

葡萄籽原花青素通过 PI3K/Akt 信号通路抑制 氧化应激诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡

夏清德^{1,2}, 赵 强¹, 郭凤霞^{1*}

(1. 甘肃省中心医院/甘肃省妇幼保健院 血液科, 中国甘肃 兰州 730000, 2. 临洮县中医院 心内科, 中国甘肃 临洮 730500)

摘 要: 为了探讨葡萄籽原花青素(grape seed proanthocyanidin, GSP)对心肌细胞的保护作用及机制, 通过CCK-8 法评估细胞活力, 采用 Western-blot 分析评估 GSP 对凋亡相关蛋白质(cleaved caspase-3、Bax 和 Bcl-2)和 PI3K/Akt 通路相关蛋白质(p-PI3K、PI3K、p-Akt 和 Akt)表达水平的影响, 并使用 TUNEL 染色和 Hoechst 33258 染色评估 H9c2 心肌细胞凋亡情况。结果显示, GSP 可以抑制 H₂O₂ 诱导的 H9c2 心肌细胞的细胞毒性和凋亡, 使促凋亡蛋白 cleaved caspase-3 和 Bax 表达下降, 并使抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平升高; GSP 作用于 H9c2 细胞后, PI3K 和 Akt 的磷酸化水平增加, 使 PI3K/Akt 信号通路激活。实验结果初步表明, GSP 可抑制氧化应激诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡, 其作用机制可能与激活 PI3K/Akt 信号通路有关。

关键词: 葡萄籽原花青素(GSP); H9c2 心肌细胞; 凋亡; 急性心肌梗死(AMI); 缺血再灌注损伤

中图分类号: Q255, R542.2+2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)01-0049-07

Grape Seed Proanthocyanidins Protect H9c2 Cardiomyocytes from Hydrogen Peroxide-induced Damage via PI3K/Akt Signaling Pathway

XIA Qingde^{1,2}, ZHAO Qiang¹, GUO Fengxia^{1*}

(1. Department of Hematology, Gansu Provincial Central Hospital/Gansu Provincial Maternal and Child Health Hospital, Lanzhou 730000, Gansu, China; 2. Department of Cardiology, Lintao County Traditional Chinese Medicine Hospital, Lintao 730500, Gansu, China)

Abstract: To investigate protective effects and mechanism of grape seed proanthocyanidin (GSP) on H9c2 cardiomyocyte, CCK-8 assay was used to evaluate cell viability, Western-blot was used to evaluate the effects of GSP on apoptosis-related proteins (cleaved caspase-3, Bax and Bcl-2) and PI3K/Akt pathway-related proteins (p-PI3K, PI3K, p-Akt and Akt), and TUNEL and Hoechst 33258 stainings were used to evaluate the apoptosis of H9c2 cardiomyocytes. The results showed that GSP can prevent the cytotoxicity and apoptosis of H9c2 cardiomyocytes induced by H₂O₂. GSP decreased the expression of pro-apoptotic proteins cleaved caspase-3 and Bax, and increased the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2. When GSP acted on H9c2 cells, the phosphorylation levels of PI3K and Akt increased, leading to activation of the PI3K/Akt signaling pathway. The experiments preliminarily demonstrated that GSP can inhibit H9c2 cardiomyocyte apoptosis induced by oxidative stress, and its mechanism of action may be related to PI3K/Akt signaling pathway activation.

Key words: grape seed proanthocyanidin (GSP); H9c2 cardiomyocyte; apoptosis; acute myocardial infarction (AMI); ischemia-reperfusion injury

(Life Science Research, 2023, 27(1): 049-055)

收稿日期: 2021-05-19; 修回日期: 2021-07-01; 网络首发时间: 2022-11-09

作者简介: 夏清德(1975—), 男, 甘肃临洮人, 主要从事心血管相关疾病研究, E-mail: xiaqingde2020@163.com; * 通信作者: 郭凤霞(1992—), 女, 甘肃定西人, 主要从事心血管及血液相关疾病研究, E-mail: 1758150080@qq.com。

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是导致心源性死亡的主要原因之一,严重危害人类生命健康^[1-2]。心肌组织在梗死过程中伴随缺血缺氧,常引起心肌细胞凋亡增加,最终导致患者心功能不全^[3]。目前,经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)是通过解除冠状动脉狭窄或梗阻来重建冠状动脉血流,减少心肌梗死面积,以及维持心脏功能最有效的微创治疗技术^[4]。然而,PCI术后冠状动脉血流的恢复常导致心肌缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)损伤,最终导致心肌细胞凋亡和坏死加重^[5-8]。因此,预防 I/R 后心肌细胞的凋亡和氧化应激是减轻心肌 I/R 损伤的重要方法之一。当前,临床尚缺乏治疗心肌组织 I/R 损伤的特效药物。原花青素(proanthocyanidin),也称为缩合单宁,是一类广泛存在于植物中的天然多酚类化合物。葡萄的种子里原花青素含量非常丰富。相关研究表明,葡萄籽原花青素(grape seed proanthocyanidin, GSP)具有抗癌、抗氧化、抗凋亡和抗炎等特性^[9-11]。然而,关于 GSP 减轻心肌 I/R 损伤的机制目前尚不明确。本研究旨在探讨 GSP 通过 PI3K/Akt 信号通路对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 心肌细胞的保护作用,以期了解 GSP 改善心肌 I/R 损伤的作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料

