

丁苯酞可通过雷帕霉素靶蛋白信号通路改善心肌梗死大鼠心功能^{*}

闫增强¹ 高吉贤¹ 代振涛^{2*} 肖华凤¹

沧州市人民医院¹ 本部院区心内五科;² 医专院区心内一科,河北沧州 061000

摘要 目的:探究丁苯酞通过雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路对心肌梗死(MI)大鼠心脏功能的影响。方法:将 30 只雄性大鼠随机分为假手术组(sham 组)、MI 组和丁苯酞治疗组(NBP 组),各 10 只。检测 3 组大鼠的心脏功能、左心室质量和左心室指数,采用 HE 染色和 Masson 染色观察大鼠心肌组织病理及胶原纤维化情况,采用免疫印迹试验检测 mTOR 和磷酸化的 mTOR(P-mTOR)表达。结果:与 sham 组比较,MI 组大鼠左室舒张末期内径(LVEDD)和左室收缩末期内径(LVESD)明显升高,左室射血分数(LVEF)和左室短轴缩短率(LVFS)水平显著降低($P < 0.05$),干预后的 NBP 组得到明显改善($P < 0.05$)。MI 组大鼠的左心室质量和左室质量指数明显高于 sham 组($P < 0.05$);干预后的 NBP 组大鼠得到显著抑制($P < 0.05$)。与 sham 组比较,MI 组大鼠的 mTOR 和 P-mTOR 明显减少($P < 0.05$);丁苯酞治疗组大鼠的 mTOR 和 P-mTOR 表达显著升高($P < 0.05$)。结论:丁苯酞可改善心肌梗死大鼠的心功能,推测是通过激活 mTOR 信号通路,进而对心功能起到保护作用。

关键词 丁苯酞; mTOR; 心肌梗死; 心脏功能

中图分类号 R542.2⁺2

文献标识码 A

DOI 10.11768/nkjwzzzz20220417

Effect of butylphthalide on cardiac function in rats with myocardial infarction through mTOR signal pathway YAN Zeng-qiang¹, GAO Ji-xian¹, DAI Zhen-tao^{2*}, XIAO Hua-feng¹. ¹Cangzhou People's Hospital, Cangzhou, Hebei 061000; ²Department of Cardiology, Cangzhou People's Hospital, Hebei Cangzhou 061000, China
Corresponding author: DAI Zhen-tao, E-mail: 18730772122@163.com

Abstract Objective: To explore the effect of butylphthalide (NBP) on cardiac function in rats with myocardial infarction (MI) through the signal pathway of mammalian target of rapamycin (mTOR). Methods: A total of 30 male rats were divided into sham group, MI group and NBP group. Cardiac function, left ventricular mass and left ventricular index were measured. Myocardial histopathology and collagen fibrosis were observed by HE staining and Masson staining. Western blotting was used to detect the expression of mTOR and phosphorylated mTOR (p-mTOR). Results: As compared with sham group, LVEDD and LVESD were significantly increased, LVEF and LVFS were significantly decreased in MI group ($P < 0.05$), and those in NBP group were significantly improved after intervention ($P < 0.05$). The left ventricular mass and left ventricular mass index in MI group were significantly higher than those in sham group ($P < 0.05$); After intervention, the left ventricular mass and left ventricular mass index in NBP group were significantly inhibited ($P < 0.05$). Compared with sham group, mTOR protein and p-mTOR protein in MI group were significantly decreased ($P < 0.05$). After intervention with NBP, the expression of mTOR protein and p-mTOR protein in NBP group increased significantly ($P < 0.05$). Conclusion: can improve the cardiac function of rats with myocardial infarction. It is speculated that NBP can protect cardiac function by activating mTOR signaling pathway.

