

文章编号 1006-8147(2021)05-0496-06

论著

阿卡地新对冠心病大鼠 AMPK/FOXO1 信号通路及心功能损害的影响

王书飞¹, 刘蕾¹, 杜林翔¹, 张培培¹, 左艳芳¹, 逮党辉²

(1.河南省周口市中心医院心脏及内科重症监护室, 周口 466000; 2.河南省人民医院血管外科, 郑州 450000)

摘要 目的:探究阿卡地新对冠心病大鼠 AMP 活化蛋白激酶(AMPK)/转录因子叉头框转录因子 O 亚族 1(FOXO1)信号通路及心功能损害的影响。方法:将 72 只 Sprague-Dawley(SD)大鼠采用随机数字表法分为正常组、模型组、地尔硫卓组(1.0 mg/kg)、阿卡地新高、中、低剂量组(2.0、1.0、0.5 mg/kg), 每组 12 只。采用高脂饲料喂养+腹腔注射垂体后叶素法建立冠心病模型。造模后腹腔注射相应剂量的药物, 正常组和模型组大鼠腹腔注射等量生理盐水, 1 次/d, 连续注射 14 d。采用超高分辨率小动物超声影像系统测量大鼠左心室收缩末期径(LVESD)、左心室舒张末期径(LVEDD)、射血分数(EF), 短轴缩短率(FS); 检测血清炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶-MB(CK-MB), 脂代谢指标甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)水平以及心肌组织匀浆中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)水平; HE 染色观察心脏组织形态变化; Western 印迹法检测心肌组织 AMPK 和 FOXO1 及其磷酸化蛋白的表达。结果:与正常组相比, 模型组大鼠心肌组织染色不均, 细胞水肿变性, 伴有大量炎性细胞浸润, LVESD、LVEDD、血清 CK、CK-MB、TNF- α 、IL-6、TC、TG、LDL-C、心肌组织 MDA 水平、p-FOXO1 表达升高($F=17.157\sim 424.519$, 均 $P<0.05$), EF、FS、SOD、CAT、p-AMPK/AMPK、FOXO1 表达下降($F=14.774\sim 129.547$, 均 $P<0.05$); 与模型组相比, 地尔硫卓组和阿卡地新高、中剂量组大鼠心肌细胞损伤减轻, LVESD、LVEDD、血清 CK、CK-MB、TNF- α 、IL-6、TC、TG、LDL-C、MDA、p-FOXO1 表达降低($F=17.157\sim 424.519$, 均 $P<0.05$), EF、FS、SOD、CAT、p-AMPK/AMPK、FOXO1 表达升高($F=17.157\sim 129.547$, 均 $P<0.05$)。结论:阿卡地新可能通过激活 AMPK/FOXO1 信号通路, 减轻冠心病大鼠心功能损害。

关键词 阿卡地新; 冠心病; 心肌损伤; 腺苷单磷酸激活蛋白激酶/转录因子叉头框转录因子 O 亚族 1

中图分类号 R541.4

文献标志码 A

Effects of acadesine on AMPK/FOXO1 signaling pathway and cardiac function damage in rats with coronary heart disease

WANG Shu-fei¹, LIU Lei¹, DU Lin-xiang¹, ZHANG Pei-pe¹, ZUO Yan-fang¹, LU Dang-hui²

(1.CCU, Zhoukou Central Hospital of Henan Province, Zhoukou 466000, China; 2. Department of Vascular Surgery, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450000, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of acadesine on adenosine monophosphate protein kinase(AMPK)/forkhead box transcription factor O1 (FOXO1) signaling pathway and cardiac function damage in rat with coronary heart disease. **Methods:** A total of 72 Sprague-Dawley(SD) rats were randomly divided into normal group, model group, diltiazem group (1.0 mg/kg), acadesine high, middle, low dose groups (2.0, 1.0, 0.5 mg/kg) by random number table method, with 12 rats in each group. The model of coronary heart disease was established by feeding with high-fat diet and intraperitoneal injection of pituitrin. After modeling, the corresponding dose of drugs was injected intraperitoneally, the rats in the normal group and model group were intraperitoneally injected with the same amount of normal saline, once a day for 14 days. Left ventricular end systolic diameter (LVESD), left ventricular end diastolic diameter (LVEDD), ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) were measured by ultra-high resolution small animal ultrasound imaging system. The levels of serum inflammatory factors tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 6(IL-6), creatine kinase(CK), creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB), lipid metabolism index triglyceride (TG), cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), catalase (CAT) in myocardial tissue homogenate were measured. HE staining was used to observe the morphological changes of heart tissue, the expression of AMPK, FOXO1 and their phosphorylated proteins were detected by Western blotting B. **Results:** Compared with those in the normal group, the myocardial tissue in the model group was stained unevenly, with edema and degeneration, accompanied by a large number of inflammatory cells infiltration. In the model group, LVESD, LVEDD, levels of CK, CK-MB, TNF- α , IL-6, TC, TG and LDL-C in serum, level of MDA in myocardial tissue and expression of p-FOXO1 were increased ($F=17.157\sim 424.519$, $P<0.05$), EF, FS, the levels of SOD and CAT, the expression of p-AMPK/AMPK and FOXO1 were decreased ($F=14.774\sim 129.547$, $P<0.05$). Compared with those in the model group, the myocardial cell injury was reduced in the

