

· 基础研究 ·

康心饮对缺血性心肌病大鼠心肌凋亡及
PI3K/Akt/FoxO1 信号通路的影响郭进建¹ 楼莉峰² 钟剑平² 李 滨² 陈萍萍²

摘要 **目的** 观察康心饮对缺血性心肌病(ICM)大鼠心肌凋亡及 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路的影响,探讨其对 ICM 的作用及可能机制。**方法** 66 只大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组、卡托普利组及康心饮低、中、高剂量组,每组 11 只。采用左前降支结扎法制备缺血性心肌病模型。模型组予生理盐水 10 mL/(kg·d)早晚灌胃,卡托普利组予卡托普利 2.86 mg/(kg·d)早晚灌胃,康心饮低、中、高组分别予康心饮 9.2、18.4、36.8 g/(kg·d)早晚灌胃,给药 2 周。TUNEL 法检测心肌凋亡情况,Western blot 检测 Bcl-2、Bax、Caspase-3、PI3K、Akt、FoxO1 蛋白表达,RT-PCR 检测 PI3K、Akt、FoxO1 mRNA 表达。**结果** 与假手术组比较,模型组心肌凋亡增多($P < 0.05$),Bax、Caspase-3 蛋白表达量升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),Bcl-2 蛋白表达量下降($P < 0.01$),PI3K、p-Akt、p-FoxO1 蛋白和 PI3K、Akt、FoxO1 mRNA 表达均下降($P < 0.05$);与模型组比较,康心饮组低、中、高剂量和卡托普利组心肌凋亡均明显减少($P < 0.01$),Bax 和 Caspase-3 蛋白表达下降,Bcl-2 蛋白表达增加(均 $P < 0.05$),PI3K、p-Akt、p-FoxO1 蛋白及 PI3K、Akt、FoxO1 mRNA 表达均升高($P < 0.01$),且康心饮高剂量组和卡托普利组优于康心饮低、中剂量组($P < 0.05$)。**结论** 康心饮可能通过激活 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路,抑制 ICM 心肌细胞凋亡。

关键词 缺血性心肌病;细胞凋亡;PI3K/Akt/FoxO1 信号通路;康心饮

Effect of Kangxin Decoction on Cardiomyocyte Apoptosis and PI3K/Akt/FoxO1 Signaling Pathway in Ischemic Cardiomyopathy Rats Model GUO Jin-jian¹, LOU Li-feng², ZHONG Jian-ping², LI Bin², and CHEN Ping-ping² 1 Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350003); 2 Second Clinical College of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350122)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Kangxin Decoction on the cell apoptosis in a rat model of ischemic cardiomyopathy (ICM), and to explore the underlying mechanisms, including its effects on the expression of PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway. **Methods** Sixty-six rats were randomly divided into six groups: the sham group, the model group, the Captopril group, the low dose Kangxin Decoction group, the middle dose Kangxin Decoction group, and the high dose Kangxin Decoction group, 11 in each group. The model rat was established by ligating the left anterior descending artery (LAD). Captopril at 2.86 mg·kg⁻¹·d⁻¹, and Kangxin Decoction at 9.2, 18.4, and 36.8 g·kg⁻¹·d⁻¹ were administered to rats in the Captopril group and three Kangxin Decoction groups by gastrogavage, respectively. All the medication was performed twice daily and continued for two weeks. The model group was fed with the same volume of saline (10 mL·kg⁻¹·d⁻¹). Cell apoptosis was observed by TUNEL, the expressions of Bcl-2, Bax, Caspase-3, PI3K, Akt and FoxO1 protein were detected by Western blot, and PI3K, Akt, FoxO1 mRNA detected by RT-PCR. **Results** Compared with the sham group, cardiomyocytes apoptosis was significantly increased in model group ($P < 0.05$), the expression of Bax and Caspase-3 protein were remarkably up-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$) while Bcl-2 down-regulated ($P < 0.01$); the expression of PI3K, p-Akt, p-

基金项目:福建省自然科学基金资助(No. 2013J01326)

作者单位:1. 福建中医药大学附属第二人民医院心内科(福州 350003);2. 福建中医药大学第二临床医学院(福州 350122)

通讯作者:郭进建, Tel: 0591-87878193, E-mail: eugojj@163.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20170802. 193

