

• 实验研究 •

黄芩苷通过激活 CPT1、维持线粒体动力学稳定缓解心肌细胞损伤

张 维¹, 管 春², 童 宁¹, 张引兰¹, 程 诺², 许静远³, 曹 辉^{1*}

1. 南京市第二医院 药学部, 江苏 南京 210003

2. 中国药科大学 多靶标天然药物全国重点实验室, 江苏 南京 211198

3. 常熟理工学院 生物与食品工程学院, 江苏 苏州 215500

摘要: **目的** 考察黄芩苷通过激活 CPT1、维持线粒体动力学稳定缓解心肌细胞损伤的作用机制。**方法** 通过使用氧气和葡萄糖剥夺 (OGD) 构建 AC16、H9c2、HL-1 细胞损伤模型。用黄芩苷 (0.1、1.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$) 处理模型细胞, 考察细胞增殖及凋亡情况。通过 RNA 测序技术检测黄芩苷治疗前后, 细胞转录谱的变化, 并通过 RT-qPCR、Western blotting 对线粒体动力学相关标志物 *PPARGC1A*、*Drp1*、*OPA1*、*MFN1*、*MFN2*、*ESRRA*、*NQO1* 以及 p-DRP1、DRP1、MFN1、NRF1、TFAM 进行验证, 并使用透射电镜对线粒体形貌进行考察。最后探究黄芩苷对其靶点 CPT1 的作用。**结果** 与模型组比较, 黄芩苷 (1.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$) 组处理后的细胞活性有显著升高, 细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。RNA 测序及 Western blotting 结果表明, 黄芩苷可显著提高 *OPA1*、*MFN1*、*ESRRA*、*NQO1* mRNA 水平以及 MFN1、NRF1 的蛋白表达水平 ($P < 0.001$)。黄芩苷处理后, AC16 细胞内的空泡体积明显减小, 线粒体数量和线粒体嵴均有所恢复。黄芩苷能在 H9c2 和 HL-1 细胞原位和体外直接激活 CPT1, 提高其活性 ($P < 0.001$)。**结论** 黄芩苷均能缓解心肌细胞活性的下降和凋亡的增加, 并通过激活 CPT1、维持线粒体动力学稳定缓解心肌细胞损伤。

关键词: 黄芩苷; 氧气和葡萄糖剥夺; 心肌损伤; 肉碱棕榈酰基转移酶 1; 线粒体动力学

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2025)05-1089-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.05.001

Baicalin alleviates myocardial cell injury by activating CPT1 and maintaining mitochondrial dynamic stability

ZHANG Wei¹, GUAN Chun², TONG Ning¹, ZHANG Yinlan¹, CHENG Nuo², XU Jingyuan³, CAO Hui¹

1. Department of Pharmacy, The Second Hospital of Nanjing, Nanjing 210003, China

2. State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

3. School of Biology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Suzhou 215500, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of baicalin alleviates cardiomyocyte injury by activating CPT1 and maintaining the stability of mitochondrial dynamics. **Methods** The injury models of AC16, H9c2, and HL-1 cells were constructed by using oxygen and glucose deprivation (OGD). Model cells were treated with baicalin (0.1, 1.0, and 10.0 $\mu\text{g/mL}$) to investigate cell proliferation and apoptosis. The changes of cell transcriptome profiles before and after baicalin treatment were detected by RNA sequencing technology. The mitochondrial dynamics-related markers *PPARGC1A*, *Drp1*, *OPA1*, *MFN1*, *MFN2*, *ESRRA*, *NQO1*, as well as p-DRP1, DRP1, MFN1, NRF1, and TFAM were verified by RT-qPCR and Western blotting. The morphology of mitochondria was investigated by transmission electron microscopy. Finally, the effect of baicalin on its target CPT1 were explored. **Results** Compared with the model group, the cell viability in the baicalin (1.0, 10.0 $\mu\text{g/mL}$) groups was significantly increased, and the apoptosis rate was significantly decreased ($P < 0.01$, 0.001). The results of RNA sequencing and Western blotting indicated that baicalin could significantly increase the mRNA levels of *OPA1*, *MFN1*, *ESRRA*, and *NQO1*, as well as the protein expression levels of MFN1 and NRF1 ($P <$

收稿日期: 2025-02-26

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82003885)

作者简介: 张 维, 女, 药师, 研究方向为心血管临床药学。E-mail: zhwei9090@163.com

*通信作者: 曹 辉, 男, 副主任药师, 研究方向为医院药学。E-mail: 13951891713@139.com

0.001)。After treatment with baicalin, the vacuole volume in AC16 cells was significantly reduced, and both the number of mitochondria and mitochondrial cristae were restored. Baicalin can directly activate CPT1 in H9c2 and HL-1 cells *in situ* and *in vitro*, and enhance their activity ($P < 0.001$). **Conclusion** Baicalin can alleviate the decline in myocardial cell activity and the increase in apoptosis, and relieve myocardial cell injury by activating CPT1 and maintaining the stability of mitochondrial dynamics.

Key words: baicalin; oxygen and glucose deprivation; myocardial injury; CPT1; mitochondrial dynamic

血管栓塞导致的心肌供血供氧不足是心力衰竭的重要诱因,其病理核心在于冠状动脉或肺循环的血流阻断引发心肌缺血缺氧、细胞代谢紊乱及不可逆损伤,最终导致心力衰竭。尤其在老年人群中,心血管壁因顺应性丧失而增厚,并常伴有血管狭窄、甚至栓塞等问题,使得心肌细胞更容易因缺血、氧气、有机物等养分供应不足等原因,发生损伤并诱发相关疾病^[1-2]。目前心力衰竭相关药物治疗的有效性仍存在局限,相关机制也有待进一步阐明^[3-5]。

近年来,大量研究表明中医药能够通过多成分、多靶标、多系统调节的方式治疗心脑血管疾病,并且中医药在防治心力衰竭方面也表现出了良好的临床效果^[6-9]。黄芩首次记载于《吴普本草》,具有“泻心肺之火,除六经实热”的功效^[10]。从黄芩中提取的黄酮苷类化合物黄芩苷已被多数研究证实具有保护心脏、缓解心肌损伤、提高心肌功能等方面具有一定作用^[11-14],逐渐成为缓解缺血性心肌损伤及心力衰竭的研究热点。研究发现,黄芩苷能够直接激活肝脏细胞中肉碱棕榈酰转移酶-1 (CPT1),加速脂质流入线粒体进行氧化产能^[15]。而在旋毛虫感染或阿霉素暴露导致的心肌损伤样本中,CPT1的表达水平也发生了显著变化^[16-17]。黄芩苷对心肌细胞的保护作用及具体机制仍未明朗,亟待阐明。

