

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.04.0350

论著

# 间歇性低氧通过 MEK/ERK 信号改善小鼠心肌梗死后 心功能恢复

丁心语, 王俊懿, 黄传, 万春晓

(天津医科大学总医院康复科, 天津 300052)

**摘要** 目的: 研究间歇性低氧(IH)对心肌梗死(MI)后 C57BL/6 小鼠心脏功能的影响及其机制。方法: 将 24 只小鼠随机划分为 4 组: 假手术组(SHAM,  $n=6$ )、假手术低氧组(SHAM-IH,  $n=6$ )、心肌梗死组(MI,  $n=6$ )和心肌梗死低氧组(MI-IH,  $n=6$ )。超声心动检测小鼠左心室射血分数(LVEF)和左心室缩短分数(LVFS)。Masson 染色检测心肌纤维化程度。Tunel 染色检测细胞凋亡。蛋白印迹检测丝裂原活化蛋白激酶激酶(MEK)蛋白及其磷酸化、细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)蛋白及其磷酸化和裂解半胱氨酸蛋白酶 3(cleaved caspase 3)蛋白的水平。体外实验用  $H_2O_2$  诱导 H9C2 细胞损伤以模拟氧化应激, 加入 MEK/ERK 抑制剂(U0126), 检测 MEK 和 ERK1/2 的蛋白及其磷酸化水平、cleaved caspase 3 蛋白水平。结果: (1) 干预 4 周后, 与 MI 组相比, MI-IH 组 LVEF、LVFS 明显增加( $t=-15.520, -15.080$ , 均  $P<0.001$ ), 心肌纤维化减少( $t=9.547, P<0.05$ ), MEK、ERK1/2 的磷酸化、cleaved caspase 3 水平均减少( $t=2.292, 3.267, 6.399$ , 均  $P<0.05$ ), 细胞凋亡减少( $t=4.341, P<0.001$ )。 (2) 与  $H_2O_2$  组相比,  $H_2O_2+U0126$  组 MEK、ERK1/2 的磷酸化减少, caspase 3 活化降低( $t=3.599, 9.692, 6.607$ , 均  $P<0.05$ )。结论: IH 通过 MEK/ERK 信号抑制心肌细胞凋亡, 从而促进 MI 小鼠心功能的恢复。

**关键词** 心肌梗死; 间歇性低氧; 细胞凋亡; 丝裂原活化蛋白激酶; 细胞外信号调节激酶

中图分类号 R54

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)04-0350-06

## Intermittent hypoxia improves cardiac function recovery after myocardial infarction in mice via MEK/ERK signaling

DING Xinyu, WANG Junyi, HUANG Chuan, WAN Chunxiao

(Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China)

**Abstract Objective:** To explore the effects and mechanisms of intermittent hypoxia (IH) on the cardiac function in C57BL/6 mice after myocardial infarction (MI). **Methods:** Twenty-four mice were classified randomly into four groups: sham group (SHAM, 6 mice), sham operation with IH treatment group (SHAM-IH, 6 mice), myocardial infarction group (MI, 6 mice) and myocardial infarction with IH treatment group (MI-IH, 6 mice). Echocardiography was used to detect left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular shortening fraction (LVFS) in mice. Masson staining was used to detect the degree of myocardial fibrosis. Tunel staining was used to detect cardiomyocytes apoptosis. Protein immunoblotting was performed to detect mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) protein and its phosphorylation (p-MEK) level, extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) protein and its phosphorylation (p-ERK1/2) level, and cleaved cysteine protease 3 (cleaved caspase 3) protein level. *In vitro* experiments, H9C2 cells were induced with  $H_2O_2$  to mimic oxidative stress, MEK, ERK1/2, p-MEK, p-ERK1/2, and cleaved caspase 3 protein levels were detected after treated with MEK/ERK inhibitor (U0126). **Results:** After 4 weeks of intervention, compared with the MI group, LVEF and LVFS were significantly increased ( $t=-15.520, -15.080$ , both  $P<0.001$ ), myocardial fibrosis ( $t=9.547, P<0.05$ ), p-MEK, p-ERK1/2 expression and cleaved caspase 3 ( $t=2.292, 3.267, 6.399$ , all  $P<0.05$ ) and Tunel-positive cells ( $t=4.341, P<0.001$ ) were significantly decreased in the MI-IH group. Compared to the  $H_2O_2$  group, the  $H_2O_2+U0126$  group had decreased protein levels of p-MEK, p-ERK1/2 and cleaved caspase 3 ( $t=3.599, 9.692, 6.607$ , all  $P<0.05$ ). **Conclusion:** IH intervention inhibits cardiomyocyte apoptosis through MEK/ERK signaling, thereby improving the recovery of cardiac function in mice after myocardial infarction.

