

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.06.009

甘草次酸通过 PI3K-AKT 途径抑制 H₂O₂ 所致大鼠心肌细胞氧化损伤 *

邢 燕¹ 历 飞² 林大勇³ 刘 鸿³ 白 剑³

(1 辽宁省人民医院 辽宁 沈阳 110016; 2 沈阳市中医院 辽宁 沈阳 110001; 3 辽宁中医药大学 辽宁 沈阳 110847)

摘要 目的:研究甘草次酸对 H₂O₂ 所致大鼠心肌细胞氧化损伤的影响及其可能机制。**方法:**采用 H₂O₂ 处理建立 H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤模型后,比较模型中 ROS 生成和细胞凋亡比例,使用不同浓度的甘草次酸孵育 H9c2 细胞 24、48h 后,通过流式细胞仪检测 ROS 的生成量,Annexin V-FITC/PI 双标记流式细胞术检测凋亡率,蛋白质印迹法检测 PI3K、AKT1、p-AKT 蛋白的表达。**结果:**H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤模型中 ROS 生成和细胞凋亡率分别为(49.33±3.23)%和(33.89±1.45)%,与对照组相比有显著差异;100 μmol/L 和 200 μmol/L 的甘草次酸作用 24 h 后,H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤模型中表达 ROS 细胞的比例(35.39±1.24)%和(30.46±0.95)%,凋亡细胞比例分别为(29.47±3.15)%和(23.17±1.46)%,当作用 48 h 后,H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤模型中表达 ROS 细胞的比例(42.67±1.89)%和(35.49±1.63)%,凋亡细胞比例分别为(40.22±3.06)%和(35.26±2.78)%,与对照组相比有显著性差异;使用渥曼青霉素后,各甘草次酸组与对照组无显著性差异。**结论:**甘草次酸可能通过 PI3K-AKT 途径抑制 H₂O₂ 所致大鼠心肌细胞氧化损伤。

关键词:甘草次酸;AKT 途径;凋亡;活性氧

中图分类号:R-33;R54 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)06-1044-06

Glycyrrhetic Acid Decreases H₂O₂-induced Oxidative Injury of H9C2 Cells through PI3K-AKT Pathway*

XING Yan¹, LI Fei², LIN Da-yong³, LIU Hong³, BAI Jian³

(1 The people's hospital of Liaoning province, Shenyang, Liaoning, 110016, China;

2 Shenyang hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning, 110001, China;

3 Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning, 110847, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect and mechanism of glycyrrhetic acid on the oxidative injury of rat myocardial cells.

Methods: Rat myocardial H9c2 cells were treated by H₂O₂ to induce oxidative injury. The ROS generation and apoptosis were detected. Different concentrations of glycyrrhetic acid were used to treat H₂O₂-induced H9c2 cells for 24 h and 48 h. of the ROS generation in H9c2 cells was detected by flow cytometry; proportion of apoptotic cells was detected by flow cytometry with Annexin V/PI double marker staining; PI3K, AKT1, p-AKT protein expressions were detected by Western blotting. **Results:** The ROS generation and cell apoptotic rate in H₂O₂-induced H9c2 cells were (49.33±3.23)% and (33.89±1.45)% respectively, which were significantly higher than those of the control group. 100 μmol/L and 200 μmol/L glycyrrhetic acid obviously decreased the ROS generation[(35.39±1.24)% and (30.46±0.95)%], ratios of apoptotic cell [(29.47±3.15)% and (23.17±1.46)%] in H9c2 cells treated by H₂O₂ for 24 hours; 100μmol/L and 200μmol/L glycyrrhetic acid obviously decreased the ROS generation [(42.67±1.89)% and (35.49±1.63)%], ratios of apoptotic cells [(40.22±3.06)% and (35.26±2.78)%] in H9c2 cells treated by H₂O₂ for 48 hours; wortmannin showed similar effect with glycyrrhetic acid. **Conclusion:** Glycyrrhetic acid could decrease the generation of ROS and apoptosis in H₂O₂-induced oxidative injury of H9c2 cells through PI3K-AKT pathway.