基于此背景,本研究尝试在氧气和葡萄糖剥夺(OGD)模拟的血管栓塞导致心力衰竭细胞模型中,考察黄芩苷对心肌细胞的保护,并通过转录组学分析,探究黄芩苷缓解心肌细胞损伤的分子机制,以此为血管栓塞相关心力衰竭的治疗提供新思路,并为黄芩苷的临床应用提供重要的理论依据。

1 实验材料

1.1 细胞株

大鼠源心肌细胞系 H9c2 购于上海 ATCC 细胞库,人源心肌细胞系 AC16 和小鼠源心肌细胞系 HL-1 均由南京医科大学附属儿童医院心内科捐赠。

1.2 药物与试剂

黄芩苷(质量分数 98.92%,货号 HY-N0197,美国 MCE 公司);DMEM 基础培养基(南京维森特生物技术有限公司,货号 319-070-CL);青霉素、

链霉素(南京维森特生物技术有限公司,货号 450-201-EL);Trypsin/EDTA(南京维森特生物技术有限公司,货号 325-043-EL);PBS 缓冲液(大连美伦生物技术有限公司,货号 MA0010);无糖 DMEM 基础培养基(澳睿赛生物技术有限公司,货号 ORCPM0270);二甲基亚砜(DMSO,北京索莱宝科技有限公司,货号 D8371);Phosphatase inhibitor cocktail(美国 MCE 公司,货号 HY-K0021、HY-K0022);蛋白酶抑制剂 Cocktail(美国 MCE 公司,货号 HY-K0010);ECL 发光液(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,货号 32209);Cell Counting Kit-8 (CCK-8)试剂(美国 MCE 公司,货号 HY-K0301);Annexin V-PE/7-AAD Apoptosis Detection Kit(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,货号 A213-02);RNA Easy Isolation Reagent(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,货号 R701-02);RNase-free H₂O(南京福麦斯生物技术有限公司);Taq Pro Universal SYBR q-PCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,货号 Q712-02);HiscriptQ RT Super Mix for q-PCR(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,货号 R123-01);RIPA(碧云天生物技术,货号 P0013B);CPT1 测试盒可见分光光度法(上海泽叶生物科技有限公司,货号 ZYF1046);CPT1、动力蛋白相关蛋白 1 (DRP1)、线粒体融合蛋白 1 (MFN1)、核呼吸因子 1 (NRF1)、线粒体转录因子 A (TFAM) 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号 66039-1-Ig、12957-1-AP、66776-1-Ig、66832-1-Ig、22586-1-AP);p-DRP1 抗体(英国 Abcam 公司,货号 ab314755); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,货号 AC026);Goat anti-Rabbit IgG 抗体、Goat anti-Mouse IgG 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号 RGAR006、RGAM006);戊二醛电镜固定液(上海源叶生物科技有限公司,货号 R20510)。

1.3 仪器

细胞操作超净台(苏州安泰空气技术有限公司);高压蒸汽灭菌锅(上海致微生物科技有限公司);恒温水浴锅(美国 Thermo Fisher Scientific);

金属浴恒温器(杭州奥盛仪器有限公司);二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific);三气培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific);低速离心机(美国 Sigma-Aldrich);高速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific);PCR 扩增仪(美国 Applied Biosystems);M3 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices);Viia7-384 实时荧光定量 PCR(美国 Applied Biosystems);Nano Drop 分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific);垂直电泳仪(美国 Bio-Rad Laboratories);Trans-Blot Turbo 型全能型蛋白转膜仪(美国 Bio-Rad Laboratories);全自动化学发光图像系统(上海天能科技有限公司);倒置显微镜(日本 Nikon 株式会社);正置显微镜(日本 Nikon 株式会社);流式细胞仪(美国 Becton, Dickinson and Company)。

2 实验方法

2.1 细胞培养

H9c2、AC16、HL-1 细胞均在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,于 5% CO₂、37 °C 条件下培养,常规消化、传代,取对数生长期细胞用于实验。

2.2 OGD 心力衰竭细胞模型

使用无血清和无葡萄糖的 DMEM,并将 H9c2、AC16、HL-1 细胞转移到 37 °C 下含有 95% N₂、5% CO₂ 的培养箱中,孵育 3 h,模拟因血管栓塞导致营养缺乏而造成的心力衰竭。随后恢复正常供氧。

2.3 黄芩苷溶液的制备

取 20 mg 黄芩苷溶于 20 mL PBS 中,用 NaHCO₃ 调 pH 值至 7.4,至其完全溶解后滤过除菌,用不含 FBS 的 DMEM 液稀释为所需质量浓度(0.1、1.0、10.0 μg/mL),处理对应分组细胞 48 h 后进行相关检测。

2.4 CCK8 检测黄芩苷对 OGD 诱导的 AC16、H9c2、HL-1 细胞活力的影响

分别将 H9c2、AC16、HL-1 细胞各自分为对照组、模型组、黄芩苷(0.1、1.0、10.0 μg/mL)组,分别进行造模和给药。模型组 OGD 处理 3 h,黄芩苷组在 OGD 处理后使用对应浓度黄芩苷处理 48 h。给药周期结束后,向细胞中加入 10 μL CCK-8 溶液,37 °C 孵育 2 h,使用酶标仪检测细胞在波长为 450 nm 处的吸光度(A)值,并绘制增殖曲线。

细胞活力 = $(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{实验 0h}} - A_{\text{空白}})$

2.5 流式细胞分析检测黄芩苷对 OGD 诱导的 AC16、H9c2、HL-1 细胞凋亡的影响

分别将 H9c2、AC16、HL-1 细胞各自分为对照

组、模型组、黄芩苷(10.0 μg/mL)组,分别进行造模和给药同 2.4 项下。给药周期结束后,收集各组细胞,加 1 mL 预冷的 PBS,1500 r/min 离心 3 min,清洗 2 遍。加入 Annexin V-FITC 和 7-AAD 避光孵育 10 min。采用 Beckman Coulter Cytoflex S 流式细胞分析仪进行检测,使用 FlowJo 软件分析数据集。

