

李红艳,梅显运,杨慧雅,等. 基于 PI3K/Akt/mTOR 通路探讨甘松新酮对 H9c2 心肌细胞低氧损伤的保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 41-47.

Li HY, Mei XY, Yang HY, et al. Protective effect of nardosinone on hypoxic injury of H9c2 cardiomyocytes mediated through the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 41-47.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.006

基于 PI3K/Akt/mTOR 通路探讨甘松新酮对 H9c2 心肌细胞低氧损伤的保护作用

李红艳^{1,2*}, 梅显运¹, 杨慧雅¹, 李艺康¹, 冯 佩¹, 孙芳云^{1,2}

(1. 西藏民族大学医学院藏药检测技术教育部工程研究中心, 陕西 咸阳 712082;
2. 西藏民族大学医学院西藏自治区高原疾病分子遗传机制与干预研究重点实验室, 陕西 咸阳 712082)

【摘要】 目的 探讨甘松新酮(nardosinone, Nar)通过调控 PI3K/Akt/mTOR 通路对低氧诱导 H9c2 心肌细胞凋亡的影响及机制。**方法** 采用氯化钴(CoCl₂)制备心肌细胞低氧损伤模型, CCK-8 试剂盒检测细胞活性; Hoechst 33342 进行细胞染色, 激光共聚焦显微镜下观察细胞凋亡现象; 网络药理学预测 Nar 治疗 IHD 相关信号通路; Western blot 检测凋亡、自噬和 PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白表达。**结果** PI3K/Akt/mTOR 通路是 Nar 治疗 IHD 关键信号通路之一; 与对照组比, CoCl₂ (400 μmol/L) 组细胞活性降低, 细胞核碎片增多, 凋亡蛋白 Cleaved-Caspase-3 表达升高, Bcl-2/Bax 比降低, PI3K、Akt 和 mTOR 磷酸化水平降低; P62 表达降低, LC3II/LC3I 比和 Beclin-1 表达升高(*P*<0.05)。与 CoCl₂ 组比, Nar (50 μmol/L) 预处理显著增加了细胞活性、减少细胞核凋亡碎片, 降低 Cleaved-Caspase-3 表达, 升高 Bcl-2/Bax 比值, 增加了 PI3K、Akt 和 mTOR 磷酸化水平及 P62 表达, 降低 LC3II/LC3I 比和 Beclin-1 表达(*P*<0.05)。PI3K 特异性抑制剂 LY294002 预作用后抵消了 Nar 对 CoCl₂ 引起的以上凋亡、PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白和 P62 蛋白的影响, 但没有抵消对 LC3II/LC3I 比和 Beclin-1 表达的影响。**结论** Nar 激活 PI3K/Akt/mTOR 通路抑制了 CoCl₂ 诱导的 H9c2 心肌细胞低氧凋亡, 但可能通过其他途径缓解了过度自噬对细胞造成的损伤。

【关键词】 甘松新酮; 心肌细胞; 低氧损伤; 凋亡; 自噬; PI3K/Akt/mTOR 通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 07-0041-07

Protective effect of nardosinone on hypoxic injury of H9c2 cardiomyocytes mediated through the PI3K/Akt/mTOR pathway

LI Hongyan^{1,2,*}, MEI Xianyun¹, YANG Huiya¹, LI Yikang¹, FENG Pei¹, SUN Fangyun^{1,2}

(1. Engineering Research Center of Tibetan Medicine Detection Technology, Ministry of Education, School of Medicine, Xizang Minzu University, Xianyang 712082, China. 2. Key Laboratory for Molecular Genetic Mechanisms and Intervention Research on High Altitude Disease of Tibet Autonomous Region, School of Medicine, Xizang Minzu University, Xianyang 712082)

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of Nardosinone (Nar) in hypoxia-induced apoptosis of H9c2 cardiomyocytes mediated through the PI3K/Akt/mTOR pathway. **Methods** Cobalt chloride (CoCl₂) was used to establish a hypoxic injury model in H9c2 cardiomyocytes. Cell proliferation was assessed by CCK-8 assays. Hoechst 33342 was applied to counterstain cells, and laser scanning confocal microscopy was used to observe apoptosis. The potential signaling pathway of Nar in treating IHD was predicted by network pharmacology. Western blot was used to detect expression of apoptosis-, autophagy-, and PI3K/Akt/mTOR pathway-related proteins. **Results** The PI3K/Akt/

[基金项目] 2022 年西藏民族大学科研项目 (22MDY012); 西藏高原相关疾病分子机制与干预研究重点实验室开放项目 (KF2022001); 2021 年国家民委高等教育教学改革研究项目 (21076); 西藏民族大学教学改革与研究项目 (2021475)。

