

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.13.006

网络首发 <http://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.r.20190628.1543.017.html>(2019-07-01)

## GSK3 $\beta$ 在 HGF 信号通路中对改善心肌缺血再灌注损伤的作用研究\*

潘艳艳, 史斌浩, 马梦晴, 林先和 $\Delta$

(安徽医科大学第一附属医院心血管内科, 合肥 230022)

**[摘要]** **目的** 探讨糖原合成酶激酶  $\beta$ (GSK3 $\beta$ )的活性在肝细胞生长因子(HGF)信号通路中对改善心肌缺血再灌注损伤的作用及机制。**方法** 研究大鼠离体心肌细胞 H9c2,用不同类型的 GSK3 $\beta$ 腺病毒[不表达 GSK3 $\beta$ 的重组腺病毒 Ad-GFP;野生型 GSK3 $\beta$ 腺病毒 GSK3 $\beta$ -Ad-wt;表达 GSK3 $\beta$ 不可磷酸化的组成型活性突变体,其第 9 位丝氨酸残基突变(Ser9)为丙氨酸,从而不能再被磷酸化失活而具有固有活性的 GSK3 $\beta$ 腺病毒 GSK3 $\beta$ -Ad-S9A;表达催化失活的 GSK3 $\beta$ 复制缺陷型腺病毒载体,其第 85 位赖氨酸残基突变为甲硫氨酸,从而持续失活的 GSK3 $\beta$ 腺病毒 GSK3 $\beta$ -Ad-K85A]感染细胞和 HGF 激活剂刺激细胞,分为对照组、缺血再灌注(I/R)组、I/R+HGF 组、I/R+HGF+Ad-GFP 组、I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-wt 组、I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-S9A 组和 I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-K85A 组。Western blot 检测 GSK3 $\beta$ ,下游通路蛋白肝激酶 B1(LKB1),腺苷单磷酸激活蛋白激酶(AMPK),自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3 II 及上游通路蛋白激酶 B(Akt)的表达水平。**结果** 与对照组和 I/R 组比较,HGF 激活剂能促进 pGSK3 $\beta$ ,下游通路蛋白 LKB1、AMPK,自噬相关蛋白 LC3 II、Beclin-1,上游蛋白 pAkt 的表达,差异有统计学意义( $P<0.05$ );而在 HGF 激活剂的作用下,GSK3 $\beta$ 的失活(Ad-wt 和 Ad-K85A 腺病毒感染组)使下游通路蛋白 LKB1、AMPK 和自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3 II 的表达量明显升高,而在 I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-S9A 组则明显降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** HGF 通路通过激活磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/Akt/GSK3 $\beta$ /AMPK 信号通路促进细胞自噬并改善心肌细胞缺血再灌注损伤。