细胞凋亡率 = 早期细胞的凋亡比率 + 晚期细胞的凋亡比率

2.6 RNA 测序

将 AC16 细胞按照 2.5 项下进行分组及处理,给药周期结束后,使用 TRIzol Reagent 提取总 RNA。使用 Hieff NGS Ultima Dual-mode mRNA Library Prep Kit for Illumina 生成测序文库,并将 Index 添加到每个样本的序列中。使用带有 oligo(DT)的磁珠从总 RNA 中调取 mRNA。合成第一链 cDNA,随后进行第二链 cDNA 合成。末尾突出端通过外切核酸酶和聚合酶活性进行修复转化为平末端。DNA 片段 3'末端腺苷酸化后,连接具有发夹环结构的 NEBNext 接头。使用 AMPure XP 磁珠对文库片段进行纯化。然后加入 3 μL USER Enzyme 在 37 °C 下孵育 15 min,在 RT-qPCR 前在 95 °C 下反应 5 min。之后用高保真 DNA 聚合酶、通用 RT-qPCR 引物和 Index(X)引物进行 RT-qPCR。纯化 RT-qPCR 产物(AMPure XP 磁珠)并在 Agilent Bioanalyzer 2100 系统上评估文库质量。测序阶段,根据制造商的说明,在 Illumina NovaSeq 平台上对文库进行测序,生成 150 bp 的双末端序列。原始读数使用生物信息学分析平台 BMKCloud(www.biocloud.net)进一步处理。

将不同样本分组中表达水平存在显著差异的基因(即差异表达基因)进行分析得到差异表达基因集。将差异表达倍数 Fold Change ≥ 1.5 且 P < 0.05 作为筛选标准,对筛选出的所有差异表达基因进行层次聚类分析,将在不同样本中具有相同或相似表达模式的基因进行聚类,绘制基因聚类表达热图。

利用 COG 数据库对基因产物进行直系同源分类,通过与数据库的比对,绘制差异表达基因 COG 分类统计图。

2.7 实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)考察黄芩苷对线粒体动力学相关基因表达的影响

采用 Freezol 法提取细胞总 RNA,按照逆转录试剂盒说明书逆转录成 cDNA,进行 RT-qPCR 反应。PPARGC1A:正向引物为 3'-TCTGAGTCTGTATGGAGTGACAT-5',反向引物为 3'-CCAAGTCGTT CACATCTAGTTCA-5';Drp1:正向引物为 3'-GAG

AACTACCTTCCGCTGTATCGC-5', 反向引物为 3'-CACCATCTCCAATTCCACCACCTG-5'; *OPA1*: 正向引物为 3'-TGTGAGGTCTGCCAGTCTTTA-5', 反向引物为 3'-TGTCCTTAATTGGGGTCGTTG-5'; *MFN1*: 正向引物为 3'-TGGCTAAGAAGGCGATTA CTGC-5', 反向引物为 3'-TCTCCGAGATAGCACC TCACC-5'; *MFN2*: 正向引物为 3'-CTCTCGATGC AACTCTATCGTC-5', 反向引物为 3'-TCCTGTACG TGTCTTCAAGGAA-5'; *ESRR4*: 正向引物为 3'-AG GGTTCCTCGGAGACAGAG-5', 反向引物为 3'-TC ACAGGATGCCACACCATAG-5'; *NQO1*: 正向引物为 3'-GAAGAGCACTGATCGTACTGGC-5', 反向引物为 3'-GGATACTGAAAGTTTCGCAGGG-5'; *18S*: 正向引物为 3'-CAGCCACCCGAGATTGAGCA-5', 反向引物为 3'-TAGTAGCGACGGGCGGTGTG-5'。反应条件: 以 *18S* 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量。

2.8 Western blotting 考察黄芩苷对线粒体动力学相关蛋白表达的影响

收集细胞并裂解, 提取蛋白, BCA 试剂盒测定蛋白浓度。利用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品, 随后将蛋白条带转至 PVDF 膜。将蛋白膜用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。分别加入 p-DRP1 兔抗 (1:1 000), DRP1 兔抗 (1:1 000), MFN1 兔抗 (1:1 000), NRF1 兔抗 (1:1 000), TFAM 兔抗 (1:1 000), 4 °C 孵育过夜。加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗, 室温孵育 1 h。加入化学发光液, 于暗室中曝光。 β -actin 兔抗 (1:15 000) 作为上样对照。

2.9 透射电子显微镜 (TEM) 检测

取处理后的细胞, 1 000×g 离心 5 min 后弃上清液, 加入 2.5% 戊二醛电镜固定液重悬, 于 4 °C 固定 4 h。PBS 洗涤 3 次。加入 1% 四氧化锇溶液, 4 °C 避光固定 2 h。吸弃固定液, PBS 洗涤 3 次。使用乙醇进行梯度脱水, 环氧树脂渗透、包埋后, 制作超薄电镜切片。经 3% 醋酸铀-枸橼酸铅染色后, 置于 TEM 下进行观察并拍照记录。

2.10 CPT1 表达量和活性测定

为了测试细胞 CPT1 表达量, 将 AC16 细胞分组给药周期结束后, 取处理后的细胞按 2.7、2.8 项下所述方法对 CPT1 的 mRNA 表达和蛋白表达进行测定。*CPT1*: 正向引物为 3'-TCCAGTTGGCTTATC GTGGTG-5', 反向引物为 3'-TCCAGAGTCCGATT

GATTTTTC-5'; *18S*: 正向引物为 3'-CAGCCACC CGAGATTGAGCA-5', 反向引物为 TAGTAGCGA CGGGCGGTGTG-5'。*CPT1* 兔抗 (1:1 000), β -actin 兔抗 (1:15 000)。

为了测试细胞 CPT1 活性, 分别将 H9c2、AC16、HL-1 细胞各自分为对照组、黄芩苷 (10 μ g/mL) 组、模型组、模型+黄芩苷组。给药周期结束后, 使用肉毒碱棕榈酰转移酶 (*CPT1*) 测试盒可见分光光度法进行检测。按照制造商产品说明书进行检测, 简而言之, 将细胞在冰上用 0.1% Triton X-100 的 PBS 裂解, 并将裂解物调节至 2 mg/mL。通过向 100 μ L 反应缓冲液中加入 20 μ L 裂解物开始酶反应, 并在 37 °C 下孵育 10 min。将反应混合物在 4 °C 下以 20 000×g 离心 5 min。然后取出 400 μ L 上清液, 与 600 μ L 蒸馏水混合, 制成 1 mL 最终样品。基于肉碱和脂酰辅酶 A 在丙二酰辅酶 A 存在与否的条件下, 通过 *CPT1* 的作用, 产生脂酰肉碱, 并释放出巯基辅酶 A, 与 Ellman 试剂 DN-TB 反应后, 产生黄色的 TNB。通过其吸收峰值的变化 (412 nm), 来定量分析 *CPT1* 的活性。

