

## 研究论文

# 黄芩苷介导PI3K/AKT通路减轻脂多糖诱导的 心肌细胞凋亡及炎症反应

靳宜静<sup>1</sup> 李堪董<sup>1</sup> 詹智晖<sup>1</sup> 王勇<sup>2\*</sup><sup>1</sup>海南西部中心医院心血管内科, 儋州 571000; <sup>2</sup>海南西部中心医院神经外科, 儋州 571000)

**摘要** 为探讨黄芩苷对脂多糖(LPS)诱导的大鼠心肌细胞凋亡、炎症及磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)信号通路的调控作用, 该研究体外培养大鼠心肌H9C2细胞, 将其分为对照组(不做干预)、LPS组(10 μg/mL LPS)、实验组(10 μg/mL LPS+10、20、40、80 μmol/L黄芩苷)、黄芩苷+Y组(10 μg/mL LPS+10 μmol/L黄芩苷+5 μmol/L PI3K/AKT通路抑制剂LY294002)、抑制剂组(10 μg/mL LPS+5 μmol/L LY294002)和黄芩苷+A组[10 μg/mL LPS+10 μmol/L黄芩苷+100 ng/mL PI3K/AKT通路激活剂胰岛素样生长因子-I(IGF-I)]。用细胞计数试剂盒-8测定细胞活力; 酶联免疫吸附试验检测炎症因子白细胞介素-1β(IL-1β)、IL-6和IL-10的含量; Hoechst33258染色法测定细胞凋亡率; 5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷测定细胞增殖率; 蛋白免疫印迹法测定PI3K/AKT相关蛋白、细胞周期蛋白D1(CyclinD1)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白表达水平。结果表明, 与对照组相比, LPS组细胞活力显著降低( $P<0.05$ ), 与LPS组相比, 10 μg/mL LPS+10 μmol/L黄芩苷组细胞活力显著升高( $P<0.05$ ), 因此选择10 μmol/L黄芩苷进行后续实验。与对照组相比, LPS组IL-10含量、细胞增殖率、CyclinD1蛋白表达水平显著降低( $P<0.05$ ), IL-6含量、IL-1β含量、细胞凋亡率、Caspase-3、p-PI3K和p-AKT蛋白表达水平显著升高( $P<0.05$ ); 与LPS组相比, 黄芩苷组(即10 μg/mL LPS+10 μmol/L黄芩苷组)和抑制剂组H9C2细胞中上述指标的变化趋势被显著扭转了( $P<0.05$ ); 与黄芩苷组相比, 黄芩苷+Y组IL-10含量、细胞增殖率、CyclinD1蛋白表达水平显著升高( $P<0.05$ ), IL-6和IL-1β含量、细胞凋亡率、Caspase-3、p-PI3K和p-AKT蛋白表达水平显著降低( $P<0.05$ ); 黄芩苷+A组与黄芩苷+Y组指标变化情况相反( $P<0.05$ )。总之, 黄芩苷可通过阻断PI3K/AKT通路的信号转导抑制LPS诱导的大鼠心肌H9C2细胞的凋亡及炎症反应。

**关键词** 心力衰竭; 黄芩苷; 脂多糖; 磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B信号通路; 凋亡; 炎症反应

## Baicalin Mediates PI3K/AKT Pathway to Reduce the Apoptosis and Inflammation of Cardiomyocytes Induced by Lipopolysaccharide

JIN Yijing<sup>1</sup>, LI Kandong<sup>1</sup>, ZHAN Zhihui<sup>1</sup>, WANG Yong<sup>2\*</sup><sup>1</sup>Department of Cardiovascular Medicine, Hainan Western Central Hospital, Danzhou 571000, China;<sup>2</sup>Department of Neurosurgery, Hainan Western Central Hospital, Danzhou 571000, China)

收稿日期: 2023-03-23

接受日期: 2023-08-09

海南省卫生健康行业科研项目(批准号: 21A200325)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13484786001, E-mail: a13484786001@163.com

Received: March 23, 2023

Accepted: August 9, 2023

This work was supported by the Hainan Health Industry Research Project (Grant No.21A200325)

