

# 二参真武汤调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制心肌纤维化的体外实验研究

赵 研<sup>1</sup>, 甘芮溪<sup>1</sup>, 张小月<sup>1</sup>, 程晓昱<sup>2</sup>, 葛 岚<sup>2</sup>, 彭代银<sup>1</sup>, 王红松<sup>1</sup>, 陈卫东<sup>1,3,4,5</sup>

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽 合肥 230031; 3. 安徽道地中药材品质提升协同创新中心, 安徽 合肥 230012; 4. 中药饮片制造新技术与研发安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012; 5. 中药复方安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012)

**[摘要]目的** 探究二参真武汤抑制心肌细胞纤维化的作用机制。**方法** 采用灌胃给予 SPF 大鼠二参真武汤、贝那普利 7 d 的方法制备含药血清, 从出生 3 d 内的乳鼠心脏中提取原代心肌成纤维细胞, 采用免疫荧光和台盼蓝染色法鉴定细胞纯度与成活率, 采用 CCK-8 法确定二参真武汤含药血清的最佳给药浓度与给药时间, 采用血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 刺激原代心肌成纤维细胞复制心肌纤维化模型, 将原代心肌成纤维细胞分为正常组、模型组、二参真武汤组、贝那普利组, 采用 ELISA 法检测胶原蛋白 (collagenase, Col)-I 和 Col-III 含量, 采用 Western blot 法检测平滑肌肌动蛋白 (alpha-smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、Col-I、Col-III、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR 蛋白表达水平, qRT-PCR 法检测  $\alpha$ -SMA、Col-I、Col-III、PI3K、AKT、mTOR mRNA 表达水平。**结果** 提取的原代心肌成纤维细胞纯度与成活率均达到 95% 以上。与正常组比较, 模型组、Col-I、Col-III 含量显著升高 ( $P < 0.05$ ),  $\alpha$ -SMA、Col-I、Col-III、p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 蛋白及 mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 二参真武汤组原代心肌成纤维细胞中  $\alpha$ -SMA、Col-I、Col-III、p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 蛋白及 mRNA 表达水平均显著降低 ( $P < 0.05$ )。**结论** 二参真武汤抑制心肌纤维化的机制与调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路有关。

**[关键词]** 心肌纤维化; 原代心肌成纤维细胞; 二参真武汤; PI3K; AKT; mTOR; 信号通路

**[中图分类号]** R285.5 **[DOI]** 10.3969/j.issn.2095-7246.2023.03.017

心肌纤维化是心功能障碍时心脏自身的代偿反应, 是许多心脏疾病终末期的共同病理生理机制<sup>[1]</sup>。纤维化的特点是成纤维细胞过度繁殖, 导致细胞外基质蛋白沉积增加, 虽然轻度的纤维化对心脏起到一定的保护作用, 但是过度增殖和沉积会使心脏扩展下降, 心脏的舒张活动降低, 心肌僵硬, 最终导致患者心律失常或心力衰竭<sup>[2]</sup>。目前, 还没有治疗心肌纤维化的最佳治疗方案, 如果能够早发现、早对症治疗, 可能会极大提高患者的生命安全。

二参真武汤是安徽中医药大学第一附属医院结合多年临床用药经验<sup>[3]</sup>, 基于《伤寒论》真武汤增加红参、丹参组成的中药复方。二参真武汤能显著改善心肾阳虚型慢性心力衰竭患者心功能, 降低醛固酮、活性氧、血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 水平<sup>[4]</sup>。二参真武汤也可抑制免疫炎症反应, 抑制心肌细胞凋亡, 保护心肌细胞, 改善慢性心力衰竭患

者心肌纤维化<sup>[5]</sup>。但是, 其治疗心肌纤维化的作用机制仍不清楚。

PI3K/AKT/mTOR 信号通路是一种常见的细胞信号通路, 参与哺乳动物多种病理生理过程, 并参与细胞周期和细胞生长的过程。有研究表明, 硫化氢通过调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路, 增加细胞自噬而减轻阿霉素诱导的大鼠心肌纤维化<sup>[6]</sup>, 芪参益气丸通过 PI3K/AKT/mTOR 通路激活自噬而减轻心肌纤维化<sup>[7]</sup>, 姜辣素通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制细胞凋亡和自噬从而改善心肌纤维化<sup>[8]</sup>。PI3K/AKT/mTOR 信号通路通过调节细胞的存活、凋亡、生长及心肌收缩甚至相关基因的转录等参与调控心肌纤维化的发生、发展和病理形成, 通过调节自噬减轻心肌纤维化, 在心血管疾病的发病机制中具有重要的作用。基于上述原因, 本实验将 PI3K/AKT/mTOR 信号通路相关蛋白及其 mRNA 作为心肌纤维化的特异性指标, 采用原代心肌成纤维细胞进行实验研究, 以二参真武汤含药血清进行干预, 并以贝那普利作为阳性对照, 探究二参真武汤治疗心肌纤维化的机制。