[作者简介] 李红艳 (1978—), 副教授, 研究生导师, 研究方向: 低氧对心血管影响及藏药干预。E-mail: lhy516@163.com

mTOR pathway is major signaling pathway in Nar treatment of IHD. Compared with the control group, CoCl_2 (400 $\mu\text{mol/L}$) decreased cell proliferation, the Bcl-2/Bax ratio, PI3K, Akt and mTOR protein phosphorylation levels, and P62 protein expression, while increasing nuclear apoptotic fragmentation, the LC3II/LC3I ratio, and Cleaved-Caspase-3 and Beclin-1 protein expression ($P<0.05$). Compared with the CoCl_2 group, Nar (50 $\mu\text{mol/L}$) pretreatment significantly increased cell proliferation, alleviated nuclear apoptotic fragmentation, decreased Cleaved-Caspase-3 protein expression, increased the Bcl-2/Bax ratio, and increased PI3K, Akt and mTOR phosphorylation levels and P62 protein expression. The LC3II/LC3I ratio and the Beclin-1 protein expression were also decreased ($P<0.05$). Pretreatment with PI3K specific inhibitor LY294002 offset the effects of Nar on CoCl_2 -induced apoptosis, PI3K/Akt/mTOR pathway-related proteins, and P62 protein expression, but had no effect on the LC3II/LC3I ratio or Beclin-1 expression. **Conclusions** Nar inhibited CoCl_2 -induced H9c2 cardiomyocyte apoptosis by activating the PI3K/Akt/mTOR pathway, but probably alleviated the damage caused by excessive autophagy in cells through other pathways.

[Keywords] nardosinone; cardiomyocytes; hypoxic injury; apoptosis; autophagy; PI3K/Akt/mTOR pathway
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

缺血性心脏病 (ischemic heart disease, IHD) 是世界上导致死亡和残疾的主要原因,其临床症状主要表现为心肌梗死、心力衰竭和心功能不全等。研究发现,心肌缺氧缺血常伴随细胞异常凋亡或坏死,从而导致心功能障碍^[1]。自噬既是细胞内一种高度保守的降解过程,也是不同条件下调节细胞存活或死亡的一把双刃剑^[2],在 IHD 发病过程中有着重要作用^[3-4]。目前,IHD 治疗包括药物治疗、抗血小板治疗和手术等方法,其中中药治疗 IHD 越来越得到人们的认可。

甘松新酮 (nardosinone, Nar) 是中药甘松的有效成分^[5],有抗心律失常、降血压、中枢抑制、促神经生长、抗肿瘤、抗癫痫和预防炎症性骨丢失等作用^[6-8],在心肌细胞低氧损伤中有抗凋亡作用^[9],但具体机制尚不清楚。网络药理学是一种快速、有效预测药物疾病靶点和相关信号通路的方法。因此,本研究首先利用网络药理学预测 Nar 治疗 IHD 相关信号通路,结果表明,PI3K/Akt/mTOR 是 Nar 治疗 IHD 关键通路之一。已知,PI3K/Akt/mTOR 通路在调节细胞增殖、凋亡和自噬等生理活动中发挥着重要作用^[10],激活该通路可抑制心肌缺血损伤中的自噬和凋亡现象^[11]。其次,以 CoCl_2 诱导 H9c2 心肌细胞低氧损伤为模型,基于 PI3K/Akt/mTOR 通路探讨 Nar 对心肌细胞凋亡影响及与自噬的关系,以为 IHD 治疗靶点药物筛选提供依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

H9c2 心肌细胞系购自中国科学院上海细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 培养基 (货号 SH30022.01) 和青链霉素

混合液 (货号 SV30010) 购自 Hyclone 公司;胎牛血清 (货号 04-001-1ACS) 购自 Biological Industries 公司;氯化钴 (CoCl_2 , 货号 232696) 购自 Sigma;甘松新酮 (货号 23720-80-1) 购自成都植标化纯生物技术有限公司;LY294002 (货号 S1105) 购自 Selleckchem 公司;BCA 蛋白定量试剂盒 (货号 JC-PD002) 购自西安晶彩生物科技有限公司;PVDF 膜 (货号 IPVH00010) 购自 Millipore 公司;RIPA 裂解液 (货号 P0013B) 和 PMSF (货号 ST505) 购自碧云天生物技术有限公司;抗体 Cleaved-Caspase-3 (ab214430)、Bax (ab32503)、Bcl-2 (ab182858)、 β -actin (ab8226)、mTOR (ab134903)、p-mTOR (ab109268)、Akt (ab8805)、p-Akt (ab38449)、p-PI3K (ab278545)、LC3B (ab192890)、Beclin-1 (ab207612) 和 P62 (ab109012) 购自 Abcam 公司;PI3K (20584-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司;二抗购自武汉博士德生物工程有限公司。

CO_2 培养箱、全波长荧光酶标仪和低温冷冻高速离心机 (Thermo Fisher);激光共聚焦显微镜 (Leica);蛋白电泳仪、蛋白转膜仪和蛋白凝胶成像系统 (Bio-Rad)。

