

引用:李家权,许锦,谭子富,方孝俊.黄芩苷通过调控铁死亡减轻H9c2细胞缺氧复氧损伤及其机制研究[J].中医导报,2025,31(2):13-18.

# 黄芩苷通过调控铁死亡减轻H9c2细胞缺氧复氧损伤及其机制研究\*

李家权<sup>1</sup>,许锦<sup>2</sup>,谭子富<sup>1</sup>,方孝俊<sup>1</sup>

(1.恩施土家族苗族自治州中心医院,湖北 恩施 445000;

2.恩施市中心医院,湖北 恩施 445000)

**[摘要]** 目的:研究黄芩苷通过铁死亡途径对H9c2心肌细胞缺氧复氧损伤的作用及机制。方法:采用Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>诱导大鼠H9c2心肌细胞铁死亡模型,随后用黄芩苷干预。采用试剂盒检测细胞活力、ROS、线粒体膜电位和Fe<sup>2+</sup>水平。Western blotting检测细胞PTGS2、NOX2和GPX4蛋白表达水平。PTGS2激动剂BUR1联合黄芩苷干预Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>诱导的细胞后,试剂盒检测细胞Fe<sup>2+</sup>水平。结果:80 μmol/L以内的黄芩苷对H9c2细胞无毒性。Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>诱导H9c2细胞铁死亡,表现为细胞ROS和Fe<sup>2+</sup>水平升高,线粒体膜电位坍塌,GPX4表达明显下降( $P<0.05$ )。黄芩苷干预后,Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>诱导的细胞ROS和Fe<sup>2+</sup>水平下降,线粒体膜电位恢复,GPX4表达明显升高( $P<0.05$ ),铁死亡进程被逆转。Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>诱导H9c2细胞后,PTGS2和NOX4表达明显升高( $P<0.05$ ),而黄芩苷干预后,Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>诱导的H9c2心肌细胞PTGS2和NOX4表达明显降低( $P<0.05$ )。黄芩苷与PTGS2和NOX4有很好的结合活性,结合能分别为-10.65和-8.82 kcal/mol。BUR1能够逆转黄芩苷抑制的Fe<sup>2+</sup>水平。结论:黄芩苷对Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>诱导H9c2细胞建立的缺氧复氧损伤模型铁死亡具有明确的恢复作用,其机制可能与其抑制PTGS2和NOX4蛋白表达有关。

**[关键词]** 缺血性心肌病;黄芩苷;铁死亡;大鼠H9c2心肌细胞;Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>;PTGS2;NOX4

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)02-0013-06

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.02.003

## Effect and Mechanism of Baicalin on Hypoxia-Reoxygenation Injury in H9c2 Cells Via Regulating Ferroptosis

LI Jiaquan<sup>1</sup>, XU jin<sup>2</sup>, TAN Zifu<sup>1</sup>, FANG Xiaojun<sup>1</sup>

(1.The Central Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture, Enshi Hubei 445000, China;

2.The Central Hospital of Enshi, Enshi Hubei 445000, China)

**[Abstract]** Objective: To investigate the effect and mechanism of baicalin on hypoxia-reoxygenation injury in H9c2 cells via regulating ferroptosis. Methods: Rat H9c2 cardiomyocytes hypoxia-reoxygenation injury model was constructed with Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, followed by baicalin intervention. Cell viability, ROS, mitochondrial membrane potential, and Fe<sup>2+</sup> levels were measured using assay kits. Western blotting was utilized to evaluate cell PTGS2, NOX2, and GPX4 protein expression levels. Cell Fe<sup>2+</sup> levels were examined using assay kits after baicalin intervention with PTGS2 agonist BUR1 following Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> induction. Results: Baicalin up to 80 μmol/L showed no toxicity to H9c2 cells. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> induced ferroptosis in H9c2 cells, characterized by elevated ROS and Fe<sup>2+</sup> levels, mitochondrial membrane potential collapse, and significant decrease in GPX4 expression ( $P<0.05$ ). Baicalin intervention led to decreased ROS and Fe<sup>2+</sup> levels induced by Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, restored mitochondrial membrane potential, markedly increased GPX4 expression ( $P<0.05$ ), and reversing the process of ferroptosis. After Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> induction in H9c2 cells, PTGS2 and NOX4 expression significantly increased ( $P<0.05$ ), while baicalin markedly reduced the expression of PTGS2 and NOX4 induced by Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> ( $P<0.05$ ). Baicalin exhibited good binding activity with PTGS2 and NOX4, with binding energies of -10.65 and -8.82 kcal/mol, respectively. BUR1 could reverse the baicalin-inhibited Fe<sup>2+</sup> levels. Conclusion: Baicalin demonstrates a clear therapeutic effect on ferroptosis in the hypoxia-reoxygenation injury model established by Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-induced

\*基金项目:湖北省中医药管理局科研项目(ZY2023F121)

通信作者:方孝俊,男,主任医师,研究方向为心血管疾病临床与基础研究

H9c2 cells, and its treatment mechanism may be associated with the inhibition of PTGS2 and NOX4 protein expression.

