

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.11.005

杨梅素通过激活 AKT 信号通路抑制心肌梗死后心脏重构的研究

邵 玲,周梦桥,熊涛,邓长金[△]
(湖北省荆门市第一人民医院心血管内科 448000)

[摘要] 目的 探讨杨梅素是否能够保护小鼠心肌梗死后心脏重构以及可能的分子机制。方法 采用冠状动脉左前降支结扎手术建立心肌梗死模型,将 C57BL/6J 小鼠分为对照组、模型组、低浓度杨梅素组(100 mg·kg⁻¹·d⁻¹)和高浓度杨梅素组(300 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。杨梅素处理组在手术第 3 天起采用灌胃方法处理心肌梗死小鼠 25 d,观察小鼠死亡率;4 周后采用超声心动图检测小鼠心功能;病理染色检测心肌梗死面积;RT-PCR 检测心脏重构标志物;免疫印迹法检测改变的蛋白分子。结果 MI 术后 4 周,与对照组比较,模型组小鼠生存率降低(37%),心功能明显恶化,心肌肥厚程度增加,纤维化水平增加,心脏炎性反应增加,氧化应激水平增加;低浓度和高浓度杨梅素处理均能明显增加小鼠术后生存率(低浓度组 58%;高浓度组 61%),改善心功能,减少心肌梗死面积,降低心肌肥厚、纤维化、炎性反应、氧化应激水平;且高浓度杨梅素处理组效果优于低浓度杨梅素组;免疫印迹结果显示,杨梅素可增加 PI3K、AKT 和 mTOR 信号通路蛋白的激活,促进细胞存活。结论 杨梅素可以通过激活 AKT 信号通路,改善心肌梗死后的心脏重构。

[关键词] 杨梅素;心肌梗死;心脏重构;PI3K/AKT 信号通路

[中图分类号] R541 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)11-1817-05

Myricetin inhibits cardiac remodeling after myocardial infarction by activating AKT signal pathway
SHAO Ning,ZHOU Mengqiao,XIONG Tao,DENG Changjin[△]

(Department of Cardiology,Jingmen Municipal No.1 People's Hospital,Jingmen,Hubei 448000,China)

[Abstract] **Objective** To investigate whether myricetin can protect the cardiac remodeling after myocardial infarction(MI) in mice and its possible molecular mechanism. **Methods** The left anterior descending coronary artery ligation was used to establish the myocardial infarction (MI) model. C57BL/6J mice were randomly divided into the control group,model group,low concentration of myricetin treatment group (100 mg·kg⁻¹·d⁻¹) and high concentration of myricetin treatment group (300 mg·kg⁻¹·d⁻¹). The myricetin treatment groups began to treat the mice with MI for 25 d on postoperative 3 d by using the gavage method. The death rate of mice was observed. The mice cardiac function was detected by echocardiography after 4 weeks. The pathological staining was used to assess the myocardial infarction area. RT-PCR was used to detect the cardiac remodeling markers. Western blot was used to detect the changed protein molecule. **Results** The mice survival rate at 4 weeks after MI operation was decreased (37%),the cardiac function was significantly deteriorated,myocardiac hypertrophy degree was increased,the fibrosis level was increased,the cardiac inflammatory reaction was increased,the oxidative stress level was increased;the treatment of low and high concentrations of myricetin all could obviously increase the postoperative survival rate (low concentration group:58%;high concentration group:61%),improved the cardiac function,decreased the myocardiac infarction area,reduced the myocardial hypertrophy,fibrosis,inflammatory reaction and oxidative stress level;moreover which in the high concentration myricetin treatment group was superior to that in the low concentration group;the Western blot results showed that myricetin increased the activation of PI3K,AKT,and mTOR signaling pathway and promoted the cellular survival. **Conclusion** Myricetin improves the cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the AKT signaling pathway.