1.3 实验方法

1.3.1 CCK-8 法检测细胞活性

将 H9c2 细胞以每孔含 100 μL DMEM 完全培养基,密度为 2×10^3 /孔接种到 96 孔培养板中,37℃、5% CO_2 培养 48 h。分别以 0、50、100、200、400、800 和 1000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 CoCl_2 (溶于双蒸水中) 干预细胞 24 h (每孔设 6 个复孔),根据 CCK-8 试剂盒测细胞活性。选择 CoCl_2 半数致死浓度 (LD_{50}) 构建细胞低氧损伤模型。同时,为了观察 Nar 对 CoCl_2 诱导细胞活性损伤影响,细胞接种 24 h

后,以终浓度分别为 0、25、50、75、100、125、150 $\mu\text{mol/L}$ 的 Nar(溶解在 DMSO 中)或 1/1000 DMSO 培养 24 h,再以 CoCl_2 (LD_{50}) 继续培养 24 h,根据 CCK-8 试剂盒检测细胞活性。

1.3.2 Hoechst 33342 染色

细胞接种于 24 孔板进行爬片,分为对照组(Control 组)、Nar 组、 CoCl_2 组和 Nar+ CoCl_2 组 4 组。24 h 后,Nar+ CoCl_2 组加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 Nar 预处理,其余各组用 DMSO 补足等体积。24 h 后, CoCl_2 组和 Nar+ CoCl_2 组分别加入 400 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 进行干预,Control 组用双蒸水补足等体积,培养箱中继续培养 24 h。随后按照 Hoechst 33342 说明书染色,激光共聚焦显微镜下观察细胞形态。

1.3.3 Nar 治疗 IHD 潜在靶点的网络学分析

(1) Nar 靶点预测

通过 TCMS (https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php)、SwissTargetPrediction (http://www.swisstargetprediction.ch/)、PharmMapper (http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/) 和 BATMANTCM (http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/) 数据库,以“Nardosinone”为关键词预测 Nar 作用靶点。

(2) IHD 靶点的预测

通过 Genecards (https://www.genecards.org/)、PharmKB (https://www.pharmgkb.org/)、OMIM (https://omim.org/)、TTD (http://db.idrblab.net/ttd/) 和 Drugbank (https://go.drugbank.com/) 数据库,以“Ischemic Heart Disease”为关键词预测疾病靶点。将 Nar 靶点和 IHD 靶点分别选择“Homo Sapiens”物种,利用 UniProt (https://www.uniprot.org/) 数据库进行 ID Mapping,统一转换为 Gene symbol。以 Venny 2.1 (https://bioinfopg.cnb.csic.es/tools/venny/index.html) 软件绘制 Nar 和 IHD 靶点交集图。

(3) Nar 治疗 IHD 信号通路分析

通过 Metascape (https://metascape.org/) 数据库对交集靶点进行 KEGG 富集分析。在微生信 (http://www.bioinformatics.com.Cn/) 网将 KEGG 通路富集结果绘成气泡图。

1.3.4 Western blot 检测蛋白表达

细胞分组:Control 组、Nar 组、 CoCl_2 组和 Nar+ CoCl_2 组或 Control 组、 CoCl_2 组、Nar+ CoCl_2 组、LY294002+ CoCl_2 组和 LY294002+Nar+ CoCl_2 组。以 RIPA 裂解液提取各组细胞总蛋白,BCA 法测蛋白

浓度。加上样缓冲液水浴煮沸进行蛋白变性。随后进行 SDS-PAGE 电泳、转膜,5%脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 10 min。一抗 Cleaved-Caspase-3、Bax、Bcl-2、 β -actin、mTOR、p-mTOR、Akt、p-Akt、p-PI3K、PI3K、LC3B、Beclin-1 和 P62 分别 4℃ 孵育过夜。TBST 缓冲液洗膜,方法同上。二抗室温孵育 2 h。显影后,采用凝胶成像系统扫描图像。使用 Image Lab 软件对灰度值进行分析。

1.4 统计学方法

以 GraphPad Prism 8.0 软件作图。每组数据以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。 t 检验用于两组间比较,单因素方差分析用于多组间比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