Key words: Glycyrrhetic acid; AKT pathway; Apoptosis; Reactive oxygen species

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R54 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)06-1044-06

心力衰竭是各种心脏疾病发展到终末阶段,心脏的收缩功能和舒张功能发生障碍导致血液在静脉中淤积,动脉系统血液灌注不足的病理生理过程^[1-3]。由于机体的血氧交换障碍,机体内活性氧类物质如氧自由基、过氧化氢和羟自由基的内源性生成增加,细胞内潜在的抗氧化物质如过氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶的消耗过多导致二者的动态平衡破坏,而活性氧

类物质(Reactive Oxygen Species, ROS)的增加则直接导致心肌细胞凋亡、成纤维细胞增生并造成心室重构等不良结局^[4-6]。甘草具有补脾益气、祛痰止咳、缓急止痛、清热解毒、调和诸药等功效,并广泛应用于心力衰竭的治疗中。甘草酸是发挥其药理活性的重要有效成分之一,甘草酸进入体内后可以水解为甘草次酸和甘草黄酮等活性成分,其中甘草次酸具有明确的抗氧化

* 基金项目:辽宁省自然科学基金项目(201618)

作者简介:邢燕(1983-),女,硕士,主治医师,电话:13940383470,E-mail: xingyan1983@outlook.com

(收稿日期:2017-09-30 接受日期:2017-11-02)

损伤的药理学作用^[3-5]。本研究建立 H9c2 大鼠心肌细胞的氧化损伤模型,主要探讨了甘草次酸对大鼠心肌细胞氧化性损伤的影响,为甘草用于治疗心力衰竭提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

甘草次酸购买于梯希爱(上海)化成工业发展有限公司(产品标号:S0988,HPLC $\geq 98\%$);H9c2 大鼠心肌细胞购买于中国医学科学院天津血液病研究所; H_2O_2 购买于德州安捷高科消毒制品有限公司;DMEM 培养液购买于美国 Gene 公司;Hyclone 小牛血清购买美国 Thermo scientific 公司;Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒购买于美国 BD 公司;磷酸肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3-kinase,PI3K)、AKT、p-AKT、 β -actin 一抗买于美国 Santa Cruze 生物技术公司;渥曼青霉素购买于北京中杉金桥生物技术有限公司;ROS 试剂盒购买于美国 Sigma-Aldrich 公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malonaldehyde, MDA)试剂盒购买于中生北控生物科技股份有限公司;测其余分析纯试剂购买于国药集团北京分公司。低速离心机购买于湖南赫西仪器装备有限公司;FACSCalibur 流式细胞仪购买于美国 BD 公司; CO_2 培养箱购买于美国 Thermo 公司;550 酶标仪和垂直系列电泳槽购买于美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 H_2O_2 对 H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤模型中 ROS 生成和细胞凋亡率的影响 H_2O_2 氧化损伤模型参照文献进行^[10,11],将消化传代后的 H9c2 细胞接种于 6 孔板内,待细胞融合度达到 90%左右时,加入含有浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 培养基孵育 4 h。通过检测 H_2O_2 组和对照组中 LDH、SOD、MDA 的含量,确定 H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤模型的结果,检测方法按照 LDH、SOD、MDA 试剂盒说明书进行。

将经过用 H_2O_2 培养基孵育 4 h 的 H9c2 细胞消化后,用 PBS 洗两次后加入 ROS 试剂盒中 10 $\mu\text{mol/L}$ Carboxy-H2DCFDA 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 40 min,然后用 PBS 溶液重复上述步骤清洗两次,再使用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Carboxy-H2DCFDA 重悬于不含血清的 DMEM 培养基中。流式细胞仪检测在激发光波长为 488nm 处检测细胞内 ROS 的生成情况。

将经过用 H_2O_2 培养基孵育 4 h 的 H9c2 细胞消化后,在 1500 r/min 离心 5 min,弃去上清液,PBS 清洗 2 次,加入 500 μL 的 Binding buffer 重悬细胞制备单细胞悬液并调整浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,取 200 μL 细胞悬液,加入 Annexin V-FITC 流式抗体 5 μL 混匀,再加入 5 μL Propidium Iodide,混匀,避光室温孵

育 20 min 后流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.2 实验分组 将接种在 6 孔板的 H9c2 大鼠心肌细胞经过 H_2O_2 处理 4 d 后分组,每组设置 5 个复孔;对照组中为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基;低浓度组甘草次酸为含浓度 50 $\mu\text{mol/L}$ 的甘草次酸的 10%胎牛血清的 DMEM 培养基;中浓度甘草次酸组为含浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 的甘草次酸的 10%胎牛血清的 DMEM 培养基;高浓度甘草次酸组为含浓度 200 $\mu\text{mol/L}$ 的甘草次酸的 10%胎牛血清的 DMEM 培养基;低浓度组甘草次酸 + 渥曼青霉素 100 nmol/L;中浓度组甘草次酸 + 渥曼青霉素 100 nmol/L;高浓度组甘草次酸 + 渥曼青霉素 100 nmol/L。上述各组细胞分别在培养箱内孵育 24h 和 48h 后进行检测。

