

本文引用: 李晓玲, 王丹, 肖扬, 等. 左西孟旦对缺氧复氧诱导的 H9c2 细胞凋亡、PTEN 和 PI3K/Akt 信号通路的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(11): 942-948. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2022.11.004.

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2022)30-11-0942-07

左西孟旦对缺氧复氧诱导的 H9c2 细胞凋亡、PTEN 和 PI3K/Akt 信号通路的影响

李晓玲¹, 王丹², 肖扬², 李春燕², 汪砚雨²

(河南科技大学第一附属医院 1. 药剂科, 2. 心血管内科, 河南省洛阳市 471000)

[摘要] **[目的]** 研究左西孟旦对缺氧复氧(H/R)条件下 H9c2 细胞凋亡的影响及相关机制。**[方法]** 体外培养 H9c2 细胞, 将细胞分为空白对照组、H/R 组、左西孟旦低剂量组、左西孟旦中剂量组、左西孟旦高剂量组。采用四甲基偶氮唑蓝法检测 H9c2 细胞增殖; 流式细胞仪检测 H9c2 细胞凋亡; 超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒分别检测 SOD 活性及 MDA 含量; 荧光探针法检测活性氧(ROS)水平; Western blot 检测增殖细胞核抗原(PCNA)、B 淋巴细胞瘤 2 蛋白(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、磷酸酶及张力蛋白同源物(PTEN)及磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(Akt)信号通路蛋白表达。**[结果]** 与空白对照组比较, H/R 组 H9c2 细胞增殖抑制率、凋亡率、MDA 含量、ROS 水平、PTEN 蛋白表达均显著升高($P < 0.05$), PCNA、Bcl-2、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 均显著降低, Bax 显著升高($P < 0.05$)。与 H/R 组比较, 左西孟旦低剂量组、左西孟旦中剂量组、左西孟旦高剂量组 H9c2 细胞增殖抑制率、凋亡率、MDA 含量、ROS 水平、PTEN 蛋白表达均显著降低($P < 0.05$), PCNA、Bcl-2、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 均显著升高, Bax 显著降低($P < 0.05$); 且左西孟旦剂量越高, 上述指标的相应变化越明显。**[结论]** 左西孟旦可能通过抑制 PTEN 并激活 PI3K/Akt 信号通路, 促进 H/R 条件下 H9c2 细胞增殖, 抑制细胞氧化应激和凋亡。

[关键词] 左西孟旦; 缺氧复氧; H9c2 细胞; 细胞凋亡; 磷酸酶及张力蛋白同源物; PI3K/Akt 信号通路
[中图分类号] R543 **[文献标识码]** A

Effects of levosimendan on hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis, PTEN and PI3K/Akt signaling pathway in H9c2 cells

LI Xiaoling¹, WANG Dan², XIAO Yang², LI Chunyan², WANG Yanyu²

(1. Department of Pharmacy, 2. Department of Cardiovascular Medicine, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471000, China)

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of levosimendan on apoptosis of H9c2 cells under hypoxia/reoxygenation (H/R) condition and related mechanisms. **Methods** H9c2 cells were cultured in vitro, and the cells were divided into blank control group, H/R group, low-dose levosimendan group, medium-dose levosimendan group, and high-dose levosimendan group. Proliferation of H9c2 cells was detected by methyl thiazolyl tetrazolium assay; Apoptosis of H9c2 cells was detected by flow cytometry; Superoxide dismutase (SOD) kit and malondialdehyde (MDA) kit were used to detect SOD activity and MDA content respectively; Reactive oxygen species (ROS) level was detected by fluorescent probe method; Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), phosphate and tension homology deleted on chromosome ten (PTEN) and phosphoinositide 3 kinase (PI3K)/serine threonine kinase (Akt) signaling pathway protein expression were detected by Western blot. **Results** Compared with the blank control group, the proliferation inhibition rate, apoptosis rate, MDA content, ROS level and PTEN protein expression of H9c2 cells in H/R group were significantly increased ($P < 0.05$), PCNA, Bcl-2, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt were significantly decreased, and Bax was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the H/R group, the proliferation inhi-

[收稿日期] 2021-03-04

[修回日期] 2021-07-30

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20190552019)

[作者简介] 李晓玲, 副主任药师, 研究方向为药学, E-mail: 3223731422@qq.com。通信作者汪砚雨, 博士, 主任医师, 研究方向为心血管病, E-mail: 13783197120@163.com。

bition rate, apoptosis rate, MDA content, ROS level and PTEN protein expression of H9c2 cells in the low-dose levosimendan group, the middle-dose group and the high-dose levosimendan group were significantly decreased ($P < 0.05$), PCNA, Bcl-2, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt were significantly increased, and Bax was significantly decreased ($P < 0.05$); And the higher the dose of levosimendan, the more obvious the corresponding changes of the above indicators. **Conclusion**

Levosimendan can promote cell proliferation, and inhibit cell oxidative stress and apoptosis in H9c2 cells under H/R conditions possibly by inhibiting PTEN and activating the PI3K/Akt signaling pathway.

