山核桃叶总黄酮对 H9c2 细胞氧化损伤的保护作用

陈宇驰， 黄燕芬， 吕 敏， 金丽霞， 高承贤， 丁志山， 金 波*
（浙江中医药大学，浙江 杭州 310053）

摘要：目的 研究山核桃叶（*Carya cathayensis*）总黄酮对 H_2O_2 诱导的 H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤的保护作用及其与 PI3K/Akt（磷脂酰肌醇 3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶 B）信号通路的关系。**方法** 使用 MTS（溴化噻唑蓝四氮唑）检测 H_2O_2 诱导氧化应激损伤的 H9c2 细胞存活率，Hoechst 33342 染色观察其凋亡，Western blot 技术检测 p-AKT 和 AKT 表达量，并用 PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002 进行验证。**结果** 山核桃叶总黄酮可显著的提高氧化应激损伤细胞的存活率，减少细胞凋亡，增加细胞中 p-AKT 的表达，但其作用可被 PI3Ks 抑制剂 LY294002 抵消。**结论** 山核桃叶总黄酮激活 PI3K/Akt 信号通路来有效抑制 H9c2 细胞的氧化损伤。

关键词：PI3K/Akt；山核桃；总黄酮；H9c2；氧化损伤
中图分类号：R285.5 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-1528(2017)02-0255-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.02.005

Protection of total flavonoids from leaf of *Carya cathayensis* on H9c2 cells oxidative injury

CHEN Yu-chi, HUANG Yan-fen, LÜ Min, JIN Li-xia, GAO Cheng-xian, DING Zhi-shan, JIN Bo*
(*Zhejiang Chinese Medical University*, *Hangzhou 310053*, *China*)

ABSTRACT: AIM To investigate the protective effects of total flavonoids from leaf of *Carya cathayensis* (TFC) against H_2O_2-induced oxidative injury in H9c2 myocardial cells and its relationship with PI3K/Akt signaling pathway. **METHODS** The cell viability of H_2O_2-induced oxidative stress injury cells was measured by MTS; their apoptosis was determined by Hoechst 33342 staining; and their expressions of p-AKT and AKT were measured by Western blot. The effects were verified by using PI3K/Akt inhibitor LY294002. **RESULTS** Total flavonoids from leaf of *C. cathayensis* could significantly improve the cell viability of oxidative stress injury cell model, reduce the apoptosis of cells, and increase the expression of p-AKT, but LY294002 offsets such an effect. **CONCLUSION** Total flavonoids from leaf of *C. cathayensis* can prevent H9c2 cells from oxidative stress injury, and its mechanism is related to the activation of PI3K/Akt signaling pathway.

KEY WORDS: PI3K/Akt; *Carya cathayensis*; total flavonoids; H9c2; oxidative injury

缺血性心脏病是一种常见的心血管疾病，发病率近年来有不断上升的趋势[1]，心肌缺血是其表现形式。由氧自由基增多引起的氧化应激参与了心肌缺血的损伤过程，其中氧自由基诱导的心肌细胞凋亡在此过程中起着重要作用[2-4]。黄酮类化合物是一类天然有机化合物，广泛分布于植物界中，能够有效减轻缺血缺氧损伤对心脏的损害[5-8]。山核桃（*Carya cathayensis* Sarg.）是我国特有的一种经济作物，具有药食两用的功能，其叶片中富含黄酮类化合物。本实验室前期研究发现[9-10]，山核桃叶

收稿日期：2016-08-10
基金项目：国家自然科学基金（81303258）
作者简介：陈宇驰（1990—），男，硕士生，从事天然药用资源的研究与评价。Tel：15088611736，E-mail：btcyc@sina.com
*通信作者：金 波（1974—），女，博士，副教授，从事天然药物的分子机制研究。Tel：（0571）86613666，E-mail：jinbo@zcmu.edu.cn

总黄酮对 H9c2 大鼠心肌细胞缺氧损伤和缺氧复氧损伤均具有保护作用，能降低损伤细胞 LDH（乳酸脱氢酶）释放量及胞内 MDA（丙二醛）水平，提高 SOD（超氧化物歧化酶）活性；但其中的机制仍不清楚。

