LY294002 (440202, 美国 Sigma 公司); 山羊血清 (CW0130S, 北京康为世纪); 兔抗大鼠 PI3K-P110 α (AF5112)、p-PIK3CA (AF4369)、Akt (AF6261)、p-Akt (AF0016)、eNOS (AF0096)、p-eNOS (AF3247) 多克隆抗体均购自美国 Affinity Biosciences 公司; Cooktail (P8340, Sigma); 十二烷基硫酸钠 (SDS, S8010, Solarbio); 末端标记 (TUNEL) 细胞凋亡检测试剂盒 (C1086)、山羊抗小鼠 IgG (A0216)、山羊抗兔 IgG (A0208)、小鼠单抗 β -Actin (AA128)、PMSF (ST506)、TritonX-100 (ST797)、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 蛋白上样缓冲液 (5 \times , P0015)、噻唑蓝 (MTT, ST316)、RIPA 裂解液 (P10013C) 及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (P0012) 均购自上海 Beyotime 公司。其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 瓜蒌皮水提物 (TP-W) 的制备

用电子天平称取瓜蒌皮, 加 8 倍量水浸泡 40 min 后, 武火煮沸后再转文火煎煮 1.5 h, 煎煮液趁热过滤。再分别用 8 倍量、6 倍量水文火煎煮 1 h, 合并上述 3 次滤液。减压抽滤, 浓缩蒸发至干粉。称量并分装, -20 $^{\circ}$ C 保存。

使用时称取 TP-W 干粉, 以高糖 DMEM 培养液溶解, 配制成 100 mg/mL 的储存液, 4 $^{\circ}$ C 保存。本研究预实验表明, 当培养液中 TP-W 终质量浓度为 0.5 mg/mL 时 (相对于瓜蒌皮生药含量 1.25 mg/mL), 对缺血缺氧的心肌细胞保护作用最佳。该浓度对正常培养的心肌细胞没有损伤作用。

2.2 心肌细胞的提取与培养

参考胡超群等^[10]的方法提取心肌细胞。乳鼠心脏用预冷的 PBS 清洗后, 轻轻剪碎至约 1 mm³ 的小块。使用美天旋 gentleMACS 全自动组织处理器, 按照配套的心肌细胞解离试剂盒说明书分离细胞。细胞接种密度约 1×10^4 mL⁻¹。当培养皿中细胞覆盖率达 80% 以上时, 可进行后续实验。

2.3 细胞处理

细胞分为 4 组, 对照 (Ctrl) 组、缺血缺氧 (Mod) 组、TP-W 组、TP-W+LY294002 (TP-W+LY) 组。Ctrl 组细胞正常培养; Mod 组细胞以不含血清的培养液于三气培养箱 (5%CO₂、94%N₂、1%O₂, 均为体积分数) 培养; TP-W 组在 Mod 组的基础上添加终质量浓度 0.5 mg/mL 的 TP-W; TP-W+LY 组在 TP-W 组的基础上再添加终浓度 20 μ mol/L 的 LY294002。

2.4 细胞形态观察

倒置相差显微镜下观察细胞形态, 并拍照记录。

2.5 细胞存活率检测

将细胞接种于 96 孔板中。分组处理后, 每孔加入 20 μ L 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的培养箱中孵育 4 h。吸弃培养液并加入的 DMSO。37 $^{\circ}$ C 继续孵育 15 min, 充分溶解紫色结晶物。酶标仪 490 nm 波长处检测各孔的吸光度 (A)。设定对照组细胞的存活率为 100%, 按下列公式计算各组细胞存活率: 存活率 = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{调零组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{调零组}}) \times 100\%$ 。

2.6 细胞凋亡率检测

细胞接种于 24 孔板, 分组处理后磷酸缓冲液 (PBS) 浸洗 1 次。4% (质量分数) 多聚甲醛 4 $^{\circ}$ C 固定 10 min, PBS 洗涤。加入含 0.3% (体积分数) Triton X-100 的 PBS 室温通透 5 min, PBS 浸洗 2 次。每孔加 150 μ L 的 TUNEL 检测液 (现用现配)。37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min, PBS 浸洗 3 次。激光共