2.11 统计学分析

应用 Graphpad Prism 9.0 统计软件对数据进行分析。本实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 *t* 检验。

3 结果

3.1 黄芩苷对 OGD 诱导的 AC16、H9c2、HL-1 细胞活力的影响

如图 1 所示, OGD 处理后, 3 种细胞的细胞活力均显著下降 ($P < 0.001$)。黄芩苷 (0.1 μ g/mL) 组并不能够恢复受损的细胞活力; 黄芩苷 (1.0、10.0 μ g/mL) 组处理后的细胞活性有显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001), 故后续研究选取 10.0 μ g/mL 作为实验浓度。

3.2 黄芩苷对 OGD 诱导的 AC16、H9c2、HL-1 细胞凋亡的影响

如图 2 所示, OGD 处理后, 3 种细胞的凋亡率显著升高 ($P < 0.001$); 而黄芩苷组细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.001$)。

3.3 黄芩苷对心肌 AC16 细胞损伤线粒体动力学稳定的影响

3.3.1 黄芩苷对 OGD 构建的心力衰竭 AC16 模型细胞转录谱的影响 考虑到针对人源细胞的研究更符合临床实际, 本研究提取了 OGD 诱导人源心肌细胞系 AC16 所构建的心力衰竭细胞模型在接受

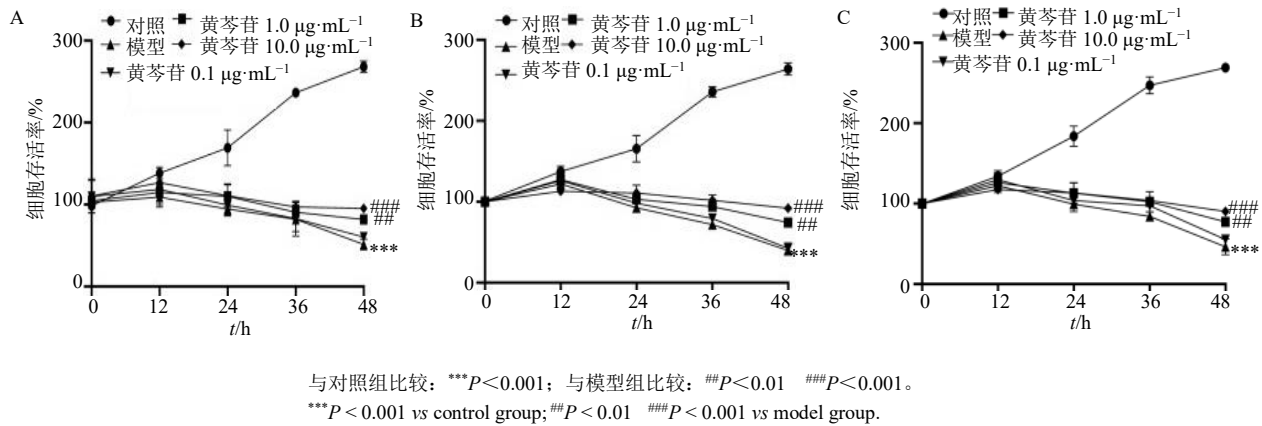


图 1 OGD 诱导的 AC16 (A)、H9c2 (B)、HL-1 (C) 细胞在黄芩苷治疗后的细胞活力 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 1 Cell viability of AC16 (A), H9c2 (B), and HL-1 (C) cells induced by OGD after baicalin treatment ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

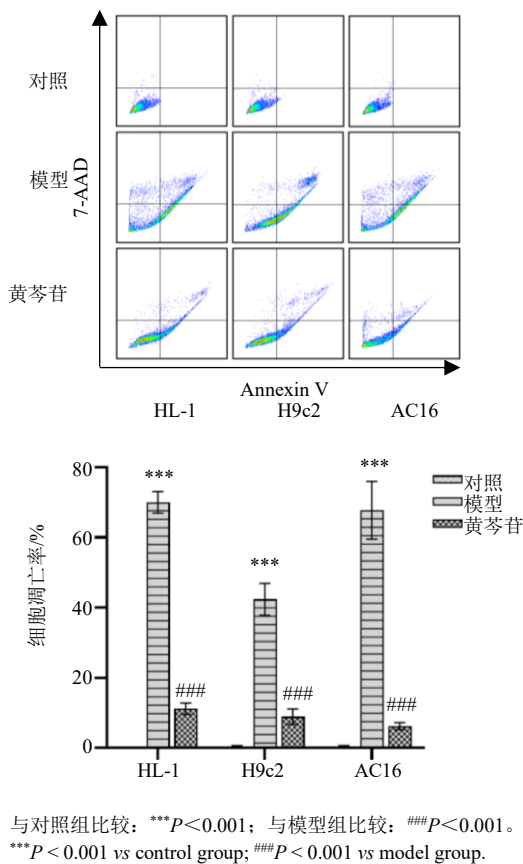


图 2 黄芩苷对 OGD 诱导的 AC16、H9c2、HL-1 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of baicalin on the apoptosis of AC16, H9c2 and HL-1 cells induced by OGD

10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的黄芩苷处理前后的细胞总 RNA, 分别进行转录组测序。首先, 通过碱基类型分布检测, 发现样本中 RNA 的鸟嘌呤 (Guanine, G) 和胞嘧啶 (Cytosine, C)、腺嘌呤 (Adenine, A) 和胸腺嘧啶 (Thymine, T) 的含量在每个测序循环上分别相等, 且整个测序过程稳定不变, 呈水平线, 无 AT、

GC 分离现象, 说明样本质量控制良好, 符合 RNA 测序需求, 见图 3。

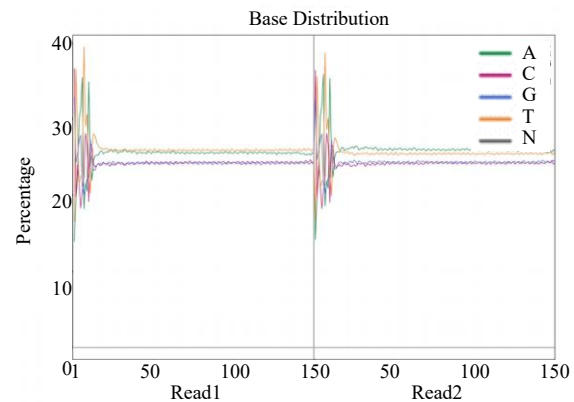


图 3 OGD 构建的心力衰竭 AC16 模型细胞接受 10 $\mu\text{g/mL}$ 黄芩苷处理前后的细胞总 RNA 碱基类型分布检测 ($n = 3$)