Key words Butylphthalide; Mammalian target of rapamycin; Myocardial infarction; Cardiac function

心肌梗死(miocardial infarction, MI)具有较高致死率和致残率^[1,2]。目前临床治疗心肌梗死常采用溶栓和心脏介入手术,但患者的预后并不理想^[3,4]。近期研究发现,蛋白激酶雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)能调控多种细胞,对缺血性心肌损伤有预防作用^[5,6]。本研究给予心肌梗

死大鼠丁苯酞干预治疗,观察其对大鼠心功能及 mTOR 通路的影响。

材料与方法

实验动物 本实验所用雄性健康大鼠共 30 只,体重 230 ~ 250 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司。

^{*}基金项目:2019 年度河北省医学科学研究课题计划(No:20190011)

^{*}通信作者:代振涛, E-mail: kdyon4@163.com, 河北省沧州市运河区重庆路与吉林大道交汇处

限公司,许可证编号:SCXK(京)2013-0007。常温下饲养大鼠,自由饮水摄食 7 d。

试剂和仪器 10% 水合氯醛溶液购自山西医科大学遗传免疫学实验室;生理盐水购自江苏恒瑞医药股份有限公司;10% 甲醛溶液、4% 多聚甲醛购自山西医科大学基础实验室;丁苯酞软胶囊购自石药集团恩必普有限公司;mTOR 抗体购自武汉博士德生物工程公司;DAB 染色剂 购自北京中山金桥生物技术有限公司;石蜡切片机为德国 Leica 公司产品;DP-73 显微镜选用日本 Olympus 公司。

动物分组与模型建立 30 只健康大鼠随机分为 3 组:假手术组(sham 组)、MI 组和丁苯酞治疗组(NBP 组)。腹腔注射 10% 水合氯醛溶液(4 mL/kg)麻醉后,进行气管插管,再把呼吸机、心电图与大鼠相连,消毒手术部位,结扎左冠状动脉前降支。当看到左室前壁的心肌部分发白,收缩功能明显变弱,并且心电图Ⅱ导联 ST 段明显抬高 0.2 V,则视为成功造模。sham 组除了对左冠状动脉前降支不结扎外,其它的手术步骤和其它 2 组相同。手术后 3 组大鼠连续注射 3 d 青霉素溶液,以预防感染。

造模成功 1 h 后,NBP 组大鼠腹腔注射生理盐水稀释的丁苯酞溶液40 mg/kg,1 次/d。其它 2 组大鼠分别注射相同剂量的生理盐水。连续干预 14 d。

大鼠心功能指标测定 给药结束后麻醉所有大鼠,检测大鼠的左室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic diameter,LVEDD)、左室收缩末期内径(left ventricular end-systolic diameter,LVESD)、左室射血分数(left ventricular ejection fraction,LVEF)和左室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening,LVFS)的心功能指标,均测量 3 次,取平均值。

大鼠左心室质量、左室质量指数测定 3 组大鼠均静脉注射 10% 氯化钾溶液3 mL,直到心脏停止在舒张期后,严格遵循无菌条件,在三、四肋间分离大鼠的肌肉后取出心脏,剪去血管和表面组织,用生理盐水冲洗,滤纸吸干左心室上面的水分,再称质量。左室质量指数 = 大鼠左心室的质量/大鼠体质

量。用消毒刀片沿心脏最大横径切开,迅速将部分心脏放到多聚甲醛中固定,置于 -20℃ 冰箱中保存;将下部梗死区边缘心肌放到冻存管并迅速投入液氮中,置于 -80℃ 冰箱中保存;分别用于组织形态学的观察及免疫印迹试验检测。

心肌组织病理形态学 取出各组大鼠冻存的心脏,甲醛溶液固定 24 h 后石蜡包埋,切成厚度为 4 μm薄片,脱蜡后进行 HE 染色并观察各组大鼠心肌组织病理学变化。

MI 面积测定 取出冻存的心脏并切成薄片,每片的厚度为 3 μm,采用 MASSON 染色对心肌切片的胶原进行染色。每张切片显微镜下随机选取 5 个梗死区视野,用软件对胶原所占面积的百分比进行测定。

