

◆实验研究◆

益气振心汤对H₂O₂诱导的H9c2心肌细胞损伤的保护作用及机制

李佳鑫, 李飞泽, 陈琳, 刘中良, 邵海斌, 龚炳, 李洁

舟山市中医院, 浙江 舟山 316000

【摘要】目的: 探究益气振心汤(YQZX)对H₂O₂诱导下H9c2心肌细胞线粒体损伤的治疗效果及作用机制。**方法:** 利用H₂O₂诱导建立心肌细胞损伤模型, 并进行分组(样本数=5): 正常组(无H₂O₂处理)、模型组(H₂O₂处理H9c2心肌细胞)、YQZX高剂量组[3.5 g/(kg·d)]、YQZX中剂量组[1.2 g/(kg·d)]、YQZX低剂量组[0.4 g/(kg·d)]、YQZX高剂量+磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)抑制剂(LY294002)组、YQZX高剂量+环磷酸鸟苷(cGMP)抑制剂(ODQ)组、YQZX高剂量+蛋白激酶C ϵ 2(PKC ϵ 2)抑制剂(Epsilon-V1-2)组、YQZX高剂量+线粒体通透性转换孔(mPTP)开放剂(Atractyloside)组。采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测细胞的活力, 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测cGMP的表达, 采用RT-PCR技术检测PI3K、蛋白激酶B(AKT)、PKC ϵ 2的mRNA表达水平, 同时通过免疫印迹(Western blot)法分析磷酸化PI3K(p-PI3K)/PI3K、p-AKT/AKT、PKC ϵ 2的蛋白表达水平。**结果:** 与正常组比较, 模型组心肌细胞活力下降($P<0.05$), cGMP表达降低($P<0.05$), PI3K、AKT、PKC ϵ 2 mRNA表达水平降低($P<0.05$), p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-PKC ϵ 2/PKC ϵ 2蛋白表达降低($P<0.05$); 与模型组比较, YQZX高剂量组细胞活力增加($P<0.05$), cGMP表达增加($P<0.05$), PI3K、AKT、PKC ϵ 2 mRNA表达水平升高($P<0.05$), p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-PKC ϵ 2/PKC ϵ 2蛋白表达水平增加($P<0.05$); 而YQZX高剂量+LY294002组、YQZX高剂量+ODQ组、YQZX高剂量+Epsilon-V1-2组、YQZX高剂量+Atractyloside组均可在不同程度上逆转益气振心汤含药血清的作用($P<0.05$)。**结论:** 益气振心汤对H₂O₂诱导H9c2心肌细胞线粒体损伤具有明显的保护作用, 其机制与PKC ϵ 2及其上游的PI3K/AKT通路相关分子mRNA及其蛋白磷酸化表达的调控, 抑制mPTP开放有关。

【关键词】 益气振心汤; 心肌细胞损伤; 线粒体; 环磷酸鸟苷; PI3K/AKT信号通路; 蛋白激酶C ϵ 2

【中图分类号】 R285.5 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 0256-7415 (2025) 14-0178-06

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2025.14.034

Protective Effect of Yiqi Zhenxin Decoction on H₂O₂-Induced H9c2 Cardiocyte Injury and Its Mechanism

LI Jiaxin, LI Feize, CHEN Lin, LIU Zhongliang, SHAO Haibin, GONG Bing, LI Jie

Zhoushan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhoushan Zhejiang 316000, China

Abstract: Objective: To investigate the curative effect of Yiqi Zhenxin (YQZX) Decoction on H₂O₂-induced mitochondrial injury in H9c2 cardiocyte and its mechanism. **Methods:** A H₂O₂-induced cardiocyte injury model was established and divided into nine groups ($n=5$) as follows: the normal group (H₂O₂-free treatment), the model group (H₂O₂-treated H9c2 cardiocyte), the high-dose YQZX group [3.5 g/(kg·d)], the medium-dose YQZX group [1.2 g/(kg·d)], the low-dose YQZX group [0.4 g/(kg·d)], the high-dose YQZX+phosphoinositide 3-kinase (PI3K)