Fig. 3 Detection of the distribution of total RNA base types in heart failure AC16 model cells constructed by OGD before and after treatment with 10 $\mu\text{g/mL}$ baicalin ($n = 3$)

完成转录组测序后, 为了直观的展示不同分组中基因的表达差异, 对筛选出的所有差异表达基因进行层次聚类分析, 将在不同样本中具有相同或相似表达模式的基因进行聚类, 绘制基因聚类表达热图 (图 4)。如图所示, 在黄芩苷 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 处理后, OGD 构建的 AC16 模型细胞的转录组发生了剧烈变化, 说明黄芩苷对 AC16 细胞的 OGD 模型的 mRNA 表达谱产生了显著的影响。

为了探究在 OGD 构建的心力衰竭 AC16 细胞模型中, 黄芩苷具体影响了细胞的哪些功能, 本研究通过生物信息学分析方法, 绘制 COG 分类统计图 (图 5), 其中能量代谢相关的细胞功能变化最为显著, 说明黄芩苷很可能通过调控 AC16 细胞的能量代谢, 恢复其经 OGD 处理后受损的细胞状态。

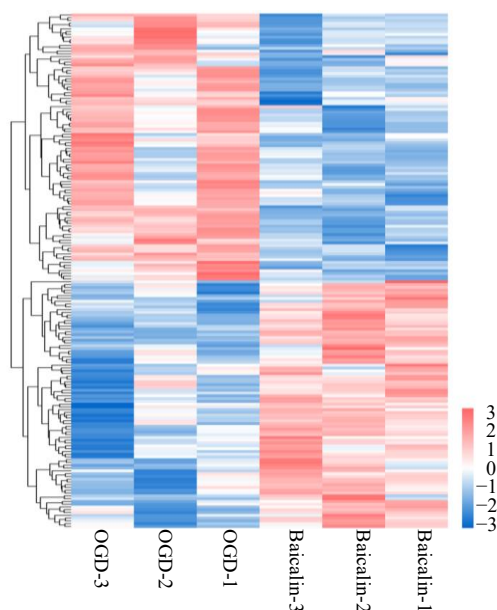


图 4 基因聚类表达热图 ($n=3$)
Fig. 4 Gene clustering heatmap ($n=3$)

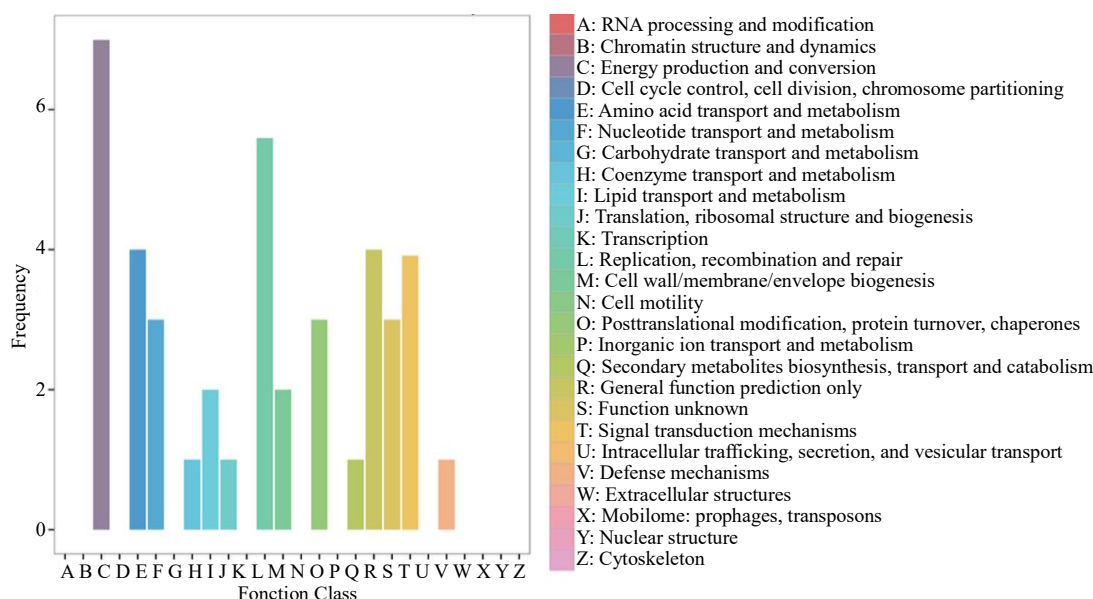


图 5 差异表达基因 COG 注释分类统计图
Fig. 5 Statistical chart of annotation classification of differentially expressed gene COG

损伤。

为了更直观地考察黄芩苷对线粒体形态的影响,并进行了 TEM 拍摄。如图 8 所示,在 OGD 诱导的模型细胞中,细胞内出现较多空泡状结构,线粒体数量显著减少,且线粒体嵴大量消失。而在给予黄芩苷处理后,AC16 细胞内的空泡体积明显减小,线粒体数量和线粒体嵴均有所恢复,说明黄芩苷能够有效恢复 OGD 造模后受损的线粒体形态,维持线粒体动力学稳定。

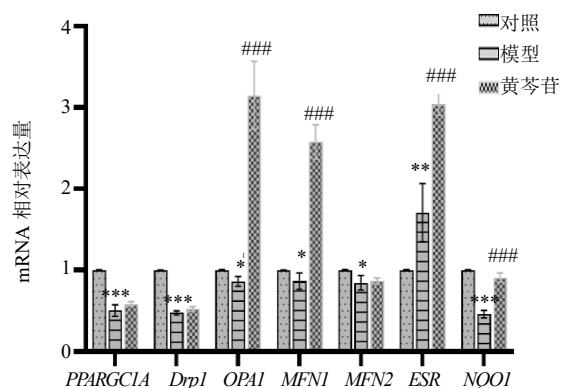
3.3.2 黄芩苷对线粒体动力学稳定相关基因表达的影响 先前的研究表明,黄芩苷很可能通过调控 AC16 细胞的能量代谢,从而恢复其因心力衰竭而受损的细胞状态。随后,本研究检测了线粒体生物发生、分裂和融合相关标志物,考察黄芩苷是否能够维持线粒体动力学稳定(图 6、7)。