**Key words** myocardial infarction; intermittent hypoxia; apoptosis; mitogen-activated protein kinase; extracellular signal-regulated kinase

基金项目 天津市医学重点学科(专科)建设项目(TJYXZDK-060B);

天津市卫健委科技项目青年项目(TJWJ2023QN008)

作者简介 丁心语(1999-),女,硕士在读,研究方向:心脏康复研究;

通信作者:万春晓, E-mail: cwan@tmu.edu.cn。

心肌梗死(myocardial infarction, MI)是中国居民致残和致死的主要心血管疾病之一<sup>[1]</sup>。尽管 MI 后患者的存活率显著增加,但是 MI 后患者的再住院率依旧很高,因此如何预防 MI 后并发症、改善患者

生活质量显得尤为重要。心脏康复作为一种常用的治疗方法,可以帮助患者恢复健康,并通过运动等训练手段改善患者心功能,已被美国心脏病学会推荐为 I A 级指南<sup>[2]</sup>。近年来,间歇性低氧(intermittent hypoxia, IH)在心血管疾病中得到了广泛研究,被证明有多种生物效应。本课题组前期研究发现 IH 干预可通过增加 MI 大鼠  $\delta$ -阿片类受体表达<sup>[3]</sup>,调控 MI 大鼠 AMP 活化蛋白激酶(AMPK) $\alpha$ 1/SIRT3 通路<sup>[4]</sup>,改善线粒体结构,调节心肌脂肪酸代谢,从而对心脏产生保护作用。

IH 在缺血-再灌注的心肌模型中具有调控细胞凋亡的作用<sup>[5-6]</sup>。心肌细胞损伤主要由心肌细胞的不可逆凋亡引起<sup>[7]</sup>。此外,细胞凋亡被认为是 MI 后心肌细胞丢失的主要来源,也是心室重塑和心力衰竭发展的重要因素<sup>[8-9]</sup>。Caspase 依赖的细胞凋亡已被证明在缺血性心肌损伤中发挥重要作用<sup>[10]</sup>,通过观察 caspase 家族的活跃程度,可以深入地了解细胞凋亡情况。越来越多的证据表明,细胞凋亡会导致严重的左心室功能障碍<sup>[11-12]</sup>。Z-VAD 是经典 caspase 抑制剂,Liao 等<sup>[13]</sup>研究发现,Z-VAD 下调了缺血-再灌注诱导的细胞凋亡,增加了心脏收缩功能的保护作用。因此,制定调节细胞凋亡的策略,对于预防 MI 后心功能障碍是必要的。

研究发现,丝裂原活化蛋白激酶激酶(MEK)/细胞外信号调节激酶(ERK)1/2 信号通路能调节心血管疾病的细胞凋亡过程<sup>[14]</sup>。在人结肠癌细胞中,抑制 MEK/ERK 通路可以缓解因轻度缺氧导致的细胞增殖过程<sup>[15]</sup>。此外,MEK/ERK 通路可以减轻缺氧诱导的 H9C2 细胞损伤<sup>[16]</sup>。目前,MI 后早期 IH 干预能否抑制 MEK/ERK 信号转导和 MI 后心肌细胞凋亡及其内在的机制尚不清楚。因此,本研究旨在通过体内、外研究,探讨 IH 对 MI 小鼠心肌组织的影响,进一步探讨细胞凋亡在 IH 影响心脏损伤中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 C57BL/6 成年雄性小鼠 24 只,8 周龄,体重 18~22 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,予(21±2)℃、(50±10)%的相对湿度下,12 h 的光照和黑暗循环中饲养,自由取水。本实验由天津医科大学总医院实验动物伦理委员会批准(伦理批准号:TMUaMEC2018037)。

1.1.2 试剂 MEK 抗体、p-MEK 抗体、ERK 抗体、p-ERK 抗体和 cleaved caspase 3 抗体购自美国 affinity 公司;GAPDH 抗体购自中国爱博泰克生物科技股份有限公司;Masson 试剂盒购自中国北京索莱宝

科技有限公司;Tunel 试剂盒购自中国塞维尔生物科技有限公司;DMEM、胎牛血清、链霉素购自美国 Gibco 公司;大鼠心肌细胞 H9C2 购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

1.1.2 仪器 小动物麻醉机购自中国广东海利集团有限公司;化学发光凝胶成像仪购自中国上海天能科技有限公司;荧光显微镜购自日本 OLYMP-PUS 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及 MI 造模 24 只雄性小鼠随机划分为 4 组,分别为假手术组(SHAM)、假手术低氧组(SHAM-IH)、心肌梗死组(MI)以及心肌梗死低氧组(MI-IH),每组 6 只。依据本课题组先前研究方案<sup>[17]</sup>,采用结扎左冠状动脉前降支构建梗死模型。异氟烷麻醉小鼠并固定,于第 3、4 肋间做一个斜切口,进行肌肉钝性分离后,充分暴露心脏,于左心耳下 2 mm 处结扎左冠状动脉前降支。SHAM 组和 SHAM-IH 组仅接受胸腔开放手术,未对左冠状动脉前降支进行结扎。模型构建成功后,所有小鼠休息 1 周。