## 1 材料

1.1 试剂 附子、红参、茯苓、白术、白芍、丹参购于

**基金项目:** 省部共建安徽道地中药材品质提升协同创新中心 (教科信厅函[2022]4号)

**作者简介:** 赵研(1998-), 女, 硕士研究生

**通信作者:** 陈卫东(1965-), 男, 教授, 博士研究生导师, wdchen@ahtcm.edu.cn

安徽普仁公司,生姜自制,经安徽中医药大学俞年军教授鉴定可用。贝那普利(批号 H200533390);中国成都地奥制药集团有限公司;胶原蛋白(Collagen, Col)-I (批号 ED-30514)、Col-III (批号 ED-30513);中国厦门仑昌硕公司;GAPDH (批号 A01020)、山羊抗兔 IgG (批号 BS13278)、山羊抗鼠 IgG (批号 A21010);美国 Abbkina;  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) (批号 ab283851)、PI3K/AKT/mTOR (批号 ab283852);美国 Abcam 公司;TRIZol (批号 15596-026);美国 Invitrogen;SYBR PreMix Ex Taq<sup>TM</sup> II 试剂盒(批号 201);日本 Takara;DMEM 高糖培养基(批号 11995040);美国 Thermo Fisher Scientific。

1.2 仪器 全波长酶标仪(Multiskan Spectrum):赛默飞公司;高速冷冻离心机(Centrifuge 5810R):上海天美有限公司;倒置光学显微镜(DMI6000B):麦克奥迪;超灵敏多功能成像仪(Amersham Image 600):美国 GE;qRT-PCR 仪(MX3000P):美国安捷伦。

1.3 动物 将大鼠置于温度(20±2)℃、相对湿度(50±5)%的环境中饲养1周。本实验所用动物由河南省郑州市惠济区华兴实验动物养殖场[生产许可证号为 SCXK(豫)2019-0002]提供。实验程序按照《实验动物护理和使用指南》进行,并获得安徽中医药大学伦理委员会批准(批文编号:AHUCM-rats-2021032)。

## 2 方法

2.1 含药血清的制备 按照文献[4]制备含药血清。采用水提回流法提取二参真武汤(丹参 30 g,白芍、焦白术、茯苓各 10 g,生姜、红参各 6 g,制附子 5 g),加入 10 倍量去离子水,制附子武火先煎 0.5 h,文火煎 1 h,再加入其他 6 味药共煎 0.5 h,过滤,滤渣再加 8 倍量去离子水,煎煮 0.5 h,沉降过滤后,将每次煮出的药液合并,浓缩后备用。

将 18 只 SPF 大鼠平均分为 3 组:空白血清组(生理盐水 10 mL/kg),二参真武汤含药血清组(二参真武汤 15.84 g/kg),贝那普利组(贝那普利 0.5 mg/kg),灌胃给药,每日 1 次,共 7 d,最后 1 次灌胃后 1 h 取血,室温放置 30 min 后,4℃离心,取血清,56℃水浴锅灭菌,过 0.45  $\mu$ m 滤头除菌,备用。

2.2 原代心肌成纤维细胞的提取 按照文献[9]方法提取原代心肌成纤维细胞。在无菌房内,取出大鼠心脏剪碎,加入 0.1%胶原酶 II,放置在 4℃冰箱静置 4 h,取上清铺板,放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱静置,等待贴壁,1 h 后取出细胞培养皿,显微镜下观察贴壁情况,贴壁细胞即为心脏成纤维细胞,

后续实验使用 2~4 代细胞。

2.3 免疫荧光检测波形蛋白(Vimentin) 将第 3 次传代的细胞以每孔  $1.2 \times 10^4$  接种至装有细胞爬片的 6 孔板上,用多聚甲醛固定。滴加一抗波形蛋白(Vimentin),4℃过夜,取出,在室温下等待 30 min,洗片后二抗孵育 3 min,PBS 洗片 5 min,使用透明指甲油封片,荧光显微镜观察拍照,使用美国国立卫生研究院 Image J 软件(版本号 1.6.0)进行免疫荧光分析,得到抗体阳性面积。