**[关键词]** 糖原合成酶激酶  $\beta$ ;肝细胞生长因子;自噬;心肌缺血;再灌注损伤

**[中图分类号]** R542.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2019)13-2184-05

### Study on role of GSK3 $\beta$ for improving myocardial ischemia reperfusion injury in HGF signaling pathway\*

PAN Yanyan, SHI Binhao, MA Mengqing, LIN Xianhe $\Delta$

(Department of Cardiovascular Medicine, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230022, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role and mechanism of GSK3 $\beta$  activation for improving myocardial ischemia reperfusion injury (IRI) in HGF signaling pathway. **Methods** The rat isolated cardiomyocytes H9c2 were selected as the study objects. The different kinds of GSK3 $\beta$  adenovirus [not expressing GSK3 $\beta$  recombinant adenovirus Ad-GFP; wild type GSK3 $\beta$  adenovirus GSK3 $\beta$ -Ad-wt; expressing GSK3 $\beta$  non-phosphorylation constitutive type active mutant, its serine residue at site 9 (Ser9) mutating as alanine, thus which can not be inactivated again by phosphorylation, and possessing active GSK3 $\beta$  adenovirus GSK3 $\beta$ -Ad-S9A; expressing catalytically inactivated GSK3 $\beta$  for duplicating deletion type adenovirus vector, its lysine residue at the site 85 mutating as methionine, thus persistently inactivated GSK3 $\beta$  adenovirus GSK3 $\beta$ -Ad-K85A] were used to infect the cells and HG activator was used to stimulate the cells, which divided into the control group, ischemia and reperfusion (I/R) group, I/R+HGF group, I/R+HGF+Ad-GFP group, I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-wt group, I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-K85A group and I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-S9A group. The expression levels of downstream pathways proteins LKB1 and AMPK, autophagy-related proteins LC3 II and Beclin1, and upstream pathway protein Akt were detected by Western blot. **Results** Compared with the control group and I/R group, the HGF stimulator could promote the expressions of pGSK3 $\beta$ , downstream pathway protein LKB1 and AMPK, autophagy-related proteins LC3 II and Beckin1, and upstream protein pAkt, the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ); while under the stimulation of HGF activator, the inactivation of GSK3 $\beta$  (the Ad-wt and Ad-K85A group) significantly increased the expression levels of its downstream

\* 基金项目:安徽省科技攻关计划项目(1501041146)。 作者简介:潘艳艳(1990-),硕士,主要从事冠心病的缺血再灌注损伤研究。

$\Delta$  通信作者, E-mail: xianhelin@sina.com。

proteins LKB1 and AMPK, autophagy-related proteins LC3 II and Beclin-1, whereas which significantly decreased in the I/R + HGF + GSK3 $\beta$ -Ad-S9A group, the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** The HGF pathway can promote the cellular autophagy and improve the myocardial ischemia and reperfusion injury by activating the PI3K/Akt/GSK3 $\beta$ /AMPK signaling pathway.

**[Key words]** glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ; hepatocyte growth factor; autophagy; myocardial ischemia; reperfusion injury

心血管疾病(cardiovascular diseases, CVD)仍是世界范围内导致患者死亡的主要原因,包括冠状动脉疾病、冠心病和缺血性心脏疾病,已成为全球性公共健康问题。随着经济的发展和水平的提高,人们生活作息和饮食习惯的改变,心肌梗死(myocardial infarction, MI)的发病率呈上升趋势<sup>[1]</sup>。临床上以改善缺血,尽早恢复心肌血流灌注,减少 MI 面积为治疗的首要原则<sup>[2]</sup>。大量研究表明,在缺血期除了细胞凋亡、坏死等促细胞死亡的机制外,还存在着细胞自噬(autophagy)等促细胞存活机制<sup>[3]</sup>。自噬是一种进化上保守的细胞内自我保护机制,细胞内多余的蛋白质聚集体和受损细胞器被隔离到自噬小泡中,随后与溶酶体融合降解<sup>[4]</sup>。在缺血状态下,心肌细胞可以通过不同的信号通路调控自噬系统,自噬的发生可促进对受损蛋白、脂质和细胞器等废物的清除<sup>[3]</sup>。因此,自噬被认为是心肌细胞对抗缺血性损伤的主要保护机制。既往研究表明,肝细胞生长因子(HGF)与其受体(Met)的结合可以激活下游信号通路促进自噬,与多种组织疾病自噬密切相关,如肺癌、结肠直肠癌、高糖性肾足细胞损伤等<sup>[5]</sup>。糖原合成激酶 3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ )是 HGF 下游通路中的一个重要通路蛋白,其活性的抑制可以激活多种下游通路对抗心肌缺血再灌注损伤引起的炎症反应,钙超载和氧化应激反应等<sup>[6]</sup>。有研究发现抑制 GSK3 $\beta$  可以激活不同的信号通路,如腺苷单磷酸激活蛋白激酶(AMPK)通路、Beclin-1 通路,可以调控多种疾病自噬<sup>[7-8]</sup>。然而,GSK3 $\beta$  在 HGF 促进自噬对抗缺血再灌注损伤中的作用少见报道。本研究通过建立立体大鼠心肌细胞缺血再灌注模型,观察内源性 HGF 和磷酸化 GSK3 $\beta$ (pGSK3 $\beta$ )的表达情况及下游通路蛋白和自噬相关蛋白的表达水平,研究 HGF 通过促进 GSK3 $\beta$  的磷酸化调控自噬在减轻大鼠心肌细胞缺血再灌注损伤中的相关作用。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料** AMPK、肝激酶 B1(LKB1)、HGF 抗体(美国 Affinity Biosciences 公司);LC3 II 抗体(美国 Abcam 公司);HRP-羊抗小鼠 IgG、HRP-羊抗兔 IgG、 $\beta$ -actin、蛋白激酶 B(Akt)抗体(上海 Bioss 公司);腺病毒(上海 Hanbio 生物科技有限公司);超敏型 ECL 发光液(美国 Advansta 公司);胎牛血清(上海双沱生物科技有限公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞系的选择及培养** 选用大鼠离体心肌细