[KEY WORDS] levosimendan; hypoxia/reoxygenation; H9c2 cell; cell apoptosis; phosphate and tension homology deleted on chromosome ten; PI3K/Akt signaling pathway

缺血性心脏病是心血管疾病患者死亡的主要原因之一,占全部心脏病死亡率的半数左右。缺血性心脏病由心脏血流灌注减少导致供氧减少使得心肌能量代谢异常所致^[1]。目前,缺血性心脏病的主要治疗手段是血流再灌注,而研究表明,缺血再灌注治疗可导致心肌出现再灌注损伤,主要表现为心肌细胞氧化应激损伤及细胞凋亡,损害心脏功能^[2]。探寻有效的预防心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia/reperfusion injury, MIRI)的药物是临床研究热点。研究证实心肌缺氧复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)损伤是 MIRI 的主要机制之一,体外建立心肌细胞 H/R 模型模拟机体 MIRI 模型,可以排除机体神经内分泌、体液等不可预知因素的干扰,有利于深入研究 MIRI 的分子机制^[3]。左西孟旦是目前临床较常用的一种改善心功能的药物,对心脏具有保护作用^[4]。孙飞等^[5]研究显示,左西孟旦可有效改善老年急性心力衰竭患者心脏功能并减少不良反应的发生。同鑫等^[6]研究显示,左西孟旦可增强心脏瓣膜置换术患者术后心肌收缩力,对围术期 MIRI 具有明显保护作用。目前,有关左西孟旦对 MIRI 的保护作用机制尚未明确,因此本研究以左西孟旦干预 H/R 条件下的心肌细胞,观察其对细胞凋亡的影响,为明确左西孟旦的心肌保护作用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

大鼠心肌细胞 H9c2 (批号:Cs010117)购自上海宾德生物公司;左西孟旦注射液(5 mL;12.5 mg)购自山东齐鲁制药公司;DMEM 培养基(批号:CDLG-3719)、四甲基偶氮噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)试剂盒(批号:GM01-500T)购自上海歌凡生物公司;AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒(批号:556547)购自杭州昊鑫生物公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(批号:DS-496)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试

剂盒(批号:DS-362)购自上海广锐生物公司;双氢-乙酰乙酸二氯荧光黄(DCFH-DA)试剂盒(批号:CA13410-A)购自北京索莱宝生物有限公司;兔源一抗 B 淋巴细胞瘤 2 蛋白(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)(批号:ab196495)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)(批号:ab29)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)(批号:ab32503)、磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3 kinase, PI3K)(批号:ab154598)、磷酸化 PI3K(phosphorylated PI3K, p-PI3K)(批号:ab151549)、磷酸酶及张力蛋白同源物(phosphate and tension homology deleted on chromosome ten, PTEN)(批号:ab267787)、丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(serine threonine kinase, Akt)(批号:ab8805)、磷酸化 Akt(phosphorylated Akt, p-Akt)(批号:ab38449)、 β -actin(批号:ab6276)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔二抗(批号:ab6721)均购自英国 Abcam 公司。

CO₂ 培养箱(型号:Thermo 311)购自上海土森视觉科技公司;酶标仪(型号:Elx800)购自美国伯腾仪器公司;倒置荧光显微镜(型号:TE2000)购自上海远耀生物公司。

1.2 细胞培养

将 H9c2 细胞置于含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM 培养基中,在 37 °C、5% CO₂ 的条件下培养。

1.3 H/R 细胞模型建立

参照文献^[7]建立 H/R 细胞模型。实验时弃去细胞正常培养基,将细胞置于缺氧盒中持续通入 95% N₂+5% CO₂ 的混合气体并于 37 °C 下缺氧 3 h,弃去缺氧液,持续通入 95% O₂、5% CO₂ 的混合气体并于 37 °C 下复氧 3 h。

1.4 细胞分组及处理

取对数生长期的 H9c2 细胞以 2.5×10^5 个/孔接种于 24 孔板中,并随机分成 5 组:(1)空白对照组:只含 H9c2 细胞,在 37 °C、5% CO₂、95% O₂ 培养箱中以无 FBS 的培养基正常培养细胞 48 h;(2)H/R 组:按照“1.3”操作后,更换为正常培养基继续培