FoxO1 protein and PI3K, Akt, FoxO1 mRNA were all remarkably down-regulated (all $P < 0.05$). Compared with the model group, cardiomyocytes apoptosis was significantly reduced in three Kangxin Decoction groups and Captopril group (all $P < 0.01$), the expression of Bax and Caspase-3 protein were remarkably down-regulated while Bcl-2 up-regulated (all $P < 0.05$); the expression of PI3K, p-Akt, p-FoxO1 protein and PI3K, Akt, FoxO1 mRNA were all remarkably up-regulated (all $P < 0.01$). Such effects were more significant in high dose Kangxin Decoction group and Captopril group than in low or middle dose Kangxin Decoction group (all $P < 0.05$). Conclusion Kangxin Decoction could reduce cardiomyocyte apoptosis in ICM rats, which may be the results of its activating of PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway.

KEYWORDS ischemic cardiomyopathy; cell apoptosis; PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway; Kangxin in Decoction

缺血性心肌病 (ischemic cardiomyopathy, ICM) 为冠状动脉粥样硬化病变使心肌慢性缺血导致心肌细胞坏死、心肌纤维化形成的疾病, ICM 是慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF) 的常见病因, 约占所有 CHF 病因的 50% 左右^[1]。有研究表明凋亡是缺血性心肌细胞死亡的一种常见的形式, 在心肌梗死后的急性期和慢性期都发现有凋亡的心肌细胞的存在^[2]。ICM 归属于中医学“胸痹”、“心悸”、“喘证”等范畴, 病机以阳气虚衰为本, 血瘀、痰凝、水停为标。可是, 迄今为止, 尚未见温阳化痰行水法作用于 ICM 心肌细胞凋亡及对 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路的研究。因此, 本研究通过制备 ICM 大鼠模型, 观察康心饮对大鼠心肌细胞凋亡和 PI3K/Akt/FoxO1 信号转导通路的影响, 探讨其作用可能的分子机制。

材料与方法

1 动物 66 只雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体重 (200 ± 20) g, 约 6 周龄。由上海斯莱克实验动物有限公司出售, 许可证号: SCXK (沪) 2012—0002。饲养于福建医科大学动物中心实验室。

2 药物 康心饮由炙黄芪 30 g 当归 10 g 葶苈子 10 g 炮附子 10 g 猪苓 15 g 桂枝 10 g 三七 5 g 水蛭 10 g 鹿衔草 15 g 组成, 由福建省第二人民医院制剂室制成汤剂。卡托普利片 (25 mg/片, 汕头金石制药总厂, 批号: H44024904)。

3 主要试剂与仪器 主要试剂: 原位细胞凋亡检测试剂盒 (美国 Roche 公司, 批号: 11684817910); 超敏 ECL 化学发光试剂盒 (碧云天生物技术研究, 批号: P0018); 一抗 Bax (批号: 2772S)、Bcl-2 (批号: 2786S)、Caspase (批号: 9662P)、PI3K (批号: 3821S)、p-Akt (批号: 4058S)、Akt (Cell Signaling Technology 公司, 批号: 9272); FoxO1 (批号: BS3573)、p-FoxO1 (Bioworld Technology 公司, 批号: BS4711)。主要仪器: SAR-830

小动物呼吸机 (美国 IITC 公司); TS100 倒置显微镜 (日本尼康公司); 多功能真彩色细胞图象分析管理系统 (美国 Media Cybernetics 公司); Bio-TEK Elx 800 酶标仪 (美国宝特公司); Bio-Rad Mini-Protein 小垂直板电泳槽、Trans-Blot Turbo 转膜仪、ChemiDoc XRS 化学发光成像仪和 GEL DOC 2000 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

4 动物模型制备及分组 参照参考文献 [3, 4], 采用冠状动脉左前降支结扎法制备缺血性心肌病模型大鼠。大鼠麻醉, 气管插管, 接呼吸机, 胸骨左缘第 4 肋间开胸, 冠脉左前降支走行于左心耳与动脉圆锥之间深处, 无创小圆针 7-0 丝线结扎, 可见左室前壁出现缺血紫绀, 心电图 ST 段弓背向上抬高。假手术模型在相同部位只穿线不结扎, 其他操作同模型组。按照随机数字表法随机分为假手术组, 模型组, 卡托普利组, 康心饮低、中、高剂量组, 每组 11 只。从造模开始到造模后喂养期间, 大鼠死亡数分别是: 模型组 3 只, 卡托普利组 2 只, 康心饮低、中、高剂量组分别为 3、1、2 只, 大鼠成活率为 83.3%。死亡的原因有术中操作不当造成大出血, 术后发生气胸、心律失常等。