聚焦显微镜下观测，并用配套软件统计阳性细胞率。

2.7 免疫荧光检测

细胞分组处理后，用 PBS 浸洗 1 次。固定液固定 10 min，PBS 浸洗 3 次。加 1%（体积分数）Triton X-100 室温通透 20 min，PBS 浸洗 3 次。封闭血清室温封闭 60 min。加入适量的一抗，4 °C 孵育过夜，PBST 浸洗 4 次。加入二抗，37 °C 孵育 20 min，PBST 浸洗 4 次。激光共聚焦显微镜观测，并测算每组细胞内相对荧光强度。

2.8 蛋白免疫印迹检测

取各组细胞，RIPA 裂解液提取总蛋白并测定蛋白浓度，SDS-PAGE 后转移至 NC 膜。封闭液室温封闭 1.5 h。加入一抗（1:1000），4 °C 孵育过夜，TBST 清洗 3 次。加入二抗（1:3000），37 °C 孵育 1 h，TBST 清洗 3 次。ECL 发光液显影，BIO-RAD 凝胶成像系统采集图像并分析。以 β -action 为内参，计算各组相对灰度值。

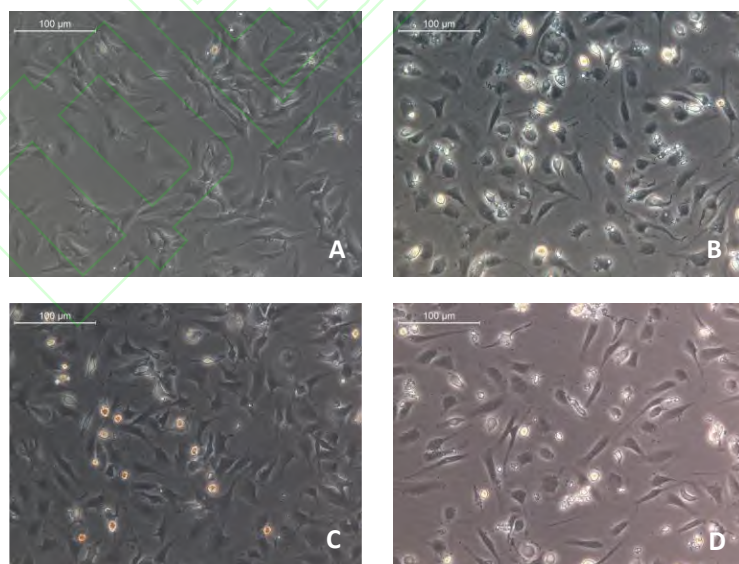
2.9 数据分析

采用 SPSS 22.0 统计软件对各组结果进行统计分析。实验结果以均数标准差($\bar{x} \pm s$)表示，组间采用 one way-ANOVA 或 LSD-*t* 检验， $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 各组细胞的生长状态

如图 1 所示，在倒置相差显微镜下观察到：Ctrl 组心肌细胞数量较多，呈放射状生长，形态饱满，跳动节律正常且有力。Mod 组细胞形态皱缩，部分细胞表面出现凋亡小体，甚至细胞碎片；多数细胞跳动节律不正常，甚至无跳动。而 TP-W 处理的细胞形态相比模型组明显改善，凋亡小体及细胞碎片减少，细胞搏动状况也趋于正常。然而，培养液中同时添加了 TP-W 及 PI3K 抑制剂 LY294002 后，细胞形态仍然皱缩，凋亡小体明显，与模型组无明显差异。