【收稿日期】 2024-11-22

【修回日期】 2025-04-22

【基金项目】 浙江省医药卫生科技计划项目(2019KY740); 全国名老中医药专家传承工作室建设项目李飞泽全国名老中医药专家传承工作室(国中医药人教函[2022]75号)

【作者简介】 李佳鑫(1995-), 男, 硕士研究生, E-mail: 2539128018@qq.com。

【通信作者】 李飞泽(1964-), 男, 主任中医师, 硕士生导师, E-mail: 836899182@qq.com。

inhibitor (LY294002) group, the high-dose YQZX+cyclic guanosine monophosphate (cGMP) inhibitor (ODQ) group, the high-dose YQZX + protein kinaseC ϵ 2 (PKC ϵ 2) inhibitor (Epsilon-V1-2) group, and the high-dose YQZX+ mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opener (Atractyloside) group. Cell viability was measured using the cell counting kit-8 (CCK-8) assay, cGMP expression was detected by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and expression levels of PI3K, AKT, and PKC ϵ 2 mRNA were detected by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and protein levels of phosphorylated PI3K (p-PI3K)/PI3K, p-AKT/AKT, and PKC ϵ 2 were analyzed by the Western blot. **Results:** Compared with the normal group, the model group showed a decreasing trend in cardiocyte viability, cGMP expression, expression levels of PI3K, AKT, and PKC ϵ 2 mRNA, and protein levels of p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT and p-PKC ϵ 2/PKC ϵ 2 ($P < 0.05$); compared with the model group, the high-dose YQZX group presented an increasing trend in cardiocyte viability, cGMP expression, expression levels of PI3K, AKT, and PKC ϵ 2 mRNA, and protein levels of p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT and p-PKC ϵ 2/PKC ϵ 2 ($P < 0.05$); the protective effects of YQZX medicated serum were reversed to varying degrees in the high-dose YQZX + LY294002 group, the high-dose YQZX + ODQ group, the high-dose YQZX + Epsilon-V1-2 group, and the high-dose YQZX + Atractyloside group ($P < 0.05$). **Conclusion:** YQZX exerts a significant protective effect on H₂O₂-induced mitochondrial injury in H9c2 cardiocyte, whose mechanism is related to the regulation of mRNA and protein phosphorylation expression related to PKC ϵ 2 and PI3K/AKT signaling pathway, and the inhibition of mPTP opener.

Keywords: Yiqi Zhenxin Decoction; Cardiocyte injury; Mitochondrial; Cyclic guanosine monophosphate; PI3K/AKT signaling pathway; Protein kinase C ϵ 2

心血管疾病是一类重要的慢性非传染性疾病,涵盖了冠心病、心肌梗死及心力衰竭等多种病症,多由于心血管病变导致的心肌组织发生的缺血性或出血性疾病。心肌细胞是构成心脏的基本功能单位。当心肌细胞受到损伤时,心脏的正常结构和功能会受到直接影响。研究表明,氧自由基数量增加,主要由过度氧化应激反应导致,氧自由基的增加会对细胞膜、DNA等生物分子造成氧化损伤,进而引发细胞器功能障碍与细胞凋亡等一系列问题,这些病理现象与心血管疾病之间存在着紧密的关联性^[1-3]。为了应对多种应激因素,机体内的细胞会启动一系列机制,其中线粒体发挥着关键作用。这些机制涵盖线粒体融合、裂变、自噬过程以及生物合成等,旨在确保线粒体的功能维持正常状态^[4]。心肌在缺血再灌注过程中可产生大量的氧自由基等有害物质,如活性氧(ROS),其可对心肌细胞造成严重的损伤。H9c2心肌细胞是一种常用的研究心肌细胞功能和损伤机制的细胞模型。由于过氧化氢(H₂O₂)是一种常见的ROS,可以模拟体内氧化应激状态,故H₂O₂诱导的H9c2心肌细胞损伤是研究氧化应激导致心肌细胞