[Key words] myricetin;myocardial infarction;cardiac remodeling;PI3K/AKT signaling pathway

心肌梗死是冠状动脉疾病发病和死亡的主要原因。在急性心肌梗死后,心肌细胞大量死亡,触发一系列的分子和细胞重构反应包括炎性反应、心肌细胞肥大反应、纤维化增生和胶原疤痕的形成^[1]。在早期上述重构过程能够保持心脏的完整性和维持心脏功能,然而持续的梗死后重构将最终导致左室扩张、心功能不全,最终发展成为心力衰竭^[2]。目前临床上的药物并不能抑制甚至逆转重构的心脏^[3],因此心力衰

竭患者的发病率逐年升高。为此,寻找新的药物靶点迫在眉睫。

杨梅素是药物化学的重要天然产品之一,已有研究报道杨梅素具有多种功效:抗菌、抗病毒、抗癌、抗炎、抗氧化应激和降糖活性^[4-6]。在心脏中的研究表明,杨梅素可以减轻大鼠心脏急性缺血再灌注损伤,可减少盐敏感性大鼠心脏损伤^[7]。此外,杨梅素还可减轻异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌损伤^[8]。上述研究均提示杨梅素可能对心肌损伤后重构具有抑制作用。本研究采用心肌梗死模型,旨在探讨杨梅素对心肌梗死后心脏重构的影响和具体机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 8~10 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠(SPF 级),饲养于隔离屏障设施的环境中;购买于南京医科大学实验室动物中心,动物合格证号:SCXK(苏)-2015-0132;动物生产许可证号:SCXK(苏)2014-0131,体质量 23.5~27.5 g,采用随机数字表法分为 4 组:对照组($n=10$);模型组($n=20$);低浓度杨梅素组($n=20$);100 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 杨梅素灌胃处理,术后 3 d 开始,持续到术后 4 周;高浓度杨梅素组($n=20$):300 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 杨梅素灌胃处理,术后 3 d 开始,持续到术后 4 周。

1.2 试剂 杨梅素(纯度大于 98%,上海融禾生物有限公司);P-PI3K 抗体(4228S),T-PI3K 抗体(4257),P-AKT 抗体(4060),T-AKT 抗体(4691),P-mTOR 抗体(2971),T-mTOR 抗体(2983),GAPDH 抗体(2118)均购自 Cell Signaling Technology 公司。

1.3 心肌梗死模型制备 采用冠状动脉左前降支结扎术建立心肌梗死模型。用 3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠后,在胸骨左缘纵行切开皮肤暴露心脏,在左心耳下缘 2~3 mm 处用 8-0 的聚丙烯缝线结扎冠状动脉,以心电图 ST 段抬高确定心肌缺血形成,对照组以相同的方法挂线,但是不结扎。迅速将心脏送回胸腔,缝合胸壁。术后 3 d 开始喂药处理。

1.4 超声心动图检测 采用小动物超声系统检测小鼠心功能。收集的数据包括:左室收缩末期内径(LVESd),左室舒张末期内径(LVEDd),左室射血分数(LVEF),左室短轴缩短率(LVFS)。

1.5 心肌梗死面积的计算 术后 4 周,取小鼠心脏,

采用中性甲醛固定,石蜡包埋切片,进行 HE 染色,用 Image J1.44 软件计算心肌梗死面积。

1.6 HE、天狼星红(PSR)和免疫组化染色 采用苏木素和伊红进行 HE 染色;采用 PSR 进行胶原染色;采用免疫组化染色 CD45 和 CD68,DAB 显色法进行炎症细胞浸润标记。

1.7 RT-qPCR 检测 采用 TRIzol(Invitrogen 公司)提取心脏的总 RNA;采用罗氏公司的反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。采用罗氏 Light Cycler 480 SYBR Green 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增。所有目标基因的转录结果与内参基因 GAPDH 进行对比。

1.8 Western blot 检测 采用裂解法提取小鼠心脏总蛋白,采用 BCA 试剂进行蛋白定量。采用 10%的 SDS-PAGE 进行凝胶电泳。所用一抗包括:磷酸化和总的 PI3K、AKT、mTOR 和内参蛋白 GAPDH(均购买于 CST 公司)。采用化学发光法进行显色,每组磷酸化蛋白的表达水平用其相应的总蛋白表达校准。

1.9 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组之间的比较用非配对 t 检验;多组之间的比较用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 杨梅素提高心肌梗死后小鼠存活率,改善心功能,减小心肌梗死面积 低浓度和高浓度杨梅素处理后的小鼠存活率明显高于模型组($P<0.05$)。且两种浓度的杨梅素处理组小鼠心肌梗死面积明显缩小($P<0.05$),其心脏重量显著低于模型组($P<0.05$)。此外,超声心动图结果提示低浓度和高浓度杨梅素能明显改善心肌梗死后 4 周小鼠的心功能:LVESd 和 LVEDd 明显小于模型组,而 LVEF 和 LVFS 明显高于模型组($P<0.05$)。两种浓度的杨梅素处理组间差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

