

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.21.011

竹节参皂苷 IVa 减轻异丙肾上腺素诱导的小鼠心肌纤维化作用机制研究*

高兰英 贾彬 文健 庄艳 罗勇^Δ

(成都市第三人民医院心脏大血管外科 四川 成都 610014)

摘要 目的:探讨竹节参皂苷(IVa)减轻异丙肾上腺素(ISO)诱导的小鼠心肌纤维化作用机制。方法:白变种实验室老鼠(Balb/C)小鼠40只并随机分为4组:正常对照组(n=10)、ISO模型组(n=10)、IVa低剂量组(n=10)、IVa高剂量组(n=10)。采用皮下注射ISO构建小鼠心肌纤维化模型,IVa剂量组在建模同时给予IVa治疗,正常组给予等量生理盐水。采用马松(Masson)三色标准和HE染色方法分析评估心脏组织形态学和胶原沉积。采用小麦胚芽凝集素(WGA)染色法测定心肌细胞面积。蛋白免疫印迹试验检测细胞自噬相关标志物(LC3-II、Beclin1和p62)和腺苷单磷酸活化蛋白激酶(AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)/自噬激活酶1(ULK1)信号通路相关标志物。采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清中血管紧张素II(Ang II)和I型前胶原羧基末端肽(PICP)的含量。结果:高剂量IVa(15mg/kg)治疗后,HW/BW和LVW/BW较ISO模型组升高,而血清中Ang II和PICP含量降低。IVa以剂量依赖的方式减轻心肌细胞在心脏组织中的损伤。皮下注射ISO后,心肌间质内胶原沉积明显,IVa治疗后胶原沉积明显减少。IVa可有效降低ISO诱导的小鼠心肌细胞面积大小。IVa能有效抑制ISO诱导的LC3-II和Beclin1蛋白降低,减少p62蛋白增多。AMPK直接磷酸化ULK1(Ser555),通过抑制mTOR磷酸化间接抑制ULK1(Ser757)磷酸化,均参与了ISO诱导的心肌纤维化小鼠自噬活性的降低;此外,IVa低剂量组和IVa高剂量组均显著增加了AMPK磷酸化,并抑制了mTOR磷酸化,降低了ULK1(Ser757)磷酸化。结论:IVa通过AMPK/mTOR/ULK1途径激活自噬,减轻了ISO诱导的心肌纤维化。表明IVa是一种潜在的抗心肌纤维化候选药物,是治疗心脏病的潜在药物靶点。

关键词: 竹节参皂苷 IVa; 异丙肾上腺素; 小鼠; 心肌纤维化; AMPK/mTOR/ULK1

中图分类号:R-33;R542.23 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2021)21-4055-07

Effect of Chikusetsusaponin IVa on Myocardial Fibrosis Induced by Isoproterenol in Mice*

GAO Lan-ying, JIA Bin, WEN Jian, ZHUANG Yan, LUO Yong^Δ

(Department of Cardiovascular Surgery, Chengdu Third People's Hospital, Chengdu, Sichuan, 610014, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism of Chikusetsusaponin (IVa) on myocardial fibrosis induced by isoproterenol (ISO) in mice. **Methods:** 40 BALB/c mice were randomly divided into four groups: normal control group (n=10), ISO model group (n=10), IVa low-dose group (n=10) and IVa high-dose group (n=10). The mouse myocardial fibrosis model was established by subcutaneous injection of ISO. The IVa dose group was treated with IVa at the same time, and the normal group was treated with the same amount of normal saline. Masson trichrome standard and HE staining were used to analyze and evaluate cardiac histomorphology and collagen deposition. The area of cardiomyocytes was measured by wheat germ agglutinin (WGA) staining. Autophagy related markers (LC3-II, Beclin1 and p62) and AMP-activated protein kinase(AMPK)/mammalian target of rapamycin(mTOR)/Unc-like kinase1(ULK1) signal pathway related markers were detected by Western blot. The contents of angiotensin II (ANG II) and type I procollagen carboxy terminal peptide (PICP) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** After high-dose IVa (15 mg/kg), HW/BW and LVW/BW increased compared with ISO model group, while the contents of Ang II and PICP in serum decreased. IVa alleviates the injury of cardiomyocytes in heart tissue in a dose-dependent manner. After subcutaneous injection of ISO, collagen deposition in myocardial stroma was obvious, and collagen deposition decreased significantly after IVa treatment. IVa can effectively reduce the area and size of mouse cardiomyocytes induced by ISO. IVa can effectively inhibit the decrease of LC3-II and Beclin1 protein and the increase of p62 protein induced by ISO. AMPK directly phosphorylates ULK1 (ser555) and indirectly inhibits ULK1 (ser757) phosphorylation by inhibiting mTOR phosphorylation, which were involved in the reduction of autophagy activity in ISO induced myocardial fibrosis mice. In addition, both low-dose and high-dose IVa groups significantly increased AMPK phosphorylation, inhibited mTOR phosphorylation and decreased ULK1 (ser757) phosphorylation. **Conclusion:** IVa activates autophagy through AMPK/mTOR/ULK1 pathway and reduces ISO induced myocardial fibrosis. It shows that IVa is a potential candidate drug for anti my-

* 基金项目:四川省医学科研青年创新课题(Q14013)

作者简介:高兰英(1980-),女,硕士,主治医师,研究方向:心血管疾病,E-mail: gly3466@163.com

Δ 通讯作者:罗勇(1967-),男,本科,主任医师,研究方向:冠心病、瓣膜性心脏病,E-mail: luoyong196788@163.com

(收稿日期:2021-04-27 接受日期:2021-05-23)

cardiac fibrosis and a potential drug target for the treatment of heart disease.