养 48 h; (3) 左西孟旦低剂量组、左西孟旦中剂量组、左西孟旦高剂量组; 细胞进行 H/R 处理后分别加入 0.1、0.2、0.3 $\mu\text{mol/L}$ 左西孟旦溶液处理^[8], 后更换为正常培养基继续培养 48 h。

1.5 MTT 法检测 H9c2 细胞增殖

将 H9c2 细胞以 2.5×10^5 个/孔接种于 96 孔板中, 培养 48 h 后, 向每孔加入 20 μL MTT 溶液 (5 g/L), 孵育 4 h 后, 再向各孔加入 150 μL 二甲基亚砷并在摇床上震荡 10 min。用酶标仪在 490 nm 波长处检测 OD 值, 并计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率 (%) = (1 - 实验组 OD 值/空白对照组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.6 流式细胞仪检测 H9c2 细胞凋亡

按照 Annexin-V FITC/PI 试剂盒说明书对 H9c2 细胞进行 PI 和 AnnexinV-FITC 染色, 通过流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.7 各组 H9c2 细胞中 SOD、MDA 水平检测

按照 SOD 试剂盒、MDA 试剂盒说明书检测细胞上清液中 SOD 活性及 MDA 含量。

1.8 荧光探针法检测各组 H9c2 细胞活性氧水平

取各组培养 48 h 的 H9c2 细胞, 以 1×10^6 个/mL 接种于细胞培养板中, 每孔 200 μL , 24 h 后, 除去各孔中的培养液; 加入 1 mL 经无 FBS 的培养基稀释的 DCFH-DA (10 $\mu\text{mol/L}$) 溶液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中反应 30 min 后, 用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min, 以除去未进入细胞内的 DCFH-DA; 荧光显微镜下 (激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm) 观察细胞二氯荧光黄 (dichlorofluorescein, DCF) 荧光强度, 以绿色荧光强度反映活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成水平。

1.9 Western blot 检测 Bcl-2、PCNA、Bax、PTEN 及 PI3K/Akt 信号通路蛋白表达

用 RIPA 裂解液提取总蛋白, 蛋白质经定量、电泳、转膜、封闭后, 分别加入一抗 Bcl-2、PCNA、Bax、PTEN、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、 β -actin, 稀释比例均为 1 : 1 000, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后, 再加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗 (1 : 2 000), 在常温下孵育 1 h, 经

显色后, 通过 Image J 软件定量蛋白灰度值。

1.10 统计分析

SPSS 22.0 软件用于统计分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素方差分析用于多组之间的比较, 进一步两组间的比较则采用 SNK-*q* 检验, *F* 值代表组间均方和组内均方的比值, 比值越大表明相对组间的差异越大, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 H9c2 细胞增殖能力比较

与空白对照组比较, H/R 组 H9c2 细胞增殖抑制率升高 ($P < 0.05$); 与 H/R 组比较, 左西孟旦低剂量组、左西孟旦中剂量组、左西孟旦高剂量组 H9c2 细胞增殖抑制率显著降低 ($P < 0.05$), 且左西孟旦剂量越高, H9c2 细胞增殖抑制率越低。详见表 1。

表 1. 各组 H9c2 细胞增殖抑制率比较

Table 1. Comparison of the proliferation inhibition rate of H9c2 cells in each group

分组	<i>n</i>	细胞增殖抑制率/%
空白对照组	6	0.00
H/R 组	6	33.37 \pm 5.10 ^a
左西孟旦低剂量组	6	29.56 \pm 4.39 ^b
左西孟旦中剂量组	6	21.68 \pm 3.24 ^b
左西孟旦高剂量组	6	15.87 \pm 2.55 ^b
<i>F</i>		262.64
<i>P</i>		0.00

注: 空白处表示数据不适用。a 为 $P < 0.05$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 H/R 组比较。

2.2 各组 H9c2 细胞凋亡情况比较

与空白对照组比较, H/R 组 H9c2 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$); 与 H/R 组比较, 左西孟旦低剂量组、左西孟旦中剂量组、左西孟旦高剂量组 H9c2 细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$), 且左西孟旦剂量越高, H9c2 细胞凋亡率越低。详见图 1 及表 2。