免疫印迹试验检测大鼠 mTOR 和磷酸化的 mTOR 的表达 分别取各组大鼠的心肌组织 100 mg,用免疫印迹试验裂解液裂解,用玻璃均浆器在冰上对组织进行研磨,30 min后以 1 2000 转/min离心 5 min,取上清液,蛋白浓度用 BCA 法进行检测。将提取出的蛋白溶液按照 4:1 的比例和 SDS-PAGE 缓冲液混合,煮沸蛋白溶液至蛋白质变性。在电泳板内分别注入 50 μm 的蛋白样品,把电泳后的样品转移到 PVDF 膜上,加入脱脂奶粉,并进行封闭,时长为 1 h。加入 1 抗后进行 TTBS 漂洗,每次漂洗 10 min,共进行 3 次漂洗,最后加入 2 抗对溶液进行稀释,再在常温中封闭1 h。取出 PVDF 膜,TTBS 漂洗 10 min × 3 次,DAB 显色后数码相机照相。

统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计学软件,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

心功能 与 sham 组比较,MI 组大鼠 LVEDD 和 LVESD 明显升高,LVEF 和 LVFS 显著降低(*P* 均 < 0.05);与 MI 组比较,NBP 组 LVEDD 和 LVESD 显著降低,LVEF 和 LVFS 水平明显升高(*P* 均 < 0.05),见表 1。

表 1 3 组大鼠心功能比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例	LVEDD(mm)	LVESD(mm)	LVEF(%)	LVFS(%)
sham 组	10	3.48 ± 0.94	2.65 ± 0.76	67.86 ± 3.12	34.43 ± 2.98
MI 组	10	5.67 ± 1.12 *	4.57 ± 0.97 *	32.65 ± 4.86 *	19.86 ± 2.11 *
NBP 组	10	4.08 ± 0.87 **	3.62 ± 0.41 **	49.87 ± 3.02 **	29.58 ± 3.09 **
<i>F</i> 值		13.27	16.39	218.9	72.18
<i>P</i> 值		< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

注:与 sham 组比较,**P* < 0.05;与 MI 组比较,***P* < 0.05

左心室质量及左室质量指数 MI 组大鼠的左心室质量及其指数高于 sham 组(P 均 <0.05);NBP 组左室质量及指数明显低于 MI 组(P 均 <0.05), 见表 2。

表 2 3 组大鼠左心室质量、左室质量指数比较($\bar{x} \pm s$)			
组别	例	左心室质量(mg)	左室质量指数($\times 10^{-3}$)
sham 组	10	463.7 $\pm$ 32.7	1.79 $\pm$ 0.13
MI 组	10	740.6 $\pm$ 42.8 *	2.65 $\pm$ 0.18 *
NBP 组	10	532.1 $\pm$ 36.5 **	1.97 $\pm$ 0.14 **
F 值		147.4	89.58
P 值		<0.0001	<0.0001

注:与 sham 组比较, * $P < 0.05$;与 MI 组比较, # $P < 0.05$

心肌组织病理形态学 sham 组大鼠心肌纤维排列有序,无心肌纤维断裂和细胞核逸出现象,心肌组织结构清晰;MI 组心肌纤维断裂明显,排列紊乱,出现大量细胞核逸出,可见大量瘢痕形成;NBP 组断裂减少,心肌纤维排列明显改善,瘢痕组织明显减少,见图 1。

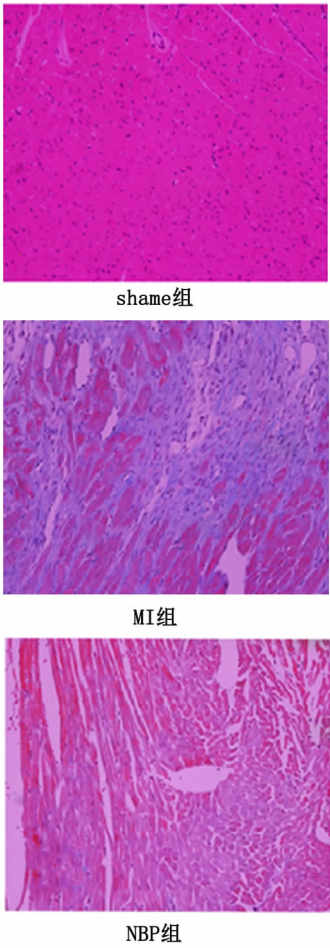


图 1 大鼠心肌组织 HE 染色($\times 400$)

