

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.20.003

丹参酚酸 B 通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路促进自噬减轻大鼠心肌纤维化的研究 *

杜 璿 石开虎[△] 赵 扬 胡定辉 李 航 刘尊涛

(南京中医药大学附属中西医结合医院 心胸外科 江苏 南京 210028)

摘要 目的:研究丹参酚酸 B(SA-B)能否通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路促进自噬,从而减轻大鼠心肌纤维化。**方法:**选用 SD 大鼠 40 只,完全随机化分为对照组、模型组、低剂量 SA-B 治疗组和高剂量 SA-B 治疗组,采用皮下注射异丙肾上腺素(ISO)构建大鼠心肌纤维化模型。低、高剂量 SA-B 治疗组在造模同时灌喂丹参酚酸 B 水溶液,对照组和模型组分别灌胃等体积 0.9%生理盐水。测定心重指数(HW/BW)和左心室重指数(LVW/BW);ELISA 法测定心肌中 I 型、III 型胶原水平;Western blot 检测自噬相关蛋白 PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、Beclin1、LC3-II 水平;大鼠心肌 HE 染色评估心肌纤维化程度。**结果:**与对照组比较,模型组中大鼠的心重指数、左心室重指数和心肌中 I 型、III 型胶原的水平升高($P<0.05$),HE 染色结果提示心肌组织发生明显的纤维化。模型组大鼠心肌细胞中的自噬相关蛋白 PI3K、AKT、p-AKT、mTOR 表达升高,Beclin1、LC3-II 表达较对照组明显降低($P<0.05$)。SA-B 组中心重指数、左心室重指数和心肌中 I 型、III 型胶原的水平明显降低,HE 染色未见明显纤维化病灶,其自噬相关蛋白 PI3K、AKT、p-AKT、mTOR 表达降低,Beclin1、LC3-II 表达较模型组明显升高($P<0.05$)。**结论:**丹参酚酸 B 能够抑制 ISO 所致的大鼠心肌纤维化,且具有剂量依赖性,其机制与抑制 PI3K/AKT/mTOR 传导通路促进细胞自噬密切相关。

关键词:丹参酚酸 B;自噬;心肌纤维化;PI3K/AKT/mTOR;Beclin1;LC3-II;Western blot

中图分类号:R-33;R54;R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)20-3812-06

A Study of Reducing Rat Myocardial Fibrosis by Promoting the Autophagy Resulting from the Inhibition of PI3K/AKT/mTOR Pathway by Salvianolic acid B (SA-B)*

DU Jin, SHI Kai-hu[△], ZHAO Yang, HU Ding-hui, LI Hang, LIU Zun-tao

(Department of Cardiothoracic Surgery, The Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, 210028, China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether the salvianolic acid B (SA-B) could inhibit the PI3K/AKT/mTOR pathway to promote the autophagy, thereby reducing rat myocardial fibrosis. **Methods:** A total of 40 SD rats underwent the complete randomization and were assigned to four groups: the control group, model group, low-dose and high-dose SA-B group. The rat myocardial fibrosis model was established by subcutaneous injection of isoproterenol (ISO). For treatment groups with low- and high-dose SA-B, the modeling was performed while feeding rats with SA-B aqueous solution was conducted, and 0.9% of normal saline with the same volume was administrated in the control and model groups. The heart weight and body weight index (HW/BW) and left ventricular weight and body weight index (LVW/BW) were measured; the ELISA method was used to detect the type I and III collagen levels in myocardia; the levels of autophagy-related proteins, PI3K, AKT, p-AKT, mTOR, Beclin1, LC3-II were detected by using Western blot; the HE staining in rat myocardia was used for the assessment on the degree of myocardial fibrosis. **Results:** As compared with the control group, it showed an increase for the model group in HW/BW, LVW/BW and type I and III collagen levels in myocardia ($P<0.05$), and the results of HE staining suggested the significant fibrosis for myocardia. In the model group, it had an increase in expression levels of autophagy-related proteins, PI3K, AKT, p-AKT, mTOR and a significant decrease in expression levels of Beclin1 and LC3-II as compared with the control group ($P<0.05$). In the SA-B group, it showed an obvious decrease in HW/BW, LVW/BW and type I and III collagen levels in myocardia, and the HE staining suggested no significant fibrosis, and it showed a decrease for expression levels of autophagy-related proteins, PI3K, AKT, p-AKT, mTOR and significant increase for expression levels of Beclin1 and LC3-II as compared with the model group ($P<0.05$). **Conclusions:** The SA-B could inhibit rat myocardial fibrosis caused by ISO in a dose-dependent manner,

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81570295)

作者简介:杜璿(1981-),临床医学博士,主治医师,主要研究方向:心血管外科,普胸外科,

电话:13851670700, E-mail:dujin810106@163.com

[△] 通讯作者:石开虎,博士,主任医师,博士生导师,主要研究方向:终末期心脏病的外科治疗以及心肌纤维化的相关研究,

E-mail:aytcs@vip.163.com

(收稿日期:2019-03-13 接受日期:2019-04-09)

and its mechanism was closely associated with autophagy promoting by the inhibition of PI3K/AKT/mTOR pathway.

