

## AMPK/PGC-1 $\alpha$ 通路对尿毒症心肌病大鼠心脏损伤及线粒体能量代谢的调控机制

倪倩 颜开萍 李淑娟 徐敏 顾佳雨 黄晓琴 袁乙

(盐城市第一人民医院 南京大学医学院附属盐城第一医院 南通大学第四附属医院 江苏医药职业学院第一附属医院肾内科, 江苏 盐城 224000)

**【摘要】目的** 探究 AMP 活化的蛋白质激酶 (AMPK)/过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  辅助因子 1- $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) 通路在尿毒症心肌病 (UCM) 大鼠心脏损伤及线粒体能量代谢中的调控机制。**方法** 将 30 只大鼠随机分为 3 组: 对照组、UCM 组、盐酸阿霉素 (DOX) 组, 每组 10 只。超声心动图检测心功能指标: 左室射血分数 (LVEF)、左心室舒张末期径 (LVIDD)、E/A, HE 染色检测心肌组织病理变化, Masson 染色检测心肌组织纤维化水平, Western blotting 检测心肌组织 AMPK、PGC-1 $\alpha$ 、磷酸化 AMPK (p-AMPK)、磷酸化 PGC-1 $\alpha$  (p-PGC-1 $\alpha$ ) 蛋白水平, JC-1 试剂盒检测线粒体膜电位, 线粒体呼吸链复合物 I ~ V 试剂盒检测线粒体复合物 I ~ V 活性, ATP 含量检测试剂盒检测 ATP 水平, 透射电子显微镜检测心肌线粒体超微结构。**结果** 与对照组相比, UCM 组大鼠心肌纤维紊乱、断裂, 心肌间隙可见胶原大量沉积, 大鼠 LVEF 无显著性差异, LVIDD 增加, E/A 降低 ( $P < 0.05$ ), 心肌组织中 AMPK、PGC-1 $\alpha$  表达无显著性差异, p-AMPK、p-PGC-1 $\alpha$  蛋白表达增加 ( $P < 0.05$ ), 心肌线粒体肿胀、空泡化, 且部分线粒体嵴消失, 线粒体膜电位减少, ATP 含量减少 ( $P < 0.05$ ) 心肌线粒体呼吸链复合物 I ~ V 活性均减少 ( $P < 0.05$ ); 与 UCM 组相比, DOX 组大鼠心肌纤维损伤改善, 心肌间隙胶原沉积减少, LVEF 无显著性差异, LVIDD 减少, E/A 增加 ( $P < 0.05$ ), 心肌组织中 AMPK、PGC-1 $\alpha$  表达无显著性差异, p-AMPK、p-PGC-1 $\alpha$  蛋白表达减少 ( $P < 0.05$ ), 心肌线粒体结构改善, 线粒体膜电位增加, ATP 含量增加 ( $P < 0.05$ ), 心肌线粒体呼吸链复合物 I ~ V 活性均增加 ( $P < 0.05$ )。**结论** 抑制 AMPK/PGC-1 $\alpha$  通路磷酸化可改善 UCM 大鼠心功能及心肌组织病理学变化, 改善线粒体能量代谢。

**【关键词】** 尿毒症心肌病; AMPK/PGC-1 $\alpha$  通路; 线粒体能量代谢

**【DOI】**10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2024.12.018

## Regulation Mechanism of AMPK/PGC-1 $\alpha$ Pathway on Cardiac Injury and Mitochondrial Energy Metabolism in Rats with Uremic Cardiomyopathy

NI Qian, YAN Kaiping, LI Shujuan, XU Min, GU Jiayu, HUANG Xiaoqin, YUAN Yi

(Department of Nephrology, Yancheng No. 1 People's Hospital, Yancheng First Hospital, Affiliated of Nanjing University Medical College, The Fourth Affiliated Hospital of Nantong University, The First Affiliated Hospital of Jiangsu Vocational College of Medicine, Yancheng 224000, Jiangsu, China)