1.2.2 低氧训练及干预方式 SHAM-IH 组和 MI-IH 组于造模 1 周后放于低压氧舱内,关闭舱门逐渐升高负压直至形成海拔 5 000 m、13%氧浓度状态。4 h/d,5 d/周<sup>[4,18]</sup>,其余两组放于常氧环境下,干预时间 4 h/d,5 d/周。

1.2.3 超声心动图 在干预前、干预 4 周后,分别对小鼠进行超声心动图检查,采用 M 型超声测量法测得左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、缩短分数(left ventricular shortening fraction, LVFS)。每次测量至少超过 5 个心动周期,每个周期至少拍摄 3~5 个图像来测量心功能参数。

1.2.4 心肌纤维化检测 4 周干预后,将小鼠注射戊巴比妥钠处死,将小鼠心脏组织完整取出,浸泡在 4%多聚甲醛中,进行固定 2 d 左右,在梯度酒精(75%、80%、95%、100%)中分别脱水 2 h,随后浸泡于二甲苯中使其透明化。用石蜡包埋组织,冷却。用自动切片机将包埋好的蜡块切片,每张厚度约为 5  $\mu$ m。根据试剂说明,将石蜡切片脱水后,用 Weigert 铁苏木素染色溶液染色 8 min、酸性乙醇分化液分化 10 s、试剂 C 蓝化液反蓝 4 min、丽春红洋红溶液染色 10 min、磷酸溶液清洗 1 min、苯胺蓝染色液染色 1 min。冲洗后脱水、透明、封片、镜下观察拍照。

1.2.5 心肌组织 Tunel 检测 心脏石蜡包埋后,放入不同的乙醇浓度(100%、90%、80%、70%)中脱蜡。按照 1:9 的比例将 PBS 溶液稀释蛋白酶 K,每个样

品滴加 100  $\mu\text{L}$  的蛋白酶 K 溶液。随后滴加试剂盒中的 Equilibration Buffer 溶液 50  $\mu\text{L}$  到每个样本,室温下孵育 15 min。加入 56  $\mu\text{L}$  标记液,在 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中孵育 1 h。洗涤样本后,滴加 DAPI 试剂 20  $\mu\text{L}$  于样本,室温放置 7 min。最后中性树脂封片,荧光显微镜下观察拍照。

**1.2.6 细胞培养及分组** 大鼠心肌细胞 H9C2 在添加 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 中培养,37 $^{\circ}\text{C}$  下在 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。在六孔板上培养 H9C2 细胞,按照实验要求并将其分为 3 组,即 Control 组(Con 组)、过氧化氢组( $\text{H}_2\text{O}_2$  组)、过氧化氢+MEK 抑制剂组( $\text{H}_2\text{O}_2$ +U0126 组)。Con 组不做任何处理, $\text{H}_2\text{O}_2$  组和  $\text{H}_2\text{O}_2$ +U0126 组首先用 200  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  处理心肌细胞,诱导氧化应激模型。后  $\text{H}_2\text{O}_2$ +U0126 组中加入 10  $\mu\text{mol}$  U0126 干预 16 h<sup>[9]</sup>。

**1.2.7 蛋白印迹检测** 用裂解液从组织和细胞中提取蛋白质,通过 BCA 测定蛋白浓度,根据分子量,用 10% 的浓缩胶和分离胶进行电泳,电泳 90 min,转膜 90 min,5% 牛血清白蛋白溶液室温封闭 1 h。添加稀释后的 ERK1/2(1:1 000)、MEK(1:1 000)、p-MEK(1:1 000)、p-ERK1/2(1:1 000)、cleaved caspase 3(1:1 000)、GAPDH(1:1 000) 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$  下孵育