2.4 台盼蓝染色观察细胞成活率 将原代心肌成纤维细胞消化,制备成  $2 \times 10^5$  的细胞悬液,在 9 mL 细胞悬液中滴加 1 mL 0.4%台盼蓝溶液,在 3~5 min 内使用显微镜观察计数,带有蓝色的细胞是死细胞,将图片中死细胞和总细胞进行计数。细胞成活率=(总细胞数量-死细胞数量)/总细胞数量 $\times 100\%$ 。

2.5 细胞活力检测 将原代心肌成纤维细胞置于 96 孔板中(每孔  $1 \times 10^4$  个,100  $\mu$ L),在标准条件下培养 24 h,用 CCK-8 法检测细胞活力,根据结果选择最佳的含药血清浓度。首先加入含有 0、2.5%、5%、10%、15%、20%含药血清的 DMEM 高糖培养基,培养 24 h 后,加入 CCK-8 试剂,每孔加 10  $\mu$ L,等待反应 1 h 后在酶标仪 450 nm 下测定吸光度。用 CCK-8 法检测细胞活力,根据细胞活力优选复制心肌纤维化模型所使用的 Ang II 浓度和作用时间,加入含有不同浓度(0.1、1、10  $\mu$ mol/L)的 Ang II 培养基分别培养细胞 12、24、48 h,每孔加 10  $\mu$ L CCK-8 试剂,反应 1 h 后在酶标仪 450 nm 下测定吸光度。

2.6 分组与给药 将原代心肌成纤维细胞分为正常组(加入含有 10%空白血清的培养基)、模型组(1  $\mu$ mol/L Ang II 刺激 24 h 后加入含有 10%空白血清的培养基)、二参真武汤组(1  $\mu$ mol/L Ang II 刺激 24 h 后加入含有 10%二参真武汤含药血清的培养基)、贝那普利组(1  $\mu$ mol/L Ang II 刺激 24 h 后,加入含有 10%贝那普利含药血清的培养基)。

2.7 ELISA 检测 Col-I 和 Col-III 含量 将原代心肌成纤维细胞以  $1 \times 10^6$ /mL 的密度接种在 6 孔板上,加入 10%含有不同含药血清的培养基刺激 24 h 后,取细胞上清液,根据 ELISA 试剂盒说明书检测 Col-I 和 Col-III 含量。

2.8 Western blot 法检测  $\alpha$ -SMA、Col-I、Col-III、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR 蛋白表达水平 将原代心肌成纤维细胞以  $1 \times 10^6$ /mL 的密度接种在 6 孔板上,使用 1  $\mu$ mol/L Ang II 刺激 24 h 后分为 4 组,加入 10%含有不同含

药血清的培养基刺激 24 h 后,配置含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的裂解液,提取细胞蛋白,每个培养皿加入 1 mL 配置好的裂解液,等待 30 min 后,吸出混合液,离心,取上清,上清液以 4:1 的比例加入蛋白上样缓冲液,将混合液体样品煮沸 12 min,蛋白定量以后进行电泳,转移到硝酸纤维素膜上,放在一抗中过夜,二抗孵育 2 h 后曝光出现条带,使用 Image J 进行蛋白定量。

2.9 qRT-PCR 法检测  $\alpha$ -SMA、Col-I、Col-III、PI3K、AKT、mTOR mRNA 表达水平 将原代心肌成纤维细胞以每毫升  $1 \times 10^6$  个的密度接种于 6 孔板上,使用  $1 \mu\text{mol/L}$  Ang II 刺激 24 h 后分为 4 组,加入 10% 含有不同含药血清的培养基刺激 24 h 后,在培养皿中加入 1 mL Trizol,提取细胞中总 RNA,将总 RNA 逆转录成 cDNA 后,采用 Master Mix 试剂盒进行检测。将 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作对照。引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 基因引物信息

