

文章编号 1006-8147(2023)04-0406-07

论 著

达格列净或沙库巴曲缬沙坦对急性心肌梗死大鼠的作用机制探讨

陶文岐, 姚朱华

(天津医科大学人民医院临床学院, 天津 300122)

摘要 目的:探索在急性心肌梗死(AMI)早期(12 h内)使用达格列净(DAPA)的疗效和安全性是否优于沙库巴曲缬沙坦(Sac/Val)并对两药的获益机制进行研究。方法:通过结扎 Sprague-Dawley (SD)大鼠左冠状动脉前降支构建 AMI 模型, Sham 组只穿线不结扎。30 只成年雄性 SD 大鼠使用抽签法抽取 5 只作为 Sham 组, 剩余 25 只制作 AMI 模型, 存活 15 只大鼠按抽签法平分为 3 组: MI 组、DAPA 干预组和 Sac/Val 干预组, 每组 5 只。干预 4 周后, 心脏彩超测量左心室收缩末内径(LVIDs)及左室射血分数(LVEF)。苏木精-伊红(HE)染色、马松染色(Masson)和自噬相关蛋白 7(ATG7)免疫组化染色明确心肌结构、纤维化以及 ATG7 分布情况。Western 印迹及 qPCR 检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(Caspase3)、活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(C-Caspase3)、死骨片 1-泛素结合蛋白 P62(SQSTM1/p62)、自噬相关蛋白(Beclin1)和 ATG7 等表达情况。结果:与 MI 组相比, DAPA 或 Sac/Val 单独应用可改善心脏功能, 降低 MI 面积($F=11.25, P<0.05$)和纤维化区域($F=29.01, P<0.05$), 增加 ATG7 阳性面积($F=8.95, P<0.05$); Western 印迹结果显示, 经过 DAPA 或 Sac/Val 治疗后可以降低 Caspase3($F=7.92, P<0.05$)、C-Caspase3($F=3.70, P<0.05$)和 SQSTM1/p62($F=7.12, P<0.05$)的表达, 增加 ATG7($F=8.08, P<0.05$)和 Beclin1($F=5.80, P<0.05$)的表达; AMI 后, 导致血压明显降低, 此时加用 Sac/Val 会进一步降低血压, 而 DAPA 对血压影响较小。结论: DAPA 或 Sac/Val 主要通过降低心肌细胞凋亡和激活自噬水平, 降低心脏纤维化和心室重构, 更好地保留心脏结构和功能; DAPA 或 Sac/Val 对心脏功能均有改善作用, 且两药无明显差异。

关键词 达格列净; 沙库巴曲缬沙坦; 急性心肌梗死; 心力衰竭; 细胞凋亡; 自噬

中图分类号 R542.2+2

文献标志码 A

Exploring the mechanism of protective effect of dapagliflozin or sacubitril/valsartan in rats with acute myocardial infarction

TAO Wen-qi, YAO Zhu-hua

(Tianjin Union Medical Center, Tianjin Medical University, Tianjin 300122, China)

Abstract Objective: To explore whether the efficacy and safety of Dapagliflozin (DAPA) in the early stage of acute myocardial infarction (AMI) (within 12 hours) was better than that of sacubitril/valsartan (Sac/Val), and the mechanism of the benefits of the two drugs.

Methods: An AMI model was constructed by ligating the anterior descending branch of the left coronary artery in Sprague-Dawley (SD) rats, while in the sham mice underwent the same procedure without ligation. Thirty adult male SD rats were used by a lottery method to select 5 rats as the Sham group, with the remaining 25 rats for AMI models. Fifteen surviving rats were divided into three groups according to the lottery method: MI group, DAPA intervention group, and Sac/Val intervention group, with 5 rats in each group. After 4 weeks of intervention, LVIDs and LVEF were calculated via standard transthoracic echocardiography. In order to clarify myocardial structure, fibrosis and ATG7 distribution, the samples were subjected to hematoxylin and eosin (H&E), Masson and immunohistochemical (IHC) staining. Western blotting and qPCR were used to observe the expression levels of Caspase3, Cleaved Caspase3 (C-Caspase3), SQSTM1/p62, beclin 1, ATG7, and other key factors. **Results:** Compared with the MI group, DAPA or Sac/Val alone significantly improved cardiac function, reduced MI area ($F=11.25, P<0.05$) and fibrosis size ($F=29.01, P<0.05$), and decreased the positive IHC stain of ATG7 ($F=8.95, P<0.05$). The protein level of Caspase3 ($F=7.92, P<0.05$), C-Caspase3 ($F=3.70, P<0.05$) and SQSTM1/p62 ($F=7.12, P<0.05$) were significantly decreased, while the expression of ATG7 ($F=8.08, P<0.05$) and Beclin1 ($F=5.80, P<0.05$) were increased in group DAPA or Sac/Val compared with the MI group. After AMI, blood pressure decreased significantly, and the addition of Sac/Val further reduced blood pressure, while DAPA had little effect on blood pressure. **Conclusion:** DAPA or Sac/Val or treatment reduces cardiac fibrosis and ventricular remodeling by reducing cardiomyocyte apoptosis and activating autophagy, thereby better preserving the cardiac structure and function. DAPA or Sac/Val both have an improvement effect on cardiac function, and there is no significant difference between the two drugs.

