

本文引用: 施凯佳, 罗才, 赵阳阳, 等. 基于网络药理学和细胞学实验探讨黄芩对糖尿病心肌纤维化的保护作用及机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(5): 386-394. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.05.003.

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2024)32-05-0386-09

基于网络药理学和细胞学实验探讨黄芩对糖尿病心肌纤维化的保护作用及机制

施凯佳, 罗才, 赵阳阳, 朱星霖, 柴金萱, 郭峻莉, 揭伟

海南医学院第一附属医院 海南省热带心血管病研究重点实验室, 海南省海口市 571199

[摘要] **[目的]** 探讨黄芩有效成分在改善糖尿病心肌病(DCM)纤维化中的作用及机制。**[方法]** 通过 TC-MSP 数据库及小分子药物靶点预测在线平台(Swiss Target Prediction)挖掘黄芩有效成分及所对应的靶点, 利用 GeneCards、Disgenet、UniProt、OMIM 数据库收集并筛选 DCM 相关的疾病基因靶点, 获取交集基因后导入 String 11.5 数据库中, 构建药物-疾病蛋白互作网络图, 利用 Cytoscape 3.9.1 软件对关键靶点网络进行可视化。运用 Metascape 在线平台挖掘黄芩有效成分抗 DCM 的分子靶点, 并通过 KEGG 数据库绘制通路图。H9c2 和 AC16 心肌细胞经 5.5 mmol/L D-葡萄糖刺激为正常糖对照组, 以 35 mmol/L D-葡萄糖刺激为高糖组, 以 10 μ mol/L 黄芩苷进行干预, 采用 RT-qPCR 检测转化生长因子 β 1 (TGF- β 1)、胶原蛋白 I (COL I) 和胶原蛋白 III (COL III) 的 mRNA 表达水平, Western blot 检测 Smad2/3、p-Smad2/3、COL I 和 COL III 的蛋白表达水平, ELISA 测定上清中 TGF- β 1 水平。**[结果]** 通过上述平台共检索得到包括黄芩苷在内的 33 个有效成分、441 个核心靶点和 1 884 个 DCM 疾病基因, 取交集后得到黄芩治疗 DCM 的 150 个核心基因, 经 String-PPI 得到药物疾病基因间相互作用的 TGF- β 1、TP53、MMP-9 及 IL-6 等基因; KEGG 富集到 MAPK、PI3K/Akt 等信号通路。体外实验显示, 高糖刺激 H9c2 和 AC16 心肌细胞导致 TGF- β 1、COL I、COL III mRNA 表达水平、p-Smad2/3、COL I、COL III 蛋白表达水平上调及显著增加上清中 TGF- β 1 含量, 黄芩苷显著减弱其表达。**[结论]** 黄芩多活性成分通过多靶点发挥抗 DCM 作用, 其中活性成分黄芩苷通过抑制 TGF- β 1/Smad 信号改善高糖诱导的心肌细胞纤维化而在 DCM 中发挥保护作用。

[关键词] 糖尿病心肌病; 网络药理学; 黄芩; 心肌细胞; 纤维化

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Protective effect and mechanism of Scutellariae Radix on fibrosis in diabetic cardiomyopathy based on network pharmacology and cytology experiments

SHI Kaijia, LUO Cai, ZHAO Yangyang, ZHU Xinglin, CHAI Jinxuan, GUO Junli, JIE Wei

The First Affiliated Hospital of Hainan Medical University & The Key Laboratory of Tropical Cardiovascular Disease Research of Hainan Province, Haikou, Hainan 571199, China

[ABSTRACT] **Aim** To explore the role and mechanism of the effective ingredients of Scutellariae Radix in improving the fibrosis of diabetes cardiomyopathy (DCM). **Methods** The technology platform of Chinese medicine system pharmacology (TCMSP) and the small molecule drug target prediction (Swiss Target Prediction) platform were used to excavate the active components of Scutellariae Radix and the target of its response. DCM related disease gene targets were screened using GeneCards, Disgene, UniPort and OMIM databases, and intersecting genes were imported into the String 11.5 database to construct a drug-disease-protein interaction network diagram. Cytoscape 3.9.1 software was adopted to visualize the key target network. Metascape platform was used to explore the molecular targets of Scutellariae Radix effective ingredients against DCM, and draw pathway maps through the KEGG database. H9c2 and AC16 cardiomyocytes were stimulated with 5.5 mmol/L D-glucose as the normal glucose control group, 35 mmol/L D-glucose as the high glucose group, and 10 μ mol/L Baicalin was used for intervention. The levels of TGF- β 1, collagen I (COL I) and

[收稿日期] 2023-12-08

[修回日期] 2024-01-22

[基金项目] 海南省重点研发项目(ZDYF2022SHFZ038); 国家自然科学基金项目(82060053)

[作者简介] 施凯佳, 博士研究生, 研究方向为心血管疾病基础与转化研究, E-mail: KaijiaShi824@126.com。通信作者揭伟, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管疾病基础与转化研究, E-mail: wei_jie@hainmc.edu.cn。

collagen III (COL III) mRNA were detected by RT-qPCR, and the expression of Smad2/3, p-Smad2/3, COL I and COL III protein were detected by Western blot, TGF- β 1 level in supernatant was assessed by ELISA. **Results** Through the above platform, a total of 33 effective ingredients including Baicalin, 441 core targets, and 1 884 DCM disease genes were retrieved, 150 core genes for treating DCM with Scutellariae Radix were obtained. The drug-disease interacted genes such as TGF- β 1, TP53, MMP-9 and IL-6 were obtained through String PPI, KEGG signaling pathways such as MAPK and PI3K/Akt were enriched. *In vitro* experiments showed high glucose stimulation of H9c2 and AC16 cardiomyocytes led to upregulation of TGF- β 1, COL I and COL III mRNA levels, p-Smad2/3, COL I and COL III protein levels, and significantly increased the content of TGF- β 1 in the supernatant, while Baicalin weakened its expression. **Conclusion** The active ingredients of Scutellariae Radix exert anti DCM effects through multiple targets, among which Baicalin inhibits TGF- β 1/Smad signaling to improve high glucose induced cardiomyocyte fibrosis and plays a protective role in DCM.

