

基于 PI3K/Akt/Beclin-1 信号通路探析积雪草苷对 OGD/R 诱导损伤 H9C2 心肌细胞的影响

曹 策^{1,2}, 李玲美², 韩 笑², 王奥奥², 王紫艳², 李 磊², 刘建勋^{1,2*}

(1. 广东药科大学中医药研究院, 广东 广州 510006; 2. 中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 中药药理北京市重点实验室, 国家中医心血管病临床医学研究中心, 北京 100091)

摘要: 观察积雪草苷 (asiaticoside, Ass) 对氧糖剥夺/再复 (oxygen and glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 损伤的 H9C2 心肌细胞的增殖、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/Bcl-2 同源结构域蛋白 (Beclin-1) 信号通路的干预作用, 探讨其对 H9C2 心肌细胞的影响。选用 H9C2 心肌细胞作为研究对象, 采用细胞增殖与活性检测试剂盒 (CCK-8) 法检测 H9C2 细胞活性。将 H9C2 细胞分成对照组、OGD/R 组、Ass 低浓度组 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、Ass 高浓度组 ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 Ass 高浓度+氯喹组 ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。对照组于正常条件下培养, 其余各组在处理后进行氧糖剥夺 4 h/再复 2 h。酶联免疫吸附法检测细胞上清液中天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate transaminase, AST)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶 (creatinase, CK) 的含量; 免疫荧光观察药物对细胞数量的影响; 自噬染色检测试剂盒观察细胞自噬; 分子对接技术确定 Ass 分子靶点; 蛋白质印迹法检测 PI3K、Akt、选择性自噬接头蛋白 (P62)、Beclin-1 的表达水平。与 OGD/R 组相比, Ass 各组在 $10\sim 80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 具有保护作用, AST、LDH 和 CK 的含量均降低, PI3K、Akt、P62 和 Beclin-1 蛋白表达水平降低。与 Ass 组相比, Ass 高浓度 + 氯喹组的 AST、LDH 和 CK 的含量均降低, PI3K、Akt、Beclin-1 和 P62 蛋白表达水平均降低。免疫荧光显示抑制剂组、各给药组与模型组相比均具有不同程度的保护作用。综上所述, 积雪草苷能够降低 OGD/R 诱导的 H9C2 心肌细胞损伤, 降低 AST、LDH、CK 含量和 P62 蛋白水平, 减少细胞自噬, 这可能与抑制 PI3K/Akt/Beclin-1 信号通路激活密切相关。

关键词: 积雪草苷; 心肌细胞; 自噬; PI3K/Akt/Beclin-1; 氧糖剥夺/再复

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)05-1149-07

Effect of asiaticoside on OGD/R induced injury of H9C2 cardiomyocytes based on PI3K/Akt/Beclin-1 signaling pathway

CAO Ce^{1,2}, LI Ling-mei², HAN Xiao², WANG Ao-ao², WANG Zi-yan², LI Lei², LIU Jian-xun^{1,2*}

(1. Institute of Chinese Medicine Sciences, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. National Clinical Research Center of Traditional Chinese Medicine for Cardiovascular Diseases, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Chinese Materia Pharmacology, Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, Beijing 100091, China)

Abstract: In order to investigate the effects of asiaticoside (Ass) on H9C2 cardiomyocytes, the present study examined the potential intervention of Ass on the proliferation and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/Bcl-2 homology domain protein (Beclin-1) signaling pathway in H9C2 cardiomyocytes following oxygen and glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) injury. H9C2 cardiomyocytes were selected as the research

收稿日期: 2022-10-28; 修回日期: 2023-02-02.

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (82030124, 82174015); 中国中医科学院科技创新工程 (CI2021A04609); 国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万”人才工程 (岐黄工程) 岐黄学者.

*通讯作者 Tel: 86-10-62835601, E-mail: liujx0324@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1132

objects, and the activity of H9C2 was detected by cell counting kit-8 (CCK-8). H9C2 cells were divided into control group, OGD/R group, Ass low concentration group ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), Ass high concentration group ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and Ass high concentration + chloroquine group ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). The control group was cultured under normal conditions, and the other groups were treated with oxygen and glucose deprivation for 4 h and reperfusion for 2 h. The activity and content of aspartic aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK) in the supernatant of H9C2 cardiomyocytes were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Autophagy staining assay kit with monodansylcadaverine (MDC) method to observe cellular autophagy; molecular docking technique to identify the molecular targets of Ass. Immunofluorescence was used to observe the effect of the drug on cell number. The expression levels of PI3K, Akt, selective autophagy adaptor protein (P62) and Beclin-1 were detected by Western blot. Compared with OGD/R group, Ass group had a protective effect from $10\text{--}80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, and the activities and contents of AST, LDH and CK were decreased. The protein expression levels of PI3K, Akt, P62 and Beclin-1 were decreased. Compared with the administration group, the activities and contents of AST, LDH and CK in Ass high-concentration + chloroquine group were significantly decreased, and the protein expression levels of PI3K, Akt, Beclin-1 and P62 were significantly decreased. Immunofluorescence showed that the inhibitor group and each administration group had different degrees of protective effect compared with the model group. Asiaticoside can reduce the injury of H9C2 cardiomyocyte induced by OGD/R, reduce the content of AST, LDH and CK, reduce the expression level of P62 protein, and reduce autophagy, which may be closely related to the inhibition of PI3K/Akt/Beclin-1 signaling pathway activation.