引物	序列(5'→3')	引物长度/bp
$\alpha$ -SMA	上游:ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	252
	下游:TTTGAGGGTGCAGCGAACTT	
Col-I	上游:TTACCCTGGCAACATTGGTC	179
	下游:CCTTGTCACCTCGAATACCTTG	
Col-III	上游:AAGGGCAGGGAACAACCTGAT	141
	下游:GGTGAAGCAGGGTGAGAAGA	
PI3K	上游:CACCTCCGCAACCAATCCTGAC	130
	下游:AGCTCGAACTGTCTCCTTCTGG	
AKT	上游:CACAGGTCGCTACTATGCCATGAAG	95
	下游:GCAGGACACGGTTCTCAGTAAGC	
mTOR	上游:GCAACAACCTCCAGGATACACTCAG	86
	下游:TTCCACCAGGGCTTCATTGACATC	
GAPDH	上游:CTTTGGTATCGTGAAGGACTC	450
	下游:GTAGAGGCAGGGATGATGTCTT	

2.10 统计学方法 应用 IBM SPSS 25.0 进行统计分析。连续型变量采用“均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )”表示。呈偏态分布数据采用 Kruskal-Wallis  $H$  检验;呈正态分布数据采用单因素方差分析,均数多重比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

3.1 原代心肌成纤维细胞的鉴定与模型复制 免疫荧光检测原代心肌成纤维细胞标志性蛋白 Vimentin,结果显示 Vimentin 单抗染色阳性大于 95% (见图 1)。台盼蓝染色检测原代心肌成纤维细胞的存活率,根据计数得知细胞存活率在 98% 以上(见图 2)。分别采用含有 0.1、1、10  $\mu\text{mol/L}$  的 Ang II

培养基刺激细胞 12、24、48 h,结果显示  $1 \mu\text{mol/L}$  Ang II 刺激细胞 24 h 后细胞活力最强 ( $P < 0.05$ ) (见图 3)。采用 Western blot 法检测纤维化标志物  $\alpha$ -SMA、Col-I、Col-III 蛋白的表达水平(见图 4),结果显示模型组( $1 \mu\text{mol/L}$  Ang II 刺激 24 h 组)Col-I、Col-III、 $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平显著高于正常组( $0 \mu\text{mol/L}$  Ang II 刺激 24 h 组) ( $P < 0.05$ ),说明心肌细胞纤维化模型复制成功。

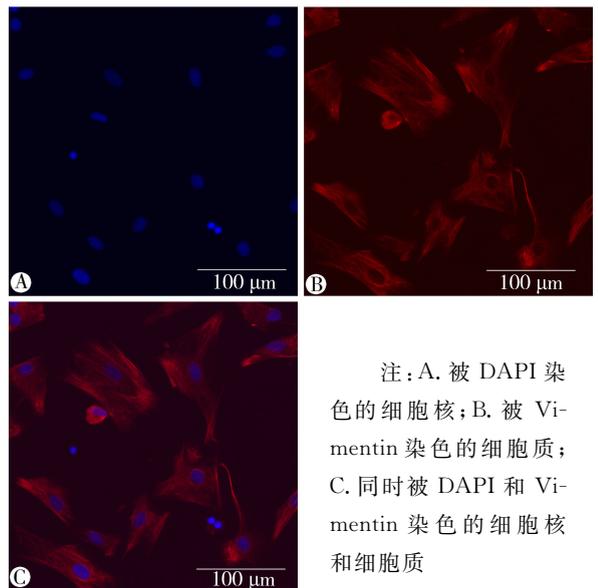


图 1 原代心肌成纤维细胞纯度(免疫荧光染色,10×20 倍)

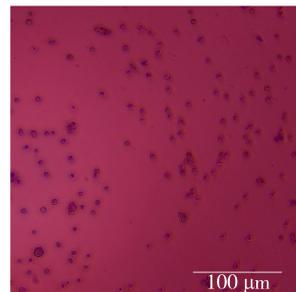
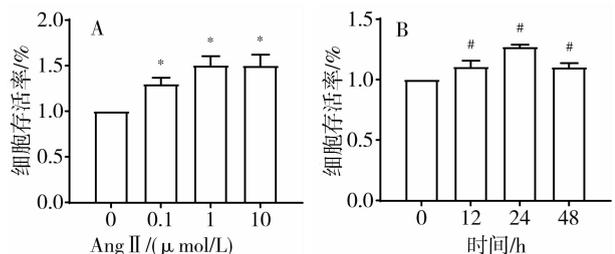
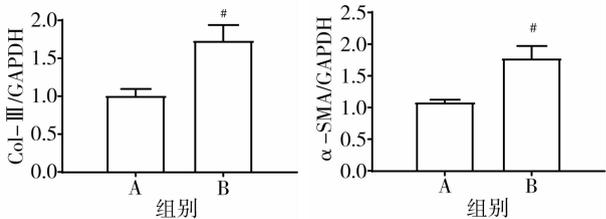
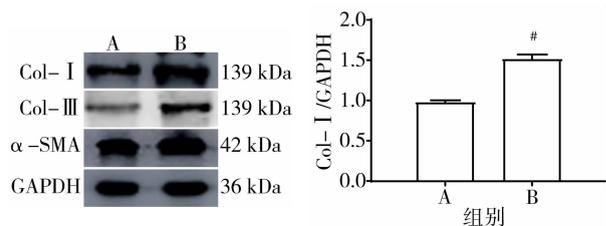