[Keywords] ischemic cardiomyopathy; baicalin; ferroptosis, rat H9c2 cardiomyocytes; Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; PTGS2; NOX4

缺血性心肌病(ischemic cardiomyopathy, ICM)是一种因冠状动脉疾病导致的心肌损伤和功能障碍性疾病,最终可导致心力衰竭<sup>[1]</sup>。ICM在全球范围内是一种严重的致死疾病,尤其在经济发达地区更为常见<sup>[2]</sup>。随着我国经济的快速发展,现代快节奏的生活和不健康的饮食习惯导致动脉粥样硬化、高血压和肥胖等发生增多,人们患上ICM的风险不断增加<sup>[3]</sup>。目前,对于ICM的治疗主要涵盖药物疗法、心脏再血管化手术及植入心脏起搏器等方式。然而,手术等侵入性疗法可能给患者带来极大损伤,长期使用β受体阻滞剂等药物也可能引发耐药性及多种不良反应<sup>[4]</sup>。因此,亟需进一步寻找ICM新的治疗策略。

ICM发病机制尚未完全阐明。疾病发生时,心肌细胞在缺氧缺血状态下发生线粒体功能障碍、过氧化脂质的累积和细胞膜的破裂,触发炎症反应和细胞凋亡,最终引发心肌细胞损伤和心功能减退<sup>[5]</sup>。铁死亡作为一种新型的程序性细胞坏死方式,在缺氧缺血条件下被认为是一种重要的细胞死亡途径<sup>[6]</sup>。研究表明,铁死亡可能是一种重要的病理生理途径,参与了心肌细胞的死亡和组织的损伤<sup>[7]</sup>。因此,干预心肌细胞的铁死亡可能为治疗ICM提供新的机会。

黄芩苷(baicalin, BAI)是中药黄芩的黄酮类成分之一,亦是黄芩发挥多方面中医临床功效的药效物质基础<sup>[8]</sup>。黄芩苷具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、保护肝脏和心血管系统,以及调节免疫等多种作用,这使其在医疗保健中具有广阔的应用前景<sup>[9]</sup>。研究显示,黄芩苷能够通过JAK/STAT和PI3K/Akt/NF-κB途径缓解心肌缺血/再灌注诱导的心肌凋亡和炎症<sup>[10-11]</sup>。此外,黄芩苷可促进骨肉瘤细胞的铁死亡,抑制铁死亡改善蛛网膜下腔出血后早期脑损伤<sup>[12-13]</sup>。本研究通过Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>诱导大鼠心肌H9c2细胞构建ICM体外模型,研究黄芩苷对其铁死亡进程的影响,并通过体外实验进行相关机制研究。

## 1 材 料

1.1 细胞 大鼠胚胎心肌细胞H9c2(批号:CL-0089)购自武汉普诺赛公司,使用含10% FBS和1%双抗的DMEM高糖培养基,在37℃的5%CO<sub>2</sub>环境中培养,细胞密度达到70%~80%时传代。

1.2 药物和试剂 黄芩苷(批号:B20570)购自上海源叶公司;Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>(批号:S817915)购自上海麦克林公司;CCK8(批号:G4103)、ROS(批号:G1706)、JC-1(批号:G1515)、PTGS2抗体(批号:GB111037)、NOX4(批号:GB11347)、GPX4(批号:GB124327)和GAPDH(批号:GB15002)均购自武汉赛维尔公司;FerroOrange(批号:F374)购自日本同仁化学研究所;BUR1(批号:HY-121025)购自美国MCE公司。

1.3 主要仪器 Heracell Vios 160i CR细胞培养箱(美国Thermo公司);DMi1和DM IL LED倒置显微镜(德国Leica公司);

SpectraMax iD5多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司)。

## 2 方 法

2.1 细胞活力检测 在96孔板中接种对数生长期的H9c2细胞,分别给予10.0、20.0、40.0、60.0、80.0、100.0和200.0 μmol/L黄芩苷,0.1% DMSO为空白对照,每个浓度设3个复孔,继续孵育24 h。药物干预后弃去培养基,每孔加入10 μL CCK8工作液。孵育2 h后,测定450 nm处的OD值,细胞活力(%)=(OD<sub>药物</sub>-OD<sub>空白</sub>)/(OD<sub>对照</sub>-OD<sub>空白</sub>)×100%。选择对H9c2心肌细胞无明显毒性作用的黄芩苷浓度进行后续实验。