PI3K/Akt（磷脂酰肌醇 3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶 B）信号通路广泛存在于细胞内，与多种细胞功能及生理病理过程密切相关。相关研究表明[11-12]，PI3K/Akt 信号通路参与了部分心肌缺血损伤调节反应的过程，能够抑制氧化损伤引起的细胞凋亡。本实验旨在从 PI3K/Akt 信号通路角度研究山核桃叶总黄酮对 H_2O_2 诱导的大鼠心肌 H9c2 细胞氧化损伤保护作用的机制，为开发山核桃叶黄酮治疗心血管疾病提供依据。

1 材料

1.1 *细胞* H9c2 大鼠心肌细胞株，购自中国科学院上海细胞库。

1.2 *药物与试剂* 山核桃叶总黄酮，浙江中医药大学生命科学学院制备[13]；槲皮素（北京世纪奥科生物技术有限公司，批号 14082610）；DMEM 高糖培养基（杭州吉诺生物医药技术有限公司，批号 1411240）；胰蛋白酶（杭州吉诺生物医药技术有限公司，批号 14030401）；胎牛血清（浙江天杭生物科技有限公司，批号 141103）；DMSO（二甲基亚砜，天津市永大化学试剂有限公司，批号 20131120）；MTS（溴化噻唑蓝四氮唑，美国 Promega公司，批号 0000088079）；H_2O_2（过氧化氢，国药化学集团有限公司，批号 20100728）；LY294002（上海碧云天生物技术有限公司，批号 S1737）；RIPA 裂解液（上海碧云天生物技术有限公司，批号 P0013B）；Akt Polyclonal Antibody（美国 ImmunoWay Biotechnology 公司，批号 YT0172）；Phospho-Akt（S473）Polyclonal Antibody（美国 ImmunoWay Biotechnology 公司，批号 YP0006）；β-actin Polyclonal Antibody（美国 Ab-land Bio-Tech 公司，批号 CT36001）；Goat anti-Rabbit IgG（H + L）（杭州联科生物技术有限公司，批号 GAR007）；ECL 发光液（美国 Thermo Scientific 公司，批号 PB197902）。

1.3 *仪器* HEPA CLASS 100 型细胞 CO_2 培养箱（美国 Thermo 公司）；ECLIPSE Ti-DH 荧光倒置显微镜（日本 Nikon 公司）；MQX 200 型微孔板扫描酶标仪（美国 BioTek Instrument 公司）；Western blot 电泳装置（美国 BioRad 公司）。

2 方法

2.1 *细胞培养及药物处理* H9c2 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基，于 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱内培养。培养至细胞铺满瓶壁 80% ~90% 时，使用 0.08% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 溶液消化，再进行传代或接种于培养板中用于后续实验。

山核桃叶总黄酮及槲皮素溶于 DMSO 中，配成 5 mg/mL 贮备液，密闭保存于 -20 ℃冰箱中备用。造模药物 H_2O_2、PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002、山核桃叶总黄酮及槲皮素贮备液使用时，用无血清 DMEM 高糖培养基稀释至相应浓度，并使 DMSO 的量低于 0.1% 。

细胞正常培养 24 h 后，各组处理方法如下：正常对照组，无血清培养基培养；H_2O_2 模型组，无血清培养基培养 24 h 后，加入终浓度为 500 μmol/L的 H_2O_2 作用 6 h，造成氧化应激损伤模型；山核桃叶总黄酮组，山核桃叶总黄酮预处理 24 h 后，H_2O_2 作用 6 h；槲皮素组，槲皮素预处理 24 h 后，H_2O_2 作用 6 h，作为阳性对照组；LY294002 + H_2O_2 模型组，LY294002 预处理 24 h 后，H_2O_2 作用 6 h；LY294002 + 山核桃叶总黄酮组：LY294002 和山核桃叶总黄酮预处理 24 h 后，H_2O_2 作用 6 h；LY294002 + 槲皮素组，LY294002 和槲皮素预处理 24 h 后，H_2O_2 作用 6 h。

2.2 *MTS 法测定细胞存活率* 将对数生长期的细胞以 5×10^4/mL 接种于 96 孔板中，药物处理后的各组细胞，每孔加入 20 μL 的 MTS 溶液，37 ℃孵育 2 h 后，酶标仪检测波长在 490 nm 处的吸光度值（*D* 值）。细胞存活率（%）=（加药细胞 *D* 值 - 本底 *D* 值）/（正常对照细胞 *D* 值 - 本底 *D* 值）×100% 。本底 *D* 值为不含细胞、不含血清的培养基加 MTS 后测得的 *D* 值。

