

· 基础研究 ·

基于 PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路研究心宝丸对慢性心力衰竭大鼠心肌肥厚的影响

何培坤 顾民华 徐煜凌 刘晓瑜 洪睦铿 贾钰华

摘要 目的 探讨心宝丸是否能够通过调控 PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路抑制慢性心力衰竭 (CHF) 大鼠模型心肌肥厚。方法 将 60 只雄性 SD 大鼠按体重随机分为假手术组、模型组、心宝丸低、中、高剂量组和贝那普利组。除假手术组外所有大鼠采用腹主动脉缩窄法复制 CHF 模型,假手术组只分离腹主动脉,不结扎,术后 4 周心宝丸药物干预组[40、80、120 mg/(kg·d)]和贝那普利组[1.05 mg/(kg·d)]开始灌胃给药 8 周,假手术组和模型组用等体积生理盐水灌胃 8 周。术后 12 周用超声心动图检测大鼠心脏功能,全部大鼠禁食 24 h 后处死,HE 染色法观察心肌组织形态,小麦胚凝集素染色 (WGA) 观察心肌细胞大小,ELISA 法检测血清 NT-proBNP 值,Real-time PCR 法检测肥厚相关基因 ANP、Myh7 mRNA 表达水平,Western Blot 法检测心肌组织 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、GSK3 β 、p-GSK3 β 蛋白表达水平。结果 与假手术组比较,模型组大鼠术后第 12 周左心室射血分数 (LVEF)、短轴缩短率 (FS) 降低 ($P<0.01$),左心室收缩末期腔内径 (LVIDs) 升高 ($P<0.05$),心肌细胞横截面积 (CSA) 增大 ($P<0.01$),血清 NT-proBNP 水平升高 ($P<0.01$),ANP、Myh7 mRNA 及 p-PI3K、p-AKT、p-GSK3 β 蛋白表达水平上调 ($P<0.01$, $P<0.05$),GSK3 β 表达水平下调 ($P<0.01$);与模型组比较,心宝丸低、中、高剂量组和贝那普利组 LVEF 升高 ($P<0.05$, $P<0.01$),心肌细胞大小减小 ($P<0.01$),Myh7 mRNA 表达水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),血清中 NT-proBNP 水平降低 ($P<0.01$),p-PI3K、p-AKT、p-GSK3 β 表达水平下调 ($P<0.01$),GSK3 β 表达水平上调 ($P<0.01$),心宝丸中、高剂量组 FS 升高 ($P<0.05$),心宝丸中、高剂量组和贝那普利组 LVIDs 减小 ($P<0.05$),心宝丸高剂量组和贝那普利组 ANP mRNA 表达水平降低 ($P<0.01$);HE 染色结果显示:心宝丸可以改善心肌肥厚,心肌细胞排列紊乱,间隙增宽的病理变化。结论 心宝丸可以抗心肌肥厚,提升心脏功能,其机制可能与抑制 PI3K/Akt 信号的磷酸化激活,抑制 GSK3 β 的磷酸化有关。

关键词 心宝丸;慢性心力衰竭;心肌肥厚;PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路

Effect of Xinbao Pill on Myocardial Hypertrophy in Chronic Heart Failure Rats by Regulating the PI3K/Akt/GSK3 β Pathway HE Pei-kun, GU Min-hua, XU Yu-ling, LIU Xiao-yu, HONG Mu-keng, and JIA Yu-hua College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou (510515)

ABSTRACT Objective To investigate whether Xinbao Pill (XBP) attenuate myocardial hypertrophy in chronic heart failure (CHF) rats by regulating the PI3K/Akt/GSK3 β pathway. **Methods** Totally 60 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham-operated group, model group, as well as low, medium and high dose XBP groups as well as Benazepril group according to their weight. All the rats except the sham-operated group underwent abdominal aortic banding to establish the CHF model. The sham-operated group were only separated the abdominal aorta without ligation. Four weeks after operation, the XBP treatment groups (40, 80, 120 mg·kg⁻¹·d⁻¹) and the Benazepril group (1.05 mg·kg⁻¹·d⁻¹) were intra-

基金项目:广东省名优中成药二次开发项目(No. 20174010);国家自然科学基金资助项目(No. 81373574, No. 81973802);广东省科技计划项目(No. 2018A030321014);广东省省级科技计划项目(No. 2016A020226002);广州市科技计划产学研协同创新重大专项项目(No. 201704020042)

作者单位:南方医科大学中医药学院(广州 510515)