Key words: asiaticoside; cardiomyocyte; autophagy; PI3K/Akt/Beclin-1; oxygen and glucose deprivation/reperfusion

冠心病是一种众所周知的缺血性心脏病,其特征是高发病率和死亡率,主要是由于冠脉循环改变,造成冠状动脉血流障碍和心肌能量代谢失衡等,进而导致的心肌损伤疾病,临床表现以休克、心律失常、心绞痛和心力衰竭为主,对机体造成了极大的健康威胁^[1,2]。在缺血区实现血流灌注再恢复是治疗冠心病最为有效和直接的方法,但是由于血流再次恢复而造成的梗死面积增加、心肌损伤程度加重,甚至心功能不全等也是无法忽视的问题^[3]。心肌缺血再灌注损伤的发病机制包括自噬、凋亡、氧化应激、钙超载和炎症反应等,其中,缺血再灌注区域出现的心肌细胞自噬是心肌缺血再灌注损伤中的重要机制之一^[4,5]。适度的自噬可以通过降解非必要物质来保护细胞自身,但是过度自噬会导致细胞大量死亡,因此,如何调控缺血再灌注损伤后心肌细胞的自噬是临床治疗的重点之一。氧糖剥夺/再复 (oxygen and glucose deprivation/reperfusion,

OGD/R) 模型是模拟临床缺血再灌注损伤的典型细胞模型,通过 OGD/R 来实现缺血/再灌注损伤,从而在体外层面充分模拟体内心肌梗死环境。

积雪草苷 (asiaticoside, Ass) 为中草药积雪草五环三萜皂苷类提取物,分子结构式如图 1 所示,在瘢痕修复、肌肤创伤等方面具有良好效果,以往研究报道显示其具有良好的抗纤维化作用^[6-10]。此外,有相关研究表明积雪草苷可以改善微血管循环、提高缺血期的血供,但 Ass 对于心肌细胞的保护作用还尚未有相关深入研究。本研究旨在通过建立体外缺血再灌注损伤模型,探究 Ass 对于 OGD/R 模型诱导损伤的 H9C2 心肌细胞的影响,为缺血性心脏病的干预治疗提供新的途径和药物。

材料与方法

材料 大鼠 H9C2 心肌细胞购于北京协和医学院细胞实验中心。积雪草苷 (约 20 mg, 110892-202006,

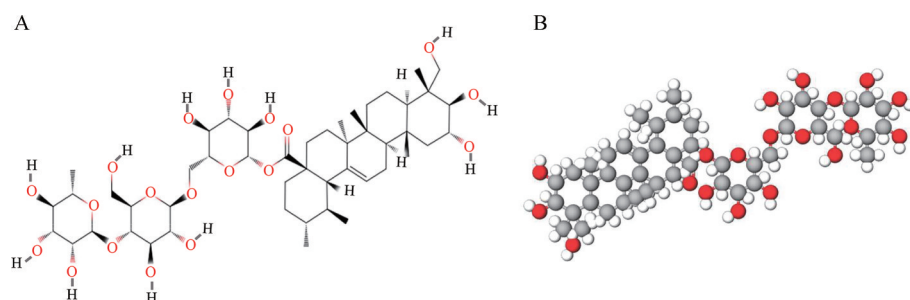


Figure 1 The 2D (A) and 3D (B) molecular formula of asiaticoside (Ass)

2~8 °C保存, 中国食品药品检定研究院); DMEM高糖培养基 (8117283)、DMEM无糖培养基 (1897256)、胎牛血清 (10099-141) (美国Invitrogen公司); 氯喹 (chloroquine, CQ, 095m14016V, 美国Sigma-Aldrich公司); DMSO (3483C285, 美国Amresco公司); PBS缓冲液 (P1020-500)、抗荧光衰减封片剂 (含DAPI, S2110) (北京Solarbio公司); Cell Counting Kit-8 (TR689, 日本Dojindo公司); 10×电泳缓冲液 (322S15079628)、10×电转移缓冲液 (转膜液) (322S10079520) (北京华兴博创基因技术有限公司); Nkx2.5 抗体 (GR3402898-2)、 β -actin 抗体 (GR3206282-1) (英国Abcam公司); PI3K 抗体 (00105490)、Akt 抗体 (10022173)、Beclin-1 抗体 (10008909)、P62 抗体 (00114353) (美国Proteintech公司); Dylight 488 goat anti-rabbit IgG (A23220, 武汉Abbkine公司); 谷草转氨酶天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate transaminase, AST) 试剂盒 (JL21297-96T)、肌酸激酶 (creatine kinase, CK) 试剂盒 (JL46377-96T)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒 (JL13677-96T) (上海江莱生物科技有限公司)。