2.3 *Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡* 将对数生长期的细胞以 1×10^4/mL 接种于 6 孔板中，药物处理后的各组细胞，用 D-Hanks 液漂洗细胞 2 次，加入 1 mL Hoechst 33342 染液于 37 ℃孵育 10 min 后，在荧光显微镜下用紫外激发光观察细胞形态并拍照。

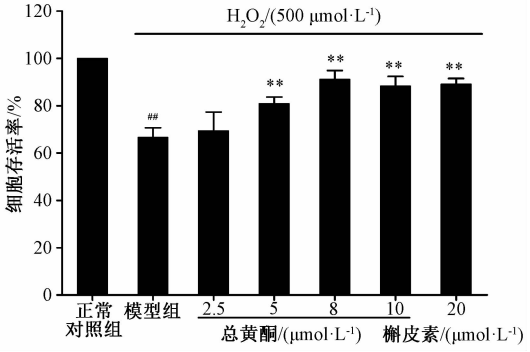
2.4 *Western blot 检测细胞 AKT 和 p-AKT 的表达* 将对数生长期的细胞以 1×10^4/mL 接种于 6 孔板中，药物处理后的各组细胞，去除培养上清液，PBS 洗涤细胞 2 次后，收集细胞，加 RIPA 冰上裂解，离心提取细胞内总蛋白并测定浓度。制备蛋白

样品，经 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭、抗体孵育、显影等过程，检测 AKT 及其磷酸化的蛋白表达水平，p-AKT 除以 AKT 的蛋白表达得到相应的磷酸化水平。

2.5 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 17.0 软件，经方差齐性检验后，用 one-way ANOVA 检验，两两比较应用 LSD-t 检验进行统计学处理，双侧检验，$P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 H_2O_2 诱导损伤的 H9c2 细胞存活率的影响 如图 1 所示，与正常对照组比较，H_2O_2 模型组能够极显著降低 H9c2 细胞存活率（$P < 0.01$）；与模型组比较，山核桃叶总黄酮 5、8、10 μg/mL 均能极显著提高 H9c2 细胞的存活率（$P < 0.01$），且在质量浓度为 8 μg/mL 时最高，为（91.17 ± 3.75）%。阳性药物槲皮素（20 μmol/L）也能极显著提高 H9c2 细胞的存活率（$P < 0.01$），为（89.16 ± 2.37）%。因此山核桃叶总黄酮后续给药质量浓度选择细胞存活率最高的 8 μg/mL。

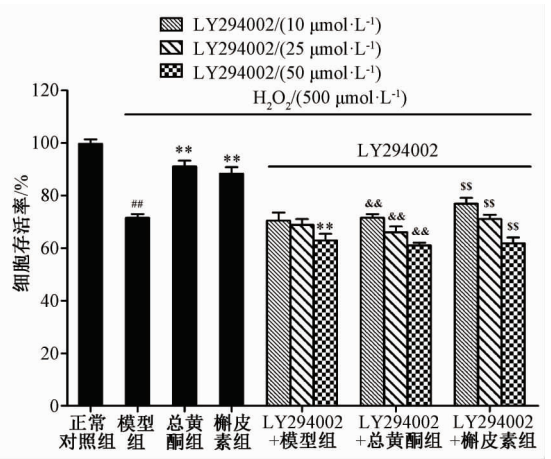


注：与正常对照组比较，$^{\#\#} P < 0.01$；与模型组比较，$^{**} P < 0.01$

图 1 山核桃叶总黄酮对 H_2O_2 诱导损伤的 H9c2 细胞存活率的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 5$）

Fig. 1 Effects of TFC on H9c2 cells viability injured by H_2O_2（$\bar{x} \pm s$，$n = 5$）

从图 2 可以看出，与模型组比较，山核桃叶总黄酮（8 μg/mL）以及槲皮素（20 μmol/L）组均能极显著提高 H9c2 细胞的存活率（$P < 0.01$）；而当加入 PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002（10、25、50 μmol/L）后，山核桃叶总黄酮组及槲皮素组提高的细胞存活率均有极显著的降低（$P < 0.01$），且与模型组接近，说明山核桃叶总黄酮可能通过 PI3K/Akt 信号通路发挥作用。由于 LY294002 在 10、25、50 μmol/L 浓度下均能极显著降低山核桃叶总黄酮组及槲皮素组细胞存活率，因此 LY294002 后续给药浓度选择浓度最低的10 μmol/L。