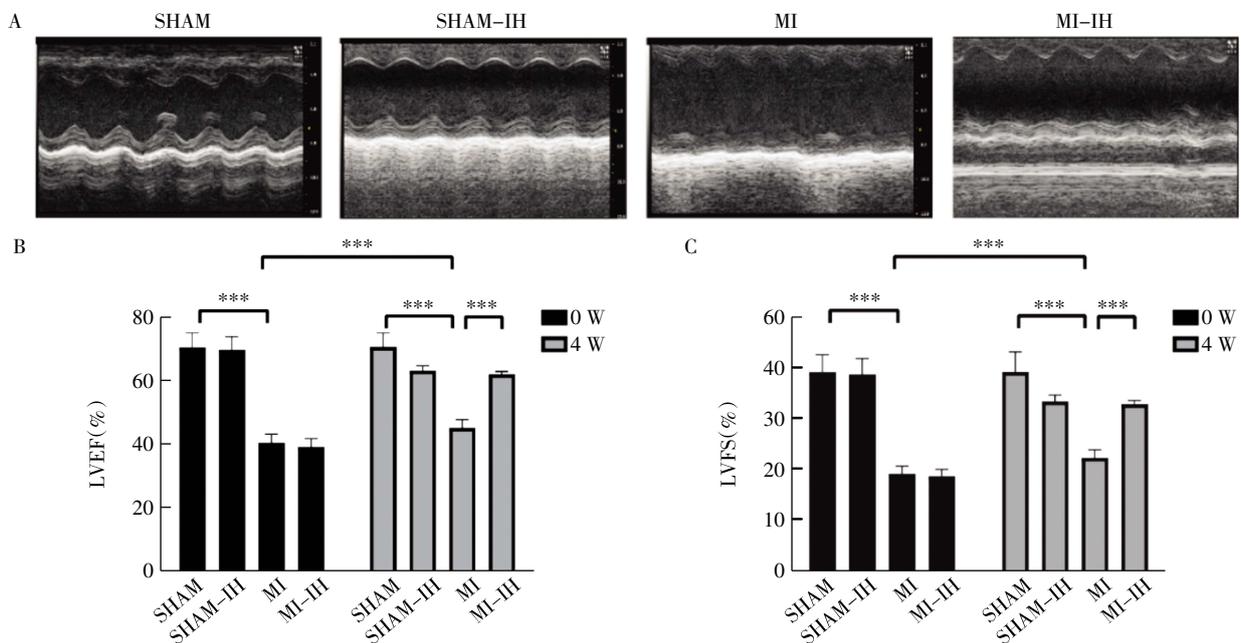
过夜,GAPDH 作为内参。添加二抗(1:2 000) 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h,电化学发光液检查特定的蛋白条带,Image J 软件测定灰度值。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 27.0 和 Graph Pad Prism 9.0 软件对所有数据进行处理,符合正态分布的资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,当数据满足正态分布和方差齐性,多组间比较采用单因素方差分析。方差不齐采用非参数检验。 $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 IH 对小鼠生存活动的影响** 4 周干预过程中 4 组小鼠均无死亡。但 MI 组小鼠活动较少,食欲较差,生长缓慢,MI-IH 组小鼠活动逐渐恢复正常。

**2.2 各组小鼠心脏超声结果比较** 超声心动结果显示,MI 组和 MI-IH 组左心室前壁运动幅度降低呈平坦状,提示左心室出现梗死。干预前,与 SHAM 组相比,MI 组和 MI-IH 组 LVEF 和 LVFS 均明显下降(均  $P<0.001$ );SHAM 组和 SHAM-IH 组间比较无差异,MI 组和 MI-IH 组间比较无差异(均  $P>0.05$ )。干预 4 周后,与 MI 组相比,MI-IH 组的 LVEF 和 LVFS 显著增加( $t=-15.520$ 、 $-15.080$ ,均  $P<0.001$ );比较干预前、后发现,干预后 MI-IH 组的 LVEF 和 LVFS 较干预前显著增加(均  $P<0.001$ ),见图 1。



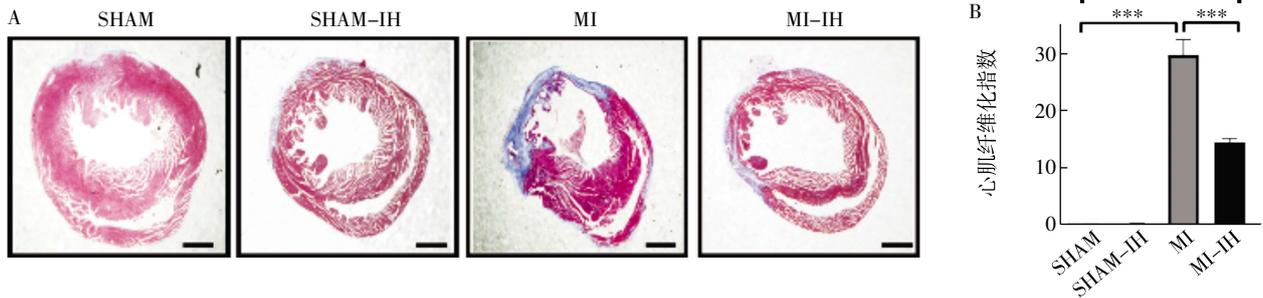
注:LVEF:左心室射血分数;LVFS:左心室射血分数;SHAM:假手术组;SHAM-IH组:假手术低氧组;MI:心肌梗死组;MI-IH:心肌梗死低氧组;A:心脏超声心动图;B:心脏 LVEF 水平;C:心脏 LVFS 水平;\*\*\* $P<0.001$

图 1 小鼠心脏 LVEF 及 LVFS 水平

Fig.1 LVEF and LVFS levels in mouse heart

**2.3 IH 对心肌组织纤维化的影响** Masson 染色结果显示,红色区域代表正常心肌范围,蓝色代表心肌纤维化范围。与 SHAM 组相比,MI 组及 MI-IH 组心肌纤维化明显增加( $t=-29.682$ 、 $-19.682$ ,均

