基于转录组学和蛋白质组学研究银杏黄酮苷元减轻多柔比星心脏毒性的作用机制Δ

涂玉洁[1,2*]，蔡　英[1,2]，程雪怡[1,2]，孙　佳[1]，潘　洁[3]，刘春花[3]，李勇军[2,3]，黄　勇[3]，郑　林[1]，陆　苑[1#]（1.贵州医科大学省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室/贵州省药物制剂重点实验室，贵阳　550004；2.贵州医科大学药学院，贵阳　550004；3.贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心，贵阳　550004）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）21-2596-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.21.04

摘　要　目的　基于转录组学和蛋白质组学研究银杏黄酮苷元（GA）降低多柔比星（DOX）心脏毒性的作用机制。**方法**　将36只小鼠随机分为对照组（CON组，隔天尾静脉注射等体积生理盐水+每天灌胃等体积生理盐水）、DOX组（隔天尾静脉注射3 mg/kg DOX）和GDOX组（每天灌胃100 mg/kg GA+隔天尾静脉注射3 mg/kg DOX），每组12只，连续给药/生理盐水15 d。收集小鼠心脏组织进行RNA-Seq转录组学测序和4D-Label-free定量蛋白质组学分析，筛选差异表达基因和蛋白并对其进行京都基因与基因组百科全书（KEGG）富集分析。测定小鼠心脏组织中爱帕琳肽（Apelin）、磷脂酰肌醇3-激酶（PI3K）和蛋白激酶B（Akt）的mRNA和蛋白表达水平及PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平进行验证。将H9c2心肌细胞分为对照组（CON组）、DOX组（2 μmol/L）和GDOX组（2 μg/mL GA+2 μmol/L DOX），测定细胞存活率及细胞中糖酵解关键物质水平。**结果**　筛选得到6条转录组学与蛋白质组学的共同通路，包括Apelin信号通路、PI3K-Akt信号通路、胰岛素抵抗等；其中以Apelin、PI3K-Akt信号通路中富集到的基因数目最多。靶点验证实验结果显示，与CON组比较，DOX组小鼠心脏组织中Apelin、PI3K和Akt的mRNA相对表达量和蛋白表达水平，以及PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）；与DOX组比较，GDOX组小鼠心脏组织中Apelin、PI3K和Akt的mRNA相对表达量及PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。细胞实验表明，与CON组比较，DOX组细胞存活率显著降低（$P<0.05$），细胞中葡萄糖相对摄取量以及丙酮酸、乳酸的相对生成量均显著增加（$P<0.05$），ATP相对生成量显著减少（$P<0.05$）；与DOX组比较，GDOX组细胞存活率显著升高（$P<0.05$），细胞中丙酮酸、乳酸的相对生成量均显著减少（$P<0.05$）。**结论**　GA可能是通过上调心脏组织中Apelin、PI3K和Akt的mRNA及其蛋白表达，调控糖酵解过程，进而改善DOX引起的心脏毒性作用。

关键词　银杏黄酮苷元；多柔比星；心脏毒性；转录组学；蛋白质组学；减毒机制

Mechanism of *Ginkgo* flavone aglycone in alleviating doxorubicin-induced cardiotoxicity based on transcriptomics and proteomics

TU Yujie[1,2], CAI Ying[1,2], CHENG Xueyi[1,2], SUN Jia[1], PAN Jie[3], LIU Chunhua[3], LI Yongjun[2,3], HUANG Yong[3], ZHENG Lin[1], LU Yuan[1]*[1. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants/Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China]

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the mechanism by which *Ginkgo* flavone aglycone (GA) reduces the cardiotoxicity of doxorubicin (DOX) based on transcriptomics and proteomics. **METHODS** Thirty-six mice were randomly assigned to control group (CON group, tail vein injection of equal volume of physiological saline every other day+daily intragastric administration of an equal volume of physiological saline), DOX group (tail vein injection of 3 mg/kg DOX every other day), and GDOX group (daily intragastric administration of 100 mg/kg GA+tail vein injection of 3 mg/kg DOX every other day), with 12 mice in each group. The administration of drugs/physiological saline was continued for 15 days. Mouse heart tissues were collected for RNA-Seq transcriptomic sequencing and 4D-

Δ **基金项目** 贵州省科技计划项目（No.黔科合基础-ZK〔2022〕一般374，No.黔科合平台人才-CXTD〔2023〕019）；贵州省高层次创新型人才项目（No.黔科合平台人才-GCC〔2023〕036）