\*Corresponding author. Tel: +86-13484786001, E-mail: a13484786001@163.com

**Abstract** The aim of this study was to explore the regulatory effects of baicalin on apoptosis, inflammation and PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/AKT (protein kinase B) signaling pathway induced by LPS (lipopolysaccharide) in rat cardiomyocytes. Rat myocardial H9C2 cells were cultured *in vitro*. They were divided into control group (no intervention), LPS group (10  $\mu\text{g/mL}$  LPS), experimental group (10  $\mu\text{g/mL}$  LPS+10, 20, 40, 80  $\mu\text{mol/L}$  baicalin) and baicalin+Y group (10  $\mu\text{g/mL}$  LPS+10  $\mu\text{mol/L}$  baicalin+5  $\mu\text{mol/L}$  PI3K/AKT pathway inhibitor LY294002), inhibitor group (10  $\mu\text{g/mL}$  LPS+5  $\mu\text{mol/L}$  LY294002) and baicalin+A group [10  $\mu\text{g/mL}$  LPS+10  $\mu\text{mol/L}$  baicalin+100  $\text{ng/mL}$  PI3K/AKT pathway activator IGF-I (insulin-like growth factor-I)]. Cell viability was measured with cell counting kit-8; the levels of IL-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ ), IL-6 and IL-10 were examined with enzyme-linked immunosorbent assay; the apoptosis rate was determined by Hoechst33258 staining; cell proliferation rate was determined by 5-ethynyl-2'-deoxyuridine; the expression levels of PI3K/AKT-related protein, CyclinD1 protein and Caspase-3 protein were determined by WB (Western blot). The results showed that cell viability in LPS group was significantly lower than that in control group ( $P<0.05$ ), the cell viability of 10  $\mu\text{g/mL}$  LPS+10  $\mu\text{mol/L}$  baicalin group was significantly increased compared with LPS group ( $P<0.05$ ), so 10  $\mu\text{mol/L}$  baicalin was selected for follow-up experiment. The content of IL-10, the rate of cell proliferation and the expression of CyclinD1 protein in LPS group were significantly lower than those in control group ( $P<0.05$ ), the contents of IL-6 and IL-1 $\beta$ , the rate of apoptosis, the expression of Caspase-3, p-PI3K and p-AKT proteins were significantly higher than those in the control group ( $P<0.05$ ); the change trend of the above indexes in H9C2 cells of baicalin group (10  $\mu\text{g/mL}$  LPS+10  $\mu\text{mol/L}$  baicalin group) and inhibitor group was significantly reversed compared with those in LPS group ( $P<0.05$ ); IL-10 content, cell proliferation rate and CyclinD1 protein expression level of baicalin+Y group were significantly increased compared with baicalin group ( $P<0.05$ ), the contents of IL-6 and IL-1 $\beta$ , apoptosis rate, and the protein levels of Caspase-3, p-PI3K and AKT were obviously lowered ( $P<0.05$ ); the change of indexes in baicalin+A group was opposite to that in baicalin+Y group ( $P<0.05$ ). In conclusion, baicalin can inhibit LPS-induced apoptosis and inflammation of H9C2 cells by blocking PI3K/AKT signal transduction.

**Keywords** heart failure; baicalin; lipopolysaccharide; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway; apoptosis; inflammatory response

心力衰竭已成为全球范围内残疾和死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。流行病学研究表明,心力衰竭导致发达国家近三分之一的死亡,发展中国家四分之一的死亡<sup>[2]</sup>。研究发现,凋亡是心肌细胞DNA裂解和坏死的序曲,可引起心肌梗死、心力衰竭、冠状动脉栓塞等心脏疾病中心肌细胞收缩功能障碍<sup>[3]</sup>。可见,过度的细胞凋亡与慢性心脏疾病密切相关。常规西药虽具有较好的治疗效果,但长期用药会导致患者出现较多不良作用。因此,寻找新的有效治疗药物至关重要。中医药具有2 000多年的历史,以其“多靶点、多渠道”的特点越来越受到心血管研究领域的关注。目前,中国冠心病患者倾向于较少使用西药,而更偏向于使用多种类的中药<sup>[4]</sup>。黄芩苷是从黄芩科开花植物黄芩的根中提取的一种单体类黄酮化合物,其具有治疗心血管疾病如动脉粥样硬化、高血压和缺血性心脏病的药理特性<sup>[5]</sup>。其治疗机制可能与抗炎、抗氧化、抗凋亡有关<sup>[6]</sup>。磷脂酰肌醇3-激酶(phosphati-

dylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)信号通路是与细胞凋亡相关的经典细胞信号通路。近年来,许多研究证实该信号通路不仅抑制细胞凋亡,而且在抑制炎症反应和降低脓毒症死亡率方面发挥积极作用<sup>[7]</sup>。有研究表明黄芩苷可通过激活PI3K/AKT/一氧化氮合酶通路促进心脏微血管内皮细胞中一氧化氮生成,减轻心肌缺血再灌注损伤<sup>[8]</sup>。但黄芩苷是否能通过PI3K/AKT信号通路对心肌细胞的凋亡和炎症反应进行调节尚未可知。基于此,本研究探讨黄芩苷对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的心肌细胞凋亡和炎症反应的影响以及对PI3K/AKT信号通路的调控,可为心力衰竭的治疗提供新的理论参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

大鼠心肌细胞H9C2购自河南省工业微生物菌

种工程技术研究中心。黄芩苷、LPS、PI3K/AKT通路抑制剂LY294002、PI3K/AKT通路激活剂胰岛素样生长因子-I(insulin-like growth factor-I, IGF-I)(纯度 $\geq 98\%$ )购自上海源叶生物科技有限公司; DMEM培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Gibco公司; 细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)购自南京诺唯赞生物医药科技有限公司; 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒购自杭州主诺生物技术有限公司; 5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)细胞增殖检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; Hoechst33258染色试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司; 鼠抗人[PI3K、AKT、p-PI3K、p-AKT、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Cysteine aspartate protease-3, Caspase-3)、细胞周期蛋白D1(CyclinD1)及 $\beta$ -actin]、碱性磷酸酶标记的山羊抗鼠IgG或抗兔IgG购自武汉三鹰生物技术有限公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 H9C2细胞培养** 将心肌细胞株H9C2接种于含10% FBS的DMEM培养基中, 并置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>、70%~80%湿度培养箱中培养, 每隔2~3天更换一次培养液, 选取对数期生长细胞用于实验。

**1.2.2 分组与干预** 选取对数期生长的H9C2细胞, 调整密度至 $2 \times 10^5$ 个/mL, 接种到合适的细胞培养板中。将心肌细胞分为对照组、LPS组、实验组、抑制剂组、黄芩苷+Y组和黄芩苷+A组, 对照组细胞不做干预, LPS组以10  $\mu$ g/mL LPS刺激24 h构建体外炎症模型<sup>[9]</sup>; 实验组在LPS组的基础上加入10、20、40、80  $\mu$ mol/L黄芩苷; 黄芩苷组(即10  $\mu$ g/mL LPS+10  $\mu$ mol/L黄芩苷组)在LPS组的基础上加入10  $\mu$ mol/L黄芩苷; 抑制剂组在LPS组的基础上加入5  $\mu$ mol/L PI3K/AKT通路抑制剂LY294002<sup>[10]</sup>; 黄芩苷+Y组在LPS组的基础上, 加入10  $\mu$ mol/L黄芩苷, 同时加入5  $\mu$ mol/L LY294002, 黄芩苷+A组在LPS组的基础上, 加入10  $\mu$ mol/L黄芩苷, 同时加入100 ng/mL PI3K/AKT通路激活剂IGF-I<sup>[11]</sup>。