1.2.3 不同浓度的甘草次酸对 H9c2 心肌细胞中 ROS 生成和细胞凋亡率的影响 将在 6 孔板内培养 24h 和 48h 的各组 H9c2 大鼠心肌细胞消化后离心,按照 1.2.1 方法检测 H9c2 心肌细胞中 ROS 生成和细胞凋亡率。

1.2.4 渥曼青霉素干预对甘草次酸- H_2O_2 诱导的 H9C2 细胞 ROS 生成和细胞凋亡率的影响 将在 6 孔板内培养 24h 和 48h 的各组 H9c2 大鼠心肌细胞消化后 1500 r/min 离心 5min,按照 1.2.1 方法检测 H9c2 心肌细胞中 ROS 生成和细胞凋亡率。

1.2.5 蛋白质印迹法检测 PI3K、AKT1、p-AKT 蛋白的表达 使用蛋白裂解液将将在 6 孔板内培养 24h 和 48h 的各组 H9c2 大鼠心肌细胞裂解,将裂解产物收集到 1.5 mL EP 管中,煮沸 5 min 后通过高速离心机在 12000 r/min 离心 1 min。BCA 法进行蛋白定量,向 SDS-PAGE 凝胶中加入样本,电泳分离后电转移至 PVDF 膜。加入 PI3K(1:1000)、AKT1(1:500)、p-AKT(1:500)和 β -actin(1:1000)抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后,加入二抗在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。通过凝胶成像分析系统,并通过各条带的吸光度值计算蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理

实验数据用 SPSS19 软件处理,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-q 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H_2O_2 诱导的 H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤模型的建立

采用含 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的培养基孵育 4 h 后,H9c2 细胞 LDH 的含量为 675.65 ± 40.13 U/L,SOD 的含量为 6.23 ± 2.01 U/L,MDA 含量为 12.37 ± 1.87 nmol/L,与对照组相比均显著增加($P < 0.05$),提示 H_2O_2 诱导 H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤造模成功,见表 1。

表 1 H_2O_2 诱导 H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤模型的结果

Table 1 The results of oxidative damage model induced by H_2O_2 in H9c2 myocardial cells

Groups	n	LDH (U/L)	SOD (U/L)	MDA (n mol/L)
Control group	5	176.72 ± 10.56	13.27 ± 2.01	9.31 ± 0.67
Model group	5	$675.65 \pm 40.13^*$	$6.23 \pm 0.71^*$	$12.37 \pm 1.87^*$

注:与对照组相比 $P < 0.05$ 。

Note: * compared with the control group $P < 0.05$.

2.2 H₂O₂ 对 H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤模型中 ROS 生成和细胞凋亡率的影响

采用含 400 μmol/L H₂O₂ 的培养基孵育 4 h 后, 通过流式细胞仪检测 H9c2 大鼠心肌细胞中 ROS 的生成量, 结果显示

H₂O₂ 氧化损伤组中的心肌细胞 ROS 生成量明显高于对照组; Annexin V-FITC/PI 双标记流式细胞术检测 H9c2 大鼠心肌细胞凋亡的比例, 结果显示 H₂O₂ 氧化损伤组中的心肌细胞 ROS 生成量明显高于对照组(见表 2)。

表 2 H₂O₂ 诱导的 H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤模型中 ROS 生成量和细胞凋亡率
Table 2 ROS production and apoptotic rate in H₂O₂-induced H9c2 myocardial cells

Groups	n	ROS production	Apoptotic rate(%)
Control group	5	32.14± 1.72	7.44± 0.25
Model group	5	49.33± 3.23*	33.89± 1.45*

注:与对照组相比 P<0.05。

Note: * compared with the control group P<0.05.

2.3 不同浓度甘草次酸对 H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤模型中 ROS 生成和细胞凋亡率的影响

不同浓度甘草次酸与 H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤模型孵育 24、48h 后, 通过流式细胞仪检测 H9c2 大鼠心肌细胞中 ROS 的生成量, 结果显示中浓度和高浓度的甘草次酸组 H9c2

细胞 ROS 生成量与模型组相比明显升高; Annexin V-FITC/PI 双标记流式细胞术检测 H9c2 大鼠心肌细胞凋亡率, 结果显示中浓度和高浓度的甘草次酸组心肌细胞凋亡率与模型组相比明显降低(见表 3)。

表 3 不同浓度甘草次酸对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 大鼠心肌细胞 ROS 生成和细胞凋亡率的影响