通讯作者:贾钰华, Tel: 020-61648520, E-mail: jyh@smu.edu.cn

DOI: 10.7661/j.cjim.20200814.034

gastrically administered for 8 weeks. The sham-operated group and the model group were intragastrically administered with an equal volume of normal saline for 8 weeks. Cardiac function was measured by echocardiography 12 weeks after operation. All rats were sacrificed after fasting for 24 hours. Myocardial tissue sections were taken for HE staining to observe myocardial morphology. Wheat germ agglutinin staining was used to observe the myocyte cross-sectional area (CSA). The serum separated from abdominal aorta blood was used to detect the level of NT-proBNP by ELISA. RT-PCR was used to detect the expressions of the mRNA of ANP and Myh7. The expression levels of PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, GSK3 β and p-GSK3 β were detected by Western Blot. **Results** Compared with the sham group, the left ventricular ejection function (LVEF) and fractional shortening (FS) decreased in the 12th week after surgery ($P < 0.01$), the LVIDs increased ($P < 0.05$), the CSA increased ($P < 0.01$), the level of NT-proBNP increased ($P < 0.01$), the contents of ANP, Myh7 mRNA increased ($P < 0.01$), the protein expression levels of p-PI3K, p-AKT, p-GSK3 β upregulated ($P < 0.01$, $P < 0.05$), the level of GSK3 β downregulated ($P < 0.01$), significantly in the model group. Compared with the model group, the LVEF improved ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the CSA decreased ($P < 0.01$), the level of Myh7 mRNA decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the level of NT-proBNP in serum declined ($P < 0.01$), the protein expression levels of p-PI3K, p-AKT, p-GSK3 β downregulated ($P < 0.01$), the level of GSK3 β upregulated ($P < 0.01$), significantly in the XBP for low, medium and high dose groups and Benazepril group, the FS improved significantly in XBP for medium and high dose groups ($P < 0.05$), the LVIDs decreased significantly in XBP for medium and high dose groups and Benazepril group ($P < 0.05$), the level of ANP mRNA decreased significantly in XBP for high dose group and Benazepril group ($P < 0.01$). The results of HE staining exhibited that XBP could improve the pathological changes of cardiac hypertrophy and myocardial cell arrangement disorder. **Conclusion** XBP can retard the progression of myocardial hypertrophy and improve cardiac functions, probably via inhibiting the phosphorylation of GSK3 β by inhibiting the phosphorylation of PI3K/Akt pathway.

KEYWORDS Xinbao Pill; chronic heart failure; myocardial hypertrophy; PI3K/Akt/GSK3 β pathway

病理性心肌肥厚一般是正常心脏向衰竭心脏发展的代偿性变化。心脏在受到机械或者神经体液性的肥厚刺激时会发生心肌肥厚^[1]。心肌细胞肥大和蛋白合成增加是心室肥厚的早期特征,是心室肥厚和重构的始动因素^[2,3]。如果肥厚刺激持续存在,心肌细胞开始凋亡、丢失,间质纤维化直至心力衰竭^[4]。因此,抑制并逆转心肌肥厚是治疗心力衰竭的主要措施。磷酸肌醇 3 激酶/蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B signaling pathway, PI3K/Akt) 信号通路和丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号激活都能够促进心肌肥厚^[5]。糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK3 β) 的功能是作为心肌肥厚的负性调节因子,抑制心肌肥厚过程中蛋白合成增加和肥厚基因的表达^[6,7]。

中医药能够从多途径、多环节、多靶点、多机制抑制心肌肥厚,防治慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF), 能够有效控制患者的症状和改善预后^[8]。心宝丸是由广东省药物研究所研制的一种中药复方制

剂,主要成分是洋金花、人参、肉桂、附子、鹿茸、冰片、人工麝香、三七、蟾酥,临床上用于改善病态窦房结综合征患者心脏功能作用明显^[9]。本研究通过建立 CHF 大鼠模型,检测心宝丸可否通过调控 PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路抑制心肌肥厚,为心宝丸在临床上防治 CHF 提供新的理论依据。

材料与方法

1 动物 SPF 级 SD 大鼠 60 只,8 周龄,体重 180~220 g,购买自南方医科大学实验动物中心,动物许可证编号:SCXK(粤)2016-0041,饲养于南方医科大学 SPF 级动物实验房,饲养室温约 22~25℃,湿度约 50%~60%,恒温恒湿,12 h 光照、12 h 黑暗环境。所有动物均在相同的条件下饲养,自由取食和饮水。本实验通过南方医科大学伦理审查委员会伦理审查 (No. L2018003),广东省动物实验证明编号 (No. 00187880)。