＊ **第一作者** 硕士研究生。研究方向：中药药效物质基础。E-mail：2739462030@qq.com

\# **通信作者** 副教授，硕士生导师，博士。研究方向：中药药效物质基础。E-mail：luyuan@gmc.edu.cn

Label-free quantitative proteomic analysis to screen differentially expressed genes and proteins, which were then subjected to Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis. The expression levels of Apelin peptide (Apelin), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), and protein kinase B (Akt) mRNA and protein in mouse heart tissues, as well as the phosphorylation levels of PI3K and Akt proteins, were verified. H9c2 cardiomyocytes were divided into control group (CON group), DOX group (2 μmol/L), and GDOX group (2 μg/mL GA+2 μmol/L DOX) to determine cell viability and the levels of key glycolytic substances in the cells. **RESULTS** Six common pathways were identified from transcriptomics and proteomics, including the Apelin signaling pathway, the PI3K-Akt signaling pathway, and insulin resistance. Among them, the Apelin and PI3K-Akt signaling pathways were the most enriched in terms of gene numbers. Target validation experiments showed that compared to the CON group, the relative expression of Apelin, PI3K and Akt mRNA and protein levels, as well as the phosphorylation levels of PI3K and Akt proteins, were significantly decreased in the DOX group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The relative expression of Apelin, PI3K and Akt mRNA and the phosphorylation levels of PI3K and Akt proteins were significantly increased in the GDOX group as compared with the DOX group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Cellular experiments indicated that compared to the CON group, cell viability in the DOX group was significantly decreased ($P<0.05$), the relative uptake of glucose and the relative production of pyruvate and lactate were significantly increased ($P<0.05$), and the relative production of ATP was significantly reduced ($P<0.05$). Compared to the DOX group, cell viability in the GDOX group was significantly increased ($P<0.05$), and the relative production of pyruvate and lactate was significantly reduced ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** GA may alleviate DOX-induced cardiotoxicity by upregulating the mRNA and protein expression of Apelin, PI3K, and Akt in heart tissues, and regulating glycolytic processes.

KEYWORDS *Ginkgo* flavone aglycone; doxorubicin; cardiotoxicity; transcriptomics; proteomics; toxicity reduction mechanism

多柔比星（doxorubicin，DOX）又称阿霉素，是一种具有抗癌作用的蒽环类广谱抗生素，临床上常用于治疗多种恶性实体瘤。然而，由于DOX严重的剂量依赖性心脏毒性作用，导致其临床应用受到极大限制[1]。银杏黄酮苷元（*Ginkgo* flavone aglycone，GA）是一种从银杏提取物中以酶水解法获取的银杏黄酮苷类的新型提取物，主要活性成分为槲皮素、山柰酚和异鼠李素，三者含量高于90%[2]。本课题组前期在GA抗肝癌荷瘤小鼠的药效研究中发现，GA具有协同抗肿瘤作用和降低DOX心脏毒性的作用，可以降低DOX组小鼠的心脏指数和血清中B型钠尿肽（B-type natriuretic peptide，BNP）、N末端脑钠肽前体（N-terminal probrain natriuretic peptide，NT-pro BNP）水平，改善心脏组织病变及心肌纤维化程度[3]，但相关机制尚不明确，亟须深入研究。

中药具有多途径、多靶点的作用特点，传统的单一组学研究很难对其调控机制进行系统、全面的解释；转录组学和蛋白质组学联合分析，可以从不同层面、不同角度解析药物对疾病的调控作用，揭示基因在转录或翻译等过程中的调控规律，得到更加完整的生物体表达信息[4]。基于此，本研究采用小鼠心脏组织进行RNA-Seq转录组测序和4D-Label-free定量蛋白质组学检测，筛选差异基因和蛋白并对其进行关联分析，然后采用实时定量逆转录聚合酶链反应（real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction，qRT-PCR）、Western blot法对关键信号通路中的重要靶点进行验证，最后采用细胞实验进一步明确药物调控靶点参与的生物学过程，以揭示GA降低DOX诱导的心脏毒性的可能作用机制。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有：NanoElute LC型液相色谱仪、TimsTOF Pro型捕集离子淌度质谱仪（美国Bruker公司），Agilent Bioanalyzer 4150型自动化电泳系统（美国Agilent公司），Allegra 64R型低温高速离心机（美国Beckman Coulter公司），Variskan Lux型多功能酶标仪（美国Thermo Fisher Scientific公司），TS100型倒置显微镜（日本Nikon公司），EL204型电子天平[梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司]，Q225型荧光定量PCR仪（武汉莫纳生物科技有限公司）。

1.2 主要药品与试剂

盐酸DOX原料药（批号NO625A，纯度>98%）购自大连美仑生物技术有限公司；GA提取物（槲皮素、山柰酚、异鼠李素含量分别为47.28%、43.42%、1.93%）由贵州省生化工程中心何珺副教授惠赠；CCK-8试剂盒（批号GK10001）购自美国GlpBio公司；葡萄糖、丙酮酸试剂盒（批号分别为20230922、2023091）均购自南京建成生物工程研究所；乳酸试剂盒（批号KTB1100）购自美国Abbkine公司；三磷酸腺苷（adenosine triphosphate，ATP）试剂盒（批号072523231121）购自上海碧云天生物技术股份有限公司；Pierce™快速BCA蛋白检测试剂盒（批号A53225）购自美国Thermo Fisher Scientific公司；鼠源甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehy-