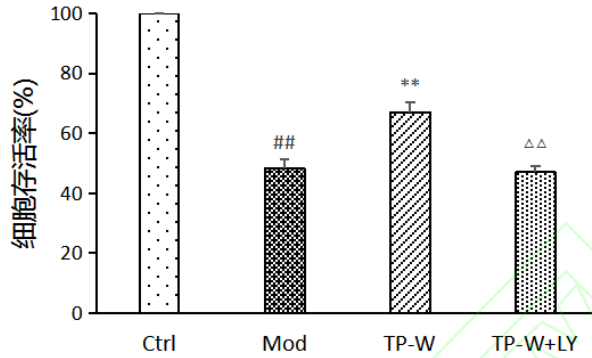


A~D 分别为 Ctrl 组、Mod 组、TP-W 组、TP-W+LY 组。放大倍数：20×10（下显微图片同）。

图 1 各组细胞的生长状态
Fig.1 Growth and morphology in cells of each group

3.2 各组细胞存活率

如图 2 所示，MTT 法检测数据表明：与 Ctrl 组相比，Mod 组的细胞存活率显著降低，仅为 50% 左右。TP-W 的处理能显著提高心肌细胞存活率，达到了 67.05%。而 TP-W 与 LY294002 共同处理后的细胞存活率仍显著降低，与 Mod 组无显著差异($P < 0.01$)。

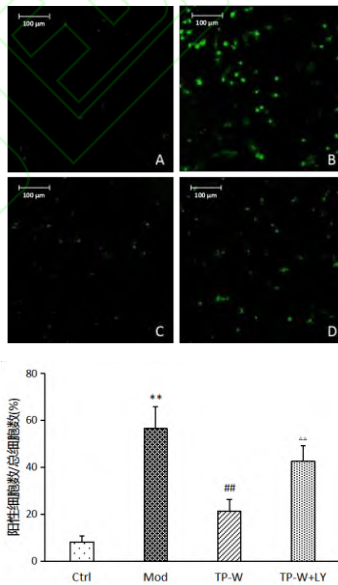


** 与 Ctrl 组相比 $P < 0.01$; ## 与 Mod 组相比 $P < 0.01$; ΔΔ 与 TP-W 组相比, $P < 0.01$ 。

图 2 各组细胞的存活率 ($n=5$)
Fig.2 The survival rate in cells of each group ($n=5$)

3.3 各组细胞凋亡率

凋亡的细胞经过 TUNEL 试剂标记，在共聚焦显微镜下呈绿色荧光，而正常细胞则不被标记，不发荧光。观测结果如图 3 所示：Ctrl 组细胞绿色荧光微弱；而 Mod 组显绿色荧光的细胞数量显著增加，荧光亮度也显著增高。TP-W 组处理后阳性细胞数目降低。而 TP-W+LY 组的阳性细胞数和模型组无显著差异。



A~D 分别为 Ctrl、Mod、TP-W 及 TP-W+LY 组。

**：与对照组相比 $P < 0.01$ ；##：与模型组相比 $P < 0.01$ ；ΔΔ：与 TP-W 组相比 $P < 0.01$ 。

图 3 各组细胞凋亡情况
Fig.3 Apoptosis in each groups

3.4 各组细胞内 PI3K 等蛋白表达及磷酸化水平

免疫荧光结果显示: Ctrl 组细胞中 PI3K、Akt 及 eNOS 的蛋白的表达水平较高, Mod 组中上述 3 种蛋白表达水平均显著下调, TP-W 的处理可显著逆转 Mod 组的状况, 上调上述 3 种蛋白的表达水平(图 4 和 5, $P < 0.01$)。