Key words: Chikusetsusaponin IVA; Isoproterenol; Mice; Myocardial fibrosis; AMPK/mTOR/ULK1

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R542.23 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)21-4055-07

前言

《中国心血管病报告 2018》显示,心血管疾病是我国人口死亡的主要原因^[1]。心肌纤维化可由急性心肌梗死、压力超负荷、衰老等多种原因引起,是心功能由代偿期转变为失代偿期的关键,伴有心肌间质网格的重构和心功能减退,有效防治不及时会导致恶性心律失常、心衰甚至猝死^[2,3]。异丙肾上腺素(ISO)为儿茶酚胺类药物,通过皮下注射或腹腔注射 ISO,可激动心脏 β_1 受体,使心脏强烈收缩导致心肌相对缺血坏死而诱导形成心肌纤维化^[4,5]。人参是我国土家族和苗族人常见的传统中草药,而竹节参皂苷(IVa)是中药人参的主要成分^[6]。研究表明,人参皂苷可有效抑制急性心肌缺血损伤模型大鼠心肌细胞凋亡,降低心肌梗死大鼠的心肌细胞的炎症及心肌纤维化程度,改善纤维化程度,减小心肌梗死面积,减轻心肌损伤^[7,8]。IVa 可通过抑制 NLRP3 炎性小体激活和 NF- κ B 信号通路,改善高脂饮食诱导的脂肪稳态,抑制脂肪组织炎症反应^[9]。然而,IVa 是否具有抗心肌纤维化活性或改善自噬仍有待研究。因此,本研究探讨 IVa 在 ISO 诱导的小鼠心肌纤维化模型中的作用及参与自噬调控的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究采用白变种实验室老鼠(Balb/C)小鼠,40 只,年龄 6-8 周,平均周龄(7.2 $\pm$ 0.5)周,体重为 18-26 g,平均(21.5 $\pm$ 2.2)g,雌雄不限,购自江苏艾菱菲生物科技有限公司。饲养条件:将小鼠置于环境温度为(23 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C)条件下,光照/黑暗周期为 12 h,小鼠食物和饮用水充足,光照适度,通风良好。本研究获得了本院医学伦理委员会批准。

1.2 动物分组

将小鼠随机分为 4 组,每组 10 只,给予不同的治疗方案:
① 正常对照组:小鼠治疗方法与给药组相同,所有试剂都是等体积的生理盐水;
② ISO 模型组:第 1 天给予 ISO(5 mg/kg,皮下注射),之后再给予 2.5 mg/kg/d,连续 20 d;
③ IVa 低剂量组:第 1 天给予 ISO(5 mg/kg,皮下注射),随后再给予 2.5 mg/kg/d,连续 20 d,第 2 天至 21 天给予 IVa(5 mg/kg,口服);
④ IVa 高剂量组:第 1 天给予 ISO(5 mg/kg,皮下注射),随后再给予 2.5 mg/kg/d,连续 20 d,第 2 天至 21 天给予 IVa(15 mg/kg,口服);
实验结束时,称重并记录,小鼠麻醉处死,立即取出心脏组织,用冷磷酸盐缓冲液洗净,称重,分成 3 份;中间部分用 10%中性缓冲福尔马林固定进行组织学检查分析;其余冷冻于液氮中,-80 $^{\circ}$ C 保存,待用于蛋白免疫印迹和生化分析。并计算心脏体重指数(HW/BW)和左心室重指数(LVW/BW)作为衡量心肌肥厚的指标,HW/BW=心脏重量/体重,LVW/BW=左心室重量/体重。

1.3 形态学及组织学分析

每组随机选取 2 只小鼠,麻醉后手术取出小鼠心脏,病将其在 4%多聚甲醛中固定至少 24 h,然后用石蜡包埋、切片、HE 染色。3-5 μ m 厚度的切片按照马松(Masson)三色标准和 HE 染色方法进行染色(上海博谷生物科技有限公司)。在光镜下观察,心肌纤维呈红色,胶原纤维呈蓝色,红细胞呈橘红色。采用双盲法由病理专业人员对所有心脏切片的组织形态学和胶原沉积进行评估。

1.4 小麦胚芽凝集素染色

心脏组织的左心室部分用 10%中性缓冲福尔马林固定。采用小麦胚芽凝集素(WGA)染色法(汇佳生物(中国)有限公司)对 3-5 μ m 厚度的心肌切片进行染色,测定心肌细胞横截面积。

1.5 蛋白免疫印迹试验

将等量的总蛋白(30 μ g)用 10%或 8% SDS-PAGE 凝胶分离,转移到 PVDF 膜上。在室温 TBST 中封闭 5%脱脂牛奶 1 小时后,随后在 4 $^{\circ}$ C 下用一抗(自噬激活激酶 1(ULK1)、磷酸化-ULK (757 位点)(p-ULK (S757))、磷酸化-ULK (555 位点)(p-ULK(S555))、腺苷单磷酸活化蛋白激酶(AMPK)、磷酸化-AMPK(p-AMPK)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、磷酸化-mTOR (p-mTOR))孵育过夜。然后用 TBST 缓冲液冲洗 3 次,与二抗(LC3-II、p62、Beclin1、GAPDH)室温孵育 2 h。用化学发光显影剂曝光膜,用 Image 6.0 软件评价各样品蛋白水平。上述操作均严格按照相关试剂说明书进行。