Key words dapagliflozin; sacubitril/valsartan; acute myocardial infarction; heart failure; autophagy; apoptosis

基金项目 天津市卫生健康科研项目(ZC20080)

作者简介 陶文岐(1991-),男,硕士在读,研究方向:心肌梗死;通信作者:姚朱华, E-mail: tjyzhpci@163.com。

PARADISE-MI 研究结果显示,在急性心肌梗死(AMI)患者中,应用沙库巴曲缬沙坦(Sac/Val)治疗在心血管死亡率、首次心力衰竭的发生率等方面低于雷米普利,而低血压发生率略高^[1]。在临床实践中,笔者发现,部分 AMI 患者因合并低血压,而不能使用 Sac/Val;能使用的患者,也只能从低剂量开始。虽然 Sac/Val 对 AMI 有很好的改善作用,但是在临床实践中由于其明显影响血压,从而导致使用受限。以达格列净(DAPA)为代表的钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂(SGLT2i),主要通过抑制肾小管钠-葡萄糖协同转运蛋白 2(SGLT2)受体,抑制肾脏对糖的重吸收。EMMY 试验评估在经皮冠状动脉介入治疗(PCI)后 72 h 内开始应用恩格列净治疗 AMI 的有效性和安全性,显示 SGLT2i 能使这类 AMI 患者获益^[2]。目前正在进行关于 SGLT2i 治疗 AMI 的大型临床研究,并且没有明确的证据表明 SGLT2i 可以用于治疗 AMI。而在 AMI 患者合并低血压时,Sac/Val 使用受限,SGLT2i 能否使用,尚需要更多证据。本课题拟在 AMI 大鼠模型中,12 h 内使用 SGLT2i,探讨其疗效和安全性是否优于 Sac/Val 两种药物产生获益的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 SPF 级雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠[动物批号:110322210101819743;生产许可号:SCXK(京)2019-0008;伦理学编号:2020-C07]购于北京华阜康生物科技股份有限公司。通过结扎 SD 大鼠冠状动脉前降支构建 AMI 模型,Sham 组只穿线不结扎。30 只成年雄性 SD 大鼠使用抽签法抽取 5 只作为 Sham 组,25 只大鼠 AMI 后存活 15 只,按抽签法平分为 3 组:心肌梗死组(MI 组)、DAPA 干预组(1 mg/kg)和 Sac/Val 干预组(34 mg/kg),每组 5 只。

1.2 主要试剂 三溴乙醇购自北京百灵威科技有限公司;DAPA(10 mg/片)购自阿斯利康制药有限公司;Sac/Val(100 mg/片)购自北京诺华制药有限公司;HE、Masson 染色试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司;B-淋巴细胞瘤基因-2(Bcl-2)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白激酶 3(Caspase3)、活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白激酶 3(C-Caspase3)、自噬基因相关蛋白 7(ATG7)抗体、微管相关蛋白 1 轻链 3 II/I(LC3 II/I)抗体、自噬相关蛋白(Beclin1)、死骨片 1-泛素结合蛋白 P62(SQSTM1/p62)购于美国 Cell Signaling Technology 公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体购于武汉三鹰生物技术有限公司;ECL 化学发光试剂盒购于上海李记生物科技

有限公司;蛋白组织裂解液、聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白浓度测定试剂盒购于北京康为世纪生物科技有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 及 RNA 提取试剂盒购于普洛麦格(北京)生物技术有限公司;实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)引物由上海捷瑞生物工程有限公司北京分公司提供;反转录试剂盒、SuperRealPreMix-Plus(SYBRGreen)购于北京全式金生物技术股份有限公司。

1.3 模型建立 SD 大鼠经 3%三溴乙醇(10 mL/kg)麻醉后,仰卧位固定于动物手术台上,记录 II、VI 导联体表心电图,连接呼吸机后剃去左侧胸部体毛并用 1%碘伏消毒相应部位,在胸骨左缘第 3、4 肋间切开 2 cm 创面,逐层游离胸大肌、胸小肌,剪断第 3 肋骨,用开睑器撑开创面,暴露出心脏,钝性分离心包膜,结扎部位为左心耳与肺动脉圆锥交界下 2 mm,用 6-0 线结扎左冠状动脉前降支(结扎后不松开结扎线),结扎后可以观察到结扎部位以下心肌变白或颜色变浅,留置引流管,然后逐层缝合创面,抽出胸腔残存的空气和血液,拔出引流管,消毒创面,术中注意无菌原则,术后大鼠放于加热垫上复温并给予头孢 0.2 g 肌肉注射,待大鼠苏醒后拔除呼吸机;Sham 组与上述步骤相同,只穿线不结扎左冠状动脉前降支。术后第 1 天,Sac/Val 干预组(34 mg/kg)或 DAPA 干预组(1 mg/kg)分别给予相应药物治疗(灌胃法);Sham 组及 MI 组给予等量生理盐水灌胃,共干预 4 周。

1.4 超声心动图检查 药物开始治疗前及干预 4 周后,留取大鼠胸骨旁左心室长轴、短轴切面 B 型和 M 型模式标准图像,测量室间隔厚度、左心室后壁厚度、左心室收缩末期直径(LVIDs)和左心室舒张末期直径,共测量 3 次,取其平均值。左室射血分数(LVEF)由 M 超图像测量得出。