[**KEY WORDS**] diabetic cardiomyopathy; network pharmacology; Scutellariae Radix; cardiomyocyte; fibrosis

糖尿病是心血管疾病的重要危险因素之一,全球糖尿病患者人数预计在 2030 年达到 5.78 亿,2045 年到达 7 亿^[1]。由糖尿病导致的心脏衰竭风险比非糖尿病高 2~3 倍,且预后更差^[2]。糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)是糖尿病慢性微血管并发症之一,是指心脏异常不能完全用高血压性心脏病、冠状动脉粥样硬化性心脏病及其他心脏病变来解释的心肌疾病^[3-4]。分子机制上,随着循环中的血糖浓度升高,心肌细胞持续被高糖刺激,导致细胞内环境稳态改变,晚期糖基化终末产物堆积,改变心肌细胞正常信号通路的传导,介导胶原产生并促进心肌纤维化,加速心脏功能衰竭,最终导致左心室肥大和心脏重塑,心脏的舒缩功能下降^[5-6]。有关 DCM 的发病机制一直是研究的热点,由于人类心脏组织样本获取有限,其致病假说大多通过动物模型和细胞学实验进行验证^[7],迄今相关发病机制尚未完全明确。

近年来采用天然中草药在心血管疾病的临床试验中取得了较好进展。黄芩苷是从中药黄芩中提取的黄酮类化合物,具有抗炎、抗氧化和抗凋亡等生物活性^[8-10]。既往研究已经表明黄芩苷具有抗纤维化及器官保护作用^[11-13],但针对黄芩苷治疗 DCM 的研究较缺乏。本研究采用网络药理学方法从整体层面阐述药物(黄芩)、靶点和疾病之间的关系,并通过细胞学实验对黄芩苷抗糖尿病心肌损伤的效果和机制进行验证,以期为黄芩治疗 DCM 的进一步开发和临床应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 细胞系

大鼠心肌细胞系 H9c2 细胞和人 AC16 心肌细胞购自武汉 Procell 公司,所有细胞均经 STR 鉴定。

1.2 主要药物、试剂与仪器

黄芩苷(批次 HY-N0197-25384);D-葡萄糖(Bio-Froxx);胎牛血清和低糖 DMEM 培养基(Biological Industries);cDNA 反转录试剂盒和 real-time PCR 试剂盒(Yeasen);TGF- β 1 的 ELISA 试剂盒(BBI);PCR 引物(上海生工);Trizol(Ambion);ECL 发光试剂盒(Biosharp);鼠抗 β -actin(碧云天);兔抗 COL I、兔抗 COL III、兔抗 p-Smad2/3 及兔抗 Smad2/3 (ABclonal)。CO₂ 培养箱(ESCO, CCL-170B-8);多功能酶标仪(BIO-TEK SynergyHTX);荧光定量 PCR 仪(Agilent Mx3005P);全自动化学发光图像分析系统(Tanon-ABL X5)。

1.3 网络药理学研究预测黄芩主要有效化合物及其基因靶点

以“黄芩”为筛选词在 TCMSp 数据库(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)中检索其化学成分,并依据口服生物利用度[(oral bioavailability, OB) \geq 30%]、类药性[(drug-like, DL) \geq 0.18]筛选出其核心成分,再利用 TCMSp 数据库找出核心成分所对应的靶点;利用 Swiss Target Prediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)对所检出的核心化学成分进行扩大检索,保留 Probability \geq 0.2 的靶基因;随后在 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)将基因靶点名称规范并统一格式。

1.4 筛选 DCM 相关靶点基因

在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)中以“diabetic cardiomyopathy”为检索关键词,保留 DCM 相关得分 Relevance scored \geq 1.0 的靶基因;再利用 Disgenet(<https://www.disgenet.org/>)和 OMIM(<https://omim.org/>)疾病基因数据库,同样以“diabetic cardiomyopathy”为检索关键词,保留 Score \geq 0.1 的目标疾病基因靶点。

1.5 获取黄芩主要活性成分的靶基因与 DCM 的靶基因的交集

利用 Venny 2.1.0 在线作图平台(<https://bioin->

fogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html) 获取黄芩与 DCM 的交集靶基因。

1.6 构建蛋白质与蛋白质相互作用网络图

将 1.5 获得的药物疾病共同基因导入 String 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 中, 条件物种设置为“人”, 得到黄芩抗 DCM 的蛋白质与蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络图和相互间存在作用的基因, 随后将所得的数据导入 Cytoscape 3.9.1 进行拓扑分析及可视化。

1.7 GO 和 KEGG 富集分析

将 1.6 所得相互作用的基因导入 Metascape 网络在线平台 (<https://metascape.org/gp-/index>), 设置检索物种为“人”, 并将富集得到的 KEGG 信号通路 (signaling pathway, SP)、生物学过程 (biological process, BP)、细胞组成 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 的数据信息导入微生物信数据分析与可视化平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>), 绘制富集气泡图。

1.8 黄芩主要有效活性成分黄芩苷对心肌细胞活性的影响

H9c2 和 AC16 心肌细胞以含 10% 胎牛血清、5.5 mmol/L D-葡萄糖的 DMEM 培养基常规培养, 对数生长期细胞接种于 96 孔板中, 每孔约 2 000 个细胞, 每组 3 个复孔, 24 h 后再以无血清单纯 DMEM 饥饿处理细胞 12 h, 分别加入含不同浓度 (0、5、10、15、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 的黄芩苷和 35 mmol/L D-葡萄糖的 DMEM 完全培养基, 48 h 后每孔加入 CCK-8 反应