**1.2.3 CCK-8法测定H9C2细胞活力** 将细胞接种在96孔板中, 每孔接种细胞悬液100  $\mu$ L(含8 000个细胞), 药物干预24 h后, 每孔加入10  $\mu$ L CCK-8溶液进行培养, 2 h后使用酶标仪测450 nm波长处各孔的吸

光度(optical density, *D*)值, 计算细胞活力。细胞活力=(LPS组或实验组*D*值/对照组*D*值) $\times 100\%$ 。

**1.2.4 ELISA法测定H9C2细胞因子表达情况** 细胞分组方法同1.2.2, 干预24 h的细胞, 取各组细胞上清液, 分别遵循白细胞介素-6(interleukin, IL-6)、IL-1 $\beta$ 和IL-10 ELISA试剂盒说明书操作步骤, 测定细胞炎症因子IL-6、IL-1 $\beta$ 和IL-10的含量。

**1.2.5 EdU法测定H9C2细胞增殖率** 药物处理24 h后, 将细胞在37 °C条件下进行EdU孵育2 h, 用4%多聚甲醛于室温固定30 min、0.3% TritonX-100透化10 min, 然后每孔加入100  $\mu$ L Click反应液室温避光孵育30 min; 随后进行常规的Hoechst复染; 装片后, 在荧光显微镜下观察并进行图片采集, 用ImageJ软件对染色细胞进行细胞计数。细胞增殖率=(EdU红色阳性染色细胞/Hoechst蓝色总细胞) $\times 100\%$ 。

**1.2.6 Hoechst33258染色法测定各组H9C2细胞凋亡率** 取各组干预24 h的细胞, PBS缓冲液清洗2次, 用4%多聚甲醛于4 °C条件下固定10 min。PBS冲洗3次, 加入5 mg/L Hoechst33258染色液染色10 min, PBS洗涤细胞3次, 室温封固, 置显微镜下随机取3个视野拍照, 计算细胞凋亡率, 凋亡特征为出现典型的核浓聚、核固缩及核碎裂等现象。细胞凋亡率=(强染色细胞数/总染色细胞数) $\times 100\%$ 。

**1.2.7 蛋白免疫印迹(Western blot, WB)法检测H9C2细胞中增殖、凋亡与PI3K/AKT信号通路相关蛋白的表达水平** 细胞分组同1.2.2, 干预24 h时, 收集各组细胞, 提取蛋白质并进行定量后上样, 凝胶电泳后转膜, 采用5%脱脂牛奶于室温封闭2 h, 加入抗PI3K(1:3 000)、AKT(1:1 000)、p-PI3K(1:1 000)、p-AKT(1:5 000)、Caspase-3(1:2 000)、CyclinD1(1:5 000)、 $\beta$ -actin(1:10 000)的稀释液, 4 °C孵育过夜, 次日用TBST洗涤后加入山羊抗鼠IgG二抗(1:2 000), 室温孵育2 h, 洗涤3次, 最后加入BCIP/NBT染色工作液, 室温避光孵育30 min或更长时间, 直至显色至预期深浅, 染色终止后在凝胶成像系统中进行图片采集。蛋白灰度用ImageJ图像分析软件来确定, 以 $\beta$ -actin为内参, 统计目标蛋白的相对表达量。

## 1.3 统计学分析

用SPSS 26.0软件进行统计分析, 所有数据均以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。多组间比较采用单因素方差分析法, 符合正态分布且方差齐时, 两组间比较Dunnnett's *t*检验; 不符合正态分布时, 采用秩和检验,

用  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。用 GraphPad Prism 8 软件作图, ImageJ 软件计算增殖细胞数、凋亡细胞数和蛋白灰度值。

## 2 结果

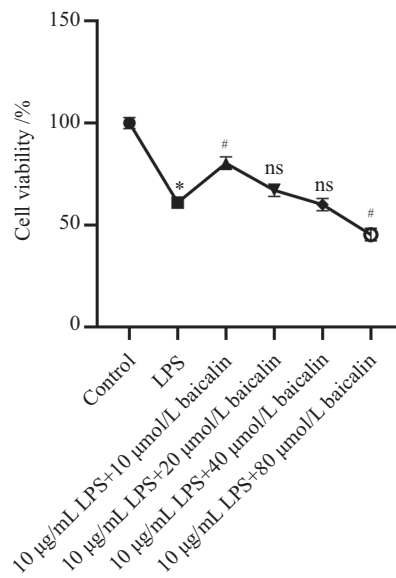
### 2.1 黄芩苷对LPS诱导的H9C2细胞活力的影响

干预 24 h 时, 与对照组比较, LPS 组细胞活力显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与 LPS 组比, 10  $\mu\text{g/mL}$  LPS+10  $\mu\text{mol/L}$  黄芩苷组细胞活力显著升高 ( $P < 0.05$ ), 10  $\mu\text{g/mL}$  LPS+20  $\mu\text{mol/L}$  黄芩苷组和 10  $\mu\text{g/mL}$  LPS+40  $\mu\text{mol/L}$  黄芩苷组细胞活力无

显著性变化 ( $P > 0.05$ ), 10  $\mu\text{g/mL}$  LPS+80  $\mu\text{mol/L}$  黄芩苷组细胞活力显著下降 ( $P < 0.05$ )。因此选择 10  $\mu\text{mol/L}$  黄芩苷进行后续实验(图1)。