1.6 酶联免疫吸附法(ELISA)检测

取小鼠血清,按照 ELISA 试剂盒说明书检测步骤检测血清中血管紧张素 II(Ang II)和 I 型前胶原羧基末端肽(PICP)的含量。

1.7 统计学方法

采用 SPSS22.0 统计分析软件。多组间比较采用单因素方差分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示及 t 检验。计数资料以频数和百分率表示及 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠 HW/BW 和 LVW/BW 比较

如表 1、图 1 所示,与对照组对比,ISO 模型组 HW/BW 和 LVW/BW 均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 ISO 模型组对比,IVa 低剂量组、IVa 高剂量组 HW/BW 和 LVW/BW 均呈下降趋势,且以 IVa 高剂量组为著,具有剂量依赖性,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 各组小鼠血清 Ang II 和 PICP 水平比较

如表 2、图 2 所示,与对照组对比,ISO 模型组血清中 Ang II 和 PICP 含量均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 ISO 模型组对比,IVa 低剂量组、IVa 高剂量组血清中 Ang II 和 PICP 均呈下降趋势,且以 IVa 高剂量组为著,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠 HW/BW 和 LVW/BW 比较($\bar{x} \pm s$)Table 1 Comparison of HW/BW, LVW/BW in mice of each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	HW/BW (mg/g)	LVW/BW (mg/g)
Normal control group	0.17 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.01
ISO model group	0.22 $\pm$ 0.04*	0.13 $\pm$ 0.02*
IVa low-dose group	0.19 $\pm$ 0.03 [#]	0.12 $\pm$ 0.01 [#]
IVa high-dose group	0.18 $\pm$ 0.02 [#]	0.10 $\pm$ 0.01 [#]
F value	7.534	5.610
P value	0.038	0.041

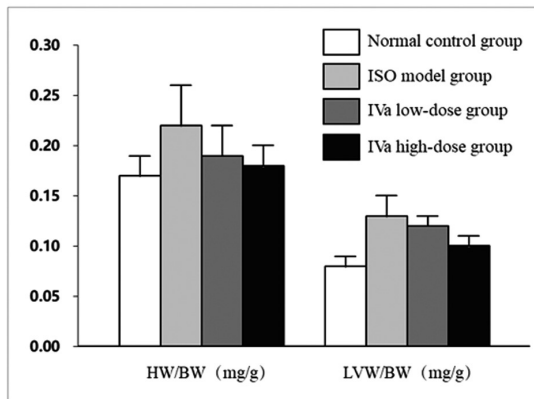


图 1 各组小鼠 HW/BW 和 LVW/BW

Fig.1 HW/BW, LVW/BW in mice of each group

2.2 各组小鼠心肌细胞损伤的病理改变

采用 HE 染色观察心脏组织的病理变化。如图 3 所示,正常对照组心肌纤维排列整齐致密,细胞核清晰,细胞外基质减少。ISO 模型组心肌纤维萎缩、排列紊乱,并有大量炎症细胞浸润。IVa 以剂量依赖的方式挽救了上述病理改变。提示 IVa 可减轻心肌细胞在心脏组织中的损伤。

2.3 各组小鼠心肌纤维化程度

采用 Masson 三色染色法评估心肌纤维化程度。如图 4 所示,蓝色染色表示心肌组织纤维化程度。正常对照组未见心肌纤维化改变。ISO 模型组心肌纤维化显著。IVa 以剂量依赖的方式挽救了上述病理改变。上述结果表明,皮下注射 ISO 后,心肌间质内胶原沉积明显,IVa 治疗后胶原沉积明显减少,提示 IVa 治疗后心肌纤维化明显减轻,且呈剂量依赖性。

表 2 各组小鼠血清 Ang II 和 PICP 水平比较($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of serum Ang II and PICP levels in mice of each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	Ang II (ng/L)	PICP (ng/mL)
Normal control group	40.11 $\pm$ 3.24	5.67 $\pm$ 0.82
ISO model group	63.52 $\pm$ 6.97*	7.43 $\pm$ 0.91*
IVa low-dose group	55.14 $\pm$ 4.58 [#]	6.52 $\pm$ 0.84 [#]
IVa high-dose group	49.03 $\pm$ 4.10 [#]	6.29 $\pm$ 0.76 [#]
F value	12.634	10.624
P value	0.001	0.006

Note: Compared with the normal control group, * $P < 0.05$; Compared with ISO model group, [#] $P < 0.05$.