实验使用的材料主要有:大鼠心肌细胞系 H9c2 细胞(中国科学院上海细胞库);胎牛血清、DMEM/高糖培养基(Gibco 公司,美国);Western-blot 试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司);TUNEL 染色试剂盒(罗氏公司,瑞士);Hoechst 33258 染色液(北京索莱宝科技有限公司);CCK-8 试剂(日本同仁化学研究所,日本);GSP(纯度大于 95%,北京索莱宝科技有限公司);PI3K 抑制剂 LY294002 (Selleck 公司,美国)。抗体包括: Bax、Bcl-2 和 cleaved caspase-3 (兔抗,武汉赛维尔科技有限公司);PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt (兔抗,美国 CST 公司); β -actin (鼠抗,美国 Affinity Biosciences 公司);山羊抗兔 IgG 二抗和山羊抗鼠 IgG 二抗(Sigma-Aldrich 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 H9c2 细胞氧化应激模型的建立

将 H9c2 细胞以每孔 5×10^3 个接种到 96 孔板中,并在培养箱中孵育过夜。随后,将细胞暴

露于不同浓度的 H₂O₂ (100 μ mol/L、200 μ mol/L、400 μ mol/L、600 μ mol/L、800 μ mol/L 和 1 000 μ mol/L),并在不同的时间点(8 h、12 h 和 24 h)使用 CCK-8 法测定细胞活性,以确定 H9c2 细胞建立氧化应激模型所需的 H₂O₂ 浓度和作用时间。

1.2.2 细胞分组及处理

将 H9c2 细胞置于 5% CO₂、37 °C 的环境下,用含有 10%胎牛血清的 DMEM/高糖培养基培养,每隔 2~3 d 更换 1 次培养基,待细胞汇合度达 80%时,进行传代及后续实验。将细胞分为空白对照(Control)组、过氧化氢(H₂O₂)组、原花青素(GSP)组和原花青素+过氧化氢(GSP+H₂O₂)组。使用 0.01 μ mol/L、0.1 μ mol/L、1 μ mol/L、10 μ mol/L 和 100 μ mol/L 的 GSP 处理细胞 24 h。在与 H₂O₂ 共孵育之前,先用 GSP 预处理 H9c2 细胞 24 h。PI3K 抑制剂 LY294002 的处理浓度为 20 μ mol/L。

1.2.3 细胞活性测定

根据制造商提供的说明书,通过 CCK-8 法测定细胞活力。简而言之,将 H9c2 细胞以每孔 5×10^3 个接种在 96 孔板中过夜,随后根据实验需要用不同浓度的 H₂O₂、GSP 或 LY294002 对其进行处理,然后将 10 μ L CCK-8 分析溶液添加到每个含有 90 μ L 培养基的孔中,将其置于 37 °C 培养箱中孵育 2 h 后,使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度。

1.2.4 TUNEL 细胞凋亡检测

根据 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书对 H9c2 细胞进行检测。简要步骤如下: H9c2 细胞以 1×10^5 mL⁻¹ 密度接种于盖玻片上,在 37 °C 条件下进行培养,当细胞生长至约 80%的汇合度时,使用不同干预措施进行处理。处理过的细胞用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤干净后用 4%多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗涤 3 次;于 0.1% Triton X-100 中孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次;加入 100 μ L 1 \times equilibration buffer,使其全部覆盖细胞,室温孵育 20 min;加入 100 μ L TdT 孵育缓冲液,37 °C 孵育 60 min; PBS 洗涤 3 次后,使用 DAPI 溶液染核 10 min; PBS 再次洗涤 3 次,将盖玻片置于载玻片上,使用抗荧光淬灭封片剂封片后在荧光显微镜下观察并采集图像。细胞凋亡率(%)=(TUNEL 染色阳性细胞总数/总细胞数) \times 100%。

1.2.5 Hoechst 33258 染色

根据制造商提供的 Hoechst 33258 染色液说明书对 H9c2 细胞进行染色。细胞以 1×10^5 mL⁻¹

密度接种于盖玻片上。当细胞生长至约 80% 的汇合度时,用 4% 多聚甲醛固定 20 min;用 PBS 洗涤后进行 Hoechst 33258 染色 15 min;PBS 洗涤后在荧光显微镜下观察并采集图像。细胞凋亡率(%) = (凋亡细胞总数/总细胞数)×100%。

1.2.6 Western-blot 检测

将处理过的 H9c2 细胞使用 RIPA 裂解液在 4 °C 条件下充分裂解,离心并收集上清液。根据 Bradford 方法测量蛋白质浓度,然后加入蛋白质上样缓冲液,水浴锅煮沸 10 min 后,−80 °C 保存备用。将 20~40 μg 蛋白质用不同浓度(8%、10% 或 12%, 根据目标分子相对分子质量大小而定)的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分离,然后转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。膜在封闭液中封闭 1 h 后,与相应一抗在 4 °C 条件下孵育过夜,一抗包括 Bax (1 : 1 000)、Bcl-2 (1 : 1 000)、cleaved caspase-3 (1 : 1 000)、PI3K (1 : 1 000)、p-PI3K (1 : 1 000)、Akt (1 : 1 000)、p-Akt (1 : 1 000) 及 β-actin (1 : 1 000)。次日,用 TBST 溶液洗膜 3 次,每次 10 min,然后将膜与对应的二抗在 4 °C 条件下孵育 2 h,随后 TBST 溶液再次洗涤 3 次,每次 10 min。最后,使用 ECL 发光液在凝胶成像系统曝光显色并采集图像。使用 ImageJ (version 1.52q) 软件进行蛋白质条带的灰度值分析。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据统计分析并制图。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,