损伤的重要实验方法之一。

益气振心汤为浙江省舟山市中医院李飞泽主任中医师的临床常用经验方,具有补气温阳、活血化瘀、利水之功,对改善心衰患者心功能、心律失常、心肌缺血以及心室重构有显着的临床疗效。笔者所在工作室过往的一系列研究表明,本方能够对心肌缺血-再灌注损伤(MIRI)大鼠心脏起到明显的保护作用,改善慢性心力衰竭的临床症状和体征,保护心脏功能,降低机体内血浆脑钠肽(BNP)水平,改善心脏的泵血能力,减小心脏左室在收缩末和舒张末时的内径尺寸,以此提升心脏的左室射血效率^[5]。本实验通过研究益气振心汤对磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)通路介导的蛋白激酶C ϵ 2(PKC ϵ 2)的影响,探讨其对H₂O₂诱导的心肌细胞产生保护作用机制,结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验细胞株 H9c2心肌细胞株由武汉普诺赛生命科技有限公司提供。

1.2 主要试剂与仪器 胎牛血清(HAKATA, S202103);细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)试剂盒、BCA蛋白

浓度测定试剂盒(碧云天生物试剂, S0056、C0037);兔抗PI3K、磷酸化PI3K(p-PI3K)、AKT、磷酸化AKT(p-AKT)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(正能生物科技, R22768、341468、R23412、R22961、KK0425);ECL显影液(Biosharp, BL520B);SYBR Green 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(赛维尔生物科技, G3326);TRIzol试剂(Ambion, 15596026);PI3K抑制剂2-吗啉代-8-苯基色酮LY294002(毕佳索, KZN7NS3Q);cDNA逆转录试剂盒(Thermo Fisher, 01068754);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗、HRP标记羊抗鼠二抗(亚科因生物技术, A21020、A21010)。3111细胞培养箱(美国Thermo公司);LightCycler 96实时荧光定量PCR仪(瑞士Roche公司);FACSCelesta流式细胞仪(美国BD公司);MINI垂直电泳及转膜系统(美国Bio-Rad公司);Tanon 5200化学发光成像系统(上海天能生命科学有限公司);ATMO全自动酶免免疫工作站(意大利Maroche公司);DMi8倒置荧光显微镜(德国Leica公司)。

1.3 实验药品 益气振心汤(黄芪、附子、党参、淫羊藿、猪苓、茯苓、车前子、葶苈子、丹参、益母草、麦冬、五味子)水提物冻干粉(由上海中医药大学中药所制备),分装后密封、避光、4℃保存备用。药物用蒸馏水配置成等体积混悬液,每只大鼠按照10 mL/(kg·d)灌胃;假手术组和模型组灌以等量蒸馏水,连续灌胃14天后制备心肌I/R模型。

1.4 细胞培养及预处理 采用Gibco公司的杜氏改良Eagle培养基(DMEM)培养基,加入双抗(青霉素和链霉素)以及Hyclone公司的胎牛血清常规培养H9c2大鼠心肌细胞。当培养瓶内的细胞生长至密度80%时,使用0.25%的胰蛋白酶进行细胞消化处理,以改变其贴壁状态。在细胞消化到合适程度后,加入完全培养基来终止消化过程,并将细胞传代至相应的培养皿中继续培养。利用磷酸盐缓冲盐水(PBS)对生长至密度为80%的H9c2心肌细胞进行冲洗,重复2~3次,去除细胞表面的杂质、残留培养基等。加入Tyrode液(含有5 mmol/L HEPES、140 mmol/L NaCl、6 mmol/L KCl、8 mmol/L glucose、1 mmol/L MgCl₂、1 mmol/L CaCl₂, pH值调至7.4)进行孵育,孵育时间为2 h。