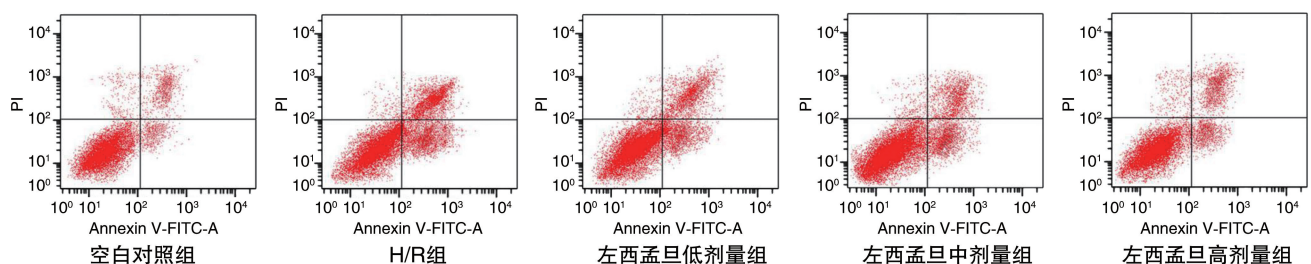


图 1. 流式细胞仪检测 H9c2 细胞凋亡率

Figure 1. Apoptosis rate of H9c2 cells detected by flow cytometry

表 2. 各组 H9c2 细胞凋亡率比较

Table 2. Comparison of apoptosis rate of H9c2 cells in each group

分组	<i>n</i>	早期凋亡率/%	晚期凋亡率/%
空白对照组	6	7.35±1.10	3.22±0.49
H/R 组	6	22.58±3.38 ^a	14.29±2.14 ^a
左西孟旦低剂量组	6	15.16±2.27 ^b	11.84±1.78 ^b
左西孟旦中剂量组	6	10.05±1.51 ^b	9.28±1.39 ^b
左西孟旦高剂量组	6	8.77±1.31 ^b	6.25±0.94 ^b
<i>F</i>		96.28	137.78
<i>P</i>		0.00	0.00

注:空白处表示数据不适用。a 为 $P<0.05$,与空白对照组比较; b 为 $P<0.05$,与 H/R 组比较。

表 3. 各组 H9c2 细胞氧化应激水平比较

Table 3. Comparison of oxidative stress level of H9c2 cells in each group

分组	<i>n</i>	SOD/(kU/g)	MDA/($\mu\text{mol/g}$)
空白对照组	6	0.55±0.09	2.06±0.45
H/R 组	6	0.33±0.08 ^a	9.93±1.48 ^a
左西孟旦低剂量组	6	0.72±0.11 ^b	8.50±1.27 ^b
左西孟旦中剂量组	6	0.95±0.14 ^b	6.82±1.01 ^b
左西孟旦高剂量组	6	1.21±0.18 ^b	4.97±0.75 ^b
<i>F</i>		62.61	135.81
<i>P</i>		0.00	0.00

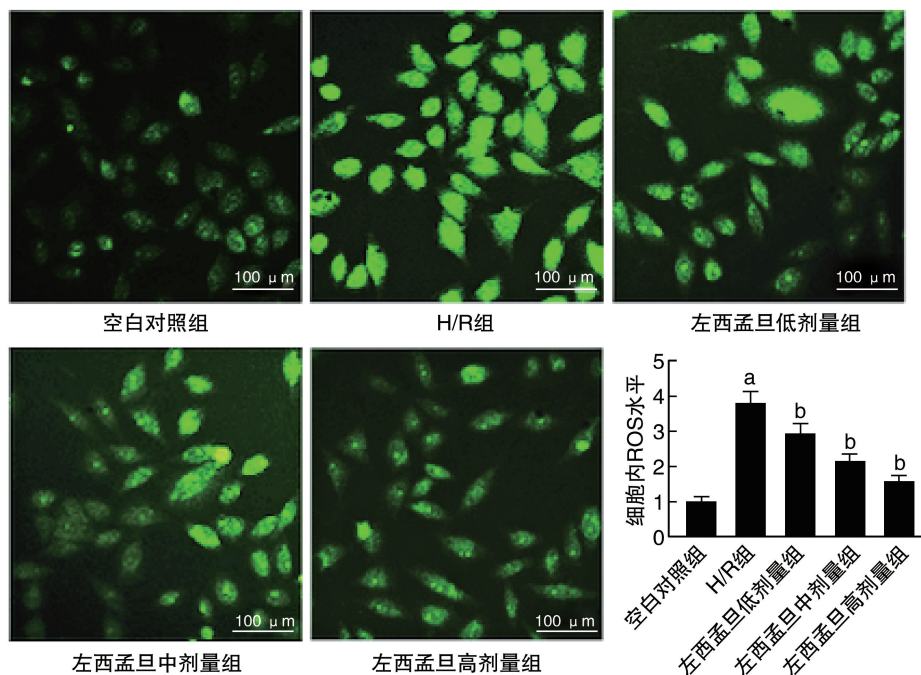
注:空白处表示数据不适用。a 为 $P<0.05$,与空白对照组比较; b 为 $P<0.05$,与 H/R 组比较。