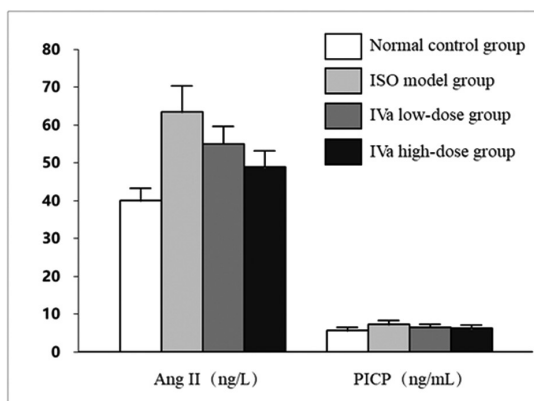


图 2 各组小鼠血清 Ang II 和 PICP 水平

Fig.2 Serum Ang II and PICP levels in mice of each group

2.4 各组小鼠平均心肌细胞面积比较

如表 3、图 5 所示,ISO 模型组平均心肌细胞面积高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。IVa 低剂量组、IVa 高剂量组平均心肌细胞面积均低于 ISO 模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。上述结果表明,IVa 可有效降低 ISO 诱导的小鼠心肌细胞面积大小。

2.5 心肌组织中 LC3-II、Beclin1 和 p62 蛋白表达情况

如表 4、图 6 所示,与正常对照组比较,ISO 模型组心肌纤维化小鼠心肌组织中 LC3-II 和 Beclin1 蛋白表达水平显著降低,而 p62 蛋白表达水平显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与 ISO 模型组比较,IVa 低剂量组和 IVa 高剂量组心肌纤维化小鼠心肌组织中 LC3-II 和 Beclin1 蛋白表达水平升高,而 p62 蛋白表达水平降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。提示 IVa 能有效抑制 ISO 诱导的 LC3-II 和 Beclin1 蛋白降低,减少 p62 蛋白增多。表明 IVa 通过激活自噬来改善 ISO 诱导的心肌纤维化。

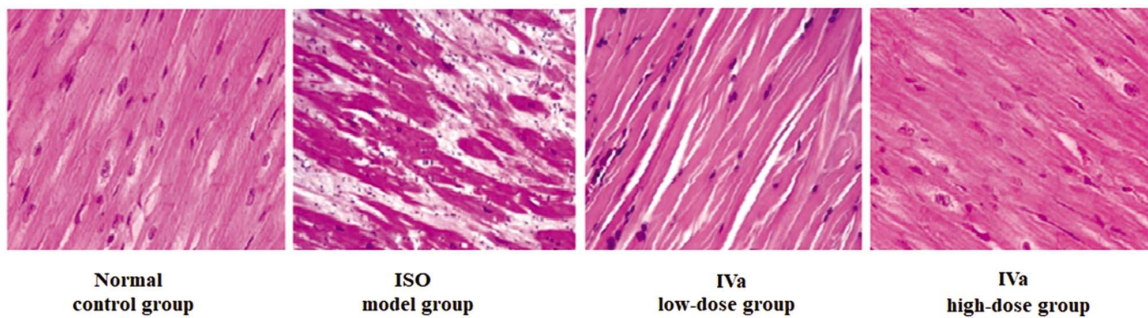


图3 各组小鼠心肌细胞损伤的病理改变($\times 400$)

Fig.3 Pathological changes of cardiomyocyte injury in mice in each group($\times 400$)

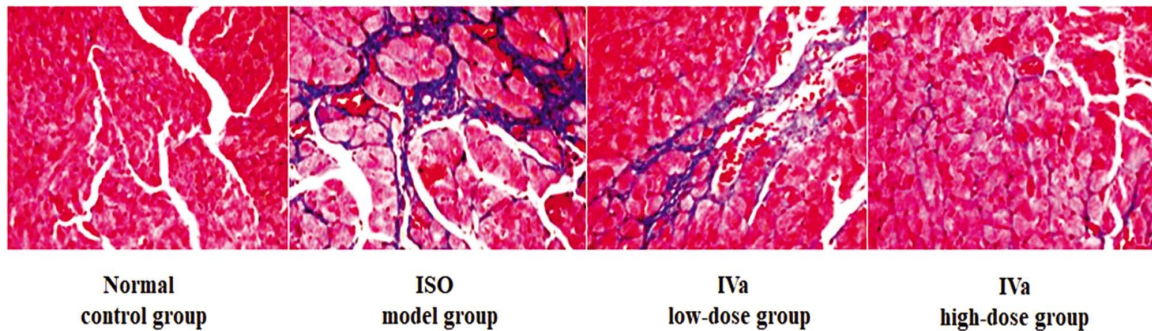


图4 各组小鼠心肌组织中胶原沉积情况($\times 200$)

Fig.4 Collagen deposition in myocardial tissue of mice in each group($\times 200$)

表3 各组小鼠平均心肌细胞面积比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of average cardiomyocyte area of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Cardiomyocyte area(μm^2)
Normal control group	1762 $\pm$ 94
ISO model group	3381 $\pm$ 142*
IVa low-dose group	2116 $\pm$ 125 [#]
IVa high-dose group	1834 $\pm$ 119 [#]
F value	12.065
P value	0.008

Note: Compared with the normal control group, * $P < 0.05$; Compared with ISO model group, [#] $P < 0.05$.