胞 H9c2 细胞系,90% 高糖培养基(DMEM)、10% 小牛血清及 1% 双抗(青霉素、链霉素)配成的培养基置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 环境下的细胞培养箱中进行培养,取生长良好的细胞种植于 6 孔细胞培养板,继续培养备用。

**1.2.2 实验模型制备** 实验分为正常对照组和实验组,实验组分别为缺血再灌注(I/R)组、I/R + HGF 组、I/R + HGF + Ad-GFP 组(不表达 GSK3 $\beta$  的重组腺病毒 Ad-GFP)、I/R + HGF + GSK3 $\beta$ -Ad-wt 组(野生型 GSK3 $\beta$  腺病毒 GSK3 $\beta$ -Ad-wt)、I/R + HGF + GSK3 $\beta$ -Ad-S9A 组[表达 GSK3 $\beta$  不可磷酸化的组成型活性突变体,其第 9 位丝氨酸残基突变(Ser9)为丙氨酸,从而不能再被磷酸化失活而具有固有活性的 GSK3 $\beta$  腺病毒 GSK3 $\beta$ -Ad-S9A]和 I/R + HGF + GSK3 $\beta$ -Ad-K85A 组(表达催化失活的 GSK3 $\beta$  复制缺陷型腺病毒载体,其第 85 位赖氨酸残基突变为甲硫氨酸,从而持续失活的 GSK3 $\beta$  腺病毒 GSK3 $\beta$ -Ad-K85A)。腺病毒感染方法为细胞贴壁于 6 孔细胞培养板,吸去原有培养基,加入 1 mL 新鲜培养基,选定多重感染(MOI)为 100 单位对应的病毒原液体积加入细胞中,摇匀。放入 37 °C 培养箱中感染 2 h,吸去含病毒的培养液,PBS 清洗 2 次,加入新鲜的培养液。HGF 激活剂组加入 HGF 激活剂(20 ng/mL),放入培养箱中培养 1 h 后更换新鲜培养液 2 mL,继续培养 24 h 后制备 I/R 模型。分别吸出 6 组实验组中的完全培养基,加入 2 mL 缺血模拟液(NaCl 98.5 mmol/L, KCl 10 mmol/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.9 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 6.0 mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mmol/L, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mmol/L, 乳酸钠 40 mmol/L, HEPES 20 mmol/L)并置于低氧细胞培养箱(95% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C)中培养 12 h,吸出缺血模拟液,加入 2 mL 完全培养基于普通培养箱中继续培养 1 h。