**【Abstract】Objective** To investigate the regulatory mechanism of AMP-activated protein kinase (AMPK)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 $\alpha$ ) pathway on heart injury and mitochondrial energy metabolism in rats with uremic cardiomyopathy (UCM). **Methods** Thirty rats were randomly divided into three groups: control group, UCM group and doxorubicin (DOX) group, with 10 rats in each group. Left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular internal-diastolic dimension (LVIDD) and E/A were measured by echocardiography. HE staining was used to detect the pathological changes of myocardial tissue. Masson staining was used to detect myocardial fibrosis. Western blotting was used to detect the protein levels of AMPK, PGC-1 $\alpha$ , phosphorylated AMPK (p-AMPK) and p-PGC-1 $\alpha$  in myocardial tissue. Mitochondrial membrane potential was measured by JC-1 kit. The activity of mitochondrial respiratory chain complex I ~ V was detected by mitochondrial respiratory chain complex I ~ V kit. ATP level was detected by ATP content detection kit. The ultrastructure of myocardial mitochondria was detected by transmission electron microscope. **Results** Compared with the control group, the myocardium fibers in UCM group were disorganized and broken, and a large amount of collagen could be seen in the myocardium space. There was no significant difference in LVEF, LVIDD increased, E/A decreased ( $P < 0.05$ ), there was no significant difference in the expression of AMPK and PGC-1 $\alpha$  in myocardial tissue, while the expression of p-AMPK and p-PGC-1 $\alpha$  increased ( $P < 0.05$ ), myocardial

基金项目: 江苏省卫生健康委员会科研项目 (2020113795)

通信作者: 颜开萍, E-mail: xiangsilu99070@163.com

mitochondria were swollen and vacuolated, some mitochondrial cristae disappeared, mitochondrial membrane potential decreased, ATP content decreased ( $P < 0.05$ ), the activities of myocardial mitochondrial respiratory chain complex I ~ V were decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with UCM group, myocardial fiber injury was improved, collagen deposition in myocardial space was reduced, LVEF was not significantly different, LVIDD was decreased, E/A was increased ( $P < 0.05$ ), there was no significant difference in the expression of AMPK and PGC-1 $\alpha$  in myocardial tissue, and the expression of p-AMPK and p-PGC-1 $\alpha$  decreased ( $P < 0.05$ ), myocardial mitochondrial structure improved, mitochondrial membrane potential increased, ATP content increased ( $P < 0.05$ ), the activities of myocardial mitochondrial respiratory chain complex I ~ V were increased ( $P < 0.05$ ) in DOX group. **Conclusion** Inhibition of AMPK/PGC-1 $\alpha$  pathway phosphorylation can improve cardiac function and myocardial histopathological changes in UCM rats, improve mitochondria and explore mitochondrial energy metabolism.

**[Keywords]** Uremic cardiomyopathy; AMPK/PGC-1 $\alpha$  pathway; Mitochondrial energy metabolism

尿毒症心肌病(uremic cardiomyopathy, UCM)是一种不可逆的慢性肾脏病患者常见的心血管并发症,与透析患者高死亡率相关<sup>[1]</sup>。UCM 的特征是异常心肌纤维化,不对称心室肥厚,随后出现舒张功能障碍,以及复杂和多因素的发病机制,其中潜在的生物机制仍未确定<sup>[2]</sup>。AMP 活化的蛋白质激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)调控线粒体稳态及线粒体功能障碍<sup>[3]</sup>。过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  辅助因子 1- $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator I alpha, PGC-1 $\alpha$ ) 调节线粒体质量控制机制,包括裂变、融合和线粒体自噬<sup>[4]</sup>。AMPK/PGC-1 $\alpha$  通路可调控线粒体功能障碍,参与认知障碍、骨关节炎、急性肾损伤等多种疾病<sup>[5-7]</sup>。Chen 等<sup>[8]</sup> 研究显示,AMPK/mTOR 信号通路参与肾切除术诱导的 UCM 小鼠的心功能异常过程。线粒体能量代谢参与慢性肾脏病的尿毒症及骨骼疾病<sup>[9-10]</sup>。然而,线粒体能量代谢是否参与 UCM,目前尚未阐明。本研究拟探究 AMPK/PGC-1 $\alpha$  通路在 UCM 大鼠心脏损伤与线粒体能量代谢中可能的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