$P<0.001$ );与 MI 组相比,MI-IH 组心肌纤维化显著降低,差异具有统计学意义( $t=9.547$ , $P<0.001$ );SHAM-IH 组和 SHAM 组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图 2。



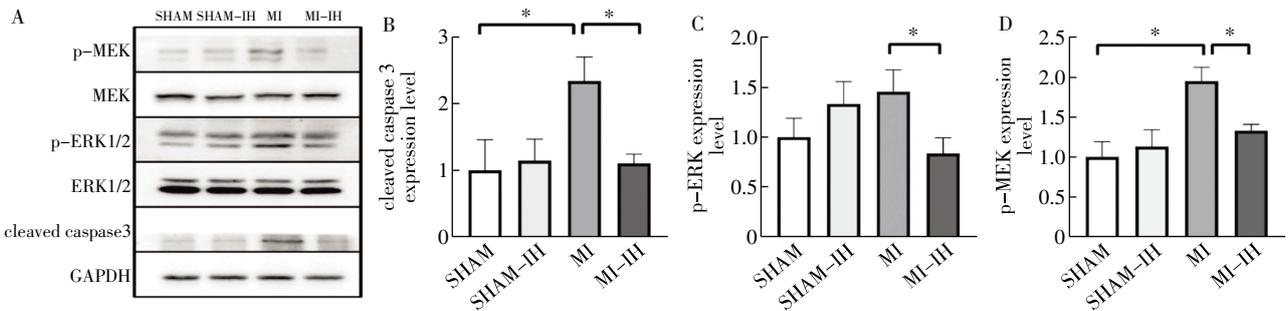
注: SHAM: 假手术组; SHAM-IH 组: 假手术低氧组; MI: 心肌梗死组; MI-IH: 心肌梗死低氧组; A: 心肌组织 Masson 染色 (比例尺=1 mm); B: 心肌纤维化指数比较; \*\*\* $P < 0.001$

图 2 心脏组织 Masson 染色

Fig.2 Masson staining of heart tissue

2.4 IH 对 MEK/ERK 通路的影响 心肌组织蛋白质免疫印迹结果显示, MI 组和 MI-IH 组 ERK1/2、MEK 蛋白与 SHAM 组相比没有差异 (均  $P > 0.05$ ); 与 SHAM 组相比, MI 的 p-MEK、cleaved caspase 3 蛋白

表达增加 ( $t = -3.729, -4.595$ , 均  $P < 0.05$ ); 与 MI 组相比, MI-IH 组 p-ERK1/2、p-MEK、cleaved caspase 3 蛋白表达降低 ( $t = 2.292, 3.267, 6.399$ , 均  $P < 0.05$ ), 见图 3。



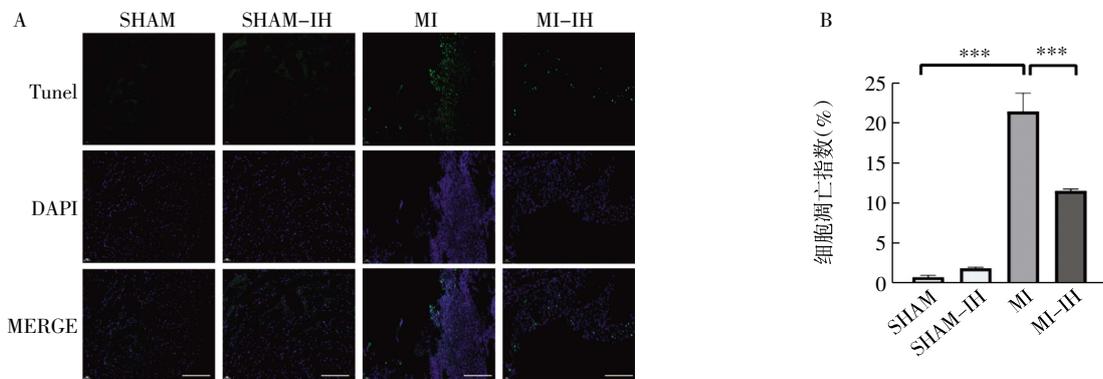
注: MEK: 丝裂原活化蛋白激酶激酶; p-MEK: 磷酸化丝裂原活化蛋白激酶激酶; ERK1/2: 细胞外信号调节激酶; p-ERK1/2: 磷酸化细胞外信号调节激酶; cleaved caspase 3: 裂解半胱氨酸蛋白酶 3; SHAM: 假手术组; SHAM-IH 组: 假手术低氧组; MI: 心肌梗死组; MI-IH: 心肌梗死低氧组; A: 蛋白印迹图; B: cleaved caspase 3 表达水平; C: p-ERK 表达水平; D: p-MEK 表达水平; \* $P < 0.05$

图 3 蛋白质免疫印迹检测 p-MEK、p-ERK1/2、cleaved caspase 3 蛋白表达

Fig.3 Expression of p-MEK, p-ERK1/2 and cleaved caspase 3 detected by Western blotting