细胞培养 取冻存于液氮中的H9C2细胞, 置37 °C水浴中解冻, 将细胞转移至离心管, 加入含10% FBS高糖DMEM的培养基4 mL, 充分混合, 1 000 r·min⁻¹离心5 min, 沉淀用完全培养基5 mL重悬于37 °C、5% CO₂的条件下静置培养, 24 h后换液, 待细胞达到80%融合时, 0.25%胰蛋白酶消化传代, 完全培养液重悬, 调节每毫升细胞数至0.5×10⁵~1×10⁵个接种于细胞培养瓶或96孔板内。复苏细胞稳定3代后, 用于实验。

分组及OGD/R模型建立 实验分为空白对照(N)组, 模型组(M), 给药组分Ass低、高浓度组(L、H, 10、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和Ass高浓度+氯喹组(CQ, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。取接种于细胞板或细胞瓶中的细胞, 弃旧培养基, PBS洗板/孔两次之后, 空白对照组更换成DMEM完全培养基后, 放回37 °C、5% CO₂的培养箱中培养6 h; 模型组更换成低氧处理过的无糖DMEM培养基, 给药组换成低氧处理过的含药无糖DMEM培养基后, 将细胞放进充入氮气的缺氧盒中密闭培养4 h, 缺氧结束后, 每瓶/孔加入葡萄糖, 使葡萄糖终浓度为4.5 g·L⁻¹, 置于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养2 h。给药组在氧糖剥夺时加入不同浓度的受试药物(受试药物为无糖DMEM培养基配制), 其余操作同模型组。实验结束后, 收集细胞或细胞上清进行检测。

细胞计数试剂法测定细胞活力 取对数生长期的H9C2心肌细胞, 以每孔4 000个细胞的密度接种于96孔板中, 按“分组及OGD/R模型建立”方法进行分组和处置, 重复3次, 每次每组设置6个复孔。待细胞经

OGD/R处理不同时间后, 每孔加入CCK-8溶液10 μL , 同时设置无细胞但含有相应量细胞培养基和CCK-8溶液的孔作为空白对照, 随后将培养板放置于37 °C细胞培养箱中, 继续孵育2 h后分别用酶标仪检测。用酶标仪在450 nm处测定吸光度(A)值。细胞活力(%) = $[(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白对照}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白对照}})] \times 100\%$ 。

细胞上清液AST、CK、LDH检测 取对数生长期的H9C2细胞, 按“分组及OGD/R模型建立”方法进行分组和处置, 重复3次, 每次每组设置6个复孔。待细胞经OGD/R实验处理结束后, 收集细胞上清液, 按照试剂盒说明书分别检测CK、AST和LDH水平。

免疫荧光法检测细胞保护作用 取对数生长期的H9C2细胞, 按“分组及OGD/R模型建立”方法进行分组和处置。使用胰酶消化细胞后重悬细胞于完全培养基中, 充分吹打, 使之成单细胞悬液, 选择合适的细胞密度种入培养板内。待48 h后, 吸出培养基, PBS洗涤3次。加入4%多聚甲醛(PBS配置)固定20 min。除去多聚甲醛, PBS洗涤3次。加入1% Triton X-100 (PBS配制), 室温通透20 min。除去Triton X-100, PBS洗涤3次。用5%的与二抗同源的血清封闭30 min。加入已配制好的适宜浓度的一抗, 4 °C过夜。除去一抗, PBS洗涤3次。滴加足够量的适宜浓度的二抗孵育1.5 h, 除去二抗, PBS洗涤3次。用吸水纸吸干爬片上的液体, 向载玻片滴加一滴含有DAPI的抗荧光淬灭剂的封片剂, 荧光显微镜下观察并随机采集一张图像进行计数。重复3次以上步骤。

细胞自噬染色检测 取对数生长期的H9C2细胞, 按“分组及OGD/R模型建立”方法进行分组和处置。使用胰酶消化细胞后重悬细胞于完全培养基中, 充分吹打, 使之成单细胞悬液, 选择合适的细胞密度种入培养板内。待48 h后, 吸出培养基, 每孔加入相应自噬染色检测试剂盒(丹酰戊二胺法, monodansylcadaverine, MDC)染色液, 置于细胞培养箱中37 °C避光孵育30 min, 吸尽MDC染色液, 使用Assay Buffer洗涤3次, 吸尽Assay Buffer, 再加入Assay Buffer, 在荧光显微镜下用紫外激发光激发, 观察绿色荧光, 激发波长为335 nm。