2.2 造模及给药处理 取对数生长期的H9c2细胞,随机分为空白对照组、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>组,并由细胞活力检测实验结果选择安全给药浓度,即20.0 μmol/L黄芩苷组、40.0 μmol/L黄芩苷组和60.0 μmol/L黄芩苷组。Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>能够抑制细胞内部的氧传输和摄取,从而诱导与缺氧相似的环境。参考文献[14]方法构建体外心肌缺氧模型,除空白对照组外,其余各组均加入终浓度为2.5 mmol/L的Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>溶液孵育30 min使细胞缺氧,弃去培养液,继续孵育4 h使细胞复氧;随后给药组给予对应浓度黄芩苷,空白对照组和模型组给予0.1% DMSO,继续孵育24 h。BUR1逆转黄芩苷抑制的Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>诱导的H9c2细胞Fe<sup>2+</sup>水平实验设置空白对照组,模型组,40.0 μmol/L黄芩苷组,处理方式同上;BUR1组给予2.5 mmol/L的Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>缺氧诱导后,给予40.0 μmol/L黄芩苷及0.2 μmol/L BUR1。

2.3 细胞ROS水平检测 在24孔板中接种对数生长期的H9c2细胞,药物干预后弃去培养基,每孔加入250 μL稀释后的DCFH-DA工作液,孵育30 min。弃去DCFH-DA工作液,加入PBS,置于荧光显微镜下观察并拍照。采用Image-pro plus6.0软件对荧光结果进行半定量分析,并计算其对比空白对照组的相对表达。

2.4 细胞线粒体膜电位水平检测 在24孔板中接种对数生长期的H9c2细胞,药物干预后弃去培养基,加入JC-1染色缓冲液洗涤,随后加入培养基和JC-1染色工作液,混匀后孵育15 min。孵育结束后,弃上清,加入JC-1染色缓冲液洗涤,置于荧光显微镜下观察并拍照。采用Image-pro plus6.0软件对荧光结果进行半定量分析,并计算其对比空白对照组的相对表达。

2.5 细胞Fe<sup>2+</sup>检测 在24孔板中接种对数生长期的H9c2细胞,药物干预后弃去培养基,加入FerroOrange工作液,孵育30 min,置于荧光显微镜下观察并拍照。采用Image-pro plus 6.0软件对荧光结果进行半定量分析,并计算其对比空白对照组的相对表达。此外,取对数生长期的H9c2细胞,随机分为空白对照组、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>组、40.0 μmol/L黄芩苷组和0.2 μmol/L BUR1+40.0 μmol/L黄芩苷组。造模及检测方法与“2.2”方法一致。

2.6 Western blotting法检测细胞相关蛋白 收集药物干预

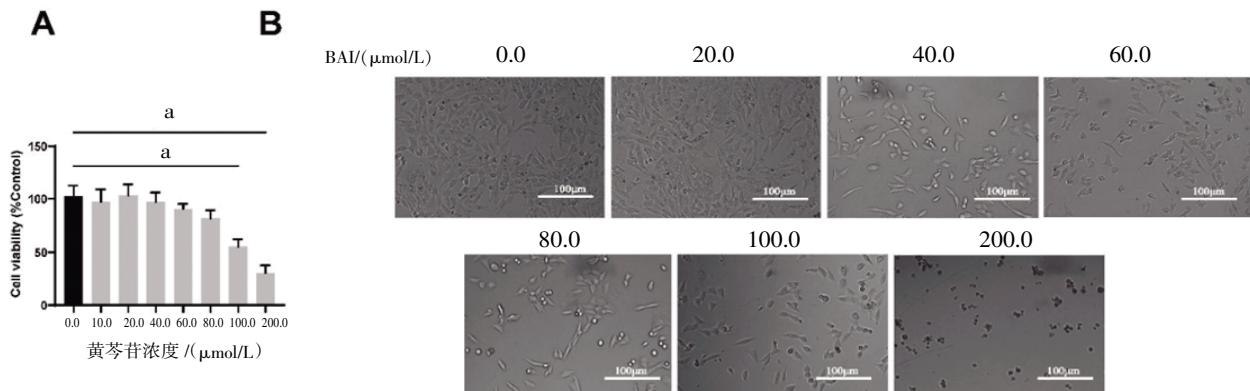
后的细胞,加入含有蛋白酶抑制剂的RIPA,置于冰上裂解。离心后收集上清液,BCA定量。SDS-PAGE凝胶按每孔30  $\mu$ g蛋白量上样,随后电泳及转膜。封闭结束后,与稀释后的PTGS2、NOX4、GPX4和GAPDH一抗4℃孵育12 h。孵育结束后,与对应的HRP标记的二抗孵育1 h。孵育结束后,滴加ECL显影液,置于化学发光成像系统中显影,结果导入ImageJ v1.8.0,以GAPDH为内参计算各蛋白的相对表达。

2.7 分子对接 通过PubChem平台获得黄芩苷的2D结构,导入ChemDraw3D v14.0获取黄芩苷的3D结构。通过PDB平台(<https://www.rcsb.org/>)获取PTGS2(5F19)和NOX4(4UT3)的3D蛋白结构,导入PyMOL v2.2.0标准化。将黄芩苷依次和PTGS2和NOX4蛋白的3D结构导入AutoDock v1.5.7进行对接、可视化处理和计算结合能。