液 10 μL , 于培养箱中孵育 1~2 h 后用酶标仪测定 450 nm 波长处的 OD 值。

1.9 ELISA 检测细胞上清液中 TGF- β 1 水平

细胞干预 48 h 后从 6 孔板中收取细胞培养液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 使用酶标仪检测 450 nm 波长处各孔的 OD 值, 计算 TGF- β 1 水平。

1.10 Western blot 检测

细胞干预 48 h 后获得总蛋白并进行浓度测定。取 30 μg 总蛋白依次行配胶、上样、电泳、转膜、5% BSA 封闭 1.5 h、一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜、二抗孵育 1 h, 最后进行 ECL 显色照相。使用的一抗包括 β -actin (1:1 000)、COL I (1:500)、COL III (1:500)、p-Smad2/3 (1:1 000) 和 Smad2/3 (1:1 000)。

1.11 RT-qPCR 测定

细胞干预 48 h 后 Trizol 裂解提取总 RNA, 使用试剂盒制备 cDNA, 再采用实时荧光定量 PCR 检测 TGF- β 1、COL I 和 COL III 的表达量, 所用引物见表 1。循环扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 退火 5 min, 使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因的相对表达水平。

1.12 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 每项实验至少重复 3 次。采用 Graphpad Prism 9.0 软件进行 ANOVA 分析或非配对 t 检验, 采用 Adobe Photoshop CS6 软件进行图像整合。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

表 1. PCR 引物序列

Table 1. PCR primer sequences

基因名	种属	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
β -actin	鼠	ACACTCTCCGCTCCTCCTAG	TGGAATCTGGAGGTTCCGAG
	人	TCTCCCAAGTCCACACAGG	GGCAGCAAGGCTCATCA
TGF- β 1	鼠	CCAGATCCTGTCCAAACTAAGG	CTCTTTAGCATAGTAGTCCGCT
	人	AGCGACTCGCCAGAGTGTTA	GCAGTGTGTTATCCCTGCTGTCA
COL I	鼠	TGTTGGTCTGCTGGCAAGAATG	GTCACCTGTTTCGCCTGTCTCAC
	人	GAGGGCAACAGCAGGTTCACTTA	TCAGCACCACCGATGTCCA
COL III	鼠	AGTCCGAGGAATGGGTGGCTATC	CAGGAGATCCAGGATGTCCAGAGG
	人	CCACGGAAACACTGGTGGAC	GCCAGCTGCACATCAAGGAC

2 结果

2.1 黄芩主要有效化合物及其靶基因

通过 TCMSPP 数据库得到黄芩的 33 个有效化合物 (表 2)。通过 Swiss Target Prediction 和 UniProt

数据库中所获得的靶点进行整合并去除重复基因靶点, 获得 441 个靶基因 (图 1)。

2.2 DCM 相关靶点基因的筛选

通过 GeneCards、Disgenet 和 OMIM 三个疾病数据库中的靶基因进行整合并去重后得到与 DCM 关

联最强的 1 884 个靶基因。

表 2. 黄芩的 33 种有效化合物

Table 2. Thirty-three effective compounds of Scutellariae Radix

化合物名称	Mol ID	OB/%	DL
Acacetin 刺槐素	MOL001689	34.97	0.24
Wogonin 汉黄芩素	MOL000173	30.68	0.23
(2R)-7-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one 山姜素	MOL000228	55.23	0.20
Baicalin 黄芩苷	MOL002714	33.52	0.21
5,8,2'-trihydroxy-7-methoxyflavone 5,8,2'-三羟基-7-甲氧基黄酮	MOL002908	37.01	0.27
5,7,2,5-tetrahydroxy-8,6-dimethoxyflavone 5,7,2,5-四羟基-8,6-二甲氧基黄酮	MOL002909	33.82	0.45
Carthamidin 红花素	MOL002910	41.15	0.24
2,6,2',4'-tetrahydroxy-6'-methoxychalcone 2,6,2',4'-四羟基-6'-甲氧基查尔酮	MOL002911	69.04	0.22
Dihydrobaicalin_qt 二氢木蝴蝶素	MOL002913	40.04	0.21
Eriodyctiol (flavanone) 圣草酚	MOL002914	41.35	0.24
Salvigenin 三裂尾鼠草素	MOL002915	49.07	0.33
5,2',6'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone 5,2',6'-三羟基-7,8-二甲氧基黄酮	MOL002917	45.05	0.33
5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone 5,7,2',6'-四羟基黄酮	MOL002925	37.01	0.24
Skullcapflavone II 黄芩黄酮 II	MOL002927	69.51	0.44
Oroxylin A 千层纸素 A	MOL002928	41.37	0.23
Panicolin 降穿心莲黄酮	MOL002932	76.26	0.29
5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavone 5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄烷酮	MOL002933	36.56	0.27
Neobaicalein 黄芩新素	MOL002934	104.34	0.44
Beta-sitosterol β -谷甾醇	MOL000358	36.91	0.75
Sitosterol 谷甾醇	MOL000359	36.91	0.75
Norwogonin 去甲汉黄芩素	MOL000525	39.4	0.21
5,2'-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone 5,2'-二羟基-6,7,8-三甲氧基黄酮	MOL000552	31.71	0.35
Ent-epicatechin (+)- 表儿茶素	MOL000073	48.96	0.24
Stigmasterol 豆甾醇	MOL000449	43.83	0.76
Coptisine 黄连碱	MOL001458	30.67	0.86
Bis[(2S)-2-ethylhexyl] benzene-1,2-dicarboxylate 双[(2S)-2-乙基己基]苯-1,2-二甲酸酯	MOL001490	43.59	0.35
Supraene 鲨烯	MOL001506	33.55	0.42
Diop 邻苯二甲酸二异辛酯	MOL002879	43.59	0.39
Moslosooflavone 苏芥宁黄酮	MOL008206	44.09	0.25
11,13-eicosadienoic acid, methyl ester 11,13-二十碳二烯酸甲酯	MOL010415	39.28	0.23
5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavanone 5,7,4'-三羟基-6-甲氧基黄烷酮	MOL012245	36.63	0.27
5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavanone 5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄烷酮	MOL012246	74.24	0.26
Rivularin 黄芩黄酮	MOL012266	37.94	0.37