AMPK 抗体、PGC-1 $\alpha$  抗体(美国 Affinity 生物技术公司)、磷酸化 AMPK (p-AMPK) 抗体、磷酸化 PGC-1 $\alpha$  (p-PGC-1 $\alpha$ ) 抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体(美国 Santa Cruz Biotech 公司)、HE 染色试剂、Masson 染色试剂盒(赛默飞世尔科技公司)、JC-1 试剂盒、线粒体呼吸链复合物 I ~ V 试剂盒、ATP 检测试剂盒(上海信裕生物科技有限公司)、盐酸阿霉素(doxorubicin, DOX) (美国 MedChemexpress 生物科技公司)、全自动酶标仪(赛默飞世尔科技公司)、JEM-1200EX 透射电子显微镜(日本 JEOL 公司)。

### 1.2 实验分组及 UCM 动物模型的建立

取 30 只 180 g SPF 级 SD 雄性大鼠(辽宁长生生物技术有限公司)随机分为 3 组:对照组、UCM 组、DOX 组(抑制 AMPK 磷酸化),每组 10 只。UCM 组、DOX 组大鼠适应性喂养 7 d,采用改良法肾切除术通

过一期手术与二期手术构建 UCM 模型,一期手术过程:将大鼠固定在手术台上,于右侧肋下背直肌外侧局部备皮,无菌操作下切开右背侧皮肤及各层组织以暴露右侧肾脏。切开右侧肾脏脂肪囊后分离肾上腺并固定右肾,肾上、下极切除,止血后逐层缝合。一周后进行二期手术,与一期手术同样方法暴露并摘除左肾。若出现左心室舒张功能异常及心肌纤维化,则 UCM 模型建立成功。对照组在一期和二期手术期间均仅切开右侧、左侧肾脏脂肪囊后逐层缝合。DOX 组大鼠在术后 5 d 每天腹腔注射 DOX (5 mg/kg)<sup>[11]</sup>。本实验经盐城市第一人民医院伦理委员会批准[2020 第(1173)号]。

### 1.3 超声心动图检测大鼠心功能

使用脱毛膏对 SD 大鼠左心前区进行备皮。将大鼠置于诱导盒中,向麻醉机蒸发器中倒入异氟烷,打开蒸发器诱导麻醉,大鼠瘫倒后,提捏大鼠尾巴,若大鼠无反应,则处于麻醉状态。将大鼠仰卧位固定于手术操作台上,同时用麻醉面罩将口鼻完全罩住,以保持麻醉状态。待大鼠心率稳定在 400 ~ 600 次/min 后,应用 Vevo2100 VisualSonics 超声检测大鼠心功能,采用标准的左心室长轴切面与心尖四腔心切面,测定左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左心室舒张末期内径(left ventricular internal diastolic dimension, LVIDD),左心室舒张早期充盈峰值速度/左心室心房收缩期峰值充盈速度(E/A)比值。

### 1.4 HE 染色检测大鼠心肌组织病理形态

将各组大鼠心肌组织切片烘烤,浸入二甲苯溶液中透明组织,浸入下行梯度酒精中脱水。将心肌组织切片浸入自来水中水化,滴加适量苏木素染液浸染心肌组织中的细胞核,将心肌切片置于缓慢的水流中反蓝,滴加适量的伊红染液浸染细胞质,再浸入上行梯度酒精、二甲苯溶液中脱水、透明,封片后在光镜下观察并拍照。

### 1.5 Masson 染色检测大鼠心肌组织中胶原沉积情况

将各组大鼠心肌组织切片脱蜡,铬处理后自来水洗涤,Regaud 苏木精滴染 5 min,使用蒸馏水洗涤后将组织切片浸入 Masson 丽春红酸性复红液中 5 min,再