2.3 各组 H9c2 细胞氧化应激水平比较

与空白对照组比较,H/R 组 H9c2 细胞 SOD 活性显著降低,MDA 含量显著升高($P<0.05$);与 H/R 组比较,左西孟旦低剂量组、左西孟旦中剂量组、左西孟旦高剂量组 H9c2 细胞 SOD 活性显著升高,MDA 含量显著降低($P<0.05$),且左西孟旦剂量越高,H9c2 细胞 SOD 活性越高,MDA 含量越低。详见表 3。

2.4 各组 H9c2 细胞 ROS 水平比较

荧光显微镜下观察,细胞内的 ROS 催化 DCFH-DA 探针产生绿色荧光,绿色荧光强度与 ROS 水平成正比。与空白对照组比较,H/R 组 H9c2 细胞绿色荧光显著增加($P<0.05$);与 H/R 组比较,左西孟旦低剂量组、左西孟旦中剂量组、左西孟旦高剂量组 H9c2 细胞绿色荧光显著降低($P<0.05$),且左西孟旦剂量越高,H9c2 细胞绿色荧光越低。详见图 2。

图 2. 各组 H9c2 细胞荧光强度(ROS 水平)比较($n=6$)

a 为 $P<0.05$,与空白对照组比较;b 为 $P<0.05$,与 H/R 组比较。

Figure 2. Comparison of fluorescence intensity (ROS level) of H9c2 cells in each group ($n=6$)

2.5 各组 H9c2 细胞增殖、凋亡相关蛋白表达比较

与空白对照组比较, H/R 组 H9c2 细胞 PCNA、Bcl-2 蛋白表达降低, Bax 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与 H/R 组比较, 左西孟旦低剂量组、左西孟旦中剂量组、左西孟旦高剂量组 H9c2 细胞 PCNA、Bcl-2 蛋白表达升高, Bax 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 且左西孟旦剂量越高, H9c2 细胞中 PCNA、Bcl-2 蛋白表达水平越高, Bax 蛋白表达水平越低。详见图 3。

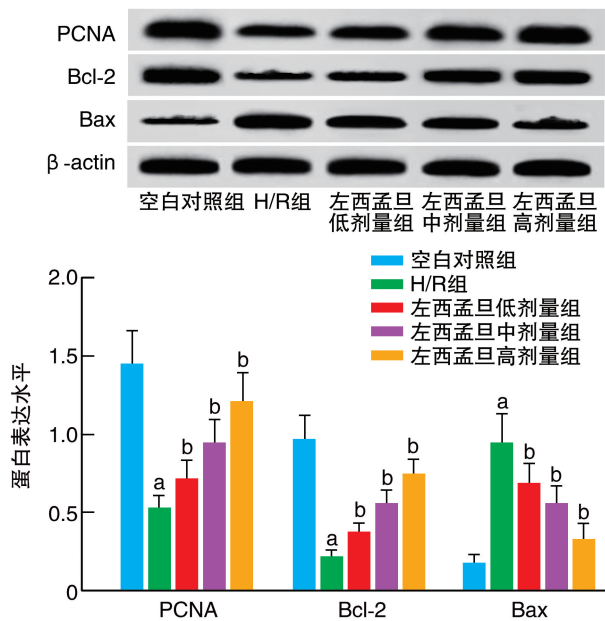


图 3. 各组 H9c2 细胞 PCNA、Bcl-2、Bax 蛋白表达比较 ($n=6$)
a 为 $P < 0.05$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 H/R 组比较。

Figure 3. Comparison of PCNA, Bcl-2 and Bax protein expression of H9c2 cells in each group ($n=6$)

2.6 各组 H9c2 细胞 PTEN 和 PI3K/Akt 信号通路蛋白表达变化

与空白对照组比较, H/R 组 PTEN 蛋白显著升高 ($P < 0.05$), p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 显著降低 ($P < 0.05$); 与 H/R 组比较, 左西孟旦低剂量组、左西孟旦中剂量组、左西孟旦高剂量组 PTEN 蛋白显著降低 ($P < 0.05$), p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 显著升高 ($P < 0.05$), 且左西孟旦剂量越高, H9c2 细胞中 PTEN 蛋白水平越低, p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 越高。详见图 4。