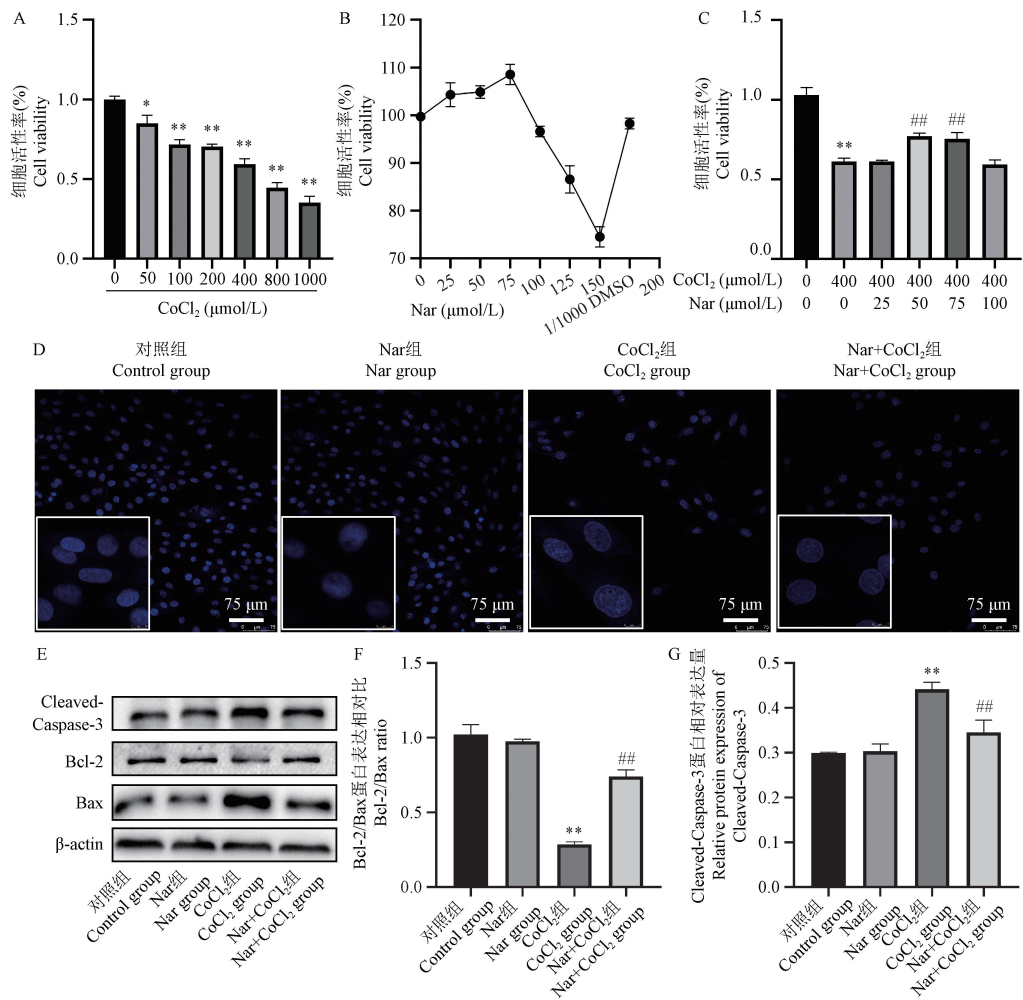
2.1 Nar 对心肌细胞低氧损伤的影响

用不同浓度 CoCl_2 处理 H9c2 细胞 24 h,细胞活性呈浓度依赖性下降(图 1A, $P < 0.01$),选 CoCl_2 (400 $\mu\text{mol/L}$) (使细胞活性降至 60%左右)作为后续细胞低氧损伤造模用。由图 1B 可见,Nar 安全浓度在 0~75 $\mu\text{mol/L}$ 之间($P < 0.01$)。细胞以不同浓度 Nar 预处理 24 h,再以 CoCl_2 继续培养 24 h,结果发现,50 $\mu\text{mol/L}$ 和 75 $\mu\text{mol/L}$ 的 Nar 可显著改善 CoCl_2 对细胞活性的影响(图 1C, $P < 0.01$),但二者差异不大,故选 Nar (50 $\mu\text{mol/L}$) 进行后续研究。

为了进一步了解 Nar 对 CoCl_2 低氧损伤的影响,Hoechst 33342 细胞染色发现(图 1D):对照组和 Nar 组细胞核轮廓正常,呈椭圆形或圆形,凋亡亮点较少。而 CoCl_2 组细胞凋亡数增加,染色质浓缩,核出现多个碎片,表现为亮点增多。Nar 预作用细胞核形态明显改善,凋亡数量减少。Western blot 结果表明,与对照组相比, CoCl_2 组凋亡蛋白 Cleaved-Caspase-3 表达升高,Bcl-2/Bax 比降低,而 Nar 预处理显著逆转了 CoCl_2 诱导的 Cleaved-Caspase-3 表达升高和 Bcl-2/Bax 比降低,表明,Nar 对 CoCl_2 诱导的细胞凋亡有抑制作用。

2.2 Nar 与 IHD 潜在靶点的信号通路分析

通过 TCMS、SwissTargetPrediction、PharmMapper 和 BATMANTCM 数据库获得 Nar 相关靶点,将结果去重,利用 UniProt 进行格式转换,最终得到 Nar 相关靶点 300 个(图 2)。在 Genecards、PharmKB、OMIM、TTD 和 Drugbank 数据库筛选出 IHD 相关靶



注：A~C：CCK-8 检测细胞活性；D：Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡现象；E~G：Western blot 检测凋亡相关蛋白 Cleaved-Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 表达。与对照组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与 CoCl_2 组相比，## $P<0.01$ 。

图 1 Nar 对 H9c2 心肌细胞低氧损伤的影响

Note. A~C, Cell viability was detected by CCK-8. D, Hoechst 33342 staining was used to detect apoptosis. E~G, Western blot was used to detect the expression of apoptosis-related proteins Cleaved-Caspase-3, Bcl-2 and Bax. Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with CoCl_2 group, ## $P<0.01$.