两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。*P* < 0.05 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 GSP 增强了 H₂O₂ 处理的 H9c2 心肌细胞活力

为探究 H₂O₂ 对 H9c2 心肌细胞活力的影响,我们采用不同浓度(100 μmol/L、200 μmol/L、400 μmol/L、600 μmol/L、800 μmol/L 和 1 000 μmol/L)的 H₂O₂ 作用 H9c2 心肌细胞 8 h、12 h 和 24 h。CCK-8 结果表明,与 Control 组相比,H₂O₂ 以剂量和时间依赖性方式降低细胞活力。当使用 600 μmol/L H₂O₂ 处理 H9c2 细胞 24 h 时,细胞活力降低至 60.02%,此时细胞状态尚可,可进行后续实验(图 1A)。因此,我们选择 600 μmol/L 作为后续实验中 H₂O₂ 的最佳处理浓度。为探究 GSP 对 H9c2 心肌细胞活力的影响,我们使用不同浓度(0.01 μmol/L、0.1 μmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L 和 100 μmol/L) GSP 作用 H9c2 心肌细胞 24 h。CCK-8 结果表明,即使在浓度高达 100 μmol/L 的情况下,细胞活力也未受到显著影响(图 1B)。因此,我们在后续实验中选择 100 μmol/L GSP 处理 H9c2 心肌细胞 24 h。为了探究 GSP 对 H₂O₂ 处理的 H9c2 心肌细胞活力的影响,在 600 μmol/L H₂O₂ 作用条件下,使用不同浓度 GSP 处理细胞 24 h。CCK-8 结果表明,在 H₂O₂ 存在下,随着 GSP 浓度增大,H9c2 心肌细胞的活力显著提高(图 1C)。

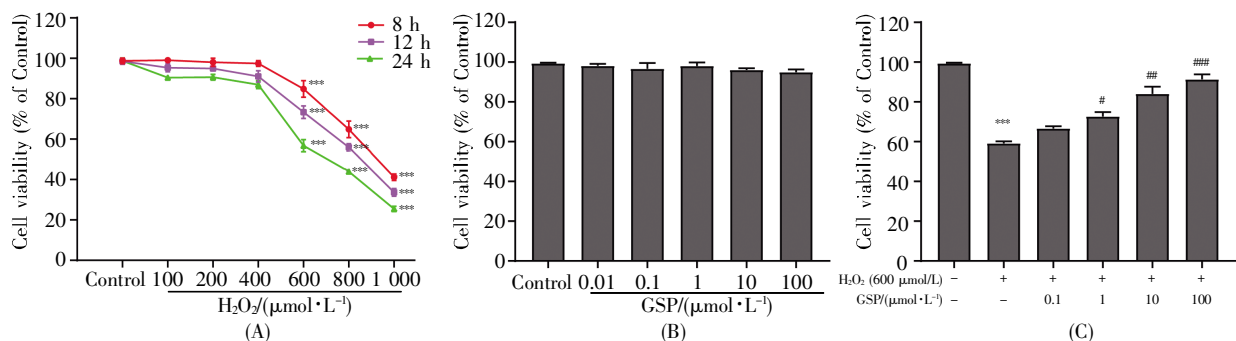


图 1 CCK-8 法检测 H₂O₂ 和 GSP 对 H9c2 心肌细胞活力的影响

(A) 不同浓度 H₂O₂ 处理 8 h、12 h 和 24 h 对 H9c2 心肌细胞活力的影响; (B) 不同浓度 GSP 处理 24 h 对 H9c2 心肌细胞活力的影响; (C) 不同浓度 GSP 处理 24 h 对 H₂O₂ (600 μmol/L) 诱导的 H9c2 心肌细胞活力的影响。****P* < 0.001 vs. Control 组, #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001 vs. H₂O₂ 组。

Fig.1 Effects of H₂O₂ and GSP on the viability of H9c2 cardiomyocytes detected by CCK-8

(A) The viability of H9c2 cardiomyocytes after treatment with different concentrations of H₂O₂ for 8 h, 12 h and 24 h; (B) The viability of H9c2 cardiomyocytes after treatment with different concentrations of GSP for 24 h; (C) The viability of H₂O₂ (600 μmol/L)-treated H9c2 cardiomyocytes after treatment with different concentrations of GSP for 24 h. ****P* < 0.001 vs. Control group; #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001 vs. H₂O₂ group.