MI 面积比较 sham 组胶原组织分布稀少且心

肌整齐排列。MI 组大鼠 MI 区出现大量胶原组织(蓝染区),残存的少量心肌细胞排列紊乱、结构模糊,梗死面积明显多于 sham 组($P < 0.05$);NBP 组大鼠有少量的胶原组织,心肌组织排列相对整齐,可见部分断裂,且 MI 面积明显少于 MI 组($P < 0.05$), 见图 2、3。

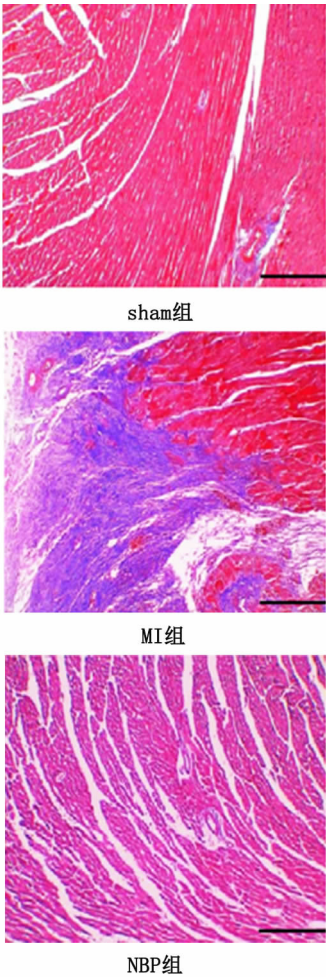
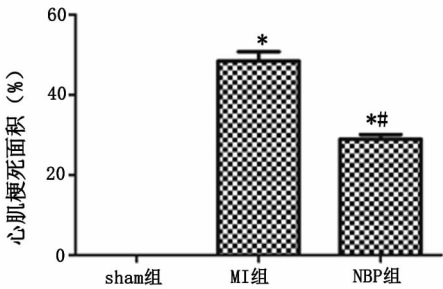


图 2 大鼠心肌组织 Masson 染色($\times 100$)



注:与 sham 组比较, * $P < 0.05$;与 MI 组比较, # $P < 0.05$

图 3 3 组大鼠心肌梗死面积

mTOR 和磷酸化的 mTOR 表达比较 与 sham 组比较,MI 组大鼠的 mTOR 蛋白和磷酸化的 mTOR 蛋白明显减少(P 均 <0.05);经过丁苯酞干预后的 NBP 组大鼠的 mTOR 蛋白和磷酸化的 mTOR 蛋白表达显著提高(P 均 <0.05),见表 3、图 4。

表 3 3 组大鼠 mTOR、磷酸化的 mTOR 蛋白比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只	mTOR	p-mTOR
sham 组	10	0.21 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.03
MI 组	10	0.13 $\pm$ 0.07	0.17 $\pm$ 0.08
NBP 组	10	0.18 $\pm$ 0.05	0.31 $\pm$ 0.06
F 值		6.282	13.58
P 值		0.0058	<0.0001

注:与 sham 组比较,* $P < 0.05$;与 MI 组比较,# $P < 0.05$

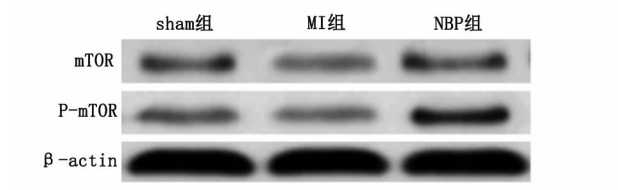


图 4 3 组大鼠 mTOR 和 P-mTOR 蛋白表达

讨 论

MI 患者多伴有 心功能不全,心功能在代偿过程中会发生心室重构。mTOR 属于一种相对保守的蛋白激酶,在多种动物的细胞中均有其表达。研究发现生物体内 mTOR 能有效调控细胞的生长和增殖,因此在细胞生长过程中一直处于重要位置。近年来研究证实,mTOR 能调节心肌缺血时心肌细胞的反应。