Figure 1 Effect of Nar on hypoxic injury in H9c2 cardiomyocytes

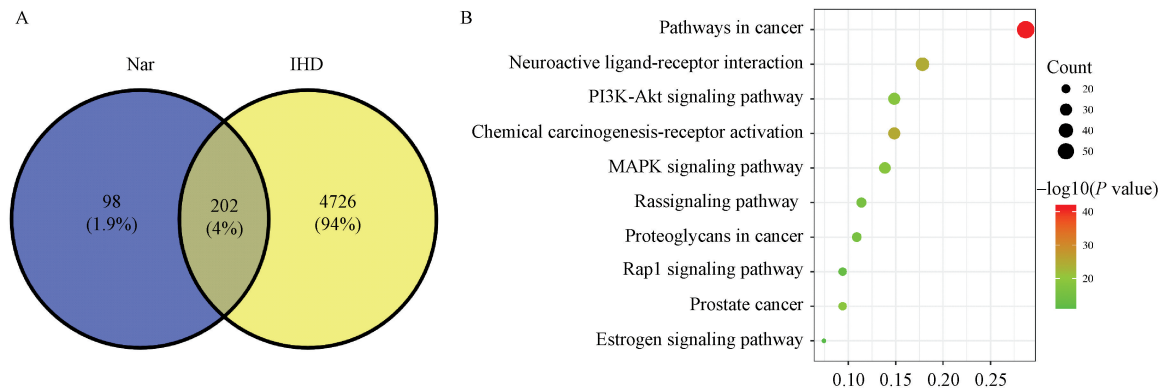


图 2 Nar 治疗 IHD 的潜在靶点信号通路分析

Figure 2 Signaling pathway analysis of potential targets of Nar treating for IHD

点共 4928 个。Nar 与 IHD 交集靶点有 202 个(图 2A)。通过 Metascape 数据库对交集靶点进行 KEGG 富集分析,共获得 207 条信号通路。以微生物网绘制排名前十的信号通路 KEGG 富集气泡图(图 2B),其中 PI3K/Akt/mTOR 通路是 Nar 治疗 IHD 重要凋亡相关通路。

2.3 Nar 影响心肌细胞低氧损伤与 PI3K/Akt/mTOR 通路的关系

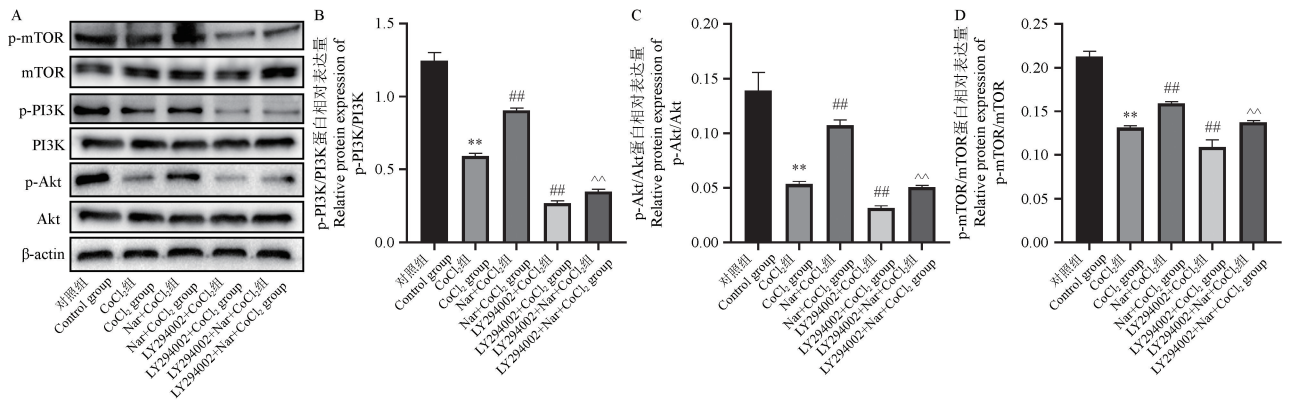
为了验证 Nar 治疗 IHD 与 PI3K/Akt/mTOR 通路的关系,在细胞水平上检测该通路相关蛋白表达。结果如图 3,与对照组比,CoCl₂ 使 PI3K、Akt 和 mTOR 磷酸化水平显著降低,Nar 预作用增加了 PI3K、Akt 和 mTOR 磷酸化水平,而以 PI3K 抑制剂 LY294002 阻断 PI3K/Akt 通路后,Nar 作用显著被抵消。结果表明,Nar 通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信