Key words: Salvianolic acid B; Autophagy; Myocardial fibrosis; PI3K/AKT/ mTOR; Beclin1; LC3-II; Western blot

Chinese Library Classification(CLC):R-33; R54; R285.5 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)20-3812-06

前言

心肌纤维化所导致的心力衰竭、心律失常和心源性猝死等严重疾病已逐渐成为心血管疾病死亡的主要原因,近年来针对预防心肌纤维化的相关药物研究日益增多。心脏是一个具有高度可塑性的器官,配备了多个复杂的生物系统以适应环境变化,在长期压力负荷过重的情况下,能够产生较缓慢但有效的代偿功能,通过心肌形态的重塑包括心肌总量增加、收缩力加强等以适应环境的变化,使心脏保证强有力的搏动,维持正常的血液循环^[1]。但这种代偿功能也有其不利之处,会明显促进心肌纤维化的发生,包括心肌细胞发生纤维肥大、细胞间胶原纤维发生积聚、纤维浓度及容积分数显著增加等。与此同时,肥大的心肌细胞需要更多的能量供应及耗氧,而冠状动脉的供血量却没有相应增加,造成相对供血不足导致心肌缺血。心肌纤维肥大会进一步导致心脏的结构改变,如心室的逐渐扩张、心脏收缩功能减弱、心功能受损,并可能进一步发展成为多种心脏疾病^[2]。细胞自噬是继细胞凋亡以来的另一项生命科学研究热点,已被证明与多种疾病的发生及进展关系密切^[3,4]。细胞自噬是一种发生在真核细胞内的高度保守的程序性降解机制,是一种重要的生物学现象,其本质是应对各种外界压力而产生的胞内代谢过程,通过自噬体包裹细胞内受损、衰老或变性的蛋白质,然后转入溶酶体中进行消化分解,从而为细胞代谢提供能量及更新细胞。正常水平的自噬为人体所必须,通过促进细胞的新陈代谢从而维持细胞内环境的稳定,但当外部环境失衡或内部代谢异常的情况下,细胞的自噬水平可能被上调或下调,过度及不足的细胞自噬均有可能导致疾病的发生。心肌细胞自噬对于维持心肌细胞正常代谢、保持心脏结构稳定、维护正常的心功能有重要作用,自噬水平的异常与多种心脏疾病的发生发展相关,包括心肌缺血再灌注损伤、心肌梗死、心肌肥厚、心脏扩张及心力衰竭等^[5]。心肌细胞自噬的主要调控机制为PI3K-AKT-mTOR 信号通路^[6]及 AMPK-TSC1/2-mTOR 信号通路^[7]。近期研究发现,当心脏压力负荷过重时心肌蛋白合成增加,心肌纤维化和心肌肥厚加重,均伴随着心肌细胞自噬活性的降低^[8]。

丹参酚酸 B 分子式为 $C_{36}H_{30}O_{16}$, 相对分子质量为 718.62, 由唇形科植物丹参的根及根茎提取而得, 不仅具有活血化瘀、安神补气等功效, 还同时具有抗纤维化、抑制肿瘤、消炎抗菌、抗氧化及减轻缺血再灌注损伤等作用, 被广泛用于治疗心绞痛、心肌梗死、肺及肝脏纤维化等疾病。近年来有研究显示, 丹参酚酸 B 能够通过多种信号通路影响心肌细胞代谢水平, 改变 PI3K-AKT-mTOR 通路中多种激酶的磷酸化水平, 调节心肌细胞自噬水平, 从而对发生急性心肌梗死的心肌细胞起到保护作用^[9,10]。本研究采用皮下注射异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)构建大鼠心肌纤维化模型, 初步探讨丹参酚酸 B 能否通过调节 PI3K-AKT-mTOR 信号通路来改变心肌细胞自噬水平, 进

而发挥抗心肌纤维化作用, 以此进一步阐明丹参酚酸 B 影响自噬的药理机制, 为临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 雄性大鼠 40 只, 体质量(220 ± 20)g, 由江苏省中医药研究院实验动物中心提供。所有大鼠均以标准颗粒饲料喂养, 自由饮水, 饲养环境为温度(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为(55 ± 10)%。

1.2 药品与试剂

丹参酚酸 B (纯度 95%) 购自 Sigma 公司; 异丙肾上腺素(ISO) 购自美国 Sigma 公司; PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、Beclin-1 及 LC3-II 抗体均购自 Cell Signaling Technology 公司; I 型胶原、III 型胶原 ELISA 试剂盒购自美国 BD 公司。