图 2 原代心肌成纤维细胞成活率(台盼蓝染色,10×20 倍)



注:与 0  $\mu\text{mol/L}$  Ang II 组比较,\*  $P < 0.05$ ;与 1  $\mu\text{mol/L}$  Ang II 刺激 0 h 组比较,#  $P < 0.05$

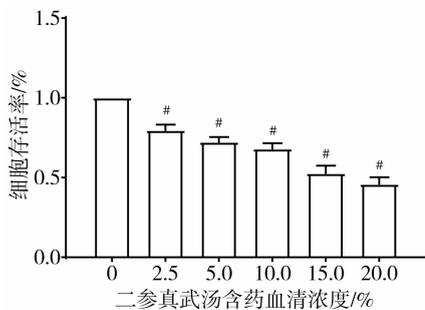
图 3 不同浓度 Ang II 刺激 24 h(A)和 1  $\mu\text{mol/L}$  Ang II 刺激不同时间(B)后原代心肌成纤维细胞成活率比较( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



注:A. 正常组(0  $\mu$ mol/L Ang II 刺激 24 h);B. 模型组(1  $\mu$ mol/L Ang II 刺激 24 h);与正常组比较,<sup>#</sup>  $P < 0.05$

图4 原代心肌成纤维细胞中 Col-I、Col-III、 $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

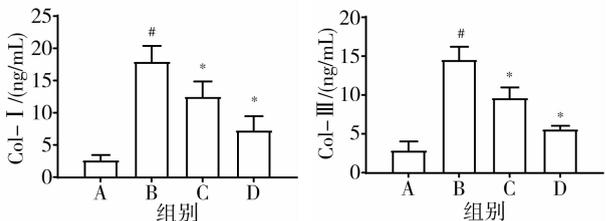
3.2 二参真武汤含药血清的最佳浓度 随着二参真武汤含药血清浓度升高,原代心肌成纤维细胞活力降低,由于15%和20%二参真武汤含药血清的抑制作用过强,对原代心肌成纤维细胞的伤害过大,故选择10%二参真武汤含药血清进行后续实验。见图5。



注:与不含二参真武汤含药血清组比较,<sup>#</sup>  $P < 0.05$

图5 不同剂量二参真武汤含药血清组原代心肌成纤维细胞活力比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

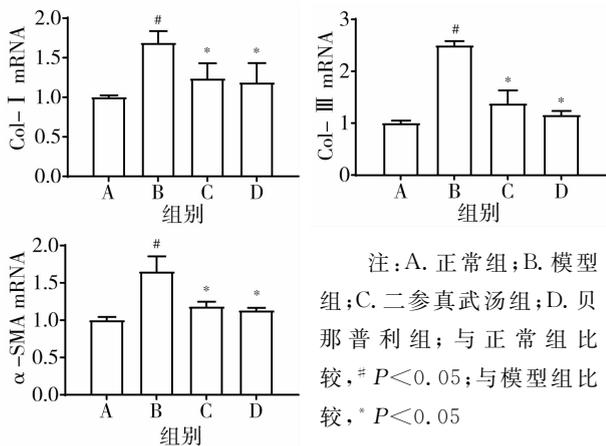
3.3 ELISA 法检测的4组原代心肌成纤维细胞中 Col-I 和 Col-III 含量比较 模型组 Col-I 和 Col-III 含量显著高于正常组( $P < 0.05$ ),经过10%二参真武汤含药血清处理后,Col-I 和 Col-III 含量显著降低( $P < 0.05$ )。见图6。



注:A. 正常组;B. 模型组;C. 二参真武汤组;D. 贝那普利组;与正常组比较,<sup>#</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup>  $P < 0.05$

图6 4组原代心肌成纤维细胞中 Col-I、Col-III 含量比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