1.5 无创血压监测 药物开始治疗前及干预 4 周后,对各组动物行无创血压检测,在安静状态下,固定大鼠并对其尾巴进行加热,鼠尾血管扩张后,测量收缩压、舒张压,共测量 3 次,取其平均值。

1.6 心电图检查 记录不同时间段(模型制备前后和术后 1 d、28 d)II、VI 导联体表心电图。

1.7 病理染色 药物干预 4 周后处死大鼠,在心脏中段选取 0.2 cm 厚度的横切面,用 4%多聚甲醛溶液固定 3 d,经二甲苯及乙醇梯度脱水后石蜡包埋,取 5 μ m 厚组织切片,行 HE、Masson 染色;免疫组化染色观察心肌组织 ATG7 表达水平;HE、Masson 染色

切片后,在 12.5 倍视野下拍照,ATG7 免疫组化染色切片在 100 倍下随机选取 3 个视野拍照。应用 Image J 软件分析图像,计算梗死面积百分数(AMI 面积/左心室面积 $\times 100\%$)、胶原组织分数(心肌纤维化面积/左心室面积 $\times 100\%$)和 ATG7 阳性面积百分比(ATG7 阳性面积/心肌组织面积 $\times 100\%$)。

1.8 Western 印迹检测凋亡和自噬相关蛋白的表达水平 取各组大鼠心肌组织(MI 组、Sac/Val 干预组和 DAPA 干预组取梗死边缘区,Sham 组取对应部位),提取蛋白,BCA 法测定蛋白总浓度,然后对蛋白进行变性,根据测得的蛋白浓度上样,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、湿转,然后常温下使用 5%牛奶封闭 1 h,Bcl-2、Caspase3、C-Caspase3、ATG7、LC3 II/I、SQSTM1/p62 和 Beclin1 一抗稀释比例均为 1:1 000,GAPDH 稀释比例均:1:5 000,于 4℃孵育过夜,次日 TBST 震荡洗涤 3 次后分别与兔二抗(1:5 000)或鼠二抗(1:5 000)孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次后进行 ECL 化学发光显影,所有蛋白条带灰度值均使用 Image J 进行分析,以 GAPDH 作为内参蛋白。

1.9 实时荧光定量 qPCR 法检测凋亡和自噬 mRNA 表达水平 取各组大鼠心肌组织(MI 组、Sac/Val 干预组和 DAPA 干预组取梗死边缘区,Sham 组取对应部位),根据试剂盒提取组织样本中总 RNA,逆转录为 cDNA 后进行 qPCR 检测。反应条件:95℃预变性 3 min;95℃变性 5 s,60℃退火延伸 30 s,40 个循环,同时收集荧光信号,以 actin 为内参。目的蛋白和 actin 的 mRNA 表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算,具体序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列

Tab 1 Primer sequencesinq PCR

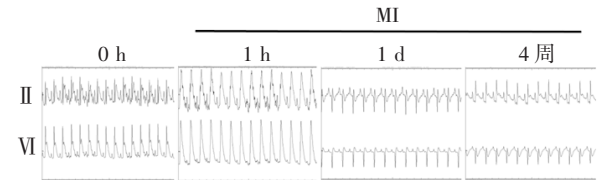
基因名称	引物序列(5'→3')
Bcl2	上游:TGTGGATGACTGAGTACCTGAACC
	下游:GGTCGCATGCTGGGGCCATATAGT
Bax	上游:AGGCGAATTGGCGATGAAGTGG
	下游:CTAGCAAAGTAGAAAAGGGCAACC
Caspase3	上游:CTGGAACTGACGATGATATGGC
	下游:CGCAAAGTGACTGGATGAACC
LC3	上游:CAGCACCCCAAGCAAGATCC
	下游:TCTTGACCAACTCGCTCATGTT
Beclin1	上游:CAAGATCCTGGACCGAGTGACC
	下游:CCTCTTCTCCTGGCTCTCTC
ATG7	上游:AGGCACCCAAAGACATCAAGG
	下游:GTGTTGTCAGGGTTCCTCAT
SQSTM1/p62	上游:AAGTACCTGCCTGAAGTCAAT
	下游:CTTTTTTTGACTCTCCCTTCTG
Actin	上游:AGAGGGAAATCGTGCGTGACATTA
	下游:GGCATCGGAACCGCTCATTGC

注:Bcl2:B-淋巴细胞瘤基因-2;Bax:B-淋巴细胞瘤基因-2 相关蛋白 X;Caspase3:半胱氨酸天冬氨酸蛋白激酶 3;LC3:微管相关蛋白 1 轻链 3;Beclin1:自噬相关蛋白;ATG7:自噬基因相关蛋白 7;SQSTM1/p62:死骨片 1-泛素结合蛋白 P62;Actin:肌动蛋白

1.10 统计学处理 采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用 Bonferroni 校正后的单因素方差分析(one-way ANOVA)进行统计分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 构建 MI 模型 和未结扎前比较,结扎 1 h 后,II、VI 导联 ST 段抬高与 QRS 融合,结扎 1 d 后,II 导联 ST 段回落,VI 导联出现 QS 波,一直持续到实验结束(4 周末),见图 1。