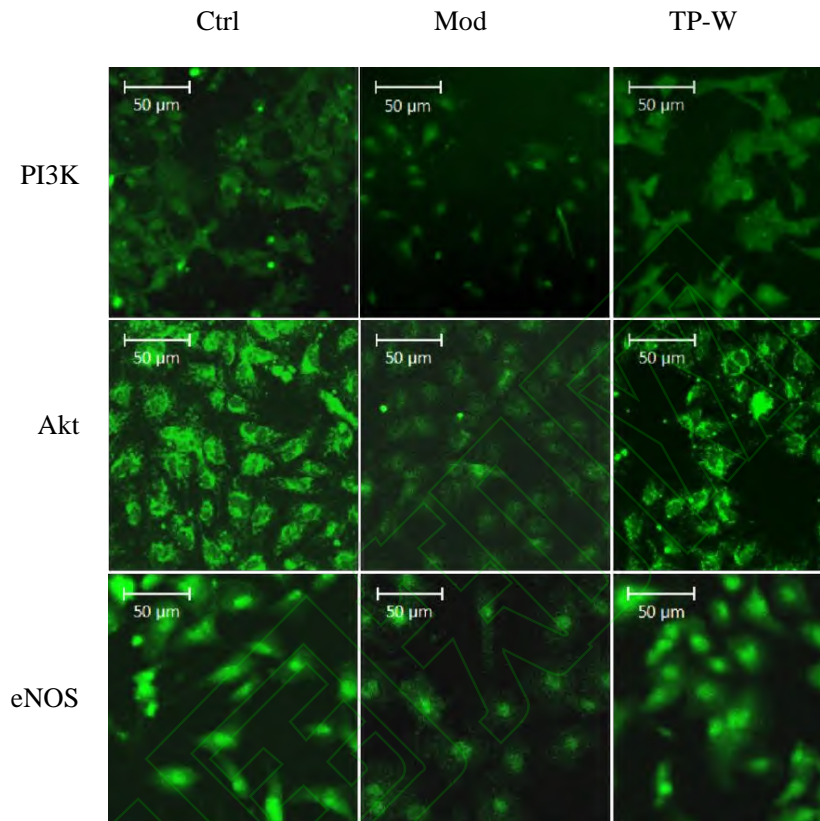
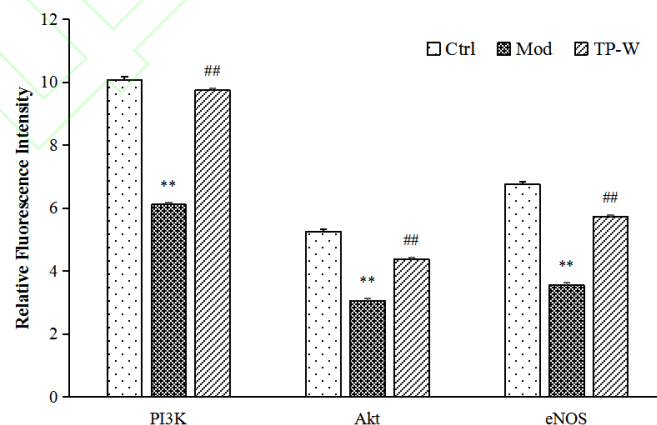


图 4 各组细胞内 PI3K、Akt、eNOS 蛋白的表达情况

Fig. 4 The expression levels of PI3K, Akt and eNOS proteins in each group



** 与 Ctrl 组相比 $P < 0.01$; ## 与 Mod 组相比 $P < 0.01$ 。

图 5 各组细胞内 PI3K、Akt、eNOS 蛋白的相对荧光强度值

Fig. 5 Relative fluorescence intensity of PI3K, Akt, and eNOS proteins in each group

磷酸化是 PI3K、Akt 及 eNOS 这 3 种蛋白的激活形式。本研究采用专一性抗 p-PI3K、p-Akt 及 p-

eNOS 的单克隆抗体进行免疫荧光检测，评估各组细胞内 3 种蛋白的激活水平。Ctrl 组细胞中 PI3K、Akt 及 eNOS 的蛋白磷酸化水平较高，荧光明亮；与 Ctrl 组比较，Mod 组细胞 3 种蛋白的激活水平均显著降低；TP-W 的处理可显著逆转 Mod 组的状况，上调上述 3 种蛋白的磷酸化水平；而经 TP-W+LY 共同处理后，细胞内上述蛋白的磷酸化水平又显著降低，与模型组无显著差异（图 6 和 7， $P < 0.01$ ）。