2.2 杨梅素降低心肌肥厚程度 心肌梗死 4 周后,模型组小鼠心肌肥厚程度明显增高;心肌肥厚相关基因 A 型利钠肽(ANP)、B 型利钠肽(BNP)和肌球蛋白重链 β (β -MHC)的转录水平显著增加;低浓度和高浓度杨梅素处理组均能显著抑制心肌肥厚程度,降低心肌肥厚相关基因的转录($P<0.05$)。高浓度杨梅素处理组效果优于低浓度处理组($P<0.05$),见图 1,表 2。

表 1 各组小鼠生存率、梗死面积以及心功能的比较

项目	对照组	模型组	低浓度杨梅素组	高浓度杨梅素组
生存率(%)	100	37*	58*#	61*#
心肌梗死面积($\bar{x}\pm s$,%)	—	56.70 $\pm$ 2.89*	38.90 $\pm$ 3.25*#	41.10 $\pm$ 2.11*#
心脏质量($\bar{x}\pm s$,mg)	112.21 $\pm$ 2.32	265.45 $\pm$ 4.32*	187.23 $\pm$ 5.43*#	179.34 $\pm$ 4.34*#
LVESd($\bar{x}\pm s$,mm)	2.65 $\pm$ 0.76	4.58 $\pm$ 0.98*	3.65 $\pm$ 0.43*#	3.86 $\pm$ 0.87*#
LVEDd($\bar{x}\pm s$,mm)	3.48 $\pm$ 0.95	5.68 $\pm$ 1.13*	4.12 $\pm$ 0.58*#	4.08 $\pm$ 0.88*#
LVEF($\bar{x}\pm s$,%)	67.87 $\pm$ 3.12	32.66 $\pm$ 4.87*	49.87 $\pm$ 3.11*#	46.78 $\pm$ 2.99*#
LVFS($\bar{x}\pm s$,%)	34.43 $\pm$ 2.99	19.87 $\pm$ 2.11*	28.08 $\pm$ 2.12*#	29.58 $\pm$ 3.09*#