注:MI:心肌梗死

图 1 4 周内,心电图 II、VI 导联不同时间段动态变化

Fig 1 The rats' ECG (Lead II, VI) showed changes in amplitude at different time points within 4 weeks

2.2 各组一般情况 所有 AMI 大鼠术后第 1 天,精神状态萎靡、活动量减少、肺部湿罗音及腹部膨隆明显,术后 1 周上述症状明显好转;Sham 组无以上情况。

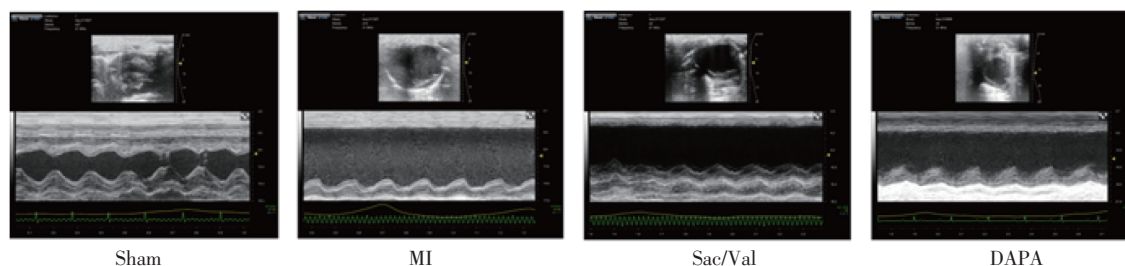
2.3 各组大鼠超声心动图检查结果比较 药物开始治疗前,与 Sham 组比较,MI 组、Sac/Val 干预组及 DAPA 干预组,LVIDs 增加($F=35.67,P<0.05$),LVEF 降低($F=19.28,P<0.05$);MI 组、Sac/Val 干预组及 DAPA 干预组之间无统计学差异,见表 2;药物干预 4 周后,与 Sham 组相比,MI 组、Sac/Val 干预组及 DAPA 干预组 LVIDs 增加($F=33.27,P<0.05$),LVEF 降低($F=160.00,P<0.05$);和 MI 组比较,Sac/Val 干预组和 DAPA 干预组 LVIDs 降低($F=33.27,P<0.05$),LVEF 升高($F=160.00,P<0.05$),两药物干预组之间,以上指标无统计学差异,见表 3 及图 2。

表 2 术后第 1 天,4 组超声心动图指标比较($n=5,\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Comparison of cardiac ultrasound results after the 1st postoperative day between the four groups ($n=5,\bar{x}\pm s$)

组别	LVIDs(mm)	LVEF(%)
Sham 组	3.35 \pm 0.55	77.31 \pm 4.80
MI 组	7.66 \pm 1.11 ^a	31.31 \pm 9.68 ^a
Sac/Val 干预组	7.54 \pm 0.82 ^a	34.96 \pm 6.52 ^a
DAPA 干预组	7.81 \pm 0.63 ^a	33.05 \pm 4.83 ^a
F	35.67	19.28
P	<0.000 1	<0.000 1

注:与 Sham 组相比,^a $P<0.05$;MI:心肌梗死;Sac/Val:沙库巴曲缬沙坦;DAPA:达格列净;LVIDs:左心室舒张末内径;LVEF:左心室射血分数



注:MI:心肌梗死;Sac/Val:沙库巴曲缬沙坦;DAPA:达格列净

图2 药物干预4周后,各实验组超声心动图变化

Fig 2 Comparison of cardiac ultrasound changes after drug intervention 4 weeks between groups

表3 药物干预4周后,各实验组超声心动图指标比较($n=5, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 Comparison of cardiac ultrasound results after drug intervention 4 weeks between groups ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	LVIDs(mm)	LVEF(%)
Sham 组	3.12±0.40	78.13±3.95
MI 组	8.80±0.49 ^a	20.88±2.37 ^a
Sac/Val 干预组	6.66±1.03 ^{ab}	31.45±4.29 ^{ab}
DAPA 干预组	7.51±1.45 ^{ab}	27.98±6.73 ^{ab}
<i>F</i>	33.27	160.00
<i>P</i>	<0.000 1	<0.000 1

注:与 Sham 组相比,^a $P<0.05$;与 MI 组相比,^b $P<0.05$;MI:心肌梗死;Sac/Val:沙库巴曲缬沙坦;DAPA:达格列净;LVIDs:左心室舒张末内径;LVEF:左心室射血分数

2.4 各组大鼠血压变化 药物开始治疗前,与 Sham 组比较,MI 组、Sac/Val 干预组及 DAPA 干预组,收缩压($F=5.61, P<0.05$)和舒张压降低($F=11.12, P<0.05$);MI 组、Sac/Val 干预组及 DAPA 干预组之间差异无统计学意义,见表4;药物干预4周后,与 Sham 组比较,MI 组、Sac/Val 组和 DAPA 组收缩压($F=17.67, P<0.05$)和舒张压降低($F=32.03, P<0.05$);与 MI 组和 DAPA 干预组比较,Sac/Val 干预组收缩压($F=17.67, P<0.05$)和舒张压显著降低($F=32.03, P<0.05$),MI 组和 DAPA 干预组比较,差异无统计学意义,见表5。

