

黄芪甲苷对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用及其自噬机制研究*

张斌¹, 马倩², 马富珍¹, 王静¹, 刘旭东^{1△}, 何儒华³

1. 宁夏医科大学总医院 心脏大血管外科(银川 750004); 2. 宁夏医科大学总医院肿瘤医院 麻醉科(银川 750004);
3. 宁夏医科大学总医院 心血管内科(银川 750004)

【摘要】目的 研究黄芪甲苷(AS-IV)对新生大鼠心肌细胞缺氧/复氧(H/R)损伤的保护作用,并探讨其潜在的作用机制。**方法** 提取并培养新生大鼠心肌细胞,随机分为6组:对照组, H/R组, H/R+低、中、高浓度AS-IV (AS-IV终浓度0.1 μmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L)组,和H/R+高浓度AS-IV (10 μmol/L)+AKT抑制剂(5 μmol/L)组。H/R前分组预处理心肌细胞(对照组和H/R组不进行预处理)48 h后,除对照组外,其余各组心肌细胞建立细胞H/R损伤模型。MTT法检测各组心肌细胞活力,实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测自噬基因LC3-II、p62的表达,Western blot 检测LC3-II、P62蛋白和磷脂酰肌醇3激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(PI3K/AKT)通路蛋白[包括AKT、磷酸化(p-)AKT(p-AKT)、p-雷帕霉素(p-mTOR)]和自噬启动因子未配位的51样激酶1(ULK1)的表达,免疫荧光染色检测心肌细胞自噬体P62的表达。**结果** AS-IV在本研究低、中、高浓度范围内以浓度依赖的方式改善H/R损伤下心肌细胞活力,并抑制H/R损伤后的心肌细胞自噬基因LC3-II和p62 mRNA和蛋白的表达,抑制ULK1蛋白的表达($P<0.05$),添加AKT抑制剂后,AS-IV的以上作用被部分抑制($P<0.05$)。AS-IV对AKT和mTOR蛋白的表达没有影响($P>0.05$),但可以促进AKT和mTOR的磷酸化($P<0.05$)。免疫荧光染色检测结果显示,高浓度AS-IV可以逆转H/R损伤诱导的自噬体P62的表达。**结论** AS-IV对H/R损伤心肌细胞具有保护作用,其作用机制可能是通过激活PI3K/AKT途径中的mTOR信号降低自噬水平,从而预防H/R损伤。

【关键词】 黄芪甲苷 缺氧/复氧损伤 PI3K/AKT通路 自噬

Astragaloside IV's Therapeutic Effect on Myocardial Infarction via Affecting Autophagy and the Mechanism Study
ZHANG Bin¹, MA Qian², MA Fu-zhen¹, WANG Jing¹, LIU Xu-dong^{1△}, HE Ru-hua³. 1. Department of Cardiovascular Surgery, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Department of Anesthesiology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 3. Department of Internal Medicine-Cardiovascular, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China
△ Corresponding author, E-mail: zhangj22@yeah.net

【Abstract】 Objective The purpose of this study was to investigate the protective effect of astragaloside IV (AS-IV) on neonatal rats' hypoxic/reoxygenated (H/R) injured myocardial cells and to explore its underlying mechanism. **Methods** Cardiac cells were extracted from newborn rats and divided into control, H/R, H/R-low AS-IV (0.1 μmol/L AS-IV), H/R-medium AS-IV (1 μmol/L AS-IV), H/R-high AS-IV (10 μmol/L AS-IV) and H/R-high AS-IV-AKT (10 μmol/L AS-IV+5 μmol/L AKT) groups. After 48 h of treatment, the contents of LC3-II, p62, AKT, pAKT, rapamycin (mTOR) mammalian targets and uncoordinated 51-like kinase 1 (ULK1) in cardiac myocytes were compared. Immunofluorescence staining was used to detect the expression of P62 in myocardium autophagosome. **Results** AS-IV improved the proliferative activity of cardio AS-IV improved the proliferative activity of cardiomyocytes in H/R injury in a dose-dependent manner and inhibited the level of cell autophagy. However, when AKT inhibitors were added, the effect of AS-IV was partially inhibited ($P<0.05$). Gene and protein expression showed that AS-IV had no significant effect on the expression of AKT and mTOR genes ($P>0.05$), but could significantly promote the phosphorylation of AKT and mTOR ($P<0.05$). Immunofluorescence staining results showed that high concentrations of the AS-IV can reverse H/R injury induced the expression of autophagy body P62. **Conclusion** AS-IV showed protection effect on H/R injured myocardial cells. The possible mechanism is by reducing the autophagy level via activating the mTOR signal in the PI3K/AKT pathway, thereby preventing H/R damage in neonatal rat cardiomyocytes.