2.6 IVa 通过激活 AMPK-mTOR-ULK1 信号通路增强自噬

如表5、图7所示,与正常对照组比较,ISO模型组p-AMPK显著降低,p-mTOR显著升高,p-ULK1(Ser555)降低,而p-ULK1(Ser757)水平显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与ISO模型组比较,IVa低剂量组和IVa高剂量组p-AMPK升高,p-mTOR降低,p-ULK1(Ser757)降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);p-ULK1(Ser555)稍降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。上述结果表明AMPK直接磷酸化ULK1(Ser555),通过抑制mTOR磷酸化间接抑制ULK1(Ser757)磷酸化,均参与了ISO诱导的心肌纤维化小鼠自噬活性的降低;此外,IVa低剂量组和IVa高剂量组均显著增加了AMPK磷酸化,并抑制了mTOR磷酸化,降低了ULK1(Ser757)磷酸化;而p-ULK1(Ser555)在ISO模型组和IVa给药组之间变化不大。提示IVa通过激活AMPK-mTOR-ULK1信号通路增强自噬,改善ISO诱导的心肌纤维化进展。

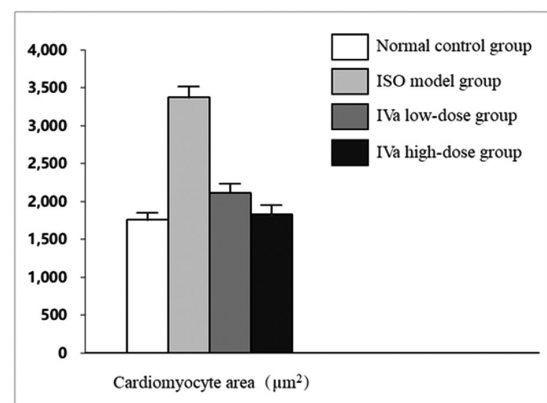


图5 各组小鼠平均心肌细胞面积

Fig.5 Average area of myocardial cells in each group

3 讨论

心肌纤维化是一个动态过程,会影响心肌的正常结构和功能,特征表现是成纤维细胞的聚集和细胞外基质蛋白的过度沉积^[10-12],过度的细胞外基质蛋白沉积可引起心肌僵硬(引起舒张功能障碍),甚至可能影响整个左心室(引起其扩张和收缩功能障碍),最终导致心力衰竭和死亡,导致死亡率和发病率增加^[13-15]。目前,心肌纤维化的预防是心脏病严重并发症的关键治疗靶点。本研究通过皮下注射ISO诱导小鼠心肌纤维化,Masson三色染色法评估心肌纤维化严重程度,结果显示ISO模型组细胞外基质蛋白沉积增加,HW/BW和LVW/BW高于正常对照组;WGA染色结果表明,ISO模型组平均心肌细胞面积大于正常对照组,上述结果表明心肌纤维化模型成功建立。Ang II具有生长因子的作用,可促进心肌细胞肥大,引起心肌纤维化^[16-18]。心脏间质胶原分为I、II、III、V、VI型等,其中90%由I型构成,

表 4 心肌组织中 LC3-II、Beclin1 和 p62 蛋白表达情况

Table 4 Expression of LC3-II, Beclin1 and p62 proteins in myocardial tissue

Groups	LC3-II	Beclin1	p62
Normal control group	1.4± 0.2	1.9± 0.3	1.2± 0.2
ISO model group	0.5± 0.1*	1.2± 0.2*	1.8± 0.3*
IVa low-dose group	0.9± 0.1 [#]	2.5± 0.4 [#]	1.3± 0.2 [#]
IVa high-dose group	1.2± 0.2 [#]	1.8± 0.3 [#]	0.9± 0.1 [#]
F value	12.385	8.204	10.375
P value	0.000	0.006	0.000

Note: Compared with the normal control group, * $P<0.05$; Compared with ISO model group, [#] $P<0.05$.

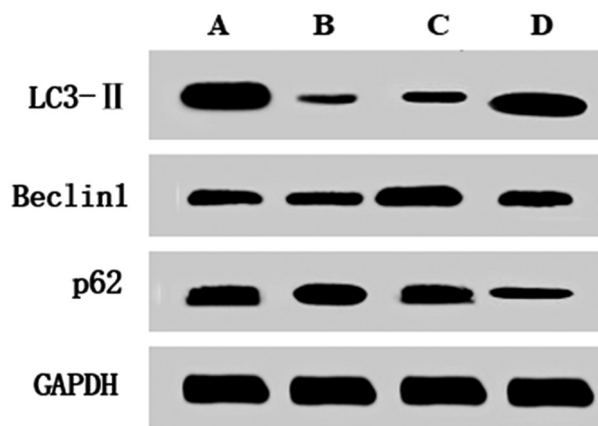


图 6 心肌组织中 LC3-II、Beclin1 和 p62 蛋白表达

Fig.6 Expression of LC3-II, Beclin1 and p62 proteins in myocardial tissue

Note: A: Normal control group; B: ISO model group; C: IVa low-dose group; D: IVa high-dose group.