分子对接 从Protein Date Bank数据库中下载对应靶点的蛋白结构文件, PubChem数据库中下载小分子的结构文件, 采用Autodock vina 1.1.2软件进行分子对接, 稳定构象为每个对接结果能最低的构象, 使用PyMOL 2.2.0软件绘制图像。

蛋白质印迹法检测PI3K、Akt、Beclin-1和P62自噬相关蛋白 取对数生长期的H9C2细胞, 按“分组及OGD/R模型建立”方法进行分组和处置。待细胞经OGD/R实验处理结束后, 弃上清液, 常温PBS洗涤

3遍,裂解并收集细胞,BCA法蛋白定量后,加5×蛋白上样缓冲液置于沸水中10 min使蛋白充分变性。取等量蛋白样品上样,SDS-PAGE分离后,将蛋白转印至PVDF膜,5% BSA封闭1 h,加入对应一抗,置于4 °C冰箱中摇床上孵育过夜。TBST洗涤3次,辣根过氧化物酶标记二抗(1:50 000),室温孵育2 h, TBST洗涤3次,使用超敏感型化学发光试剂显色,采用Image Lab系统拍摄成像,Image J软件进行灰度值分析。同时,以β-actin的蛋白表达水平为内参参照。每个蛋白均重复实验3次。

统计学处理 用SPSS 26.00软件进行统计分析,用Graphpad Prism 9软件进行做图。计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据比较用单因素方差分析,组间两两比较用*t*检验。

结果

1 Ass对OGD/R诱导H9C2细胞具有保护作用

OGD/R损伤后H9C2细胞活力结果显示,A值显著降低,与正常组相比具有统计学差异($P < 0.01$),提示细胞损伤严重。各组H9C2细胞经药物处理后A值升高,与模型组相比,10、20和40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 具有统计学差异($P < 0.05$),80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 具有显著差异($P < 0.01$),提示Ass对氧糖剥夺再复后细胞具有保护作用(图2)。因此,Ass在10~80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度区间具有保护作用,且Ass在80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 保护作用最明显。

2 氯喹降低OGD/R对H9C2细胞的损伤

OGD/R损伤后H9C2细胞活力结果显示,A值显著降低,与正常组相比具有统计学差异($P < 0.01$),提示细胞损伤严重。各组H9C2细胞经氯喹处理后,A值升高,与模型组相比,氯喹在10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时具有统计学差异($P < 0.05$),在25、50、200、400、800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 具有显著差异($P < 0.01$),对OGD/R损伤的细胞具有保护作用

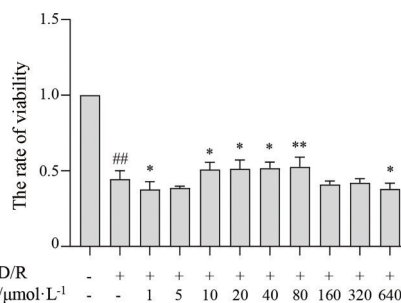


Figure 2 The protective effects of Ass in H9C2 cells injured by oxygen and glucose deprivation/reperfusion (OGD/R). $n = 6, \bar{x} \pm s$. ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs OGD/R group

(图3)。本结果表明,氯喹在10~50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度区间具有保护作用,并且在50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 保护作用最明显。

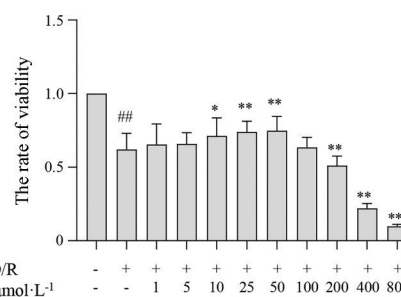


Figure 3 The protective effects of chloroquine (CQ) in H9C2 cells injured by OGD/R. $n = 6, \bar{x} \pm s$. ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs OGD/R group

3 Ass提高OGD/R诱导后H9C2细胞数量

为了检测Ass对于OGD/R诱导H9C2细胞的保护作用,本实验采用DAPI与Nkx2.5进行心肌细胞荧光染色。Nkx2.5为一种心肌细胞特异性标志物,在心脏中只表达于心肌细胞。与正常组相比,模型组中细胞数量降低($P < 0.05$);与模型组相比,L组、H组与H组+CQ组存活的心肌细胞数量明显上升($P < 0.01$),说明Ass对于心肌细胞具有一定程度的保护作用(图4)。