3 讨论

缺血性心脏病是全世界公共健康问题之一, 心肌缺血再灌注是其主要治疗策略, 然而缺血心肌在恢复血流灌注后极易引起 MIRI, 仍然是阻碍缺血性

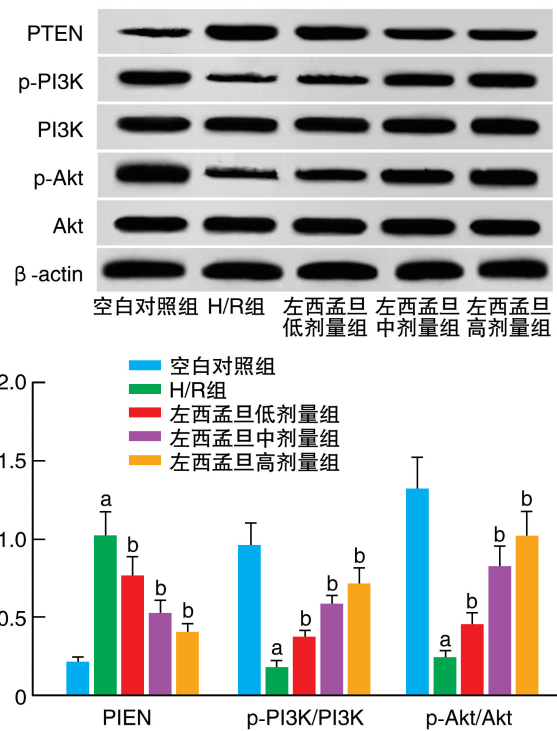


图 4. 各组 H9c2 细胞 PTEN 和 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达变化 ($n=6$)
a 为 $P < 0.05$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 H/R 组比较。

Figure 4. Changes in the expression of PTEN and PI3K/Akt signaling pathway-related proteins of H9c2 cells in each group ($n=6$)

心脏病治疗的一大难题^[9]。近年来, MIRI 的防治成为心血管领域的研究热点, 心肌细胞 H/R 模型是研究 MIRI 的常用细胞模型, 可从细胞层面上来研究关于 MIRI 的病理变化^[10]。

左西孟旦是新型正性肌力药物, 能够增加肌钙蛋白对钙离子的敏感性, 改善患者心肌收缩力, 从而提高心功能^[11]。邱云等^[12]研究显示, 左西孟旦可有效减少左心功能不全患者心脏手术后并发症的发生, 改善患者预后。刘杲等^[13]研究显示, 左西孟旦可改善心力衰竭患者心肌氧化应激损伤及心功能。心肌细胞缺氧使得细胞膜受损, 再复氧时产生大量氧自由基, 使细胞内的抗氧化酶 (如 SOD) 活性降低, 导致 ROS 含量升高, 引起脂质发生过氧化, 破坏细胞结构, 同时会生成大量 MDA, 导致细胞发生氧化应激损伤, 进而介导细胞凋亡^[14]。因此有效减少 H/R 心肌细胞氧化应激损伤诱导的细胞凋亡是治疗 MIRI 的重要策略之一。PCNA 是细胞增殖相关蛋白, 高表达于肿瘤癌变组织; Bcl-2 是一种可抑制细胞凋亡的原癌蛋白, 而 Bax 作为人体最主要的促凋亡蛋白之一, 当接收到诱导凋亡信号时, Bcl-

2 与 Bax 在线粒体膜上结合并形成异二聚体,进而增强线粒体膜的通透性^[15]。目前有关左西孟旦对 MIRI 的保护作用机制研究鲜有报道,因此本研究建立 H/R 条件下体外培养的心肌 H9c2 细胞损伤模型,以左西孟旦进行干预,结果显示,与空白对照组比较,H/R 组 H9c2 细胞增殖抑制率、凋亡率、MDA 含量、ROS 水平及 Bax 蛋白表达显著升高,SOD 活性及 PCNA、Bcl-2 蛋白表达显著降低。当加入不同剂量的左西孟旦药物处理后,H/R 条件下的 H9c2 细胞增殖抑制率、MDA 含量及 ROS 水平显著降低,SOD 活性显著升高。说明左西孟旦可能促进 H/R 条件下 H9c2 细胞增殖,抑制细胞氧化应激和凋亡以缓解心肌损伤。类似的研究还有很多,如左西孟旦可抑制猪冠状动脉微栓塞后心肌细胞的凋亡^[16];左西孟旦对脂多糖诱导的乳鼠心肌细胞损伤有保护作用,该机制与抑制细胞凋亡、促进 Bcl-2 蛋白的表达相关^[17]。