PICP 是反应 I 型胶原合成和降解的指标^[19,20]。本研究显示,与对照组对比,ISO 模型组血清中 Ang II 和 PICP 含量均升高,而与 ISO 模型组对比,IVa 低剂量组、IVa 高剂量组血清中 Ang II 和 PICP 均呈下降趋势。表明 IVa 具有降低 Ang II 含量,减少心肌间质胶原的积聚,从而抑制心肌纤维化的作用。人参皂苷是人参根茎中含量最丰富、活性最强的成分,IVa 是主要成分之一,主要通过减轻氧化应激引起的心肌损伤和心肌细胞死亡,对心肌缺血损伤大鼠具有心脏保护作用,也能显著改善 ISO 诱导的小鼠细胞外胶原沉积和心肌肥大^[7]。本研究显示 IVa 对 ISO 诱导心肌纤维化的保护作用呈剂量依赖性,鉴于心肌纤维化对心脏病的发展和进展至关重要,IVa 的保护作用提示 IVa 可能是

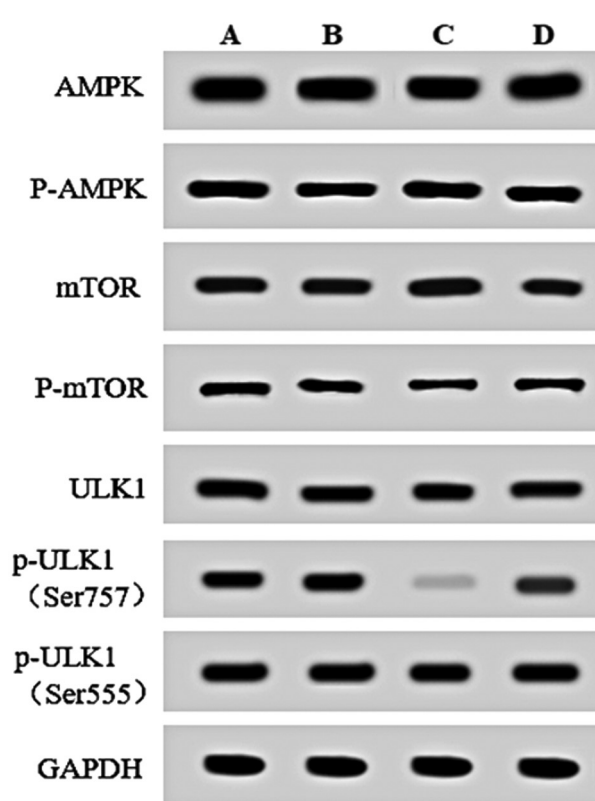


图 7 心脏组织 AMPK-mTOR-ULK1 信号通路蛋白表达

Fig.7 Expression of AMPK-mTOR-ULK1 signal pathway protein in heart tissue

Note: A: Normal control group; B: ISO model group; C: IVa low-dose group; D: IVa high-dose group.

开发新的干预心脏相关疾病进展的有价值治疗药物。

表 5 心脏组织 AMPK-mTOR-ULK1 信号通路表达

Table 5 Expression of AMPK-mTOR-ULK1 signal pathway in heart tissue

Groups	p-AMPK/AMPK	p-mTOR/mTOR	p-ULK1(Ser555)/ULK1	p-ULK1(Ser757)/ULK1
Normal control group	9.1± 1.1	6.8± 0.8	0.80± 0.30	0.40± 0.10
ISO model group	4.5± 0.7*	13.6± 1.9*	0.64± 0.21*	0.94± 0.33*
IVa low-dose group	5.4± 0.7 [#]	8.8± 1.0 [#]	0.55± 0.16	0.24± 0.08 [#]
IVa high-dose group	8.6± 1.0 [#]	4.5± 0.7 [#]	0.54± 0.16	0.31± 0.08 [#]
F value	17.005	22.524	1.254	5.064
P value	0.000	0.000	0.806	0.039

Note: Compared with the normal control group, * $P<0.05$; Compared with ISO model group, [#] $P<0.05$.

心肌纤维化是许多心血管疾病终末期常见的病理表现,越来越多的证据表明,自噬功能障碍是心肌纤维化的主要原因^[21-23]。自噬是一种进化保守的分解代谢过程,在此过程中,部分细胞质,包括多余或受损的细胞器和错误折叠或聚集的蛋白质,被称为自噬体的双膜泡吞噬,进行降解和循环,以维持细胞稳态,参与了一系列的生理和病理过程^[24-25]。越来越多的证据表明自噬功能障碍是包括心肌梗厚、心力衰竭、缺血性心脏病在内的多种病理状态的主要原因。此外,自噬在心肌纤维化中也有保护作用^[26-28],自噬对减少过量细胞外基质蛋白在心脏的积累起保护作用。因此,本研究探讨了 IVa 对 LC3-II、Beclin1 和 p62 自噬相关蛋白水平的影响。结果显示,ISO 诱导心肌纤维化的心肌组织中,LC3-II、Beclin1 表达降低,p62 表达增加,提示自噬参与了 ISO 诱导心肌纤维化的发展;高剂量 IVa(15 mg/kg)治疗后,LC3-II 表达显著上调,p62 表达显著下调,而低剂量 IVa(5 mg/kg)对 Beclin1 上调的影响更为显著。上述结果表明 IVa 可通过上调自噬来有效改善 ISO 诱导的心肌纤维化。