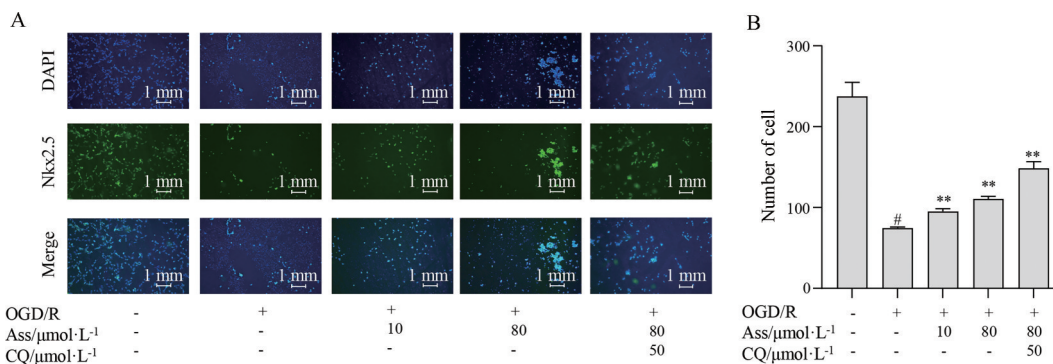


Figure 4 Dual fluorescence staining of Nkx2.5 and DAPI revealed that Ass increased the number of H9C2 cells after OGD/R induction. A: The immunofluorescence of Ass in H9C2 cells injured by OGD/R. Scale bar = 1 mm; B: The number of H9C2 cells injured by OGD/R. $n = 3, \bar{x} \pm s$. [#] $P < 0.05$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs OGD/R group

4 Ass降低OGD/R诱导H9C2细胞CK、AST、LDH水平

根据化学发光试剂盒检测结果显示,与正常组相比,模型组CK、AST、LDH显著升高,具有显著差异($P < 0.01$);与OGD/R组相比,Ass各组CK、AST、LDH水平降低,均具有统计学差异($P < 0.01$)。该结果表明,Ass可以降低心肌细胞中CK、LDH和AST含量水平(图5)。

5 Ass降低OGD/R诱导H9C2细胞的自噬反应

自噬染色检测试剂盒中的MDC可以通过离子捕获特异性地结合膜脂,从而特异性标记自噬。根据试剂盒自噬染色结果显示,OGD/R组相较于正常组的自噬小体增加;与OGD/R组相比,给药组各组自噬情况均具有不同程度的降低(图6)。

6 Ass对OGD/R诱导H9C2细胞自噬相关蛋白表达的影响

如图7结果所示,与正常组相比,OGD/R组的PI3K、Akt、Beclin-1和P62的蛋白表达水平均升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与OGD/R组相比,除L组外,H组与H组+CQ组Akt蛋白表达水平均降低($P < 0.01$),PI3K、Beclin-1和P62的蛋白表达水平在各组中均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

7 积雪草苷分子对接

积雪草苷分子对接结果如图8所示,积雪草苷的氧原子可以和Beclin-1第6位精氨酸结合形成一个较强氢键(1.9 Å),与Beclin-1第11位天冬氨酸形成两个较强氢键(2.2和2.3 Å),与Beclin-1第87位赖氨酸形成两个较强氢键(2.3和2.4 Å)。

讨论

目前,冠心病的治疗已取得较大进步,但梗死后的心肌无法进行再生或再生能力有限,心肌细胞数量减少,导致心肌结构完整性遭到破坏,心肌梗死及其导致的心力衰竭等心血管疾病将持续危害人类生命健康^[11]。缺血引起以心肌细胞为中心的心肌超微结构、能量代谢、心功能和电生理一系列损伤性变化,再灌注是恢复心肌细胞功能的首要方案。但是,再灌注时血流恢复的同时也会造成进一步的损伤,甚至抵消再灌注带来的益处,发生更严重的心律失常和猝死现象^[12]。OGD/R是在体外实验中较为充分地模拟冠心病的临床模型。此外,既往研究^[6,13]表明,Ass可明显减小左心及全心心肌梗死面积,具有浓度依赖性,能明显改善心功能,作用特点在于对血压和心率无影响。Ass可明显减少心肌细胞凋亡,可能具有抗凋亡活性,但是Ass对于心肌细胞自噬方面的机制研究尚且不清。因此,本实验设计通过采用H9C2心肌细胞,构建OGD/R模型模拟临床冠心病,来探索OGD/R后Ass对于H9C2细胞自噬的调控作用,进而从另一角度诠释Ass保护冠心病后心肌细胞的具体机制。