【Key words】 Astragaloside IV Hypoxia/reoxygenation injury PI3K/AKT pathway Autophagy

近年来,冠心病的发病率和死亡率呈逐年上升的趋势,其中急性心肌梗塞(AMI)常表现出高致残率和高致

死率^[1]。AMI和冠状动脉血流中断引起的局部心肌细胞部分缺血、缺氧和坏死是AMI主要的表现之一。早期低氧心肌细胞的再灌注疗法是挽救垂死心肌的最有效的治疗方法。然而,再灌注引起的缺氧/复氧(H/R)损伤可能

* 宁夏自然科学基金项目(No. NZ15151)资助

△ 通信作者, E-mail: zhangj22@yeah.net

导致细胞死亡和大量细胞丢失,进一步扩大心肌缺血的范围,严重影响患者的存活率^[2]。目前已有大量关于H/R损伤机制的研究,主要集中于细胞凋亡和坏死^[3]。随着生物技术的不断发展,细胞自噬这一调节机制为有关H/R损伤机制的研究提供了新的思路^[4]。当心肌细胞受损时,大量受损的蛋白质和细胞器聚集于心脏,上调自噬水平以吞噬上述物质。处于动态平衡过程中的自噬在维持细胞稳态及发挥正常生物学功能中起着关键作用。在自噬平衡被打破,并出现异常升高后可能进一步加重损伤,甚至导致细胞凋亡。而自噬水平的异常增加可能是导致H/R损伤的另一个关键因素^[5]。自噬的调节过程复杂,目前研究较为广泛的是哺乳动物雷帕霉素靶标(mTOR)作为氨基酸和三磷酸腺苷(ATP)的受体,在自噬的调节中起关键作用^[6]。如已有研究证实,mTOR的活性能够影响自噬小体形成和成熟^[7]。还有研究证实,多种信号通路参与到自噬的调节中,而磷脂酰肌醇3激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(PI3K/AKT)通路是其中重要的调控通路之一^[8]。

黄芪甲苷(AS-IV)是从中草药黄芪中提取的主要有效成分^[9]。有研究表明,AS-IV通过调节tol样受体4/核因子- κ B信号通路来减轻大鼠心肌H/R损伤^[10]。HAEMMIG等^[11]通过研究Hes1蛋白表达的上调为AS-IV对H/R损伤引起的心肌细胞的保护能力提供了证据。然而,有关H/R损伤对心肌细胞的影响及其AS-IV对心肌细胞保护作用的可能机制研究仍不十分明确。因此,本研究通过研究AS-IV对H/R心肌细胞的保护作用及其自噬调节机制,为冠心病的治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

AS-IV(德斯特生物,中国),哌立福辛(Viva Bioscience,英国),胰蛋白酶溶液(Gibco BRL,美国),5-BrdU(Sigma-Aldrich Chemical Company,圣路易斯,美国),DMEM培养基(Gibco BRL,纽约州格兰德岛,美国),二甲亚砜(DMSO)(Sigma-Aldrich Chemical Company,圣路易斯,美国),甲基噻唑基四唑(MTT)试剂盒(南京建成,中国),Trizol试剂(生工,中国),BCA定量试剂(挪威赞,中国),自噬基因LC3-II、p62和 β -actin引物的设计及合成由中国生工生物公司完成。LC3-II、P62、PI3K、AKT、mTOR、自噬启动因子未配位的51样激酶1(ULK1)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(Abcam公司,美国)。

1.2 实验细胞的分离和培养

日龄1~3 d、体质量为5~8 g的健康新生Sprague-

Dawley雌性大鼠20只由北京维通利华公司提供。大鼠通过腹腔内注射氨基甲酸乙酯麻醉,在无菌条件下取出其心室肌组织,用冷PBS灌注3 min,并切成1 mm×1 mm×1 mm的小块,然后进行细胞分离和培养。用0.25%胰蛋白酶溶液反复消化组织小块。应用10%胎牛血清(FBS)的培养基终止消化。随后将细胞悬浮液过滤并以800×g离心1 min。将获得的细胞沉淀重悬后以 3×10^5 /孔的密度接种到96孔板中,在37℃、体积分数为5%CO₂的培养箱中培养,以使成纤维细胞黏附。然后,收获非贴壁细胞,并将5-BrdU(终浓度为0.1 mmol/L)添加到DMEM培养基持续24 h以抑制非心肌细胞的生长。在随后的实验之前,将培养基更改为无血清DMEM,将其孵育24 h。

1.3 心肌细胞分组和药物预处理

选择处于亚融合状态和良好搏动($15\sim 80\text{ min}^{-1}$)的心肌细胞,并通过随机数表将其分为6组:对照组,H/R,H/R+低、中、高浓度AS-IV,H/R+高浓度AS-IV+AKT抑制剂组。除对照组和H/R组(常规培养48 h)外,其余各组心肌细胞在H/R前采用不同的药物进行预处理:H/R+低、中、高浓度AS-IV组分别加终浓度0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 的AS-IV;H/R+高浓度AS-IV+AKT抑制剂组中加入AS-IV 10 $\mu\text{mol/L}$ 和AKT抑制剂5 $\mu\text{mol/L}$ 。将所有细胞分别在37℃、体积分数为5%CO₂下培养48 h。