1.5 实验分组 共设9个组,每组样本数为5。正常

组(S):选取培养状态良好的H9c2心肌细胞,用PBS冲洗2~3次,之后加入上述标准Tyrode液进行2 h的孵育。模型组(M):首先让细胞静置20 min,然后加入100 μmol/L的H₂O₂,进行30 min的孵育处理。益气振心汤组(YQZX):YQZX高剂量组[3.5g/(kg·d)]、YQZX[1.2g/(kg·d)]中剂量组、YQZX[0.4g/(kg·d)]低剂量组分别处理20 min,然后100 μmol/L H₂O₂孵育30 min。YQZX+PI3K抑制剂(LY294002)组、YQZX+环磷酸鸟苷(cGMP)抑制剂(ODQ)组、YQZX+蛋白激酶Cε2(PKCε2)抑制剂(Epsilon-V1-2)组、YQZX+线粒体通透性转换孔(mPTP)开放剂(Atractyloside)组:给予100 μmol/L H₂O₂孵育30 min后+各个抑制剂或激动剂(LY294002、ODQ、Epsilon-V1-2、Atractyloside)+益气振心汤高剂量共处理20 min,剂量和给药方式根据说明使用。

1.6 各指标检测方法 ①CCK-8法检测细胞活力^[6],准备细胞密度为1×10⁴个/mL的细胞悬液,每孔取100 μL均匀接种在96孔板中,按照如下分组对细胞进行处理:空白对照组、模型组、YQZX含药血清低剂量组、中剂量组、高剂量组、YQZX高剂量+LY294002组、YQZX高剂量+ODQ组、YQZX高剂量+Epsilon-V1-2组、YQZX高剂量+Atractyloside组,每组重复5孔,预处理12 h,除空白对照组外,其余各组加入H₂O₂(100 μmol/L)继续培养6 h。完成处理步骤后,向每个孔内均匀分配10 μL的CCK-8溶液,随后将其置于37℃的条件下继续培养1.5 h。之后,利用酶标仪在450 nm波长下对各孔的吸光度值进行精确测定,并计算细胞活力(%)。②cGMP水平检测。将心肌细胞放置于共聚焦专用小皿中培养,当细胞达到80%的融合状态时,加入Tyrode液孵育2 h。使用cGMP完整酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(Enzo Life Science公司),根据说明书进行cGMP测定。③Real-time PCR检测PI3K、AKT、PKCε2 mRNA的表达。将大鼠心肌细胞样本置于TRIzol裂解液中,提取H9c2心肌细胞总RNA。采用Takara PrimeScript™ RT Master Mix(Perfect Real Time)执行逆转录。采用Takara SYBR® Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus)在Biorad CFX96仪器进行荧光定量PCR反应。反应条件设定为以95℃预变性30 s,然后进行40个循环,每个循环包括95℃变性5 s,60℃退火并延伸30 s。每个样本均进行3次的重复实

验, 实验中使用的基因 primer 序列由生工(上海)股份有限公司设计并合成, 序列信息参见表 1。④Western blot 检测 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-PKCε2/PKCε2 的蛋白表达。按照实验分组处理细胞后, 用 PBS 重复冲洗细胞 2~3 次, 在冰上操作, 加入蛋白裂解液, 使细胞裂解 10~30 min, 将其刮下, 将细胞放置于 EP 管中, 通过超声波进行破碎处理。随后, 在 4℃条件下, 以 15 000 r/min 进行离心, 去除沉淀物。之后, 将上清液加入到 96 孔板中, 利用 BCA 试剂盒对蛋白浓度进行测定。根据标准曲线进行上样、制胶、转膜, 使用 10% 脱脂牛奶在室温下进行封闭, 随后加入一抗, 4℃冰箱中孵育过夜。次日, 洗膜后将二抗加入进行孵育处理。完成二抗孵育后, 采用 ECL 发光液对样品进行显色处理, 随后用 ImageJ 软件对影像进行分析。