1.3 动物分组及大鼠心肌纤维化模型的建立

SD 大鼠随机分为 4 组(每组 10 只); 完全随机化分为对照组、模型组、低剂量 SA-B 治疗组和高剂量 SA-B 治疗组。模型组及低、高剂量 SA-B 治疗组为注射异丙肾上腺素(ISO)小鼠, 每天背部皮下注射 ISO 2.5 mg/kg(首日 5 mg/kg), 连续 21 d, 建立大鼠心肌纤维化模型, 对照组皮下注射同等量生理盐水。低、高剂量 SA-B 治疗组在造模同时灌喂 SA-B 水溶液, 低剂量治疗组灌胃量为 15 mg/kg, 高剂量治疗组灌胃量为 30 mg/kg, 灌胃体积均为 10 mL/kg, 连续 21 d, 对照组和模型组分别灌胃等体积 0.9% 生理盐水。最后一次灌胃结束后, 禁食 24 小时, 处死动物, 常规取心脏备用。

1.4 心脏质量参数及心肌纤维化相关指标检测

大鼠在末次给药 24 h 后称重(BW), 然后以 10% 水合氯醛(0.3 mL/kg)麻醉。手术打开胸腔摘取心脏, 移除主动脉、上下腔静脉、肺动静脉及心外膜脂肪组织, 清洗后使用滤纸吸干水分, 称全心质量(HW)。由心脏中切取左心室, 称重获得左心室质量(LVW), 进一步计算获得心重指数(HW/BW, mg/g)和左心室重指数(LVW/BW, mg/g)。取少量左心室心肌组织, 在冰浴下制成 5%、1% 组织匀浆, 在 4°C 下以 4000 r/min 速度离心机离心 15 min。心肌组织匀浆按照 ELISA 试剂盒方法, 用酶标仪测定心肌中 I 型、III 型胶原水平。

1.5 Western-Blot 测定自噬相关蛋白表达水平

心肌组织匀浆中加入裂解液后提取蛋白, 采用 BCA 蛋白定量法检测蛋白含量, 加热变性后 SDS-PAGE 电泳分离, PVDF 转膜。5% 牛血清蛋白封闭 2 h, 顺序加入一抗及二抗, 洗膜后 ECL 发光液曝光, 显色后使用凝胶成像系统进行灰度分析。

1.6 大鼠心肌苏木精-伊红染色(HE 染色)

每组随机选取大鼠 2 只, 麻醉后手术切取心脏, 4% 多聚甲醛固定 24 h, 常规石蜡包埋后切片, 苏木精-伊红染色 15~20 min, 95% 的乙醇润洗 5 s, 伊红染色 20 min, 着色满意后光学显微镜下观察并拍照。对切片进行心脏间质纤维化的分析与评价, 阳性结果判定标准: 细胞核被苏木精染成鲜明的蓝色, 细

胞浆被伊红染成深浅不同的粉红色至桃红色,胶原纤维呈淡粉红色。

1.7 统计学分析

采用 SPASS 17.0 软件包进行统计学分析,所有计量资料用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组实验大鼠的一般情况

各组大鼠均顺利存活至最后一次 SA-B 灌胃治疗结束后(21 d),无实验中途死亡,处死前大鼠一般情况良好,精神状

态、进食情况及活动情况无明显异常。

2.2 丹参酚酸 B 对心肌纤维化大鼠心脏质量参数及心肌中 I 型、III 型胶原水平的影响

与对照组相比,模型组大鼠心脏的心重指数(HW/BW)、左心室重指数(LVW/BW)明显升高($P<0.05$),同时心肌组织中 I、III 型胶原蛋白水平也明显升高($P<0.01$);与模型组比较,低、高剂量 SA-B 组的心重指数(HW/BW)、左心室重指数(LVW/BW)与 I、III 型胶原蛋白水平均呈下降趋势,差异显著($P<0.05, 0.01$),其中高剂量组的下降程度更为明显,具有剂量依赖性, ($P<0.05$),结果见表 1。

表 1 丹参酚酸 B 对异丙肾上腺素诱导的心肌纤维化大鼠心重指数(HW/BW)、左心室重指数(LVW/BW)及心肌中 I、III 型胶原水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of Lithospermate-B on the heart weight and body weight index (HW/BW) and left ventricular weight and body weight index (LVW/BW), concentration of collagens I and III in myocardium of myocardial fibrosis rats by ISO($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Groups	(HW/BW)/(mg·g ⁻¹)	(LVW/BW)/(mg·g ⁻¹)	Type I collagen /(ng·L ⁻¹)	Type III collagen /(ng·L ⁻¹)
Control group	2.63 $\pm$ 0.31	2.01 $\pm$ 0.28	497.09 $\pm$ 70.06	220.39 $\pm$ 50.86
Model group	3.40 $\pm$ 0.22*	2.41 $\pm$ 0.19*	710.66 $\pm$ 88.13**	390 $\pm$ 66.27**
Low dose group	2.90 $\pm$ 0.17 [#]	2.18 $\pm$ 0.14 [#]	580.25 $\pm$ 49.98 ^{##}	281.37 $\pm$ 32.01 ^{##}
High dose group	2.71 $\pm$ 0.13 ^{##}	2.07 $\pm$ 0.11 ^{##}	537.69 $\pm$ 37.22 ^{##,§}	247.17 $\pm$ 28.73 ^{##,§}

Note: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group; [§] $P<0.05$ vs low dose group.