AMPK 是一种广泛表达的细胞能量传感器,是在应激期间发生的心肌细胞应激适应性反应的重要组成部分^[29,30]。AMPK 是心脏组织自噬的激活因子,在过表达显性阴性 AMPK 小鼠中,缺血诱导的心脏自噬体形成减少,这提供了 AMPK 对启动心肌自噬必不可少的遗传学证据,AMPK 在自噬中发挥着重要作用^[31,32]。AMPK 通过介导 ULK1 磷酸化调控自噬,激活的 ULK1 形成分离膜,这是自噬体形成的重要第一步,体内和体外试验均证实依赖 AMPK 的 ULK1 磷酸化是自噬的必要条件^[33]。自噬是由 AMPK 的激活而负调控的,而负调控由 mTOR 调节^[34]。进一步研究发现 AMPK 激活 ULK1 涉及两个机制,AMPK 通过磷酸化 ULK1-Ser555 直接激活,AMPK 通过 mTOR 抑制磷酸化 ULK1-Ser757 间接激活^[35]。在心肌缺血/缺氧损伤期间,AMPK 的激活导致 mTOR 活性降低和自噬增加,AMPK 激活剂二甲双胍可显著抑制糖尿病小鼠 mTOR 表达,诱导自噬,从而改善糖尿病性心脏病的发生,说明 AMPK/mTOR 信号通路介导了自噬的诱导^[36-38]。本研究显示,与正常对照组比较,ISO 模型组心肌纤维化 AMPK 活性明显受损,mTOR 激活增加;IVa 给药治疗后 p-AMPK 表达显著上调,mTOR 表达被抑制;ULK1-Ser757 磷酸化表达增加,激活下游自噬通路。上述结果表明 IVa 通过激活 AMPK-mTOR-ULK1 信号通路增强自噬,改善 ISO 诱导的心肌纤维化进展。

综上所述,IVa 通过 AMPK/mTOR/ULK1 途径激活自噬,减轻了 ISO 诱导的心肌纤维化。表明 IVa 是一种潜在的抗心肌纤维化候选药物,是治疗心脏病的潜在药物靶点。

参考文献(References)

- [1] 胡盛寿,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2018》概要[J]. 中国循环杂志,2019,34(3): 209-220
- [2] Verjans R, Peters T, Beaumont FJ, et al. MicroRNA-221/222 Family Counteracts Myocardial Fibrosis in Pressure Overload-Induced Heart Failure[J]. Hypertension, 2018, 71(2): 280-288
- [3] Yuan J, Liu H, Gao W, et al. MicroRNA-378 suppresses myocardial fibrosis through a paracrine mechanism at the early stage of cardiac hypertrophy following mechanical stress [J]. Theranostics, 2018, 8(9): 2565-2582
- [4] 邓晓娟,夏成,周红梅. 安立生坦对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌纤维化保护作用及机制研究 [J]. 解放军预防医学杂志, 2020, 38(2): 47-50
- [5] 王科科,黄穗青,黄少杰,等. 维替泊芬对异丙肾上腺素诱导小鼠心肌纤维化的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2020, 37(4): 693-696
- [6] 胡艳红,王雪,方靖漪,等. 人参-三七-川芎提取物对糖尿病小鼠心肌纤维化的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(8): 30-37
- [7] 韩凌,张晶晶,秦立. 人参皂苷 Rb3 通过 Neuregulin-1/ErbB 信号通路对心肌梗死大鼠 VE-cadherin, NRG-1, ErbB2, ErbB4 表达的影响 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2019, 11(2): 195-199
- [8] 彭程飞,李洋,刘丹,等. 人参皂苷 Rg1 抑制大鼠急性心肌梗死后心肌纤维化[J]. 中国循环杂志, 2017, 32(z1): 27
- [9] Yuan C, Liu C, Wang T, et al. Chikusetsu saponin IVa ameliorates high fat diet-induced inflammation in adipose tissue of mice through inhibition of NLRP3 inflammasome activation and NF- κ B signaling [J]. Oncotarget, 2017, 8(19): 31023-31040
- [10] Zabihollahy F, Rajan S, Ukwatta E. Machine Learning-Based Segmentation of Left Ventricular Myocardial Fibrosis from Magnetic Resonance Imaging[J]. Curr Cardiol Rep, 2020, 22(8): 65
- [11] Ambale-Venkatesh B, Liu CY, et al. Association of myocardial fibrosis and cardiovascular events: the multi-ethnic study of atherosclerosis [J]. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2019, 20(2): 168-176
- [12] Kong WKF, Bax JJ, Delgado V. Left ventricular myocardial fibrosis: a marker of bad prognosis in symptomatic severe aortic stenosis[J]. Eur Heart J, 2020, 41(20): 1915-1917
- [13] Jin L, Zhang J, Deng Z, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate myocardial fibrosis in diabetic cardiomyopathy via the secretion of prostaglandin E2[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 122
- [14] Raman B, Ariga R, Spartera M, et al. Progression of myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy: mechanisms and clinical implications[J]. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2019, 20(2): 157-167
- [15] 高嘉梦,胡兵,申铎. 心肌成纤维细胞转分化与糖尿病心肌病的研究进展[J]. 中华心血管病杂志, 2020, 48(10): 885-889
- [16] Ding J, Tang Q, Luo B, et al. Klotho inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy, fibrosis, and dysfunction in mice through suppression of transforming growth factor- β 1 signaling pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 859: 172549
- [17] 李琴,李言,高珊珊,等. 黄芪多糖抑制血管紧张素 II 诱导心肌肥大的作用途径[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(19): 3086-3091
- [18] 封晓荣,陈思宇,张岁龙,等. 上调 PTEN 表达对血管紧张素 II 诱导心肌成纤维细胞增殖迁移的影响[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2019, 11(2): 160-163
- [19] Yang C, Qiao S, Song Y, et al. Procollagen type I carboxy-terminal propeptide (PICP) and MMP-2 are potential biomarkers of myocardial fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy[J]. Cardiovasc Pathol, 2019, 43: 107150
- [20] 丁守坤,马艳玲,王光公,等. 原花青素抑制病毒性心肌炎大鼠心肌纤维化的机制[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(4): 549-554
- [21] 黄柳,贾妍,郭炳彦,等. RhoA/ROCK 通路在 2 型糖尿病大鼠心肌纤维化形成中的作用及法舒地尔的干预效果[J]. 新疆医科大学学报, 2020, 43(6): 701-706
- [22] Zong M, Zhao H, Li Q, et al. Irbesartan ameliorates myocardial fibro-