2.8 数据处理与分析 采用SPSS 21.0进行统计学处理,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组比较采用One-Way ANOVA分析,两组间比较方差齐时采用LSD-*t*法,方差不齐时采用Dunnett's T3法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

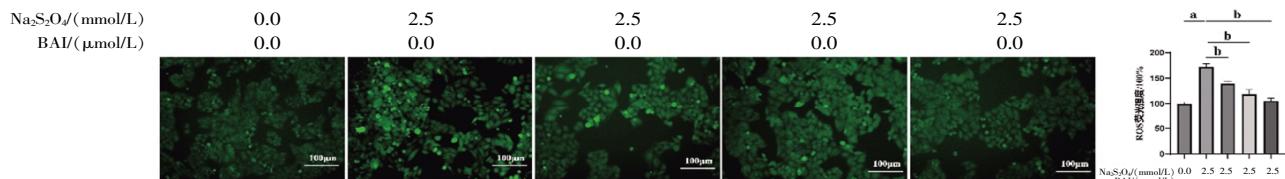
### 3 结 果

3.1 黄芩苷对H9c2细胞活力的影响 如表1及图1A所示,与



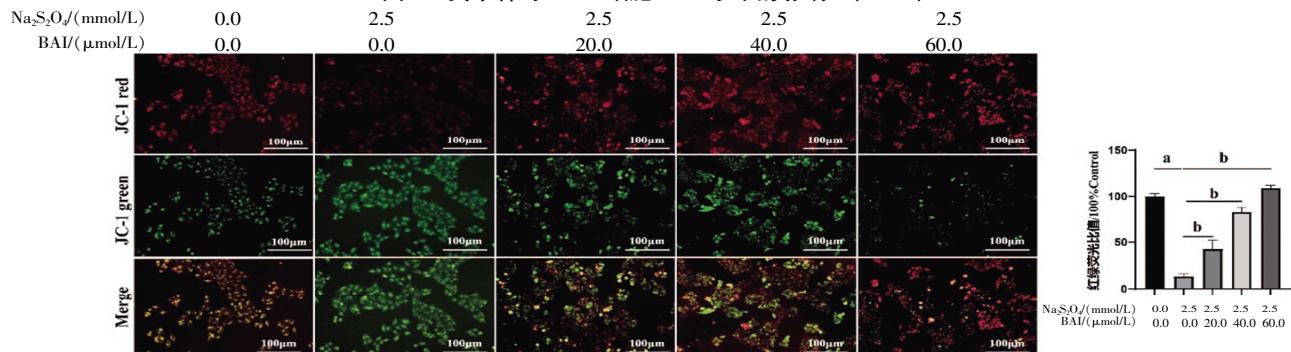
注:BAI为黄芩苷;A为细胞活力,与空白组比较,<sup>a</sup> $P < 0.0001$ ;B为各给药组细胞形态( $\times 200$ )。

图1 黄芩苷对H9c2细胞的影响



注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

图2 黄芩苷对H9c2细胞ROS水平的影响( $\times 200$ )



注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

图3 黄芩苷对H9c2细胞线粒体膜电位的影响( $\times 200$ )

空白对照组比较,80.0  $\mu$ mol/L以内的黄芩苷对H9c2细胞活力无明显影响,100.0和200.0  $\mu$ mol/L的黄芩苷则明显抑制H9c2细胞活力( $P < 0.0001$ )。如图1B所示,20.0、40.0和60.0  $\mu$ mol/L黄芩苷干预和未干预的H9c2细胞均呈现梭形,细胞质丰富;100.0和200.0  $\mu$ mol/L黄芩苷干预后,细胞变圆,死亡细胞增多。结果表明,黄芩苷对H9c2细胞的安全浓度在80.0  $\mu$ mol/L以内,后续实验选择20.0、40.0和60.0  $\mu$ mol/L为黄芩苷的给药浓度。

表1 黄芩苷对H9c2细胞活力的影响/100%空白对照组( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	细胞生存率/%
空白对照组	3	100.00 ± 13.14
10.0 $\mu$ mol/L黄芩苷组	3	97.06 ± 11.92
20.0 $\mu$ mol/L黄芩苷组	3	103.11 ± 10.33
40.0 $\mu$ mol/L黄芩苷组	3	97.11 ± 8.84
60.0 $\mu$ mol/L黄芩苷组	3	90.73 ± 4.54
80.0 $\mu$ mol/L黄芩苷组	3	81.86 ± 7.34
100.0 $\mu$ mol/L黄芩苷组	3	55.35 ± 6.82 <sup>a</sup>
200.0 $\mu$ mol/L黄芩苷组	3	30.69 ± 7.11 <sup>a</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ 。