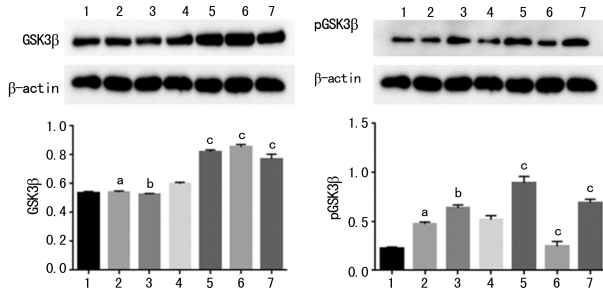
**1.2.3 检测指标** 采用 Western blot 检测 Akt、GSK3 $\beta$ 、LKB1、AMPK、LC3 II、Beclin-1 表达。模型制备完后,将培养板置于冰盒上,用预冷的 PBS 清洗 2 次,吸尽 PBS,加入裂解液摇床上裂解 30 min,用细胞刮刮至 1.5 mL 的 EP 管中,4 °C 12 000 r/min 离心 30 min,轻轻吸取上清液加入其 1/4 的 SDS 上样缓冲液,沸水中煮 10 min,进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳,之后将蛋白转于聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。聚偏氟乙烯(PVDF)膜用含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 3 h。将含有蛋白的聚偏

氟乙烯(PVDF)膜置于 1:1 000 或 1:300 的目标蛋白抗体的一抗稀释液中 4℃ 过夜孵育, TBST 冲洗 3 次, 每次 15 min, 分别使用对应的 1:10 000 二抗孵育 1 h, TBST 冲洗 3 次, 每次 15 min。最后用超敏型 ECL 发光液进行曝光显影, 显影仪 Bio-Rad 成像系统拍照, Image J 软件分析蛋白的相对表达量。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组 GSK3 $\beta$ 、pGSK3 $\beta$  表达情况** 与对照组和 I/R 组比较, I/R+HGF 组 GSK3 $\beta$  的总表达量差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而 pGSK3 $\beta$  的表达量明显增加 ( $P < 0.05$ )。在 HGF 激活剂的刺激下, 各 GSK3 $\beta$  感染组的 GSK3 $\beta$  的总表达量差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-wt 组的 GSK3 $\beta$  总表达量较低 ( $P < 0.05$ )。I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-wt 组和 I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-K85A 组的 pGSK3 $\beta$  明显升高 ( $P < 0.05$ ), 而 I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-S9A 组降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 1。



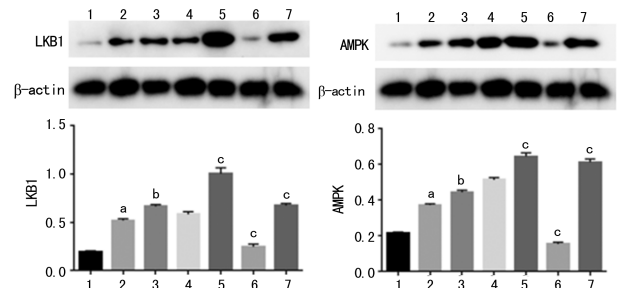
1: 对照组; 2: I/R 组; 3: I/R+HGF 组; 4: I/R+HGF+Ad-GFP 组; 5: I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-wt 组; 6: I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-S9A 组; 7: I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-K85A 组; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$  与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 I/R 组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与 I/R+HGF 组比较

图 1 各组 GSK3 $\beta$ 、pGSK3 $\beta$  表达情况

**2.2 各组 LKB1、AMPK 表达情况** 与对照组比较, I/R 组的 LKB1 和 AMPK 的表达量明显升高 ( $P < 0.05$ )。与 I/R 组相比, I/R+HGF 组 LKB1 和 AMPK 的表达量明显升高 ( $P < 0.05$ )。在 HGF 激活剂的作用下, I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-wt 组和 I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-K85A 组的 LKB1 和 AMPK 明显升高 ( $P < 0.05$ ), 而 I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-S9A 组降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。