2 药物 心宝丸 (60 mg/丸,广东心宝药业科技有限公司提供,批号:20190103) 由洋金花、人参、肉桂、附子、鹿茸、冰片、人工麝香、三七、蟾酥组成。

3 主要试剂及仪器 大鼠 N 端前脑钠肽 (NT-proBNP) 酶联免疫试剂盒 (ELISA), 武汉 EIAab 公司, 批号: 9A086J。青霉素钠和贝那普利购自南方医院。小麦胚凝集素 FITC, 美国 Sigma 公司, 批号: 019M4090V。DAPI 染液, 北京索莱宝公司, 批号: C0065。Trizol Reagent RNA 提取剂, 上海全式金公司, 批号: L31010, PrimeScript RT Reagent 试剂盒、SYBR Green 荧光染料, 日本 TaKaRa 公司, 批号分别为: AK5302、AI52227A。RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂、SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒, 碧云天生物技术研究 所, 批号分别为: S1006、P0013F、P1005、P10012A。5×SDS 上样缓冲液, 北京雷根生物技术有限公司, 批号: 0619A18。兔源单克隆抗体 PI3K、p-PI3K、美国 Affinity 公司, 批号: AF6241、AF3241; 兔单克隆抗体 Akt、p-Akt, 美国 Cell Signaling 公司, 批号: C67E7、D25E6; 兔多克隆抗体 GSK3 β , 美国 proteintech 公司, 批号: 22104-1-AP; 兔多克隆抗体 p-GSK3 β , 美国 Abcam 公司, 批号: ab65740; 兔多克隆抗体 GAPDH, 美国 Cell Signaling 公司, 批号 D16H11; HRP 标记的山羊抗兔 IgG, 武汉谷歌生物公司, 批号: 180534。BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 美国 Thermo 公司, 批号: SJ256263; ECL 发光液, 美国 Millipore 公司, 批号: 1705102。其余试剂均为国产分析纯。超声心动仪 (美国 Fujifilm VisualSonics 公司); 荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo 公司); PCR 扩增仪 (美国 Thermo 公司); iMark 型全自动酶标仪 (美国伯乐生命医学产品有限公司); Sorvall Stratos 低温高速离心机 (美国 Thermo Electron 公司); EclipseTi 荧光倒置显微镜 (日本 Nikon 公司); Kodak Image Station 2000MM 成像系统 (美国 KODAK 公司); Legaci 超低温冰箱 (美国 Revco 公司); 微量移液器 (德国 Eppendorf 公司)。

4 CHF 模型建立 60 只 SD 大鼠按体重随机选出 10 只作为假手术组, 其余大鼠参考文献 [10] 的方法, 通过腹主动脉缩窄术, 建立 CHF 大鼠模型, 简述如下: 将大鼠术前禁食 24 h, 3% 戊巴比妥钠按照 60 mg/kg 体重给大鼠腹腔注射麻醉, 于剑突下至髂棘连线之间作一腹正中切口, 长约 2~3 cm, 分层打开腹腔, 无菌洞巾铺好后, 用纱布将大鼠肠道部分分离拨出到体外, 暴露腹后壁的视野, 钝性分离腹膜, 暴露腹主动脉, 于左肾静脉和下腔静脉汇合点上方约 1~1.5 cm 处分离腹主动脉, 用 5~0 手术线穿过腹主动脉, 将腹主动脉与 7 号灌胃针头 (直径 0.7 mm) 一起结扎后拔除针头, 将肠道脏器轻轻放回腹腔, 分层缝合

肌肉和皮肤。术后给予青霉素 1×10^5 U/只肌肉注射 3 天, 预防感染。假手术组分离腹主动脉, 相同部位穿线, 但是不结扎, 其余流程和建模组相同。术后 12 周, 超声检查左心室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF) < 50%, 短轴缩短率 (fractional shortening, FS) < 30% 认为造模成功^[10], 手术期间以及术后 3 天内共死亡 11 只, 替补造模 11 只。

5 动物分组及给药 造模后的大鼠随机分为 5 组: 模型组, 心宝丸治疗低、中、高剂量组和贝那普利组, 每组 10 只。心宝丸在临床上服用剂量为成人 6 mg/(kg·d) (心功能 1 级), 12 mg/(kg·d) (心功能 2 级), 18 mg/(kg·d) (心功能 3 级), 疗程 2 个月, 贝那普利服用剂量为 0.17 mg/(kg·d)。根据成人与大鼠用药剂量换算, 用心宝丸灌胃大鼠给药剂量设定为低剂量 40 mg/(kg·d), 中剂量 80 mg/(kg·d), 高剂量 120 mg/(kg·d), 各剂量组分别对应成人剂量的 6、12、18 mg/(kg·d) 各 1 倍, 贝那普利给药剂量为 1.05 mg/(kg·d), 相当于成人剂量 10 mg/d 的 1 倍。手术后第 4 周开始, 心宝丸治疗组和贝那普利组按照相应剂量灌胃给药 8 周, 假手术和模型组灌胃同体积生理盐水。