通过 RT-qPCR 和 Western blotting,对线粒体生物发生相关基因 *PPARGC1A*、*Drp1* mRNA 的表达以及 DRP1 蛋白的磷酸化进行表征,发现黄芩苷并不直接影响 *PPARGC1A*、*Drp1* mRNA 表达量,而显著增加了 p-DRP1 的蛋白表达 ($P<0.01$)。对线粒体分裂和融合相关基因 *OPA1*、*MFN1*、*MFN2* 及 MFN1 的蛋白表达进行表征,发现黄芩苷可显著提高 *OPA1* 和 *MFN1* mRNA 水平以及 MFN1 的蛋白水平 ($P<0.001$)。此外,黄芩苷还能够增加 *ESRR4* 和 *NQO1* mRNA 水平以及 NRF1 的蛋白表达水平 ($P<0.001$),从而促进线粒体能量代谢,清除线粒体的

以上结果表明,黄芩苷能够维持线粒体的生物发生、分裂和融合,清除线粒体的损伤,维持线粒体动力学和形态稳定,从而调控线粒体能量代谢,对细胞发挥保护作用。

3.4 黄芩苷对 CPT1 蛋白、基因表达及其活性的影响

为了进一步探究黄芩苷是否直接作用于 CPT1,首先检测了正常 AC16 细胞在 $10.0 \mu\text{g/mL}$ 黄芩苷处理前后,以及 OGD 造模的 AC16 细胞在黄芩苷处理前后 CPT1 的 RNA 和蛋白表达水平(图 9)。结

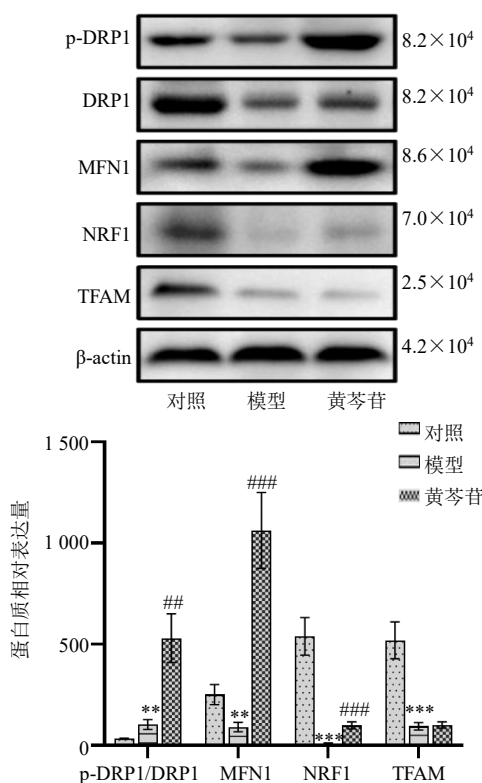


与对照组比较: * $P<0.05$ *** $P<0.001$; 与模型组比较: ### $P<0.001$ 。

* $P<0.05$ *** $P<0.001$ vs control group; ### $P<0.001$ vs model group.

图 6 黄芩苷对 AC16 细胞线粒体动力学相关基因的表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Fig. 6 Effects of baicalin on the expression of mitochondrial dynamics-related genes in AC16 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)



与对照组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与模型组比较: ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ 。

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group; ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group.

图 7 黄芩苷对 AC16 细胞线粒体动力学相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Fig. 7 Effects of baicalin on the expression of mitochondrial dynamics-related proteins in AC16 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

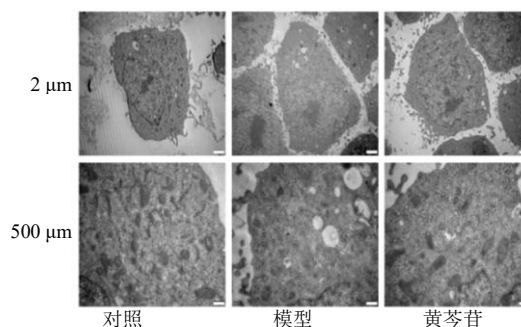


图 8 黄芩苷对 OGD 构建的 AC16 模型细胞透射电镜图像的影响

Fig. 8 Effects of baicalin on the transmission electron microscope images of AC16 model cells constructed by OGD

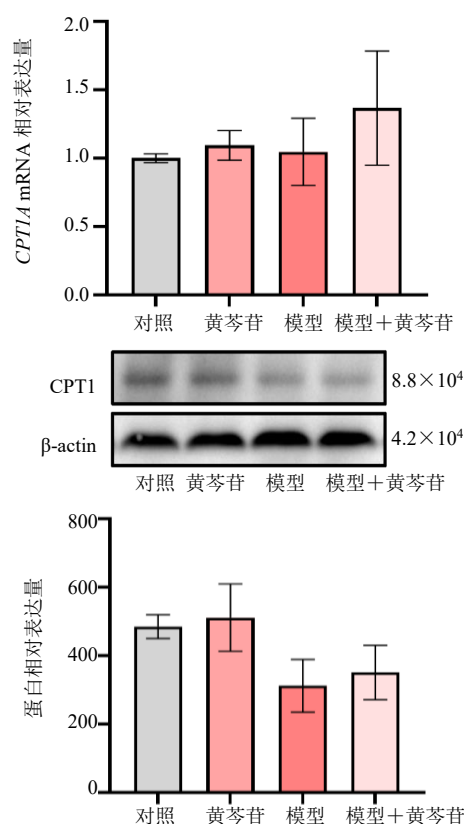
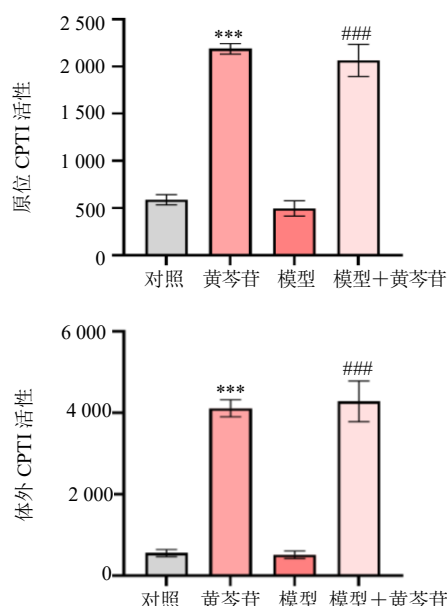


图 9 AC16 细胞中 CPT1 的 RNA 和蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 9 RNA and protein expression levels of CPT1 in AC16 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

果发现,不论是在正常细胞还是在模型细胞中,黄芩苷均未显著提高 CPT1 的 RNA 和蛋白表达,说明黄芩苷可能并不能直接提高 CPT1 的含量。

为了探究黄芩苷是否能直接激活 CPT1,本研究使用黄芩苷分别处理正常 AC16 细胞和 OGD 建模的 AC16 细胞,随后将细胞裂解,使用 CPT1 活性测试盒检测裂解物中 CPT1 的活性(图 10)。结



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$ 。
*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group.