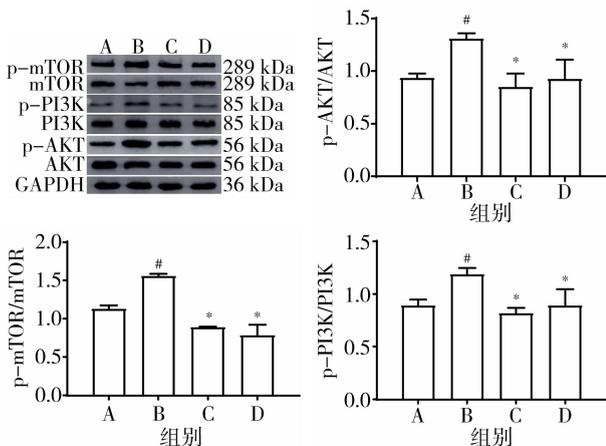
3.4 qRT-PCR 检测的4组原代心肌成纤维细胞中  $\alpha$ -SMA、Col-I、Col-III mRNA 表达水平比较 模型组  $\alpha$ -SMA、Col-I、Col-III mRNA 表达水平显著高于正常组( $P < 0.05$ ),经过10%二参真武汤含药血清处理后, $\alpha$ -SMA、Col-I、Col-III mRNA 显著降低( $P < 0.05$ )。见图7。



注:A. 正常组;B. 模型组;C. 二参真武汤组;D. 贝那普利组;与正常组比较,<sup>#</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup>  $P < 0.05$

图7 4组  $\alpha$ -SMA、Col-I、Col-III mRNA 相对表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

3.5 Western blot 检测的4组原代心肌成纤维细胞中 p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平比较 模型组 p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平显著高于正常组( $P < 0.05$ ),经过10%二参真武汤含药血清处理后,p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。见图8。



注:A. 正常组;B. 模型组;C. 二参真武汤组;D. 贝那普利组;与正常组比较,<sup>#</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup>  $P < 0.05$

图8 4组原代心肌成纤维细胞中 p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

3.6 qRT-PCR 检测的4组原代成纤维细胞中 PI3K、AKT、mTOR mRNA 表达水平比较 模型组 PI3K、AKT、mTOR mRNA 表达水平均显著高于正常组( $P < 0.05$ );经过10%二参真武汤含药血

清处理后, PI3K、AKT、mTOR mRNA 表达水平均显著下降( $P<0.05$ )。见图9。

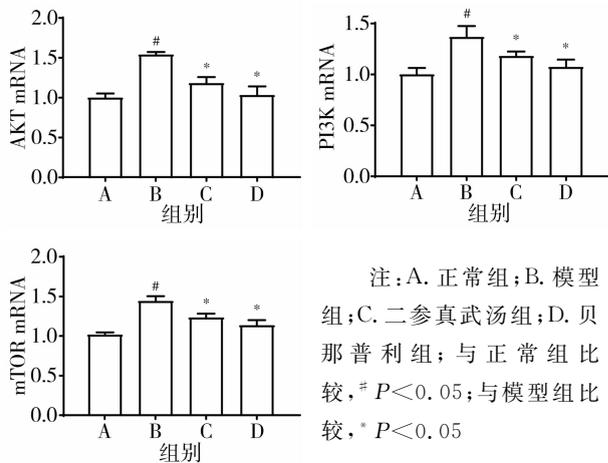


图9 4组原代成纤维细胞中PI3K、AKT、mTOR mRNA表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

#### 4 讨论

心肌纤维化的主要特征是细胞外基质蛋白在心肌中过度沉积,导致 $\alpha$ -SMA的过度表达和胶原的产生,主要为Col-I与Col-III比值增加<sup>[10]</sup>。心肌纤维化可使心肌兴奋-收缩耦联失调,损害收缩和舒张功能,从而加快心脏疾病的进展,导致心力衰竭<sup>[11]</sup>。心脏病尤其是心力衰竭患者心肌纤维化严重程度与死亡率相关。本研究使用Ang II刺激原代心肌成纤维细胞建立细胞模型作为研究对象,结果表明,二参真武汤可以降低心肌纤维化细胞的标志因子 $\alpha$ -SMA、Col-I、Col-III的表达水平,产生这种结果的原因可能是二参真武汤可以减少胶原纤维的产生和沉积,抑制心肌成纤维细胞激活,减轻心肌纤维化,二参真武汤可以降低心肌纤维化细胞PI3K/AKT/mTOR信号通路相关蛋白和mRNA表达,改善心肌纤维化。