1.4 心肌细胞H/R损伤模型的建立

除对照组外,其余各组参考文献^[11]建立细胞H/R损伤模型。将细胞置于具有N₂(99.9%,5 L/min)的密闭容器中,添加缺氧培养基[(NaH₂PO₄ 0.9 mmol/L,NaHCO₃ 6.0 mmol/L,CaCl₂ 1.2 mmol/L,MgSO₄ 1.2 mmol/L,乳酸钠 40 mmol/L,HEPES 20 mmol/L,NaCl 98.5 mmol/L,KCl 10 mmol/L,pH 6.8,37℃,氧气压力<10 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)]。10 min后,将N₂流速更改为1 L/min,然后将密闭的容器在缺氧条件下于37℃的培养箱中培养3 h,然后移出培养板,并用正常培养基替换缺氧培养基(正常培养基包括:5.5 mmol/L葡萄糖1 000 mL,含DMEM 13.4 g,HEPES 4.76 g,NaHCO₃ 1.85 g,青霉素1 000 U,链霉素1 mg,FBS 100 mL;pH 7.34~7.45;37℃;氧气压力150 mmHg)。将细胞在37℃、体积分数为5%CO₂的培养箱中培养2 h,进行复氧。对照组细胞常规培养5 h。

1.5 心肌细胞的形态观察和活力检测

复氧2 h后在倒置光学显微镜镜下观察各组心肌细胞形态,然后除去培养基。添加DMEM培养基(100 μL /孔)和含有0.5%MTT的培养液(5 μL /孔)。在37℃、体积分数为5%CO₂的培养箱中孵育48 h后,弃去培养液。然后,添

加100 μL DMSO, 并振荡10 min。待晶体溶解后置于波长为490 nm的酶标仪进行光密度(OD)值检测, 常规计算细胞活力, 并以对照组的细胞活力为1, 计算其它各组细胞的相对活力。所有实验均独立重复3次。

1.6 实时荧光定量PCR (RT-qPCR) 检测自噬基因的mRNA表达

采用Trizol试剂进行各组细胞总RNA的提取, 并确定RNA纯度和浓度。将1 μg 总RNA逆转录为cDNA, 收集5 μL cDNA并稀释4倍。然后, 以2 μL cDNA为模板, 分别在LC3- II、p62和内参基因 β -actin引物下, 分别进行RT-qPCR检测。PCR引物序列见表1。RT-qPCR的扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s, 然后95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40个循环。溶解曲线为95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。应用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算LC3- II和p62的相对表达量, 并以对照组目的mRNA的表达为1, 计算其他各组目的mRNA的相对表达量。实验重复3次。

表 1 PCR引物序列
Table 1 Gene sequences

Gene		Primer sequence (5'-3')
LC3- II	Forward	TGTTTGGTATGGAGAGTGTGGA
	Reverse	GGACACCTGGACAGGAACTG
p62	Forward	GAGGCACCCCGAAACATGG
	Reverse	ACTTATAGCGAGTTCCACCA
β -actin	Forward	GCAAGGACCTCTATGCCAACA
	Reverse	GAAGCATTTGCGGTGGACG

1.7 免疫印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白的表达

用PBS洗涤各组细胞, 加入细胞裂解液RIPA裂解细胞, 提取胞内总蛋白, 用BCA法测定蛋白浓度。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离30 μg 蛋白, 并在100 V恒压下转移至膜中60~90 min, 然后将其分离。用5%脱脂奶/TBS和0.1%Tris缓冲盐水和Tween(TBST)在常温下进行密封1~2 h后添加各抗体, 1:500 LC3- II、1:500 P62、1:3000 PI3K总蛋白、1:3000 AKT、1:1000 p-AKT、1:500 mTOR、1:500 ULK1, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。 β -actin 1:5000在室温下孵育1.5 h, 并用TBST清洗膜(10 min $\times$ 3次)。添加二抗在室温下孵育2 h。洗膜5 min后电化学发光(ECL)检测和显色, 通过使用DOXTM XR+凝胶成像系统完成成像^[12], 拍照并测定各显色条带的灰度值, 以目的条带与 β -actin灰度值的比值为目的蛋白的表达量, 再以对照组目的蛋白的表达量为1,

计算其他各组目的蛋白的相对表达量。

1.8 免疫荧光检测自噬体

当P62和LC3发生结合后能够有效促进自噬, 因此用P62蛋白的表达情况间接反映自噬水平。取对照组、H/R组、H/R+10 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV组和H/R+10 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV+5 $\mu\text{mol/L}$ AKT抑制剂组细胞制备细胞载玻片, 并通过免疫荧光染色检测心肌细胞P62蛋白的表达情况。操作严格按试剂盒说明进行, 使用Leica AS MDW多维成像工作站收集免疫荧光图像。细胞核发出蓝色荧光, 而P62发出绿色荧光。在相同的曝光时间和相同的条件观察以上4组细胞P62蛋白的表达。