Table 3 Effect of different concentrations of glycyrrhetic acid on the ROS production and apoptotic rate in H₂O₂-induced H9c2 myocardial cells

Groups	24h		48h	
	ROS production	Apoptotic rate	ROS production	Apoptotic rate
Model group	52.13± 0.74	41.51± 2.07	63.21± 3.28	53.29± 1.84
Low glycyrrhetic acid	51.24± 1.32	35.17± 2.58	57.37± 3.26	45.26± 2.69
Middle glycyrrhetic acid	35.39± 1.24*	29.47± 3.15*	42.67± 1.89*	40.22± 3.06*
High glycyrrhetic acid	30.46± 0.95*	23.17± 1.46*	35.49± 1.63*	35.26± 2.78*
Low glycyrrhetic acid+ wortmannin	51.78± 2.17	41.43± 3.32	50.33± 3.24	55.24± 1.54
Middle glycyrrhetic acid + wortmannin	48.69± 2.12	44.65± 3.64	47.98± 2.18	54.19± 1.98
High glycyrrhetic acid + wortmannin	47.93± 1.53	44.61± 2.65	40.38± 3.47*	50.16± 2.36

注:与对照组相比 P<0.05。

Note: * compared with the control group P<0.05.

表 4 不同浓度甘草次酸对 H9c2 大鼠心肌细胞 ROS 生成和细胞凋亡率的影响

Table 4 Effect of different concentrations of glycyrrhetic acid on the ROS production and apoptotic rate in H9c2 myocardial cells

Groups	24h		48h	
	ROS production	Apoptotic rate	ROS production	Apoptotic rate
Control group	11.13± 0.74	11.51± 2.07	17.21± 3.28	13.29± 1.34
Low glycyrrhetic acid	10.33± 3.12	13.56± 3.26	17.37± 4.48	13.54± 1.27
Middle glycyrrhetic acid	12.23± 3.56	12.45± 2.99	12.67± 0.95	12.09± 1.43
High glycyrrhetic acid	12.98± 2.17	11.73± 3.11	15.38± 0.34	11.45± 1.76
Low glycyrrhetic acid+ wortmannin	11.98± 4.12	11.78± 2.17	12.33± 1.17	15.45± 2.14
Middle glycyrrhetic acid + wortmannin	7.39± 2.47	13.55± 3.56	9.98± 2.18	14.19± 0.68
High glycyrrhetic acid + wortmannin	8.79± 3.45	13.38± 3.67	10.38± 1.42	13.16± 1.34

注:与对照组相比 P<0.05。

Note: * compared with the control group P<0.05.

2.4 不同浓度甘草次酸对 H9c2 大鼠心肌细胞 PI3K、AKT、p-AKT 蛋白表达的影响

采用不同浓度甘草次酸处理 H9c2 大鼠心肌细胞 24h、48h

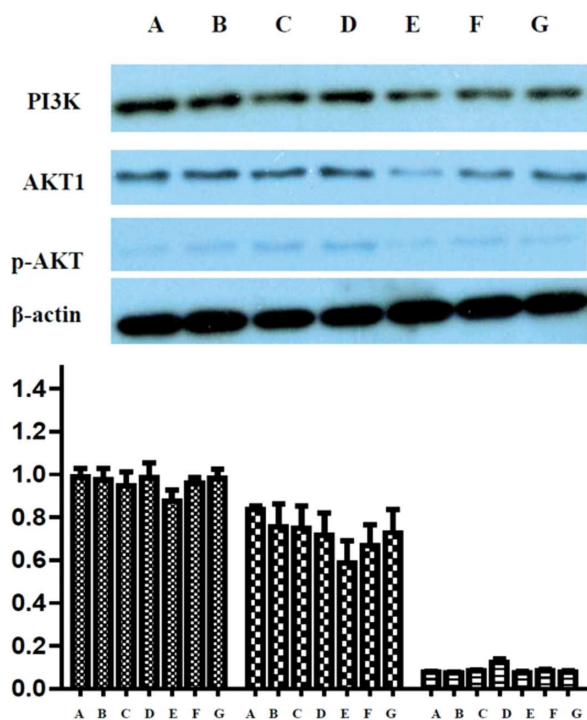


图 1 不同浓度的甘草次酸与 H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤模型孵育 24h 后 PI3K、AKT、p-AKT 蛋白表达

Fig.1 Expression of PI3K, AKT and p-akt protein in oxidative damage model of H9c2 myocardial cells after culturing 24 h at different concentrations of glycyrrhetic acid