5 给药及取材方法 参照参考文献及本课题组前期研究方案^[4-6], 大鼠术后常规喂养 4 周, 第 5 周开始, 假手术组和模型组予生理盐水 10 mL/(kg · d) 早晚灌胃; 卡托普利组予卡托普利 2.86 mg/(kg · d) 早晚灌胃给药; 康心饮低、中、高组分别予康心饮 9.2、18.4、36.8 g/(kg · d) 早晚灌胃给药, 分别相当于成人用量的 3、6、12 倍。灌胃治疗 2 周结束后, 沿大鼠左室短轴切取心肌组织, 分别快速放入冰 4% 多聚甲醛和液氮中保存备用, 用 4% 多聚甲醛固定的组织, 常规进行脱水、浸蜡、包埋。

6 检测指标及方法

6.1 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡 心肌组织切片常规脱蜡至水, 用蛋白酶 K (20 μg/mL 溶于

Tris/HCl 中,pH 7.4 ~8.0) 室温孵育 15 ~30 min, 37 ℃孵育 15 min;标记:滴加 50 μL 的 TUNEL 反应混合溶液,在湿盒中 37 ℃孵育 60 min,PBS 冲洗 3 次;信号转化和分析:加入 50 μL 转化剂-POD,在湿盒中 37 ℃孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次,加入 50 ~100 μL DAB 底物溶液,室温孵育 10 min,PBS 冲洗 3 次;苏木素复染细胞核,封片,光镜镜检分析。

6.2 Western blot 检测 Bcl-2、Bax、Caspase-3、PI3K、Akt、FoxO1、p-Akt、p-FoxO1 表达 将保存于液氮的心肌组织加入蛋白裂解液进行研磨匀浆,于 4 ℃ 13 000 r/min 离心 15 min,取上清液进行蛋白浓度的测定(BCA 法)。样品经过加样;跑胶;转膜(湿转);封闭;一抗孵育:兔抗大鼠 Bcl-2 (浓度 1:5 000)、兔抗大鼠 Bax (浓度 1:5 000)、兔抗大鼠 Caspase-3 (浓度 1:5 000)、兔抗大鼠 PI3K (浓度 1:2 000)、兔抗大鼠 Akt (浓度 1:2 000)、兔抗大鼠 p-Akt (浓度 1:2 000)、兔抗大鼠 FoxO1 (浓度 1:2 000)、兔抗大鼠 p-FoxO1 (浓度 1:2 000),于 4 ℃冰箱内摇床上过夜(至少 12 h);二抗孵育:加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔(浓度 1:5 000),室温摇床孵育 2 h;显影成像:使用超敏 ECL 化学发光试剂盒,A 液、B 液按 1:1 比例配制混匀;图像分析:成像仪内曝光成像,用 ImagePro Plus 图像处理软件半定量分析,检测条带灰度值来表示目的蛋白相对表达强度,灰度值 = $V_{目的条带} / V_{\beta-actin}$ 。

6.3 RT-PCR 检测 PI3K、Akt、FoxO1 mRNA 表达 保存于液氮的心肌组织经裂解、分层、RNA 沉淀、RNA 洗脱、离心后测 RNA 纯度和浓度。参照北京全式金公司的逆转录试剂盒说明书合成 cDNA。总反应体积 20 μL。反应条件:GAPDH:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,58 ℃退火,72 ℃延伸,35 个循环,72 ℃循环 10 min;PI3K、Akt、FoxO1 mRNA:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,56 ℃退火,72 ℃延伸,31 个循环,72 ℃循环 10 min。PCR 产物经电泳后以 PCR 反应仪半定量计算灰度值,表示目的片段相对表达强度,灰度值 = $V_{目的条带} / V_{GAPDH}$ 。PCR 引物序列见表 1。

7 统计学方法 应用 SPSS 18.0 统计软件统计分析,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组心肌细胞凋亡情况(图 1,表 2) 模型组细胞凋亡小体(褐色颗粒)增多,假手术组中仅有少量。