1.9 统计学方法

计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组心肌细胞的形态和活力

如图1所示, 对照组和H/R+10 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV组细胞呈棱柱形, 附着好, 结构紧密。H/R+10 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV+5 $\mu\text{mol/L}$ AKT抑制剂组镜下可见细胞密度较低, 其细胞呈椭圆形, 少部分细胞出现液泡状改变。由图2可见, 与对照组相比, H/R组、H/R+0.1 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV或+1 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV或+10 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV+5 $\mu\text{mol/L}$ AKT抑制剂组细胞活力下降, 且差异有统计学意义($P < 0.05$), 而H/R+10 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV组无明显变化($P > 0.05$)。与H/R组相比, AS-IV在0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 范围内以浓度依赖的方式改善H/R损伤下心肌细胞的增殖活性, H/R+1 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV组或+10 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV组较H/R组细胞活力升高($P < 0.05$)。结果表明, H/R损伤可以抑制心肌细胞的增殖, 而中、高浓度的AS-IV可以抵抗H/R损伤引起的细胞增殖抑制, AKT抑制剂可以降低AS-IV的作用。

2.2 各组心肌细胞自噬基因和蛋白表达水平的变化

如图3和图4所示, H/R、H/R+0.1 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV或+1 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV和H/R+10 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV+5 $\mu\text{mol/L}$ AKT抑制剂组的LC3- II和p62 mRNA和蛋白表达水平高于对照组, 且差异有统计学意义($P < 0.05$); 而H/R+10 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV组与对照组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与H/R组相比, H/R+1 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV或H/R+10 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV组中LC3- II和p62的mRNA和蛋白表达水平均降低($P < 0.05$)。

2.3 各组心肌细胞AKT、p-AKT、p-mTOR和ULK1蛋白的表达变化

与对照组相比, 所有治疗组的AKT和mTOR蛋白表

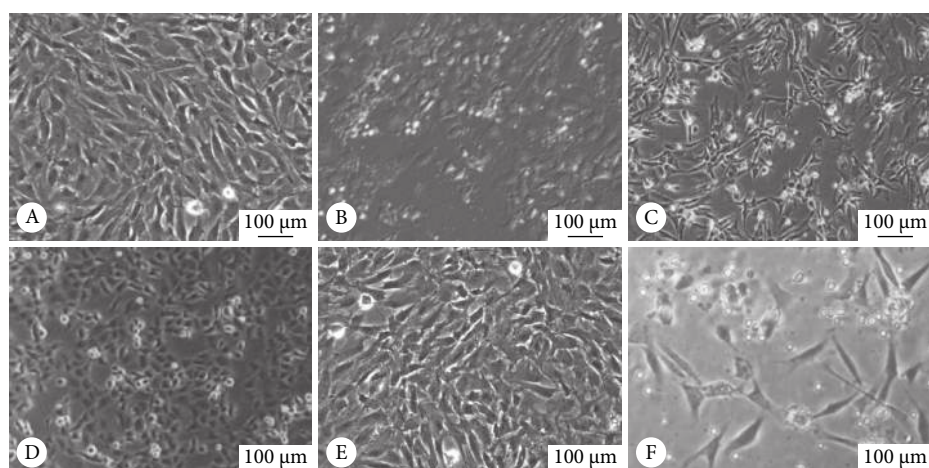
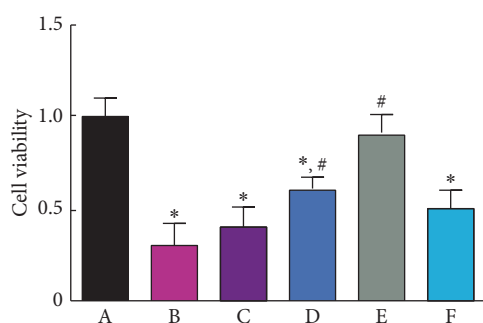


图1 各组心肌细胞形态

Fig 1 Cardiac cell morphology of each group

A: Control group; B: H/R group; C: H/R+0.1 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV group; D: H/R+1 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV group; E: H/R+10 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV group; F: H/R+10 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV + 5 $\mu\text{mol/L}$ perifosine group.

图2 MTT检测不同处理组细胞活力 ($n=5$)Fig 2 Detection of MTT cell viability in different treatment groups ($n=5$)

A-F: Same notes as fig 1. * $P<0.05$, vs. control group; # $P<0.05$, vs. H/R group.