2.2 GSP 抑制 H₂O₂ 诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡

为明确 GSP 对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡的影响, 我们使用 TUNEL 染色和 Western-blot 检测细胞凋亡情况。TUNEL 染色结果显示: 与 Control 组(空白对照组)相比, H₂O₂ 组出现更多的凋亡细胞; 而与 H₂O₂ 组相比, GSP+H₂O₂ 组细胞的凋亡水平显著下降(图 2A~B)。Western-blot 结果显示: 与 Control 组相比, H₂O₂ 组 cleaved caspase-3 和 Bax 的表达量增加, 而 Bcl-2 的表达量减少; 与 H₂O₂ 组相比, GSP+H₂O₂ 组 cleaved caspase-3 和 Bax 的表达量下降, 而 Bcl-2 的表达量增加(图 2C~F)。以上结果表明, GSP 能够抑制 H₂O₂ 诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡。

2.3 GSP 激活 H₂O₂ 诱导的 H9c2 心肌细胞中的 PI3K/Akt 信号通路

PI3K/Akt 通路在细胞凋亡中起着重要作用, 它的激活可以抑制细胞凋亡; PI3K/Akt 通路被激活后, p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 的比值均升高^[12-13]。我们使用 Western-blot 检测各组细胞中 PI3K/Akt 通路相关蛋白质的表达水平。结果如图 3 所示, H₂O₂ 诱导 H9c2 心肌细胞氧化损伤后, p-PI3K/

PI3K 和 p-Akt/Akt 的比值均较对照组显著降低; 而经过 GSP 处理后, p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 的比值均较 H₂O₂ 组明显升高。因此, H₂O₂ 诱导 H9c2 心肌细胞氧化损伤能够抑制 PI3K/Akt 信号通路, 而 GSP 可以通过磷酸化 PI3K 进一步磷酸化下游分子 Akt, 从而激活该信号通路。

2.4 PI3K/Akt 信号通路抑制剂 LY294002 对 GSP 处理的 H9c2 心肌细胞凋亡的影响

为进一步证实 PI3K/Akt 信号通路在 GSP 保护 H₂O₂ 诱导的 H9c2 心肌细胞中发挥作用, 使用 PI3K 抑制剂 LY294002 处理细胞, 采用 Western-blot 检测通路相关蛋白质和凋亡相关蛋白质的表达水平。结果如图 4 所示, 与 Control 组相比, H₂O₂ 组 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 的比值显著下降, cleaved caspase-3、Bax 的表达水平显著增加, 而 Bcl-2 的水平显著下降; 与 H₂O₂ 组相比, GSP+H₂O₂ 组 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 的比值显著增加, cleaved caspase-3、Bax 的表达水平显著下降, 而 Bcl-2 的水平显著升高; 与 GSP+H₂O₂ 组相比, GSP+H₂O₂+LY294002 组 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 的比值显著下降, cleaved caspase-3、Bax 的表达水

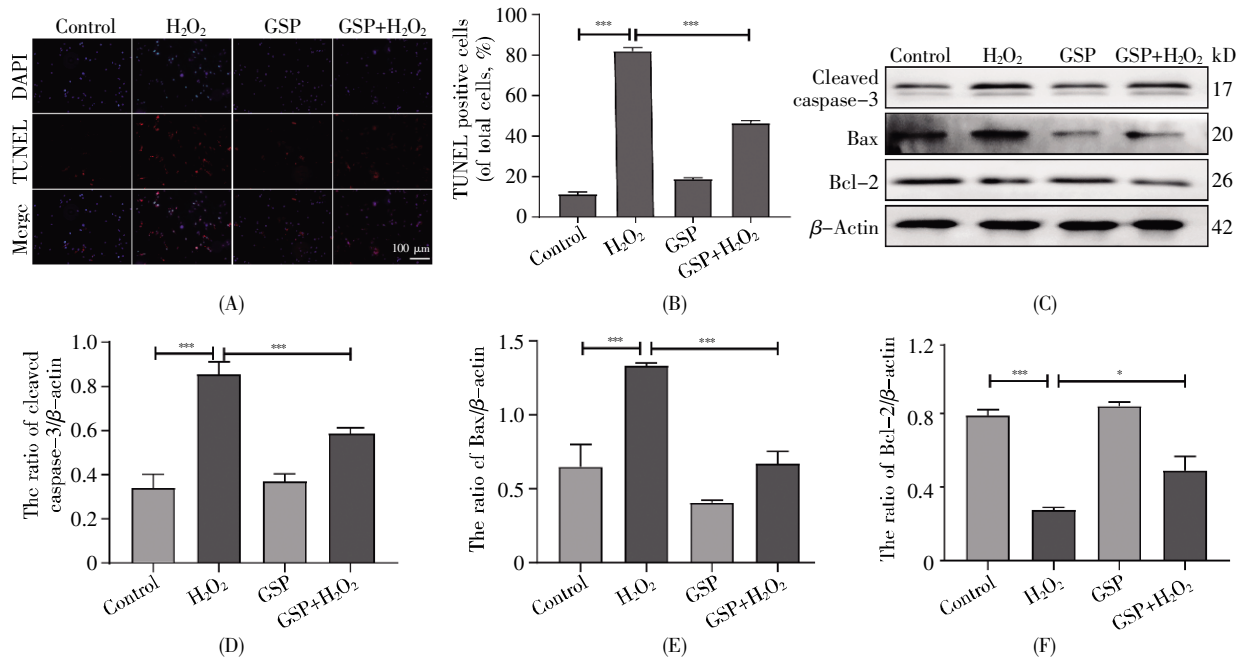


图2 GSP 对 H₂O₂ 诱导 H9c2 心肌细胞凋亡的影响

(A) TUNEL 染色评估 H9c2 心肌细胞凋亡的代表图像; (B) 各组细胞凋亡率统计分析柱状图; (C~F) 不同处理组 H9c2 心肌细胞中凋亡相关蛋白质(cleaved caspase-3、Bax 和 Bcl-2)表达量的 Western-blot 代表性蛋白质条带和统计分析柱状图。*P < 0.05, ***P < 0.001。