### 2.2 黄芩苷对LPS诱导的H9C2细胞炎症反应的影响

如图2所示, 与对照组相比, LPS 组细胞炎症因子 IL-6 和 IL-1 $\beta$  含量显著升高 ( $P < 0.05$ ), IL-10 含量显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与 LPS 组相比, 黄芩苷组和抑制剂组的 IL-6 和 IL-1 $\beta$  含量显著降低 ( $P < 0.05$ ), IL-10 含量显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与黄芩苷组相比, 黄芩苷+Y 组 IL-6 和 IL-1 $\beta$  含量显著降低 ( $P < 0.05$ ), IL-10 含量显著

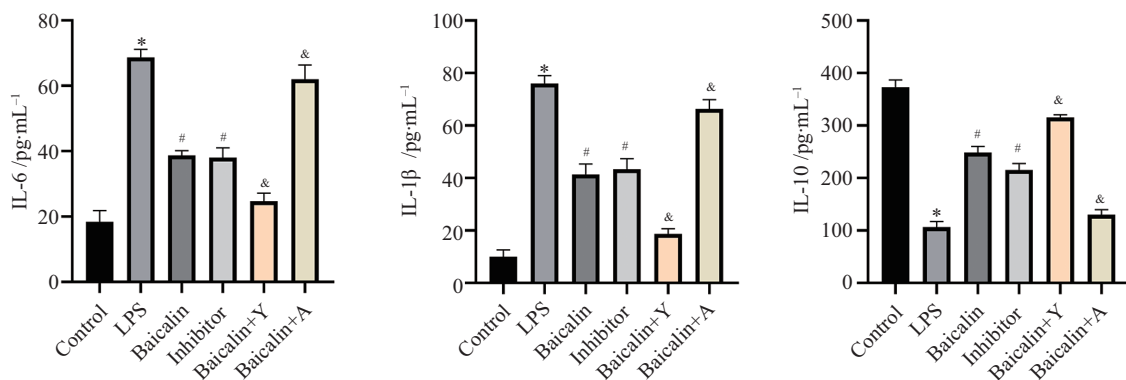


\* $P < 0.05$ , 与对照组相比; # $P < 0.05$ , 与LPS组相比; <sup>ns</sup> $P > 0.05$ , 与LPS组相比。

\* $P < 0.05$  compared with control group; # $P < 0.05$  compared with LPS group; <sup>ns</sup> $P > 0.05$  compared with LPS group.

图1 CCK-8法测定黄芩苷对LPS诱导的H9C2细胞活力的影响

Fig.1 The effect of baicalin on H9C2 cell viability induced by LPS was determined by CCK-8 method



\* $P < 0.05$ , 与对照组相比; # $P < 0.05$ , 与LPS组相比; & $P < 0.05$ , 与黄芩苷组相比。

\* $P < 0.05$  compared with control group; # $P < 0.05$  compared with LPS group; & $P < 0.05$  compared with baicalin group.

图2 ELISA法测定黄芩苷对LPS诱导的H9C2细胞炎症因子的影响

Fig.2 The effect of baicalin on H9C2 cell inflammatory factors induced by LPS was determined by ELISA

升高( $P<0.05$ ); 而黄芩苷+A组的IL-6和IL-1 $\beta$ 含量显著升高( $P<0.05$ ), IL-10含量显著降低( $P<0.05$ )。

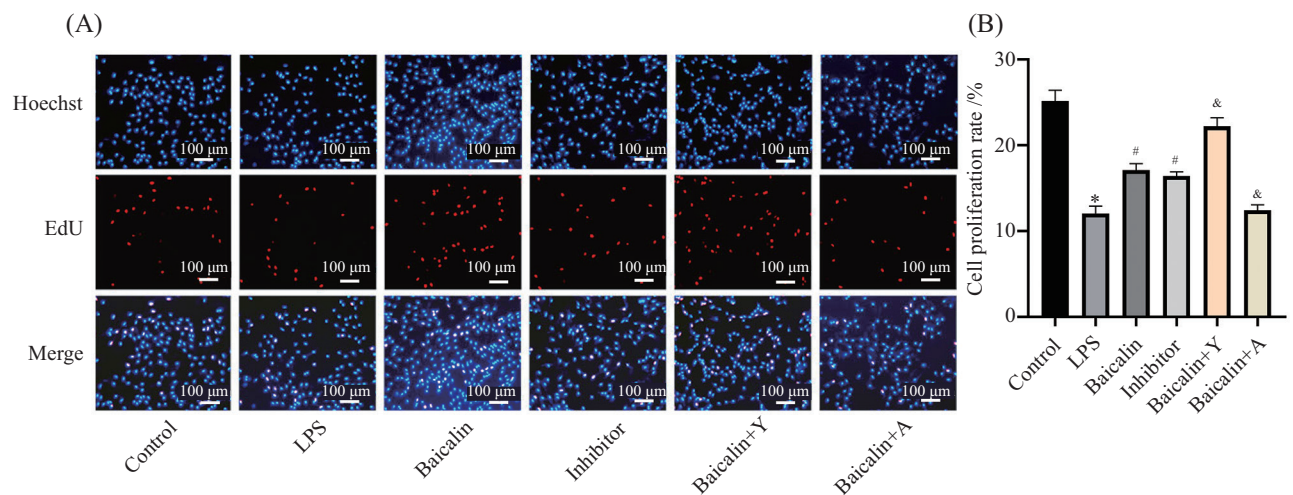
### 2.3 黄芩苷调控PI3K/AKT通路对LPS诱导的H9C2细胞增殖的影响