达水平无明显变化, H/R、H/R+0.1 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV、H/R+1 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV和H/R+10 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV+5 $\mu\text{mol/L}$ AKT抑制剂组p-AKT和p-mTOR的表达水平均降低 ($P<0.05$), 而ULK1表达水平增加 ($P<0.05$), H/R+10 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV组p-AKT、p-mTOR和ULK1表达水平无

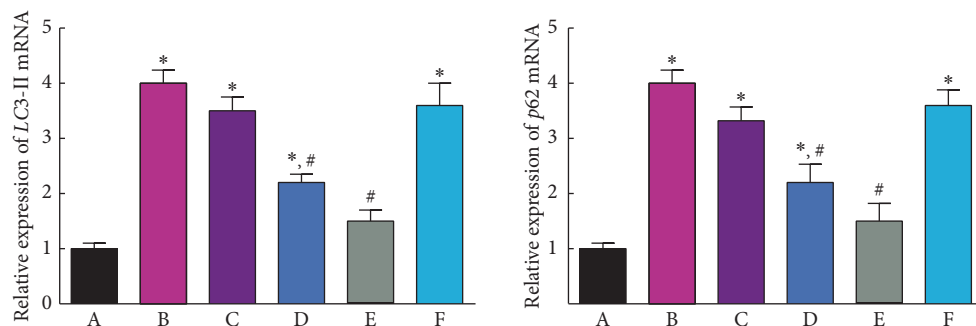
明显变化 ($P>0.05$)。与H/R组相比, H/R+1 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV或+10 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV组的p-AKT和p-mTOR表达水平增加 ($P<0.05$), 而ULK1的蛋白表达水平降低 ($P<0.05$), 见图5。

2.4 黄芪甲苷对H/R诱导的心肌细胞自噬体形成的影响

如图6所示, H/R和H/R+10 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV+5 $\mu\text{mol/L}$ AKT抑制剂组形成的自噬体较对照组和H/R+10 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV组更多。该结果表明, H/R损伤可诱导心肌细胞自噬体形成, 高浓度AS-IV可以逆转H/R损伤诱导的细胞自噬。

3 讨论

缺血性心脏病是由冠状动脉粥样硬化引起的长期心肌缺血, 致使心肌弥漫性纤维化并产生与特发性扩张型心肌病表征相似的一类心脏系统疾病, 是最常见的临床疾病之一, 对人体健康的危害越来越大^[13]。及时恢复血流灌注以实现冠状动脉再通是一种有效的治疗方法, 但

图3 细胞自噬基因LC3-II和p62的表达 ($n=5$)Fig 3 Expression of autophagy genes LC3-II and p62 ($n=5$)

A-F: Same notes as fig 1. * $P<0.05$, vs. A group; # $P<0.05$, vs. B group.

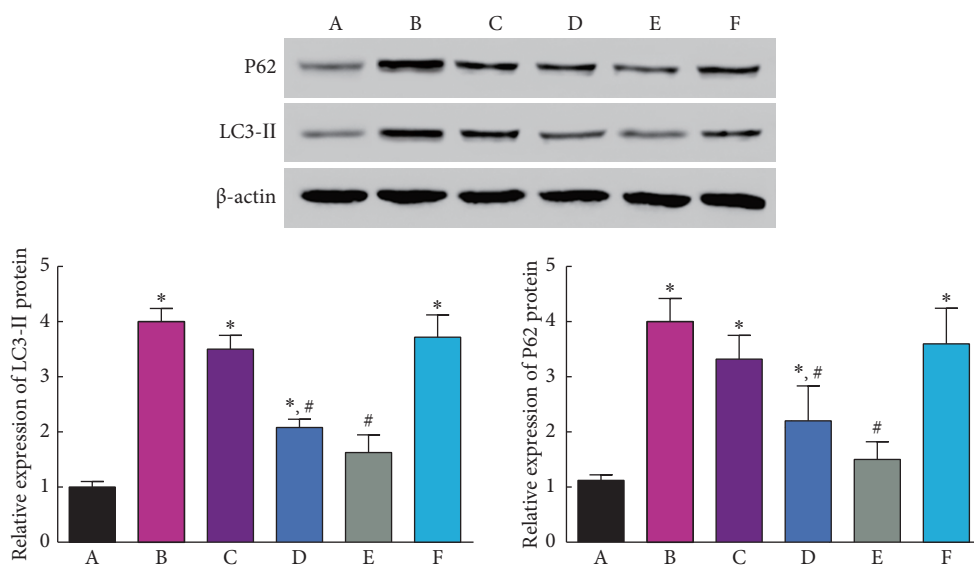


图 4 细胞自噬蛋白LC3- II 和P62的表达 (n=5)

Fig 4 Expressions of autophagy proteins LC3- II and P62 (n=5)