Fig.2 The effect of GSP on H₂O₂ induced H9c2 cardiomyocyte apoptosis

(A) TUNEL staining of H9c2 cardiomyocyte apoptosis; (B) Statistical analysis of apoptosis rates in each group; (C~F) Western-blot detection of expression levels of apoptosis-related proteins (cleaved caspase-3, Bax and Bcl-2) in H9c2 cardiomyocytes of different treatment groups and statistical analysis of the expression levels. *P < 0.05, ***P < 0.001.

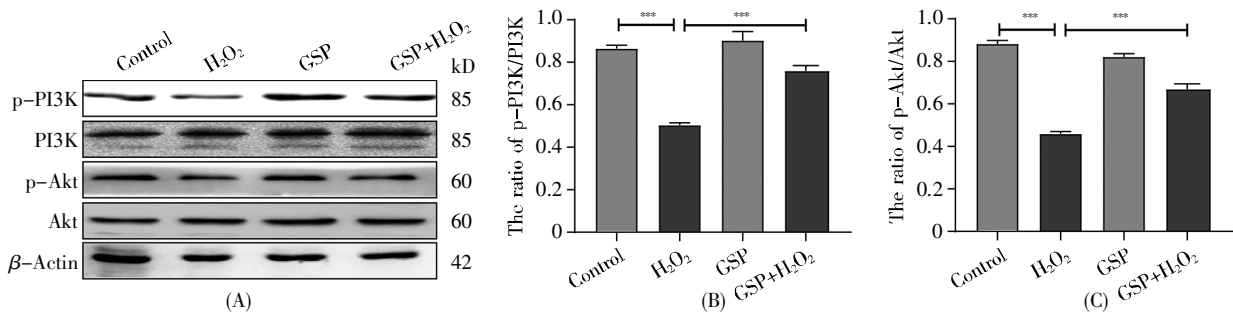


图 3 GSP 激活 H9c2 心肌细胞中的 PI3K/Akt 信号通路

(A) 不同处理组 H9c2 心肌细胞中 PI3K/Akt 通路相关指标(p-PI3K、PI3K、p-Akt 和 Akt)表达量的 Western-blot 代表性蛋白质条带图像; (B) p-PI3K/PI3K 比值的定量分析柱状图; (C) p-Akt/Akt 比值的定量分析柱状图。*** $P < 0.001$ 。

Fig.3 GSP activating the PI3K/Akt signaling pathway in H9c2 cardiomyocytes

(A) Western-blot detection of expression levels of PI3K/Akt pathway related indicators (p-PI3K, PI3K, p-Akt and Akt) in H9c2 cardiomyocytes of different treatment groups; (B) Quantitative analysis of p-PI3K/PI3K ratio; (C) Quantitative analysis of p-Akt/Akt ratio. *** $P < 0.001$.

平显著增加, 而 Bcl-2 的水平显著下降。进一步的 Hoechst 33258 染色结果显示, 与 Control 组相比, H₂O₂ 组凋亡细胞比值显著增加; 与 H₂O₂ 组相比, GSP+H₂O₂ 组凋亡细胞比值显著下降; 而与 GSP+H₂O₂ 组相比, GSP+H₂O₂+LY294002 组凋亡细胞比值显著增加(图 5)。以上结果表明, H₂O₂ 单独处理

时, PI3K/Akt 信号通路被显著抑制, H9c2 心肌细胞凋亡水平增加; 当加入 GSP 后, PI3K/Akt 信号通路激活, 细胞凋亡水平下降; 而加入 PI3K 抑制剂 LY294002 后, PI3K/Akt 信号通路受到抑制, 细胞凋亡水平增加。这进一步证实, GSP 通过激活 PI3K/Akt 信号通路抑制 H₂O₂ 诱导的 H9c2 心肌细