- sis in diabetic cardiomyopathy rats by inhibiting the TGF β 1/Smad2/3 pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(5): 117
- [23] 杜璵, 石开虎, 赵扬, 等. 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[J]. *现代生物医学进展*, 2019, 19(20): 3812-3817
- [24] Rockel JS, Kapoor M. Autophagy: controlling cell fate in rheumatic diseases[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 13(3): 193
- [25] 李帅, 鲍翠玉, 李晶. 自噬相关通路在糖尿病心脏病中的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(6): 753-756
- [26] 陈少青, 万全, 白婷婷, 等. 缺血性心脏病大鼠心肌细胞自噬在心肌重塑中的作用[J]. *中国应用生理学杂志*, 2019, 35(5): 396-399, 后插 2
- [27] 邹晋, 杨琴, 李宾公, 等. 自噬对急性心肌梗死后大鼠内皮细胞间质转分化及心肌纤维化的调节机制 [J]. *中国急救医学*, 2018, 38(12): 1099-1104, 后插 2, 封 3
- [28] Liu R, Zhang HB, Yang J, et al. Curcumin alleviates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and fibrosis through inhibition of autophagy and activation of mTOR [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(21): 7500-7508
- [29] 王超. 自分泌 / 旁分泌效应在缺血再灌注损伤心肌中活化单磷酸腺苷活化蛋白激酶的研究进展 [J]. *中国循环杂志*, 2017, 32(8): 826-829
- [30] Deng J, Zhang N, Chen F, et al. Irisin ameliorates high glucose-induced cardiomyocytes injury via AMPK/mTOR signal pathway[J]. *Cell Biol Int*, 2020, 44(11): 2315-2325
- [31] 唐丹丽, 石晓雯, 周明眉, 等. 瘀瘀同治方对缺氧复氧诱导心肌细胞 AMPK-mTOR 自噬信号通路的影响及机制 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38(4): 435-440
- [32] Wu A, Hu P, Lin J, et al. Activating Cannabinoid Receptor 2 Protects Against Diabetic Cardiomyopathy Through Autophagy Induction[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1292
- [33] Liu J, Long S, Wang H, et al. Blocking AMPK/ULK1-dependent autophagy promoted apoptosis and suppressed colon cancer growth[J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 336
- [34] Chen H, Tran D, Yang HC, et al. Dapagliflozin and Ticagrelor Have Additive Effects on the Attenuation of the Activation of the NLRP3 Inflammasome and the Progression of Diabetic Cardiomyopathy: an AMPK-mTOR Interplay [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2020, 34 (4): 443-461
- [35] Wang L, 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]. *Phytomedicine*, 2019, 58: 152764
- [36] Yang F, Qin Y, Wang Y, et al. Metformin Inhibits the NLRP3 Inflammasome via AMPK/mTOR-dependent Effects in Diabetic Cardiomyopathy[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(5): 1010-1019
- [37] Chen H, Tran D, Yang HC, et al. Dapagliflozin and Ticagrelor Have Additive Effects on the Attenuation of the Activation of the NLRP3 Inflammasome and the Progression of Diabetic Cardiomyopathy: an AMPK-mTOR Interplay [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2020, 34 (4): 443-461
- [38] Yang F, Zhang L, Gao Z, et al. Exogenous H₂S Protects Against Diabetic Cardiomyopathy by Activating Autophagy via the AMPK/mTOR Pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43 (3): 1168-1187

(上接第 4032 页)

- [23] Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting [J]. *Autophagy*, 2007, 3(6): 542-545
- [24] Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm [J]. *Essays in Biochemistry*, 2017, 61(6): 609-624
- [25] Kim Y C, Guan K-L. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2015, 125(1): 25-32
- [26] Wang Y, Zhang H. Regulation of Autophagy by mTOR Signaling Pathway [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, 1206: 67-83
- [27] Meijer A J, Lorin S, Blommaert E F, et al. Regulation of autophagy by amino acids and MTOR-dependent signal transduction [J]. *Amino Acids*, 2015, 47(10): 2037-2063
- [28] Sahota A, Tischfield J A, Goldfarb D S, et al. Cystinuria: Genetic aspects, mouse models, and a new approach to therapy [J]. *Urolithiasis*, 2019, 47(1): 57-66
- [29] Alelign T, Petros B. Kidney Stone Disease: An Update on Current Concepts[J]. *Advances in Urology*, 2018, 2018: 3068365
- [30] 刘丹骐, 雷俊, 黄凯, 等. 自噬在草酸诱导人肾小管上皮细胞损伤中的作用[J]. *中南大学学报(医学版)*: 1-6