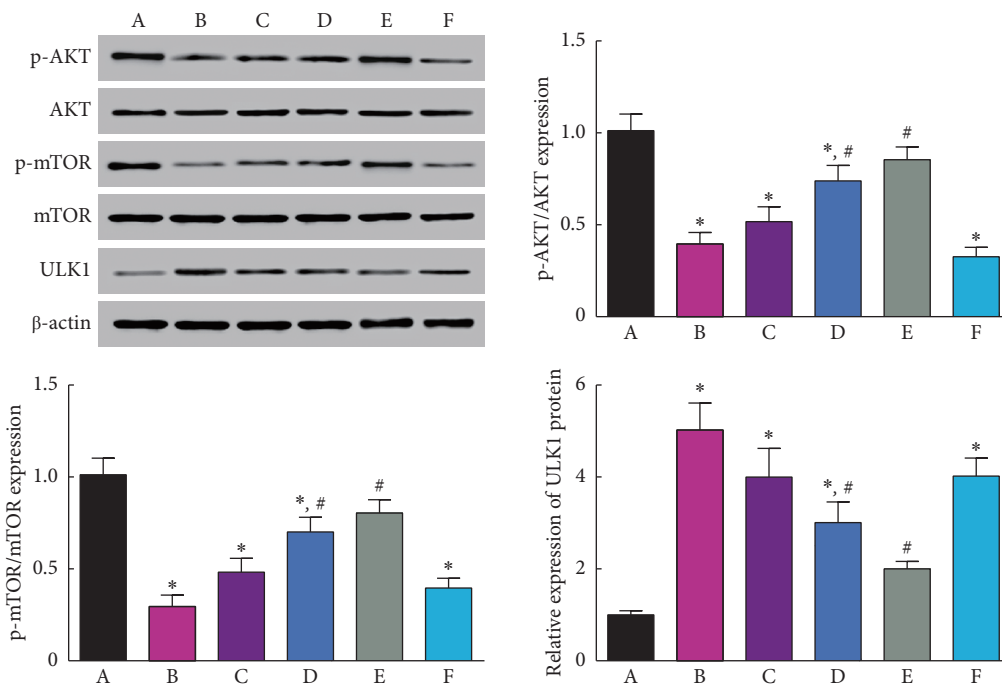
A-F: Same notes as fig 1. * $P < 0.05$, vs. A group; # $P < 0.05$, vs. B group.

图 5 各组相关通路蛋白的表达 (n=5)

Fig 5 Expressions of related pathway proteins in each group (n=5)

A-F: Same notes as fig 1. * $P < 0.05$, vs. A group; # $P < 0.05$, vs. B group.

是组织器官的再灌注将带来新的和不可避免的心肌缺血和再灌注损伤^[14]。目前随着研究的愈发深入,自噬的概念为缺血再灌注损伤的机制提供了新的视角^[4]。LC3包括LC3- I、LC3- II两个亚型。先前的研究发现自噬底物蛋白P62,其泛素化靶蛋白聚集体的降解与自噬途径有关,当P62和LC3发生结合后能够有效促进自噬,因此

P62蛋白的表达情况间接反映自噬的水平^[15]。自噬小体增加和自噬生物标志物的表达升高可以直接反映自噬水平^[16]。清华大学李丕龙与俞立课题组合作证实,P62识别目的蛋白上的多聚泛素化链,通过相分离的机制形成P62小体,进而介导自噬小体的形成^[17]。本研究结果显示,与对照组相比,H/R损伤组心肌细胞活力降低,自噬

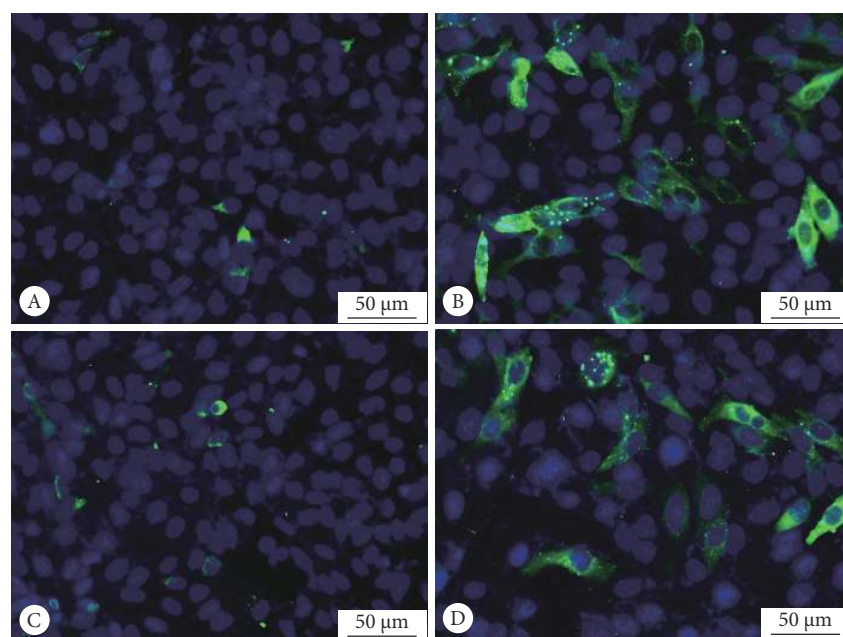


图6 不同处理组自噬水平免疫荧光情况

Fig 6 Autophagy immunofluorescence in different treatment groups

A: Control group; B: H/R group; C: H/R+10 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV group; D: H/R+10 $\mu\text{mol/L}$ AS-IV+5 $\mu\text{mol/L}$ perifosine group.