6 检测指标及方法

6.1 超声心动图检查 在术后第 12 周, 所有大鼠行超声心动图检查大鼠心功能的情况。大鼠禁食 24 h 后, 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉 (60 mg/kg)、备皮, 应用超声心动仪及高频探头行超声心动图检查。检测 LVEF、FS、左心室收缩末期内径 (left ventricular internal dimension in end-systole, LVIDs)。

6.2 心脏组织形态学观察 大鼠完整心脏经 4% 多聚甲醛固定后, 常规脱水、浸蜡包埋处理后制作 4 μ m 病理切片。然后各组中随机选择 5 张切片, 采用 HE 染色后置于显微镜下观察拍照。

6.3 小麦胚凝集素染色 大鼠心肌组织制作冰冻切片后, 采用 WGA 染色, 在荧光显微镜下拍照。WGA 染色步骤: 避光操作, PBS 漂洗 3 次, 5 min/次, 滴加 WGA 染液 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 漂洗 3 次, 10 min/次, DAPI 室温染色 5 min, 封片。采用 Image J 软件计算心肌细胞横截面积 (cross-sectional area, CSA) 并与假手术组比较进行统计。

6.4 Real-time PCR 检测肥厚相关基因 ANP、Myh7 mRNA 表达 按照 RNA Trizol 试剂盒说明, 分别提取各组大鼠心肌组织总 RNA, 反转录合成 cDNA, 反应参数: 42 $^{\circ}$ C, 15 min; 85 $^{\circ}$ C, 5 s; 4 $^{\circ}$ C, 5 min。

然后按照 SYBR 试剂盒说明书进行目的基因和内参基因的 PCR 反应,反应参数:95 ℃,10 min;95 ℃,15 s;60 ℃,1 min;循环 40 次。引物由上海生工生物工程公司合成,引物序列见表 1。采用 Stepone software 软件分析 Ct 值, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因 mRNA 的相对表达量。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	引物长度(bp)
ANP	上游 GAGCGAGCAGACCGATGAAGC	21
	下游 TCCATCTCTCTGAGACGGGTTGAC	24
Myh7	上游 CCAGAACACCAGCCTCATCAACC	23
	下游 CACCGCCTCCTCCACCTCTG	20
GAPDH	上游 GACATGCCGCTGGAGAAAC	20
	下游 AGCCCAGGATGCCCTTTAGT	20

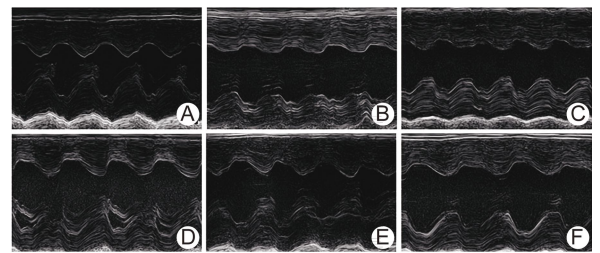
6.5 血清 NT-proBNP 水平检测 术后 12 周将大鼠麻醉,腹主动脉穿刺取血,全血样品在 4 ℃ 静置 1 h 后,3 000 r/min 离心 15 min 取上清分装,置于 -20 ℃ 保存。按照 ELISA 试剂盒操作说明检测大鼠血清中的 NT-proBNP 水平。

6.6 Western Blot 检测 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、GSK3 β 、p-GSK3 β 的表达水平 采用 RIPA 裂解液提取心肌组织的总蛋白,使用 BCA 法蛋白浓度测定试剂盒测定各组心肌组织总蛋白浓度,取提取出的蛋白样本加入适量 5 $\times$ SDS 上样缓冲液,98 ℃ 煮 5 min,10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转膜,5% BSA 室温封闭 2 h 后,切膜分别加入 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、GSK3 β 、p-GSK3 β 和 GAPDH 抗体 4 ℃ 孵育过夜;TBST 洗膜 3 次,15 min/次,加入 HRP 标记的二抗室温孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,5 min/次,使用 ECL 发光液进行发光显色。

7 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析,计量 $\bar{x}\pm s$ 表示,统计方法采用 One-way ANOVA,方差齐用 LSD-t 法进行两两比较,方差不齐采用 Dunnett's T3 法进行两两比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠心脏功能超声指标比较(表 2,图 1) 与假手术组比较,模型组 LVEF 和 FS 降低($P<0.01$),LVIDs 升高($P<0.01$);与模型组比较,心宝丸低、中、高剂量组和贝那普利组 LVEF 值升高($P<0.05$, $P<0.01$);心宝丸中、高剂量组 FS 值升高($P<0.05$);心宝丸中、高剂量组和贝那普利组 LVIDs 减少($P<0.05$, $P<0.01$)。