表4 术后第1天,4组血压比较($n=5, \bar{x} \pm s$)

Tab 4 Comparison of blood pressure after 1st postoperative day in the four groups ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)
Sham 组	132.00±8.22	105.40±8.32
MI 组	120.40±5.27 ^a	89.60±7.64 ^a
Sac/Val 干预组	113.60±7.54 ^a	86.20±3.35 ^a
DAPA 干预组	118.20±8.17 ^a	81.60±7.30 ^a
<i>F</i>	5.61	11.12
<i>P</i>	0.008	0.0003

注:与 Sham 组相比,^a $P<0.05$;1 mmHg=0.133 kPa;MI:心肌梗死,Sac/Val:沙库巴曲缬沙坦,DAPA:达格列净

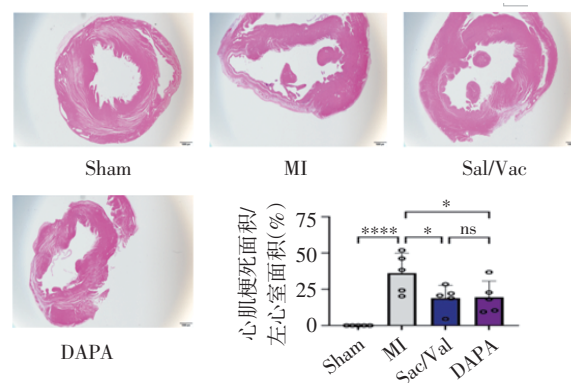
表5 药物干预4周后,4组血压比较($n=5, \bar{x} \pm s$)

Tab 5 Comparison of blood pressure after drug intervention 4 weeks in the four groups ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)
Sham 组	137.33±0.71	110.67±0.71
MI 组	110.40±4.14 ^a	83.67±2.93 ^a
Sac/Val 干预组	87.80±6.62 ^{ab}	56.67±6.11 ^{ab}
DAPA 干预组	108.27±5.67 ^{ac}	77.20±3.94 ^{ac}
<i>F</i>	17.67	32.03
<i>P</i>	<0.0001	<0.0001

注:与 Sham 组相比,^a $P<0.05$;与 MI 组相比,^b $P<0.05$;与 Sac/Val 干预组相比,^c $P<0.05$;1 mmHg=0.133 kPa;MI:心肌梗死,Sac/Val:沙库巴曲缬沙坦;DAPA:达格列净

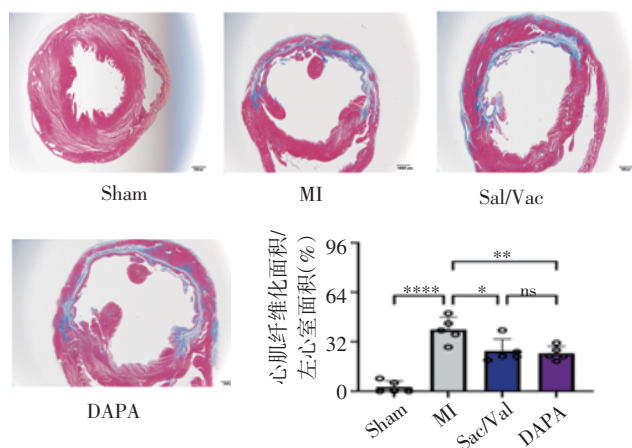
2.5 各组大鼠 MI 及纤维化面积变化 HE 和 Masson 染色显示,与 Sham 组比较,MI 组、Sac/Val 组和 DAPA 梗死面积百分比($F=11.25, P<0.05$)及胶原组织分数增大($F=29.01, P<0.05$);和 MI 组比较,Sac/Val 干预组和 DAPA 干预组梗死面积($F=11.25, P<0.05$)及纤维化比例降低($F=29.01, P<0.05$),两种药物干预组之间,以上指标无统计学差异,见图3、4。



注:4组间 HE 染色图片结果及组间梗死面积统计结果比较,计算梗死面积百分比的方法:心肌梗死面积/左心室面积×100%;* $P<0.05$,**** $P<0.000 1$,ns:无统计学意义;MI:心肌梗死;Sac/Val:沙库巴曲缬沙坦;DAPA:达格列净

图3 各组心肌组织 HE 染色(12.5×)

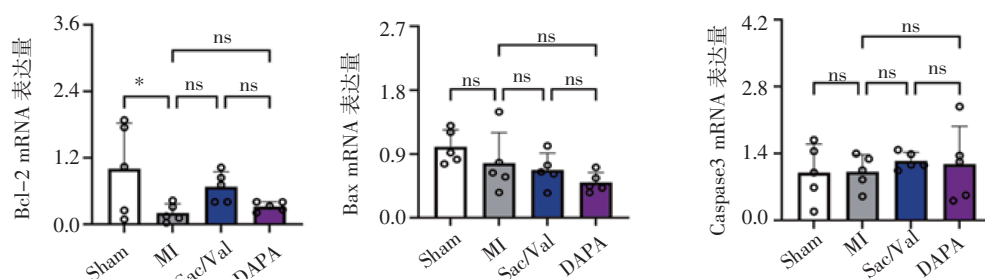
Fig 3 HE staining of myocardial tissue in each group (12.5×)