2.3 黄芩关键化学成分基因与 DCM 的交互基因

利用 Venny 2.1.0 在线作图平台绘制维恩图, 得到 150 个治疗 DCM 的基因靶点(图 2)。

2.4 黄芩关键化学成分基因与 DCM 交互基因的 PPI 网络图

在 String 数据库“Multiple proteins”模块中导入

150 个交集基因, 并设“置信分数>0.4”, 随后运用 Cytoscape 进行可视得到 TNF、TP53、VEGFA、SRC、TGF- β 1 等 150 个相互作用的基因(图 3)。

2.5 KEGG 和 GO 富集分析

将 PPI 所得相互作用关系最强的 150 个基因进行富集, 主要涉及 MAPK、晚期糖基化终末产物及受

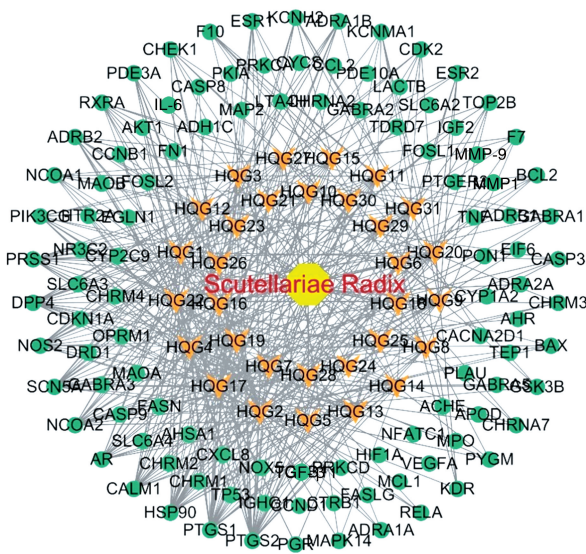


图 1. 黄芩药物成分-靶点网络图

Figure 1. Scutellariae Radix's pharmacological active ingredient-target network

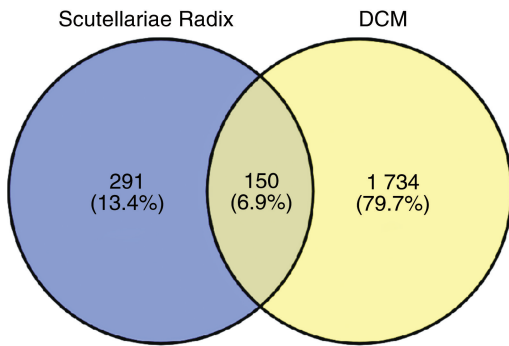


图 2. 黄芩-糖尿病心肌病交集基因维恩图

Figure 2. Venn diagram of Scutellariae Radix and DCM interaction genes

体、PI3K/Akt 信号通路等 192 条相关通路。将表达前 20 的信号通路绘制成气泡图(图 4)。将 150 个基因进行 BP、CC 和 MF 富集,其中 BP 排名前 3 为激素反应、正向调节蛋白磷酸化、激酶活性的调控;CC 排名前 3 为膜筏、膜微区、细胞质核周区;MF 排名前 3 为磷酸转移酶活性(醇基为受体)、激酶活性、蛋白激酶活性(图 5)。

2.6 黄芩苷对心肌细胞活力的影响及给药浓度的确定

根据网络药理学分析黄芩的有效化学成分,选取黄芩苷进行进一步验证。结果发现,与正常糖组相比,高糖组 H9c2 细胞活力增加到 1.24 倍($P < 0.05$),AC16 细胞活力增加到 1.23 倍($P > 0.05$)。H9c2 细胞和 AC16 细胞在高糖基础上给予不同浓

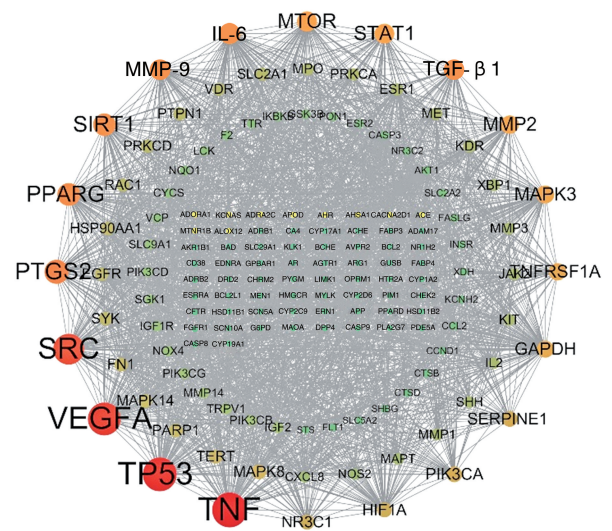


图 3. 黄芩抗 DCM 蛋白互作网络图

Figure 3. Network diagram of anti DCM protein interaction in Scutellaria baicalensis