注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为心宝丸低剂量组;D 为心宝丸中剂量组;E 为心宝丸高剂量组;F 为贝那普利组;图 2~4 同

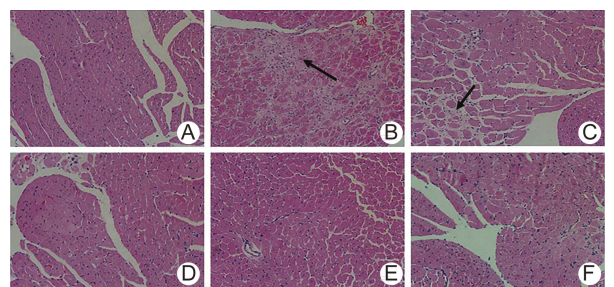
图 1 各组大鼠超声心动图变化

表 2 各组大鼠超声心动图指标比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	LVEF (%)	FS (%)	LVIDs (mm)
假手术	10	80.15 $\pm$ 8.28	49.73 $\pm$ 8.06	2.60 $\pm$ 0.41
模型	10	45.53 $\pm$ 2.06**	23.40 $\pm$ 1.13**	5.45 $\pm$ 0.49**
心宝丸低剂量	10	62.60 $\pm$ 11.45 Δ	34.82 $\pm$ 8.48	3.97 $\pm$ 1.51
心宝丸中剂量	10	66.20 $\pm$ 10.26 Δ	37.10 $\pm$ 7.26 Δ	3.36 $\pm$ 1.05 Δ
心宝丸高剂量	10	67.95 $\pm$ 11.17 $\Delta\Delta$	38.50 $\pm$ 9.02 Δ	2.98 $\pm$ 0.89 $\Delta\Delta$
贝那普利	10	63.97 $\pm$ 8.90 Δ	35.70 $\pm$ 7.23	3.77 $\pm$ 0.45 Δ

注:与假手术组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;表 3~5,图 4 同

2 各组大鼠心肌组织病理改变(图 2) 各组大鼠心肌组织的 HE 染色结果显示,假手术组大鼠心肌细胞结构完整,排列紧密,细胞呈椭圆形或长梭形,核致密清晰。模型组心肌细胞肥大,出现脂肪空泡,排列紊乱,间隙增宽,间质增生、纤维化,肌纤维间疏松水肿。与模型组比较,心宝丸低、中、高剂量组和贝那普利组均能够在不同程度上改善心肌组织的病理变化。



注:箭头所指为心肌细胞肥大,间隙增宽纤维化

图 2 各组 CHF 大鼠心肌组织病理改变 (HE, $\times 200$)

3 各组大鼠心肌细胞横截面积比较(图 3,表 3) 与假手术组比较,模型组大鼠心肌细胞肥大($P<0.01$);与模型组比较,心宝丸低、中、高剂量组和贝那普利组均能减轻大鼠心肌细胞肥大($P<0.01$),以高剂量组效果最好。

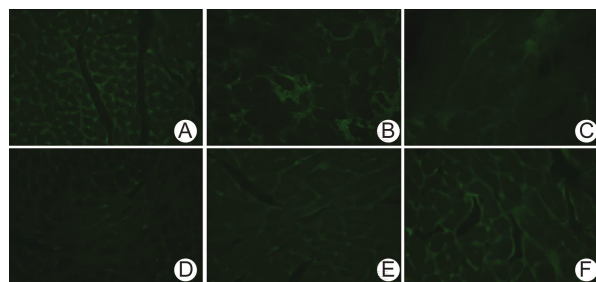


图3 心宝丸对心肌细胞横截面积的影响 (WGA, ×400)

表3 各组大鼠心肌细胞横截面积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CSA (fold change)
假手术	10	1.00±0.06
模型	10	3.27±0.68**
心宝丸低剂量	10	2.23±0.39 ^{△△}
心宝丸中剂量	10	2.09±0.77 ^{△△}
心宝丸高剂量	10	1.45±0.32 ^{△△}
贝那普利	10	2.42±0.66 ^{△△}

4 各组大鼠 ANP、Myh7 mRNA 表达水平比较 (表4) 与假手术组比较,模型组 ANP、Myh7 mRNA 表达水平上调 ($P<0.01$);与模型组比较,心宝丸高剂量组和贝那普利组可以下调 ANP mRNA 表达水平 ($P<0.01$),心宝丸低、中、高剂量组和贝那普利组可以下调 Myh7 mRNA 的水平 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