注:A 对照组 B 低浓度组甘草次酸组 C 中浓度组甘草次酸组 D 高浓度组甘草次酸组 E 低浓度组甘草次酸组 + 渥曼青霉素 F 中浓度组甘草次酸组 + 渥曼青霉素 G 高浓度组甘草次酸组 + 渥曼青霉素

Note: A control B Low glycyrrhetic acid C Middle glycyrrhetic acid D High glycyrrhetic acid E Low glycyrrhetic acid + wortmannin F Middle glycyrrhetic acid + wortmannin G High glycyrrhetic acid + wortmannin

3 讨论

心肌是机体内需氧量最高的器官之一,而且心肌细胞对氧化性损伤的耐受能力差,容易被活性氧类物质损伤^[12-15]。活性氧类物质也可以作为第二信使参与体内多条氧化还原信号通路的调控,可以对细胞生长、血管形成和心肌重构等细胞和组织的生理活动产生影响^[16]。有研究显示心力衰竭患者体内的活性氧类物质的含量与患者的病情正相关,当机体内活性氧类物质堆积过多时可以导致心肌细胞氧化应激反应、钙超负荷并引起心肌细胞死亡,因此抗氧化治疗也是降低缺血造成的心肌细胞氧化性损伤的有效方法之一^[17-19]。在细胞内,氧化-还原的动态平衡需要靠 ROS 的生成来维持,ROS 主要来源于细胞内线粒体的代谢,在细胞没有受到损伤时 ROS 可以维持较为低的水平,但是当细胞内 ROS 在细胞的含量由于升高时,ROS 可以直接活化到凋亡信号通路并最终导致细胞的凋亡^[20-22]。

后,其 p-AKT 表达逐渐增强,在加入渥曼青霉素对阻断 PI3K/AKT 信号通路后,在各组中 p-AKT 表达明显减弱。(见图 1、2)。

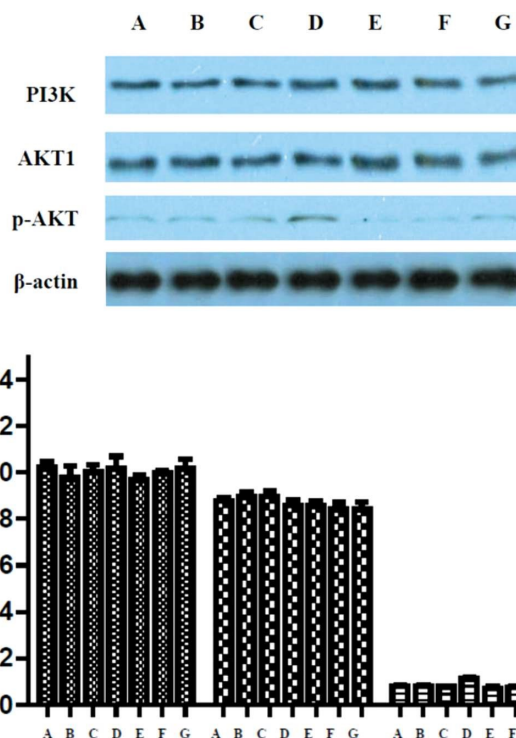


图 2 不同浓度的甘草次酸与 H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤模型孵育 48h 后 PI3K、AKT、p-AKT 蛋白表达

Fig.2 Expression of PI3K, AKT and p-akt protein in oxidative damage model of H9c2 myocardial cells after culturing 48h at different concentrations of glycyrrhetic acid

注:A 对照组 B 低浓度组甘草次酸组 C 中浓度组甘草次酸组 D 高浓度组甘草次酸组 E 低浓度组甘草次酸组 + 渥曼青霉素 F 中浓度组甘草次酸组 + 渥曼青霉素 G 高浓度组甘草次酸组 + 渥曼青霉素

Note: A control B Low glycyrrhetic acid C Middle glycyrrhetic acid D High glycyrrhetic acid E Low glycyrrhetic acid + wortmannin F Middle glycyrrhetic acid + wortmannin G High glycyrrhetic acid + wortmannin

PI3K/AKT 信号在细胞增殖和生长过程中发挥重要作用,近年来的研究发现该信号也参与细胞的凋亡、心肌缺血再灌注损伤、细胞氧化性损伤和肿瘤发生的病理生理过程^[23-25]。PI3K 属于原癌基因编码蛋白,其活化产物 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇具有第二信使功能的激酶,他可以通过信号的级联放大的反应,募集和激活下游靶物质并发挥一系列的生物学功能。AKT 是 PI3K 下游的重要靶激酶之一,当 PI3K 与 AKT 结合后形成了 p-AKT 后,AKT 进入活化状态,并进一步诱导细胞增殖^[26-29]。有研究报道,当使用渥曼青霉素对 PI3K/AKT 信号通路阻断时,细胞的增殖能力减弱,凋亡细胞比例明显增加。