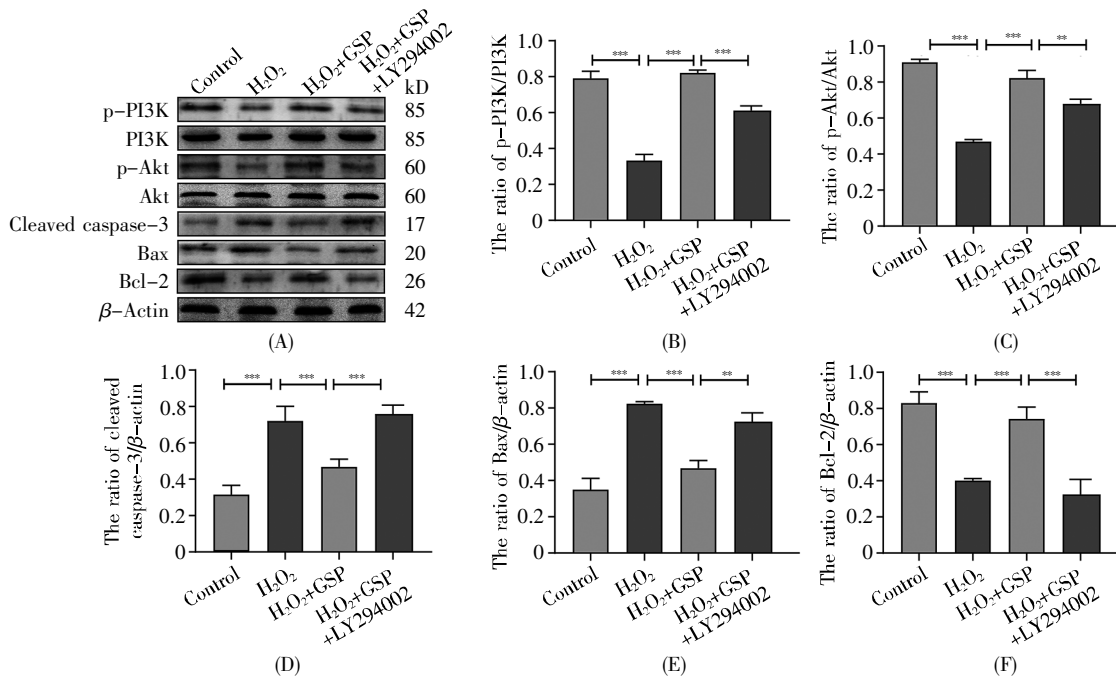


图 4 PI3K/Akt 信号通路抑制剂 LY294002 对 GSP 处理的 H9c2 心肌细胞凋亡的影响

(A) 不同处理组 H9c2 心肌细胞中 PI3K/Akt 通路相关蛋白质(p-PI3K、PI3K、p-Akt 和 Akt)和凋亡相关蛋白质(cleaved caspase-3、Bax 和 Bcl-2)表达量的 Western-blot 代表性蛋白质条带图像; (B-F) PI3K/Akt 通路和凋亡相关指标的统计分析柱状图。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Fig.4 The effect of PI3K/Akt signaling pathway inhibitor LY294002 on the apoptosis of H9c2 cardiomyocytes treated with GSP

(A) Western-blot detection of expression levels of PI3K/Akt pathway-related proteins (p-PI3K, PI3K, p-Akt and Akt) and apoptosis-related proteins (cleaved caspase-3, Bax and Bcl-2) in H9c2 cardiomyocytes of different treatment groups; (B-F) Statistical analysis of PI3K/Akt pathway and apoptosis-related indicators. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

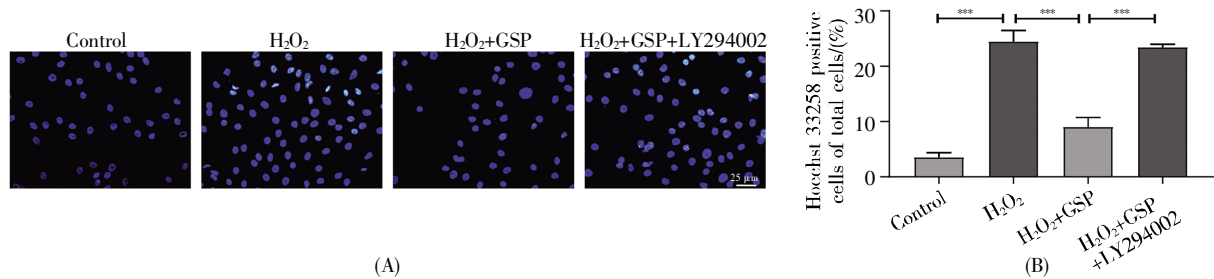


图5 Hoechst 33258 染色展示 LY294002 对 GSP 处理的 H9c2 心肌细胞凋亡的影响

(A) 不同处理组 H9c2 心肌细胞 Hoechst 33258 染色的代表性图像。当细胞发生凋亡时, H9c2 心肌细胞的细胞核呈现致密浓染, 或呈碎块状致密浓染, 且染色鲜艳; (B) Hoechst 33258 染色的统计分析柱状图。*** $P < 0.001$ 。

Fig.5 The effect of LY294002 on apoptosis of GSP-treated H9c2 cardiomyocytes detected by Hoechst 33258 staining

(A) Hoechst 33258 staining of H9c2 cardiomyocytes in different treatment groups. When the cells undergo apoptosis, their nuclei are dense and hyperchromatically stained, some are fragmented, with bright color; (B) Statistical analysis of Hoechst 33258 staining results. *** $P < 0.001$.