2.3 丹参酚酸 B 导致 PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、Beclin1、LC3-II 蛋白变化

Western blot 结果显示,相对于对照组,模型组的 PI3K、AKT、p-AKT、mTOR 蛋白表达升高,而 Beclin1、LC3-II 蛋白表达降低,其差异具有统计学意义($P<0.05$)。相对于模型组,经过丹参酚酸 B 处理的低、高剂量 SA-B 组,其 PI3K、AKT、p-AKT、mTOR 蛋白表达降低,Beclin1、LC3-II 蛋白表达升高($P<0.05$),其中高剂量组的变化程度更为明显,提示丹参酚酸 B 可通过下调 AKT 磷酸化水平,抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号传导通路从而提高心肌细胞自噬水平,且具有剂量依赖性。结果见图 1、2。

2.4 大鼠心肌 HE 染色切片观察结果

HE 染色结果显示,对照组心肌组织为正常心肌组织,心肌细胞横纹清晰,细胞结构完整,间质内未见血管扩张及炎性细胞的浸润。而在模型组中,可见心肌结构破坏、紊乱、纤维增生,可见明显的纤维化病灶形成,同时伴有不同程度的细胞萎缩、变性、坏死等病理性改变。低剂量 SA-B 组心肌细胞损伤程度较模型组明显减轻,细胞结构大体规整,可见少量的纤维化改变,但无明显的坏死病灶及大片纤维化病灶形成。高剂量 SA-B 组心肌细胞纤维化程度进一步减轻,未见明显纤维化改变。结果见图 3。

3 讨论

心肌纤维化是多种心血管系统疾病终末期的共同病理表现,包括心肌细胞肥大、凋亡、成纤维细胞增殖和纤维性胶原成分增多等多种细胞水平改变,逐步造成心肌肥厚,心脏功能减退,最终造成心功能不全、各种心律失常和心力衰竭等多种严重心脏疾病。因此,探明心肌纤维化发生和发展机制,选用敏感

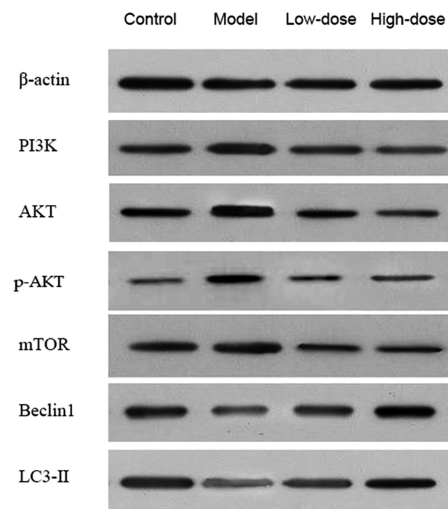


图 1 丹参酚酸 B 导致 PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、Beclin1、LC3-II 蛋白变化

Fig.1 Effects of Lithospermate-B on the expressions of PI3K, AKT, p-AKT, mTOR, Beclin1 and LC3-II

的药物抑制和逆转心肌纤维化、预防心肌重塑及心脏结构改变是预防心功能不全、心律失常及心源性猝死的主要研究方向。

本研究通过皮下注射异丙肾上腺素来建立大鼠心肌纤维化模型,异丙肾上腺素属于儿茶酚胺类物质,可通过兴奋心脏 β_1 受体,使心肌收缩力增强、心率加快、传导加速、心排血量和心肌氧耗增加,同时扩张冠状动脉,增加冠脉血流量。每日注射一定剂量可明显增加血浆中肾素、醛固酮和血管紧张素 II 水平,提高心肌 AT1 受体水平,增加心肌间质胶原的合成,最终发展成心肌纤维化^[11,12]。异丙肾上腺素还可引起整合素连接激