作者简介 王书飞(1987-), 男, 主治医师, 硕士, 研究方向: 心血管内科; 通信作者: 王娜, E-mail: leyan_2002@163.com。

diltiazem group, acadesine high and middle dose group, LVESD, LVEDD, levels of CK, CK-MB, TNF- α , IL-6, TC, TG and LDL-C in serum, level of MDA in myocardial tissue and expression of p-FOXO1 were decreased ($F=17.157-424.519, P<0.05$), the EF, FS, the levels of SOD and CAT, the expression of p-AMPK/AMPK and FOXO1 were higher ($F=17.157-129.547, P<0.05$). **Conclusion:** Acadesine may reduce the damage of cardiac function in rats with coronary heart disease by activating AMPK/FOXO1 signaling pathway.

Key words acadesine; coronary heart disease; cardiac function damage; adenosine monophosphate protein kinase/forkhead box transcription factor O1

冠心病(coronary heart disease, CHD)是一种常见的心脏病,在世界范围内具有很高的死亡率和致残性。CHD的基本病理生理过程是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS),容易形成斑块并阻塞血管,导致心肌缺血、缺氧或坏死^[1]。炎症^[2]、氧化应激^[3]和血脂代谢异常^[4]引起的AS是导致CHD发生、发展的重要原因,对其调控也成为临床治疗CHD的重要干预环节。目前,CHD的治疗方法主要包括冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)和冠状动脉搭桥术(coronary artery bypass grafting, CABG),然而术后再次狭窄和具有广泛病变的患者限制了其在CHD中的应用^[5]。因此,迫切需要寻找一种非侵入性的方法来保护缺血性心肌。AMP活化蛋白激酶(adenosine monophosphate protein kinase, AMPK)在内皮细胞(endothelial cell, EC)、肝脏和大脑等多种组织广泛表达,研究发现在局部缺血或缺氧中,AMPK的激活可促进血管生成,抑制心肌细胞凋亡,保护心肌组织^[6],但其机制尚未完全了解。阿卡地新是AMPK特异性激动剂^[7],可促进AMPK磷酸化,改善心肌能量代谢,减轻体外循环术后心肌缺血再灌注损伤^[8];激活AMPK通路可保护冠状动脉血管内皮细胞的正常功能,对大鼠CHD具有一定的治疗作用^[9]。故推测阿卡地新作为AMPK特异性激动剂可能对CHD大鼠心功能具有保护作用,本研究通过构建CHD大鼠模型,探究阿卡地新对CHD大鼠心功能损害的影响及其潜在的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级健康Sprague-Dawley(SD)雄性大鼠72只,体重(210 \pm 10)g,购自济南朋悦动物繁育有限公司,生产证号为SCXK(鲁)20140007,动物饲养许可证:SYXK(豫),动物批号:20150005。所有动物均严格按照动物饲养规则喂养,温度为(24 \pm 2) $^{\circ}$ C,湿度为50%~60%,12h明暗交替,自由饮水和摄食。

1.2 药品及试剂 阿卡地新(加拿大StressMarq,货号:SIH-402,纯度: \geq 98%);盐酸地尔硫卓注射液(山东方明药业集团股份有限公司,国药准字H20070254,10 mL:10 mg);垂体后叶素(南京新百药业有限公司,国药准字H32026638,1 mL:6单位);HE染色试