表 1 PCR 引物序列

基因名称	序 列	扩增片段长度(bp)
GAPDH	上游: 5'-ACGGCAAGTTCAACGGCACAG-3'	130
	下游: 5'-GAAGACGCCAGTAGACTCCACGAC-3'	
PI3K	上游: 5'-GAGAACCTATTGCGAGGGAAAC-3'	240
	下游: 5'-GAC ATTGAGGGAGTATTGTGC-3'	
Akt	上游: 5'-CTTCTTCCACCTGTCTCGTGAGC-3'	182
	下游: 5'-ACAGCCCCGAAGTCCGTTATCTT-3'	
FoxO1	上游: 5'-CAGCCAGGCACCTCATAACA-3'	254
	下游: 5'-GGACACCCATCCTACCATAGC-3'	

卡托普利组、康心饮低、中、高组较模型组凋亡小体减少,且卡托普利组和康心饮高剂量组最明显。

与假手术组比较,模型组心肌凋亡阳性细胞表达率增多($P < 0.05$);与模型组比较,康心饮低、中、高剂量组和卡托普利组的心肌凋亡阳性细胞表达率均减少($P < 0.01$);且康心饮高剂量组和卡托普利组较康心饮低、中剂量组减少更明显(均 $P < 0.05$)。

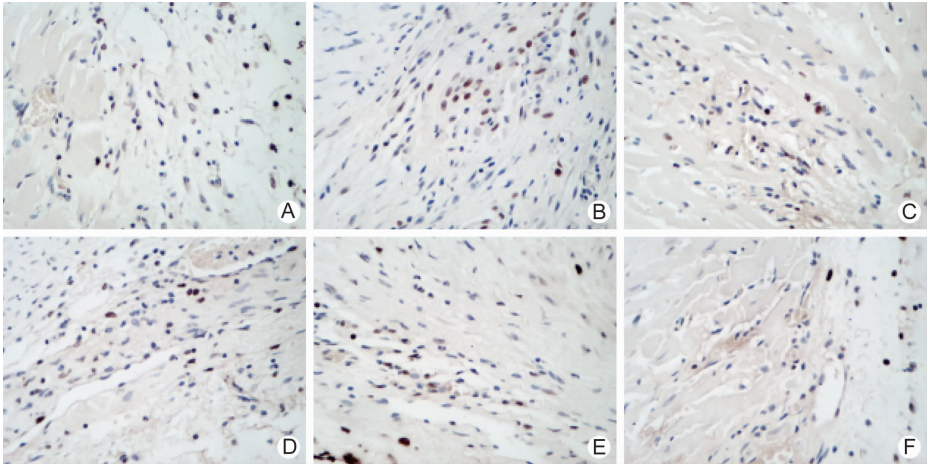
表 2 各组大鼠心肌凋亡的阳性细胞表达率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	阳性细胞表达率
假手术	11	0.10 ± 0.02
模型	8	0.90 ± 0.02 [*]
卡托普利	9	0.15 ± 0.01 ^{Δ▲○}
康心饮低剂量	8	0.47 ± 0.02 ^Δ
中剂量	10	0.45 ± 0.02 ^Δ
高剂量	9	0.17 ± 0.01 ^{Δ▲○}

注:与假手术组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,^Δ $P < 0.01$;与康心饮低剂量组比较,[▲] $P < 0.05$;与康心饮中剂量组比较,[○] $P < 0.05$

2 各组心肌 Bax、Caspase-3、Bcl-2、PI3K、p-Akt、p-FoxO1、Akt、FoxO1 蛋白表达比较(表 3,图 2) 与假手术组比较,模型组 Bax、Caspase-3 蛋白表达量升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),Bcl-2、PI3K、p-Akt、p-FoxO1 蛋白表达量均下降($P < 0.05$);与模型组比较,康心饮低、中、高剂量组和卡托普利组 Bax、Caspase-3 蛋白表达量均下降($P < 0.05$),Bcl-2、PI3K、p-Akt、p-FoxO1 蛋白表达量均升高($P < 0.05$);与康心饮低、中剂量组比较,康心饮高剂量组、卡托普利组 Bax 和 Caspase-3 表达量均下降($P < 0.05$),Bcl-2、PI3K、p-Akt 和 p-FoxO1 蛋白表达量均升高($P < 0.05$)。

3 各组心肌 PI3K、Akt 和 FoxO1 mRNA 表达比较(表 4) 与假手术组比较,模型组 PI3K、Akt 和 FoxO1 mRNA 表达量均下降($P < 0.05$);与模型组比较,康心饮低、中、高剂量组和卡托普利组 PI3K、Akt 和 FoxO1 mRNA 表达量均升高($P < 0.05$);且康心饮高剂量组和卡托普利组较康心饮低、中剂量组升高更明显($P < 0.05$)。