5 各组大鼠血清 NT-proBNP 水平比较 (表5) 与假手术组比较,模型组大鼠在术后 12 周,血清中的 NT-proBNP 水平上升 ($P<0.01$);与模型组比较,心宝

表4 各组大鼠 ANP、Myh7 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

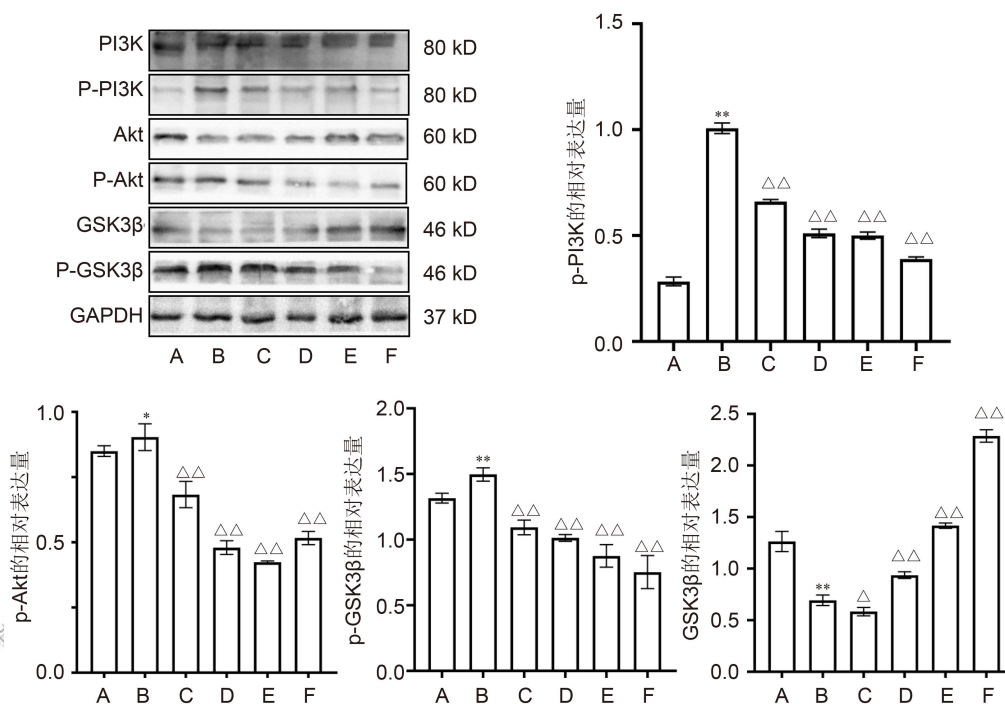
组别	n	ANP mRNA	Myh7 mRNA
假手术	10	1.00±0.02	1.00±0.12
模型	10	27.30±15.28**	16.46±1.29**
心宝丸低剂量	10	22.70±2.08	14.20±0.40 [△]
心宝丸中剂量	10	19.48±3.51	13.99±1.45 [△]
心宝丸高剂量	10	3.89±0.05 ^{△△}	12.11±1.42 ^{△△}
贝那普利	10	1.97±0.17 ^{△△}	12.88±0.70 ^{△△}

表5 各组大鼠血清 NT-proBNP 水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	NT-proBNP
假手术	10	132.65±26.94
模型	10	531.90±243.05**
心宝丸低剂量	10	304.32±113.05 ^{△△}
心宝丸中剂量	10	286.53±223.69 ^{△△}
心宝丸高剂量	10	282.62±93.01 ^{△△}
贝那普利	10	262.85±80.94 ^{△△}

丸低、中、高剂量组和贝那普利组都能够降低血清中 NT-proBNP 水平 ($P<0.01$)。

6 各组大鼠心肌组织 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、GSK3 β 、p-GSK3 β 蛋白表达水平比较 (图4) 与假手术组比较,模型组 p-PI3K、p-AKT、p-GSK3 β 表达水平上调 ($P<0.01$, $P<0.05$), GSK3 β 表达水平下调 ($P<0.01$);与模型组比较,心宝丸低、中、高剂量组和贝那普利组能够下调 p-PI3K、p-AKT、p-GSK3 β 表达水平 ($P<0.01$),上调 GSK3 β 表达水平 ($P<0.01$)。

图4 各组大鼠 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、GSK3 β 、p-GSK3 β 蛋白表达比较