剂、RIPA裂解液和BCA试剂盒(碧云天生物科技公司,批号分别为C0105、P0013B、P0012S);SMT100V便携式全自动动物生化分析仪(江苏南京普朗医疗设备有限公司);超高分辨率小动物彩色多普勒超声实时影像系统(Vevo 2100,加拿大VisualSonics公司);肌酸激酶(creatine kinase, CK)、肌酸激酶同工酶MB(creatine kinase isoenzyme-MB, CK-MB)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、低密度脂蛋白-胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为A032-1、E006-11、A001-3、A003-1、A007-1、A113-1);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)(RA20035)、白细胞介素-6(IL-6)(RA20607)ELISA检测试剂盒购自武汉贝茵莱生物科技有限公司;兔抗AMPK抗体(ab207442)、兔抗p-AMPK抗体(ab23875)、兔抗FOXO1抗体(ab179450)、兔抗p-FOXO1抗体(ab131339)、兔抗beta Actin抗体(ab8227)、羊抗兔IgG H&L(HRP)(ab205718),购自英国abcam公司;多功能酶标仪(iMark680, Bio-Rad公司)、荧光显微镜(日本Olympus公司)。

1.3 方法

1.3.1 大鼠分组与CHD模型的制备 采用随机数字表法将72只大鼠随机分为正常组、模型组、地尔硫卓组(1.0 mg/kg)^[10]、阿卡地新高、中、低剂量组(2.0、1.0、0.5 mg/kg)^[11],每组12只。除正常组外,其余各组大鼠参照文献^[12-13]采用高脂饲料喂养+腹腔注射垂体后叶素建立CHD模型,给予高脂饲料喂养8周后腹腔注射垂体后叶素(30 μ g/kg),1次/24 h,连续注射3次,构建CHD大鼠模型。正常组给予基础饲料喂养8周后连续3d腹腔注射等量生理盐水。高脂饲料:基础饲料81.3%、猪油10%、蛋黄粉5%、胆固醇3%、胆酸钠0.5%、丙硫氧嘧啶0.2%。8周后采集大鼠尾静脉血,用自动生化分析仪检测TG、TC、LDL-C验证建模结果:结果显示模型大鼠TG、TC、LDL-C水平均显著升高,模型制备成功。

1.3.2 给药方法 地尔硫卓组、阿卡地新各剂量组在造模完成后,腹腔注射相应剂量的阿卡地新,正常组和模型组大鼠腹腔注射等量生理盐水,1次/d,

连续注射 14 d。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 心功能检测 末次注射阿卡地新 2 h 后,戊巴比妥钠麻醉大鼠,采用超高分辨率小动物超声影像系统测量大鼠左心室收缩末期内径(left ventricular end-systolic diameter,LVESD)、左心室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic diameter,LVEDD)、射血分数(ejection fraction,EF),短轴缩短率(fractional shortening,FS)。

1.4.2 心肌酶及炎性指标检测 心功能检测完成后,腹主动脉取血,静置后以 3 000 r/min 离心 15 min,分离血清,检测血清中 CK、CK-MB、TNF- α 、IL-6 水平,严格按照试剂盒说明书的步骤进行操作。

1.4.3 脂代谢指标检测 生化法检测血清 TC、TG、LDL-C 水平,溶液的配制及检测步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.4.4 氧化应激指标检测 取血后,取出大鼠完整心脏,于冰上用无菌手术刀片切分为 3 部分,一部分置于冻存管中,-80 $^{\circ}$ C 保存;一部分用 4%多聚甲醛固定;另一部分按照 1:9 加入预冷的生理盐水研磨后,离心,取上清液,制备成 10%的组织匀浆,生化法检测匀浆中 MDA、SOD、CAT 水平。

1.4.5 心肌组织 HE 染色 取 4%多聚甲醛固定的心肌组织,乙醇梯度脱水,石蜡包埋,连续切 3 μ m 薄片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱苯 1 min,蒸馏水冲洗。常规 HE 染色,光镜下观察心脏组织形态变化。

1.4.6 Western 印迹法检测心肌组织中相关蛋白的表达 取-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存的心肌组织,加入 RIPA 裂解液研磨后,置于冰上,静置后离心,提取上清液为总蛋白溶液。用 BCA 法测量蛋白浓度后取等量蛋白质样品(30 μ g/孔)上样,SDS-PAGE 凝胶电泳,湿转法转膜,5%脱脂奶粉封闭,加入相应一抗(AMPK、p-AMPK、FOXO1、p-FOXO1 按照 1:1 000 比例进行

稀释, β -actin 1:5 000 按比例进行稀释)于 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜,HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,ECL 显色,以 β -actin 为内参,通过与内参的灰度比,得出目的条带的相对表达水平。