浸入 2% 冰醋酸溶液中 3 min, 1% 钼酸水 3 min, 滴加苯胺蓝染色 5 min, 浸入 0.2% 冰醋酸溶液中 3 min, 再依次浸入梯度酒精与二甲苯溶液中脱水透明, 封片后镜下观察并拍照。

### 1.6 Western blotting 检测 AMPK、PGC-1 $\alpha$ 、p-AMPK、p-PGC-1 $\alpha$ 蛋白水平

收集大鼠心肌组织, 提取心肌组织中的总蛋白, 使用 BCA 试剂盒检测各组蛋白浓度, 配置合适的体系, 高温将蛋白变性处理, 置于  $-20^{\circ}\text{C}$  备用。提前配备合适浓度的凝胶块, 向凝胶孔道中加入相同体积的样品进行电泳, 电泳条件为: 120 V 30 min, 80 V 1 h。预先配备转膜液进行预冷, 将电泳结束的凝胶与聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜按照一定顺序置于转膜夹中 80 V 转膜适当时长, 转膜后浸入快速封闭液中封闭, 磷酸盐吐温缓冲液 (phosphate buffered saline with Tween 20, PBST) 清洗 3 次, 每次 10 min, 分别孵育 AMPK、PGC-1 $\alpha$ 、p-AMPK、p-PGC-1 $\alpha$ 、GAPDH 抗体, PBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 室温孵育对应的二抗, PBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 使用发光液进行曝光, 最后使用 Image J 软件分析。

### 1.7 透射电子显微镜检测心肌组织中线粒体超微结构

将心肌组织切成小块后用 2.5% 戊二醛固定, 使

用磷酸盐缓冲液漂洗 3 次, 用 1%  $\text{OsO}_4$  固定 1 h, 并用 Epon 812 包埋。将心肌组织切割成超薄切片, 将切片用 2% 醋酸双氧铀、枸橼酸铅染色, 用 JEM-1200EX 透射电子显微镜拍照。

### 1.8 试剂盒检测大鼠心肌线粒体膜电位、ATP 及线粒体呼吸链复合物 I ~ V 水平

按照 JC-1 试剂盒、线粒体呼吸链复合物 I ~ V 试剂盒、ATP 检测试剂盒说明书进行操作, 将所得的数据参考说明书进行统计分析。

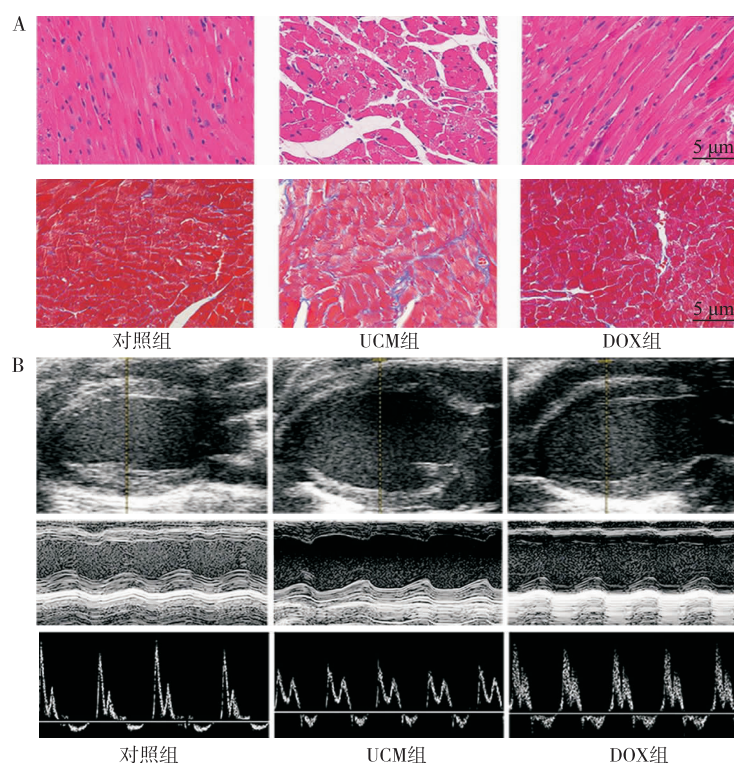
### 1.9 统计学处理

采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析, GraphPad 9.0 软件进行绘图。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用 One-way ANOVA 检验。  $P < 0.05$  为具有显著性差异, 结果有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DOX 对尿毒症大鼠心功能及心肌组织病理结构的影响