首先,本研究通过OGD/R模型模拟临床缺血再灌注损伤,Ass预给药处理发现,Ass在 $10 \sim 80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度区间具有保护作用,并且在 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 保护作用最明显,因此后续研究选取 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为本实验的低浓度组, $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为高浓度组。此外,本课题组通过免疫荧光实验发现,与模型组相比,Ass低浓度组、Ass高浓度组与Ass高浓度+氯喹组存活的心肌细

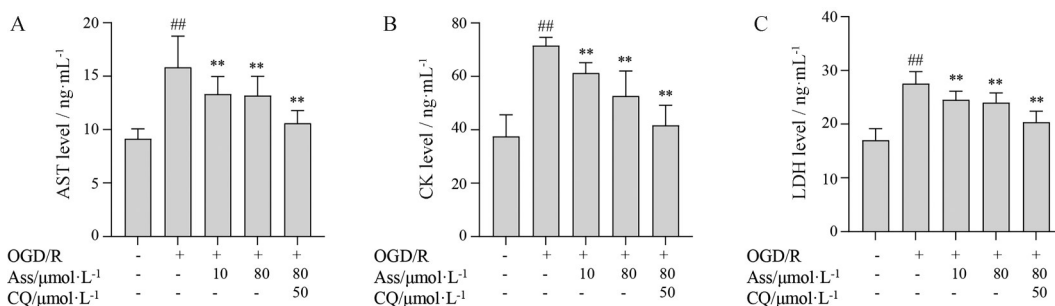


Figure 5 Effects of Ass on the levels of aspartate transaminase (AST, A), creatine kinase (CK, B), and lactate dehydrogenase (LDH, C) in H9C2 cells induced by OGD/R. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ## $P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs OGD/R group

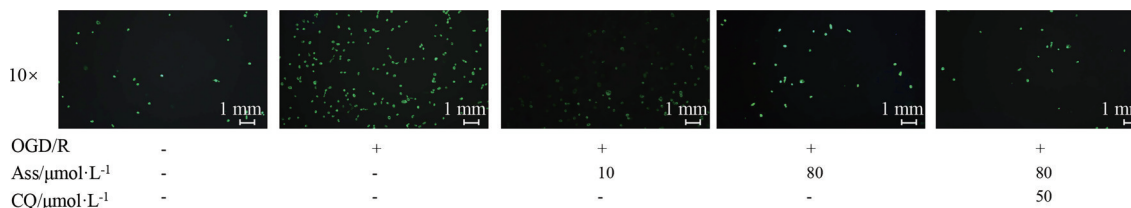


Figure 6 Effects of Ass on autophagy in H9C2 cells induced by OGD/R. Monodansylcadaverine (MDC) can specifically bind membrane lipids by ion trapping, thus specifically labeling autophagic vesicles appearing as green. Scale bar = 1 mm

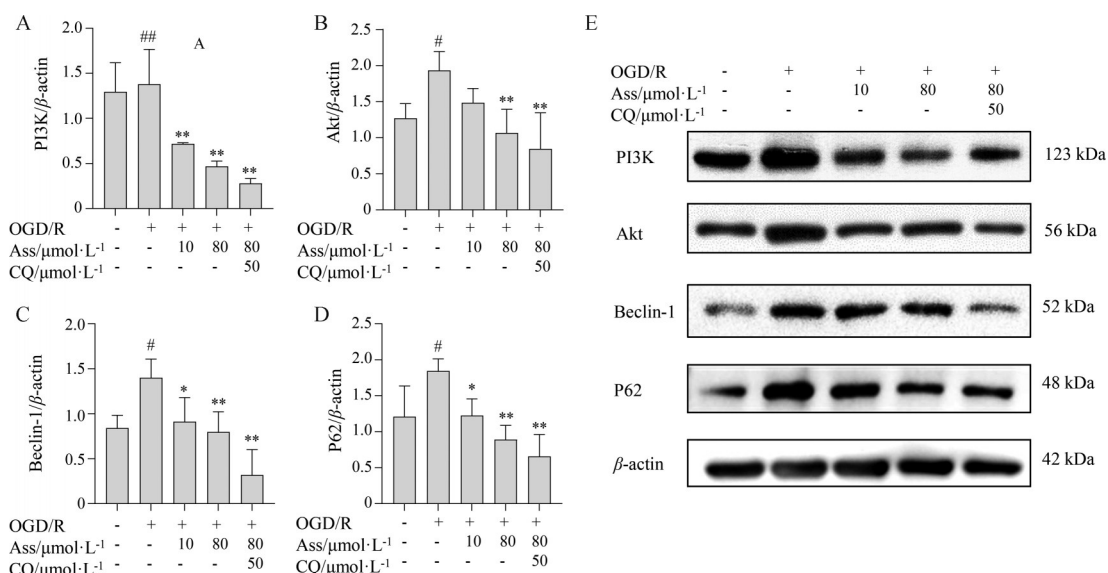


Figure 7 Effect of Ass on the expression of autophagy-related proteins in H9C2 cells induced by OGD/R. A: PI3K; B: Akt; C: Beclin-1; D: P62; E: The Western blot of autophagy-related proteins in H9C2 cells induced by OGD/R. $n = 3, \bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs OGD/R group