2.5 IH 对细胞凋亡的影响 心肌组织 TUNEL 染色结果显示, SHAM 组和 SHAM-IH 组间的细胞凋亡水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与 SHAM 组相

比, MI 组凋亡阳性细胞数明显增多 ( $t = -8.997, P < 0.001$ )。与 MI 组相比, MI-IH 组凋亡阳性细胞数明显减少 ( $t = 4.341, P < 0.001$ ), 见图 4。



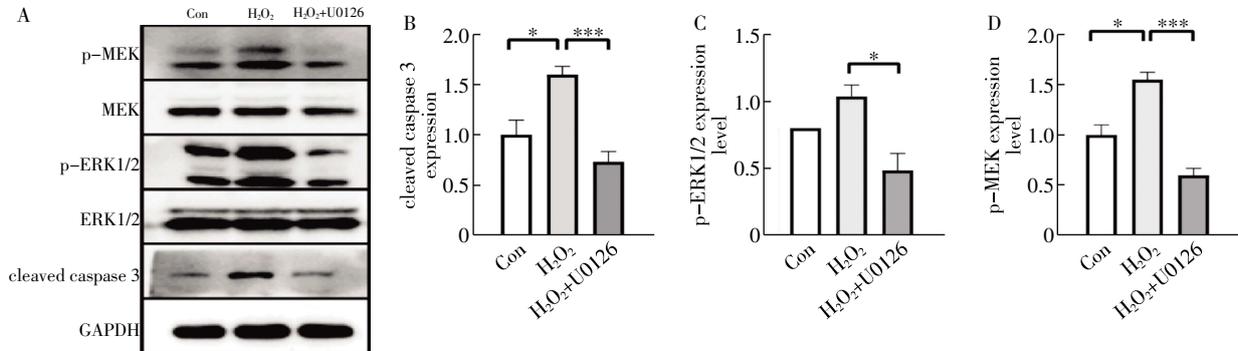
注: DAPI: 4,6-联脒-2-苯基吡啶; SHAM: 假手术组; SHAM-IH 组: 假手术低氧组; MI: 心肌梗死组; MI-IH: 心肌梗死低氧组; A: TUNEL 染色图 (比例尺=200  $\mu\text{m}$ ); B: 细胞凋亡水平; \*\*\* $P < 0.001$

图 4 心脏组织 TUNEL 染色

Fig.4 TUNEL staining of heart tissue

2.6 抑制 MEK/ERK 对 H9C2 细胞凋亡的影响 蛋白质印迹结果显示:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+U0126 组的 ERK1/2、MEK 蛋白与 Con 组相比,差异无统计学意义(均  $P>0.05$ );与 Con 组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组 p-MEK、

cleaved caspase 3 蛋白表达明显增加( $t=-4.489$ 、 $-3.606$ , 均  $P<0.05$ );与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+U0126 组的 p-ERK1/2、p-MEK、cleaved caspase 3 蛋白表达明显降低( $t=3.599$ 、 $9.692$ 、 $6.607$ , 均  $P<0.05$ ),见图 5。



注:MEK:丝裂原活化蛋白激酶激酶;p-MEK:磷酸化丝裂原活化蛋白激酶激酶;ERK1/2:细胞外信号调节激酶;p-ERK1/2:磷酸化细胞外信号调节激酶;cleaved caspase 3:裂解半胱氨酸蛋白酶 3;Con:对照组;H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:过氧化氢组;H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+U0126:过氧化氢抑制剂组;A:蛋白免疫印迹图;B:cleaved caspase 3 表达水平;C:p-ERK 表达水平;D:p-MEK 表达水平;\* $P<0.05$ ,\*\*\* $P<0.001$

图 5 蛋白质免疫印迹检测 p-MEK、p-ERK1/2、cleaved caspase 3 蛋白表达

Fig.5 Expression of p-MEK, p-ERK1/2 and cleaved caspase 3 detected by Western blotting

### 3 讨论

#### 3.1 IH 干预改善 MI 小鼠的心功能及心肌纤维化

MI 是由于动脉内壁斑块生成,心肌缺血缺氧产生的血管损伤、炎症等一系列反应的一种心血管疾病<sup>[20]</sup>。MI 后的心肌胶原持续纤维化会严重损害心脏功能,最终发展为心力衰竭。研究表明,间歇性低氧可以减少 MI 面积,缓解心肌纤维化,增强运动能力<sup>[21]</sup>。在本研究中同样发现 MI 组心肌纤维化程度明显高于 Sham 组,而 IH 干预后,心肌纤维化程度明显降低,提示 IH 可改善心肌纤维化。

MI 后胶原纤维增多导致的纤维化增多会影响心脏的收缩功能。LVEF 是评估 MI 后左室收缩功能的重要指标,如 LVEF<40%可预测急性 MI 的死亡率<sup>[22-23]</sup>。有研究证明 IH 作为一种无创的干预方式,可以改善心肌组织的舒缩功能<sup>[24]</sup>。为了探究 IH 对心脏功能的积极作用,本研究采用超声观察心脏功能,发现 MI-IH 组与 MI 组相比,LVEF、LVFS 的升高具有统计学意义,提示 IH 干预 4 周可显著改善 MI 小鼠的左室收缩功能。