*: $P<0.05$,与对照组比较;#: $P<0.05$,与模型组比较

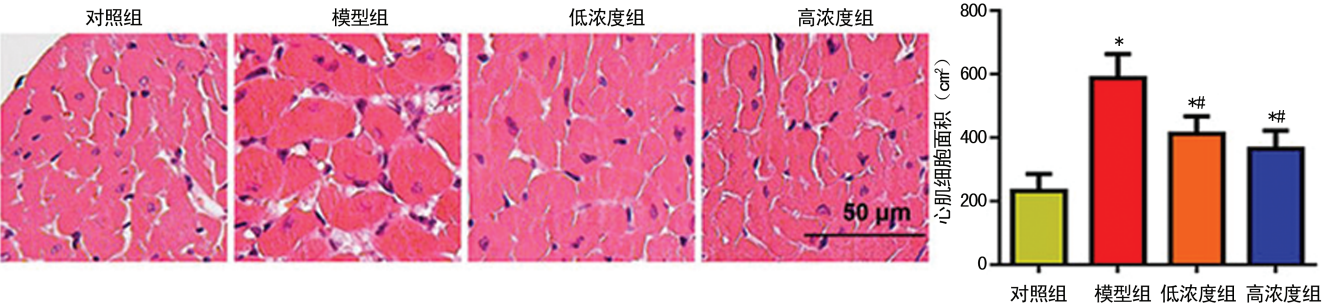


图 1 各组 HE 染色心肌肥厚程度

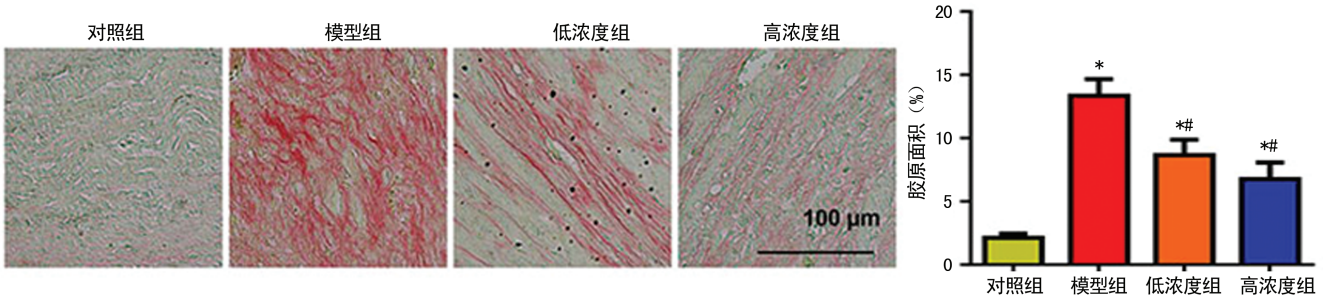


图 2 各组 PSR 染色心肌纤维化程度

表 2 各组小鼠心脏心肌肥厚和纤维化相关基因的转录水平(±s)

项目	对照组	模型组	低浓度组	高浓度组
ANP	0.32±0.01	3.24±0.03 *	1.55±0.01 * #	1.07±0.02 * #
BNP	0.27±0.02	2.98±0.01 *	1.43±0.03 * #	1.19±0.02 * #
β-MHC	0.14±0.02	3.22±0.01 *	1.09±0.02 * #	0.88±0.02 * #
Collgen I (×10 ⁻²)	1.09±0.12	13.43±1.11 *	8.12±0.13 * #	6.99±0.18 * #
Collgen III (×10 ⁻²)	1.14±0.76	14.34±1.21 *	8.55±1.99 * #	6.67±1.09 * #
CTGF(×10 ⁻³)	2.09±1.11	15.43±2.12 *	7.43±1.23 * #	5.21±1.87 * #
TGF-β(×10 ⁻⁴)	1.98±0.12	12.28±2.24 *	8.34±1.34 * #	6.28±1.11 * #

* :*P*<0.05,与对照组比较;#: *P*<0.05,与模型组比较

表 3 各组小鼠心脏心肌炎症和氧化应激水平(±s)

项目	对照组	模型组	低浓度组	高浓度组
IL-1(×10 ⁻⁴)	5.39±0.12	17.86±2.33 *	8.91±2.11 * #	6.64±1.98 * #
IL-6(×10 ⁻⁴)	1.23±0.32	11.87±2.32 *	6.65±1.21 * #	5.65±1.01 * #
TNF-α(×10 ⁻⁴)	1.65±0.43	12.09±2.32 *	8.98±1.42 * #	6.45±2.62 * #
NADPH P67(×10 ⁻³)	2.33±0.76	15.65±2.32 *	5.54±0.76 * #	4.65±0.89 * #
NADPH gp91(×10 ⁻³)	1.02±0.48	10.90±1.29 *	6.54±1.09 * #	4.65±0.78 * #
SOD(nmol/mg)	4.35±0.87	0.76±0.12 *	1.23±0.32 * #	2.65±0.78 * #
MDA(nmol/mg)	11.40±1.23	35.60±2.34 *	19.40±2.09 * #	18.90±2.87 * #

* :*P*<0.05,与对照组比较;#: *P*<0.05,与模型组比较

2.3 杨梅素降低心肌纤维化水平 心肌梗死 4 周后,模型组小鼠心肌纤维化及相关基因的转录水平显著增加:I 型胶原蛋白(Collagen I),Ⅲ型胶原蛋白(CollagenⅢ),结缔组织生长因子(CTGF)和转化生长因子-β(TGF-β)。低浓度和高浓度杨梅素处理组均能显著抑制心肌纤维化水平;减少纤维化相关基因的转录(*P*<0.05)。高浓度杨梅素处理组效果优于低浓度处理组(*P*<0.05),见图 2,表 2。

2.4 杨梅素降低心肌炎性反应 心肌梗死 4 周后,模型组小鼠 CD45 和 CD68 阳性的炎症细胞浸润明显增多,炎症相关基因[白细胞介素-1(IL-1),白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子(TNF-α)]的转录水平显著

增加;低浓度和高浓度杨梅素处理组均能显著减少 CD45 和 CD68 阳性的炎症细胞浸润;减少 IL-1、IL-6、TNF-α 的转录(*P*<0.05)。不同浓度杨梅素处理组间差异无统计学意义(*P*>0.05),见表 3、图 3。