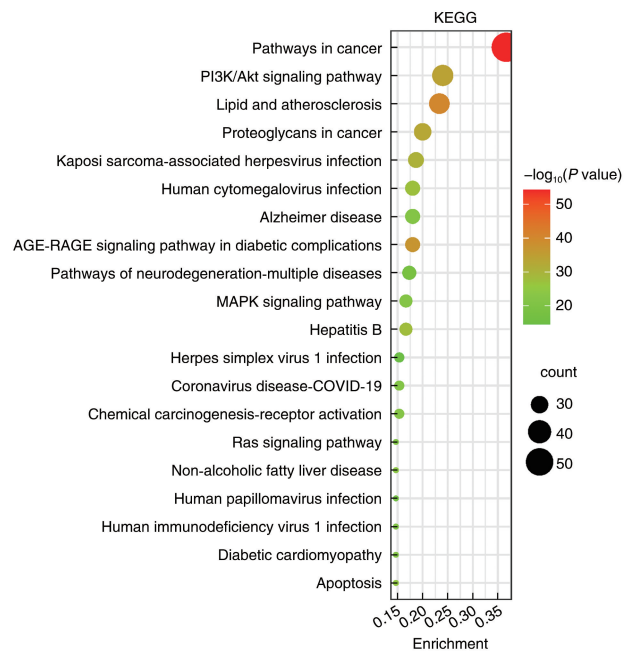


图 4. KEGG 富集排名前 20 通路气泡图

Figure 4. Bubble diagram of the top 20 KEGG-enriched pathways

度黄芩苷(0.5、10、15、20 及 40 $\mu\text{mol/L}$)干预后发现,5 ~ 15 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷对 H9c2 和 AC16 细胞活力无明显影响,20 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷对 H9c2 和 AC16 细胞活力的抑制率为 25.81% 和 33.33% (均 $P < 0.05$),40 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩苷对 H9c2 和 AC16 细胞活力的抑制率为 41.13% 和 41.46% (均 $P < 0.05$;图 6)。因此选择 10 $\mu\text{mol/L}$ 作为黄芩苷后续实验的给药浓度。

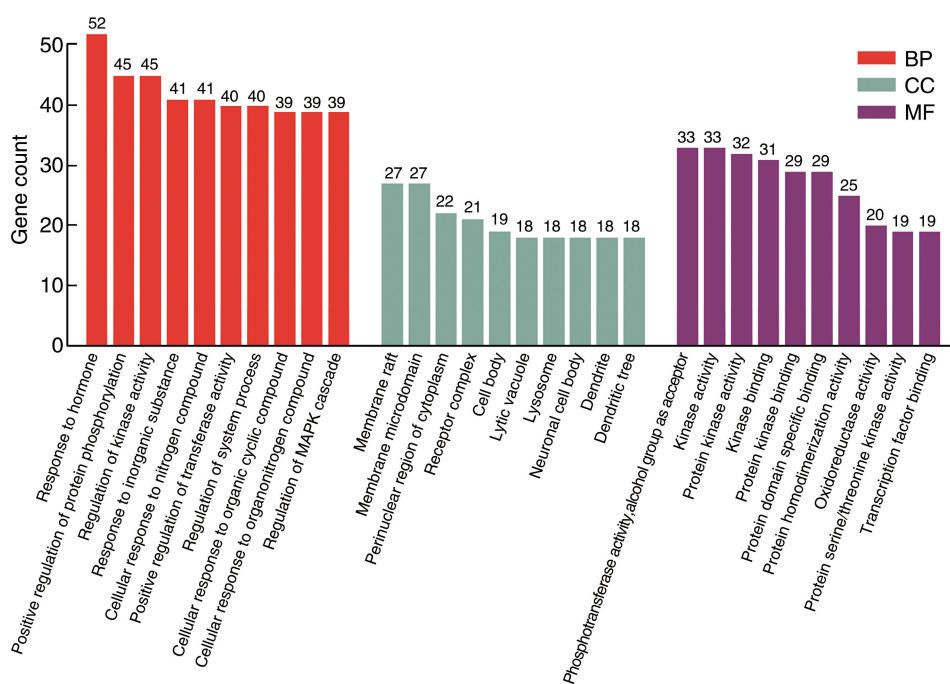


图 5. GO 功能富集分析

Figure 5. GO functional enrichment analysis

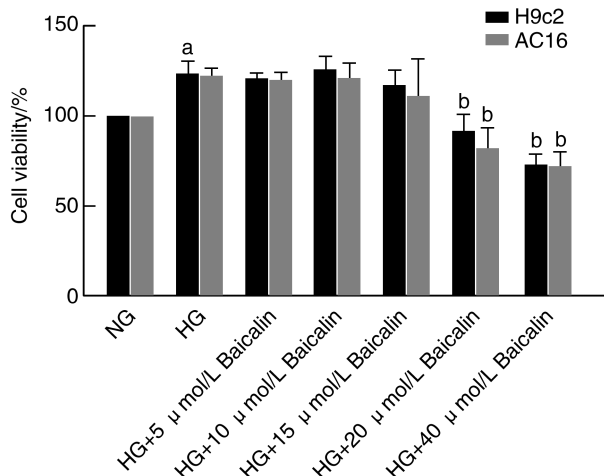


图 6. 黄芩苷对高糖刺激的心肌细胞活力的影响

a 为 $P < 0.05$, 与正常糖组比较; b 为 $P < 0.05$, 与高糖组比较。

Figure 6. The effect of Baicalin on the cell viability of high glucose stimulated cardiomyocytes