3.2 IH 干预抑制 MI 小鼠的细胞凋亡 MI 后心肌长期缺血缺氧会诱导细胞凋亡,而细胞凋亡则会影响心脏功能。在临床上,由于心肌细胞丢失是患者死亡率的主要决定因素,因此减少细胞凋亡是拯救心血管疾病的关键因素<sup>[25]</sup>。Caspases 家族是细胞凋亡的启动者<sup>[26]</sup>,其中 caspase3 是细胞凋亡的主要蛋白酶之一。观察 caspase 3 活化水平可以反映细胞凋亡水平。本研究采用 TUNEL 染色和蛋白免疫印迹检

测细胞凋亡水平,MI 后心肌细胞凋亡蛋白 caspase 3 活化增多,TUNEL 阳性凋亡细胞数增加,而在 IH 干预 4 周后 caspase 3 活化明显减少,TUNEL 阳性凋亡细胞数降低。这些变化表明 IH 干预可以抑制梗死心脏的细胞凋亡水平,从而改善心脏结构和功能。

3.3 IH 干预通过 MEK/ERK 通路改善抑制细胞凋亡 本课题组前期研究已证实,一定参数的 IH 对 MI 心脏的保护作用<sup>[3-4]</sup>,可以减少心肌纤维化,改善心功能。研究表明,MEK/ERK 通路在丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路中扮演着至关重要的角色,它们可以调控细胞增殖、分化、凋亡等不同的生理过程<sup>[27]</sup>。而细胞凋亡是由 MAPK 信号通路介导的最显著的表型之一。研究表明,RGS5 基因敲除小鼠 MI 后出现明显细胞凋亡,可能因为部分激活 MAPK 信号通路<sup>[28]</sup>。M1 巨噬细胞衍生的细胞外囊泡激活 MEK/ERK 通路,增加了 MI 区域的凋亡细胞,降低了血管生长因子的表达,抑制 MI 后的血管生成和心肌再生<sup>[29]</sup>。橄榄苦苷通过抑制 MEK 磷酸化,显著抑制缺血再灌注大鼠的 caspase 3 的表达<sup>[30]</sup>。上述研究提示抑制 MEK/ERK 通路可以抑制细胞凋亡。蛋白印迹结果显示,与 MI 组相比,MI-IH 组 MEK、ERK 磷酸化蛋白、cleaved caspase 3 蛋白表达显著减少。但是 MEK、ERK 总蛋白水平未有统计学差异,表明 IH 通过下调 MEK、ERK 的表达,抑制细胞凋亡。U0126 明显抑制了 MEK、ERK 的活化状态。在体外实验中,发现 MEK/ERK 抑制剂的使用可明显减少受损心肌细胞的 caspase 3 活化。这也证实了抑

制 MEK/ERK 信号转导的激活会抑制细胞凋亡,从而加快 MI 的恢复。

综上所述,本研究通过体外和体内实验,发现小鼠 MI 后采用 IH 干预通过抑制心肌 MEK、ERK1/2 蛋白磷酸化,抑制细胞凋亡,改善心肌纤维化,从而产生心肌保护作用。本研究有望为临床 MI 后患者的心脏康复提供理论基础与分子机制。但 MEK/ERK 所调控的表型众多,充分认识 MEK/ERK 还需要进一步探索。