与对照组相比, UCM 组大鼠心肌纤维紊乱、断裂, 心肌间隙可见大量胶原沉积; 与 UCM 组相比, DOX 组大鼠心肌纤维化损伤改善, 心肌间隙胶原沉积减少 (图 1A)。与对照组相比, UCM 组大鼠 LVEF 无显著性差异, LVIDD 增加, E/A 降低 ( $P < 0.05$ ); 与 UCM 组相比, DOX 组大鼠 LVEF 无显著性差异, LVIDD 减少, E/A 增加 ( $P < 0.05$ ), 见图 1B 和表 1。



注: 图 A 为 HE 及 Masson 染色检测心肌组织病理变化及心肌纤维化水平; 图 B 为超声心动图检测心功能。

图 1 各组大鼠心功能及心肌组织病理变化

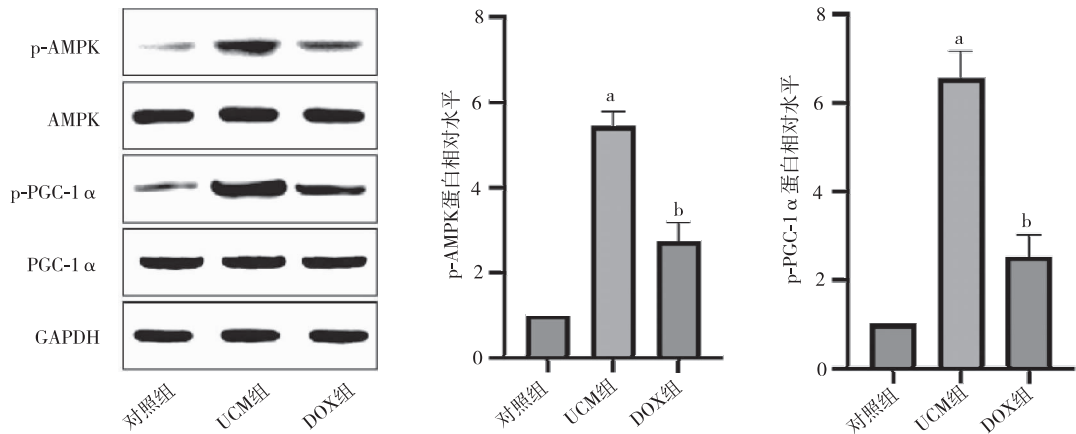
表 1 各组大鼠心功能( $\bar{x} \pm s$ )

分组	LVEF/%	LVIDD/mm	E/A
对照组	65.00 ± 2.65	3.43 ± 0.21	1.93 ± 0.15
UCM 组	58.67 ± 4.16	4.73 ± 0.35 <sup>a</sup>	1.37 ± 0.12 <sup>a</sup>
DOX 组	59.33 ± 2.08	4.03 ± 0.21 <sup>b</sup>	1.67 ± 0.06 <sup>b</sup>

注:<sup>a</sup> 表示与对照组相比,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> 表示与 UCM 组相比,  $P < 0.05$ 。

2.2 DOX 对 UCM 大鼠心肌组织中 AMPK、PGC-1 $\alpha$  及其磷酸化蛋白表达水平的影响

与对照组相比,UCM 组大鼠心肌组织中 AMPK、PGC-1 $\alpha$  表达无显著性差异,p-AMPK、p-PGC-1 $\alpha$  蛋白表达增加( $P < 0.05$ );与 UCM 组相比,DOX 组大鼠心肌组织中 AMPK、PGC-1 $\alpha$  表达无显著性差异,p-AMPK、p-PGC-1 $\alpha$  蛋白表达减少( $P < 0.05$ ),见图 2。