注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为卡托普利组;D 为康心饮低剂量组;E 为康心饮中剂量组;F 为康心饮高剂量组;下同

图 1 各组大鼠心肌细胞凋亡情况 (TUNEL 染色, ×400)

表 3 各组大鼠心肌 Caspase-3、Bax、Bcl-2、PI3K、p-Akt、p-FoxO1、Akt、FoxO1、Akt、FoxO1 蛋白表达比较 (x̄±s)

组别	n	Caspase-3	Bax	Bcl-2	PI3K	p-Akt	p-FoxO1	Akt	FoxO1
假手术	11	1.00±0.26	1.00±0.18	1.02±0.15	1.01±0.07	1.00±0.02	0.99±0.04	0.96±0.02	0.93±0.03
模型	8	4.21±0.19**	2.71±0.13*	0.31±0.07**	0.56±0.02*	0.35±0.03**	0.49±0.05**	0.97±0.02	0.95±0.02
卡托普利	9	2.01±0.16 ^{Δ▲○}	1.28±0.06 ^{Δ▲○}	0.85±0.12 ^{Δ▲○}	0.93±0.12 ^{Δ▲○}	0.90±0.01 ^{Δ▲○}	0.91±0.03 ^{Δ▲○}	0.96±0.01	0.95±0.03
康心饮低剂量	8	3.63±0.19 ^Δ	1.63±0.14 ^{ΔΔ}	0.51±0.08 ^Δ	0.73±0.04 ^Δ	0.56±0.03 ^{ΔΔ}	0.66±0.06 ^{ΔΔ}	0.94±0.01	0.97±0.02
中剂量	10	2.64±0.52 ^Δ	1.40±0.15 ^{ΔΔ}	0.60±0.07 ^Δ	0.84±0.11 ^Δ	0.70±0.01 ^{ΔΔ}	0.82±0.03 ^{ΔΔ}	0.97±0.02	0.96±0.01
高剂量	9	1.86±0.09 ^{Δ▲○}	1.18±0.24 ^{Δ▲○}	0.90±0.12 ^{Δ▲○}	0.99±0.06 ^{Δ▲○}	0.88±0.01 ^{Δ▲○}	0.91±0.05 ^{Δ▲○}	0.95±0.02	0.96±0.02

注:与假手术组比较,*P<0.05,**P<0.01;与模型组比较,^ΔP<0.05,^{ΔΔ}P<0.01;与康心饮低剂量组比较,[▲]P<0.05;与康心饮中剂量组比较,[○]P<0.05;下同

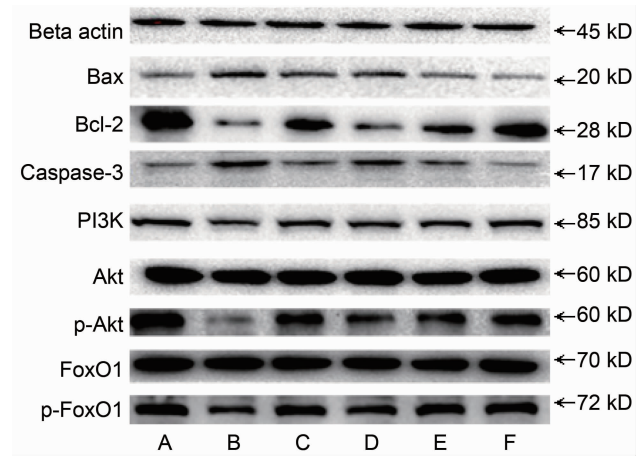


图 2 各组大鼠心肌 Bax、Caspase3、Bcl-2、PI3K、p-Akt、p-FoxO1 蛋白表达

表 4 各组大鼠心肌 PI3K、Akt、FoxO1 mRNA 表达比较 (x̄±s)

组别	n	PI3K mRNA	Akt mRNA	FoxO1 mRNA
假手术	11	0.94±0.04	0.74±0.05	0.72±0.05
模型	8	0.30±0.06*	0.24±0.02**	0.20±0.02**
卡托普利	9	0.67±0.10 ^{Δ▲○}	0.56±0.01 ^{Δ▲○}	0.41±0.03 ^{Δ▲○}
康心饮低剂量	8	0.42±0.04 ^Δ	0.30±0.03 ^{ΔΔ}	0.26±0.04 ^{ΔΔ}
中剂量	10	0.46±0.04 ^Δ	0.33±0.03 ^{ΔΔ}	0.28±0.02 ^{ΔΔ}
高剂量	9	0.57±0.09 ^{Δ▲○}	0.40±0.01 ^{Δ▲○}	0.34±0.03 ^{Δ▲○}