#### 参考文献:

- [1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2022 概要[J]. 中国循环杂志, 2023, 38(6): 583-612.
- [2] BOZKURT B, FONAROW G C, GOLDBERG L R, et al. Cardiac rehabilitation for patients with heart failure: JACC expert panel[J]. J Am Coll Cardiol, 2021, 77(11): 1454-1469.
- [3] 张嘉玮, 陈英, 邓伟丽, 等. 间歇性低氧通过  $\delta$ -阿片类受体表达保护心肌梗死大鼠心肌的研究[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2020, 35(7): 782-793.
- [4] 党小红, 黄传, 万春晓. 间歇性低氧干预对心肌梗死大鼠 AMP-K $\alpha$ 1/SIRT3 通路及心肌能量代谢的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2023, 45(1): 12-17.
- [5] CHANG J C, LIEN C F, LEE W S, et al. Intermittent hypoxia prevents myocardial mitochondrial Ca(2+) overload and cell death during ischemia/reperfusion: the role of reactive oxygen species[J]. Cells, 2019, 8(6): 564-580.
- [6] 孟祥艳, 于海龙, 郭敏, 等. 间歇低压低氧预处理对心肌缺血/再灌注损伤及 ZFP580 表达的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2014, 30(5): 396-400.
- [7] WHITE H D, THYGESEN K, ALPERT J S, et al. Clinical implications of the third universal definition of myocardial infarction[J]. Heart, 2014, 100(5): 424-32.
- [8] MINICUCCI M F, AZEVEDO P S, POLEGATO B F, et al. Heart failure after myocardial infarction: clinical implications and treatment[J]. Clin Cardiol, 2011, 34(7): 410-414.
- [9] FENG J, ZHAN J, MA S. LRG1 promotes hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis and autophagy by regulating hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 8897-8907.
- [10] WANG X, GUO Z, DING Z, et al. Inflammation, autophagy, and apoptosis after myocardial infarction[J]. J Am Heart Assoc, 2018, 7(9): e008024.
- [11] HOU L, GUO J, XU F, et al. Cardiomyocyte dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 attenuates left-ventricular remodeling after acute myocardial infarction: involvement in oxidative stress and apoptosis[J]. Basic Res Cardiol, 2018, 113(4): 28-40.
- [12] LIU C Y, ZHANG Y H, LI R B, et al. LncRNA CAIF inhibits autophagy and attenuates myocardial infarction by blocking p53-mediated myocardial transcription[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 29-41.
- [13] LIAO S, LUO Y, CHUNCHAI T, et al. An apoptosis inhibitor suppresses microglial and astrocytic activation after cardiac ischemia/reperfusion injury[J]. Inflamm Res, 2022, 71(7-8): 861-872.
- [14] YE H K, ZHANG H H, TAN Z M. MiR-328 inhibits cell apoptosis and improves cardiac function in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury through MEK-ERK signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(6): 3315-3321.
- [15] MIYAMOTO L, YAGI Y, HATANO A, et al. Spontaneously hyperactive MEK-ERK pathway mediates paradoxical facilitation of cell proliferation in mild hypoxia[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1850(4): 640-646.
- [16] YUAN L, YU L, ZHANG J, et al. Long non-coding RNA H19 protects H9c2 cells against hypoxia-induced injury by activating the PI3K/AKT and ERK/p38 pathways[J]. Mol Med Rep, 2020, 21(4): 1709-1716.
- [17] GAO E, LEI Y H, SHANG X, et al. A novel and efficient model of coronary artery ligation and myocardial infarction in the mouse[J]. Circ Res, 2010, 107(12): 1445-1453.
- [18] BI Y, WANG G, LIU X, et al. Low-after-high glucose down-regulated Cx43 in H9c2 cells by autophagy activation via cross-regulation by the PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK(1/2) signal pathways[J]. Endocrine, 2017, 56(2): 336-345.
- [19] ZHENG H, SU Y, ZHU C, et al. An addition of U0126 protecting heart grafts from prolonged cold ischemia-reperfusion injury in heart transplantation: a new preservation strategy[J]. Transplantation, 2021, 105(2): 308-317.
- [20] THYGESEN K, ALPERT J S, JAFFE A S, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018)[J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 72(18): 2231-2264.
- [21] XU W Q, YU Z, XIE Y, et al. Therapeutic effect of intermittent hypobaric hypoxia on myocardial infarction in rats[J]. Basic Res Cardiol, 2011, 106(3): 329-342.
- [22] KLAEBOE L G, EDVARDSEN T. Echocardiographic assessment of left ventricular systolic function[J]. J Echocardiogr, 2019, 17(1): 10-16.
- [23] POTTER E, MARWICK T H. Assessment of left ventricular function by echocardiography: the case for routinely adding global longitudinal strain to ejection fraction[J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2018, 11(2 Pt 1): 260-274.
- [24] AGUILAR M, GONZÁLEZ-CANDIA A, RODRÍGUEZ J, et al. Mechanisms of cardiovascular protection associated with intermittent hypobaric hypoxia exposure in a rat model: role of oxidative stress[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2): 366-371.
- [25] XIAO Y, ZHAO J, TUAZON J P, et al. MicroRNA-133a and myocardial infarction[J]. Cell Transplant, 2019, 28(7): 831-838.
- [26] KUMAR S, DORSTYN L, LIM Y. The role of caspases as executioners of apoptosis[J]. Biochem Soc Trans, 2022, 50(1): 33-45.
- [27] CAGNOL S, CHAMBARDE J C. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death—apoptosis, autophagy and senescence[J]. FEBS J, 2010, 277(1): 2-21.
- [28] DING H S, HUANG Y, CHEN Z, et al. Regulator of G-protein signalling 5 deficiency impairs ventricular remodelling after myocardial infarction by promoting NF- $\kappa$ B and MAPK signalling in mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 499(2): 143-149.
- [29] CHEN B, LUO L, WEI X, et al. M1 bone marrow-derived macrophage-derived extracellular vesicles inhibit angiogenesis and myocardial regeneration following myocardial infarction via the MALAT1/microRNA-25-3p/CDC42 axis[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 9959746.
- [30] JIN H X, ZHANG Y H, GUO R N, et al. Inhibition of MEK/ERK/STAT3 signaling in oleuropein treatment inhibits myocardial ischemia/reperfusion[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(2): 1034-1043.