生物标志物LC3-II和p62基因和蛋白的表达水平增加,细胞内自噬小体P62蛋白表达增加,提示H/R损伤促进自噬。心脏中自噬水平稳态的保持在细胞器的更新中起重要作用。当心脏处于压力或受损状态时(例如缺血和再灌注、心肌肥大和心力衰竭)时,心脏中会聚集大量受损的蛋白质和亚细胞结构的细胞器成分。为了有效去除这些受损的蛋白质和细胞器成分,自噬在其中扮演着重要的角色^[18]。众所周知,心脏是高能消耗器官,心肌细胞是终末分化的细胞,能否维持能量平衡将直接决定心肌细胞的存活情况。自噬可以通过对坏死的细胞器或受损的蛋白质进行有效分解便于机体细胞的再利用,这对于维持细胞功能至关重要。因此,自噬对维持脏器及功能的稳态非常重要,但发挥有益作用的前提在于其处于一种动态平衡的状态,越来越多的自噬研究通过对自噬流水平的观察从而判断其稳态平衡性。因为过度或自噬缺乏均能破坏机体发挥正常功能^[19]。已有研究证实自噬可以去除缺血再灌注过程中受损的细胞器,但当细胞内物质和细胞器超过一定阈值时,就会发生自噬细胞死亡^[20]。本研究通过细胞形态、细胞活力及自噬水平的检测指标发现,与对照组比较,H/R造成心肌细胞出现过度自噬,而施加高浓度AS-IV处理后,降低了自噬水平,且可逆转H/R造成的细胞自噬现象。因此,我们认为AS-IV能够通过有效控制心肌细胞自噬水平保护心肌细胞免受

H/R造成的损害。

自噬的调控过程复杂,其启动的关键环节是mTOR的相关靶标,包括TOR复合物1(TORC1)和PI3K^[5]。PI3K/AKT途径的激活被传递到TORC1,然后mTOR被激活,从而抑制自噬水平。因此,PI3K/AKT途径是mTOR的最关键的上游途径之一^[21]。体内外实验证明,PI3K/AKT/mTOR可以保护神经元,帮助细胞抵抗H₂O₂引起的细胞损伤,并避免H₂O₂引起的细胞自噬损伤^[22]。此外,PI3K/AKT/mTOR信号通路可以被胰岛素样生长因子-1(IGF-1)激活,从而保护神经元免受N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)诱导的毒性。同时,细胞自噬的过程也可以调整^[23]。这些结果表明,有可能通过激活PI3K/AKT/mTOR信号通路来调节细胞自噬并保护细胞本身。此外,PI3K/AKT/mTOR在细胞自噬中起关键作用。本研究结果显示,与对照组相比,H/R组的p-AKT和mTOR水平明显降低,自噬水平升高,细胞活力降低。PI3K/AKT/mTOR途径的激活对控制受损心肌细胞的自噬和提高细胞活力具有重要意义。

既往研究表明,AS-IV能够对心肌梗死起到一定的治疗作用^[10]。但是,关于AS-IV对H/R损伤心肌细胞的作用机制,尚未深入探讨。本研究发现,在用高浓度的AS-IV+AKT抑制剂治疗后,细胞活力和自噬水平与H/R组相比没有显著变化。另外,用高浓度的AS-IV处理后,p-AKT和mTOR的表达增加。这些结果表明AS-IV可能影响PI3K/AKT/mTOR通路。该结果进一步证明AS-IV可能通

过激活PI3K/AKT途径在自噬抑制和细胞保护中起作用。

本研究结果显示,与H/R组对比,中/高浓度AS-IV处理心肌细胞后,细胞活力明显增加,自噬体数目减少,LC3-II和p62基因和蛋白表达下降,说明AS-IV能够通过调节自噬水平从而治疗受损的心肌细胞。我们进一步分析了PI3K/AKT/mTOR途径调节自噬水平的机制。ULK1是自噬起始复合物的重要成分,并参与自噬的起始^[24]。与H/R组相比,中/高浓度AS-IV处理H/R细胞后,ULK1的表达水平降低。加入AKT抑制剂后,其表达水平明显升高。结果表明,细胞自噬从一开始就受到抑制。这些实验证明AS-IV处理对ULK1基因的表达有影响,这可以通过PI3K/AKT/mTOR实现。这些结果还证明,AS-IV可以在初始阶段调节细胞自噬,因此高剂量的AS-IV可以对细胞提供良好的保护作用。然而本研究缺少体内动物实验及临床样本的验证,在未来的研究中我们将进一步探讨AS-IV在体内H/R模型的作用及其对自噬流的影响。

综上所述,本研究证实AS-IV可以通过调节自噬从而保护被H/R损伤的心肌细胞。而AS-IV对心肌细胞的保护作用可能通过激活PI3K/AKT/mTOR信号通路实现。