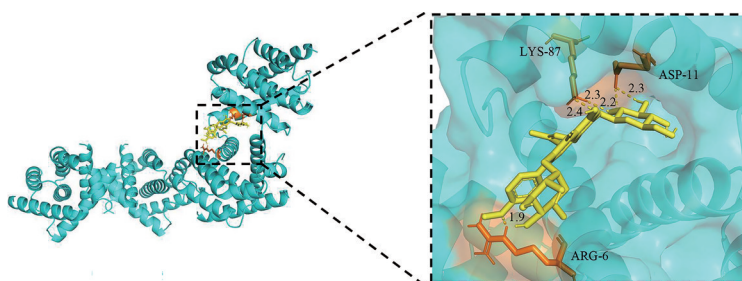


Figure 8 The results of molecular docking between Ass and Beclin-1

胞数量明显上升, 本结果表明 Ass 对于心肌细胞具有一定程度的保护作用。其次, 还检测了 AST、LDH 和 CK。在心肌缺血再灌注的发生发展过程中, 心肌细胞坏死会释放心肌内包含 AST、LDH 和 CK 等多种酶, AST 是一种广泛存在于心肌细胞中的酶类物质, 一旦出现升高便表明心肌细胞出现损伤; CK 一般于 24 h 达到含量高峰; LDH 在心梗时出现的时间较为晚, 一般 48~72 h 达到高峰, 是衡量心肌梗死的重要指标。本研究结果发现, Ass 可以降低 H9C2 细胞上清液中 AST、LDH 和 CK 的活性和含量, 有效地保护了 OGD/R 诱导损伤后的 H9C2 心肌细胞。

本课题组进一步探索了 Ass 保护 OGD/R 诱导损伤 H9C2 心肌细胞的具体机制, 通过细胞自噬染色检测试剂盒观察发现, H9C2 心肌细胞各组均出现了自噬小体。自噬作为一种细胞降解的方式, 通过溶酶体消除不必要或受损的细胞器以维持内部环境稳态的基本过程, 对于维持细胞形态具有重要作用。最近的研究表明, 自噬在心肌缺血再灌注的病理学中起着重要作用, 在心肌梗死早期, 自噬可以降解非功能性细胞质蛋

白, 为关键生命活动提供关键营养素, 从而抑制细胞凋亡和坏死, 保护细胞免受缺血再灌注的损害, 但是持续的自噬会导致心肌细胞的大量死亡, 因此, 调节心肌细胞的自噬程度具有重要意义^[14]。氯喹作为溶酶体的抑制剂, 可以抑制自噬体与溶酶体的融合进而抑制自噬的发生, 因此为了明确 Ass 是否通过自噬保护 OGD/R 后的心肌细胞, 设置了自噬抑制剂组。根据自噬染色试剂盒检测结果显示, 与正常组相比, 模型组细胞自噬情况增加, 而给药组可以减少细胞自噬情况, 并且呈现浓度依赖性, 添加氯喹后细胞自噬情况进一步减少, 以上研究表明 Ass 可以通过减少细胞自噬从而保护 OGD/R 给 H9C2 心肌细胞造成的损伤。

本课题组又通过蛋白质印迹法对各组进行了自噬蛋白的验证。PI3K/Akt/Beclin-1 信号通路是调节细胞自噬的关键通路之一, 主要参与细胞内分化、凋亡、发育等过程^[15,16]。PI3K 作为 G 蛋白偶联受体的下游主要效应因子, 通过磷脂的生成, 将各种细胞因子的信号通路转化为细胞内信息^[17]; Akt 可以通过 PI3K 信号传导的刺激, 将信号进一步传导至下游; Beclin-1 是近些年

来发现参与自噬调控的关键蛋白之一,位于人类染色体17q21位点的基因编码的蛋白,可以通过Akt信号的激活促进自噬;P62是一种选择性的自噬受体,通过与微管相关蛋白1A/1B轻链3(IL3)结合,进而促进细胞自噬。本实验研究发现Ass可以降低PI3K、Akt、Beclin-1和P62的蛋白表达水平,并呈现浓度依赖性;通过添加自噬抑制剂,Ass高浓度+氯喹组($80\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}+50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的结果显示,PI3K、Akt、Beclin-1和P62的蛋白表达水平也进一步的降低,本研究发现Ass可以降低细胞的自噬水平,从而保护OGD/R诱导损伤后的心肌细胞。除此之外,PI3K/Akt/Beclin-1信号通路是自噬的经典通路,但其中PI3K与Akt作为可以启动众多通路的两个蛋白,当PI3K和Akt与不同的调节蛋白结合时,可以选择性地介导不同生物进程,并不具备自噬的特异性,而Beclin-1是近些年发现参与自噬调控的关键蛋白,在哺乳动物中高度保守,是自噬的关键分子,因此选择了Beclin-1作为分子对接的对象。分子对接技术的结果显示,积雪草苷作用于自噬关键靶点蛋白Beclin-1的具体结合位点,即Ass可以与第6位精氨酸、第11位天冬氨酸和第87位赖氨酸形成氢键,进而影响自噬关键蛋白的运作。