讨 论

康心饮是福建中医药大学附属第二人民医院治疗 CHF 的经验方,由炮附子、炙黄芪等九味药组成。方中炮附子回阳救逆,补火助阳;炙黄芪补气健脾、利水消肿,此二药共助肺、脾、肾三脏之阳气以治本,为君药。葶苈子泻肺行水,下气平喘,猪苓利水消肿而不伤阴,共为臣药。桂枝温通经脉、助阳化气,当归养血活血,三七去瘀生新,水蛭破血化瘀,鹿衔草补虚益肾,这五味药有助于全方活血祛瘀通络的作用,同时又不伤正,共为佐药^[7]。全方攻补兼施,共奏益气温阳、利水平喘、去瘀生新之功。

本实验观察到康心饮可以减轻心肌细胞凋亡,同时降低 Bax、Caspase-3 表达,升高 Bcl-2 表达,并且康心饮使 PI3K、Akt、FoxO1 mRNA 和 PI3K、p-Akt、p-FoxO1 蛋白增高,特别是康心饮高剂量组,提示康心饮可能通过激活 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路改善 ICM 大鼠心肌细胞凋亡,这可能是益气温阳、利水化瘀的中药方剂康心饮治疗 ICM 的分子机制之一。

研究发现,大鼠心肌凋亡细胞指数在梗死后 3 天~4 周明显增加,心功能随梗死时间的延长而下降,提示

随梗死时间的延长,大鼠心肌细胞凋亡增加,心功能不断下降,说明细胞凋亡参与了心功能衰竭的过程^[8],是 ICM 形成的重要机制之一。细胞凋亡的过程受促凋亡因子和抗凋亡因子的精确的调控,Bcl-2 家族成员是细胞凋亡密切相关的整合因子,包括 Bcl-2 等抗凋亡成员和 Bax 等促凋亡成员。在诱导凋亡的信号刺激下,Bax 蛋白表达增多,并从细胞质转移到线粒体膜上形成 Bax-Bax 同源二聚体,使线粒体通透性增加,导致细胞色素 C 从线粒体释放进入胞浆中,从而激活 Caspase 级联反应而促进细胞凋亡^[9]。

以往研究表明,益气活血或益气温阳、化痰利水方剂或其有效成分对不同病因的急性心力衰竭、CHF 均具有抗心肌凋亡的作用,并且具有益气、活血作用的中药抗凋亡作用优于温阳、利水药^[10-12]。本研究发现模型组凋亡小体数量较假手术组明显增多,提示 ICM 的心肌细胞凋亡严重,这可能是促凋亡因子表达增加和抑凋亡因子表达下降的结果。不同剂量康心饮治疗均具有促进 Bcl-2 和抑制 Bax 的表达,效果以高剂量为佳,与卡托普利相似。研究表明,方中的附子、黄芪等药的有效成分如附子多糖、黄芪多糖、三七总皂苷等均有抗心肌细胞凋亡的作用,这是康心饮具有抗 ICM 细胞凋亡的药理基础^[13-15]。因此,具有益气温阳、利水化痰作用的康心饮对慢性缺血心肌的细胞凋亡具有抑制作用,且其机制可能是通过调控 Bcl-2、Bax 的表达水平及其比例来完成的。

PI3K/Akt 是细胞内重要的信号转导通路,激活的 Akt,即 p-Akt 促进 Caspase-3、Caspase-9、Bax 的 Ser184 位点发生磷酸化,抑制这些因子的活化,从而抑制促凋亡功能^[16,17]。或是直接启动 Bcl-2 的转录,使其表达水平增多,从而发挥抗凋亡作用^[18]。FoxO 家族广泛参与细胞代谢过程的调控,并与糖尿病、缺血再灌注损伤等多种疾病有关^[19,20]。PI3K/Akt 信号通路是调节 Fox-Os 的分子通路之一,激活的 Akt 介导 FoxO1 蛋白的 Ser256 及 Thr24 两个磷酸化位点,使其发生核排除,从细胞核内移位出来并滞留在细胞质中,继而抑制转录因子与 DNA 结合,达到抑制细胞凋亡的效应^[21,22]。