注：与正常对照组比较，$^{\#\#} P < 0.01$；与模型组比较，$^{**} P < 0.01$；与总黄酮组比较，$^{\&\&} P < 0.01$；与槲皮素组比较，$^{\$\$} P < 0.01$

图 2 LY294002 对 H9c2 细胞存活率的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 5$）

Fig. 2 Effects of LY294002 on H9c2 cells viability（$\bar{x} \pm s$，$n = 5$）

3.2 对 H9c2 细胞凋亡的影响 通过 Hoechst 33342 染色检测 H9c2 细胞凋亡情况。图 3 结果显示，正常对照组细胞核染色均匀，H_2O_2 模型组细胞核固缩，致密浓染，亮蓝色的凋亡细胞增多；与模型组比较，山核桃叶总黄酮（8 μg/mL）以及槲皮素（20 μmol/L）组均能减轻细胞核凝聚固缩的现象，减少细胞碎片及亮蓝色细胞，抑制细胞凋亡；加入 LY294002（10 μmol/L）后，细胞核固缩凝聚加重，细胞碎片和亮蓝色凋亡细胞增多。

3.3 对 AKT 和 p-AKT 表达变化的影响 Western blot 结果如图 4 ~ 5 所示，与正常对照组比较，H_2O_2 模型组 p-AKT/AKT 的表达量无明显变化（$P > 0.05$）；与模型组比较，山核桃叶总黄酮（8 μg/mL）以及槲皮素（20 μmol/L）能明显增加 p-AKT 的表达（$P < 0.01$），加入 LY294002（10 μmol/L）后，p-AKT 蛋白的表达明显被抑制（$P < 0.01$）。

4 讨论

氧化应激是由于体内自由基产生过多而引起的机体细胞的损伤，间接导致各种疾病的发生。氧化应激诱导的心肌细胞凋亡对心血管疾病（如缺血再灌损伤、缺血性心脏病和心衰等）的发病机制具有重要作用[14]。虽然需氧细胞必须要有氧自由基，但是在病理状态下，氧自由基的过多聚集会对

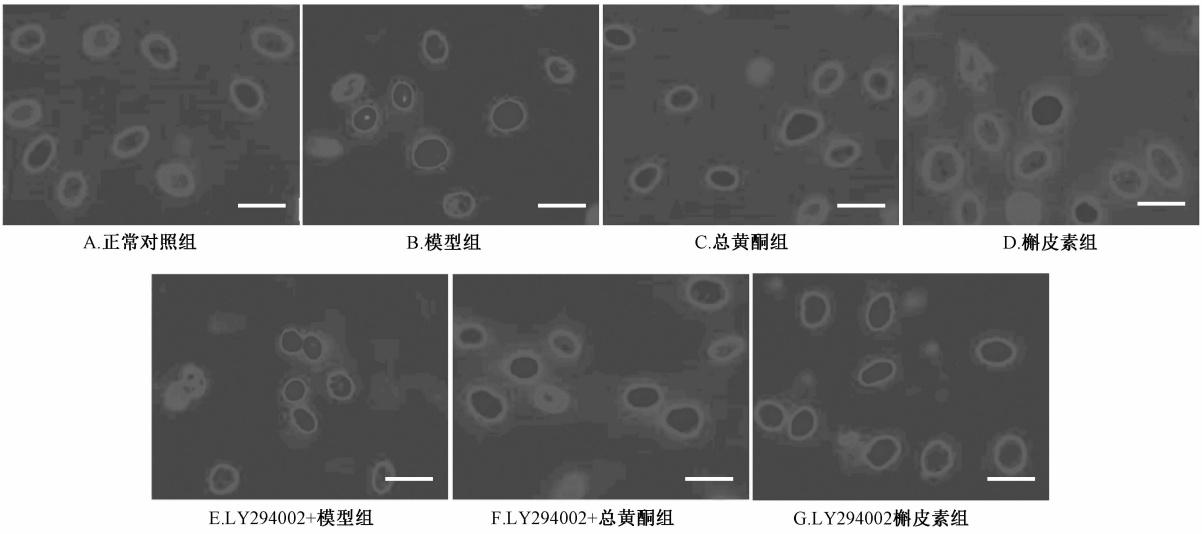
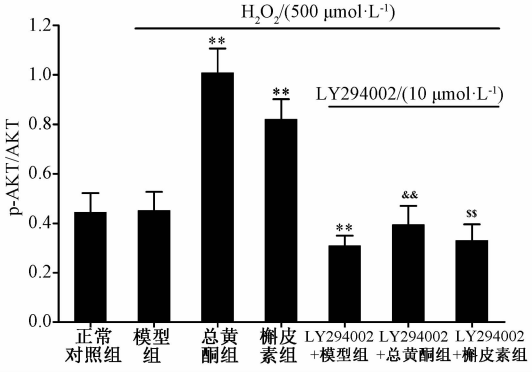