1.5 统计学处理 本研究所得数据均采用 SPSS 22.0 软件进行统计,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,当符合正态分布和同质性时,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Tukey 事后检验,组间有差异进一步采用 SNK-*q* 检验;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 阿卡地新对 CHD 大鼠心功能的影响 与正常组相比,模型组大鼠 LVESD、LVEDD 显著增大,EF、FS 显著下降(均 *P*<0.05);与模型组相比,地尔硫卓组。阿卡地新高、中剂量组大鼠 LVESD、LVEDD 明显下降,EF、FS 明显升高(均 *P*<0.05);与地尔硫卓组相比,阿卡地新高剂量组 LVESD、LVEDD、EF、FS 差异均无统计学意义(均 *P*>0.05),见表 1。

2.2 阿卡地新对 CHD 大鼠血清心肌酶及炎性相关因子的影响 与正常组相比,模型组大鼠血清 CK、CK-MB、TNF- α 、IL-6 水平显著升高(均 *P*<0.05);与模型组相比,地尔硫卓组、阿卡地新高、中、低剂量组大鼠血清 CK、CK-MB、TNF- α 、IL-6 水平明显下降(均 *P*<0.05);与地尔硫卓组相比,阿卡地新高剂量组 CK、CK-MB、TNF- α 、IL-6 水平差异无统计学意义(均 *P*>0.05),见表 2。

2.3 阿卡地新对 CHD 大鼠脂代谢相关指标的影响 与正常组相比,模型组大鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平显著升高(均 *P*<0.05);与模型组相比,地尔硫卓组和阿卡地新高、中剂量组大鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平明显下降(均 *P*<0.05);与地尔硫卓组相比,阿卡地新高剂量组 TC、TG、LDL-C 水平差异均无统计学意义(均 *P*>0.05),见表 3。

表 1 阿卡地新对 CHD 大鼠心功能的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effect of Acadixin on cardiac function in CHD rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	LVESD(mm)	LVEDD(mm)	EF(%)	FS(%)
正常组	12	2.17 \pm 0.21	4.54 \pm 0.43	76.17 \pm 7.03	35.21 \pm 3.35
模型组	12	3.99 \pm 0.28 ^a	5.97 \pm 0.35 ^a	55.23 \pm 6.12 ^a	22.25 \pm 3.08 ^a
地尔硫卓组	12	2.53 \pm 0.27 ^{ab}	4.86 \pm 0.53 ^{ab}	70.84 \pm 6.32 ^{ab}	32.67 \pm 2.79 ^{ab}
阿卡地新高剂量组	12	2.74 \pm 0.25 ^{ab}	5.02 \pm 0.44 ^{ab}	66.25 \pm 7.11 ^{ab}	30.88 \pm 2.95 ^{ab}
阿卡地新中剂量组	12	3.26 \pm 0.30 ^{abc}	5.54 \pm 0.42 ^{abc}	62.36 \pm 8.32 ^{abc}	28.75 \pm 3.14 ^{abc}
阿卡地新低剂量组	12	3.77 \pm 0.29 ^{ac}	5.78 \pm 0.61 ^{ac}	57.58 \pm 7.93 ^{ac}	25.81 \pm 3.42 ^{ac}
<i>F</i>		86.091	17.157	14.774	27.196
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000	0.000

注:CHD:冠心病;LVESD:左心室收缩末期内径;LVEDD:左心室舒张末期内径;EF:射血分数;FS:短轴缩短率;与正常组相比,^a*P*<0.05;与模型组相比,^b*P*<0.05;与地尔硫卓组相比,^c*P*<0.05

表2 阿卡地新对 CHD 大鼠心肌酶及炎症相关因子的影响($\bar{x}\pm s$)Tab 2 Effect of Acadixin on myocardial enzymes and inflammatory related factors in CHD rats($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	CK(U/L)	CK-MB(U/L)	TNF- α (pg/mL)	IL-6(pg/mL)
正常组	12	79.45 \pm 12.15	102.25 \pm 20.21	48.55 \pm 7.33	56.21 \pm 11.15
模型组	12	190.04 \pm 15.28 ^a	255.14 \pm 28.32 ^a	215.63 \pm 13.26 ^a	338.25 \pm 18.08 ^a
地尔硫卓组	12	90.58 \pm 16.07 ^{ab}	151.21 \pm 23.14 ^{ab}	92.06 \pm 12.18 ^{ab}	161.38 \pm 16.23 ^{ab}
阿卡地新高剂量组	12	93.27 \pm 14.15 ^{ab}	153.77 \pm 24.35 ^{ab}	95.15 \pm 13.74 ^{ab}	165.49 \pm 17.67 ^{ab}
阿卡地新中剂量组	12	137.85 \pm 15.32 ^{abc}	195.32 \pm 23.37 ^{abc}	120.88 \pm 12.58 ^{abc}	197.03 \pm 12.91 ^{abc}
阿卡地新低剂量组	12	176.53 \pm 16.08 ^{abc}	239.43 \pm 22.14 ^{abc}	151.74 \pm 11.72 ^{abc}	248.14 \pm 17.88 ^{abc}
F		121.704	72.213	278.108	424.519
P		0.000	0.000	0.000	0.000