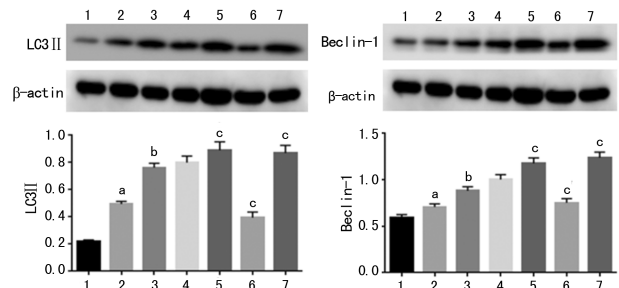
**2.3 各组 LC3 II、Beclin-1 表达情况** 与对照组比较, I/R 组 LC3 II、Beclin-1 的表达量明显升高 ( $P < 0.05$ )。与 I/R 组相比, I/R+HGF 组 LC3 II、Beclin-1 的表达量明显升高 ( $P < 0.05$ )。在 HGF 激活剂的作用下, I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-wt 组和 I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-K85A 组的 LC3 II、Beclin-1 明显升高 ( $P < 0.05$ ), 而 I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-S9A 组

降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。



1: 对照组; 2: I/R 组; 3: I/R+HGF 组; 4: I/R+HGF+Ad-GFP 组; 5: I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-wt 组; 6: I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-S9A 组; 7: I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-K85A 组; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$  与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 I/R 组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与 I/R+HGF 组比较

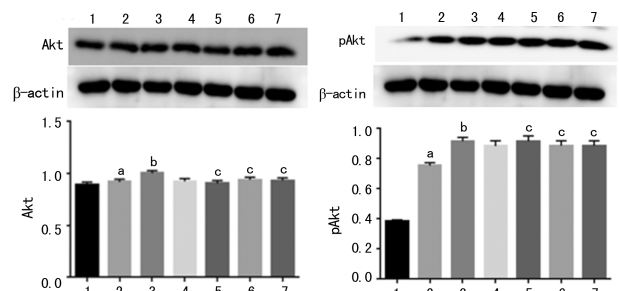
图 2 各组 LKB1、AMPK 表达情况



1: 对照组; 2: I/R 组; 3: I/R+HGF 组; 4: I/R+HGF+Ad-GFP 组; 5: I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-wt 组; 6: I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-S9A 组; 7: I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-K85A 组; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$  与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 I/R 组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与 I/R+HGF 组比较

图 3 各组 LC3 II、Beclin-1 表达情况

**2.4 各组 Akt 表达情况** 与对照组比较, I/R 组的 pAkt (Akt 的 Ser473 位点磷酸化) 的表达量明显升高 ( $P < 0.05$ )。与 I/R 组相比, I/R+HGF 组 pAkt 明显升高 ( $P < 0.05$ )。而在 HGF 激活剂的作用下, 各感染组的 pAkt 表达量差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。



1: 对照组; 2: I/R 组; 3: I/R+HGF 组; 4: I/R+HGF+Ad-GFP 组; 5: I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-wt 组; 6: I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-S9A 组; 7: I/R+HGF+GSK3 $\beta$ -Ad-K85A 组; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$  与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 I/R 组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与 I/R+HGF 组比较

图 4 各组 Akt 表达情况

## 3 讨论

GSK3 $\beta$  是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸酶。GSK3 $\beta$  已被证明作用于多种信号蛋白和转录因子, 调节细胞的分化、增殖、存活和凋亡<sup>[9]</sup>。既往研究表明, GSK3 $\beta$  在 Ser9 位点磷酸化从而失去活性在心肌缺血

再灌注引起的炎症反应,钙超载和氧化应激反应等中具有抗炎和抗凋亡作用,从而保护心肌细胞,其机制可能与其提高线粒体的通透性转换孔(mPTP)开放阈值,减少线粒体损伤,细胞凋亡和坏死相关<sup>[6]</sup>。GSK3 $\beta$ 作为 HGF/Met 信号通路中的一个下游信号蛋白,在 HGF/Met 的抗炎、抗凋亡等多种组织保护机制中起着关键性作用<sup>[7-8]</sup>。而 GSK3 $\beta$ 在心肌细胞发生缺血再灌注时 HGF/Met 信号通路促进自噬,保护心肌细胞中的作用,缺乏相关报道。