注:4组间 Masson 染色图片结果及心肌纤维化区域统计结果比较,计算纤维化区域百分比的方法:心肌纤维化面积/左心室面积 $\times 100\%$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$, ns:无统计学意义;MI:心肌梗死;Sac/Val:沙库巴曲缬沙坦;DAPA:达格列净

图4 各组心肌组织 Masson 染色(12.5 \times)

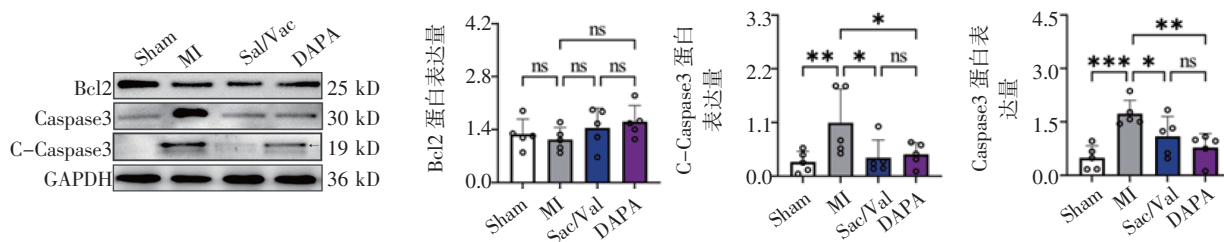
Fig 4 Masson staining of myocardial tissue in each group (12.5 \times)



注:4组间 Bcl2,Bax 和 Caspase3 mRNA 统计结果比较; * $P<0.05$, ns:无统计学意义;MI:心肌梗死;Sac/Val:沙库巴曲缬沙坦;DAPA:达格列净;Bcl-2:B-淋巴细胞瘤基因-2;Bax:B-淋巴细胞瘤基因-2 相关蛋白 X;Caspase3:半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3

图5 各实验组凋亡相关基因表达

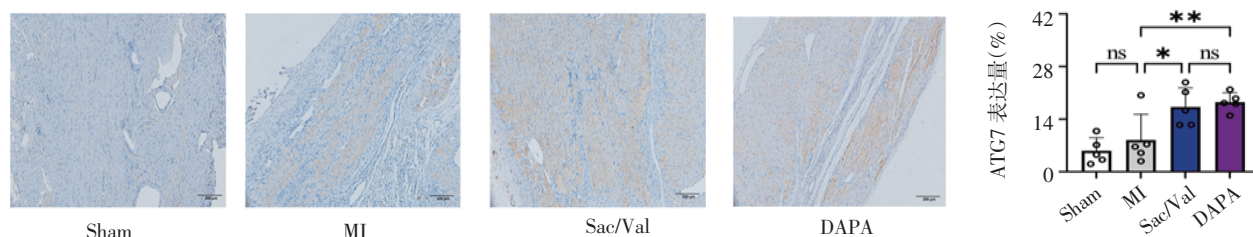
Fig 5 Expression of the genes related to apoptosis in each group



注:4组间 Bcl2,Caspase3 和 C-Caspase3 蛋白统计结果比较; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$, ns:无统计学意义;MI:心肌梗死;Sac/Val:沙库巴曲缬沙坦;DAPA:达格列净;Bcl2:B-淋巴细胞瘤基因 2;C-Caspase3:活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3;Caspase3:半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

图6 大鼠心肌组织凋亡相关蛋白表达情况

Fig 6 The expression of protein related to apoptosis in rats myocardial tissues



注:4组间 ATG7 免疫组化染色图片结果及 4 组间 ATG7 阳性面积百分比统计结果比较; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, ns:无统计学意义;MI:心肌梗死;Sac/Val:沙库巴曲缬沙坦;DAPA:达格列净;ATG7:自噬基因相关蛋白 7

图7 各组心肌 ATG7 免疫组化染色($\times 100$)

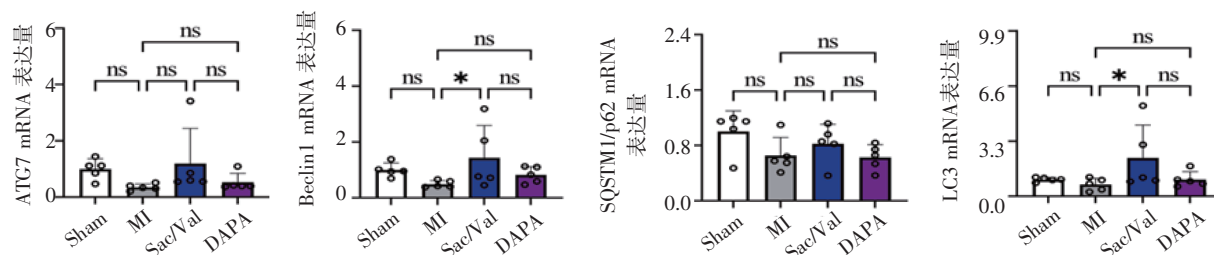
Fig 7 The immunohistochemical staining of ATG7 of myocardial tissue in each group ($\times 100$)