注:CHD:冠心病;CK:肌酸激酶;CK-MB:肌酸激酶同工酶-MB;TNF- α :肿瘤坏死因子- α ;IL-6:白细胞介素-6;与正常组相比,^a P <0.05;与模型组相比,^b P <0.05;与地尔硫卓组相比,^c P <0.05

表3 阿卡地新对 CHD 大鼠脂代谢相关指标的影响($\bar{x}\pm s$)Tab 3 Effect of Acadixin on related indexes of lipid metabolism in CHD rats($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)
正常组	12	0.67 \pm 0.11	2.25 \pm 0.21	0.85 \pm 0.13
模型组	12	1.48 \pm 0.19 ^a	4.14 \pm 0.28 ^a	1.93 \pm 0.16 ^a
地尔硫卓组	12	0.87 \pm 0.16 ^{ab}	2.89 \pm 0.23 ^{ab}	1.01 \pm 0.12 ^{ab}
阿卡地新高剂量组	12	0.95 \pm 0.17 ^{ab}	3.07 \pm 0.25 ^{ab}	1.15 \pm 0.14 ^{ab}
阿卡地新中剂量组	12	1.25 \pm 0.15 ^{abc}	3.31 \pm 0.38 ^{abc}	1.58 \pm 0.12 ^{abc}
阿卡地新低剂量组	12	1.37 \pm 0.20 ^{ac}	3.64 \pm 0.34 ^{abc}	1.74 \pm 0.17 ^{ac}
F		43.591	60.826	113.317
P		0.000	0.000	0.000

注:CHD:冠心病;TG:甘油三酯;TC:总胆固醇;LDL-C:低密度脂蛋白-胆固醇;与正常组相比,^a P <0.05;与模型组相比,^b P <0.05;与地尔硫卓组相比,^c P <0.05

2.4 阿卡地新对 CHD 大鼠心肌组织氧化应激指标的影响 与正常组相比,模型组大鼠心肌组织 SOD、CAT 水平显著降低,MDA 水平显著升高(均 P <0.05);与模型组相比,地尔硫卓组和阿卡地新高、中、低剂量组大鼠心肌组织 SOD、CAT 水平明显升高,MDA 水平明显降低(均 P <0.05);与地尔硫卓组相比,阿卡地新高剂量组 SOD、CAT、MDA 水平差异无统计

表4 阿卡地新对 CHD 大鼠心肌组织氧化应激指标的影响($\bar{x}\pm s$)Tab 4 Effect of Acadixin on oxidative stress index of myocardial tissue in CHD rats($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	SOD(U/mgprot)	MDA(nmol/mgprot)	CAT(U/mL)
正常组	12	225.04 \pm 17.55	0.84 \pm 0.12	120.53 \pm 12.15
模型组	12	148.36 \pm 16.38 ^a	2.65 \pm 0.16 ^a	74.72 \pm 10.08 ^a
地尔硫卓组	12	193.41 \pm 16.58 ^{ab}	1.09 \pm 0.13 ^{ab}	109.12 \pm 12.31 ^{ab}
阿卡地新高剂量组	12	187.52 \pm 17.66 ^{ab}	1.28 \pm 0.15 ^{ab}	106.49 \pm 11.64 ^{ab}
阿卡地新中剂量组	12	175.81 \pm 18.54 ^{abc}	1.87 \pm 0.18 ^{abc}	96.85 \pm 12.91 ^{abc}
阿卡地新低剂量组	12	161.52 \pm 15.45 ^{abc}	2.13 \pm 0.21 ^{abc}	89.14 \pm 13.56 ^{abc}
F		29.719	220.307	21.306
P		0.000	0.000	0.000

注:CHD:冠心病;SOD:超氧化物歧化酶;MDA:丙二醛;CAT:过氧化氢酶;与正常组相比,^a P <0.05;与模型组相比,^b P <0.05;与地尔硫卓组相比,^c P <0.05