参 考 文 献

- [1] 李飞翔, 赵阳. 老年冠心病合并心力衰竭患者肠道菌群特征性研究. *中华老年医学杂志*, 2019, 38(11): 1220-1222.
- [2] 吴嘉美, 滕松, 张越. miRNAs在心血管疾病中的研究进展. *沈阳医学院学报*, 2018, 20(5): 460-463.
- [3] HOJO Y, SAITO T, KONDO H. Role of apoptosis in left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *J Cardiol*, 2012, 60(2): 91-92.
- [4] 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. *中国应用生理学杂志*, 2019, 35(5): 396-399.
- [5] 谢胜, 刘洪武, 黎丽群, 等. 背俞指针疗法对GERD大鼠食管下端组织的ICC内质网AMPK/mTOR自噬通路的影响. *中华中医药学刊*. (2020-09-14) [2020-09-21]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20200914.1501.018.html>.
- [6] ZHANG H J, FEI F C, YAN L, *et al*. More serious autophagy can be induced by ZnO nanoparticles than single-walled carbon nanotubes in rat tracheal epithelial cells. *Environ Toxicol*, 2021, 36(2): 238-248.
- [7] GHAVAMI S, GUPTA S, AMBROSE E, *et al*. Autophagy and heart disease: implications for cardiac ischemia-reperfusion damage. *Curr Mol Med*, 2014, 14(5): 616-629.
- [8] FAN S N, ZHANG B, LUAN P, *et al*. PI3K/AKT/mTOR/p70S6K pathway is involved in A[beta]25-35-induced autophagy. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 161020[2020-07-08]. <https://doi.org/10.1155/2015/161020>.
- [9] 杨广安, 马海霞, 谭琪明, 等. HPIC-EISD法测定黄芩精粉中黄芩甲苷的含量. *广东化工*, 2019, 46(21): 134-135.
- [10] 王丽娟, 沈洁, 王丽华. 黄芩甲苷对病毒性心肌炎小鼠内质网应激及炎症反应的影响. *解放军医药杂志*, 2019, 31(12): 6-11.
- [11] HAEMMIG S, SIMION V, YANG D. Long noncoding RNAs in cardiovascular disease, diagnosis, and therapy. *Curr Opin Cardiol*, 2017, 32(6): 776-783.
- [12] YANG B, LIN H, XIAO J. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med*, 2007, 13(4): 486-491.
- [13] O'DONNELL C J, NABEL E G. Genomics of cardiovascular disease. *N Engl J Med*, 2011, 365(22): 2098-2109.
- [14] MØLGAARD S, FARICELLI B, SALOMONSSON M, *et al*. Increased myocardial vulnerability to ischemia-reperfusion injury in the presence of left ventricular hypertrophy. *J Hypertens*, 2016, 34(3): 513-523.
- [15] O'DONNELL T B, HYDE J L, MINTER N J D, *et al*. Mouse Norovirus infection promotes autophagy induction to facilitate replication but prevents final autophagosome maturation. *Virology*, 2016, 492: 130-139.
- [16] JIANG P, MIZUSHIMA N. LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells. *Methods*, 2015, 75: 13-18.
- [17] SUN D X, WU R B, ZHENG J X, *et al*. Polyubiquitin chain-induced p62 phase separation drives autophagic cargo segregation. *Cell Res*, 2018, 28(4): 405-415.
- [18] 潘震华, 赵悦, 于宏颖, 等. 饱和氢盐水对心肌缺血再灌注损伤老年大鼠心肌细胞自噬的影响. *中华医学杂志*, 2015, 95(25): 2022-2026.
- [19] FEI Q, MA H, ZOU J, *et al*. Metformin protects against ischaemic myocardial injury by alleviating autophagy-ROS-NLRP3-mediated inflammatory response in macrophages. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 145: 1-13[2020-07-08]. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.05.016>.
- [20] KIRSCHENBAUM L A. Regulation of autophagy in the heart in health and disease. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2012, 60(2): 109[2020-07-08]. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31825f6faa>.
- [21] YANG H, LI L, ZHOU K, *et al*. Shengmai injection attenuates the cerebral ischemia/reperfusion induced autophagy via modulation of the AMPK, mTOR and JNK pathways. *Pharm Biol*, 2016, 54(10): 2288-2297.
- [22] WANG M, LI Y J, DING Y, *et al*. Silibinin prevents autophagic cell death upon oxidative stress in cortical neurons and cerebral ischemia-reperfusion injury. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(2): 932-943.
- [23] WANG Y, WANG W, LI D G, *et al*. IGF-1 alleviates NMDA-induced excitotoxicity in cultured hippocampal neurons against autophagy via the NR2B/PI3K-AKT-mTOR pathway. *J Cell Physiol*, 2014, 229(11): 1618-1629.
- [24] PETHERICK K J, CONWAY O J L, MPAMHANGA C, *et al*. Pharmacological inhibition of ULK1 kinase blocks mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent autophagy. *J Biol Chem*, 2015, 290(18): 11376-11383.

(2020-06-06收稿, 2020-09-22修回)

编辑 沈进