由图3A可见, LPS组EdU阳性细胞数变少, 黄芩苷处理后EdU阳性细胞数变多。定量后发现, 与对照组相比, LPS组细胞增殖率显著降低( $P<0.05$ ); 与LPS组相比, 黄芩苷组和抑制剂组细胞增殖率显著

升高( $P<0.05$ ); 黄芩苷+Y组细胞增殖率明显高于黄芩苷组, 而黄芩苷+A组细胞增殖率明显低于黄芩苷组( $P<0.05$ , 图3B)。

### 2.4 黄芩苷调控PI3K/AKT通路对LPS诱导的H9C2细胞凋亡的影响

如图4所示, 与对照组相比, LPS组细胞凋亡率显著升高( $P<0.05$ ); 与LPS组相比, 黄芩苷组和抑制剂组细胞凋亡率显著降低( $P<0.05$ ); 与黄芩苷组相比,

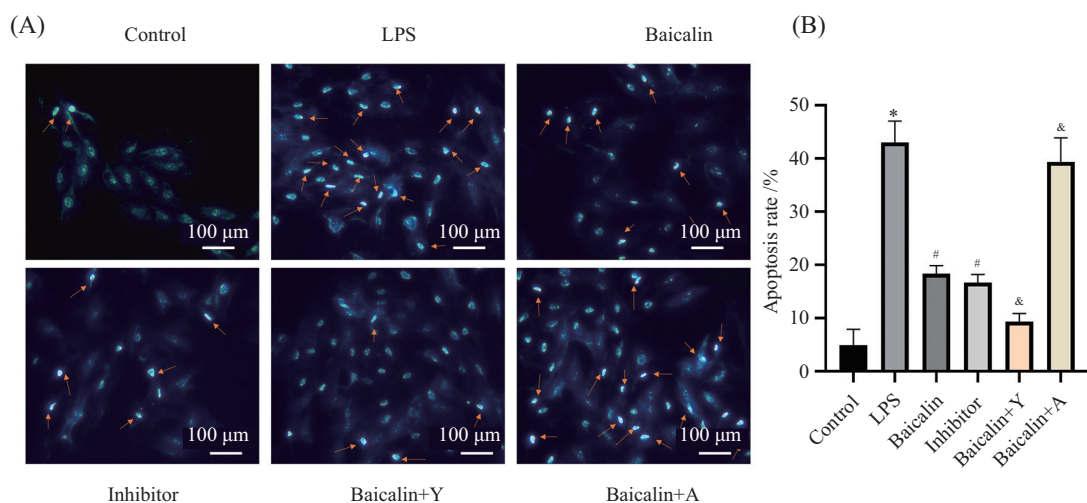


A: 通过EdU法检测不同组别之间H9C2细胞增殖的变化; B: 各组之间细胞增殖的定量分析; \* $P<0.05$ , 与对照组相比; # $P<0.05$ , 与LPS组相比; & $P<0.05$ , 与黄芩苷组相比。

A: the changes of H9C2 cell proliferation between different groups were detected by EdU assay; B: quantitative analysis of cell proliferation between groups; \* $P<0.05$  compared with control group; # $P<0.05$  compared with LPS group; & $P<0.05$  compared with baicalin group.

图3 EdU法检测黄芩苷对LPS诱导的H9C2细胞增殖率的影响

Fig.3 The effect of baicalin on the proliferation rate of H9C2 cells induced by LPS was detected by EdU assay

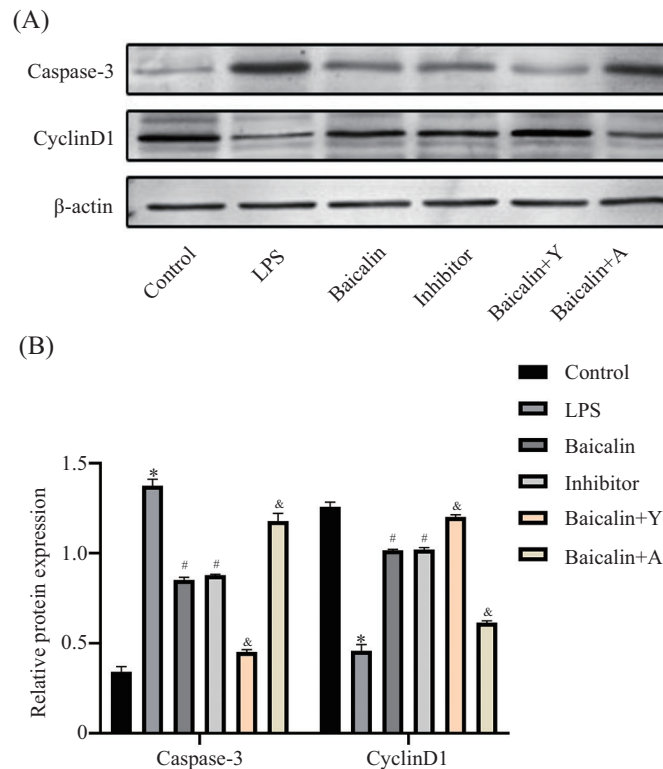


A: 通过Hoechst33258检测不同组别之间H9C2细胞凋亡的变化; B: 各组之间细胞凋亡的定量分析; \* $P<0.05$ , 与对照组相比; # $P<0.05$ , 与LPS组相比; & $P<0.05$ , 与黄芩苷组相比。

A: the apoptosis of H9C2 cells in different groups was detected by Hoechst33258; B: quantitative analysis of apoptosis between groups; \* $P<0.05$  compared with control group; # $P<0.05$  compared with LPS group; & $P<0.05$  compared with baicalin group.