drogenase，GAPDH）单克隆抗体、兔源爱帕琳肽（Apelin）单克隆抗体、兔源磷脂酰肌醇3-激酶（phosphoinositide 3-kinase，PI3K）单克隆抗体（批号分别为ab8245、ab181786、ab191606）均购自英国Abcam公司；兔源蛋白激酶B（protein kinase B，Akt）抗体（批号10176-2-AP）购自武汉三鹰生物技术有限公司；兔源磷酸化PI3K（p-PI3K）单克隆抗体、兔源磷酸化Akt（p-Akt）单克隆抗体（批号分别为4228、4060）均购自美国Cell Signaling Technology公司；辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗兔免疫球蛋白G（IgG）二抗、HRP标记的山羊抗鼠IgG二抗（批号分别为E-AB-1003、E-AB-1001）均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司；DMEM培养基、胎牛血清均购自美国Gibco公司；甲酸、甲醇和乙腈均为质谱纯。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级雄性ICR小鼠，共36只，体重18～22 g，购自长沙市天勤生物技术有限公司，生产许可证号为SCXK（湘）2022-0011。动物均饲养于温度18～25 ℃、相对湿度50%～70%的环境中，饲养期间小鼠自由进食、饮水。本实验方案已通过贵州医科大学实验动物伦理委员会批准，批准编号为2101200。

1.4 细胞

大鼠心肌细胞H9c2购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

2 方法与结果

2.1 动物分组、造模、给药与样本收集

36只小鼠经过7 d适应性喂养后，按随机数字表法分为正常对照组（CON组）、模型组（DOX组）和治疗组（GDOX组），每组12只。除CON组外，DOX组和GDOX组小鼠隔天尾静脉注射3 mg/kg的DOX药液1次，并且GDOX组小鼠在DOX组的基础上每天灌胃100 mg/kg的GA混悬液1次；CON组小鼠隔天尾静脉注射+每天灌胃等体积生理盐水。连续给药/生理盐水15 d。末次给药/生理盐水后，取出小鼠心脏组织，用无RNA酶磷酸盐缓冲液清洗干净后，放于－80 ℃下保存，备用。本课题组前期通过生化试剂盒检测了按上述方法分组、给药后小鼠血清中天冬氨酸转氨酶、肌酸激酶、肌酸激酶同工酶和乳酸脱氢酶水平，已证实了GA具有减轻DOX心脏毒性的药效作用[5]，故本实验获取的各组小鼠心脏组织可用于组学分析及验证实验。

2.2 小鼠心脏组织的转录组学研究

2.2.1 RNA提取、测序及序列比对

分别从“2.1”项下CON组、DOX组和GDOX组中随机选取3只小鼠的心脏组织（每只约50 mg），冰上解冻后加入1 mL的Trizol试剂，匀浆，并于冰上静置10 min以充分提取总RNA。用Oligo（dT）磁珠富集mRNA并将其打断，以mRNA碎片作为合成cDNA第1链的模板，在此基础上合成cDNA的第2条链。对双链cDNA进行纯化、修复，构建cDNA文库，上机测序。将原始序列（raw reads）去除低质量碱基序列后获得高质量序列（clean reads），通过HISAT2软件对clean reads和参考基因组进行序列比对，获取其在参考基因组上的位置信息。转录组学测序工作由上海中科新生命生物科技有限公司协助完成。

2.2.2 差异表达基因筛选及功能分析

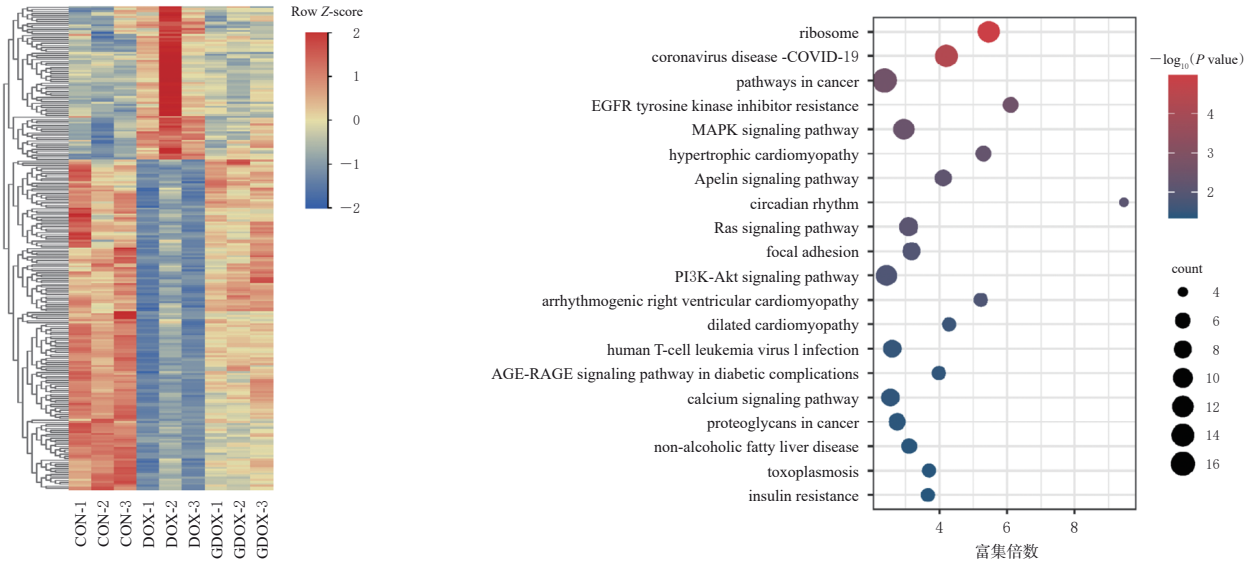
利用R包DESeq2对组间基因进行筛选，筛选条件为差异倍数（fold change，FC）＞1.2或FC＜0.8且P＜0.05。结果显示，与正常小鼠比较，经DOX作用后基因发生显著改变且经GA治疗后回调的差异表达基因（differentially expressed genes，DEGs）有242个。其中，DOX组显著上调而GDOX组显著下调的DEGs有72个，DOX组显著下调而GDOX组显著上调的DEGs有170个。