表 1 引物序列

引物	序列	长度(bp)
PI3K	上游 5'-AGAGCACTTGTAATCGGAGG-3'	119
	下游 5'-CTTCCCCGGCAGTATGCTTC-3'	
Akt	上游 5'-AGCGACGTGGCTATTGTGAAG-3'	96
	下游 5'-GCCATCATCTCTTGAGGAGGAAGT-3'	
PKCε2	上游 5'-CGAGGCCGTGAGCTTGAAG-3'	90
	下游 5'-GCAATGTAGGGTCGAGAAGG-3'	
GADPH	上游 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'	197
	下游 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'	

1.7 统计学方法 所有数据均用 SPSS22.0 统计学软件进行分析。计数资料符合正态分布者以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用完全随机设计的单因素方差分析(One-way ANOVA)方法。 $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 H9c2 心肌细胞活力比较 见表 2。与空白对照组比较, 模型组 H9c2 心肌细胞活力明显降低($P < 0.05$); 与模型组比较, YQZX 含药血清高剂量组 H9c2 心肌细胞活力明显上升($P < 0.05$); 与 YQZX 高剂量组比较, YQZX 高剂量+LY294002 组、YQZX 高剂量+ODQ 组、YQZX 高剂量+Epsilon-V1-2 组、YQZX 高剂量+Atractyloside 组 H9c2 心肌细胞活力下降($P < 0.05$)。

2.2 各组 H9c2 心肌细胞 cGMP 水平比较 见表 3。与空白对照组比较, 模型组 H9c2 心肌细胞 cGMP 含

量降低($P < 0.05$); 与模型组比较, YQZX 含药血清低、中、高剂量组 H9c2 心肌细胞 cGMP 水平呈上升趋势($P < 0.05$); 与 YQZX 高剂量组比较, YQZX 高剂量+LY294002 组、YQZX 高剂量+ODQ 组 H9c2 心肌细胞 cGMP 水平显著降低($P < 0.05$), YQZX 高剂量+Epsilon-V1-2 组、YQZX 高剂量+Atractyloside 组 H9c2 心肌细胞 cGMP 水平变化无统计学差异($P > 0.05$)。

表 2 各组 H9c2 心肌细胞活力比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	细胞活力(%)
空白对照组	5	0.97 ± 0.07
模型组	5	0.56 ± 0.11 ^①
YQZX 低剂量组	5	0.51 ± 0.11
YQZX 中剂量组	5	0.54 ± 0.10
YQZX 高剂量组	5	0.79 ± 0.05 ^②
YQZX 高剂量+LY294002 组	5	0.56 ± 0.11 ^③
YQZX 高剂量+ODQ 组	5	0.65 ± 0.05 ^③
YQZX 高剂量+Epsilon-V1-2 组	5	0.33 ± 0.08 ^③
YQZX 高剂量+Atractyloside 组	5	0.39 ± 0.07 ^③

注: ①与空白对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$; ③与 YQZX 高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

表 3 各组 H9c2 心肌细胞 cGMP 水平比较($\bar{x} \pm s$) nmol/L

组别	样本量	cGMP
空白对照组	5	0.72 ± 0.04
模型组	5	0.48 ± 0.02 ^①
YQZX 低剂量组	5	0.57 ± 0.01 ^②
YQZX 中剂量组	5	0.66 ± 0.02 ^②
YQZX 高剂量组	5	0.70 ± 0.01 ^②
YQZX 高剂量+LY294002 组	5	0.58 ± 0.01 ^③
YQZX 高剂量+ODQ 组	5	0.52 ± 0.06 ^③
YQZX 高剂量+Epsilon-V1-2 组	5	0.67 ± 0.02
YQZX 高剂量+Atractyloside 组	5	0.68 ± 0.01