当心肌发生缺血再灌注时,除心肌细胞的坏死和凋亡程度影响预后,自噬的发生同样也影响心肌的梗死面积和存活<sup>[3]</sup>。其机制可能是当心肌发生缺血时,细胞的能量缺乏促进 AMPK 的激活,导致自噬基因 Beclin-1 的苏氨酸 388 位点产生磷酸化,促使自噬基因 Beclin-1 与 Bcl-2 解离,促进自噬相关蛋白 Beclin-1 和 VPS34 及 Atg14 的结合形成三聚体复合物,三聚体再不断地招募相关的核心蛋白,作为自噬起始;在自噬体的延长阶段,LC3 I 会被包括 Atg7 和 Atg3 在内的泛素样体系所修饰和加工,产生相对分子质量为  $14 \times 10^3$  的 LC3 II,并定位到自噬小体中。这样,自噬小体中存在的 LC3 和低分子量的 LC3 II 都被当作细胞发生自噬的分子标志,并且 LC3 II 的含量和发生自噬的程度成正比。因此这两个蛋白可以作为自噬水平的检测指标<sup>[10]</sup>。本实验通过腺病毒转染大鼠离体心肌细胞的方法使 GSK3 $\beta$  不同的位点发生突变从而使 GSK3 $\beta$  处于持续失活或激活状态,并通过建立缺血再灌注模型,以 GSK3 $\beta$  下游通路蛋白和自噬相关蛋白为指标研究在 HGF 激活剂的作用下,GSK3 $\beta$  的失活对促进细胞自噬,减轻细胞损伤的相关作用<sup>[11]</sup>。既往研究结果显示,在缺血状态下,HGF 的激活可以激活下游 PI3K/Akt/Bcl-2 信号通路从而抑制细胞凋亡,保护心肌细胞<sup>[12]</sup>。GSK3 $\beta$  作为 PI3K/Akt 的下游信号蛋白在缺血时同样发挥着重要的作用。研究发现,抑制 GSK3 $\beta$  的活性(GSK3 $\beta$  的 Ser9 位点磷酸化)能有效提高线粒体 mPTP 的开放阈值,减少线粒体损伤、细胞凋亡和坏死的发生<sup>[13]</sup>。本实验结果显示,与对照组相比,I/R 组 AMPK 的表达量明显升高,验证了心肌细胞在发生缺血时会产生一定量的自噬。AMPK 的激活与其上游基因 LKB1 的活性有关。在之前的报道中表明,GSK3 $\beta$  去磷酸化将会抑制 LKB1 的活性。本实验结果显示,HGF 促进了 pAkt、pGSK3 $\beta$  的表达,以及下游通路蛋白 LKB1、AMPK 和自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3 II 的表达。证实了在缺血状态下,HGF 对心肌细胞自噬的促进作用及 GSK3 $\beta$  在 HGF 促进自噬中的可能性的潜在性作用。而在 HGF 激活剂的作用下,GSK3 $\beta$  的失活(Ad-wt 和 Ad-K85A 腺病毒感染组)使下游通路蛋白 LKB1、AMPK 和自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3 II 的表达量明显升高。表明了 HGF/Met 信号通路在心肌缺血再灌注损伤

中通过抑制 GSK3 $\beta$  的活性,促进细胞自噬到达保护作用。而持续激活 GSK3 $\beta$  的 Ad-S9A 腺病毒感染组中自噬呈减弱趋势,可能导致心肌细胞加速损伤。