图4 Hoechst33258法检测黄芩苷对LPS诱导的H9C2细胞凋亡率的影响

Fig.4 The effect of baicalin on H9C2 cell apoptosis induced by LPS was detected by Hoechst33258 method



A: H9C2中CyclinD1和Caspase-3蛋白的免疫印迹分析; B: CyclinD1和Caspase-3蛋白量化分析; \* $P < 0.05$ , 与对照组相比; # $P < 0.05$ , 与LPS组相比; & $P < 0.05$ , 与黄芩苷组相比。

A: Western blot analysis of CyclinD1 and Caspase-3 proteins in H9C2; B: quantitative analysis of CyclinD1 and Caspase-3 proteins; \* $P < 0.05$  compared with control group; # $P < 0.05$  compared with LPS group; & $P < 0.05$  compared with baicalin group.

图5 黄芩苷对LPS诱导的H9C2细胞中CyclinD1和Caspase-3蛋白水平的影响

Fig.5 Effects of baicalin on CyclinD1 and Caspase-3 protein levels in LPS-induced H9C2 cells

黄芩苷+Y组细胞凋亡率显著降低( $P < 0.05$ ), 黄芩苷+A组细胞凋亡率显著升高( $P < 0.05$ )。

### 2.5 黄芩苷对LPS诱导的H9C2细胞CyclinD1和Caspase-3蛋白表达的影响

与对照组相比, LPS组CyclinD1蛋白表达量较少, 而Caspase-3蛋白表达量较多( $P < 0.05$ ); 黄芩苷组和抑制剂组CyclinD1蛋白表达量多于LPS组, 而Caspase-3蛋白表达量少于LPS组( $P < 0.05$ ); 黄芩苷+Y组CyclinD1蛋白表达量多于黄芩苷组, 而Caspase-3蛋白表达量少于黄芩苷组( $P < 0.05$ ); 黄芩苷+A组CyclinD1蛋白表达量少于黄芩苷组, 而Caspase-3蛋白表达量多于黄芩苷组( $P < 0.05$ , 图5)。

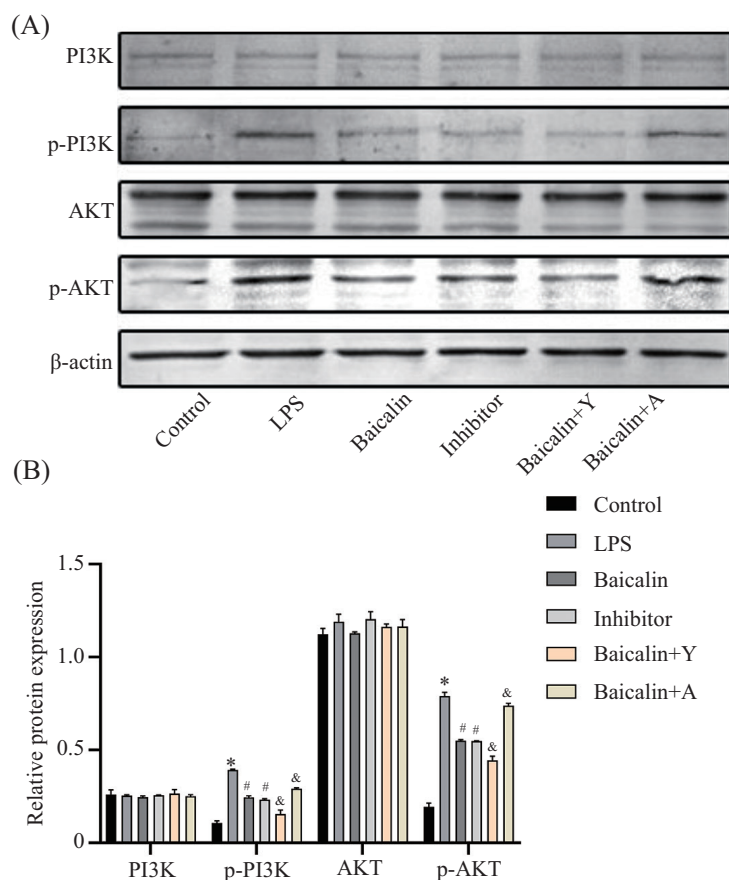
### 2.6 黄芩苷对LPS诱导的H9C2细胞中PI3K/AKT通路相关蛋白表达量的影响

图6结果显示, 各组之间PI3K和AKT蛋白表达水平无显著差异( $P > 0.05$ ); 与对照组相比, LPS组p-PI3K和p-AKT表达水平显著升高( $P < 0.05$ ); 与LPS组相比, 黄芩苷组和抑制剂组p-PI3K和p-AKT表达水

平显著降低( $P < 0.05$ ); 与黄芩苷组相比, 黄芩苷+Y组p-PI3K和p-AKT表达水平显著降低( $P < 0.05$ ), 黄芩苷+A组p-PI3K和p-AKT表达水平显著升高( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

心力衰竭是一种终身性慢性病, 易反复发作且病情多变, 急性心肌梗死、冠心病、高血压以及不同类型的心肌病等多种疾病均可导致心力衰竭<sup>[12]</sup>。心衰患者血液供应受损, 因为衰竭的心脏不能充分泵血。心衰的常规药物是β-肾上腺素能阻滞剂、血管紧张素转换酶抑制剂等, 但其长期使用会导致严重的副作用<sup>[13]</sup>。而中药不仅用途广泛且副作用小, 是治疗慢性心力衰竭的有效药物。心衰患者的前六大证型为阳虚、气虚、血瘀、水滞、阴虚、痰浊。根据中医理论, 心力衰竭的根本功能障碍是长期心气阳虚、气血瘀滞。因此, 中医治疗心力衰竭的原则是有益于心脏的气和暖阳, 特别是通过活血循环来驱散血瘀和驱散肿胀。黄芩苷是从黄芩根中分离



A: H9C2中PI3K/AKT信号通路相关蛋白的免疫印迹分析; B: PI3K/AKT信号通路相关蛋白定量分析; \* $P < 0.05$ , 与对照组相比; # $P < 0.05$ , 与LPS组相比; & $P < 0.05$ , 与黄芩苷组相比。

A: Western blot analysis of PI3K/AKT signaling pathway related proteins in H9C2; B: quantitative analysis of PI3K/AKT signaling pathway related proteins; \* $P < 0.05$  compared with control group; # $P < 0.05$  compared with LPS group; & $P < 0.05$  compared with baicalin group.