PTEN 作为一种抑癌蛋白,其具有双重脂质磷酸酶活性,此外,PTEN 对 PI3K/Akt 信号通路还有负向调控作用^[18]。PI3K 作为 PI3K/Akt 信号通路的起始因子,当其活化后可产生第二信使 PIP3,并进一步磷酸化 Akt 使 Akt 活化,而活化的 Akt 可抑制 Bax 表达,促进抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达,进而抑制细胞凋亡^[19]。据报道,咪达唑仑通过激活 PI3K/Akt 信号通路,增强高糖诱导的心肌细胞活性,抑制细胞凋亡并减轻氧化应激^[20];淫羊藿黄酮可抑制心肌细胞 PTEN 表达,活化 PI3K/Akt 信号通路,进而降低心肌超氧化物和 MDA 的生成,最终减轻 MIRI^[21]。本研究显示,H/R 条件下 H9c2 细胞 PTEN 蛋白表达上调且 PI3K/Akt 信号通路活化受抑制,当加入左西孟旦药物处理后,H9c2 细胞 PTEN 蛋白表达下调且 PI3K/Akt 信号通路被激活;说明左西孟旦能促进 H/R 条件下 H9c2 细胞增殖,抑制细胞氧化应激和凋亡,该机制可能与下调 PTEN 并激活 PI3K/Akt 信号通路有关。

综上所述,左西孟旦可能通过抑制 PTEN 并激活 PI3K/Akt 信号通路,促进 H/R 条件下 H9c2 细胞增殖,抑制细胞氧化应激和凋亡。由于细胞实验具有一定局限性,后期将进一步开展动物实验以验证 H/R 条件下左西孟旦对 PTEN 和 PI3K/Akt 信号通路介导的心肌细胞凋亡的影响,为临床治疗提供更可靠的依据。

[参考文献]

[1] 于晓朴,边云飞,庞有成,等. 外泌体 miRNA 在缺血性

心脏病中的作用机制及靶向治疗前景[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(2): 171-178.

YU X P, BIAN Y F, PANG Y C, et al. The mechanism of exosome miRNA in ischemic heart disease and the prospect of targeted therapy[J]. Chin J Arterioscler, 2021, 29(2): 171-178.

[2] YU W C, XU M, ZHANG T, et al. Mst1 promotes cardiac ischemia-reperfusion injury by inhibiting the ERK-CREB pathway and repressing FUNDC1-mediated mitophagy[J]. J Physiol Sci, 2019, 69(1): 113-127.

[3] 熊伟,钱金桥. 心肌细胞缺氧/复氧模型的构建及研究进展[J]. 医学综述, 2019, 25(18): 3578-3583.

XIONG W, QIAN J Q. Research progress in building and applying cardiomyocytes injury model[J]. Med Recapitulate, 2019, 25(18): 3578-3583.

[4] 张连芳,沈洪,罗哲. 左西孟旦治疗顽固性心力衰竭的疗效 Meta 分析[J]. 中外医疗, 2020, 39(13): 85-89.

ZHANG L F, SHEN H, LUO Z. Meta analysis of the efficacy of levosimendan in the treatment of refractory heart failure[J]. Chin Foreign Med Treat, 2020, 39(13): 85-89.

[5] 孙飞,王海珠,刘丹丹,等. 左西孟旦对老年急性心力衰竭患者心脏功能 MACE 事件及不良反应的影响[J]. 安徽医学, 2019, 40(6): 621-624.

SUN F, WANG H Z, LIU D D, et al. Effect of levosimendan on cardiac function, MACE events and adverse reactions in elderly patients with acute heart failure[J]. Anhui Med J, 2019, 40(6): 621-624.

[6] 同鑫,金冉. 左西孟旦与米力农在心脏瓣膜置换术围术期的心肌保护作用研究[J]. 实用药物与临床, 2019, 22(1): 43-46.

TONG X, JIN R. Myocardial protection of levosimendan and milrinone during the perioperative period of heart valve replacement[J]. Pract Pharm Clin Remedies, 2019, 22(1): 43-46.

[7] 胥甜甜. 葛根素抗心肌细胞缺氧复氧损伤保护作用机制研究[D]. 江西:南昌大学, 2014: 5-8.

XU T T. Protective mechanism of puerarin against hypoxia reoxygenation injury of cardiomyocytes[D]. Jiangxi: Nanchang University, 2014: 5-8.

[8] 刘永利. 左西孟旦对 H₂O₂ 所致大鼠心肌细胞氧化损伤的保护作用[D]. 长春:吉林大学, 2014: 14-21.

LIU Y L. Protective effect of levosimendan on oxidative damage of rat cardiomyocytes induced by H₂O₂ [D]. Changchun: Jilin University, 2014: 14-21.

[9] 刘丹勇,夏正远,韩荣辉,等. 心肌缺血再灌注损伤机制研究的回顾与展望[J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(12): 1013-1019.