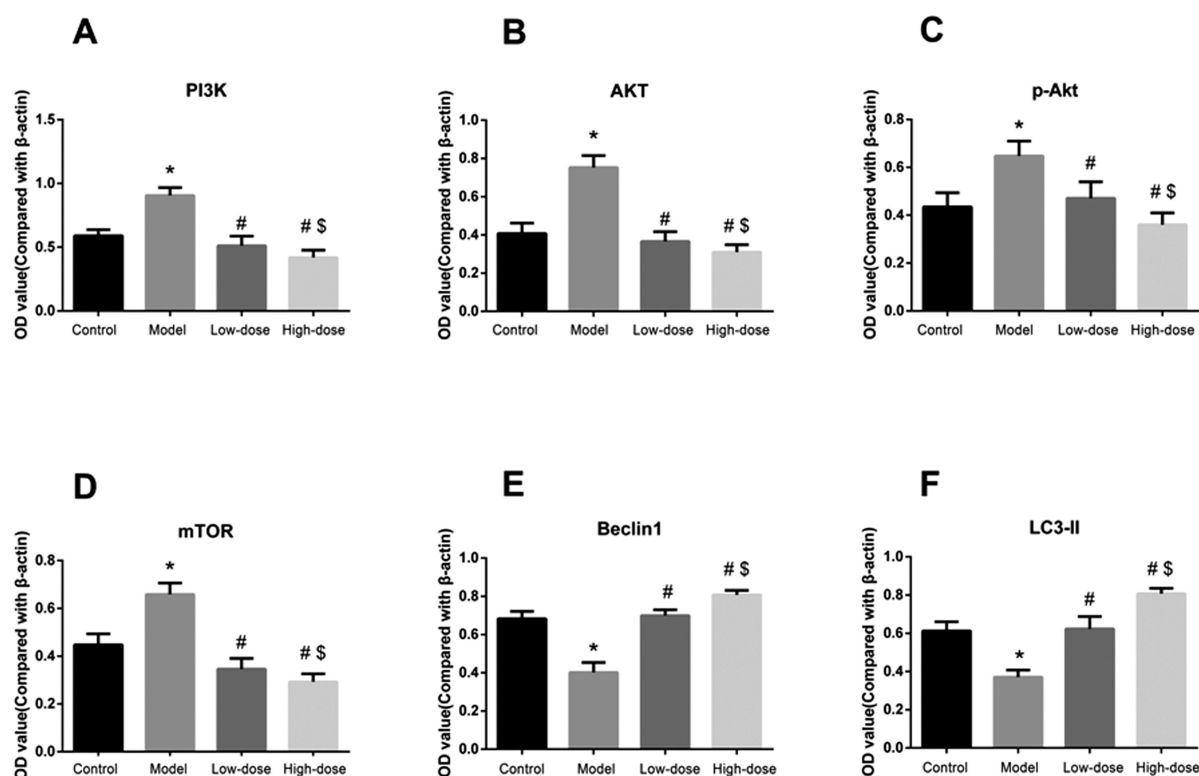


图 2 各组大鼠心肌 PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、Beclin1、LC3-II 表达的比较

Fig.2 Comparison of PI3K, AKT, p-AKT, mTOR, Beclin1, LC3-II expression of myocardium tissues of rats in each group

Note: A, B, C, D, E, F showed respectively the gray value of PI3K, AKT, p-AKT, mTOR, Beclin1 and LC3-II. * $P < 0.05$ vs control group;

$P < 0.05$ vs model group; \$ $P < 0.05$ vs low dose group.

酶 (ILK)、提高 PI3K 和 Akt 蛋白磷酸化水平, 激活 PI3K-AKT-mTOR 信号通路, 改变细胞代谢和蛋白质合成过程, 提高细胞抗凋亡水平^[13]。同时, 异丙肾上腺素还通过激活蛋白激酶 C(PKC)和蛋白激酶 A(PKA)信号通路, 上调 Raf 和 ERK1/2 的表达, 促进细胞内环磷酸腺苷生成和糖原合成, 使心肌细胞内的总蛋白和非收缩蛋白含量提高, 心肌纤维细胞进一步增殖, 最终导致心肌纤维化的发生^[14]。在前期的预实验中, 我们首先探索性的皮下注射 20 mg/kg 异丙肾上腺素, 观察大鼠的反应, 结果陆续有大鼠死亡, 且随着给药的持续, 只有少量大鼠存活。因此我们在接下来的预实验中逐渐降低异丙肾上腺素的给药剂量(15 mg/kg、10 mg/kg), 最后确定为首剂给与冲击剂量 5 mg/kg, 后以 2.5 mg/kg 维持 21 d, 每天同一时间注射一次, 能够不致大鼠死亡, 同时又能造成心肌纤维化。结果显示, 与对照组相比, 模型组的心重指数 (HW/BW)、左心室重指数 (LVW/BW)、心肌中 I 型、III 型胶原水平均明显升高, HE 染色提示大鼠心肌发生了明显纤维化改变, 说明异丙肾上腺素诱导的心肌纤维化模型成功建立。

近年来, 细胞自噬作为一种程序性细胞死亡方式成为了生命科学研究的热点, 被认为与多种疾病相关, 包括肿瘤、感染、内分泌疾病、心血管疾病及肺动脉高压^[15-18]等。自噬的基本过程包括自噬的启动、形成自噬体隔离膜(solation membrane)、自噬体和溶酶体结合形成自噬溶酶体、降解胞浆内容物成为氨基酸或多肽并循环利用。细胞自噬是一个复杂的受多种蛋白复合物和上游信号通路调控的过程, 主要包括: 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin compounds, mTORC),

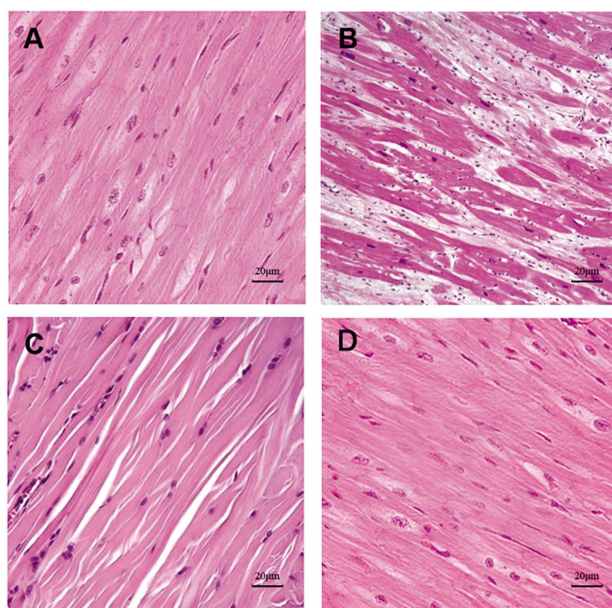


图 3 各组大鼠心肌组织病理改变(HE 染色, × 400)