2.7 黄芩苷对高糖刺激心肌细胞中 TGF- β 1/Smad 信号通路的影响

根据网络药理学研究结果筛选出核心靶点 TGF- β 1 予以实验验证。结果发现,与正常糖组相比,高糖组 H9c2、AC16 细胞中 TGF- β 1 mRNA 和蛋白的表达水平升高(均 $P < 0.05$);与高糖组相比,黄芩苷显著抑制 TGF- β 1 的表达(均 $P < 0.05$)。进一步检测 Smad2/3 蛋白活化水平,结果发现,与正常

糖组相比,高糖显著激活 H9c2、AC16 细胞中 Smad2/3 的磷酸化水平(均 $P < 0.05$);与高糖组相比,黄芩苷显著抑制 Smad2/3 的磷酸化水平(均 $P < 0.05$;图 7)。

2.8 黄芩苷对高糖刺激心肌细胞中胶原蛋白表达的影响

与正常糖组相比,高糖组 H9c2、AC16 细胞中 COL I 和 COL III 的 mRNA 和蛋白表达水平升高(均 $P < 0.05$),而黄芩苷显著下调高糖诱导的 COL I 和 COL III 的 mRNA 和蛋白表达(均 $P < 0.05$;图 8)。

3 讨论

与糖尿病密切相关的心肌功能障碍于 1954 年被首次提出,自此之后,有关 DCM 的概念才逐渐形成,其病理生理机制被逐渐揭开^[14]。其中心肌纤维化在 DCM 的发生发展中起着关键作用,涉及到心脏结构和功能异常^[15]。究其原因主要是持续高糖状态引起细胞应激反应而引起的一系列病理生理反应。然而,目前对于糖尿病心肌纤维化的治疗效果仍不佳^[16-18]。尽管黄芩具有抗炎、抗氧化、抗器官纤维化的作用,但对其是否含有抗糖尿病心肌纤维化的有效成分、靶基因及信号调节通路尚不明确。

本研究首先基于中药网络药理学数据库,筛选出黄芩 33 种主要有效化学成分,包括汉黄芩苷、山

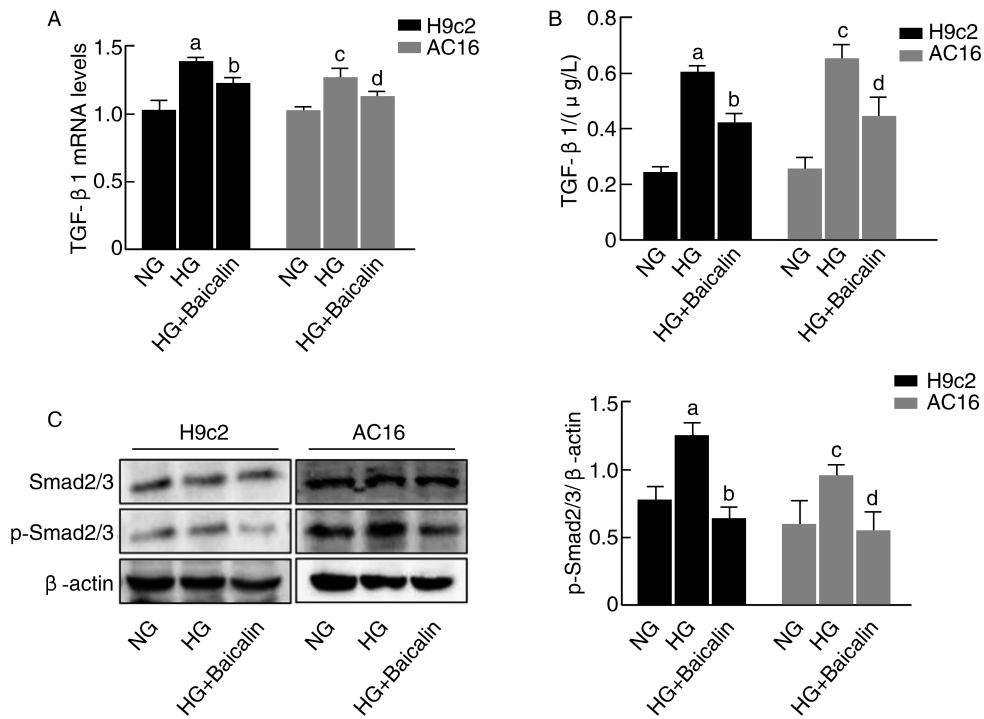


图 7. 黄芩苷对高糖刺激心肌细胞中 TGF-β1/Smad 信号的影响

A 为 RT-qPCR 检测 H9c2 和 AC16 细胞中 TGF-β1 mRNA 水平, B 为 ELISA 检测 H9c2 和 AC16 细胞培养上清中 TGF-β1 蛋白水平, C 为 Western blot 检测 H9c2 和 AC16 细胞中 Smad2/3 和 p-Smad2/3 的表达。a 为 $P < 0.05$, 与正常糖组比较; b 为 $P < 0.05$, 与高糖组比较。

Figure 7. Effect of Baicalin on activation of TGF-β1/Smad signaling in high glucose-stimulated cardiomyocytes