图6 黄芩苷对LPS诱导的H9C2细胞中PI3K/AKT信号通路相关蛋白表达的影响

Fig.6 Effect of baicalin on the expression of PI3K/AKT signaling pathway related proteins in H9C2 cells induced by LPS

出来的天然黄酮类化合物, 在治疗炎症性肠病、类风湿性关节炎、自身免疫性肝炎和慢性肝病等方面具有显著的抗炎活性<sup>[14]</sup>。此外研究发现, 黄芩苷在多种心血管疾病中亦可发挥优良的保护作用<sup>[15]</sup>。研究表明, 黄芩苷可减轻心肌缺血炎症损伤<sup>[16]</sup>, 并可改善心力衰竭大鼠心功能及心肌细胞线粒体损伤<sup>[17]</sup>。LPS是革兰阴性细菌细胞壁的外膜成分, 其释放量的多寡决定了机体产生炎症反应的类型, 多项研究表明其可用于诱导制备炎症模型<sup>[18-19]</sup>。本研究结果表明, 与对照组相比, LPS刺激后, 细胞活力显著降低, 与LPS组相比, 10  $\mu\text{g/mL}$  LPS+10  $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷组H9C2细胞活力显著升高, 因此选取10  $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷作为最适浓度进行后续实验。

病理性心脏功能障碍会导致心肌炎症和细胞凋亡<sup>[20]</sup>, 这受AKT的影响, AKT是一种丝氨酸/苏氨酸蛋

白激酶, 也被称为蛋白激酶B<sup>[21]</sup>。AKT是PI3K的效应器, 在心脏发育过程中起重要作用, PI3K/AKT信号通路是与心肌保护相关的经典信号通路。有研究表明, 该通路的激活可通过激活内皮型一氧化氮合酶、介导抗凋亡作用、调节线粒体通透性过渡孔的开放等途径发挥心肌保护作用<sup>[22]</sup>。调控PI3K/AKT信号通路的活化状态可诱发或减轻心肌细胞炎症反应、凋亡及缺氧损伤<sup>[23]</sup>。此外, 朱磊等<sup>[24]</sup>研究结果表明黄芩苷能通过抑制PI3K/AKT信号通路减轻溃疡性结肠炎大鼠炎症反应和细胞凋亡。因此推测, 黄芩苷能通过调控PI3K/AKT信号通路作用于心肌细胞。本文通过探讨黄芩苷对LPS诱导的心肌细胞凋亡和炎症反应的影响以及对PI3K/AKT信号通路的调控, 发现与对照组相比, LPS刺激后IL-10含量、细胞增殖率、CyclinD1蛋白表达量显著降低, IL-6和IL-1 $\beta$ 含量、细

胞凋亡率以及Caspase-3、p-PI3K和p-AKT蛋白表达量显著升高,加入10  $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷处理或PI3K/AKT通路抑制剂显著扭转了这些指标的变化,黄芩苷可以抑制LPS诱导的H9C2细胞的凋亡,促进其增殖,对LPS造成的心肌炎症反应有一定的保护作用,而与黄芩苷组相比,黄芩苷+Y组IL-10含量、细胞增殖率、CyclinD1蛋白表达量显著升高,IL-6和IL-1 $\beta$ 含量、细胞凋亡率、Caspase-3、p-PI3K和p-AKT蛋白表达量显著降低,黄芩苷+A组上述指标的变化趋势相反,证明了黄芩苷对LPS诱导的心肌细胞炎症损伤和凋亡的抑制作用是通过下调PI3K/AKT通路实现的。

综上所述,黄芩苷可抑制LPS诱导的大鼠心肌细胞H9C2细胞凋亡和炎症反应,促进其增殖,其作用机制可能与抑制PI3K/AKT信号通路的活化有关。本研究从细胞功能方面揭示了黄芩苷对LPS诱导的H9C2细胞的作用,表明了黄芩苷对LPS诱导的大鼠心肌细胞损伤的治疗有一定积极效果,并能促进其增殖,但是本文仅在PI3K/AKT信号通路上进行研究,下一步可对其他通路参与心力衰竭的作用进行研究。