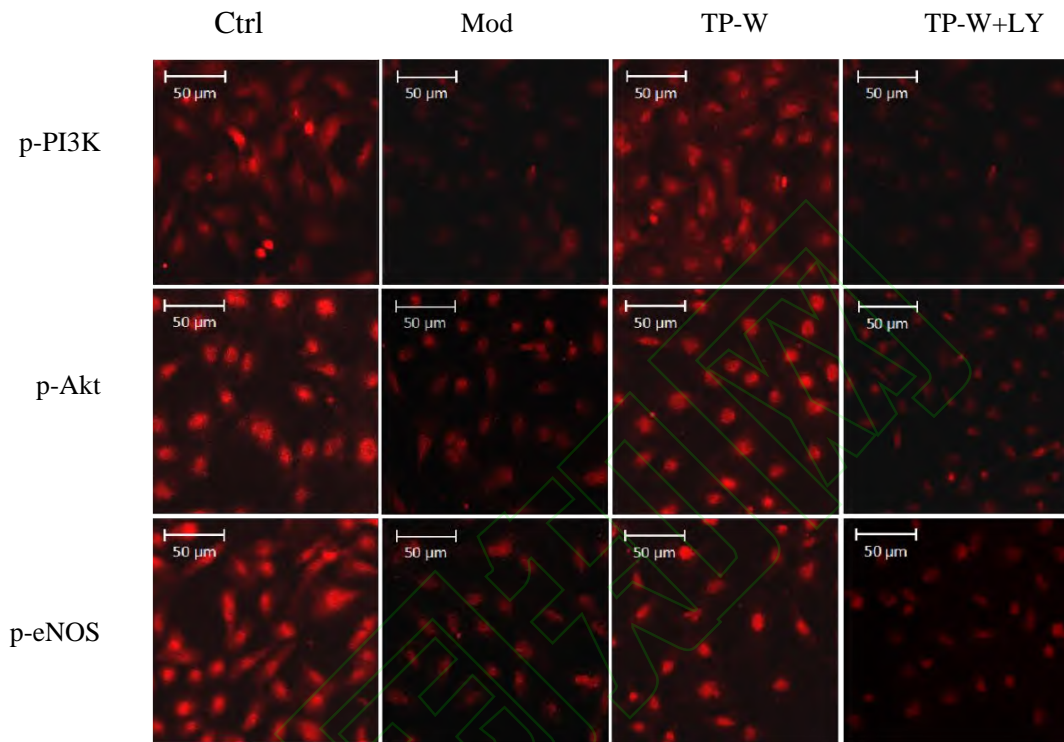
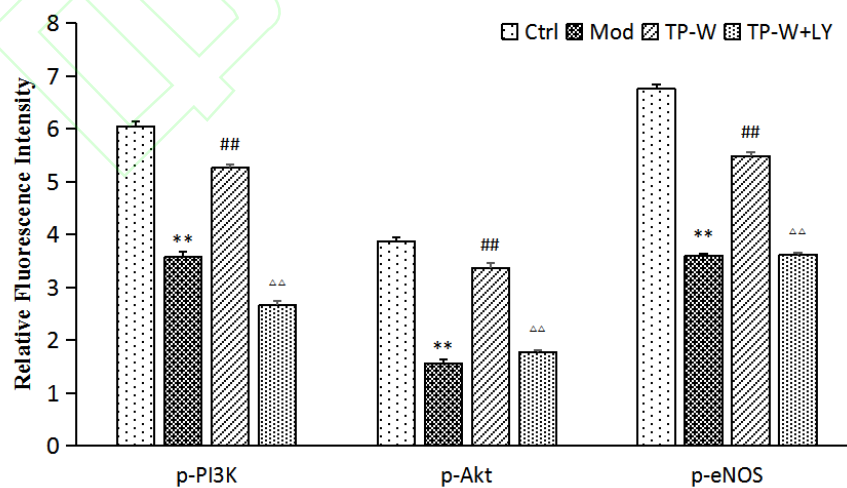