LIU D Y, XIA Z Y, HAN R H, et al. Review and prospect

- on the mechanism of myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Chin J Arterioscler*, 2020, 28(12): 1013-1019.
- [10] 张由建, 范卫东, 吴玉国. 胰高血糖素样肽 1 对 H9c2 心肌细胞缺氧复氧损伤的保护作用及机制研究[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(5): 395-399.
ZHANG Y J, FAN W D, WU Y G. Protective effect and mechanism of glucagon like peptide-1 on hypoxia/reoxygenation injury of H9c2 cardiomyocytes[J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(5): 395-399.
- [11] 蒙茂龙, 王志伟, 周楚芝, 等. 左西孟旦在重症瓣膜病术中缺血预处理中的应用分析[J]. *临床外科杂志*, 2019, 27(4): 352-354.
MENG M L, WANG Z W, ZHOU C Z, et al. Application of levosimendan in ischemic preconditioning during operation of severe valvular disease[J]. *J Clin Surg*, 2019, 27(4): 352-354.
- [12] 邱云, 高素敏, 孙虹, 等. 左西孟旦对合并左心功能不全患者心脏手术预后影响的 Meta 分析[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2018, 39(12): 1138-1143.
QIU Y, GAO S M, SUN H, et al. Efficacy of levosimendan in patients with left ventricular dysfunction undergoing cardiac surgery: a Meta-analysis [J]. *Int J Anesthesiol Resusc*, 2018, 39(12): 1138-1143.
- [13] 刘杲, 伊争伟, 张鹏博. 左西孟旦联合托伐普坦对顽固性心力衰竭患者氧化应激心肌损伤及心功能的影响[J]. *安徽医学*, 2019, 40(6): 683-685.
LIU G, YI Z W, ZHANG P B. Effects of levosimendan combined with tolvaptan on oxidative stress myocardial injury and cardiac function in patients with intractable heart failure[J]. *Anhui Med J*, 2019, 40(6): 683-685.
- [14] ZHOU D L, DING T T, NI B, et al. Hydroxysafflor yellow A mitigated myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting the activation of the JAK2/STAT1 pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(2): 405-416.
- [15] CHEN S Q, LYU L R, ZHAN Z Y, et al. Silencing of long noncoding RNA SRRM2-AS exerts suppressive effects on angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma via activating MYLK-mediated cGMP-PKG signaling pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(11): 7757-7768.
- [16] 张龙岩, 鄢华, 宋丹, 等. 左西孟旦调控磷酸酶基因蛋白激酶 B 通路降低猪冠状动脉微栓塞后心肌细胞的凋亡[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2019, 21(7): 750-753.
ZHANG L Y, YAN H, SONG D, et al. Levosimendan regulates phosphatase gene protein kinase B pathway to reduce cardiomyocyte apoptosis after coronary microembolization in pigs[J]. *Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis*, 2019, 21(7): 750-753.
- [17] 穆立华, 张丽华, 蒋友旭, 等. 左西孟旦对 LPS 诱导的乳鼠心肌细胞损伤的保护作用[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2017, 52(4): 427-430.
MU L H, ZHANG L H, JIANG Y X, et al. Protective effect of levosimendan on LPS induced cardiomyocyte injury in neonatal rats[J]. *J Zhengzhou Univ (Med Sci)*, 2017, 52(4): 427-430.
- [18] PHAM F, CHEHADEH S E, LIPSKER D. PTEN hamartoma tumor syndrome in children: diagnosis based on cutaneous manifestations with a focus on translucent palmo-plantar papules [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2020, 34(10): e632-e633.
- [19] QU Y, SUN Q, SONG X X, et al. Helix B surface peptide reduces sepsis-induced kidney injury via PI3K/Akt pathway [J]. *Nephrology*, 2020, 25(7): 527-534.
- [20] 吴丹, 刘佳, 陈丹. 咪达唑仑调控 PI3K/AKT 信号通路对高糖诱导心肌细胞氧化应激和凋亡的影响[J]. *遵义医科大学学报*, 2020, 43(4): 500-505.
WU D, LIU J, CHEN D. Effect of midazolam regulation of PI3K/AKT signaling pathway on high glucose-induced cardiomyocyte oxidative stress and apoptosis [J]. *J Zunyi Med Univ*, 2020, 43(4): 500-505.
- [21] 王萌, 余再新, 李唐志铭. PTEN/PI3K/Akt 信号转导通路在心肌缺血再灌注损伤中的研究进展[J]. *医学综述*, 2020, 26(23): 4588-4592.
WANG M, YU Z X, LI-TANG Z M. Research progresses of PTEN/PI3K/Akt signaling pathway in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Med Recapitulate*, 2020, 26(23): 4588-4592.

(此文编辑 曾学清)