图 3 山核桃叶总黄酮对 H_2O_2 诱导损伤的 H9c2 细胞 Hoechst 33342 染色影响（×200，标尺 =100 μm）

Fig. 3 Effects of TFC on Hoechst 33342 staining of H9c2 cells injured by H_2O_2 (×200, scale bar = 100 μm)



注：与模型组比较，$^{**}P<0.01$；与总黄酮组比较，$^{\&\&}P<0.01$；与槲皮素组比较，$^{\$\$}P<0.01$

图 4 山核桃叶总黄酮对 H9c2 细胞 p-AKT/AKT 比值的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig. 4 Effects of TFC on ratio (p-AKT/AKT) of H9c2 cells injured by H_2O_2 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

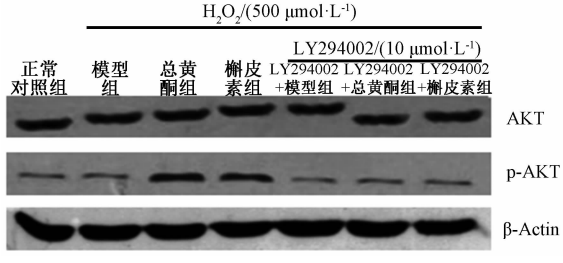


图 5 山核桃叶总黄酮对 H9c2 细胞 AKT，p-AKT 和 β-Actin表达的影响

Fig. 5 Effects of TFC on AKT, p-AKT and β-Actin expression of H9c2 cells injured by H_2O_2

细胞结构和功能造成严重损伤，并将最终导致细胞凋亡。因此，细胞内过多的氧自由基的消除和凋亡抑制对这些疾病的治疗很可能提供有益的干预。H_2O_2 是一种重要的氧自由基，极易透过细胞膜；由于其易于获得且性质相对稳定，故已成为研究体外氧化应激损伤最常用的模型，可模拟体内氧化损伤的病理过程。

中药中用于预防和治疗心血管疾病的主要有效成分黄酮类化合物，具有显著的抗氧化作用[5,15]。本实验室前期的研究发现，山核桃叶总黄酮或其黄酮类化合物具有抗心肌缺血[9-10]、抗肿瘤[16-17]、抗炎镇痛[18]和抗氧化[19]等药理活性。

磷脂酰肌醇 3-激酶（PI3K）作为细胞外信号通路和细胞免疫应答的桥梁，对细胞凋亡的调控起着十分重要的作用。Akt 是一类丝/苏氨酸蛋白激酶，可参与多种细胞活动，如细胞增殖、迁移等。PI3K 信号通路参与了许多细胞功能的调节，如细胞增殖、分化等，而近年来研究热点则转向 PI3K 与其下游蛋白激酶 Akt 所组成的 PI3K/Akt 信号通路，该信号通路除了与肿瘤的发生发展息息相关，还是控制心肌细胞存亡的重要信号转导通道[20]。当 PI3K 受到信号刺激后，通过磷酸化 thr308 或者 ser473 位点激活 Akt，活化的 Akt 可磷酸化其下游靶标，从而发挥抗凋亡的作用[21]。

本实验研究了山核桃叶总黄酮抗 H_2O_2 诱导 H9c2 细胞氧化损伤及 PI3K/Akt 通路在其中的作用。利用 MTS 法和 Hoechst 33342 染色观察山核桃

叶总黄酮对 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞存活率和细胞凋亡的影响，结果发现其能显著提高细胞存活率，减少细胞凋亡，加入 PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002 后，以上结果得到反转。利用 Western blot 技术观察山核桃叶总黄酮对 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞 p-AKT 和 AKT 的表达情况，结果表明其能显著增加 p-AKT 的表达，但当加入 LY294002 后，该种效果得到抑制。

综上所述，山核桃叶总黄酮对 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞氧化损伤的保护作用与 PI3K/Akt 信号通路及细胞凋亡密切相关，其机制为激活 PI3K/Akt 信号通路进而抑制氧化应激损伤细胞凋亡实现保护作用。

参考文献：

[1] 姚 震，陈 林. 我国心血管疾病现状与展望[J]. 海南医学，2013，24(13)：1873-1876.