采用微生信在线平台（https://www.bioinformatics.com.cn）绘制DEGs的聚类热图（图1A），展示DEGs在不同组间的表达量变化。将得到的DEGs导入DAVID数据库（https://david.ncifcrf.gov/）进行京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）通路富集分析，共富集得到31条代谢通路。按照P值大小，选取排前20名的条目，并通过HiPlot网站（https://hiplot.com.cn/home/index.html）进行可视化分析。结果显示，GA减轻DOX诱导的心脏毒性的机制涉及肥厚型心肌病（hypertrophic cardiomyopathy）、Apelin信号通路（Apelin signaling pathway）、PI3K-Akt信号通路（PI3K-Akt signaling pathway）等，详见图1B。

2.3 小鼠心脏组织的蛋白质组学研究

2.3.1 样品处理及数据采集

分别从“2.1”项下CON组、DOX组和GDOX组中随机选取3只小鼠的心脏组织（每只约50 mg），于冰上剪碎，加入适量SDT裂解液在冰上匀浆后静置5 min，然后在4 ℃下以12 000 r/min离心10 min，收集上清液并于－80 ℃保存。采用过滤器辅助样品制备法对获得的肽段进行洗脱[6]，经真空冷冻干燥后的肽段用40 μL 0.1%甲酸复溶，上机采集数据。仪器检测条件如下：流动相A为0.1%甲酸-水、流动相B为0.1%甲酸-乙腈-水，梯度洗脱（0～3.00 min，5%B→8%B；3.00～43.00 min，8%B→26%B；43.00～48.00 min，26%B→40%B；48.00～50.00 min，40%B→90%B；50.00～60.00 min，90%B）；流速为300 nL/min；正离子模式下离子源电压为1.5 kV，扫描范围为质荷比（m/z）100～1 700。蛋白质组学测序工作由上海中科新生命生物科技有限公司协助完成。