Fig.3 Pathologic changes of myocardium tissues of rats in each group(HE staining, × 400)

Note: A.control group B.model group

C. low dose group D. high dose group

当细胞外界环境变化、营养代谢异常、细胞因子改变及各类应激反应影响时, 会自行调节细胞生长和代谢水平, 间接激活或抑制 mTOR 的表达, 从而改变细胞自噬水平^[19]。不仅如此, 在应激状态下, 心肌细胞还能够通过上调腺苷酸活化蛋白激酶

(AMP activated protein kinase, AMPK) 的磷酸化水平抑制 mTOR 的表达来提高细胞自噬水平, 有多种 mTOR 抑制剂已被证明具有提高细胞自噬水平的作用^[7,20]。① I 型和 III 型磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K), 研究表明 PI3K 广泛参与了细胞自噬的调控, 提高 PI3K 的磷酸化水平能够抑制 mTOR 的表达, 从而提高细胞自噬水平^[21]。② 微管相关蛋白轻链 3(light chain 3, LC3)可转化为 LC3-II, 与自噬相关基因(autophagy-related gene, Atg)合成为自噬体膜^[22]。本实验结果提示, 相较于对照组, 模型组大鼠心脏 HW/BW、LVW/BW 及 I、III 型胶原水平等心肌纤维化指标明显升高, PI3K、AKT、p-AKT 及 mTOR 蛋白的表达升高, 提示持续给与异丙肾上腺素引起 PI3K/AKT/mTOR 信号通路活化, PI3K 表达升高, 提高磷酸化 AKT 水平, mTOR 的表达水平明显上升, 说明 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的激活可能是导致心肌细胞自噬水平降低、心肌纤维化的机制之一。心肌细胞自噬对维持心肌功能具有重要作用, 自噬不足或过度自噬均会导致心脏疾病的发生^[5]。有研究发现, 用 mTOR 抑制剂雷帕霉素来治疗, 可以通过提高自噬水平来显著改善心肌纤维化^[20]。酵母 ATG6 同源物 Beclin1 主要定位于反面高尔基体、内质网和线粒体, 能够与 Vps15、Vps34 形成 PI3K 复合体, 可以将磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI) 磷酸化后生成 3-磷酸磷脂酰肌醇(PI3-phosphate, PI3P)^[23], PI3P 能够通过将胞浆中自噬相关蛋白 Atg 聚集到前自噬体膜上, 通过一系列的信号传递调节自噬体膜的形成。PI3K 同样可以通过影响自噬体的形成从而调节 Beclin1 依赖的自噬过程, PI3K 抑制剂可干扰自噬体的形成^[24]。也有研究表明, mTOR 和 Beclin1 可调节自噬活性, 其中 mTOR 主要作用在细胞自噬的初始阶段, 而 Beclin1 可以作用于自噬的不同阶段^[25,26], 其表达的增强可以诱导自噬水平的上调而发生生物学效应^[27]。LC3 是自噬体典型的标志蛋白, 是证实自噬存在最有相关性的因素, 其包括两种可相互转化的形式即 LC3-I 和 LC3-II, 二者均参与了自噬体的形成, LC3-I 经泛素化加工修饰后能够转变为 LC3-II, LC3-II 是自噬体的标志分子, 定位于前自噬体和自噬体细胞膜, 具有膜结合能力, 其表达水平随自噬体膜的增多而增加, 在某种程度上反映了细胞的自噬活性^[28]。本项研究中, 模型组中自噬相关蛋白 Beclin1、LC3-II 水平较对照组明显降低, 印证了发生纤维化的心肌细胞自噬水平的降低。

丹参酚酸 B 是活血化瘀中药丹参的有效水溶性成分, 为三分子丹参参与一分子咖啡酸缩合而成, 具有抗氧化、抗凝血和抗肿瘤等效应。已有大量研究表明, 丹参酚酸 B 对人体多个器官的纤维化具有预防和改善作用^[29,31]。丹参酚酸 B 同样具有抗心肌纤维化的作用, 其机制可能与抑制心肌成纤维细胞的增殖, 下调 III 型胶原、MMP-9、Smad2/3 蛋白表达和上调 Smad7 蛋白表达有关^[3]。在本项研究中, 我们发现与模型组相比, SA-B 组的心肌纤维化程度明显降低, 这与其他研究者的研究结果相一致。我们进一步对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路相关蛋白以及自噬相关蛋白 Beclin1、LC3-II 进行了检测, 结果显示: ① 经丹参酚酸 B 处理后, PI3K、AKT、p-AKT 及 mTOR 蛋白的表达较模型组明显降低, 这提示丹参酚酸 B 可能通过下调 AKT 磷酸化水平, 抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进细胞自噬。② 经