注: ①与空白对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$; ③与 YQZX 高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 各组 H9c2 心肌细胞 PI3K、AKT、PKCε2 mRNA 表达水平比较 见表 4。与空白对照组比较, 模型组 H9c2 心肌细胞 PI3K、AKT、PKCε2 的 mRNA 表达降低($P < 0.05$)。与模型组比较, YQZX 含药血清低、中、高剂量组 H9c2 心肌细胞 PI3K、AKT、PKCε2 的 mRNA 表达均呈显著的上升趋势($P < 0.05$)。YQZX 高剂量+各抑制剂组均能够不同程度的逆转 YQZX 含药血清的作用, 且以 YQZX 高剂量

+LY294002组对PI3K、AKT的逆转效果，YQZX高剂量+LY294002组、YQZX高剂量+ODQ组、YQZX高剂量+Epsilon-V1-2组、YQZX高剂量+Atractyloside组对PKCε2的逆转效果最为明显($P < 0.05$)。

表4 各组H9c2心肌细胞PI3K、AKT、PKCε2 mRNA
表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	PI3K	AKT	PKCε2
空白对照组	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	5	0.98±0.00 ^①	0.96±0.01 ^①	0.93±0.00 ^①
YQZX低剂量组	5	1.00±0.00 ^②	0.99±0.01 ^②	0.99±0.00 ^②
YQZX中剂量组	5	1.01±0.00 ^②	1.03±0.01 ^②	1.02±0.01 ^②
YQZX高剂量组	5	1.04±0.01 ^②	1.05±0.01 ^②	1.12±0.00 ^②
YQZX高剂量+LY294002组	5	1.00±0.00 ^③	1.01±0.00 ^③	1.02±0.02 ^③
YQZX高剂量+ODQ组	5	1.04±0.03	1.03±0.00	1.05±0.00 ^③
YQZX高剂量+Epsilon-V1-2组	5	1.03±0.01	1.03±0.01	0.98±0.01 ^③
YQZX高剂量+Atractyloside组	5	1.03±0.00	1.03±0.01	1.09±0.01 ^③

注：①与空白对照组比较， $P < 0.05$ ；②与模型组比较， $P < 0.05$ ；③与YQZX高剂量组比较， $P < 0.05$ 。

2.4 各组H9c2心肌细胞p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-PKCε2/PKCε2蛋白表达水平比较 见图1，表5。与空白对照组比较，模型组对H9c2心肌细胞p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-PKCε2/PKCε2的蛋白表达降低($P < 0.05$)；与模型组比较，YQZX含药血清低、中、高剂量组对H9c2心肌细胞p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-PKCε2/PKCε2的蛋白表达明显上升($P < 0.05$)；YQZX高剂量+各抑制剂组均有较明显的逆转YQZX含药血清的作用($P < 0.05$)。

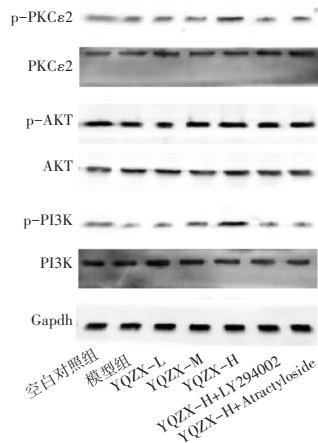


图1 各组H9c2细胞蛋白条带

3 讨论

心力衰竭可归属于中医学心水、喘证等范畴。

表5 各组H9c2细胞p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-PKCε2/PKCε2蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT	p-PKCε2/PKCε2
空白对照组	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	5	0.38±0.11 ^①	0.75±0.07 ^①	0.66±0.09 ^①
YQZX低剂量组	5	0.51±0.12 ^②	0.92±0.11 ^②	0.69±0.08 ^②
YQZX中剂量组	5	0.96±0.11 ^②	1.10±0.11 ^②	0.76±0.12 ^②
YQZX高剂量组	5	2.56±0.10 ^②	1.32±0.11 ^②	1.26±0.11 ^②
YQZX高剂量+LY294002组	5	0.84±0.12 ^③	0.87±0.11 ^③	0.53±0.07 ^③
YQZX高剂量+Atractyloside组	5	0.76±0.12 ^③	0.93±0.06 ^③	0.51±0.07 ^③