讨 论

心肌肥厚的早期阶段,心肌主要通过肌节数目增多以及肌细胞体积增大平衡增加的室壁张力,进而维持心泵输出的稳定满足机体需要。如果心脏长期受到压力负荷或者神经体液刺激会导致心脏失代偿进而发展为 CHF,防治早期的心肌肥厚可以延缓甚至预防心力衰竭的发生^[11]。现有的治疗心力衰竭的药物可以有效提高患者的生活质量,但是在抑制并逆转心肌肥厚方面并不理想,无降低心力衰竭的死亡率^[12,13]。因此,寻找抑制心肌肥厚新的药物和新的靶点是当下关于心力衰竭研究的重要工作。

PI3K/Akt 信号通路通过调控内皮细胞迁移和和血管形成、心室重构、能量代谢、氧化应激、自噬等多种机制影响心脏功能^[14-17]。PI3K 将 PIP2 转化为 PIP3,PIP3 募集 Akt 到膜内并使其磷酸化激活^[18]。磷酸化 Akt 本身可以诱导肥厚相关基因的表达,也可以抑制 GSK3 β ^[19]。GSK3 β 在静息状态下的细胞中是活化的,研究证实,过表达 GSK3 β 展现出强大的抗心肌肥厚效应,包括蛋白合成的增加和肥厚基因的表达,而抑制 GSK3 β 则会导致心肌肥厚的加重^[20]。PI3K/Akt 信号在磷酸化激活后会通过 GSK3 β 的 Ser9 位点的磷酸化使 GSK3 β 失活^[21]。

PI3K/Akt 信号和 GSK3 β 信号被视作心肌肥厚调节的重要靶点。Qian WC 等^[22]研究发现,黄芩素可以通过促进 PI3K 的催化亚基 Pik3 α 的泛素化降解,抑制 PI3K/Akt 信号通路,在体内和体外抑制异丙肾上腺素诱导的心肌肥厚和心肌细胞肥大。Ba L 等^[17]研究发现大蒜素可以通过调节 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制心肌细胞过度自噬,从而减轻压力负荷诱导的心肌肥厚。Chen L 等^[23]研究发现,薯蓣皂苷通过在体内体外抑制 MAPK 信号和 Akt/GSK3 β /mTOR 信号,抑制血管紧张素 II 诱导的心肌肥厚和心肌细胞肥大。诸如此类研究均表明 PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路在心肌肥厚和 CHF 中都起着重要的作用。

中医药在抑制心肌肥厚和防治心力衰竭方面具有强大的潜力。现代医学治疗心力衰竭开始主张在出现心力衰竭症状之前给予干预,这与中医学“治未病”思想不谋而合,提示在采用中医药抑制并逆转心肌肥厚从而防治心力衰竭方面的巨大研究价值。心宝丸用于临床多年,药味较多,成分复杂,具有活血通脉,益气助阳,温补心肾的功效,李尊江等^[24]通过网络药理学研究发现,心宝丸中人参皂苷类化合物具有抗心律失常、心肌肥厚、抑制心肌细胞凋亡、改善心肌缺血、保护血

管内皮细胞等药理作用,华蟾素毒基类和蟾毒灵类化合物等发挥强心、抗心肌缺血、改善微循环、增加心肌供氧等作用,洋金花醉茄甙内酯类化合物主要有抗炎、抗瘙痒、细胞毒性和免疫抑制等作用。本研究以腹主动脉缩窄法复制 CHF 大鼠模型,以心宝丸给药干预,发现心宝丸可以有效提升大鼠心脏射血功能,抑制心肌肥厚,减轻心肌细胞肥大,下调肥厚相关基因 ANP 和 Myh7 mRNA 的表达水平,降低血清 NT-proBNP 水平,并且下调 p-PI3K、p-AKT、p-GSK3 β 表达水平,上调 GSK3 β 表达水平,发挥 GSK3 β 的抗心肌肥厚作用,说明其作用机制可能与 PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路有关。然而,心宝丸作为中药复方,通过多靶点多机制发挥药理学作用,本研究的结果只能说明心宝丸发挥抑制心肌肥厚,防治心力衰竭的作用可能与 PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路有关,而其作用机制是否直接靶向 PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路,或者有其他抗心肌肥厚的机制则需要进一步的研究。故应逐步深入研究,为心宝丸防治 CHF 提供更多理论依据。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Li Y, Li Z, Zhang C, et al. Cardiac fibroblast-specific activating transcription factor 3 protects against heart failure by suppressing MAP2K3-p38 signaling [J]. *Circulation*, 2017, 135(21): 2041-2057.
- [2] Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(7): 387-407.
- [3] Shimizu I, Minamino T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 97: 245-262.
- [4] Lyon RC, Zanella F, Omens JH, et al. Mechano-transduction in cardiac hypertrophy and failure [J]. *Circ Res*, 2015, 116(8): 1462-1476.
- [5] Gao WN, Guo N, Zhao SG, et al. Carboxypeptidase A4 promotes cardiomyocyte hypertrophy through activating PI3K-AKT-mTOR signaling [J]. *Biosci Rep* 2020, 40(5): BSR20200669. <https://doi.org/10.1042/BSR20200669>.
- [6] Hardt SE, Sadoshima J. Glycogen synthase kinase-3 β : a novel regulator of cardiac hypertrophy and development [J]. *Circ Res*, 2002, 90(10): 1055-1063.
- [7] 陈志清, 李浪. GSK-3 β 调节心肌纤维化的研究进展 [J]. *广西医科大学学报*, 2020, 37(3): 533-537.
- [8] 彭玉霞, 卢桂林, 张斌霞. 中医药治疗慢性心力衰竭的