3.2 黄芩苷对H9c2细胞ROS的影响 过高的ROS水平能够

导致细胞氧化应激,进而影响铁代谢和铁死亡过程。 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 干预后,H9c2细胞ROS水平升高;20.0、40.0和60.0  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 黄芩苷干预 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 诱导的H9c2细胞后,细胞ROS呈现逐步下降趋势( $P<0.001$ )。结果表明, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 能够刺激H9c2细胞ROS生成,而黄芩苷具有降低细胞ROS水平的作用。(见图2、表2)

表2 黄芩苷对H9c2细胞ROS、线粒体膜电位及 $\text{Fe}^{2+}$ 水平的影响/100%空白对照组 ( $\bar{x}\pm s$ )

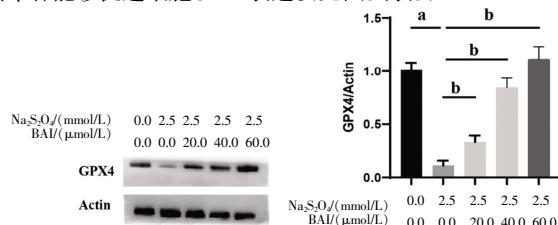
组别	n	ROS荧光强度	红绿荧光比值	$\text{Fe}^{2+}$ 水平
空白对照组	3	100.00 $\pm$ 3.00	100.00 $\pm$ 2.40	100.00 $\pm$ 4.50
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 组	3	171.80 $\pm$ 6.56 <sup>a</sup>	13.55 $\pm$ 2.40 <sup>a</sup>	843.2 $\pm$ 28.63 <sup>a</sup>
20.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 黄芩苷组	3	139.43 $\pm$ 4.05 <sup>b</sup>	42.53 $\pm$ 9.27 <sup>b</sup>	336.53 $\pm$ 23.47 <sup>b</sup>
40.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 黄芩苷组	3	118.53 $\pm$ 9.28 <sup>b</sup>	83.17 $\pm$ 5.00 <sup>b</sup>	213.4 $\pm$ 21.44 <sup>b</sup>
60.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 黄芩苷组	3	105.53 $\pm$ 5.35 <sup>b</sup>	108.87 $\pm$ 3.11 <sup>b</sup>	103.83 $\pm$ 5.56 <sup>b</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

3.3 黄芩苷对H9c2细胞线粒体膜电位的影响 线粒体膜电位的稳定与维持对细胞铁代谢和铁死亡过程至关重要。 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 干预后,H9c2细胞JC-1红色荧光强度下降,绿色荧光强度升高;20.0、40.0和60.0  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 黄芩苷干预 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 诱导的H9c2细胞后,细胞JC-1红色荧光强度逐步升高,绿色荧光强度逐步下降( $P<0.001$ 或 $P<0.0001$ )。结果表明, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 能够诱导细胞线粒体膜电位坍塌,而黄芩苷具有保护细胞线粒体膜电位的作用。(见图3、表2)

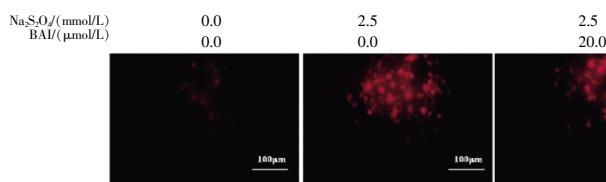
3.4 黄芩苷对H9c2细胞 $\text{Fe}^{2+}$ 的影响  $\text{Fe}^{2+}$ 水平增高是铁死亡发生的标志之一。 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 干预后,H9c2细胞 $\text{Fe}^{2+}$ 水平升高;20.0、40.0和60.0  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 黄芩苷干预 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 诱导的H9c2细胞后,细胞 $\text{Fe}^{2+}$ 呈现逐步下降趋势( $P<0.001$ )。结果表明, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 能够促进H9c2细胞 $\text{Fe}^{2+}$ 水平升高,而黄芩苷具有降低细胞 $\text{Fe}^{2+}$ 水平的作用。(见图4、表2)

3.5 黄芩苷对H9c2细胞GPX4表达的影响 铁死亡进程伴随着GPX4表达降低。与空白对照组比较, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 组GPX4表达明显下降( $P<0.001$ );与 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 组比较,20.0、40.0、60.0  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 黄芩苷组GPX4表达明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.001$ ),且下降趋势呈浓度梯度。结果表明, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 能够降低H9c2细胞GPX4表达,而黄芩苷能够促进细胞GPX4表达。(见图5、表3)



注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

图5 黄芩苷对H9c2细胞GPX4表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )



注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

图4 黄芩苷对H9c2细胞 $\text{Fe}^{2+}$ 水平的影响 ( $\times 200$ )