图 10 AC16 细胞中原位和体外的 CPT1 活性 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 10 *In situ* and *in vitro* activities of CPT1 in AC16 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

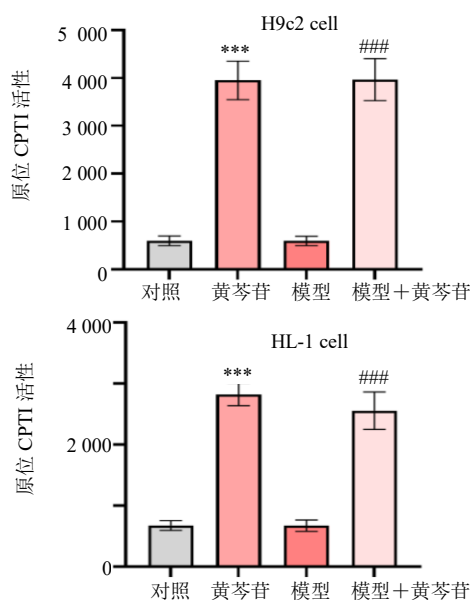
果显示,与对照组相比,不论是否经过 OGD 造模,黄芩苷均能在 AC16 细胞原位直接激活 CPT1,显著提高其活性 ($P < 0.001$)。同时通过体外研究,先将正常 AC16 细胞和 OGD 造模的 AC16 细胞裂解,再使用黄芩苷处理细胞裂解物,并使用 CPT1 活性测试盒检测裂解物中 CPT1 的活性。结果表明,与对照组相比,黄芩苷在体外也能够显著提高 CPT1 的活性 ($P < 0.001$)。

为了考察黄芩苷直接激活 CPT1 这一功能的普适性,本研究分别在 H9c2、HL-1 细胞中重复了上述实验。结果表明,黄芩苷对 H9c2 和 HL-1 均能在细胞原位和体外直接激活 CPT1,提高其活性 ($P < 0.001$),见图 11、12。

综上所述,黄芩苷能够激活人源、大鼠源、小鼠源心肌细胞系 AC16、H9c2、HL-1 等多种心肌细胞的 CPT1,显著提高其活性。

4 讨论

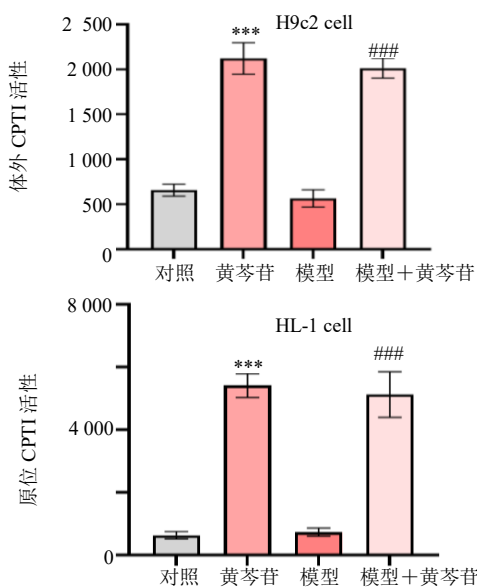
近 40 年来,虽然我国心力衰竭住院病死率已下降,但由于逐渐步入老龄化社会,导致心力衰竭患病率持续上升,给社会和经济增加了沉重的负担^[18]。天然产物黄芩苷因其具有多靶点、多通路的心血管保护作用,逐渐成为缓解缺血性心肌损伤及



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$ 。
*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group.

图 11 不同细胞中原位 CPT1 的活性 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 11 CPT1 activity *in situ* in different cell ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$ 。
*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group.

图 12 不同细胞体外 CPT1 的活性 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 12 CPT1 activity *in vitro* in different cell ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

心力衰竭的研究热点^[11,19]。有研究表明,黄芩苷能够通过抑制 AMPK/mTOR 通路,减轻 Ang II 诱导的心肌细胞凋亡和自噬^[19],还能够改善线粒体膜电位、ATP 水平和活性氧产生,维持细胞的能量稳态^[20]。此外,黄芩苷还能通过抑制 Furin/TGF β 1/Smad3/

TSP-1 通路改善内皮功能障碍, 并通过抑制 Akt 相关通路改善血小板活化, 从而改善微血管灌注^[21]。

在本研究中首先选用 OGD 造模方法, 模拟老年人群中容易发生的因血管狭窄、栓塞等问题, 使得心肌细胞缺血, 氧气、有机物等养分供应不足, 从而诱发的营养缺乏导致的心力衰竭, 并先后在人源心肌细胞系 AC16、大鼠源心肌细胞系 H9c2、小鼠源心肌细胞系 HL-1 中进行造模。随后使用不同剂量的黄芩苷进行治疗干预, 发现 1、10 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的黄芩苷能够有效缓解 OGD 造模导致的心肌细胞损伤, 其中 10 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的黄芩苷的效果最为显著。

为了探究黄芩苷保护 OGD 心力衰竭模型细胞的具体作用机制, 以期为临床相关研究提供理论依据, 我们选用了人源心肌细胞系 AC16 进行 OGD 造模, 之后用 10 $\mu\text{g/mL}$ 黄芩苷处理, 提取处理前后的细胞总 RNA, 使用 RNA 测序和生物信息学技术进行分析, 并参考 COG 数据库对基因产物进行直系同源分类, 从而探究黄芩苷影响的转录本所反映的代谢或生理偏向^[22]。结果表明, 黄芩苷主要影响了 OGD 造模细胞的能量代谢相关功能。而细胞能量代谢最重要的组分是线粒体, 且有文献表明黄芩苷能够影响线粒体的生物发生等动力学指标^[23]。随后为了探究具体的作用机制, 进一步考察了黄芩苷对线粒体生物发生、分裂和融合等动力学特征的影响、以及对线粒体形态的影响。结果表明, 黄芩苷提高 *OPA1*、*MFN1*、*MFN2*、*ESRRA* 和 *NQO1* 的 mRNA 水平以及 *MFN1*、*NRF1* 的蛋白水平, 增加 *DRP1* 的磷酸化, 维持线粒体动力学和形态的稳定, 促进线粒体能量代谢。最后, 考察了在心肌细胞模型中, 黄芩苷是否直接靶向 CPT1。结果发现, 黄芩苷虽不能影响 CPT1 的含量, 但能够激活 CPT1, 从而使 OGD 造模后受损的细胞活力得以恢复。CPT1 含有多个可结合位点, 分别影响其蛋白稳定性和功能活性, 如缬氨酸 (Val275、Val414) 和酪氨酸 (Tyr498) 主要影响蛋白质本身的稳定性, 但远离其活性位点; 而氨基酸残基 381 和 481 之间的几种保守精氨酸 (Arg388、Arg451) 和色氨酸 (Trp391、Trp452) 通过电荷中和和疏水相互作用维持酶-底物复合物的稳定, 甘氨酸 (Gly709 和 Gly710) 对催化位点疏水核心的结构至关重要^[24-25], 黄芩苷可能通过选择性结合上述位点, 从而使其虽不影响 CPT1 的含量, 但直接提高了功能活性。CPT1 锚定在线粒体外膜