学意义(均 P >0.05),见表4。

2.5 阿卡地新对 CHD 大鼠心肌组织形态学变化的影响 HE 染色结果显示,正常组大鼠的心肌细胞排列整齐、心肌纤维结构完整清晰,染色均匀,未见心肌细胞水肿、坏死;模型组大鼠心肌组织染色不均,局部肌纤维横纹消失,心肌细胞形态不规则,排列紊乱,可见水肿变性,并伴有大量炎性细胞浸润;与模型组相比,地尔硫卓组和阿卡地新高、中剂量组大鼠心肌细胞水肿减轻,心肌纤维排列较为整齐,纤维断裂减少,少量炎性细胞浸润,见图1。

2.6 阿卡地新对 CHD 大鼠心肌组织中 p-AMPK/AMPK、p-FOXO1/FOXO1 表达的影响 Western 印迹结果显示,与正常组相比,模型组大鼠心肌组织 p-AMPK/AMPK、FOXO1 蛋白表达显著降低,p-FOXO1 蛋白表达显著升高(均 P <0.05);与模型组相比,地尔硫卓组和阿卡地新高、中剂量组大鼠心肌组织 p-AMPK/AMPK、FOXO1 蛋白表达明显增加,p-FOXO1 蛋白表达明显降低(均 P <0.05);与地尔硫卓组相比,阿卡地新高剂量组 p-AMPK/AMPK、FOXO1、p-FOXO1 蛋白表达差异无统计学意义(均 P >0.05),见图2。

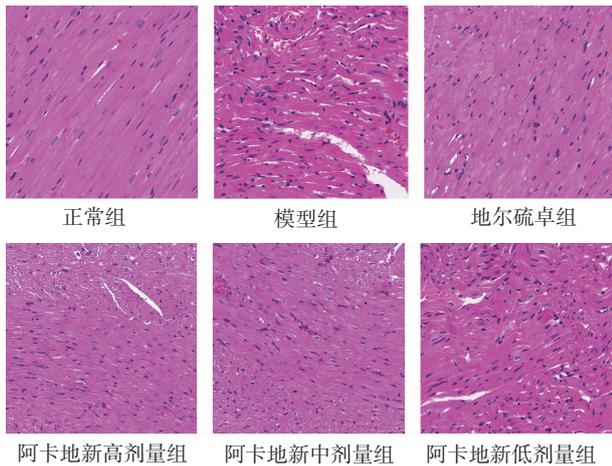
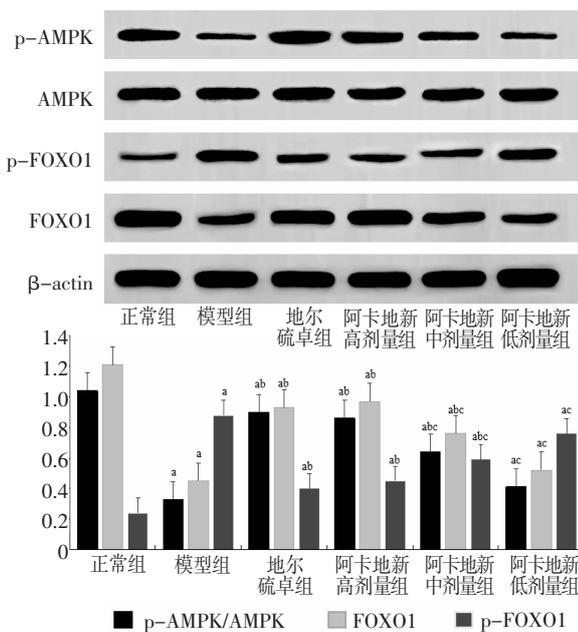


图 1 大鼠心肌组织形态学改变(HE 染色, 200 \times)

Fig 1 Morphological changes of myocardial tissue in rats (HE staining, 200 \times)



注:CHD:冠心病;AMPK:AMP 活化蛋白激酶;FOXO1:叉头框转录因子 O 亚族 1; β -actin: β 肌动蛋白;与正常组相比, $^*P<0.05$;与模型组相比, $^{\#}P<0.05$;与地尔硫卓组相比, $^{\Delta}P<0.05$

图 2 阿卡地新对 CHD 大鼠心肌组织 AMPK、FOXO1 蛋白表达的影响
Fig 2 The effect of acarbose on the expression of AMPK and FOXO1 protein in myocardium of CHD rats