甘草别名甜草,根与根状茎入药,是一种具有补益功能的中草药。在神农《神农本草经》中有记载"甘草,主五脏六腑寒邪气,坚筋骨,长肌肉,倍气力,金疮肿,解毒。"甘草次酸重要活性成分之一甘草次酸,具有抗炎、抗病毒、抑菌、抗肾损伤、抗溃疡、降血糖、免疫调节、抗氧化和肝细胞保护作用等药理学活性

[3,30]。而近年来的研究表明,甘草次酸还可以通过特异性抑制还原型辅酶 II (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, NADPH) 氧化酶的活性减少 ROS 类物质释放而最终降低凋亡细胞比例。本实验在此基础上,通过 H_2O_2 诱导 H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤模型,此后用不同浓度的甘草次酸与细胞孵育,观察甘草次酸对 H9c2 大鼠凋亡影响。结果表明,浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 的甘草次酸作用 24 h 后, H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤模型中表达 ROS 细胞的比例 $35.39 \pm 1.24\%$ 和 $30.46 \pm 0.95\%$; 当作用 48 h 后, H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤模型中表达 ROS 细胞的比例均低于对照组并呈现出一定的剂量依赖性。当用浓度为 100 nmol/L 的渥曼青霉素阻断 PI3K/AKT 信号通路后,低、中浓度组中甘草次酸对 H9c2 大鼠心肌细胞内 ROS 影响消失,只有使用高浓度甘草次酸作用 48h 后与对照组相比才出现显著性差异。使用 Annexin V / PI 双标记流式细胞术检测 H9c2 大鼠心肌细胞凋亡的比例检测结果表明,浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 的甘草次酸作用 24 h 后, H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤模型中表达凋亡细胞的比例 $29.47 \pm 3.15\%$ 和 $23.17 \pm 1.46\%$; H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤模型中表达凋亡细胞的比例 $40.22 \pm 3.06\%$ 和 $35.26 \pm 2.78\%$ 。当用浓度为 100 nmol/L 的渥曼青霉素阻断 PI3K/AKT 信号通路后,低、中浓度组中甘草次酸对 H9c2 大鼠心肌细胞凋亡比例无差异,只有使用高浓度甘草次酸作用后与对照组相比才出现显著性差异。通过蛋白质印迹法检测 PI3K、AKT、p-AKT 在各组中的含量表明,甘草次酸可以有效的激活 p-AKT 在下游的表达,当渥曼青霉素阻断 PI3K/AKT 信号通路的活化后,甘草次酸对 p-AKT 的影响减弱。因此可以证明,甘草次酸通过调节 PI3K/AKT 信号通路来影响减少 H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤,减少细胞凋亡比例。

综上所述,在治疗心肌细胞氧化性损伤过程中,可以发挥甘草次酸具有较好的抗氧化和抗凋亡的双重作用,减少 ROS 在细胞内的含量和凋亡细胞的比例,为研发治疗心肌氧化性损伤提供新的选择。

参考文献(References)