注:a 表示与对照组相比,  $P < 0.05$ ; b 表示与 UCM 组相比,  $P < 0.05$ 。

图 2 各组大鼠心肌组织中 AMPK、PGC-1 $\alpha$  及其磷酸化蛋白水平

2.3 DOX 对 UCM 大鼠心肌线粒体超微结构、膜电位及 ATP 含量的影响

与对照组相比,UCM 组大鼠心肌线粒体肿胀、空泡化,且部分线粒体嵴消失,线粒体膜电位减少,ATP

含量减少( $P < 0.05$ );与 UCM 组相比,DOX 组大鼠心肌线粒体结构改善,线粒体膜电位增加,ATP 含量增加( $P < 0.05$ ),见图 3 和表 2。

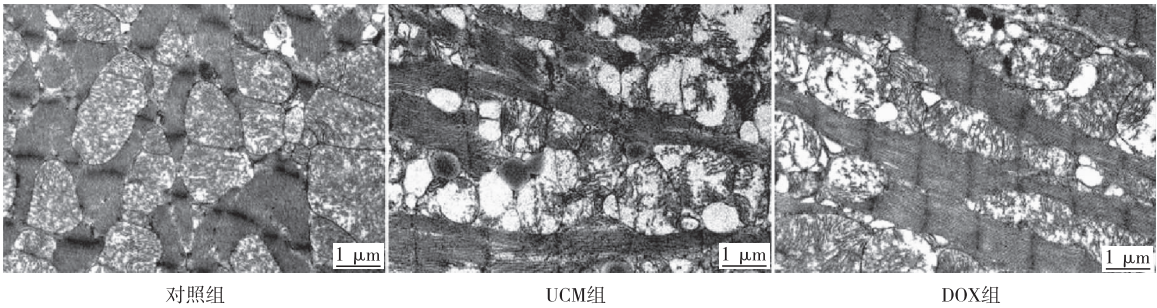


图 3 各组大鼠心肌线粒体超微结构

表 2 各组大鼠心肌线粒体膜电位及 ATP 水平( $\bar{x} \pm s$ )

分组	JC-1	ATP
对照组	2.50 ± 0.16	21.88 ± 2.59
UCM 组	1.83 ± 0.07 <sup>a</sup>	7.68 ± 0.88 <sup>a</sup>
DOX 组	2.18 ± 0.04 <sup>b</sup>	15.60 ± 0.77 <sup>b</sup>

注:<sup>a</sup> 表示与对照组相比,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> 表示与 UCM 组相比,  $P < 0.05$ 。

2.4 DOX 对 UCM 大鼠心肌线粒体呼吸链复合物 I ~ V 活性的影响

与对照组相比,UCM 组大鼠心肌线粒体呼吸链复合物 I ~ V 活性均减少( $P < 0.05$ );与 UCM 组相比,DOX 组大鼠心肌线粒体呼吸链复合物 I ~ V 活性均

增加( $P < 0.05$ ),见表 3。

3 讨论

慢性肾脏病是一个全球健康问题,影响了 10% ~ 12% 的人口<sup>[12]</sup>。慢性肾脏病患者出现心血管功能障碍,通常称为 UCM,特征性改变主要表现为左心室舒张性肥厚,射血分数保留的心力衰竭,继而可见心室间质纤维化,心脏毛细血管壁变薄和收缩功能障碍<sup>[13]</sup>。本研究显示,UCM 大鼠 LVEF 无显著性差异,LVIDD 增加,E/A 降低,且心肌组织病理结构异常,心肌间隙出现明显的纤维化,这提示 UCM 大鼠出现射血分数保留的心力衰竭,与既往研究保持一致。然而,由于 UCM 复杂的发病机制,目前尚未完全阐明。