二参真武汤的有效成分含有三七皂苷,丹参酮,芍药苷,人参皂苷Rg1、Re、Rb1<sup>[12]</sup>。三七皂苷Rg1可以增加细胞自噬,减少细胞增殖,是调控PI3K/AKT/mTOR信号通路实现的<sup>[13]</sup>。丹参酮II A可抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路,增强自噬,诱发自噬性死亡<sup>[14]</sup>。芍药苷抑制PI3K/AKT信号通路增加细胞的自噬,减少炎症因子产生<sup>[15]</sup>。PI3K/Akt/mTOR通路是细胞对细胞外刺激反应的关键细胞级联,越来越多的证据表明,PI3K/Akt/mTOR通路参与细胞增殖、分化、代谢、细胞骨架重组和凋亡<sup>[16-17]</sup>。Ang II刺激原代心肌成纤维细胞,使PI3K增加,激活AKT,使AKT磷酸化,最后激

活mTOR,使原代心肌成纤维细胞代谢和生长改变,增加Col-I、Col-III沉积,最后导致心肌纤维化。使用二参真武汤含药血清干预后,PI3K/AKT/mTOR通路相关蛋白和mRNA表达水平均明显降低。已有研究<sup>[18]</sup>表明,一些关键分子和信号通路可以调节自噬,其中mTOR可以调节多种细胞信号通路和过程,如细胞凋亡和自噬。本研究发现,用二参真武汤处理的模型细胞中p-PI3K、p-AKT、p-mTOR蛋白表达水平显著降低,心肌纤维化程度减轻,提示二参真武汤通过调控PI3K/AKT/mTOR信号通路增加细胞自噬抑制心肌纤维化。

综上所述,二参真武汤可能是通过调控PI3K/AKT/mTOR信号通路相关蛋白和基因的表达,增加自噬活性,诱导纤维化细胞自噬性死亡来改善心肌纤维化,对纤维化的原代心肌成纤维细胞起到保护作用。

#### 参考文献:

- [1] ESPELAND T, LUNDE I G, H AMUNDSEN B, et al. Myocardial fibrosis [J/OL]. Tidsskr Nor Laegeforen, 2018, 138(16) [2022-11-28]. <https://doi.org/10.4045/tidsskr.17.1027>.
- [2] WANG L P, YUAN D, ZHENG J, et al. Chikusetsu saponin IVa attenuates isoprenaline-induced myocardial fibrosis in mice through activation autophagy mediated by AMPK/mTOR/ULK1 signaling [J/OL]. Phytomedicine, 2019, 58: 152764 [2022-11-28]. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.11.024>.
- [3] 付伟娜, 程晓昱. 复方真武冲剂治疗老年慢性心衰患者的临床疗效观察[J]. 中医药临床杂志, 2021, 33(12): 2385-2389.
- [4] HONG L L, ZHAO Y, CHEN W D, et al. Tentative exploration of pharmacodynamic substances; pharmacological effects, chemical compositions, and multi-components pharmacokinetic characteristics of ESZWD in CHF-HKYd rats [J/OL]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9: 913661 [2022-11-28]. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.913661>.
- [5] 李林, 刘中勇, 骆始华, 等. 真武汤抗心衰与TGF- $\beta$ /JNK信号通路关系的相关性研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(5): 1041-1044.
- [6] NIE L, LIU M, CHEN J, et al. Hydrogen sulfide ameliorates doxorubicin-induced myocardial fibrosis in rats via the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Mol Med Rep, 2021, 23(4): 299.
- [7] LV S, YUAN P, LU C, et al. QiShenYiQi pill activates autophagy to attenuate reactive myocardial fibrosis via the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(4): 5525-5538.