2.6 各组大鼠心肌凋亡 mRNA 及相关蛋白表达水平变化 在 mRNA 水平上,与 MI 组比较,Sham 组、Sac/Val 干预组及 DAPA 干预组 Bcl2 升高($F=3.30$, $P<0.05$);而 Bax 和 Caspase3 各组间差异无统计学意义,见图 5;在蛋白水平上,与 MI 组比较,Sham 组、Sac/Val 干预组及 DAPA 干预组 Caspase3($F=7.92$, $P<0.05$)、C-Caspase3($F=3.70$, $P<0.05$)表达降低,两种药物干预组之间,以上指标无统计学差异;Bcl2 在各组间无统计学差异,见图 6。

2.7 各组大鼠心肌自噬水平、ATG7 免疫组化、自噬相关 mRNA 及蛋白变化 ATG7 免疫组化染色显示,Sham 组和 MI 组 ATG7 表达水平较低,经过药物治疗后,Sac/Val 干预组和 DAPA 干预组表达增加($F=8.95$, $P<0.05$),两种药物干预组之间,无统计学差异,见图 7;在 mRNA 水平上,与 MI 组比较,Sac/Val 干预组及 DAPA 干预组,Beclin1、LC3 及 ATG7

比较,差异无统计学意义,见图8;在蛋白水平上,与Sham组和MI组比较,Sac/Val干预组及DAPA干预组,ATG7($F=8.08, P<0.05$)及Beclin1($F=5.80, P<0.05$)

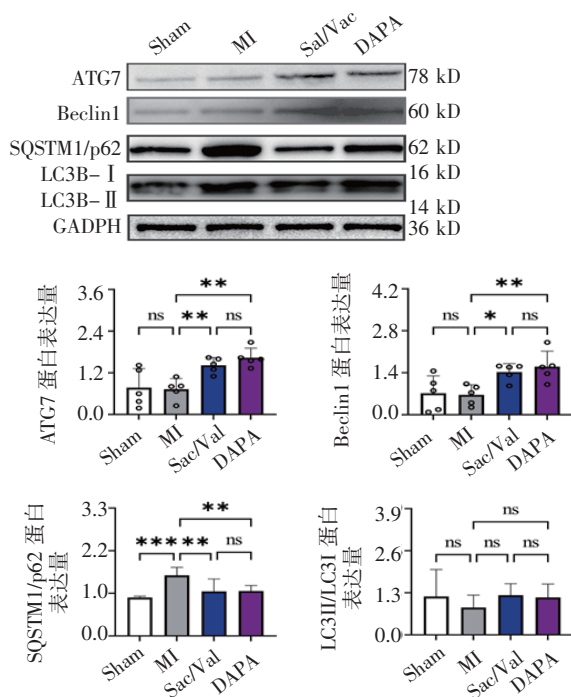
表达量升高,SQSTM1/p62表达降低($F=7.12, P<0.05$),以上指标在两种药物干预组之间,差异无统计学意义,LC3 II/I比值在各组间无统计学差异,见图9。



注:4组间ATG7、Beclin1、SQSTM1/p62和LC3 mRNA统计结果比较;* $P<0.05$, ns:无统计学意义;MI:心肌梗死;Sac/Val:沙库巴曲缬沙坦;DAPA:达格列净;ATG7:自噬基因相关蛋白7;Beclin1:自噬基因相关蛋白;SQSTM1/p62:死骨片1-泛素结合蛋白P62;LC3:微管相关蛋白1轻链3

图8 各实验组自噬相关基因表达比较

Fig 8 Comparison the expression of genes related to autophagy in each group



注:4组间ATG7、Beclin1、SQSTM1/p62和LC3II/LC3I蛋白统计结果比较;* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns:无统计学意义;MI:心肌梗死;Sac/Val:沙库巴曲缬沙坦;DAPA:达格列净;ATG7:自噬基因相关蛋白7;Beclin1:自噬相关蛋白1;SQSTM1/p62:泛素结合蛋白;LC3 II/I:微管相关蛋白1轻链3 II/I

图9 各实验组自噬相关蛋白表达比较

Fig 9 Comparison the expression of protein related to autophagy in each group

3 讨论

本实验主要针对DAPA或Sac/Val对AMI早期使用的疗效及安全性对比以及两药获益机制进行研究。因为目前没有明确的证据表明SGLT2i可以用于治疗AMI患者。本研究可以得出以下结论:DAPA或Sac/Val可以维持左心结构和功能,降低心

脏纤维化和逆转心室重构,降低心肌细胞凋亡和激活心肌细胞自噬水平;DAPA或Sac/Val均可以改善AMI后心脏功能,且两药无明显差异;和DAPA比较,Sac/Val明显影响血压。

本实验结果显示,AMI后,LVIDs明显增加,提示左心室扩大,心脏重构明显,DAPA或Sac/Val可以逆转左心重构。心脏功能有赖于结构的完整性,AMI后心力衰竭大鼠的LVEF下降,DAPA或Sac/Val可以阻止心脏功能的下降,减少AMI对心脏功能的损害。且两药在逆转心室重构和改善心脏功能方面疗效类似。有研究显示,Sac/Val在AMI后使用,可以逆转心室重构,更好地维持左心室形态,保护左心室泵血功能^[9]。通过病理实验发现,AMI后加用DAPA或Sac/Val后均可以减少梗死面积和纤维化区域,且两药之间差异不明显。