胞凋亡。

3 讨论

心肌组织在梗死过程中缺血缺氧导致心肌细胞凋亡增加, 而 PCI 术后冠状动脉血流的迅速恢复常引起心肌缺血再灌注(I/R)损伤, 这进一步加速了心肌细胞的凋亡和坏死^[14-18]。GSP 具有广泛的抗氧化及抗凋亡特性, 在本研究中我们发现, GSP 通过 PI3K/Akt 信号通路抑制 H₂O₂ 诱导的心肌细胞凋亡。

1972 年, Kerr 等^[19]根据细胞发生的和坏死完全不同的死亡过程而提出了细胞凋亡的概念。最初描述的凋亡过程是程序性细胞死亡的一种形式, 具有某些形态学特征, 例如: 细胞表面结构丧失、体积变窄、染色质浓缩、核碎裂和凋亡小体形成^[20-21]。线粒体途径、内质网途径和死亡受体途径是细胞发生凋亡的主要机制^[22-24]。Caspase 家族是一组蛋白酶, 介导即将死亡的细胞高效且特异的蛋白质水解作用, 是细胞凋亡过程中非常重要的效应分子^[25]。Caspase-3 是 caspase 家族中最重要的成员之一, 被认为是激活凋亡的主要效应物^[26]。Cleaved caspase-3 是 caspase-3 蛋白裂解后的最终产物。Bcl-2 蛋白家族的成员由抗凋亡因子和促凋亡因子组成, 参与线粒体介导的凋亡途径, Bax 是 Bcl-2 家族的促凋亡蛋白, 受 Bcl-2 负向调控^[27]。当细胞发生凋亡后, cleaved caspase-3 和 Bax 的表达水平升高, 而 Bcl-2 的表达水平下降^[28]。本研究结果表明, H₂O₂ 诱导的 H9c2 心肌细胞的凋亡水平显著增加, 而 GSP 显著抑制了 H₂O₂ 诱导的细胞凋亡。

PI3K/Akt 信号通路是重要的凋亡抑制信号转

导通路, 在卵巢癌、结肠癌、乳腺癌等多种肿瘤的生长代谢中发挥重要作用^[29-30]。PI3K 活化后可激活下游蛋白质 Akt, 活化后的 Akt 可调节其下游多种凋亡相关基因, 促进凋亡基因失活, 进而抑制细胞凋亡。A549 细胞 PI3K/Akt 通路激活可抑制氧化应激诱导的细胞凋亡^[31]。Ba 等^[32]研究表明, 大蒜素可以通过激活 PI3K/Akt 信号通路抑制自噬, 进而抑制细胞凋亡。Ren 等^[33]研究表明, 姜黄素通过激活 PI3K/Akt 通路抑制氧化应激诱导的细胞凋亡。Zhao 等^[34]研究表明, β -胡萝卜素通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路保护 H9c2 心肌细胞, 使其免受晚期糖基化终末产物诱导的内质网应激、凋亡和自噬。在本研究中, GSP 通过 PI3K/Akt 通路抑制 H₂O₂ 诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡, 为了进一步证实这一观察结果, 我们用 PI3K 抑制剂 LY294002 处理 H9c2 心肌细胞, 结果表明 LY294002 抑制剂部分阻断了 GSP 的抗凋亡作用。本研究结果表明, GSP 通过激活 PI3K/Akt 信号通路对心肌细胞发挥保护作用。

综上所述, GSP 可以作为预防心肌缺血再灌注损伤的潜在治疗药物, 其通过激活 PI3K/Akt 信号通路抑制心肌损伤后的心肌细胞凋亡。我们的研究初步证明了 GSP 治疗心肌缺血再灌注损伤的可能作用机理, 并为后续心肌细胞损伤研究提供了理论依据。

参考文献(References):

- [1] MAHMUD E, DAUERMAN H L, WELT F G P, *et al.* Management of acute myocardial infarction during the COVID-19 pandemic: a consensus statement from the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions (SCAI), the American College of Cardiology (ACC), and the American College of Emergency Physicians (ACEP)[J]. *Catheterization and Cardiovascular Interventions*, 2020, 96(2): 336-345.