图 6 各组细胞内 PI3K、Akt 及 eNOS 蛋白的磷酸化水平
Fig. 6 Phosphorylation levels of PI3K, Akt, and eNOS proteins in each group



**与 Ctrl 组相比 $P < 0.01$ ；##与 Mod 组相比 $P < 0.01$ ； $\Delta\Delta$ 与 TP-W 组相比 $P < 0.01$ 。

图 7 各组细胞内 p-PI3K、p-Akt 及 p-eNOS 的相对荧光强度值
Fig. 7 The relative fluorescence intensity of p-PI3K, p-Akt, and p-eNOS in the group cells

蛋白免疫印迹检测结果进一步验证了该药材对上述 3 种蛋白的表达及磷酸化水平的调控作用。与 Ctrl 组比较, Mod 组细胞内 PI3K 等 3 种蛋白的表达及磷酸化水平均显著下调, 磷酸化蛋白与总蛋白的比值均显著降低; TP-W 的处理可显著逆转 Mod 组的情况; 而经 LY294002 处理后, 细胞中上述蛋白的磷酸化水平又显著降低, 与 Mod 组无显著性差异 (图 8 和 9, $P < 0.01$)。

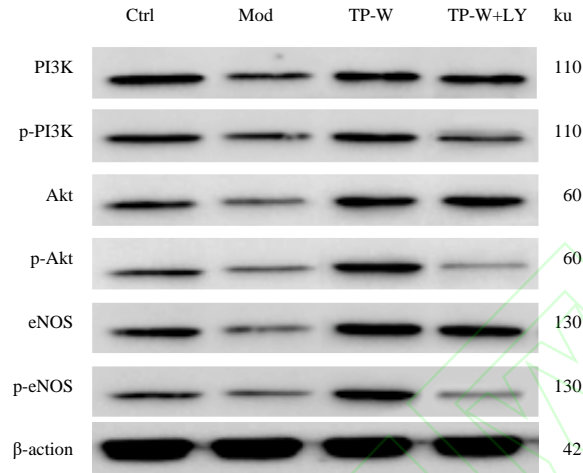
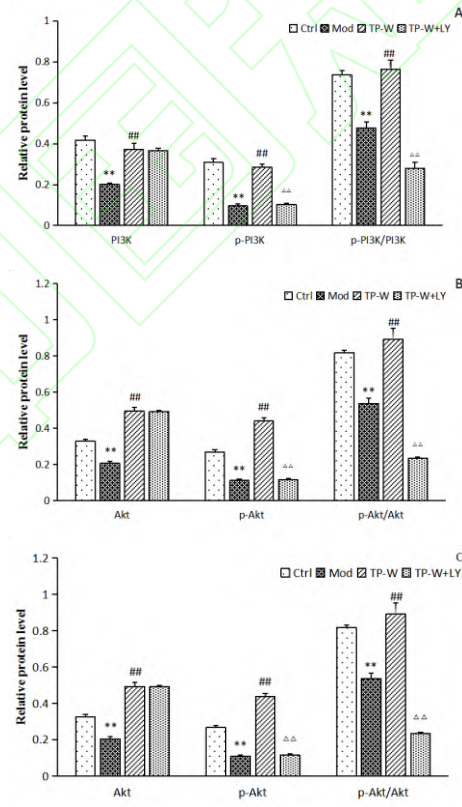


图 8 各组细胞 PI3K、Akt、eNOS 及磷酸化蛋白的免疫印迹
Fig. 8 Western blotting of PI3K, Akt, eNOS and their phosphorylated proteins in each group



A-C 分别为 PI3K、Akt、eNOS。**与 Ctrl 组相比 $P < 0.01$; ##与 Mod 组相比 $P < 0.01$; $\Delta\Delta$ 与 TP-W 组相比 $P < 0.01$ 。

图 9 各组细胞内 PI3K、Akt 及 eNOS 的表达及磷酸化水平
Fig. 9 The expression of PI3K, Akt and eNOS protein expression and phosphorylation level in each group