丹参酚酸 B 处理后, 大鼠心肌细胞中 Beclin1、LC3-II 水平明显增高, 而二者是目前最常用的自噬标记因子, 被广泛用于自噬的检测, 这说明丹参酚酸 B 提高了大鼠心肌细胞的自噬水平。而 Beclin1、LC3-II 同时接受多种信号传导通路调控, 说明丹参酚酸 B 仍可能通过其它途径影响细胞自噬水平。③ 高剂量 SA-B 组的 PI3K、AKT、p-AKT 及 mTOR 蛋白的表达较低剂量 SA-B 组进一步降低, 而 Beclin1、LC3-II 表达进一步提高, 说明 SA-B 对心肌自噬水平的提高具有剂量依耐性。

综合以上实验结果, 我们认为丹参酚酸 B 可能通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路提高了心肌细胞的自噬水平, 减轻了异丙肾上腺素造成的大鼠心肌纤维化。本研究结果具有一定的参考价值, 有望为心肌纤维化的防治带来新的思路和靶点, 但自噬在心肌纤维化中起到的作用仍存在争议, 需要进一步的研究证实。

参考文献(References)

- [1] Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signaling pathways [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(8): 589-600
- [2] Shimizu I, Minamino T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy [J]. *Mol Cell Cardiol*, 2016, 97: 245-262
- [3] Hansen TE, Johansen T. Following autophagy step by step [J]. *BMC Biol*, 2011, 9(1): 39-42
- [4] Wang JY, Xia Q, Chu KT, et al. Severe global cerebral ischemia-induced programmed necrosis of hippocampal CA1 neurons in rat is prevented by 3-methyladenine: a widely used inhibitor of autophagy [J]. *Neuropathol Exp Neurol*, 2011, 70(4): 312-314
- [5] Xie F, Liu W, Chen LX. The progress of autophagy involved in heart disease [J]. *Prog Biochemistry Biophys*, 2012, 39(3): 224-233
- [6] Liu Q, Guan JZ, Sun Y, et al. Insulin-like growth factor 1 receptor-mediated cell survival in hypoxia depends on the promotion of autophagy via suppression of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(4): 2136-2142
- [7] Li Y, Chen C, Yao F, et al. AMPK inhibits cardiac hypertrophy by promoting autophagy via mTORC1 [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 558: 79-86
- [8] Hill JA. Autophagy in cardiac plasticity and disease [J]. *Pediatr Cardiol*, 2011, 32(3): 282-289
- [9] Lin C, Liu Z, Lu Y, et al. Cardioprotective effect of Salvianolic acid B on acute myocardial infarction by promoting autophagy and neovascularization and inhibiting apoptosis [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2016, 68(7): 941-952
- [10] Han X, Liu JX, Li XZ. Salvianolic acid B inhibits autophagy and protects starving cardiac myocytes [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(1): 38-44
- [11] Liu S Y, Xing W P, Wu Z Y, et al. Effects of puerarin on the expression of TGF- β 1 and CTGF in left ventricle myocardial tissue of the rats with myocardial fibrosis [J]. *J Clin Cardiol*, 2010, 26(12): 942-946
- [12] 陈蓉, 谢梅林. 异丙肾上腺素致小鼠心肌纤维化模型的制备 [J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(9): 1325-1328
- [13] Shimamura H, Terada Y, Okado T, et al. The PI3-kinase-Akt pathway promotes mesangial cell survival and inhibits apoptosis in vitro [J].