既往研究发现,HGF 与其受体的结合可以激活下游信号蛋白 PI3K/Akt,而 PI3K/Akt 的激活可以促进下游信号蛋白 GSK3 $\beta$  在 Ser9 位点发生磷酸化,失去活性<sup>[6]</sup>。在心血管系统中,GSK3 $\beta$  在葡萄糖代谢、心肌肥厚和细胞死亡等病理过程中起着关键性作用<sup>[14]</sup>。在慢性脑缺血性疾病中,增加 GSK3 $\beta$  的磷酸化会导致 pmTOR 的水平增加及 Beclin-1 水平的降低,从而抑制细胞破坏性自噬的活性。在对高糖血症和血脂异常的人主动脉内皮细胞的研究中发现,抑制 GSK3 $\beta$  的活性可以通过增加 AMPK 的活性增加自噬体的形成,从而减少内皮细胞的死亡及动脉粥样硬化的形成<sup>[15]</sup>。结合本实验结果,表明 GSK3 $\beta$  在 HGF 保护心肌对抗缺血再灌注损伤中起着重要的作用。本实验从蛋白水平证实了 HGF 通路的激活可以通过促进细胞自噬保护心肌细胞在缺血再灌注中的损伤,其可能机制是 PI3K/Akt/GSK3 $\beta$ /AMPK 信号通路的激活,但其是否存在其他可能的分子机制及作用靶点尚不明确,仍待进一步完善。

心肌细胞是一种高度分化的永久性细胞,其损伤往往是不可逆的,会引起致命性损伤。故减少心肌细胞的损伤和死亡对保护心脏极为重要。自噬在缺血再灌注中对心肌细胞起保护作用的同时也会引起细胞自噬性死亡,进一步加重心肌细胞的受损。因此,避免或尽最大程度地降低自噬在缺血再灌注损伤引起的细胞死亡将可能成为未来治疗冠心病的重要环节。

## 参考文献

- [1] GALLONE G, BALDETTI L, PAGNESI M, et al. Medical therapy for long-term prevention of atherothrombosis following an acute coronary syndrome: JACC state-of-the-art review[J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 72 (23 Pt A): 2886-2903.
- [2] DAVIDSON S M, FERDINANDY P, ANDREADOU I, et al. Multitarget strategies to reduce myocardial ischemia/reperfusion injury: JACC review topic of the week[J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 73(1): 89-99.
- [3] MUSHER D M, ABERS M S. Acute infection and myocardial infarction[J]. N Engl J Med, 2019, 380(2): 171-176.
- [4] CHEN W, ZHONG Z, BAI H, et al. An autophagic mechanism study on effect of electroacupuncture at different times pretreating myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Zhongguo Zhen Jiu, 2018, 38(10): 1087-1092.
- [5] GALLO S, GATTI S, SALA V, et al. Agonist antibodies activating the Met receptor protect cardiomyoblasts from cobalt chloride-induced apoptosis and autophagy[J]. Cell

Death Dis, 2014, 5; e1185.

- [6] WANG Y, GE C, CHEN J, et al. GSK-3 $\beta$  inhibition confers cardioprotection associated with the restoration of mitochondrial function and suppression of endoplasmic reticulum stress in sevoflurane preconditioned rats following ischemia/reperfusion injury[J]. *Perfusion*, 2018, 33(8): 679-686.
- [7] SHOHREH M, SIMON K, JOHN P, et al. Compound C enhances tau phosphorylation at Serine396 via PI3K activation in an AMPK and rapamycin independent way in differentiated SH-SY5Y cells[J]. *Neuros Lett*, 2018, 670(23): 53-61.
- [8] SHOHREH M, JOHN HT P, SIMON A K, et al. The impact of tau hyperphosphorylation at Ser262 on memory and learning after global brain ischaemia in a rat model of reversible cardiac arrest[J]. *IBRO Rep*, 2016, 2: 1-13.
- [9] MANCINELLI R, CARPINO G, PETRUNGARO S, et al. Multifaceted roles of GSK-3 in cancer and autophagy-related diseases[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 4629495.
- [10] SINGH R, KAUSHIK S, WANG Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism[J]. *Nature*, 2009, 458(4097): 1131-1135.
- [11] LIU L, JIN X, HU C F, et al. Exosomes derived from

mesenchymal stem cells rescue myocardial ischaemia/reperfusion injury by inducing cardiomyocyte autophagy via AMPK and Akt pathways[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(1): 52-68.