号通路影响 CoCl₂ 诱导细胞低氧损伤。
2.4 Nar 通过 PI3K/Akt/mTOR 通路影响低氧诱导的细胞凋亡

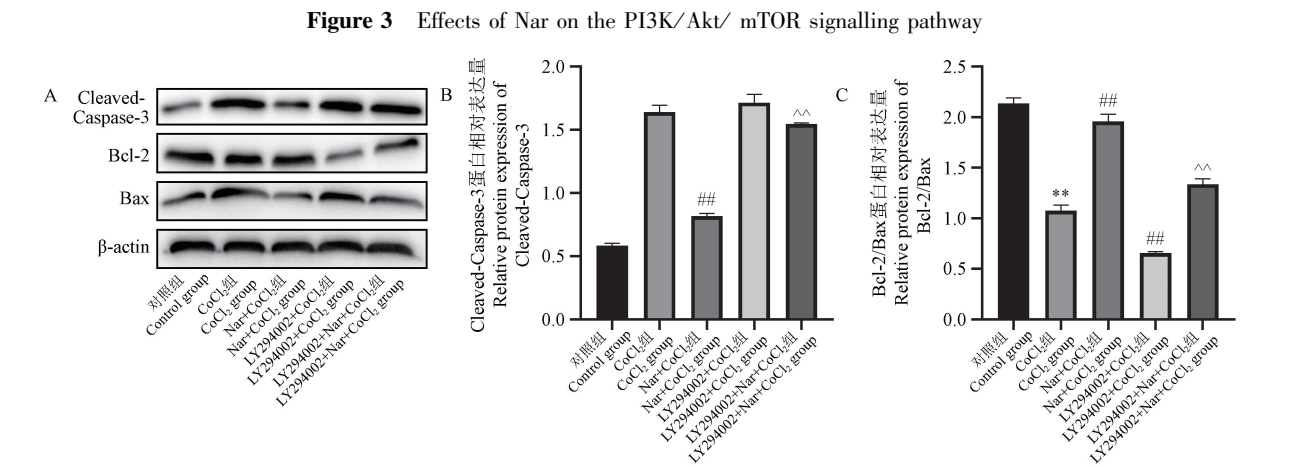
为了进一步探索 Nar 在心肌细胞低氧凋亡中的作用与 PI3K/Akt/mTOR 通路的关系,以 LY294002 阻断 PI3K/Akt 通路,检测凋亡蛋白 Cleaved-Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 表达。结果,LY294002 预作用抵消了 Nar 对 CoCl₂ 引起的 Cleaved-Caspase-3 表达升高和 Bcl-2/Bax 比降低的影响(图 4)。结果表明,Nar 激活 PI3K/Akt/mTOR 通路抑制心肌细胞低氧诱导的凋亡。

2.5 Nar 通过 PI3K/Akt/mTOR 通路影响细胞低氧损伤与自噬的关系

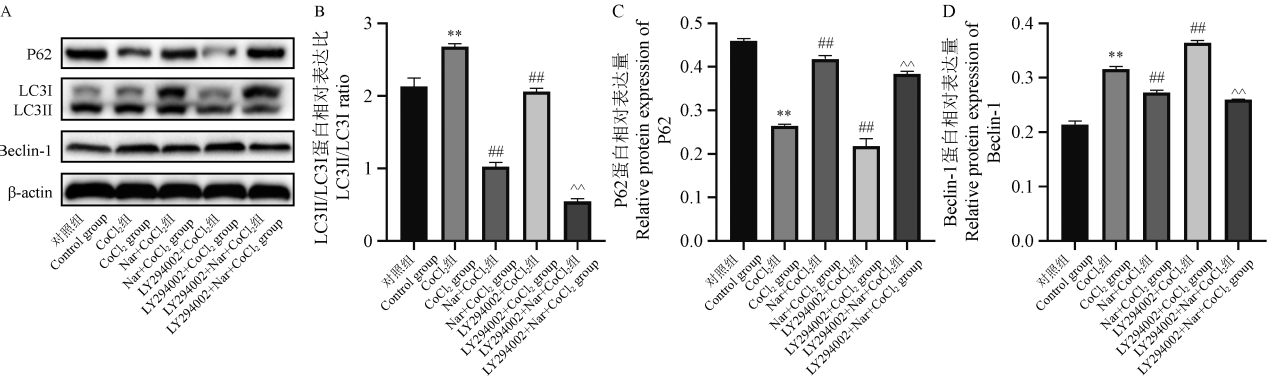
既往研究表明,Nar 对 CoCl₂ 诱导心肌细胞过度自噬有抑制作用^[9]。结果见图 5,为了深入探讨 Nar



注:与对照组相比, ** $P<0.01$;与 CoCl₂ 组相比, ## $P<0.01$;与 Nar+CoCl₂ 组相比, ~ $P<0.01$ 。
Figure 3 Nar 对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响
Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with CoCl₂ group, ## $P<0.01$. Compared with Nar+CoCl₂ group, ~ $P<0.01$.