- NF-kappa B and Bad[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(6): 1427-1434
- [14] Baek KH, Park J, Shin I. Autophagy-regulating small molecules and their therapeutic application[J]. *Chem Soc Rev*, 2012, 41(8): 3245-3263
- [15] Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, et al. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction[J]. *Cell Biol*, 1992, 119(2): 301-311
- [16] Martinez-Lopez N, Garcia-Macia M, Sahu S, et al. Autophagy in the CNS and periphery coordinate lipophagy and lipolysis in the brown adipose tissue and liver[J]. *Cell Metab*, 2016, 23(1): 113-127
- [17] Ryter SW, Choi AM. Autophagy in lung disease pathogenesis and therapeutics[J]. *Redox Biol*, 2015, 4: 215-225
- [18] Aaron C, Laurin M, Sarah B, et al. Protein kinase C depresses cardiac myocyte power output and attenuates myofilament responses induced by protein kinase A[J]. *J Muscle Res Cell Motil*, 2013, 33(6): 439-448
- [19] Xu L, Brink M. mTOR, cardiomyocytes and inflammation in cardiac hypertrophy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(7 Pt B): 1894-1903
- [20] Ackermann MA. Links between mTOR and the immunoproteasome: Therapeutic targets for cardiac hypertrophy? [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 89(Pt B): 113-115
- [21] 肖凌. PI3K-自噬途径介导 apelin-13 促 H9c2 心肌细胞 IL-8 分泌 [D]. 衡阳: 中国南华大学, 2013: 1-7
- [22] Joachim J, Jefferies H B, Razi M, et al. Activation of ULK Kinase and Autophagy by GABARAP Trafficking from the Centrosome Is Regulated by WAC and GM130[J]. *Mol Cell*, 2015, 60(6): 899-913
- [23] Mcknight NC, Zhenyu Y. Beclin1, an essential component and master regulator of PI3KIII in health and disease [J]. *Curr Pathobiol Rep*, 2013, 1(4): 231-238
- [24] Simonsen A, Tooze SA. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class PI3-kinase complexes [J]. *J Cell Biol*, 2009, 186(6): 773-782
- [25] Backer JM. The regulation and function of class III PI3Ks: novel roles for Vps34[J]. *Biochem J*, 2008, 410: 1-17
- [26] Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy[J]. *Autophagy*, 2008, 4: 600-606
- [27] 王远航, 夏盛源, 王芳, 等. 自噬通路中 mTOR、Beclin1 与肿瘤关系研究的最新进展 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(8): 1656-1662
- [28] Dancourt J, Melia TJ. Lipidation of the autophagy proteins LC3 and GABARAP is a membrane-curvature dependent process [J]. *Autophagy*, 2014, 10: 470-471
- [29] 陆海英, 张悦, 刘煜敏, 等. 丹参酚酸 B 对肾纤维化大鼠肾组织 MMP-2 表达的影响[J]. *上海中医药大学学报*, 2009, 23(2): 55-58
- [30] 吴航. 丹参酚酸 B 通过 Sirt-1 对大鼠肝纤维化模型的影响[J]. *华北理工大学学报(医学版)*, 2016, 18(5): 349-352
- [31] 金粟, 李士远, 陈芳宁, 等. 丹参酚酸 B、甘草次酸、白藜芦醇单用及联用对小鼠肺间质纤维化影响的实验研究[J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(5): 1095-1098
- [32] 罗红, 王春花, 赵玲璐, 等. 丹参酚酸 B 抗心肌纤维化的机制研究 [J]. *中国药房*, 2017, 28(28): 3900-3903

(上接第 3954 页)

- [17] Coelho R, Silva M, Rodrigues-Pinto E, et al. CA 19-9 as a Marker of Survival and a Predictor of Metastization in Cholangiocarcinoma[J]. *J Surg Oncol*, 2018, 117(3): 380-388
- [18] Park SY, Shin JH, Kee SH. E-cadherin expression increases cell proliferation by regulating energy metabolism through nuclear factor- κ B in AGS cells[J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(9): 1769-1777
- [19] van Roy F. Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(2): 121-134
- [20] Petrova YI, Schecterson L, Gumbiner BM. Roles for E-cadherin cell surface regulation in cancer[J]. *Mol Biol Cell*, 2016, 27(21): 3233-3244
- [21] Lin Y, Zhang CS, Li SJ, et al. LncRNA LOC554202 promotes proliferation and migration of gastric cancer cells through regulating p21 and E-cadherin [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(24): 8690-8697
- [22] Tanaka N, Yamada S, Sonohara F, et al. Clinical Implications of Lysyl Oxidase-Like Protein 2 Expression in Pancreatic Cancer[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 9846
- [23] Wen X, Liu Y, Bai Y, et al. LOXL2, a copper-dependent monoamine oxidase, activates lung fibroblasts through the TGF- β /Smad pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(6): 3530-3541
- [24] 肖小平, 郭玲, 张熊, 等. 胆管癌组织 LOXL2 mRNA 与 Tenascin-C mRNA 表达的临床应用研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2017, 32(3): 79-81
- [25] 赵敏, 罗晨辉, 王瑛, 等. TRPM7 与肿瘤 [J]. *中南大学学报(医学版)*, 2016, 41(3): 333-336
- [26] 李立, 曹玉文, 吴何兴, 等. TRPM7 在胆管癌组织中的表达及其与预后的关系[J]. *重庆医学*, 2015, 44(25): 3523-3525, 3528
- [27] He C, Zhang Y, Song Y, et al. Preoperative CEA levels are supplementary to CA19-9 levels in predicting prognosis in patients with resectable intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *J Cancer*, 2018, 9(17): 3117-3128
- [28] Zheng BH, Yang LX, Sun QM, et al. A New Preoperative Prognostic System Combining CRP and CA199 For Patients with Intrahepatic Cholangiocarcinoma[J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2017, 8(10): e118
- [29] Li Y, Li DJ, Chen J, et al. Application of Joint Detection of AFP, CA19-9, CA125 and CEA in Identification and Diagnosis of Cholangiocarcinoma[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(8): 3451-3455
- [30] 何婵, 张俊文. B 超、CT、MRCP 及 ERCP 诊断胆管癌临床价值的 Meta 分析[J]. *重庆医学*, 2017, 46(12): 1648-1653