本研究发现,模型组心肌的 PI3K、Akt、FoxO1 mRNA 表达量较假手术组下降,康心饮组心肌的 PI3K、Akt、FoxO1 mRNA 表达量均较模型组上升,以高剂量组为著。但各组 Akt、FoxO1 总蛋白水平无明显变化,而 PI3K、p-Akt、p-FoxO1 蛋白表达量与 mRNA 表达水平的分析结果一致。这是因为,只有磷酸化的 Akt 和 FoxO1 才能抑制下游转录因子与 DNA 结合来抗凋亡的作用,而 Bax 和 Bcl-2 即是受 Akt、

FoxO1 调控的靶基因和靶蛋白。提示康心饮对 ICM 大鼠心肌细胞凋亡的抑制作用可能是通过 Akt、FoxO1 的磷酸化继而促进 Bcl-2 和抑制 Bax 来实现的。本研究结果与 Wang B 等^[23]研究相似,后者发现,益气活血中成药通心络通过激活 VEGF/Akt/eNOS 信号通路,改善压力超负荷所致的心衰小鼠的心功能,减轻心肌纤维化和心肌超微病理。

虽然本实验观察到康心饮具有缓解 ICM 心肌凋亡作用,但观察时间尚短,延长疗程可能更进一步了解康心饮对 ICM 的较长期的治疗价值。另外,本实验未应用 Ak 特异性阻滞剂如 LY294002,若加用则更能证明康心饮作用的信号通路机制,因此,本研究结果尚需在后续的研究中进一步完善与验证。

综上所述,本实验结果提示康心饮可能通过激活 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路,达到抑制 ICM 心肌细胞的凋亡的作用,这可能是其抗心肌纤维化、抑制心室重构、改善心功能的分子机制之一。

参 考 文 献

- [1] Bulluck H, Yellon DM, Hausenloy DJ, et al. Reducing myocardial infarct size: challenges and future opportunities[J]. Heart, 2016, 102(5): 341-348.
- [2] Martin K, Huang CL, Caplice NM. Regenerative approaches to post-myocardial infarction heart failure[J]. Curr Pharm Des, 2014, 20(12): 1930-1940.
- [3] Olivetti G, Capasso JM, Meggs LG, et al. Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rats[J]. Circ Res, 1991, 68(3): 856-869.
- [4] 钟剑平,郭进建,楼莉峰,等.康心饮对缺血性心脏病大鼠心肌组织 MMP-2 及 TIMP-2 表达的影响[J].福建中医药大学学报,2014,24(5): 19-21.
- [5] 程全周,张电,吕永飞.中西医结合治疗气虚血瘀型冠心病慢性心衰 46 例[J].中医研究,2013,26(5): 46-48.
- [6] 梅蒙,王洪新,唐富天,等. Calpain 1 在黄芪甲苷抑制异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌凋亡中的作用[J].中国动脉硬化杂志,2015,23(4): 330-334.
- [7] 钟赣生主编.中药学[M].第 9 版.北京:中国中医药出版社,2012: 53-201.
- [8] Jose Corbalan J, Vatner DE, Vatner SF. Myocardial apoptosis in heart disease: does the emperor have clothes? [J]. Basic Res Cardiol, 2016, 111(3): 31.
- [9] Karch J, Molkenin JD. Regulated necrotic cell death: the passive, aggressive side of Bax and Bak[J]. Circ Res, 2015, 116(11): 1800-1809.
- [10] 周俊佟,雷雪,王雪梅,等.参附汤入血有效成分对急性心衰大鼠血流动力学及心肌凋亡、自噬的影响[J].中国中医基础医学杂志,2014,20(7): 976-978.