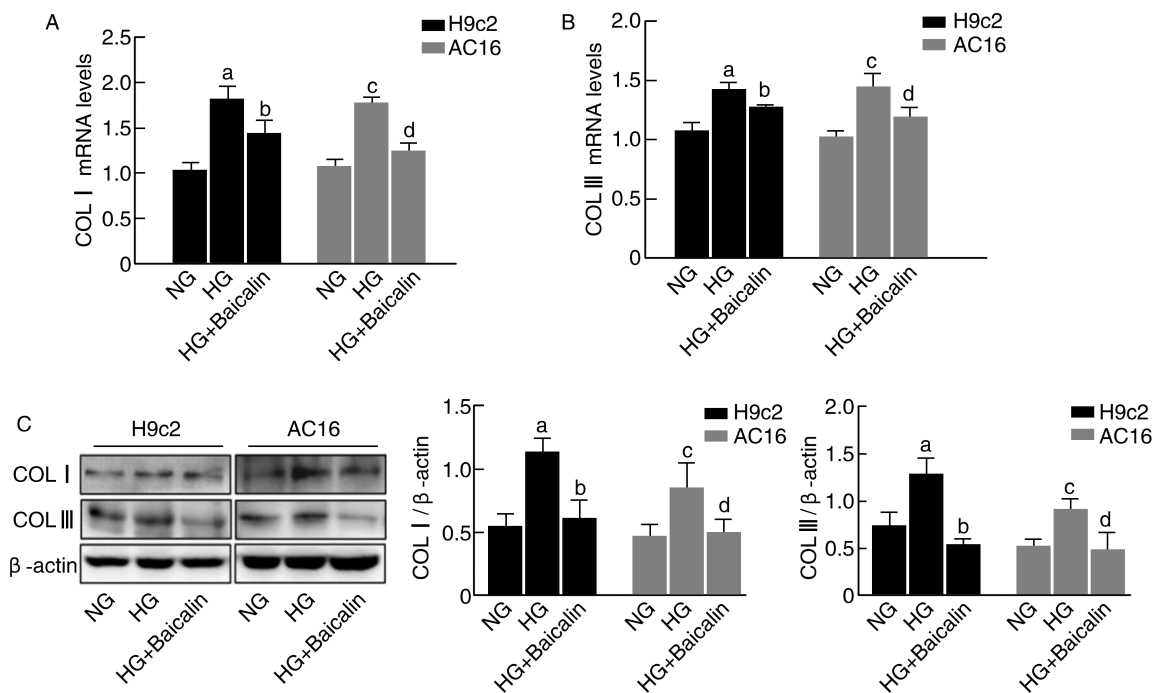


图 8. 黄芩苷对心肌细胞中 COL I 和 COL III 表达水平的影响

A、B 分别为 RT-qPCR 检测 H9c2 和 AC16 细胞中 COL I 和 COL III mRNA 水平, C 为 Western blot 检测 H9c2 和 AC16 细胞中 COL I 和 COL III 蛋白表达。a 为 $P < 0.05$, 与正常糖组比较; b 为 $P < 0.05$, 与高糖组比较。

Figure 8. Effect of Baicalin on the expression of COL I and COL III in high glucose-stimulated cardiomyocytes

姜素、黄芩素等。研究报道,汉黄芩素可对糖尿病大鼠肾纤维化有明显保护作用^[19]。山姜素可缓解博来霉素所致的小鼠肺纤维化^[20]。黄芩素在血管紧张素 II 诱导的高血压模型小鼠的高血压、心肌肥厚、纤维化和炎症反应中起着重要的保护作用^[21]。这些丰富的有效成分为黄芩抗 DCM 奠定了物质基础。针对黄芩的有效成分初步筛选出 1 884 个靶基因,通过运用 String 数据库对交集基因进行 PPI 互作分析,筛选到 TNF、MMP-9 和 TGF- β 1 等 150 个互作基因。其中 MMP-9 和 TGF- β 1 都与纤维化密切相关,因此后续细胞实验选取 TGF- β 1 进行验证。另外,进一步对 150 个互作基因进行 KEGG 富集,共富集到 192 条相关通路,其中 MAPK、晚期糖基化终末产物及受体、PI3K/Akt 等通路 with DCM 引起的心肌纤维化密切相关^[22]。

既往众多研究中,TGF- β 1 已经证实与器官组织的纤维化呈正相关。TGF- β 1 是一种生物学功能复杂的细胞因子,参与细胞的生长、增殖、凋亡和分化等生物学作用,可以促进 COL I 和 COL III 的表达,而两者是细胞外基质的主要成分,导致细胞外基质在细胞内积聚,促进了组织器官的纤维化^[23-25]。本研究用高糖刺激 H9c2 和 AC16 心肌细胞,发现两组细胞 TGF- β 1、COL I 和 COL III 的表达以及 Smad2/3 的磷酸化水平均升高,提示高糖刺激依赖经典的 TGF- β 1/Smad 信号通路来促进心肌细胞纤维化。后续研究中,在高糖培养的心肌细胞培养皿内加入不同剂量的黄芩苷,发现 10 μ mol/L 黄芩苷组的细胞活性最适宜,因此选择 10 μ mol/L 黄芩苷为后续实验组。实验结果表明,黄芩苷组 TGF- β 1、COL I 和 COL III 的表达水平均较高糖组降低,同时显著减弱高糖刺激诱导 p-Smad2/3 的表达,说明黄芩苷可以抑制高糖诱导的心肌纤维化过程。既往研究显示黄芩苷可以减弱博来霉素诱导的肺组织中 TGF- β 1 的表达来抑制肺组织纤维化^[20],这与本研究中黄芩苷抑制心肌细胞 TGF- β 1 的表达进而减轻其纤维化的结果相似。

综上,本研究通过网络药理学并结合细胞学实验探究了黄芩抗 DCM 的作用机制,结果表明黄芩通过多靶点、多信号的机制在抗 DCM 中发挥作用。其中的关键成分黄芩苷可通过抑制 TGF- β 1/Smad 信号而发挥作用,这为黄芩抗 DCM 的进一步研究开发和临床应用提供了实验依据。

[参考文献]

[1] SUN H, SAEEDI P, KARURANGA S, et al. IDF diabetes

atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109119.