注:与对照组相比, ** $P<0.01$;与 CoCl₂ 组相比, ## $P<0.01$;与 Nar+CoCl₂ 组相比, ~ $P<0.01$ 。
Figure 4 Nar 对 CoCl₂ 诱导下 H9c2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响
Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with CoCl₂ group, ## $P<0.01$. Compared with Nar+CoCl₂ group, ~ $P<0.01$.



注:与对照组相比, ** $P<0.01$;与 CoCl_2 组相比, ## $P<0.01$;与 $\text{Nar}+\text{CoCl}_2$ 组相比, ~ $P<0.01$ 。

图 5 Nar 对 CoCl_2 诱导下 H9c2 细胞自噬相关蛋白表达的影响

Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with CoCl_2 group, ## $P<0.01$. Compared with $\text{Nar}+\text{CoCl}_2$ group, ~ $P<0.01$.

Figure 5 Effects of Nar on autophagy-related proteins in H9c2 cells induced by CoCl_2

对心肌细胞低氧损伤激活自噬的影响与 PI3K/Akt/mTOR 通路的关系,以 LY294002 阻断 PI3K/Akt 通路,检测自噬相关蛋白 LC3B、Beclin-1 和 P62 表达。与对照组比, CoCl_2 组 LC3B/LC3A 比和 Beclin-1 蛋白表达显著升高, P62 表达降低, Nar 预作用降低 LC3B/LC3A 比和 Beclin-1 蛋白表达, 增加 P62 表达。LY294002 预作用虽然逆转了 Nar 对 CoCl_2 引起 P62 表达降低的影响, 但没有逆转对 LC3B/LC3A 比值和 Beclin-1 表达的影响。表明, Nar 可抑制 CoCl_2 引起的过度自噬, 但不是完全通过 PI3K/Akt/mTOR 通路实现的, 具体机制还需要进一步研究。

3 讨论

IHD 发病率逐年上升, 尤其在老年人群中。诱发 IHD 危险因素很多, 包括高血压、糖尿病、高胆固醇血症、吸烟、过度饮酒和肥胖等^[12-13]。 CoCl_2 是目前模拟细胞低氧损伤常用化学药物之一。本研究发现, CoCl_2 导致 H9c2 心肌细胞生长抑制、核内出现明显凋亡碎片, Nar 预处理改善了细胞生长, 减少凋亡现象, 表明 Nar 对低氧损伤条件下细胞凋亡有抑制作用, 与既往研究结果一致^[9]。

当细胞缺血缺氧时, 线粒体作为快速传感器, 在自由基等作用下膜通透性增加, 线粒体内细胞色素 C 释放到细胞质中, 致使促凋亡蛋白释放和下游 Caspase 家族级联激活^[14-15]。这些蛋白水平的增加构成心肌缺血损伤的基础^[16]。本研究中, 低氧引起心肌细胞中促凋亡蛋白 Bax 上调, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 下调, Bcl-2/Bax 比降低, Cleaved-Caspase-3 蛋白表达升高, Nar 预处理有效改善了这些蛋白表达水平,

进一步说明 Nar 在心肌细胞低氧损伤中有抗凋亡作用。

为了进一步分析 Nar 对心肌细胞低氧损伤影响的机制, 首先利用网络药理学预测 Nar 治疗 IHD 的可能信号通路, 结果显示 PI3K/Akt/mTOR 是最显著富集通路之一。已有研究表明, 激活该通路可以抑制心肌缺血损伤中的凋亡和自噬过程^[11]。因此, 本研究又通过体外实验验证了网络药理学结论, 结果表明, 低氧引起细胞内 PI3K、Akt 和 mTOR 磷酸化水平显著降低, Nar 预处理逆转了这一过程。但当 PI3K 抑制剂 LY294002 特异性阻断 PI3K/Akt 通路后, Nar 对 PI3K、Akt 和 mTOR 磷酸化水平的影响较低氧组明显减轻, 表明 Nar 通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路缓解了心肌细胞低氧损伤, 这与 Qin 等^[17]研究结果一致。LY294002 特异性阻断 PI3K/Akt 通路后抵消了 Nar 对低氧条件下 Cleaved-Caspase-3 表达和 Bcl-2/Bax 比值的影响。表明, Nar 是通过激活 PI3K/Akt/mTOR 通路抑制低氧引起细胞凋亡的。

自噬是细胞的一种生存机制, 负责去除错误折叠或错误组装的蛋白质, 并清除受损细胞器和消除细胞内病原体等^[18]。研究表明, 心肌早期缺血后自噬被激活, 以缺血预处理的方式对心脏起保护作用^[19-20]。而慢性或过度缺氧缺血激活自噬会导致细胞凋亡^[21], 引发心功能障碍, 如急性缺血性心脏损伤和心力衰竭中自噬被过度激活^[22]。本研究中, CoCl_2 激活了自噬, 引起自噬相关蛋白 LC3B/LC3A 比和 Beclin-1 表达升高, P62 表达降低, Nar 预处理后逆转了这些蛋白的表达水平。而阻断 PI3K/