注：①与空白对照组比较， $P < 0.05$ ；②与模型组比较， $P < 0.05$ ；③与YQZX高剂量组比较， $P < 0.05$ 。

中医学认为，心力衰竭以正虚为本，心气虚、心阳虚是其基本病机^[7]；邪实为标，瘀血、水肿既是实邪又是本病的病理产物^[8]。由此可见，心力衰竭的病机虚实夹杂，临床常根据辨证分型分别采用补气温阳、活血化瘀、利水消肿等治则。益气振心汤由党参、黄芪、附子、丹参、淫羊藿、益母草、麦冬、五味子、葶苈子、猪苓、茯苓、车前子等组成，方中党参、黄芪益气养心，五味子收敛心气，麦冬益气生津，三者合用取生脉饮之益气养阴之义；配合丹参活血，以助心行血；附子、淫羊藿补肾阳以益心阳，使心阳得振，则阴翳自消；加葶苈子、猪苓、茯苓、车前子以利水消肿，除胸中悬饮。诸药合用，共奏益气养阴、活血化瘀、温阳利水之功效，对改善心律失常、心肌缺血以及心室重构等有一定疗效。

心脏肌肉细胞的最主要能量来源是线粒体，线粒体同样也是心肌细胞开始氧化应激伤害的来源和重要靶点。当细胞处于应激状态或发生损伤时，ROS含量增加，其中包括H₂O₂。心肌细胞中线粒体的损伤会触发自噬反应及凋亡过程，进而加剧病情恶化^[9]。线粒体是细胞内产生ROS的主要场所之一，也是心肌缺血再灌注损伤的重要靶点^[6,10-11]。本实验应用H₂O₂诱导H9c2心肌细胞制备线粒体损伤模型，致使线粒体损伤。

细胞活力是反映细胞健康状态的重要指标，心肌细胞受到损伤，细胞活力大幅下降。本次研究结果显示，模型组的细胞活力和cGMP含量较空白对照组明显降低，表明H₂O₂诱导心肌细胞受损的模型成功。YQZX各给药组细胞活力较模型组明显上升，表明YQZX含药血清对H₂O₂诱导的细胞损伤具有保护作用。

用;与YQZX高剂量组比较,各信号通路及分子抑制剂组细胞活力显著降低,表明YQZX含药血清对H₂O₂诱导的细胞损伤的保护作用可能与PI3K/AKT/PKC ϵ 2信号通路相关。

cGMP是一种具有细胞内信息传递作用的第二信使,可通过激活蛋白激酶G,可磷酸化并调节血管平滑肌细胞中的多种蛋白,从而导致血管平滑肌舒张,改善血供。cGMP在维持心脏稳态中起关键作用,其含量下降表明心肌细胞的正常生理调节机制受到干扰。I3K-Akt通路可通过调节线粒体功能来影响细胞存活^[12-13]。而PKC ϵ 属于PKC家族中的一员,能够维持线粒体膜的稳定性,减少线粒体膜电位的丧失,抑制mPTP的开放,从而减少心肌细胞内ROS的产生,增强心肌细胞对氧化应激的耐受性;另一方面,PKC ϵ 能够改善线粒体的功能,增强线粒体对脂肪酸的氧化能力,提高三磷酸腺苷(ATP)的生成效率,从而帮助恢复心肌细胞的正常能量代谢,提高心肌细胞在缺血再灌注过程中的生存能力^[14-15]。本实验结果还显示,相比模型组而言,YQZX各给药组cGMP水平呈上升趋势;相比YQZX高剂量组而言,YQZX高剂量+LY294002组、YQZX高剂量+ODQ组心肌细胞cGMP水平显著降低。与空白对照组比较,模型组PI3K、AKT、PKC ϵ 2的mRNA表达降低和H9c2细胞p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-PKC ϵ 2/PKC ϵ 2的蛋白表达降低;与模型组比较,YQZX各剂量组PI3K、AKT、PKC ϵ 2的mRNA表达和p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-PKC ϵ 2/PKC ϵ 2的表达均呈显著的上升趋势;YQZX高剂量+各抑制剂组均能够逆转YQZX含药血清。提示益气振心含药血清能够通过对抗PKC ϵ 2及其上游的PI3K/AKT通路相关分子mRNA及其蛋白磷酸化表达的调控,抑制mPTP开放,起到抗H₂O₂诱导的线粒体损伤作用。