2.5 杨梅素降低心肌氧化应激水平 心肌梗死 4 周后,模型组小鼠还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶亚基 gp91 和 P67 的转录水平明显增强,抗氧化酶超氧化物歧化酶(SOD)活性明显降低,小鼠心脏脂质过氧化中间代谢产物丙二醛(MDA)明显增多;低浓度和高浓度杨梅素处理组均能显著减少 gp91 和 P67 的转录水平;增加 SOD 活性,减少 MDA 产生(*P*<0.05)。不同浓度杨梅素处理

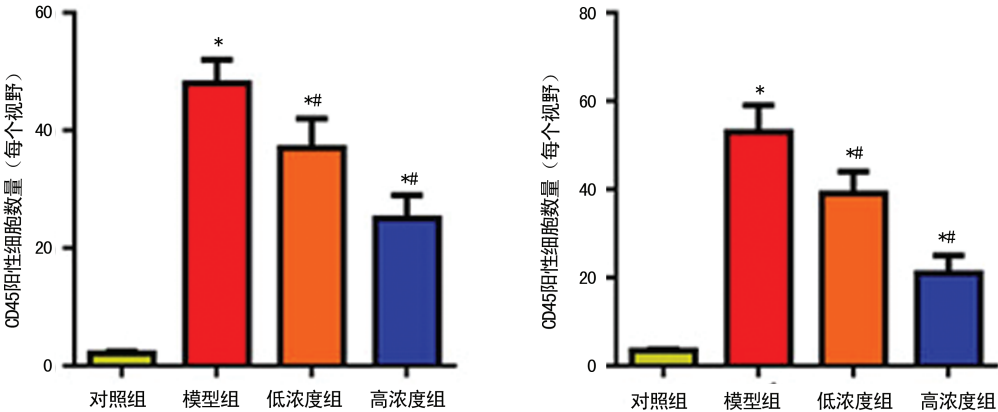
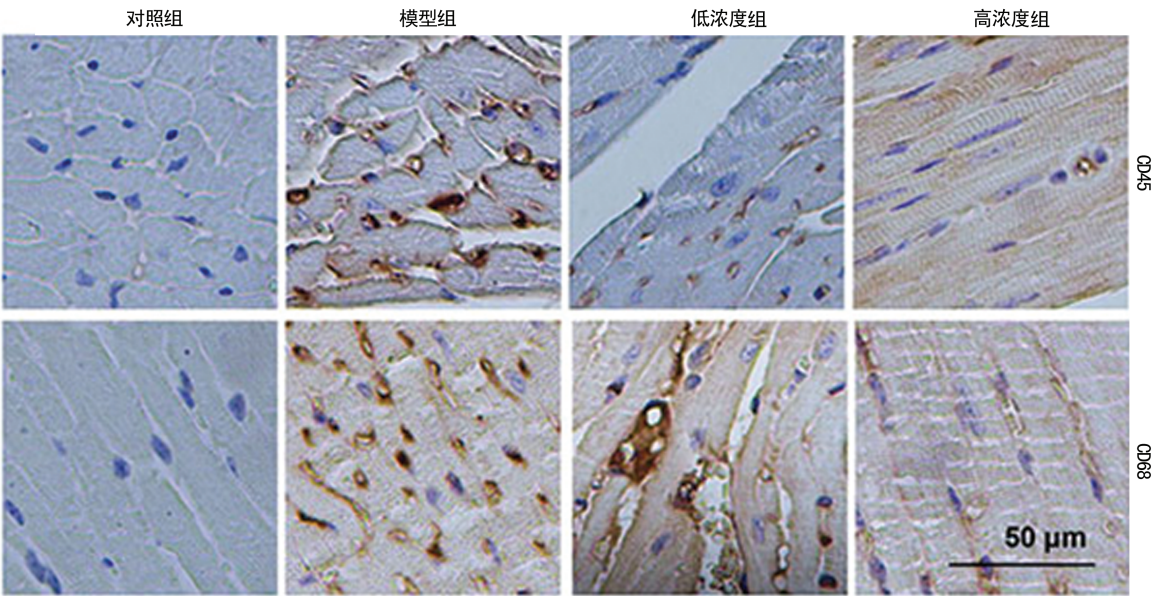