4 讨论与结论

瓜蒌皮是常用的大宗中药材,其对冠心病、心绞痛等多种 CVD 的显著疗效早已被 2000 多年大量的中医临床实践所证明。而且该药材价格低廉,副作用少,因而开发价值很高。探寻该药材的有效成分和作用靶点,是本课题组的长期目标。本研究表明,激活心肌细胞内 PI3K/Akt/eNOS 通路,抑制该细胞凋亡,可能是上述功效在细胞内信号转导层面的体现,部分阐明了其“开胸除痹”传统理论的现代医学内涵。

4.1 PI3K/Akt/eNOS 信号通路对瓜蒌皮干预 AMI 的重要作用

本研究在前期研究基础上进一步发现,对于缺血缺氧损伤的心肌细胞,TP-W 在显著改善其生长状态、抑制其凋亡的同时,显著上调了细胞内 PI3K、Akt 及 eNOS 的蛋白表达水平、磷酸化水平,增加了 pPI3K/PI3K、pAkt/Akt、p-eNOS/eNOS 的比值,极大地激活了 PI3K/Akt/eNOS 信号通路,而 PI3K 特异性抑制剂 LY294002 可显著抵消 TP-W 的这些作用。本研究在该通路阻断、畅通的两种情况下,比较了 TP-W 对细胞凋亡的抑制效果,从而证实了瓜蒌皮是通过激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路,抑制缺血缺氧心肌细胞凋亡的。该通路可能是瓜蒌皮发挥 AMI 保护效果的关键环节。

其他学者也有类似的报道。楚冬海等发现,对连二亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)处理的 H9C2 心肌细胞株缺氧/复氧损伤模型,TP-W 可显著抑制细胞凋亡,同时激活细胞内 PI3K/Akt 信号通路,上调 eNOS 表达及活性,增加内源性 NO 的基础含量^[18-20]。邱清勇等报道,对柯萨奇病毒 B3 感染的上述细胞株,瓜蒌皮提取物能够通过激活 PI3K/PKB 通路,显著减轻其损伤及凋亡^[21]。这些结果均可表明,对病毒感染及化学缺氧剂造成的心肌细胞单纯缺氧损伤,瓜蒌皮可激活 PI3K/PKB,发挥保护作用。然而,上述研究使用的是永生化 H9C2 心肌细胞株。这种细胞兼具肿瘤细胞与心肌细胞的生物学特征,繁殖力强、生命力旺盛;但与正常细胞相比,对药物的敏感性发生很大变化。本研究使用的是从大鼠心脏分离培养的原代心肌细胞,对药物处理更加敏感。而且我们充分模拟体内 AMI 时心肌细胞生存环境,联合使用缺氧气体(5%CO₂、94%N₂、1%O₂) + 无血清培养液培养,制造了心肌细胞同时缺血、缺氧的损伤模型。因此,本研究为 TP-W 激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路提供了更有说服力的证据。

4.2 瓜蒌皮对上述通路的激活与其抗氧化作用的密切关系

抗氧化治疗在 CVD 领域一直倍受关注。在 AMI 或 I/R 过程中,过量的 ROS、RNS 是心肌细胞凋亡、坏死的主要诱因,也是 PI3K、Akt 和 eNOS 等蛋白失活或解离的元凶^[17]。我们前期发现瓜蒌皮具有较强的抗氧化活性,不仅可显著升高 AMI 大鼠血浆 T-AOC 及 SOD、CAT 的活性,降低其中 ox-LDL、LPO 的含量^[8,11];亦可清除缺血缺氧心肌细胞中的 T-ROS、T-Superoxe 水平,升高其中 T-AOC^[10]。结合本研究的结果,我们推测体内 AMI 发生后,瓜蒌皮可能通过清除自由基,纠正异常的氧化应激状态,保护 PI3K 等蛋白的完整性,从而维护了上述通路的正常功能。