- [1] Naga Prasad S V, Gupta M K, Duan Z H, et al. A unique microRNA profile in end-stage heart failure indicates alterations in specific cardiovascular signaling networks [J]. Plos One, 2017, 12 (3): e0170456
- [2] Levy W C, Mozaffarian D, Linker D T, et al. The Seattle Heart Failure Model[J]. Circulation, 2016, 113(11): 1424-33
- [3] Solomon S D, Claggett B, McMurray J J V, et al. Combined neprilysin and renin-angiotensin system inhibition in heart failure with reduced ejection fraction: a met analysis[J]. European Journal of Heart Failure, 2016, 18(10): 1238-1243
- [4] Ong M K, Romano P S, Edgington S, et al. Effectiveness of Remote Patient Monitoring After Discharge of Hospitalized Patients With Heart Failure: The Better Effectiveness After Transition -- Heart Failure (BEAT-HF) Randomized Clinical Trial[J]. Jama Intern Med, 2016, 176(3): 310-318
- [5] Ovchinnikova E S, Schmitter D, Vegter E L, et al. Signature of circulating microRNAs in patients with acute heart failure [J]. European Journal of Heart Failure, 2016, 18(4): 414-423
- [6] Yu J, Yu Q, Liu Y, et al. Hydrogen gas alleviates oxygen toxicity by reducing hydroxyl radical levels in PC12 cells [J]. Plos One, 2017, 12 (3): e0173645
- [7] 赵雨坤, 李立, 刘学, 等. 基于系统药理学探索甘草有效成分甘草甜素的药理作用机制[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(10): 1916-1920
Zhao Yu-kun, Li Li, Liu Xue, et al. Based on systematic pharmacology to explore mechanism of pharmacological action of glycyrrhiza and glycyrrhizin [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2016, 41(10): 1916-1920
- [8] 冯亚娟, 胡滨青, 周建华. 甘草黄酮对糖尿病大鼠血糖、血脂水平及抗氧化能力的影响[J]. 山东医药, 2016, 56(03): 23-25
Feng Ya-juan, Hu Bing-qing, Zhou Jian-hua, et al. Effects of glycyrrhizin on blood glucose, lipid level and antioxidant capacity in diabetic rats [J]. Shandong Medical Journal, 2016, 56(03): 23-25
- [9] 李彦坤, 李鑫, 彭洪, 等. 甘草提取物(GL-1)对Hela细胞增殖抑制及促凋亡作用[J]. 中国公共卫生, 2016, 32(09): 1186-1188
Li Yan-kun, Li Xin, Peng Hong, et al. The effect of glycyrrhiza extract (gl-1) on the proliferation inhibition and apoptosis of Hela cells[J]. Chinese Journal of Public Health, 2016, 32(09): 1186-1188
- [10] 郑磊, 付帮泽, 解华, 等. 甘草酸和甘草次酸对H9c2大鼠心肌细胞活性氧水平的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(01): 21-25
Zheng Lei, Fu Ze-bang, Xie Hua, et al. Effects of glycyrrhizic acid and glycyrrhizic acid on the active oxygen levels of myocardial cells of H9c2 rats [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-/Cerebrovascular Disease, 2016, 14(01): 21-25
- [11] Zhang S M, Xie Z P, Xu M L, et al. Cardioprotective effects of fucoidan against hypoxia-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells[J]. Pharmaceutical Biology, 2015, 53(9): 1352-1357
- [12] Bonifacio A, Mullen P J, Mityko I S, et al. Simvastatin induces mitochondrial dysfunction and increased atrogin-1 expression in H9c2 cardiomyocytes and mice in vivo [J]. Archives of Toxicology, 2016, 90(1): 203-215
- [13] Cheung K G, Cole L K, Xiang B, et al. Sirtuin-3 (SIRT3) Protein Attenuates Doxorubicin-induced Oxidative Stress and Improves Mitochondrial Respiration in H9c2 Cardiomyocytes [J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(17): 10981-10993.
- [14] Nehra S, Bhardwaj V, Kalra N, et al. Nanocurcumin protects cardiomyoblasts H9c2 from hypoxia-induced hypertrophy and apoptosis by improving oxidative balance[J]. Journal of Physiology & Biochemistry, 2015, 71(2): 1-13
- [15] Johnson R, Dlodla P, Joubert E, et al. Aspalathin, a dihydrochalcone C glucoside, protects H9c2 cardiomyocytes against high glucose induced shifts in substrate preference and apoptosis [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2016, 60(4): 922-934.
- [16] Saezatiensar S, Bonetponce L, Da C C, et al. Bcl-xL-mediated antioxidant function abrogates the disruption of mitochondrial dynamics induced by LRRK2 inhibition[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2016, 1862(1): 20-31
- [17] 于宁, 杨芳, 冷雪, 等. 枸杞多糖通过调控 PI3K/Akt/eNOS 信号通路对去卵巢大鼠心肌产生抗氧化作用[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(8): 1370-1375
Yu Ning, Yang Fang, Leng Xue, et al. The effect of lycium