表 3 各组大鼠线粒体呼吸链复合物 I ~ V 活性( $\bar{x} \pm s$ )

分组	复合物 I	复合物 II	复合物 III	复合物 IV	复合物 V
对照组	1.33 ± 0.11	0.36 ± 0.02	0.39 ± 0.01	0.41 ± 0.02	0.25 ± 0.01
UCM 组	0.79 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>a</sup>
DOX 组	1.10 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.31 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.31 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.37 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.22 ± 0.01 <sup>b</sup>

注:<sup>a</sup>表示与对照组相比, $P < 0.05$ ;<sup>b</sup>表示与 UCM 组相比, $P < 0.05$ 。

AMPK 是一种由能量状态下降激活的细胞能量传感器,可通过促进产生 ATP 的分解代谢途径,同时抑制能量消耗过程,从而恢复能量稳态<sup>[14]</sup>。AMPK 可调节碳水化合物和脂质代谢、线粒体和溶酶体稳态以及 DNA 修复,参与癌症、肥胖、糖尿病、尿毒症等多种疾病进展<sup>[15]</sup>。Yang 等<sup>[16]</sup>研究显示,AMPK/UCP2 通路参与尿毒症毒素诱导的心肌细胞肥大。PGC-1 $\alpha$  是一种转录性共激活剂,为线粒体生物发生和功能的主要调节剂。PGC-1 $\alpha$  在高能量需求的组织中高度表达,与代谢综合征的发病机制及其主要并发症有关,包括肥胖、2 型糖尿病、心血管疾病和肝脂肪变性<sup>[17]</sup>。此外,AMPK 的磷酸化水平在肾切除术诱导的 UCM 小鼠中明显增加<sup>[8]</sup>。目前,关于 AMPK/PGC-1 $\alpha$  通路在 UCM 中的作用机制尚未完全阐明。本研究显示,UCM 大鼠心肌组织中 AMPK、PGC-1 $\alpha$  总蛋白无显著性差异,磷酸化的 AMPK、PGC-1 $\alpha$  表达明显增加。这提示,AMPK/PGC-1 $\alpha$  通路参与 UCM 过程,然而潜在的发病机制有待继续研究。

线粒体是独特且必不可少的细胞器,介导能量代谢和细胞死亡等许多重要的细胞过程<sup>[18]</sup>。值得关注的是,AMPK 参与线粒体能量代谢功能障碍<sup>[19]</sup>。研究<sup>[5-7]</sup>显示,AMPK/PGC-1 $\alpha$  通路可调控线粒体功能障碍,参与认知障碍、骨关节炎、急性肾损伤等多种疾病。线粒体能量代谢参与慢性肾脏病的尿毒症及骨骼疾病<sup>[9-10]</sup>。然而,AMPK/PGC-1 $\alpha$  通路是否可调控线粒体能量代谢参与 UCM,未见报道。本研究结果显示,UCM 大鼠心肌线粒体能量代谢异常,即线粒体结构异常、膜电位下降、ATP 合成减少且线粒体呼吸链复合物 I ~ V 活性均减少。抑制 AMPK 磷酸化可改善心功能及心肌病理学变化,改善心肌线粒体能量代谢相关指标,这提示 AMPK/PGC-1 $\alpha$  通路可调控线粒体能量代谢,在 UCM 大鼠心肌损伤中发挥重要作用。

综上所述,UCM 大鼠心肌线粒体能量代谢异常,抑制 AMPK/PGC-1 $\alpha$  通路磷酸化可改善 UCM 大鼠心功能、心肌组织病理学变化及线粒体能量代谢。本研究首次发现 AMPK/PGC-1 $\alpha$  调控的能量代谢参与 UCM 大鼠心肌损伤过程,这将为治疗 UCM 提供理论及实验依据。然而,本研究只是初步阐明二者之间可能的联系机制,具体深入的调控机制仍需继续探究。

# 参 考 文 献

[1] Amador-Martínez I, García-Ballhaus J, Buelna-Chontal M, et al. Early

inflammatory changes and CC chemokine ligand-8 upregulation in the heart contribute to uremic cardiomyopathy[J]. *FASEB J*, 2021, 35(8):e21761.