活性氧导致心肌细胞死亡的途径错综复杂,涉及到 NADPH 氧化酶系统、一氧化氮合酶系统和黄嘌呤氧化酶系统等。这些系统以及相互关联的信号传导途径均有可能是瓜蒌皮的作用环节^[22]。在今后的研究中,可从上述通路或系统找到该药材的药效靶标,进而利用靶蛋白分子垂钓技术,筛选该药材的有效成分,追踪研究该药材清除自由基及其他氧化损伤成分的物质基础、作用机制。

参考文献:

- [1] PENG H, ABDEL-LATIF A. Cellular therapy for ischemic heart disease: an update[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, 1201:195-213.
- [2] 高飞,王康,李静华,等.瓜蒌皮注射液治疗冠心病心绞痛及心肌梗死的系统评价[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2018, 16(19): 2774-2778.
- [3] 张秀云,周凤琴.中药栝楼本草学考证[J]. *山东中医药大学学报*, 2013, 37(4): 319-321.

- [4] 曹元宇. 神农本草经[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987: 139.
- [5] 周岩. 本草思辨录(卷二)[M]. 北京: 中国书店影印, 1987: 37.
- [6] 范永升. 金匱要略[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 136.
- [7] 郭玉洪, 赵洋洋, 刘原, 等. 瓜蒌皮治疗心血管疾病的作用机制及临床应用概况[J]. 中国药房, 2019, 30(21): 3013-3018.
- [8] 李航, 李建峰, 张宇, 等. 瓜蒌皮对高血脂合并急性心肌缺血大鼠保护作用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(7): 22-25.
- [9] 单红燕, 高兆慧, 伏瑶, 等. 瓜蒌皮不同提取物干预急性心肌缺血的药效学研究[J]. 山东中医杂志, 2017, 36(5): 414-418.
- [10] 胡超群, 薛慧文, 郑书臣, 等. 瓜蒌皮提取物对缺血缺氧心肌细胞保护效果及抗氧化能力研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(3): 15-18.
- [11] 杨震, 傅旒旒, 薛慧文, 等. 瓜蒌皮对高血脂合并心肌缺血大鼠氧化应激状态动态调节作用研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(1): 39-43.
- [12] 赵启韬, 孟冰雪, 黄臻辉, 等. 不同品系栝楼果皮抗心肌梗死药效学比较研究[J]. 药物评价研究, 2013, 36(2): 95-99.
- [13] KIELCZEWSKI J L, JARAJAPU Y P R, MCFARLAND E L, et al. Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates vascular repair by enhancing nitric oxide generation[J]. *Circ Res*, 2009, 105: 897-905.
- [14] ZHANG X, HUANG L F, HUA L, et al. Resveratrol protects myocardial apoptosis induced by ischemia-reperfusion in rats with acute myocardial infarction via blocking PI3K/Akt/e-NOS pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(4): 1789-1796.
- [15] TIE G, YAN J, YANG Y, et al. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis in endothelial progenitor cells by inactivating the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway[J]. *Vasc Res*, 2010, 47(6): 519-530.
- [16] KUZKAYA N, WEISSMANN N, HARRISON DG, et al. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols. Implications for uncoupling of endothelial nitric-oxide synthase[J]. *Biol Chem*. 2003, 278(25): 22546-22554.
- [17] BAO X M, WU C F, LU G P. Atorvastatin inhibits homocysteine-induced oxidative stress and apoptosis in endothelial progenitor cells involving Nox4 and p38 MAPK[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 210(1): 114-121.
- [18] 楚冬海, 张振秋. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(22): 42-48.
- [19] 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.
- [20] 楚冬海, 张振秋. PI3K/Akt 信号通路在瓜蒌皮保护心肌细胞缺氧/复氧损伤中的作用[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(4): 220-225.
- [21] 邱清勇, 刘大勇, 彭锦, 等. 瓜蒌皮激活 PI3K/PKB 通路减轻柯萨奇病毒感染心肌细胞损伤的实验研究[J]. 病毒学报, 2021, 37(5): 1036-1042.
- [22] WU M Y, YANG G T, LIAO W T, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(4): 1650-1667.