A. DEGs的聚类热图　　B. DEGs的KEGG富集分析

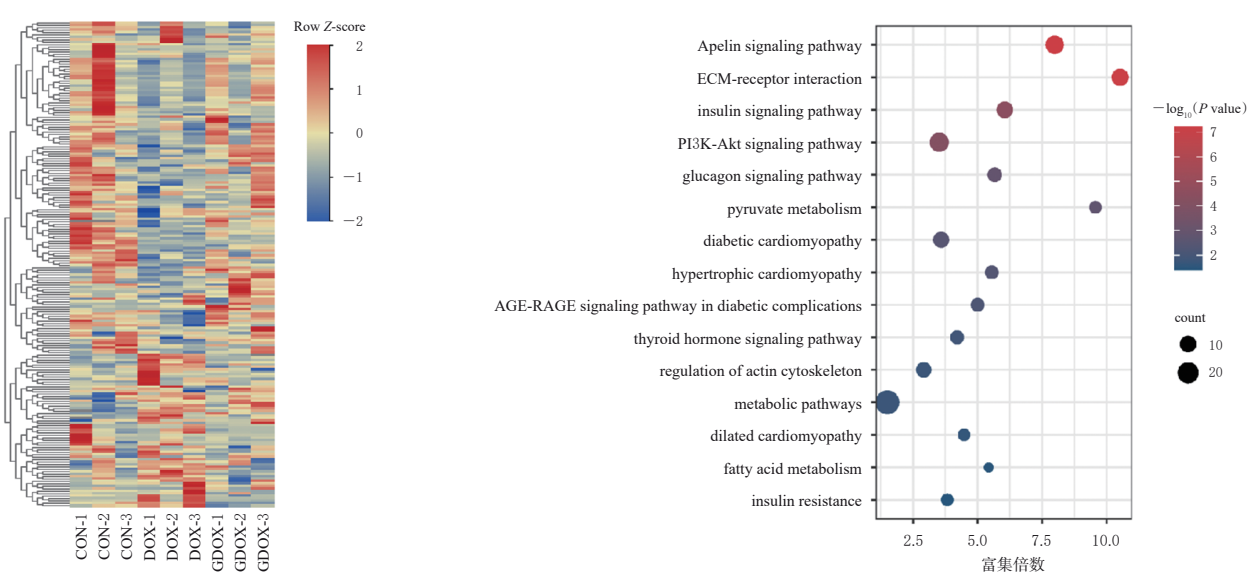
图1　各组小鼠心脏组织的转录组学分析结果

2.3.2　差异表达蛋白筛选与功能分析

首先采用UniProt数据库（https://www.uniprot.org/）和NCBI数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）将肽段序列与蛋白质匹配，用MaxQuant软件（版本号1.6.14）对所有蛋白质进行鉴定和定量分析，以肽段和蛋白的错误发生率（false discovery rate，FDR）≤0.01为条件分别筛选可信肽段和蛋白质，获得的数据按照FC＞1.2或FC＜0.8为条件筛选差异表达蛋白（differentially expressed proteins，DEPs）。结果显示，与CON组比较，DOX组上调而GDOX组下调的DEPs有86个；同时，DOX组下调而GDOX组上调的DEPs有114个。通过层次聚类算法对各组小鼠心脏组织的DEPs进行归类（图2A），结果显示，各组内的DEPs相似，而组间有明显的差异。采用DAVID数据库对得到的DEPs进行KEGG富集分析，共富集得到57条代谢通路，其中有15条与心肌病及能量代谢相关，主要涉及Apelin信号通路（Apelin signaling pathway）、PI3K-Akt信号通路（PI3K-Akt signaling pathway）、丙酮酸代谢（pyruvate metabolism）等通路，详见图2B。

2.4　小鼠心脏组织的转录组学与蛋白质组学联合分析

将“2.2”和“2.3”项下筛选得到的DEGs和DEPs所富集到的通路导入Draw Venn Diagram网站（https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/）进一步取交集，得到6条转录组学与蛋白质组学的共同通路，分别为Apelin信号通路、PI3K-Akt信号通路、胰岛素抵抗、糖尿病并发症中晚期糖基化终产物及其受体（AGE-RAGE）信号通路、肥厚型心肌病和扩张型心肌病，其中以Apelin信号通路和PI3K-Akt信号通路中富集到的基因数目最



A. DEPs的聚类热图　　B. DEPs的KEGG富集分析

图2　各组小鼠心脏组织的蛋白质组学分析结果

多，说明这2条信号通路可能在GA降低DOX诱导的心脏毒性中发挥重要作用，故后续本课题组针对这2条信号通路中的重要靶点（Apelin、PI3K和Akt）进行验证。

2.5 小鼠心脏组织中Apelin、PI3K和Akt mRNA表达的检测

采用qRT-PCR法检测。取“2.1”项下每组3只小鼠心脏组织，分别按RNA提取试剂盒的说明书提取组织中总RNA，经检验合格后，按逆转录试剂盒方法将RNA逆转录为cDNA。以cDNA为模板进行PCR扩增，引物序列设计由四维加生物科技（武汉）有限公司完成，详见表1。扩增体系如下（共10 μL）：×SYBR® Green Pro Taq HS Premix 5 μL，上、下游引物各1 μL，DNA template 2 μL，H_2O 1 μL。PCR扩增条件如下：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s，60 ℃退火30 s，65～95 ℃延伸5 s，循环40次。以GAPDH作为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算Apelin、PI3K和Akt mRNA的相对表达量。应用GraphPad Prism 8软件对数据进行分析。本实验数据均符合正态分布，以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验，检验水准$\alpha=0.05$。结果显示，与CON组比较，DOX组小鼠心脏组织中Apelin、PI3K和Akt的mRNA相对表达量均显著降低（$P<0.01$）；与DOX组比较，GDOX组小鼠心脏组织中Apelin、PI3K和Akt的mRNA相对表达量均显著升高（$P<0.01$）。结果见表2。

表1 引物序列及产物长度

基因名称	引物序列（5′→3′）	产物长度/bp
GAPDH	正向引物：TGTTTCCTCGTCCCGTAGA	106
	反向引物：ATCTCCACTTTGCCACTGC	
Apelin	正向引物：CTGGGTTTAGTGAAGCGGGT	118
	反向引物：TTAGGGACTATTCCGGGCCA	
Akt	正向引物：GCCGCCTGATCAAGTTCTCC	115
	反向引物：TTCAGATGATCCATGCGGGG	
PI3K	正向引物：CACCTTAAATGGTGAGCACGG	169
	反向引物：ACACCCCAGCCAATCAAGTC	