[2] Murphy E，Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury[J]. *Physiol Rev*，2008，88(2)：581-609.

[3] Rosano G M，Fini M，Caminiti G，*et al*. Cardiac metabolism in myocardial ischemia[J]. *Curr Pharm Des*，2008，14(25)：2551-2562.

[4] Han X J，Chae J K，Lee M J，*et al*. Involvement of GADD153 and cardiac ankyrin repeat protein in hypoxia-induced apoptosis of H9c2 cells[J]. *J Biol Chem*，2005，280(24)：23122-23129.

[5] Sun X，Sun G B，Wang M，*et al*. Protective effects of cynaroside against H_2O_2-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblasts[J]. *J Cell Biochem*，2011，112(8)：2019-2029.

[6] 郭新红，王新春. 黄酮类化合物抗心肌缺血再灌注损伤研究进展[J]. 中成药，2014，36(10)：2168-2171.

[7] 周 畅，鲍美华，刘卫平. 黄酮类化合物对心肌缺血的保护作用及其构效关系研究[J]. 长沙医学院学报，2008，12(2)：17-19.

[8] 林炜鑫，廖 月，李冬兰，等. 九龙藤总黄酮对缺氧/复氧心肌损伤的作用[J]. 中国药学杂志，2014，49(1)：36-39.

[9] 慈海登，杨 仙，朱学鑫，等. 山核桃叶总黄酮对小鼠抗心肌缺血及心肌细胞缺氧损伤保护作用研究[J]. 云南中医学院学报，2015，38(4)：1-5.

[10] 蒋瑞彬，朱学鑫，邢丽婉，等. 山核桃叶总黄酮对 H9C2 心肌细胞缺氧复氧损伤的保护作用[J]. 中药材，2016，39(2)：378-382.

[11] Zhang M Q，Zheng Y L，Chen H，*et al*. Sodium tanshinone IIA sulfonate protects rat myocardium against ischemia-reperfusion injury via activation of PI3K/Akt/FOXO3A/Bim pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*，2013，34(11)：1386-1396.

[12] 何东伟，刘新伟，庞 勇，等. 白藜芦醇对大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡的抑制作用与 PI3K-Akt 信号通路的关系[J]. 中国中药杂志，2012，37(15)：2323-2326.

[13] 朱学鑫，李伟平，俞 燕，等. 山核桃叶总黄酮制备[J]. 中华中医药学刊，2013，31(1)：147-149.

[14] Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress[J]. *Curr Top Med Chem*，2001，1(6)：569-590.

[15] Lakshmi S V，Padmaja G，Kuppusamy P，*et al*. Oxidative stress in cardiovascular disease[J]. *Indian J Biochem Biophys*，2009，46(6)：421-440.

[16] Cao X D，Ding Z S，Jiang F S，*et al*. Antitumor constituents from the leaves of *Carya cathayensis*[J]. *Nat Prod Res*，2012，26(22)：2089-2094.

[17] 翟 斡，沈嫣婧，沈一平，等. 山核桃叶总黄酮诱导人多发性骨髓瘤 U266 细胞株凋亡作用研究[J]. 甘肃中医学院学报，2014，31(2)：7-11.

[18] 张 坤，沈 勇，徐 敏，等. 山核桃叶总黄酮苷元抗炎镇痛作用的研究[J]. 浙江中医药大学学报，2013，37(10)：1226-1229.

[19] 徐 敏，沈 勇，张 坤，等. 山核桃叶总黄酮苷元及其主要单体成分球松素查尔酮的抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19(22)：204-208.

[20] Miura T，Miki T. GSK-3β，a therapeutic target for cardiomyocyte protection[J]. *Circ J*，2009，73(7)：1184-1192.

[21] Song J Q，Teng X，Cai Y，*et al*. Activation of Akt/GSK-3β signaling pathway is involved in intermedin (1-53) protection against myocardial apoptosis induced by ischemia/reperfusion[J]. *Apoptosis*，2009，14(9)：1061-1069.