3 讨论

炎症、氧化应激反应和血脂代谢异常在 CHD 的发生、发展中发挥至关重要的作用^[14]。当心肌缺血时,机体代谢产物不能被及时清除,在体内大量堆积产生毒性作用,诱发心肌发生病变,导致心泵功能减退,血液流变学发生异常,引起血脂代谢异常;同时心肌缺血后会激活氧化应激反应,产生大量的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS),生成和释放大量炎症因子(如 TNF- α 、IL-6),促进 CHD 的发生、发展。高脂饮食被认为是诱发脂代谢紊乱并导

致 CHD 的必不可少的因素^[12]。因此,本研究采用高脂饲料喂养联合腹腔注射垂体后叶素构建 CHD 大鼠模型,结果发现模型大鼠 LVESD、LVEDD 显著升高,EF、FS 显著下降,提示 CHD 大鼠心腔扩大,心脏泵血量显著降低,不能满足机体的需要,心脏泵血功能衰竭;CHD 大鼠血清 CKMB、CK 水平显著升高,HE 染色结果也显示,心肌组织染色不均,局部肌纤维横纹消失,心肌细胞排列紊乱,并伴有大量炎症细胞浸润;说明 CHD 大鼠出现严重的心肌损伤;同时血清炎症和脂代谢相关指标水平显著升高,且心肌抗氧化指标(SOD、CAT)水平的显著降低,MDA 水平的升高;提示 CHD 大鼠出现血脂代谢异常、炎症和氧化应激反应。

阿卡地新是一种腺苷类似物,能够模拟 AMP 功能,特异性激活 AMPK。AMPK 是一种位于真核生物细胞中广泛表达且高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,对炎症和氧化应激具有重要调节作用^[15];提高 AMPK 活性,可降低 ROS 水平,增加 SOD 生成,增强机体抗氧化能力^[16]。而且 AMPK 通路可调控脂类代谢,研究发现脂联素可通过激活 AMPK 通路,抑制脂肪酸合成,增加血脂中脂肪酸的氧化,降低血脂水平,调节脂代谢紊乱,预防冠状动脉粥样硬化发生和发展^[17]。阿卡地新能降低心肌细胞中 ROS、脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)水平,调节心肌梗死后心肌功能^[18]。本研究结果发现,给予阿卡地新干预后,大鼠 LVESD、LVEDD 明显降低,EF、FS 明显升高,提示 CHD 模型大鼠心脏泵血功能明显改善;血清 CKMB、CK 水平明显降低,心肌损伤减轻,同时血清炎症因子(TNF- α 、IL-6)、脂代谢相关指标(TC、TG、LDL-C)水平明显降低,心肌组织 SOD、CAT 水平明显升高,说明阿卡地新可抑制 CHD 模型大鼠的炎症和氧化应激反应,改善血脂代谢异常。

FOXO1 是 Fox 家族成员之一,大量证据表明 FOXO1 是心脏代谢调节和维持心脏功能的重要因素,AMPK/FOXO1 信号通路的激活具有心脏保护作用。FOXO1 主要分布在细胞质中,但 FOXO1 的核定位是该基因调节功能的前提。在磷酸化状态,FOXO1 被排除在细胞核之外,并以泛素依赖性方式在细胞质中降解。而 AMPK 激活后可直接阻止 FOXO1 的磷酸化,触发 FOXO1 蛋白从细胞质到细胞核的重新定位,并使 FOXO1 活性增加,降低细胞中活性氧的水平^[19];还可以增加脂肪酸 β 氧化,增强脂肪细胞的脂解作用,降低肌管中的脂质蓄积^[15]。绞股蓝皂甙 A 可通过激活 AMPK/FOXO1 途径,保护心肌缺血/再灌注损伤^[20]。作为 AMPK 的特异性激活剂,阿卡地新

对 CHD 大鼠的保护机制是否与 FOXO1 有关? 本研究采用 Western 印迹法检测了 AMPK、FOXO1 及其磷酸化蛋白的表达,结果显示阿卡地新可明显增加心肌组织 p-AMPK/AMPK、FOXO1 蛋白的表达,降低 p-FOXO1 蛋白表达;提示阿卡地新对 CHD 大鼠的心功能的保护作用,可能与激活 AMPK/FOXO1 信号通路有关。

综上所述,阿卡地新可抑制 CHD 大鼠的炎症和氧化应激反应,改善血脂代谢异常,保护心功能;其作用机制可能与激活 AMPK/FOXO1 信号通路有关。本研究为 CHD 的治疗和阿卡地新的临床应用提供了理论与实验参考,但尚存在一定不足,未设置通路抑制剂组进行验证,此外,由于条件限制,本研究只在动物水平进行了验证,下一步可从细胞水平上进行探讨。