表2 各组小鼠心脏组织中Apelin、PI3K和Akt的mRNA相对表达量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	Apelin mRNA	PI3K mRNA	Akt mRNA
CON组	1.04±0.06	1.04±0.06	1.10±0.09
DOX组	0.41±0.01[a]	0.41±0.04[a]	0.56±0.05[a]
GDOX组	0.71±0.04[b]	0.68±0.04[b]	0.87±0.06[b]

a：与CON组比较，$P<0.01$；b：与DOX组比较，$P<0.01$。

2.6 小鼠心脏组织中Apelin、p-PI3K、PI3K、p-Akt和Akt蛋白表达的检测

采用Western blot法检测。取“2.1”项下每组3只小鼠心脏组织，加入蛋白提取剂，冰浴彻底匀浆后，在4 ℃下以12 000 r/min离心5 min，收集上清液，即为总蛋白溶液。用BCA试剂盒测定总蛋白浓度后，于98 ℃条件下加热变性。每组取10 μL变性蛋白上样进行电泳，电泳条件为浓缩胶电压80 V，分离胶电压120 V，待条带到达玻璃板底部时结束电泳。将聚偏二氟乙烯（PVDF）膜于甲醇中活化1 min，设定电流为250 mA，于冰浴中转膜60 min。结束后，将PVDF膜放入适量5%脱脂奶粉中，于脱色摇床上振荡封闭1 h。分别加入GAPDH（稀释度为1∶10 000）、Apelin（稀释度为1∶2 000）和PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt（稀释度均为1∶1 000）一抗，4 ℃孵育过夜。用TBST清洗5次，加入相应二抗（稀释度均为1∶3 000），孵育1 h后，用TBST再次清洗5次。在PVDF膜上加高强度化学发光混合溶液对条带进行曝光显影，保存扫描的胶片。用Image J软件分析目标条带的灰度值，通过目的蛋白与GAPDH（内参）蛋白条带灰度值的比值计算各目的蛋白的表达水平，以磷酸化蛋白与未磷酸化蛋白的表达水平比值表示该蛋白的磷酸化水平。按“2.5”项下方法进行统计学分析。结果见图3、表3。

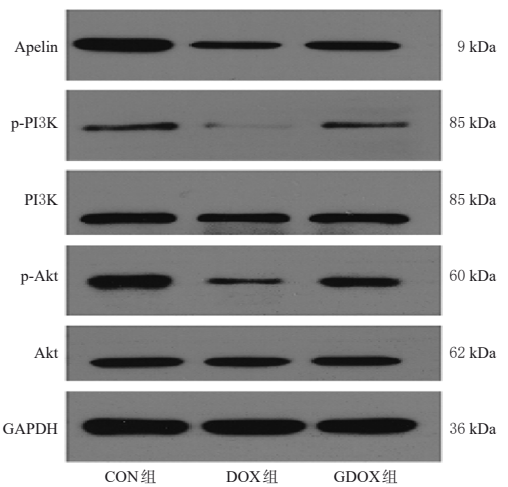


图3 各组小鼠心脏组织中Apelin、p-PI3K、PI3K、p-Akt和Akt蛋白表达的电泳图

表3 各组小鼠心脏组织中Apelin、PI3K蛋白表达水平和PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	Apelin/GAPDH	p-PI3K/PI3K	PI3K/GAPDH	p-Akt/Akt	Akt/GAPDH
CON组	1.02±0.06	0.71±0.18	0.96±0.04	0.99±0.01	0.98±0.09
DOX组	0.65±0.16[a]	0.13±0.05[a]	0.75±0.10[a]	0.36±0.27[a]	0.83±0.10
GDOX组	0.77±0.11	0.44±0.18[b]	0.89±0.02	0.83±0.09[b]	0.90±0.06

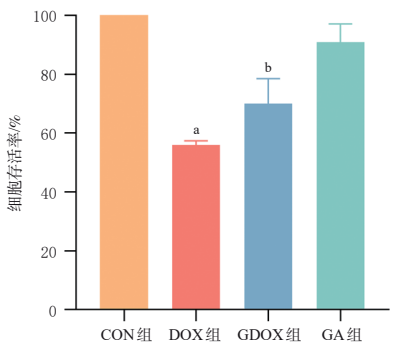
a：与CON组比较，$P<0.05$；b：与DOX组比较，$P<0.05$。

结果显示，与CON组比较，DOX组小鼠心脏组织中Apelin、PI3K蛋白表达水平和PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平均显著降低（$P<0.05$）；与DOX组比较，GDOX组小鼠心脏组织中PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平均显著升高（$P<0.05$）。

2.7 DOX和GA对H9c2细胞活力的影响

将H9c2细胞置于含10%胎牛血清和1%双抗（青霉素-链霉素）的DMEM培养基中，于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养。取对数生长期的H9c2细胞接种至96孔板中，细胞密度为1×10^5个/mL，每孔90 μL。于培养箱中孵育24 h后，将细胞分为CON组（不给药，即对照组）、DOX

组（2 μmol/L的DOX溶液，浓度根据预实验结果设置）、GA组（2 μmol/L GA溶液，浓度根据预实验结果设置）和GDOX组（2 μmol/L的DOX溶液+2 μg/mL的GA溶液，浓度根据预实验结果设置），每组设置3个复孔；另设不加细胞和不加药的空白孔。加药后，继续孵育24 h。培养结束后，每孔加入10 μL CCK-8溶液，培养2 h后用酶标仪在450 nm波长处检测各孔吸光度（A）值，并计算细胞存活率。细胞存活率=（$A_{给药组}-A_{空白组}$）/（$A_{对照组}-A_{空白组}$）×100%。按“2.5”项下方法进行统计学分析。结果见图4。



a：与CON组比较，$P<0.01$；b：与DOX组比较，$P<0.05$。

图4　细胞存活率测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

结果显示，与CON组比较，DOX组细胞存活率显著降低（$P<0.01$）；与DOX组比较，GDOX组细胞存活率显著升高（$P<0.05$）；GA对细胞存活率的影响不明显。