图 3 各组 CD45 和 CD68 阳性炎症细胞浸润数量

表 4 各组心脏 AKT 信号蛋白的相对表达(±s)

项目	对照组	模型组	低浓度组	高浓度组
P-PI3K/T-PI3K	2.34±0.02	0.98±0.01*	2.56±0.02#	2.76±0.02#
P-AKT/T-AKT	3.12±0.02	0.54±0.01*	3.25±0.03#	2.98±0.02#
P-mTOR/T-mTOR	0.89±0.02	0.45±0.01*	0.83±0.03#	0.91±0.02#

*: $P<0.05$, 与对照组比较; #: $P<0.05$, 与模型组比较

组间差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

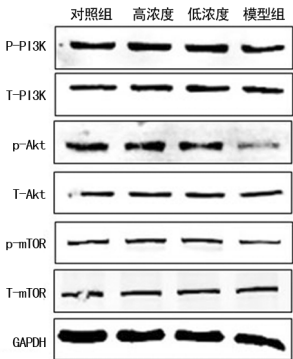


图 4 各组 AKT 信号通路的改变

2.3 杨梅素激活 AKT 信号通路 模型组小鼠心脏 AKT 活化程度明显降低($P<0.05$),且其上游 PI3K 和下游蛋白 mTOR 磷酸化水平降低($P<0.05$)。低浓度和高浓度杨梅素处理后 AKT 信号通路蛋白

PI3K,AKT 和 mTOR 的磷酸化水平明显提高($P<0.05$)。不同浓度处理组间差异无统计学意义($P>0.05$),见表 4、图 4。

3 讨 论

以往的研究表明杨梅素通过抑制 P38 信号通路减轻大鼠心脏急性缺血再灌注损伤^[4]。杨梅素可减少盐敏感性大鼠心脏损伤^[7]。杨梅素还可减轻异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌损伤^[8]。上述研究均侧重于杨梅素对抗心肌的急性损伤作用。而本研究采用心肌梗死模型,杨梅素给予处理至术后 4 周,探讨杨梅素对心肌梗死后心脏重构的影响,结果提示杨梅素能够减少小鼠心肌梗死后 4 周的死亡率,减少心肌梗死面积,改善梗死 4 周后的心功能。

心肌梗死后的心脏重构是一个复杂的病理过程。在心肌梗死早期(梗死后 1~2 周),坏死和凋亡的心肌细胞诱导一系列炎症反应。适当的炎症反应促进

死亡的心肌细胞清除^[9];炎症细胞分泌的促炎症因子可诱导成纤维细胞的激活和分泌,促进心肌纤维化^[10]。在疾病早期,上述重构有助于维持心脏的完整性和功能。随着重构的持续(梗死后 3~4 周),梗死周边区域残余的心肌细胞为满足心脏的做功要求,发生肥厚性增生,在此过程中胚胎基因过度激活(ANP、BNP、 β -MHC),成为心脏重构的标志物^[11];此外,纤维化过度增生导致左室僵硬度增加,心室顺应性降低,影响心脏的舒张功能^[11]。本研究发现杨梅素能够显著减少心脏重量和心脏重构标志物 ANP、BNP、 β -MHC 的表达;减少纤维化标志物 I 型 collagen I、collagen III 和促纤维化因子 CTGF、TGF- β 的转录。提示杨梅素能够阻止心肌梗死后心脏重构的发展。

在心肌梗死后期,过度的炎性反应造成促纤维化因子大量分泌,刺激成纤维细胞增殖分化和分泌,促进心肌纤维化;此外,过多的炎性反应导致心肌细胞损伤凋亡增多,心肌细胞数量减少,影响心脏收缩功能^[12]。氧化应激在心肌梗死后心脏重构中发挥重要作用。在生理条件下,ROS 作为第二信使发挥重要的信号传递功能;然而在病理条件下 ROS 产生和清除失衡,导致心肌细胞氧化应激损伤。一方面氧化应激引起细胞蛋白质和 DNA 损伤;另一方面氧化应激激活多种炎症和心脏重构相关通路,刺激心脏重构的发生发展^[13]。本研究发现,杨梅素能够减少心肌梗死后 CD45 和 CD68 炎症细胞的浸润,减少促炎症因子的合成;减少氧化酶 NADPH 的表达,而增加抗氧化酶 SOD 的活性。提示杨梅素能够阻止心肌梗死后心肌炎症和氧化应激反应。