### 参考文献 (References)

- [1] GEVAERT A B, KATARIA R, ZANNAD F, et al. Heart failure with preserved ejection fraction: recent concepts in diagnosis, mechanisms and management [J]. *Heart*, 2022, 108(17): 1342-50.
- [2] GOLDSBOROUGH E 3rd, OSUJI N, BLAHA M J. Assessment of cardiovascular disease risk: a 2022 update [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2022, 51(3): 483-509.
- [3] 杨梦, 李琳, 钟森杰, 等. 中药干预慢性心力衰竭心肌细胞凋亡的研究进展[J]. *生命的化学* (YANG M, LI L, ZHONG S J, et al. Research progress of traditional Chinese medicine interfering cardiomyocyte apoptosis in chronic heart failure [J]. *Chemistry of Life*), 2021, 41(4): 724-33.
- [4] ZHANG S, ZHENG H, LIU X, et al. Eight years follow-up of a patient with triple vessel disease patient complicated with heart failure without invasive intervention for home-based exercise rehabilitation combined traditional Chinese medicine: a case report [J]. *Clin Case Rep*, 2022, 10(6): e5974.
- [5] LI L, LU H, ZHANG X, et al. Baicalein acts against candida albicans by targeting eno1 and inhibiting glycolysis [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(4): e0208522.
- [6] DAI H, ZHANG X, YANG Z, et al. Effects of baicalin on blood pressure and left ventricular remodeling in rats with renovascular hypertension [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 2939-48.
- [7] HE X, LI Y, DENG B, et al. The PI3K/AKT signalling pathway in inflammation, cell death and glial scar formation after traumatic spinal cord injury: mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *Cell Prolif*, 2022, 55(9): e13275.
- [8] BAI J, WANG Q, QI J, et al. Promoting effect of baicalin on nitric oxide production in CMECs via activating the PI3K-AKT-eNOS pathway attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Phytomedicine*, 2019, 63: 153035.
- [9] 陈冲. 细粒棘球蚴囊液体外保护脂多糖诱导大鼠心肌细胞H9C2损伤的效果评价及机制研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2020.
- [10] 伍龙玫, 刘春艳. 姜黄素调控PI3K/Akt信号通路抑制H9C2心肌细胞的炎症损伤[J]. *上海中医药杂志* (WU L Z, LIU C Y. Curcumin inhibits inflammatory injury in H9C2 cardiac myocytes through regulating PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine*), 2018, 52(7): 75-9.
- [11] 王静, 徐萍, 杨志文, 等. PI3K/AKT激动剂和抑制剂对巨噬细胞炎症反应的影响[J]. *胃肠病学* (WANG J, XU P, YANG Z W, et al. Effect of agonist and inhibitor of PI3K/AKT on inflammatory response in macrophages [J]. *Chinese Journal of Gastroenterology*), 2017, 22(2): 82-6.
- [12] LEHNART S E. Understanding the physiology of heart failure through cellular and *in vivo* models-towards targeting of complex mechanisms [J]. *Exp Physiol*, 2018; 98: 622-8.
- [13] WRITING C M, YANCY C W, JESSUP M, et al. 2016 ACC/AHA/HFSA focused update on new pharmacological therapy for heart failure: an update of the 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the american college of cardiology/american heart association task force on clinical practice guidelines and the heart failure society of america [J]. *Circulation*, 2016, 134(13): e282-e93.
- [14] CHANGLE Z, CUILING F, FENG F, et al. Baicalin inhibits inflammation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury toll like receptor-4/myeloid differentiation primary response 88/nuclear factor-kappa B signaling pathway [J]. *J Tradit Chin Med*, 2022, 42(2): 200-12.
- [15] LI M, REN C. Exploring the protective mechanism of baicalin in treatment of atherosclerosis using endothelial cells deregulation model and network pharmacology [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2022, 22(1): 257.
- [16] XU M, LI X, SONG L. Baicalin regulates macrophages polarization and alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury via inhibiting JAK/STAT pathway [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 655-63.
- [17] 邓斌, 张静思, 符史健, 等. 黄芩苷对心力衰竭大鼠心功能、心肌细胞线粒体损伤和凋亡的影响[J]. *沈阳药科大学学报* (DENG B, ZHANG J S, FU S J, et al. Effects of baicalin on cardiac function, mitochondrial damage and apoptosis of myocardial cells in rats with heart failure [J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*), 2022, 39(3): 269-76.
- [18] 符洪铤, 梁丽明. miR-877靶向TRIM72调控脂多糖诱导的大鼠心肌细胞炎症反应和细胞凋亡[J]. *中国老年学杂志* (FU H D, LIANG L M. miR-877 targeting TRIM72 regulates lipopolysaccharide-induced inflammation and apoptosis of rat cardiomyocytes [J]. *Chinese Journal of Gerontology*), 2020, 40(18): 3950-5.
- [19] 陈瑜, 张永珍, 王永强, 等. miR-195缓解脂多糖诱导的H9c2心肌细胞凋亡、氧化应激及炎症反应[J]. *免疫学杂志* (CHEN Y, ZHANG Y Z, WANG Y Q, et al. miR-195 relieves lipopolysaccharide-induced apoptosis, oxidative stress and inflammatory response in H9c2 cardiomyocytes [J]. *Immunological Journal*), 2022, 38(2): 132-8.
- [20] LI H, TRAGER L E, LIU X, et al. IncExACT1 and DCHS2 regulate physiological and pathological cardiac growth [J]. *Circulation*, 2022,



- 145(16): 1218-33.
- [21] QIN W, CAO L, MASSEY I Y. Role of PI3K/Akt signaling pathway in cardiac fibrosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(11): 4045-59.
- [22] LIU C, TANG M, ZHANG X, et al. Knockdown of miR-665 protects against cardiomyocyte ischemia/reperfusion injury-induced ROS accumulation and apoptosis through the activation of Pak1/Akt signaling in myocardial infarction [J]. *Int Heart J*, 2020, 61(2): 347-54.
- [23] ZHAO L, YANG X R, HAN X. MicroRNA-146b induces the PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B signaling pathway to reduce vascular inflammation and apoptosis in myocardial infarction by targeting PTEN [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(2): 1171-81.
- [24] 朱磊, 沈洪, 顾培青, 等. 黄芩苷对溃疡性结肠炎模型大鼠炎症反应、凋亡的影响及与PI3K/AKT通路的关系 [J]. *中华中医药杂志*(ZHU L, SHEN H, GU P Q, et al. Effects of baicalin on the inflammation and apoptosis in ulcerative colitis rats relating to PI3K/AKT pathway [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*), 2017, 32(9): 4001-4.