Akt 通路后只抵消了 Nar 对 CoCl_2 引起的 P62 表达的影响,没有抵消对 LC3II/LC3I 比和 Beclin-1 表达的影响。说明,Nar 对 CoCl_2 引起的自噬可能是通过其他途径抑制的,而不是通过 PI3K/Akt/mTOR 通路,有待进一步研究。

综上,Nar 对 CoCl_2 诱导心肌细胞低氧损伤有保护作用,通过激活 PI3K/Akt/mTOR 通路抑制凋亡实现的。凋亡的发生可能与 CoCl_2 诱导的过度自噬有关,Nar 对过度自噬起抑制作用,但 Nar 调控自噬的具体机制还不清楚。另外,本研究仅通过体外实验验证了网络药理学结果,后续还需进行体内实验验证。

参考文献:

- [1] Narula J, Pandey P, Arbustini E, et al. Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(14): 8144-8149.
- [2] Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(2): 124-131.
- [3] Cadenas S, Aragonés J, Landázuri MO. Mitochondrial reprogramming through cardiac oxygen sensors in ischaemic heart disease [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 88(2): 219-228.
- [4] Loos B, Genade S, Ellis B, et al. At the core of survival: autophagy delays the onset of both apoptotic and necrotic cell death in a model of ischemic cell injury [J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317(10): 1437-1453.
- [5] 刘国林, 刘勇, 石晋丽, 等. 甘松新酮的稳定性研究 [J]. *药物分析杂志*, 2015, 35(2): 360-363.
- [6] 钱薇, 邹丽, 王秀秀, 等. 甘松新酮对 SD 大鼠心室肌细胞钠离子通道电流的影响 [J]. *当代医药论丛*, 2019, 17(16): 2-5.
- [7] 简鹏, 李庆海, 范立华. 甘松新酮对快速性心律失常大鼠心肌细胞抑制作用的实验研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(22): 2240-2242.
- [8] Niu C, Xiao F, Yuan K, et al. Nardosinone suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis and attenuates lipopolysaccharide-induced alveolar bone resorption [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 626.
- [9] 李红艳, 赵思涵, 梅显运, 等. 甘松新酮对 H9c2 心肌细胞低氧损伤的作用及其机制 [J]. *华南师范大学学报(自然科学版)*, 2021, 53(2): 51-58.
- [10] Liu Z, Wang F, Zhou ZW, et al. Alisertib induces G_2/M arrest,

apoptosis, and autophagy via PI3K/Akt/mTOR- and p38 MAPK-mediated pathways in human glioblastoma cells [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(3): 845-873.

- [11] Zhang J, Wang C, Yu S, et al. Sevoflurane postconditioning protects rat hearts against ischemia-reperfusion injury via the activation of PI3K/AKT/mTOR signaling [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 7317.
- [12] GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 [J]. *Lancet*, 2016, 388(10053): 1459-1544.
- [13] Charlson FJ, Moran AE, Freedman G, et al. The contribution of major depression to the global burden of ischemic heart disease: a comparative risk assessment [J]. *BMC Med*, 2013, 11:250.
- [14] Ullrich V, Schildknecht S. Sensing hypoxia by mitochondria: a unifying hypothesis involving S-nitrosation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(2): 325-338.
- [15] Zheng JH, Viacava Follis A, Kriwacki RW, et al. Discoveries and controversies in BCL-2 protein-mediated apoptosis [J]. *FEBS J*, 2016, 283(14): 2690-2700.
- [16] Zheng C, Wu Z, Tian L, et al. Long noncoding RNA AK12348 is involved in the regulation of myocardial ischaemia-reperfusion injury by targeting PARP and Caspase-3 [J]. *Heart Lung Circ*, 2018, 27(5): e51-e58.
- [17] Qin L, Fan SX, Jia RB, et al. Ginsenoside Rg1 protects cardiomyocytes from hypoxia-induced injury through the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Pharmazie*, 2018, 73(6): 349-355.
- [18] Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms [J]. *J Pathol*, 2010, 221(1): 3-12.
- [19] Yan WJ, Dong HL, Xiong LZ. The protective roles of autophagy in ischemic preconditioning [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(5): 636-643.
- [20] Matsui Y, Takagi H, Qu X, et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy [J]. *Circ Res*, 2007, 100(6): 914-922.
- [21] Marín-García J, Akhmedov AT. Mitochondrial dynamics and cell death in heart failure [J]. *Heart Fail Rev*, 2016, 21(2): 123-136.
- [22] Costa R, Morrison A, Wang J, et al. Activated protein C modulates cardiac metabolism and augments autophagy in the ischemic heart [J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10(9): 1736-1744.

[收稿日期] 2022-10-20