- [8] XUE Y C, ZHANG M Q, LIU M M, et al. 8-Gingerol ameliorates myocardial fibrosis by attenuating reactive oxygen species, apoptosis, and autophagy via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:711701[2022-11-28]. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.711701>.
- [9] 张平, 谭延振, 张冰, 等. 原代SD仔鼠心肌成纤维细胞分离与培养方法的改进[J]. *海南医学*, 2021, 32(22): 2857-2860.
- [10] PETROV V V, FAGARD R H, LIJNEN P J. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta 1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts[J]. *Hypertension*, 2002, 39(2):258-263.
- [11] LI L, ZHAO Q, KONG W. Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis[J]. *Matrix Biol*, 2018(68/69):490-506.
- [12] HONG L L, ZHAO Y, YANG C Y, et al. Identification of chemical constituents *in vitro* and *in vivo* of Er Shen ZhenWu Decoction by utilizing ultra-high-performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *J Sep Sci*, 2021, 44(24):4327-4342.
- [13] 高鑫, 樊新龙, 曾巍, 等. 三七皂苷 R1 调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路诱导人下咽鳞状细胞癌 FaDu 细胞凋亡和自噬[J]. *现代肿瘤学*, 2022, 30(13):2311-2314.
- [14] 王叨, 丁艳杰, 陈娇, 等. 丹参酮IIA 抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路促进人白血病 NB4 细胞株自噬的实验研究[J]. *中国小儿血液与肿瘤杂志*, 2020, 25(1):4-8.
- [15] 姚旭, 王清华, 茹艺, 等. 芍药苷抑制 PI3K/AKT 信号通路促进细胞自噬治疗骨关节炎[J]. *吉林中医药*, 2020, 40(8):1076-1079.
- [16] CHEN L, LIU P, FENG X, et al. Salidroside suppressing LPS-induced myocardial injury by inhibiting ROS-mediated PI3K/Akt/mTOR pathway *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(12):3178-3189.
- [17] FENG F B, QIU H Y. Effects of Artesunate on chondrocyte proliferation, apoptosis and autophagy through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in rat models with rheumatoid arthritis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 102:1209-1220.
- [18] YANG J, PI C, WANG G. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103:699-707.

(收稿日期:2022-11-29)

## Mechanism of Action of Ershen Zhenwu Decoction in Inhibiting Myocardial Fibrosis by Regulating the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway: An *in vitro* Study

ZHAO Yan<sup>1</sup>, GAN Ruixi<sup>1</sup>, ZHANG Xiaoyue<sup>1</sup>, CHENG Xiaoyu<sup>2</sup>, GE Lan<sup>2</sup>, PENG Daiyin<sup>1</sup>, WANG Hongsong<sup>1</sup>, CHEN Weidong<sup>1,3,4,5</sup>

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 2. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230031, China; 3. Synergetic Innovation Center of Anhui Authentic Chinese Medicine Quality Improvement, Anhui Hefei 230012, China; 4. Anhui Province Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces of New Manufacturing Technology, Anhui Hefei 230012, China; 5. Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula of Anhui Province, Anhui Hefei 230012, China)

**[Abstract] Objective** To investigate the mechanism of action of Ershen Zhenwu Decoction in inhibiting myocardial fibrosis.

**Methods** Specific pathogen-free rats were given Ershen Zhenwu Decoction and benazepril by gavage for 7 days to prepare drug-containing serum. Primary myocardial fibroblasts were extracted from the heart of neonatal rats within 3 days after birth, and immunofluorescence assay and trypan blue staining were used to measure cell purity and viability. CCK-8 assay was used to determine the optimal concentration and duration for the administration of drug-containing serum. Primary myocardial fibroblasts were stimulated by angiotensin II to establish a model of myocardial fibrosis, and then the primary myocardial fibroblasts were divided into normal group, model group, Ershen Zhenwu Decoction group, and benazepril group. ELISA was used to measure the content of type I collagen (Col-I) and type III collagen (Col-III); Western blot was used to measure the protein expression levels of alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), Col-I, Col-III, PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT, mTOR, and p-mTOR, and quantitative real-time PCR was used to measure the mRNA expression levels of  $\alpha$ -SMA, Col-I, Col-III, PI3K, AKT, and mTOR. **Results** Both the purity and viability of the extracted primary myocardial fibroblasts reached above 95%. Compared with the normal group, the model group had significant increases in the content of Col-I and Col-III ( $P < 0.05$ ) and the protein and mRNA expression levels of  $\alpha$ -SMA, Col-I, Col-III, p-PI3K, p-AKT, and p-mTOR ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the Ershen Zhenwu Decoction group had significant reductions in the protein and mRNA expression levels of  $\alpha$ -SMA, Col-I, Col-III, p-PI3K, p-AKT, and p-mTOR in primary myocardial fibroblasts ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Ershen Zhenwu Decoction inhibits myocardial fibrosis possibly by regulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.

**[Key words]** Myocardial fibrosis; Primary myocardial fibroblast; Ershen Zhenwu Decoction; PI3K; AKT; mTOR; Signaling pathway