- 研究进展[J]. 中国中医急症, 2020, 29(2): 373-376.
- [9] 彭广操, 朱明军, 王永霞, 等. 心宝丸治疗病态窦房结综合征的系统评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 286-289.
- [10] 黄贤娜, 黄玲, 罗洪波. 基于 TGF- β 1/Smads 通路研究补阳还五汤对心衰大鼠心肌重塑的干预作用[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(5): 15-20.
- [11] Gjesdal O, Bluemke DA, Lima JA. Cardiac remodeling at the population level-risk factors, screening, and outcomes[J]. Nat Rev Cardiol, 2011, 8(12): 673-685.
- [12] Rouleau JL. New and emerging drugs and device therapies for chronic heart failure in patients with systolic ventricular dysfunction[J]. Can J Cardiol, 2011, 27(3): 296-301.
- [13] Hellawell JL, Margulies KB. Myocardial reverse remodeling[J]. Cardiovasc Ther, 2012, 30(3): 172-181.
- [14] Lawrence SP, Holman GD, Koumanov F. Translocation of the Na⁺/H⁺ exchanger 1 (NHE1) in cardiomyocyte responses to insulin and energy-status signalling[J]. Biochem J, 2010, 432(3): 515-523.
- [15] Azimzadeh O, Sievert W, Sarioglu H, et al. Integrative proteomics and targeted transcriptomics analyses in cardiac endothelial cells unravel mechanisms of long-term radiation-induced vascular dysfunction [J]. J Proteome Res, 2015, 14(2): 1203-1219.
- [16] Bi YM, Wu YT, Chen L, et al. 3, 5-Dicaffeoylquinic acid protects H9C2 cells against oxidative stress-induced apoptosis via activation of the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Food Nutr Res, 2018, 62.
- [17] Ba L, Gao J, Chen Y, et al. Allicin attenuates pathological cardiac hypertrophy by inhibiting autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK/mTOR signaling pathways[J]. Phytomedicine, 2019, 58: 152765.
- [18] Woodgett JR. Recent advances in the protein kinase B signaling pathway[J]. Curr Opin Cell Biol, 2005, 17(2): 150-157.
- [19] Dorn GN. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy[J]. Hypertension, 2007, 49(5): 962-970.
- [20] Takahashi-Yanaga F. Roles of Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) in cardiac development and heart disease[J]. J Uoeh, 2018, 40(2): 147-156.
- [21] Blankesteyn WM, van de Schans VA, ter Horst P, et al. The Wnt/frizzled/GSK-3 beta pathway: a novel therapeutic target for cardiac hypertrophy [J]. Trends Pharmacol Sci, 2008, 29(4): 175-180.
- [22] Qian WC, Yu DS, Zhang J, et al. Wogonin attenuates isoprenaline-induced myocardial hypertrophy in mice by suppressing the PI3K/Akt pathway[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 896.
- [23] Chen L, Li Q, Lei L, et al. Dioscin ameliorates cardiac hypertrophy through inhibition of the MAPK and Akt/GSK3beta/mTOR pathways [J]. Life Sci, 2018, 209: 420-429.
- [24] 李尊江, 于潇潇, 王冬梅, 等. 基于网络药理学研究心宝丸治疗慢性心力衰竭的作用机制[J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(6): 768-774.

(收稿:2020-06-08 在线:2020-10-27)

责任编辑:白霞

中国中西医结合杂志社微信公共账号已开通

中国中西医结合杂志社已经开通微信公共账号,可通过扫描右方二维码或者搜索微信订阅号“中国中西医结合杂志社”加关注。本杂志社将通过微信不定期发送《中国中西医结合杂志》、*Chinese Journal of Integrative Medicine* 的热点文章信息,同时可查看两本期刊的全文信息,欢迎广大读者订阅。