基于以上数据,笔者对相关分子进行研究,发现DAPA或Sac/Val对凋亡和自噬都有很好的改善作用。自噬和凋亡在心血管疾病中发挥重要作用^[4-6],AMI后凋亡水平明显增加^[7],是梗死中心和周围区域心肌细胞死亡的主要方式^[8]。本研究发现,MI后,Caspase3和C-Caspase3表达增加,抗凋亡蛋白Bcl2有降低趋势,经过DAPA或Sac/Val治疗后,Caspase3和C-Caspase3蛋白水平降低,Bcl2蛋白有上调趋势,表明DAPA或Sac/Val可以通过调控凋亡蛋白表达水平,减轻心肌细胞凋亡,维持心肌细胞的活性。研究发现,在AMI模型中过度的凋亡会促进心肌缺血损伤,下调Caspase-3可减少梗死面积,降低心肌细胞凋亡指数,改善心脏功能,促进Bcl2表达可抑制心肌内源性细胞凋亡,进一步保护AMI后的心脏功能^[9-10]。AMI时,自噬反应在缺氧心肌中适应

性激活,可以通过消化吸收错误折叠的蛋白质和受损的细胞器来降低心脏损伤,降低梗死面积和纤维化区域,维持心脏结构和功能的完整性^[11-12]。本研究发现,在病理(ATG7 免疫组化)、蛋白及 mRNA 水平上,DAPA 或 Sac/Val 治疗可 AMI 大鼠激活心肌细胞自噬,且两药在提高水平上无明显差异。DAPA 或 Sac/Val 均改善心功能的可能原因是:两种药物通过激活自噬,去除功能失调的细胞器,促使心肌细胞恢复^[13]。本研究发现,AMI 后心力衰竭常导致低血压,造成低心输出量综合征,而 Sac/Val 会进一步降低血压及影响器官灌注,而 DAPA 对血压影响较小。在临床应用中,出于用药安全性考虑,大部分患者在 AMI 后无法及时使用 Sac/Val,而另一部分患者也只能从小剂量开始使用(50mg,2 次/d),从而导致 Sac/Val 使用受限,此时可优先使用 DAPA,获得和 Sac/Val(靶剂量)一样的治疗效果,同时对血压的影响较小。

综上所述,DAPA 或 Sac/Val 可以降低心肌细胞凋亡和激活自噬,降低心脏纤维化和逆转心室重构,更好的维持左心室形态和泵血功能;DAPA 或 Sac/Val 应用于 AMI 大鼠后,使心功能改善明显,且两药无明显差异;和 DAPA 比较,Sac/Val 明显影响血压。本研究在动物实验上初步探索了 DAPA 或 Sac/Val 对 AMI 的改善作用,为 AMI 患者,尤其是合并低血压的 AMI 患者提供了一种治疗策略。

参考文献:

- [1] PFEFFER M A, CLAGGETT B, LEWIS E F, et al. Angiotensin receptor-neprilysin inhibition in acute myocardial infarction[J]. *N Engl J Med*, 2021, 385(20): 1845-1855.
- [2] VONLEWINSKI D, KOLESNIK E, TRIPOLT N J, et al. Empagliflozin in acute myocardial infarction: the EMMY trial[J]. *Eur Heart J*, 2022, 43(41): 4421-4432.
- [3] LU H I, TONG M S, CHEN K H, et al. Entresto therapy effectively protects heart and lung against transverse aortic constriction induced cardiopulmonary syndrome injury in rat[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(8): 2290-2305.
- [4] GUSTAFSSON A B, GOTTLIEB R A. Autophagy in ischemic heart disease[J]. *Circ Res*, 2009, 104(2): 150-158.
- [5] TAKEMURA G, MIYATA S, KAWASE Y, et al. Autophagic degeneration and death of cardiomyocytes in heart failure[J]. *Autophagy*, 2006, 2(3): 212-214.
- [6] YAN L, VATNER D E, KIM S J, et al. Autophagy in chronically ischemic myocardium[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(39): 13807-13812.
- [7] TAKEMURA G, FUJIWARA H. Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction[J]. *Pharmacol Ther*, 2004, 104(1): 1-16.
- [8] JUHASZ B, THIRUNAVUKKARASU M, PANT R, et al. Bromelain induces cardioprotection against ischemia-reperfusion injury through Akt/FOXO pathway in rat myocardium[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(3): H1365-H1370.
- [9] LIU Q. Lentivirus mediated interference of Caspase-3 expression ameliorates the heart function on rats with acute myocardial infarction[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(13): 1852-1858.
- [10] LUO K Q, LONG H B, XU B C. Reduced apoptosis after acute myocardial infarction by simvastatin[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 71(2): 735-740.
- [11] DENG R, JIANG K, CHEN F, et al. Novel cardioprotective mechanism for Empagliflozin in nondiabetic myocardial infarction with acute hyperglycemia[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 154: 113606.
- [12] TORRADO J, CAIN C, MAURO A G, et al. Sacubitril/Valsartan averts adverse post-infarction ventricular remodeling and preserves systolic function in rabbits[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 72(19): 2342-2356.
- [13] PACKER M. Autophagy-dependent and -independent modulation of oxidative and organellar stress in the diabetic heart by glucose-lowering drugs[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2020, 19(1): 62.

(2023-02-08 收稿)