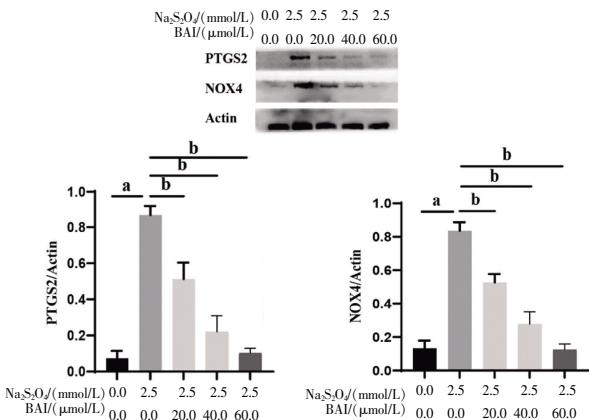
表3 各组细胞中GPX4、NOX4及PTGS2蛋白表达的比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	GPX4	NOX4	PTGS2
空白对照组	3	0.91 $\pm$ 0.10	0.13 $\pm$ 0.05	0.07 $\pm$ 0.04
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 组	3	0.11 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.84 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.87 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
20.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 黄芩苷组	3	0.33 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.53 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.51 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>
40.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 黄芩苷组	3	0.84 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.28 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	0.02 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>
60.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 黄芩苷组	3	1.12 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	0.12 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.10 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

3.6 黄芩苷对H9c2细胞PTGS2和NOX4的影响 与空白对照组比较, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 组PTGS2和NOX4表达明显升高( $P<0.001$ );与 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 组比较,20.0、40.0、60.0  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 黄芩苷组PTGS2和NOX4表达明显下降( $P<0.001$ ),且下降趋势呈浓度梯度。结果表明,黄芩苷可能通过抑制PTGS2和NOX4蛋白表达干预H9c2细胞铁死亡。(见图6、表3)

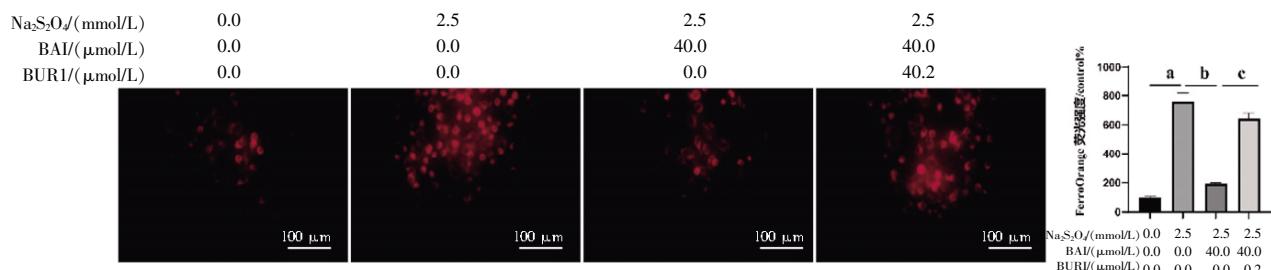
通过分子对接实验发现,黄芩苷与PTGS2结合位点的212位苏氨酸、214位组氨酸、382位天冬酰胺、385位酪氨酸、387位色氨酸和388位组氨酸等多个氨基酸形成氢键相互作用网络;黄芩苷与NOX4结合位点的多个氨基酸也形成稳定的氢键相互作用,包括98位赖氨酸、99位谷氨酰胺、69位和70位酪氨酸、71位天冬氨酸等。(见图7)此外,黄芩苷与PTGS2和NOX4的结合能分别为-10.65和-8.82 kcal/mol。这些结果表明,黄芩苷可能靶向PTGS2和NOX4影响ICM铁死亡进程。



注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

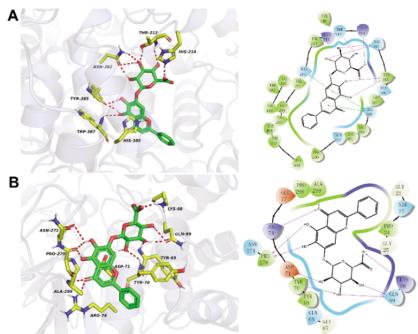
图6 黄芩苷对H9c2细胞PTGS2和NOX4表达的影响

3.7 BUR1逆转黄芩苷对H9c2细胞 $\text{Fe}^{2+}$ 水平抑制作用 BUR1能够诱导PTGS2表达。如图8及表4统计结果所示,选择中间浓度即40.0  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 黄芩苷进行验证,BUR1能够逆转黄芩苷抑制 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 诱导的H9c2细胞 $\text{Fe}^{2+}$ 水平( $P<0.01$ )。这些结果进一步表明,黄芩苷可通过抑制PTGS2表达逆转H9c2细胞铁死亡。



注:与空白对照组比较,<sup>a</sup>P<0.05;与Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>组比较,<sup>b</sup>P<0.05;与BUR1组比较,<sup>c</sup>P<0.05。

图8 BUR1对H9c2细胞Fe<sup>2+</sup>水平的影响 (×200)