2.8　H9c2细胞中糖酵解关键物质的测定

取“2.7”项下各组细胞（未取GA组细胞），于液氮中速冻5 min后，再于冰浴中超声（功率100 W超声5 s、间隔10 s，共超声10 min）破碎。按各试剂盒说明书测定各组细胞中葡萄糖、丙酮酸、乳酸和ATP的水平。按“2.5”项下方法进行统计学分析。结果见表4。

表4　各组H9c2细胞中葡萄糖、丙酮酸、乳酸和ATP水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，%）

组别	葡萄糖相对摄取量	丙酮酸相对生成量	乳酸相对生成量	ATP相对生成量
CON组	4.05±1.22	0.61±0.08	20.87±0.08	2.26±0.06
DOX组	7.25±0.72[a]	0.80±0.07[a]	37.12±0.23[a]	1.93±0.03[a]
GDOX组	5.05±0.33	0.65±0.06[b]	29.21±0.83[b]	2.01±0.05

a：与CON组比较，$P<0.05$；b：与DOX组比较，$P<0.05$。

结果显示，与CON组比较，DOX组细胞中葡萄糖相对摄取量以及丙酮酸、乳酸的相对生成量均显著增加（$P<0.05$），ATP相对生成量显著减少（$P<0.05$）；与DOX组比较，GDOX组细胞中丙酮酸、乳酸的相对生成量均显著减少（$P<0.05$）。

3　讨论

本课题采用小鼠心脏组织进行RNA-Seq转录组学测序和4D-Label-free定量蛋白质组学检测，从基因与蛋白水平2个层面寻找差异基因和差异蛋白，并进行通路富集分析。转录组学和蛋白质组学共同聚焦到6条通路，包括Apelin信号通路、PI3K-Akt信号通路、胰岛素抵抗、AGE-RAGE信号通路、肥厚型心肌病和扩张型心肌病。其中，Apelin信号通路、PI3K-Akt信号通路富集到的基因数目最多。

Apelin信号通路是一种由Apelin与其受体血管紧张素Ⅱ1型受体相关蛋白（Apelin receptor angiotensin receptor-like 1，APJ）结合而激活的信号传导途径。Apelin/APJ信号通路在中枢神经系统和外周组织中广泛表达，参与多种生物过程，包括葡萄糖代谢、免疫功能和体液稳态等，其主要生理功能可能与心血管作用有关[7]。此外，Apelin可诱导外周和冠状血管扩张，同时增加心输出量和收缩力[8]。PI3K-Akt信号通路通过激活参与细胞周期转变和细胞增殖的下游效应因子，在调节细胞存活、代谢、增殖和血管生成等许多生理过程中具有重要作用[9]。有研究发现，激活PI3K-Akt信号通路可以减少心肌缺血再灌注损伤诱导的心肌细胞凋亡[10]。通过分析通路中p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt比值，可以证明药物是否改变蛋白的磷酸化水平，从而激活信号通路[11]。因此本研究对Apelin和PI3K-Akt信号通路中的重要靶点的蛋白水平进行检测，发现DOX组小鼠心脏组织中Apelin、PI3K、Akt蛋白表达水平和p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt比值均低于CON组；GA干预后，上述蛋白水平及比值均不同程度升高。同时本课题组对GA和DOX干预后小鼠心脏组织中Apelin、PI3K和Akt的mRNA表达水平进行测定，发现DOX组小鼠心脏组织中上述mRNA的表达下调，而GA干预后上述mRNA的表达回调。这说明GA很可能作用于Apelin信号通路和PI3K-Akt信号通路来降低DOX诱导的心脏毒性。

研究表明，Apelin信号通路[12]和PI3K-Akt信号通路[13]会影响细胞能量代谢。机体发生心脏毒性时，线粒体功能受损，脂肪酸的β-氧化受到破坏[14]，心肌细胞对葡萄糖的利用增加[15]，葡萄糖耗氧量减少，产生的ATP也减少[16]。因此本课题组推测GA可能会调节心肌细胞糖酵解中关键物质，如葡萄糖、丙酮酸、乳酸和ATP的水平。为了验证这一猜想，本实验探究了DOX和GA对H9c2细胞的毒性作用及对关键能量物质的影响。结果显示，DOX可使细胞中葡萄糖相对摄取量以及丙酮酸、乳酸的相对生成量均显著增加，ATP相对生成量显著减少；而GA干预后细胞中丙酮酸、乳酸的相对生成量均显著减少。

综上所述，GA可能通过调节心脏组织中Apelin、PI3K和Akt的mRNA及其蛋白表达，调控糖酵解过程，进而改善DOX引起的心脏毒性作用。本研究仍存在一定局限性，如实验中测定的样本量较少、实验结果可能存在偏差、具体作用靶点未明确等，有待后续完善。

参考文献

[1] RAWAT P S, JAISWAL A, KHURANA A, et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: an update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management[J]. Biomedicine Pharmacother, 2021, 139: 111708.