上, 负责将酰基辅酶 A 转化为酰基肉碱, 运输到线粒体基质中, 从而被氧化以产能^[26-27]。黄芩苷提高了 CPT1 的功能活性, 促进了线粒体内的能量产生, 使其能维持本身的动力学稳定, 促进进一步的细胞恢复等耗能过程。

综上所述, 本研究证明了黄芩苷能够通过增强 CPT1 的活性, 促进线粒体能量代谢, 并维持线粒体动力学和形态的稳定, 从而恢复 OGD 处理对心肌细胞造成的损伤, 为血管栓塞相关心力衰竭的治疗提供了新思路, 并为黄芩苷从实验室迈向临床应用提供了重要的理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Campbell P, Rutten F H, Lee M M, *et al.* Heart failure with preserved ejection fraction: Everything the clinician needs to know [J]. *Lancet*, 2024, 403(10431): 1083-1092.
- [2] Redfield M M, Borlaug B A. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Review [J]. *JAMA*, 2023, 329(10): 827-838.
- [3] Beghini A, Sammartino A M, Papp Z, *et al.* 2024 update in heart failure [J]. *ESC Heart Fail*, 2025, 12(1): 8-42.
- [4] Wang H, Chai K, Du M H, *et al.* Prevalence and incidence of heart failure among urban patients in China: A national population-based analysis [J]. *Circ Heart Fail*, 2021, 14(10): e008406.
- [5] Zheng S L, Chan F T, Nabebaccus A A, *et al.* Drug treatment effects on outcomes in heart failure with preserved ejection fraction: A systematic review and meta-analysis [J]. *Heart*, 2018, 104(5): 407-415.
- [6] 霍勇, 吴宗贵, 林谦. 通心络防治冠心病临床应用中国专家共识 [J]. 中国介入心脏病学杂志, 2024, 32(4): 181-190.
- [7] 杨欣, 朱建平, 郭向鑫, 等. 半夏白术天麻汤治疗心脑血管疾病的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(16): 253-261.
- [8] 廉坤, 李沛铄, 宋志广, 等. 慢性心力衰竭心肌细胞凋亡及中医药干预 [J/OL]. 中国实验方剂学杂志 [2025-05-10]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20241813>.
- [9] Song Y Q, Chen C, Li W, *et al.* Ginsenoside Rb1 in cardiovascular and cerebrovascular diseases: A review of therapeutic potentials and molecular mechanisms [J]. *Chin Med Herb*, 2024, 16(4): 489-504.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 923-925.
- [11] 王佳梅, 易璐, 李雪珂, 等. 黄芩苷与黄芩素对结直肠癌多重调控作用的研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(2): 742-752.

- [12] 黑爱莲, 徐平湘, 孙颂三, 等. 黄芩甙对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌损伤的保护作用 [J]. 首都医科大学学报, 1999(2): 14.
- [13] 刘桦, 吴晓冬, 王红兰, 等. 黄芩苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2002(2): 198-200.
- [14] 侯晓杰, 张建锋, 侯长周, 等. 黄芩苷药理活性和作用机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(11): 2688-2696.
- [15] Dai J Y, Liang K, Zhao S, *et al.* Chemoproteomics reveals baicalin activates hepatic CPT1 to ameliorate diet-induced obesity and hepatic steatosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(26): E5896-E5905.
- [16] 李晓云, 韩彩霞, 路义鑫, 等. 感染旋毛虫小鼠的心肌 CPT1 mRNA 表达量及血脂变化 [J]. 中国兽医科学, 2011, 41(2): 205-209.
- [17] Wang S L, Zhang X, Hou Y H, *et al.* SIRT6 activates PPAR α to improve doxorubicin-induced myocardial cell aging and damage [J]. *Chem Biol Interact*, 2024, 392: 110920.
- [18] 葛均波, 霍勇, 杨杰孚, 等. 慢性心力衰竭“新四联”药物治疗临床决策路径专家共识 [J]. 中国循环杂志, 2022, 37(8): 769-781.
- [19] Cheng Y, Yan M C, He S Y, *et al.* Baicalin alleviates angiotensin II-induced cardiomyocyte apoptosis and autophagy and modulates the AMPK/mTOR pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(9): e18321.
- [20] Liu K L, Zhou Y, Song X R, *et al.* Baicalin attenuates neuronal damage associated with SDH activation and PDK2-PDH axis dysfunction in early reperfusion [J]. *Phytomedicine*, 2024, 129: 155570.
- [21] Wang P C, Wu J, Wang Q S, *et al.* Baicalin inhibited both the Furin/TGF β 1/Smad3/TSP-1 pathway in endothelial cells and the AKT/Ca²⁺/ROS pathway in platelets to ameliorate inflammatory coagulopathy [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 949: 175674.
- [22] Galperin M Y, Vera Alvarez R, Karamycheva S, *et al.* COG database update 2024 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2025, 53(D1): D356-D363.
- [23] Zhao D J, Du B H, Xu J H, *et al.* Baicalin promotes antibacterial defenses by modulating mitochondrial function [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 621: 130-136.
- [24] Schlaepfer I R, Joshi M. CPT1A-mediated fat oxidation, mechanisms, and therapeutic potential [J]. *Endocrinology*, 2020, 161(2): bqz046.
- [25] Gobin S, Thuillier L, Jogl G, *et al.* Functional and structural basis of carnitine palmitoyltransferase 1A deficiency [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(50): 50428-50434.
- [26] McGarry J D, Brown N F. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis [J]. *Eur J Biochem*, 1997, 244(1): 1-14.
- [27] Bonnefont J P, Djouadi F, Prip-Buus C, *et al.* Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: Biochemical, molecular and medical aspects [J]. *Mol Aspects Med*. 2004, 25(5/6): 495-520.

[责任编辑 高源]