- [12] RONG S L, WANG X L, ZHANG C Y, et al. Transplantation of HGF gene-engineered skeletal myoblasts improve infarction recovery in a rat myocardial ischemia model[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0175807.
- [13] ANZOVINO A, CHIANG S, BROWN B E, et al. Molecular alterations in a mouse cardiac model of friedreich ataxia: an impaired Nrf2 response mediated via up regulation of Keap1 and activation of the Gsk3 $\beta$  axis[J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(12): 2858-2875.
- [14] BÉNARD L, OH J G, CACHEUX M, et al. Cardiac stim1 silencing impairs adaptive hypertrophy and promotes heart failure through inactivation of mTORC2/Akt signaling[J]. *Circulation*, 2016, 133(15): 1458-1471.
- [15] KAMARUDIN M N, MOHD RAFLEE N A, HUSSEIN S S, et al. (R)-(+)- $\alpha$ -lipoic acid protected NG108-15 cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death through PI3K-Akt/GSK-3 $\beta$  pathway and suppression of NF- $\kappa$ B-cytokines[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2014, 8: 1765-1780.

(收稿日期: 2018-12-26 修回日期: 2019-03-16)

(上接第 2183 页)

原始卵泡数减少。造模后第 8 周卵巢指数较前 6 周稍有升高。说明 CTX 对卵巢储备功能损伤是肯定的, 但模型有一定的自我修复能力, 并未形成卵巢衰竭的状态, 符合 DOR 的疾病发病特点。众所周知, 卵巢功能一旦到了衰竭状态, 治疗难度很大, 目前尚未发现有药物能逆转已经衰竭的卵巢功能, 但如果在疾病发生的早期就给予药物干预, 卵巢功能衰竭的速度可减慢, 甚至有逆转可能。

综上所述, 采用 75 mg/kg CTX 单次腹腔注射能成功制造 SD 大鼠 DOR 模型。该法操作简便易行、造模时间短、成功率高, 模型有一定的自我修复能力, 值得推广应用。

## 参考文献

- [1] 刘惠芬, 杨冬梓, 罗亦娟. 环磷酰胺对大鼠卵巢功能的影响[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2009, 30(22): 99-102.
- [2] 王方圆, 谢超, 程蔚蔚, 等. 环磷酰胺化疗导致小鼠卵巢功能损伤模型的建立[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2011, 31(10): 1398-1402, 1408.
- [3] 中华医学会妇产科分会绝经学组. 早发性卵巢功能不全的激素补充治疗专家共识[J]. *中华妇产科杂志*, 2016, 12(51): 881-886.
- [4] Practice committee of the american society for reproduc-

tive medicine. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion[J]. *Fertil Steril*, 2012, 98(6): 1407-1415.

- [5] 王超君, 吴浩. 卵巢储备功能减退病因及处理[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2015, 31(8): 723-726.
- [6] OKTAY K, MOY F, TITUS S, et al. Age-related decline in DNA repair function explains diminished ovarian reserve, earlier menopause, and possible oocyte vulnerability to chemotherapy in women with BRCA mutations[J]. *Clin Oncol*, 2014, 32(10): 1093-1094.
- [7] 曾琴, 刘伟信, 罗孟军, 等. 抗冷冻蛋白 III 减少家兔卵巢组织冷冻损伤的效果观察[J]. *实用妇产科杂志*, 2016, 32(5): 383-387.
- [8] MEIROW D, ASSAD G, DOR J, et al. The GnRH agonist reduces cyclophosphamide-induced ovarian follicular destruction in mice[J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(6): 1294-1299.
- [9] 高飞飞, 张剑, 王吉波. 环磷酰胺对育龄妇女卵巢损伤的临床研究[J]. *临床合理用药杂志*, 2017, 10(8): 63-64.
- [10] FALCONE T, BEDAIWY M A. Fertility preservation and pregnancy outcome after malignancy[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2005, 17(1): 21-26.
- [11] 陈小平. 卵巢功能减退的临床影响因素与实验研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.

(收稿日期: 2019-01-13 修回日期: 2019-03-21)