注:A为黄芩苷与PTGS2的分子对接;B为黄芩苷与NOX4的分子对接。

图7 黄芩苷与PTGS2和NOX4的可视化分子对接

表4 BUR1对H9c2细胞Fe<sup>2+</sup>水平的影响/100%空白对照组  
( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Fe <sup>2+</sup> 水平
空白对照组	3	100.00±6.00
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 组	3	756.87±60.98 <sup>a</sup>
40.0 μmol/L黄芩苷组	3	192.87±6.64 <sup>b</sup>
BUR1组	3	642.5±38.64 <sup>b</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup>P<0.01;与Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>组比较,<sup>b</sup>P<0.01。

#### 4 讨 论

本研究探讨了黄芩苷对Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>诱导的大鼠心肌细胞系H9c2细胞缺氧复氧损伤的干预作用及其相关机制。黄芩苷是一种黄酮化合物,具有丰富的药理活性,特别是心血管保护作用<sup>[9]</sup>。

铁死亡主要受铁蛋白诱导氧化应激的影响,细胞内过氧化脂质不受控制的积累,最终导致细胞死亡<sup>[10]</sup>。铁死亡发生时,细胞内增加的游离Fe<sup>2+</sup>能够导致大量ROS的产生,并影响线粒体内膜通道和转运蛋白,干扰离子平衡,最终造成线粒体膜电位去极化<sup>[11]</sup>。ICM主要表现为心脏血流减少而引起的氧气供应不足,线粒体损伤是加重心肌缺氧复氧损伤的关键机制<sup>[12]</sup>。线粒体中的铁储备约占心肌细胞总铁储备的三分之一。因此,线粒体铁储备被认为是决定心肌细胞命运的主要因素<sup>[13]</sup>。线粒体对损伤的保护在减轻心肌I/R损伤中起着重要作用,这可能是抑制I/R损伤的一种有吸引力的策略<sup>[14]</sup>。本研究中,Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>诱导的H9c2细胞Fe<sup>2+</sup>和ROS水平升高,线粒体膜电位坍塌,而黄芩苷则能够保护线粒体膜电位,降低细胞内ROS水平及Fe<sup>2+</sup>水平。GPX4是一种细胞内重要的抗氧化酶,其功能是维护细胞内的脂质过氧化平衡,可以作为判断细胞铁死亡

的指标之一<sup>[15]</sup>。Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>干预后,GPX4蛋白表达下降,这说明H9c2细胞发生铁死亡;当黄芩苷干预后GPX4蛋白表达升高,且干预效果呈现浓度依赖,这说明黄芩苷能够逆转Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>诱导的H9c2细胞铁死亡。

黄芩苷具有抗氧化应激、抗炎、抗病毒、抗菌、抗过敏,免疫调节,神经细胞抗兴奋毒性,抗细胞凋亡,以及促进神经因子生长等多种活性<sup>[16]</sup>。WANG I C等<sup>[17]</sup>发现黄芩素和木犀草素能够通过抑制ROS和MDA的合成进而抑制由缺血再灌注诱导的铁死亡,发挥保护心肌细胞的作用。FAN Z Y等<sup>[18]</sup>研究提示黄芩苷可通过抑制ACSL4控制的铁死亡来预防心肌缺血再灌注损伤。有文献报道PTGS2和NOX4在调控氧化应激及缺血再灌注损伤诱发的铁死亡过程中发挥重要的作用<sup>[19-21]</sup>。PTGS2是一种与炎症和氧化应激密切相关的酶,能够促进下游前列腺素的释放进而诱导铁死亡,加重脑缺血再灌注损伤<sup>[22]</sup>。NOX4是一种参与产生细胞内ROS产生的酶,它在调节细胞内氧化还原平衡和氧化应激中发挥重要作用。NOX4可以诱导铁死亡从而促进细胞线粒体代谢受损,促进脂质过氧化,抑制NOX4,改善心脏I/R小鼠的心脏功能<sup>[23]</sup>。本研究中,Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>诱导的H9c2细胞PTGS2和NOX4蛋白表达升高,且计算机层面分子对接也显示黄芩苷与PTGS2和NOX4有着很好的结合活性。这些结果说明PTGS2和NOX4可能是黄芩苷靶向调控ICM铁死亡的重要靶点。当黄芩苷干预后,H9c2细胞PTGS2和NOX4蛋白表达下降。为了进一步验证黄芩苷抑制铁死亡的机制,我们使用了PTGS2激动剂BUR1干预心肌细胞,发现其能够逆转黄芩苷抑制的Fe<sup>2+</sup>水平,表明黄芩苷可能通过抑制PTGS2蛋白表达水平逆转Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>诱导的H9c2细胞铁死亡。因未找到NOX4的激动剂,课题组拟于下一步构建NOX4的过表达质粒进行验证工作。

综上,黄芩苷对Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>诱导的H9c2细胞缺氧复氧损伤铁死亡具有明确的恢复作用,治疗机制可能与其抑制PTGS2和NOX4蛋白表达有关。

#### 参考文献

- 1] DEL BUONO M G, MORONI F, MONTONE R A, et al. Ischemic cardiomyopathy and heart failure after acute myocardial infarction[J]. Curr Cardiol Rep, 2022, 24(10): 1505-1515.
- 2] RÓDENAS-ALESINA E, JORDÁN P, HERRADOR L, et al. Q waves in ischemic cardiomyopathy[J]. Int J