- [11] 陈永忠, 陈成, 陈慧, 等. 健心颗粒及拆方对心力衰竭大鼠细胞凋亡的影响[J]. 山西中医, 2015, 31(5): 45-47.
- [12] 邢俊娥, 吴鹏, 杨清华, 等. 益气活血方对气虚血瘀型心衰大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. 湖北中医杂志, 2017, 39(3): 5-7.
- [13] 纪超, 刘颖. 附子多糖抗心肌细胞凋亡的 Smac/Diablo 机制研究[J]. 中药材, 2012, 35(8): 1314-1318.
- [14] 于胜男, 曹琼丹, 鲁美丽, 等. 黄芪多糖对糖尿病大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(4): 102-105.
- [15] 刘咏梅, 孙秀玲, 刘瑞华, 等. 三七总皂苷调控 miR-NA-466b 抑制急性心梗大鼠心肌细胞凋亡的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(22): 6-10.
- [16] Xia P, Xu XY. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application[J]. Am J Cancer Res, 2015, 5(5): 1602-1609.
- [17] Bertacchini J, Heidari N, Mediani L, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR network for treatment of leukemia[J]. Cell Moll Life Sci, 2015, 72(12): 2337-2347.
- [18] Rama A, Goyal N, Ahlawat A, et al. Mechanisms involved in attenuated cardio-protective role of ischemic preconditioning in metabolic disorders[J]. Perfusion, 2015, 30(2): 94-105.
- [19] Rochette L, Lorin J, Zeller M, et al. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular disease: possible therapeutic targets? [J]. Pharmacol Ther, 2013, 140(3): 239-257.
- [20] Maiese K. FoxO transcription factors and regenerative pathways in diabetes mellitus[J]. Curr Neurovasc Res, 2015, 12(4): 404-413.
- [21] Kim DK, Park MH, Lee EK, et al. The roles of FoxOs in modulation of aging by calorie restriction[J]. Biogerontology, 2015, 16(1): 1-14.
- [22] Nozhat Z, Hedayati M. PI3K/AKT pathway and its mediators in thyroid carcinomas[J]. Mol Diagn Ther, 2016, 20(1): 13-26.
- [23] Wang B, Yang Q, Bai WW, et al. Tongxinluo protects against pressure overload-induced heart failure in mice involving VEGF/Akt/eNOS pathway activation[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e98047.

(收稿: 2016-04-19 修回: 2017-07-29)

责任编辑: 白霞

沉痛悼念中西医结合医学家林求诚教授

全国老中医药专家学术经验继承指导老师、国务院特殊津贴获得者、福建省优秀专家、原福建省中医药研究所(院)副所长林求诚教授于 2017 年 9 月 23 日在福州病世,享年 87 岁。

林求诚同志 1931 年 3 月出生于福建省莆田市仙游县,1954 年毕业于福建医学院,同年 8 月,分配至福建医学院附属协和医院从事医疗工作。1958 年 12 月—1961 年 9 月参加福建省第一届西医离职学习中医班。1972 年调入福建省中医药研究所(现福建省中医药研究院)从事临床、中西医结合科研及教学工作,历任福建省中医药研究所(院)副所长、研究员、主任医师、临床医学研究室副主任、主任、福建中医学院第二附属人民医院副院长等职。曾兼任中国中西医结合研究会理事、中国医药学信息处理学会理事、福建省科学技术协会委员、福建省中西医结合学会副会长、福建省中西医结合学会虚证与老年病分会主任委员、《中国中西医结合杂志》编委会委员、《中药新药与临床药理杂志》编委等,是在全国有一定影响力的中西医结合专家。

林求诚同志通古博今,贯通中西,热爱中西医结合事业,先后担任临床、教学、科研工作,培养博士研究生 5 人、硕士研究生 37 人、高级学徒 4 人。50 多年来,坚持中西医结合相关研究,从治疗学及基础理论方面寻找规律,提高疗效,探索中西医结合的发展道路。他的科研成果《慢阻肺中医脏腑辨证电子计算机辅助诊断的探讨》、《肺心病阴阳虚证若干指标观察》、《软脉灵的研发及治疗脑动脉硬化症的研究》分别获得省科技进步三等奖及省医药卫生成果二等奖;《冬虫夏草—中国拟青霉新药研究》获得省医药卫生科技成果一等奖;他的多项科研成果均达到国内先进水平。先后主编了《实用医学统计》、《中西医结合诊疗手册》、《新编医生手册》、《中西医结合急难重症诊治》等著作。

林求诚同志热爱党、热爱祖国,忠于共产主义事业,勇于开拓、具有创新精神,不辞劳苦,从不计较个人名利与得失。50 多年来,林求诚同志历尽艰辛,呕心沥血,在中西医结合的道路上孜孜不倦,做出了突出的贡献。先后获得国务院特殊津贴、福建省优秀专家、福建省卫生先进工作者、福建省科技先进工作者、福州市劳动模范等多项荣誉称号。

林求诚同志的逝世,是中国中西医结合事业的巨大损失、是福建中医药大学和福建省中医药研究院的重大损失。我们沉痛悼念林求诚同志,我们要化悲痛为力量,学习林求诚同志求真务实、刻苦钻研的精神,在中医药研究的道路上积极探索、无私奉献!

(福建省中医药研究院 撰文)