[2] 宋浩静,杜亚斌,于泽芳,等. UPLC-MS/MS法多组分测定研究银杏叶提取物注射液的质量一致性[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(19): 2407-2411.
SONG H J, DU Y B, YU Z F, et al. Determination of the mass consistency of extract of *Ginkgo biloba* leaves injection of different manufacturers by UPLC-MS/MS method [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2019, 35(19): 2407-2411.

[3] 宋忠军,朱晓青,何艳,等. 银杏黄酮苷元对多柔比星治疗肝癌的增效减毒作用[J]. 中国药房, 2022, 33(16): 1937-1942, 1949.
SONG Z J, ZHU X Q, HE Y, et al. Effects of increasing efficacy and decreasing toxicity of *Ginkgo* flavone aglycone on doxorubicin in the treatment of liver cancer[J]. China Pharm, 2022, 33(16): 1937-1942, 1949.

[4] LEE S Y, LEE H, YUN S H, et al. Application of multiomics technology for the elucidation of antipneumococcal activity of 3-acyl-2-phenylamino-1, 4-dihydroquinolin-4-one (APDQ) derivative against *Streptococcus pneumoniae*[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 20685.

[5] 蔡英,钱丽,王开靓,等. 银杏黄酮苷元减轻多柔比星心脏毒性的作用机制[J]. 中国药房, 2024, 35(6): 659-664.
CAI Y, QIAN L, WANG K L, et al. Mechanism of *Ginkgo* flavonoid aglycone against doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. China Pharm, 2024, 35(6): 659-664.

[6] DAVALIEVA K, KIPRIJANOVSKA S, DIMOVSKI A, et al. Comparative evaluation of two methods for LC-MS/MS proteomic analysis of formalin fixed and paraffin embedded tissues[J]. J Proteomics, 2021, 235: 104117.

[7] KINJO T, HIGASHI H, UNO K, et al. Apelin/apelin receptor system: molecular characteristics, physiological roles, and prospects as a target for disease prevention and pharmacotherapy[J]. Curr Mol Pharmacol, 2021, 14(2): 210-219.

[8] KUBA K, SATO T, IMAI Y, et al. Apelin and Elabela/Toddler; double ligands for APJ/Apelin receptor in heart development, physiology, and pathology[J]. Peptides, 2019, 111: 62-70.

[9] 杨嘉豪,崔瑞琴,周波,等. 温阳消饮方对慢性心力衰竭大鼠PI3K-Akt信号通路表达及相关凋亡蛋白的影响[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(1): 145-149.
YANG J H, CUI R Q, ZHOU B, et al. Effects of Wenyang xiaoyin formula on the expression of PI3K-Akt signal pathway and related apoptotic proteins in chronic heart failure rats[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(1): 145-149.

[10] YUE T T, CAO Y J, CAO Y X, et al. Shuxuening injection inhibits apoptosis and reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in rats through PI3K/Akt pathway[J]. Chin J Integr Med, 2024, 30(5): 421-432.

[11] 庞夏云,周瑞,宋若彤,等. 珠子参总皂苷对人宫颈癌细胞系HeLa增殖、凋亡及自噬的影响[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(14): 3848-3856.
PANG X Y, ZHOU R, SONG R T, et al. Effect of total saponins from Panacis Majoris Rhizoma on proliferation, apoptosis and autophagy of human cervical carcinoma HeLa cells[J]. China J Chin Mater Med, 2024, 49(14): 3848-3856.

[12] FENG J H, ZHAO H, DU M Z, et al. The effect of apelin-13 on pancreatic islet beta cell mass and myocardial fatty acid and glucose metabolism of experimental type 2 diabetic rats[J]. Peptides, 2019, 114: 1-7.

[13] ZHAO L G, LI P L, DAI Y, et al. Mibefradil alleviates high-glucose-induced cardiac hypertrophy by inhibiting PI3K/Akt/mTOR-mediated autophagy[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2020, 76(2): 246-254.

[14] DE JONG K A, LOPASCHUK G D. Complex energy metabolic changes in heart failure with preserved ejection fraction and heart failure with reduced ejection fraction[J]. Can J Cardiol, 2017, 33(7): 860-871.

[15] YUAN Y, FAN S M, SHU L X, et al. Exploration the mechanism of doxorubicin-induced heart failure in rats by integration of proteomics and metabolomics data[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 600561.

[16] LING G J, WANG X P, TAN N N, et al. Mechanisms and drug intervention for doxorubicin-induced cardiotoxicity based on mitochondrial bioenergetics[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 7176282.

（收稿日期：2024-06-25　修回日期：2024-10-12）
（编辑：林　静）