综上所述,本研究发现Ass可以对OGD/R诱导损伤的H9C2心肌细胞具有保护作用,主要通过降低心肌细胞AST、LDH和CK含量,降低PI3K、Akt、Beclin-1和P62的蛋白表达水平,减少细胞自噬,为积雪草苷抗心肌缺血再灌注损伤作用提供了实验依据。

作者贡献: 曹策负责实验操作和文章撰写;刘建勋负责实验总体设计及稿件修改;李磊、韩笑、李玲美、王紫艳和王奥奥参与了部分实验操作与论文修改。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] El Hussein MT, Fibich E. Noninvasive diagnostic modalities for the diagnosis of coronary artery disease: a guide for acute care NPs [J]. Nurse Pract, 2022, 47: 27-36.
- [2] Deng F, Li X, Tang C, et al. Mechanisms of Xiong-Pi-Fang in treating coronary heart disease associated with depression: a systematic pharmacology strategy and *in vivo* pharmacological validation [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 298: 115631.
- [3] Mokhtari-Zaer A, Marefati N, Atkin SL, et al. The protective role of curcumin in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. J Cell Physiol, 2018, 234: 214-222.
- [4] Luo X, Wu S, Jiang Y, et al. Inhibition of autophagy by geniposide protects against myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 85: 106609.
- [5] Li Y, Liang P, Jiang B, et al. CARD9 promotes autophagy in cardiomyocytes in myocardial ischemia/reperfusion injury via interacting with Rubicon directly [J]. Basic Res Cardiol, 2020, 115: 29.
- [6] Zeng X, Yu J, Liu P, et al. Asiaticoside alleviates cardiomyocyte apoptosis and oxidative stress in myocardial ischemia/reperfusion injury via activating the PI3K-AKT-GSK3 β pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. Ann Transl Med, 2022, 10: 69.
- [7] Zhang M, Liu S, Fang L, et al. Asiaticoside inhibits renal fibrosis development by regulating the miR-142-5p/ACTN4 axis [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2022, 69: 313-322.
- [8] Luo J, Zhang T, Zhu C, et al. Asiaticoside might attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis by activating cAMP and Rap1 signalling pathway assisted by A2AR [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24: 8248-8261.
- [9] Zulklipl NN, Zakaria R, Long I, et al. *In silico* analyses and cytotoxicity study of asiaticoside and asiatic acid from malaysian plant as potential mTOR inhibitors [J]. Molecules, 2020, 25: 3991.
- [10] Huang J, Zhou X, Xia L, et al. Inhibition of hypertrophic scar formation with oral asiaticoside treatment in a rabbit ear scar model [J]. Int Wound J, 2021, 18: 598-607.
- [11] Li L, Liu J, Ren J, et al. Relationship between prescription and syndrome on mini-swine phlegm-stasis syndrome of coronary heart disease [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 1698-1704.
- [12] Deng J. Advanced research on the regulated necrosis mechanism in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Int J Cardiol, 2021, 334: 97-101.
- [13] He Z, Hu Y, Niu Z, et al. A review of pharmacokinetic and pharmacological properties of asiaticoside, a major active constituent of *Centella asiatica* (L.) Urb [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 302: 115865.
- [14] Zheng Y, Shi B, Ma M, et al. The novel relationship between Sirt3 and autophagy in myocardial ischemia-reperfusion [J]. J Cell Physiol, 2019, 234: 5488-5495.
- [15] Sun W, Lu H, Dong S, et al. Beclin1 controls caspase-4 inflammasome activation and pyroptosis in mouse myocardial reperfusion-induced microvascular injury [J]. Cell Commun Signal, 2021, 19: 107.
- [16] Shi B, Ma M, Zheng Y, et al. mTOR and Beclin1: two key autophagy-related molecules and their roles in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. J Cell Physiol, 2019, 234: 12562-12568.
- [17] Li Y, Qu M, Xing F, et al. The protective mechanism of dexmedetomidine in regulating Atg14L-Beclin1-Vps34 complex against myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. J Cardiovasc Transl Res, 2021, 14: 1063-1074.