PI3K/AKT 是胰岛素受体被激活后的重要的信号通路,在调节细胞代谢、葡萄糖摄取、细胞增殖和蛋白质合成方面发挥核心作用^[14]。在心肌细胞中,AKT 信号通路还参与细胞存活、血管生成、炎性反应和氧化应激。在受到胰岛素信号刺激后,PI3K 磷酸化激活,促进下游的 AKT 蛋白磷酸化激活,后者可刺激多种下游分子^[15]。其中 mTOR 通过 mTORC1 复合体激活后促进细胞蛋白质合成、生长和存活^[16]。本研究发现小鼠心肌梗死 4 周 AKT 信号通路蛋白明显失活,而低浓度和高浓度杨梅素处理能够重新激活 PI3K/AKT 信号通路,促进心肌细胞存活,降低小鼠死亡,抑制心脏重构的发展。

综上所述,杨梅素能够通过激活 PI3K/AKT 信号通路,阻断心肌梗死后的心脏重构。杨梅素可能成为治疗心脏重构的新思路。

参考文献

- [1] BHATT A S, AMBROSIO A P, VELAZQUEZ E J. Adverse remodeling and reverse remodeling after myocardial infarction[J]. *Curr Cardiol Rep*, 2017, 19(8): 71.
- [2] THIAGARAJAN H, THIYAGAMOORTHY U, SHANMUGHAM I, et al. Angiogenic growth factors in myocar-

- dial infarction; a critical appraisal[J]. *Heart Fail Rev*, 2017(22): 665-683.
- [3] DELEON-PENNELL K Y, MESCHIARI C A, JUNG M, et al. Matrix metalloproteinases in myocardial infarction and heart failure[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017 (147): 75-100.
- [4] QIU Y, CONG N, LIANG M, et al. Systems pharmacology dissection of the protective effect of myricetin against acute ischemia/reperfusion-induced myocardial injury in isolated rat heart[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2017, 17(3): 277-286.
- [5] ORTEGA J T, SUAREZ A I, SERRANO M L, et al. The role of the glycosyl moiety of myricetin derivatives in anti-HIV-1 activity in vitro[J]. *AIDS Res Ther*, 2017, 14(1): 57.
- [6] JUNG H Y, LEE D, RYU E, et al. Myricetin improves endurance capacity and mitochondrial density by activating SIRT1 and PGC-1 α [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 6237.
- [7] BORDE P, MOHAN M, KASTURE S. Effect of myricetin on deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt-hypertensive rats[J]. *Nat Prod Res*, 2011, 25(16): 1549-1559.
- [8] TIWARI R, MOHAN M, KASTURE S, et al. Cardioprotective potential of myricetin in isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats[J]. *Phytother Res*, 2009, 23(10): 1361-1366.
- [9] PRABHU S D, FRANGOGIANNIS N G. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: from inflammation to fibrosis[J]. *Circ Res*, 2016, 119(1): 91-112.
- [10] LINDSEY M L, HALL M E, HARMANCEY G, et al. Adapting extracellular matrix proteomics for clinical studies on cardiac remodeling post-myocardial infarction[J]. *Clin Proteomics*, 2016(13): 19.
- [11] TALMAN V, RUSKOAHIO H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration[J]. *Cell Tissue Res*, 2016, 365(3): 563-581.
- [12] HUANG S, FRANGOGIANNIS N G. Anti-inflammatory therapies in myocardial infarction: failures, hopes, and challenges[J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(9): 1377-1400.
- [13] HORI M, NISHIDA K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 81(3): 457-464.
- [14] GUO C A, GUO S. Insulin receptor substrate signaling controls cardiac energy metabolism and heart failure[J]. *J Endocrinol*, 2017, 233(3): 131-143.
- [15] WEEKS K L, BERNARDO B C, OOI J Y, et al. The IGF1-PI3K-Akt signaling pathway in mediating exercise-induced cardiac hypertrophy and protection[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017(1000): 187-210.
- [16] TASATARGIL A N, KUSCU S, DALAKLIOGLU A, et al. Cardioprotective effect of nesfatin-1 against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats: Role of the Akt/GSK-3 β pathway[J]. *Peptides*, 2017, 95(1): 1-9.