综上,益气振心汤能够对H₂O₂诱导H9c2心肌细胞线粒体损伤具有明显的保护作用,其机制与PKC ϵ 2及其上游的PI3K/AKT通路相关分子mRNA及其蛋白磷酸化表达的调控,抑制mPTP开放有关。

[参考文献]

- [1] QIU Z, WANG L, MAO H, et al. miR-370 inhibits the oxidative stress and apoptosis of cardiac myocytes induced by hydrogen peroxide by targeting FOXO1[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(4): 3025-3031.
- [2] YU D, ZHU Z, WANG M, et al. Triterpenoid saponins from *Ilex cornuta* protect H9c2 cardiomyocytes against H2O2-induced apoptosis by modulating Ezh2 phosphorylation[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 269: 113691.
- [3] ZHANG X, QIN Q, DAI H, et al. Emodin protects H9c2 cells from hypoxia-induced injury by up-regulating miR-138 expression[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2019, 52(3): e7994.
- [4] 刘书宇, 汤沂, 李贺娟, 等. 比索洛尔通过调节线粒体自噬保护H9c2细胞缺氧/复氧损伤[J]. *医学研究生学报*, 2022, 35(12): 1237-1243.
- [5] 罗毅卿. 益气振心汤治疗慢性心力衰竭的临床疗效观察[D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2016.
- [6] LIANG X X, WANG R Y, GUO Y Z, et al. Phosphorylation of Akt at Thr308 regulates p-eNOS Ser1177 during physiological conditions[J]. *FEBS Open Bio*, 2021, 11(7): 1953-1964.
- [7] 陈可冀, 吴宗贵, 朱明军, 等. 慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2016, 14(3): 225-232.
- [8] 蔡鑫桂, 蔡海荣, 蔡惠铃, 等. 基于内生宿邪论治心力衰竭[J]. *新中医*, 2022, 54(11): 235-239.
- [9] 贾燕, 黄进一, 宗晴晴, 等. 大黄酸对过氧化氢致心肌细胞线粒体损伤的保护作用机制[J]. *医学研究与战创伤救治*, 2023, 36(8): 791-795.
- [10] DEL RE D P, AMGALAN D, LINKERMANN A, et al. Fundamental Mechanisms of Regulated Cell Death and Implications for Heart Disease[J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(4): 1765-1817.
- [11] LANG Z, FAN X, LIN H, et al. Silencing of SNHG6 alleviates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis by modulating miR-135a-5p/HIF1AN to activate Shh/Gli1 signalling pathway[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2021, 73(1): 22-31.
- [12] ZHANG M, CHENG K, CHEN H, et al. Galectin-3 knock down inhibits cardiac ischemia-reperfusion injury through interacting with bel-2 and modulating cell apoptosis[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 694: 108602.
- [13] NAKAMURA T, TSUJITA K. Current trends and future perspectives for heart failure treatment leveraging cGMP modifiers and the practical effector PKG[J]. *J Cardiol*, 2021, 78(4): 261-268.
- [14] ZHANG J, CHEN C, LI F, et al. Different Changing Patterns of Three NOS-NO System Activities after Ischemia-Reperfusion in Rabbit with AMI[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2021, 79(4): 857-862.
- [15] AMBARYAN S. The Role of NO/sGC/cGMP/PKG Signaling Pathway in Regulation of Platelet Function[J]. *Cells*, 2022, 11(22): 3704.

(责任编辑: 冯天保, 邓乔丹)