- [2] ELBADAWI A, AHMED H M A, ELGENDY I Y, *et al.* Outcomes of acute myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis[J]. *The American Journal of Medicine*, 2020, 133(10): 1168–1179.e4.
- [3] YOUSUF T, NAKHLE A, RAWAL H, *et al.* Natural disasters and acute myocardial infarction[J]. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 2020, 63(4): 510–517.
- [4] DOLL J A, HIRA R S, KEARNEY K E, *et al.* Management of percutaneous coronary intervention complications: algorithms from the 2018 and 2019 Seattle percutaneous coronary intervention complications conference[J]. *Circulation. Cardiovascular Interventions*, 2020, 13(6): e008962.
- [5] WU W Y, BERMAN A N, BIERY D W, *et al.* Recent trends in acute myocardial infarction among the young[J]. *Current Opinion in Cardiology*, 2020, 35(5): 524–530.
- [6] ELGENDY I Y, MAHTTA D, PANIAGUA D. Multivessel PCI for acute myocardial infarction: where do we stand after the complete trial? [J]. *Current Cardiology Reports*, 2020, 22(9): 97.
- [7] AKODAD M, SICARD P, FAUCONNIER J, *et al.* Colchicine and myocardial infarction: a review[J]. *Archives of Cardiovascular Diseases*, 2020, 113(10): 652–659.
- [8] TEHRANI B N, BASIR M B, KAPUR N K. Acute myocardial infarction and cardiogenic shock: should we unload the ventricle before percutaneous coronary intervention? [J]. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 2020, 63(5): 607–622.
- [9] FU K, CHEN L Q, HU S, *et al.* Grape seed proanthocyanidins attenuate apoptosis in ischemic stroke[J]. *Acta Neurologica Belgica*, 2021, 121(2): 357–364.
- [10] LI L L, GENG X, TIAN L L, *et al.* Grape seed proanthocyanidins protect retinal ganglion cells by inhibiting oxidative stress and mitochondrial alteration[J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2020, 43(10): 1056–1066.
- [11] WANG L H, ZHAN J C, HUANG W D. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and cell cycle arrest of HepG2 cells accompanied by induction of the MAPK pathway and NAG-1[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(12): 1200.
- [12] SHORNING B Y, DASS M S, SMALLEY M J, *et al.* The PI3K-AKT-mTOR pathway and prostate cancer: at the crossroads of AR, MAPK, and WNT signaling[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(12): 4507.
- [13] FATTAHI S, AMJADI-MOHEB F, TABARIPOUR R, *et al.* PI3K/AKT/mTOR signaling in gastric cancer: epigenetics and beyond[J]. *Life Sciences*, 2020, 262: 118513.
- [14] KARACSONYI J, BRILAKIS E S. Percutaneous coronary intervention: “the oculosufficient” effect and how to overcome it[J]. *Catheterization and Cardiovascular Interventions*, 2020, 95(7): 1267–1268.
- [15] INOHARA T, KOHSAKA S, SPERTUS J A, *et al.* Comparative trends in percutaneous coronary intervention in Japan and the United States, 2013 to 2017[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2020, 76(11): 1328–1340.
- [16] MEGALY M, XENOGIANNIS I, ABI RAFEH N, *et al.* Retrograde approach to chronic total occlusion percutaneous coronary intervention[J]. *Circulation. Cardiovascular Interventions*, 2020, 13(5): e008900.
- [17] ELEID M F, GULATI R. Robotic percutaneous coronary intervention: making gains with experience[J]. *Circulation. Cardiovascular Interventions*, 2020, 13(5): e009237.
- [18] JEREMIAS A, STONE G W. Assessing post-percutaneous coronary intervention physiology: is hyperemia necessary? [J]. *JACC. Cardiovascular Interventions*, 2020, 13(16): 1934–1936.
- [19] KERR J F, WYLLIE A H, CURRIE A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. *British Journal of Cancer*, 1972, 26(4): 239–257.
- [20] FLEISHER T A. Apoptosis[J]. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 1997, 78(3): 245–250.
- [21] XU X B, LAI Y Y, HUA Z C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials[J]. *Bioscience Reports*, 2019, 39(1): BSR20180992.
- [22] PAN Y H, LI P F, JIA R Y, *et al.* Regulation of apoptosis during porcine circovirus type 2 infection[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2086.
- [23] PAN Y H, CHENG A C, WANG M S, *et al.* The dual regulation of apoptosis by flavivirus[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 654494.
- [24] DAI C S, LI J C, TANG S S, *et al.* Colistin-induced nephrotoxicity in mice involves the mitochondrial, death receptor, and endoplasmic reticulum pathways[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(7): 4075–4085.
- [25] LEE H, SHIN E A, LEE J H, *et al.* Caspase inhibitors: a review of recently patented compounds (2013–2015)[J]. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2018, 28(1): 47–59.
- [26] LOSSI L, CASTAGNA C, MERIGHI A. Caspase-3 mediated cell death in the normal development of the mammalian cerebellum[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(12): 3999.
- [27] LI H L, HUANG X P, ZHOU X H, *et al.* Correlation of seven biological factors (Hsp90a, p53, MDM2, Bcl-2, Bax, cytochrome C, and cleaved caspase3) with clinical outcomes of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma[J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2011, 24(6): 630–641.
- [28] CHEN J, XIE J J, JIN M Y, *et al.* Sirt6 overexpression suppresses senescence and apoptosis of nucleus pulposus cells by inducing autophagy in a model of intervertebral disc degeneration[J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9(2): 56.
- [29] EDIRIWEERA M K, TENNEKON K H, SAMARAKOON S R. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: biological and therapeutic significance[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2019, 59: 147–160.
- [30] DENG S, LEONG H C, DATTA A, *et al.* PI3K/AKT signaling tips the balance of cytoskeletal forces for cancer progression[J]. *Cancers*, 2022, 4(7): 1652.
- [31] NIU Z Y, LIN J S, HAO C F, *et al.* Glycyrrhizic acid attenuates pulmonary fibrosis of silicosis by inhibiting the interaction between HMGB1 and BRG1 through PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 19(14): 8743.
- [32] BA L N, GAO J Q, CHEN Y P, *et al.* Allicin attenuates pathological cardiac hypertrophy by inhibiting autophagy via activation of PI3K/AKT/mTOR and MAPK/ERK/mTOR signaling pathways[J]. *Phytomedicine*, 2019, 58: 152765.
- [33] REN B C, ZHANG Y F, LIU S S, *et al.* Curcumin alleviates oxidative stress and inhibits apoptosis in diabetic cardiomyopathy via Sirt1-Foxo1 and PI3K-Akt signalling pathways[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020, 24(21): 12355–12367.
- [34] ZHAO G C, ZHANG X L, WANG H, *et al.* Beta carotene protects H9c2 cardiomyocytes from advanced glycation end product-induced endoplasmic reticulum stress, apoptosis, and autophagy via the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Annals of Translational Medicine*, 2020, 8(10): 647.