参考文献:

- [1] KNYAZEVA T, BADIJEVA V A, NIKIFOROVA T I. Physical training integration with physiotherapeutic methods of myocardial metabolism recovery in the rehabilitation of patients after acute coronary syndrome and cardiosurgical myocardial revascularization [J]. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult*, 2020, 97(5):5
- [2] ZHANG L, QI X, ZHANG G, et al. Saxagliptin protects against hypoxia-induced damage in H9c2 cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 315:108864
- [3] CHERAGHI M, AHMADVAND H, MALEKI A, et al. Oxidative stress status and liver markers in coronary heart disease [J]. *Rep Biochem Mol Biol*, 2019, 8(1):49
- [4] DEROSA G, COLLETTI A, MAFFIOLI P, et al. Lipid-lowering nutraceuticals update on scientific evidence [J]. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2020, 21(11):845
- [5] KHOSRAVI A, VAKHSHOORI M, SHARIF V, et al. Comparison of survival rate and complications of percutaneous coronary intervention, coronary artery bypass graft, and medical treatment in patients with left main and/or three vessel diseases [J]. *ARYA Atheroscler*, 2020, 16(2):85
- [6] CHEN M H, FU Q M. The roles of AMPK in revascularization [J]. *Cardiol Res Pract*, 2020, 2020:4028635
- [7] ZHOU X, CHEN Y, WANG F, et al. Artesunate induces autophagy dependent apoptosis through upregulating ROS and activating AMPK-mTOR-ULK1 axis in human bladder cancer cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 331:109273
- [8] ZHANG D S, LIANG G Y, LIU D X, et al. Role of phosphorylated AMP-Activated protein kinase (AMPK) in myocardial insulin resistance after myocardial ischemia-reperfusion during cardiopulmonary bypass surgery in Dogs [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25:4149
- [9] LI J M, LU W, YE J, et al. Association between expression of AMPK pathway and adiponectin, leptin, and vascular endothelial function in rats with coronary heart disease [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(2):905
- [10] 张艺红, 刘智. 人参皂苷 Rg1 对冠心病大鼠的影响研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(2):133
- [11] XU X H, HU Q, ZHOU L S, et al. Berberine inhibits gluconeogenesis in skeletal muscles and adipose tissues in streptozotocin-induced diabetic rats via LKB1-AMPK-TORC2 signaling pathway [J]. *Curr Med Sci*, 2020, 40(3):530
- [12] ZHANG W J, SU W W, LIN Q W, et al. Protective effects of Naoxintong capsule alone and in combination with ticagrelor and atorvastatin in rats with Qi deficiency and blood stasis syndrome [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1):1006
- [13] ZHANG H, WANG W R, LIN R, et al. Buyang huanwu decoction ameliorates coronary heart disease with Qi deficiency and blood stasis syndrome by reducing CRP and CD40 in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130(1):98
- [14] YANG Q, LI J, ZHANG H, et al. Down-regulation of microRNA-429 alleviates myocardial injury of rats with coronary heart disease [J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(19):2550
- [15] LO M C, JY C, KUO Y T, et al. Camptothecin activates SIRT1 to promote lipid catabolism through AMPK/FoxO1/ATGL pathway in C(2)C(12) myogenic cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2019, 42(8):672
- [16] 黄旦, 刘健, 纵瑞凯, 等. 黄芩清热除痹胶囊激活 PPAR γ 介导 AMPK/FOXO3a 信号通路改善强直性脊柱炎患者氧化应激 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(2):451
- [17] 马林, 陈旭, 邵明燕, 等. 脂联素介导的 AMPK 通路在冠心病脂质代谢中的分子调控机制及中医药研究进展 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2020, 18(14):2248
- [18] LIANG Q, CAI M, ZHANG J, et al. Role of muscle-specific histone methyltransferase (Smyd1) in exercise-induced cardioprotection against pathological remodeling after myocardial infarction [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19):7010
- [19] LEE J, YANG G, KIM Y J, et al. Hydrogen-rich medium protects mouse embryonic fibroblasts from oxidative stress by activating LKB1-AMPK-FoxO1 signal pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 491(3):733
- [20] CHANG L, SHI R, WANG X, et al. Gypenoside protects ischemia/reperfusion injuries by suppressing miR-143-3p level via the activation of AMPK/Foxo1 pathway [J]. *Biofactors*, 2020, 46(3):432

(2020-12-02 收稿)