- polysaccharide on the anti-oxidative effects of the PI3K/Akt/eNOS signaling pathway on the myocardium of the rats to the ovary[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2016, 32(8): 1370-1375
- [18] 卢宁, 韩吉春, 任博雪, 等. 二氢槲皮素预处理对心肌缺血/再灌注损伤抗氧化作用的影响[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(4): 487-492
Lu Ning, Han Ji-chun, Ren Bo-xue, et al. The effects of the pretreatment of dihydroquercetin on the antioxidation of myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Chinese Pharmacology Bulletin, 2017, 33(4): 487-492
- [19] Huang S Y, Chen Y C, Kao Y H, et al. Redox and Activation of Protein Kinase A Dysregulates Calcium Homeostasis in Pulmonary Vein Cardiomyocytes of Chronic Kidney Disease [J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(7): e005701
- [20] Magarin M, Pohl T, Lill A, et al. Embryonic cardiomyocytes can orchestrate various cell protective mechanisms to survive mitochondrial stress [J]. Journal of Molecular & Cellular Cardiology, 2016, 97(suppl 1): 1-14
- [21] Paul D. Ray, BoWen Huang, Yoshiaki Tsuji. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling [J]. Cellular Signalling, 2012, 24(5): 981-990
- [22] Denicola G M, Karreth F A, Humpton T J, et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis[J]. Nature, 2011, 475(7354): 106-109
- [23] Xia H, Li Y, Lv X. MicroRNA-107 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the BDNF-mediated PI3K/AKT pathway in human non-small lung cancer [J]. International Journal of Oncology, 2016, 49(4): 1325-1333
- [24] Liu X, Li Z, Song Y, et al. AURKA induces EMT by regulating histone modification through Wnt/ β -catenin and PI3K/Akt signaling pathway in gastric cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(22): 33152-33164
- [25] Yu J S, Cui W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination[J]. Development, 2016, 143(17): 3050-3060
- [26] Yeh Y L, Ting W J, Shen C Y, et al. Hypoxia Augments Increased HIF-1 α and Reduced Survival Protein p-Akt in Gelsolin (GSN) -Dependent Cardiomyoblast Cell Apoptosis [J]. Cell Biochemistry & Biophysics, 2016, 74(2): 221-228
- [27] Moon A, Chin S, Kim H K, et al. EGFR, COX2, p-AKT expression and PIK3CA mutation in distal extrahepatic bile duct carcinoma[J]. Pathology, 2016, 48(1): 35-40
- [28] Du J, Wang L, Li C, et al. MicroRNA-221 targets PTEN to reduce the sensitivity of cervical cancer cells to gefitinib through the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Biology & Medicine, 2016, 37(3): 3939-3947
- [29] Chen J, Shao R, Li F, et al. PI3K/Akt/mTOR pathway dual inhibitor BEZ235 suppresses the stemness of colon cancer stem cells [J]. Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology, 2016, 42(12): 1317-1326
- [30] 宗阳, 何书芬, 孙冰婷, 等. 甘草抗抑郁作用机制研究及应用概况 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016(10): 194-198
Zong Yang, He Shu-fen, Sun Bing-ting, et al. Research and application of the anti-depression mechanism of liquorice [J]. China Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2016 (10): 194-198

(上接第 1080 页)

- Yu Tao. Implementation of High Quality Cardiopulmonary Resuscitation - From Guidance to Practice [J]. Chinese Journal of Emergency Medicine, 2015, 24(1): 17-21
- [27] 张蓓, 甄玲玲, 秦静, 等. 除颤和心肺复苏在院外心脏骤停发生时实施先后顺序对复苏成功影响的系统评价和 Meta 分析[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2011, 5(18): 5380-5386
Zhang Bei, Zhen Ling-ling, Qin Jing, et al. The successful resuscitation effects of the sequence of defibrillation and cardiopulmonary resuscitation on patient with out-of-hospital cardiac arrests: a systematic review and meta-analysis [J]. Chinese Journal of Clinicians(Electronic Edition), 2011, 5(18): 5380-5386
- [28] 梁峰, 沈珠军, 方全, 等. 2015 年欧洲心脏病学会关于心肌梗、遗传性心律失常、小儿和先天性心脏病患者室性心律失常治疗和心脏性猝死预防指南解读[J]. 中国心血管杂志, 2016, 21(5): 413-418
Liang Feng, Shen Zhu-jun, Fang Quan, et al. Interpretation of 2015 european society of cardiology guidelines for the management of ventricular arrhythmias in patients with cardiomyopathies, inherited primary arrhythmia syndromes, paediatric arrhythmias and congenital heart disease, and the prevention of sudden cardiac death in those patients[J]. Chinese Journal of Cardiology, 2016, 21(5): 413-418
- [29] Hernesniemi JA, Lyytikäinen LP, Oksala N, et al. Predicting sudden cardiac death using common genetic risk variants for coronary artery disease[J]. Eur Heart J, 2015, 36(26): 1669-1675
- [30] 王燕, 张冬, 韩丽芳. 反复电除颤成功抢救急性心肌梗死心脏骤停 1 例报告[J]. 医学理论与实践, 2016, 29(4): 547-547
Wang Yan, Zhang Dong, Han Lifang. Repeated defibrillation successfully rescued cardiac arrest in patients with acute myocardial infarction: a case report [J]. The Journal of Medical Theory and Practice, 2016, 29(4): 547