本研究 AMI 组大鼠的心功能明显减退,表现为大鼠 LVEDD 和 LVESD 明显升高,LVEF 和 LVFS 显著降低。研究发现,MI 大鼠的心室壁会发生僵硬,并且梗死大鼠的心功能指标也明显减退。心肌细胞的数量不仅会随着梗死的发生而减少,同时心脏超声指数也显著恶化。本研究 NBP 组大鼠的心功能明显改善。MI 发生后,心室的重构是导致心功能减退的主要病理基础,丁苯酞可有效抑制心室重构的发生,改善大鼠的心功能。本研究 MI 组大鼠左室质量指数显著增加,而 NBP 组明显降低。可见丁苯酞可有效降低大鼠 MI 面积,改善大鼠 MI 后心功能,同时也能有效改善心肌组织纤维化。研究发现,丁苯酞可改善大鼠的脑微循环,并且在发生缺血时对神经细胞进行有效的保护。田小超等^[8]发现,丁苯酞对大鼠的脑心缺血有一定的改善作用,可能与上调血管内皮生长因子有关。

研究发现心肌缺血后可激活多种自我保护机制和信号转导通路,其中 mTOR 信号通路就是最重要的一条。mTOR 是 Akt 的下游,Akt 的激活触发 mTOR 的活化,进而调节心肌细胞的凋亡^[9]。mTOR 在心肌缺血损伤中对心肌细胞具有很好的保护作用。本研究发现,MI 组大鼠的 mTOR 蛋白和磷酸化的 mTOR 蛋白明显低于 sham 组;经过丁苯酞干预后得到显著提高,表明丁苯酞能有效促进 mTOR 和磷酸化的 mTOR 蛋白的表达,从而对心功能起到保护作用。王成等^[10]研究发现,缺血再灌注小鼠经强心治疗后,与对照组小鼠比较,在急性期时治疗组小鼠存活率提高,且 MI 面积减小,纤维化减少;在慢性阶段,预防不良的左室重塑,改善心功能,而且 mTOR 激活是发挥以上心肌保护作用所必须的,在治疗组小鼠中,mTOR 磷酸化显著增强。

参 考 文 献

- 1 Liu MX,Li W,Wang HB,et al. CTRP9 ameliorates atrial inflammation fibrosis and vulnerability to atrial fibrillation in post-myocardial infarction rats[J]. J Am Heart Assoc,2019,8(21):e013133.
- 2 Li L,Li ZB,Jia M,et al. Therapeutic effects of KANK2 in myocardial infarction rats might be associated with the NF-κB p65 inhibition[J]. Int Immunopharmacol,2020,86(12):106687.
- 3 Lin JG,Yao K W,Wang Q Q,et al. Mechanism of Xuefu Zhuyu Decoction in treatment of myocardial infarction based on network pharmacology and molecular docking[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi,2021,46(4):885-893.
- 4 Palmquist-Gomes P,JM Pérez-Pomares,Guadix J A. Cell-based therapies for the treatment of myocardial infarction: lessons from cardiac regeneration and repair mechanisms in non-human vertebrates[J]. Reviews,2019,24(1):133-142.
- 5 Deng Y,Wu W,Guo S,et al. Altered mTOR and Beclin-1 mediated autophagic activation during right ventricular remodeling in monocrotaline-induced pulmonary hypertension [J]. Respir Res,2017,18(1):53.
- 6 Zhang X,Yang K,Zhang H,et al. Effect of typhaneoside on ventricular remodeling and regulation of PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Herz,2020,45(1):113-122.
- 7 吕凤亚. 氟伐他汀联合丁苯酞软胶囊治疗急性脑梗死的疗效及对血清 IL-6 水平的影响[J]. 中国老年学杂志,2015,35(18):5154-5155.
- 8 田小超,何伟亮,刘斯文,等. 丁苯酞对大鼠心肌和脑缺血的保护作用[J]. 脑与神经疾病杂志,2016,24(6):358-361.
- 9 崔勤涛,王俊华,刘晓晨,等. 丹酚酸 A 激活 AKT/mTOR/4EBP1 通路缓解脂多糖诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡和氧化应激[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2020,34(1):18-25.
- 10 王成,郭长磊,李霞,等. 山奈酚激活 mTOR 通路对心肌细胞缺氧损伤的保护作用[J]. 中国免疫学杂志,2019,35(1):19-23.