- [2] DUNLAY S M, GIVERTZ M M, AGUILAR D, et al. Type 2 diabetes mellitus and heart failure: a scientific statement from the American Heart Association and the Heart Failure Society of America: this statement does not represent an update of the 2017 ACC/AHA/HFSA heart failure guideline update [J]. *Circulation*, 2019, 140(7): e294-e324.
- [3] AKHTAR M S, ALAVUDEEN S S, RAZA A, et al. Current understanding of structural and molecular changes in diabetic cardiomyopathy [J]. *Life Sci*, 2023, 332: 122087.
- [4] 邱俊霖, 罗说明, 周智广. 糖尿病性心脏病研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(8): 679-687.
- QIU J L, LUO S M, ZHOU Z G. Research progress of diabetic heart disease [J]. *Chin J Arterioscler*, 2020, 28(8): 679-687.
- [5] WAN A, RODRIGUES B. Endothelial cell-cardiomyocyte crosstalk in diabetic cardiomyopathy [J]. *Cardiovasc Res*, 2016, 111(3): 172-183.
- [6] 孟庆芸, 符丽娟, 张博. N-乙酰半胱氨酸对糖尿病大鼠心肌损伤的保护作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20(2): 125-129.
- MENG Q Y, FU L J, ZHANG B. Protective effect of N-acetylcysteine on myocardial injury in diabetic rats [J]. *Chin J Arterioscler*, 2012, 20(2): 125-129.
- [7] SALVATORE T, PAFUNDI P C, GALIERO R, et al. The diabetic cardiomyopathy: the contributing pathophysiological mechanisms [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 695792.
- [8] FANG H Y, ZHAO X N, ZHANG M, et al. Beneficial effects of flavonoids on cardiovascular diseases by influencing NLRP3 inflammasome [J]. *Inflammopharmacology*, 2023, 31(4): 1715-1729.
- [9] TAN Y Q, LIN F, DING Y K, et al. Pharmacological properties of total flavonoids in *Scutellaria baicalensis* for the treatment of cardiovascular diseases [J]. *Phytomedicine*, 2022, 107: 154458.
- [10] WEN Y Q, WANG Y, ZHAO C, et al. The pharmacological efficacy of baicalin in inflammatory diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11): 9317.
- [11] LI L, LIU Q, SHI L, et al. Baicalin prevents fibrosis of human trabecular meshwork cells via inhibiting the MyD88/NF- κ B pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 938: 175425.
- [12] LIU S, CHEN P, MOHAMMED S A D, et al. Exploration of the potential mechanism of Baicalin for hepatic fibrosis based on network pharmacology, gut microbiota, and experimental validation [J]. *Front Microbiol*, 2023, 13: 1051100.
- [13] WANG H, JIANG Q, ZHANG L. Baicalin protects against renal interstitial fibrosis in mice by inhibiting the TGF- β /

- Smad signalling pathway [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 1407-1416.
- [14] MARWICK T H, RITCHIE R, SHAW J E, et al. Implications of underlying mechanisms for the recognition and management of diabetic cardiomyopathy [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 71(3): 339-351.
- [15] TULETA I, FRANGOIANNIS N G. Fibrosis of the diabetic heart: clinical significance, molecular mechanisms, and therapeutic opportunities [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 176: 113904.
- [16] ATHITHAN L, GULSIN G S, MCCANN G P, et al. Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology, theories and evidence to date [J]. *World J Diabetes*, 2019, 10(10): 490-510.
- [17] DHAR A, VENKADAKRISHNAN J, ROY U, et al. A comprehensive review of the novel therapeutic targets for the treatment of diabetic cardiomyopathy [J]. *Ther Adv Cardiovasc Dis*, 2023, 17: 17539447231210170.
- [18] SHARMA A, DE BLASIO M, RITCHIE R. Current challenges in the treatment of cardiac fibrosis: recent insights into the sex-specific differences of glucose-lowering therapies on the diabetic heart: IUPHAR Review 33 [J]. *Br J Pharmacol*, 2023, 180(22): 2916-2933.
- [19] 张旭东, 任桂灵, 陈慧慧, 等. 汉黄芩素调控 TLR4/MAPK/NF- κ B 信号通路对糖尿病肾病大鼠肾纤维化的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(10): 1840-1846.
- ZHANG X D, REN G L, CHEN H H, et al. Effect of baicalin modulation of TLR4/MAPK/NF- κ B signaling pathway on renal fibrosis in rats with diabetic nephropathy [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2023, 39(10): 1840-1846.
- [20] 刘宇, 王倩, 王荣丽. 山姜素对博来霉素诱导的肺纤维化小鼠的作用及机制研究 [J]. *临床肺科杂志*, 2023, 28(6): 898-904.
- LIU Y, WANG Q, WANG R L. Effect and mechanism of alpinetin on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *J Clin Pulm Med*, 2023, 28(6): 898-904.
- [21] 苗杰. 黄芩素对血管紧张素 II 诱导的高血压模型小鼠的干预机制 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2015.
- MIAO J. Intervention mechanism of baicalein on angiotensin II induced hypertensive model mice [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2015.
- [22] CHENG Y, WANG Y, YIN R, et al. Central role of cardiac fibroblasts in myocardial fibrosis of diabetic cardiomyopathy [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1162754.
- [23] HUANG P, MA H, CAO Y, et al. Activation of primary hepatic stellate cells and liver fibrosis induced by targeting TGF- β 1/Smad signaling in schistosomiasis in mice [J]. *Parasit Vectors*, 2022, 15(1): 456.
- [24] LI Z Y, LV S, QIAO J, et al. Acacetin alleviates cardiac fibrosis via TGF- β 1/Smad and AKT/mTOR signal pathways in spontaneous hypertensive rats [J]. *Gerontology*, 2023, 69(9): 1076-1094.
- [25] ZHANG B, CHEN Z Y, JIANG Z, et al. Nephroprotective effects of cardamonin on renal ischemia reperfusion injury/UUO-induced renal fibrosis [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(36): 13284-13303.
- (此文编辑 文玉珊)