- Cardiovasc Imaging, 2021, 37(6):2085–2092.
- [3] 马丽媛, 王增武, 樊静, 等.《中国心血管健康与疾病报告2022》要点解读[J].中国全科医学, 2023, 26(32):3975–3994.
- [4] 赵梦杰, 肖梦丽, 应佳珂, 等.中医药治疗心肌病随机对照试验的文献计量学分析[J].中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21(8):1374–1381.
- [5] CHANG X, TOAN S, LI R B, et al. Therapeutic strategies in ischemic cardiomyopathy: Focus on mitochondrial quality surveillance[J]. EBio Medicine, 2022, 84:104260.
- [6] TANG D L, CHEN X, KANG R, et al. Ferroptosis: Molecular mechanisms and health implications [J]. Cell Res, 2021, 31(2):107–125.
- [7] LI D L, PI W H, SUN Z Z, et al. Ferroptosis and its role in cardiomyopathy[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 153: 113279.
- [8] 陈馨, 张欣然, 牟立婷, 等.基于UHPLC-Q-Orbitrap-MS鉴定黄芩的化学成分及血中移行成分[J].中草药, 2023, 54(9): 2722–2732.
- [9] 朱亚南, 杨七妹, 张硕, 等.黄芩苷与黄芩素药理作用及机制研究进展[J].时珍国医国药, 2020, 31(4):921–925.
- [10] XU M, LI X Y, SONG L C. Baicalin regulates macrophages polarization and alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury via inhibiting JAK/STAT pathway[J]. Pharm Biol, 2020, 58(1):655–663.
- [11] LUAN Y, SUN C, WANG J, et al. Baicalin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury through Akt/NF-κB pathway[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(3):3212–3219.
- [12] WEN R J, DONG X, ZHUANG H W, et al. Baicalin induces ferroptosis in osteosarcomas through a novel Nrf2/xCT/GPX4 regulatory axis[J]. Phytomedicine, 2023, 116:154881.
- [13] ZHENG B, ZHOU X W, PANG L J, et al. Baicalin suppresses autophagy-dependent ferroptosis in early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. Bioengineered, 2021, 12(1):7794–7804.
- [14] 楚冬海, 张振秋.瓜蒌皮提取物对缺氧/复氧损伤H9c2心肌细胞的保护作用及其机制研究[J].中国药房, 2019, 30(8):1072–1078.
- [15] SUN L, WANG H, YU S S, et al. Herceptin induces ferroptosis and mitochondrial dysfunction in H9c2 cells[J]. Int J Mol Med, 2022, 49(2):17.
- [16] KOBAYASHI M, SUHARA T, BABA Y, et al. Pathological roles of iron in cardiovascular disease [J]. Curr Drug Targets, 2018, 19(9):1068–1076.
- [17] ZHANG F Y, LI Z Y, GAO P, et al. HJ11 decoction restrains development of myocardial ischemia-reperfusion injury in rats by suppressing ACSL4-mediated ferroptosis[J]. Front Pharmacol, 2022, 13:1024292.
- [18] BERSUKER K, HENDRICKS J M, LI Z P, et al. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis[J]. Nature, 2019, 575(7784):688–692.
- [19] ZHANG T Q, DENG W X, DENG Y, et al. Mechanisms of ferroptosis regulating oxidative stress and energy metabolism in myocardial ischemia-reperfusion injury and a novel perspective of natural plant active ingredients for its treatment[J]. Biomedecine Pharmacother, 2023, 165:114706.
- [20] WANG I C, LIN J H, LEE W S, et al. Baicalein and luteolin inhibit ischemia/reperfusion-induced ferroptosis in rat cardiomyocytes[J]. Int J Cardiol, 2023, 375:74–86.
- [21] FAN Z Y, CAI L L, WANG S N, et al. Baicalin prevents myocardial ischemia/reperfusion injury through inhibiting ACSL4 mediated ferroptosis[J]. Front Pharmacol, 2021, 12:628988.
- [22] JIAN J, WANG D, XIONG Y F, et al. Puerarin alleviated oxidative stress and ferroptosis during renal fibrosis induced by ischemia/reperfusion injury via TLR4/Nox4 pathway in rats[J]. Acta Cir Bras, 2023, 38: e382523.
- [23] XU Y F, LIU Y, LI K X, et al. COX-2/PGE2 pathway inhibits the ferroptosis induced by cerebral ischemia reperfusion[J]. Mol Neurobiol, 2022, 59(3):1619–1631.
- [24] WU Z H, BAI Y P, QI Y J, et al. Metformin ameliorates ferroptosis in cardiac ischemia and reperfusion by reducing NOX4 expression via promoting AMPKα[J]. Pharm Biol, 2023, 61(1):886–896.

(收稿日期:2024-06-16 编辑:罗英姣)