[2] D'Agostino M, Mauro D, Zicarelli M, et al. miRNAs in uremic cardiomyopathy: a comprehensive review[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6):5425.

[3] Wu S, Zou MH. AMPK, mitochondrial function, and cardiovascular disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(14):4987.

[4] Halling JF, Pilegaard H. PGC-1 $\alpha$ -mediated regulation of mitochondrial function and physiological implications[J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2020, 45(9):927-936.

[5] Wang D, Cao L, Zhou X, et al. Mitigation of honokiol on fluoride-induced mitochondrial oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and cognitive deficits through activating AMPK/PGC-1 $\alpha$ /Sirt3[J]. *J Hazard Mater*, 2022, 437:129381.

[6] Sun J, Song FH, Wu JY, et al. Sestrin2 overexpression attenuates osteoarthritis pain via induction of AMPK/PGC-1 $\alpha$ -mediated mitochondrial biogenesis and suppression of neuroinflammation[J]. *Brain Behav Immun*, 2022, 102:53-70.

[7] Tong D, Xu E, Ge R, et al. Aspirin alleviates cisplatin-induced acute kidney injury through the AMPK-PGC-1 $\alpha$  signaling pathway[J]. *Chem Biol Interact*, 2023, 380:110536.

[8] Chen Q, Li Z, Liu B, et al. [Protective effects of Zhenwutang on cardiac function in mice with uremic cardiomyopathy induced by subtotal nephrectomy][J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2015, 35(12):1725-1728.

[9] Thome T, Kim K, Dong G, et al. The role of mitochondrial and redox alterations in the skeletal myopathy associated with chronic kidney disease[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2023, 38(4-6):318-337.

[10] Thome T, Kumar RA, Burke SK, et al. Impaired muscle mitochondrial energetics is associated with uremic metabolite accumulation in chronic kidney disease[J]. *JCI Insight*, 2020, 6(1):e139826.

[11] 保靖夫. 啮齿类动物尿毒症心肌病模型构建研究[D]. 广州:南方医科大学, 2022.

[12] Sárközy M, Watzinger S, Kovács ZZA, et al. Neuregulin-1 $\beta$  improves uremic cardiomyopathy and renal dysfunction in rats[J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2023, 8(9):1160-1176.

[13] Sárközy M, Kovács ZZA, Kovács MG, et al. Mechanisms and modulation of oxidative/nitrative stress in type 4 cardio-renal syndrome and renal sarcopenia[J]. *Front Physiol*, 2018, 9:1648.

[14] Steinberg GR, Hardie DG. New insights into activation and function of the AMPK[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(4):255-272.

[15] Entezari M, Hashemi D, Taheriazam A, et al. AMPK signaling in diabetes mellitus, insulin resistance and diabetic complications: a pre-clinical and clinical investigation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 146:112563.

[16] Yang K, Xu X, Nie L, et al. Indoxyl sulfate induces oxidative stress and hypertrophy in cardiomyocytes by inhibiting the AMPK/UCP2 signaling pathway[J]. *Toxicol Lett*, 2015, 234(2):110-119.

[17] Rius-Pérez S, Torres-Cuevas I, Millán I, et al. PGC-1 $\alpha$ , inflammation, and oxidative stress: an integrative view in metabolism[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020:1452696.

[18] Esteras N, Abramov AY. Nrf2 as a regulator of mitochondrial function: energy metabolism and beyond[J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 189:136-153.

[19] Yang L, Chen Y, Zhou J, et al. Aconitine induces mitochondrial energy metabolism dysfunction through inhibition of AMPK signaling and interference with mitochondrial dynamics in SH-SY5Y cells[J]. *Toxicol Lett*, 2021, 347:36-44.

收稿日期:2024-05-09

## 雷公藤红素通过调节 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路改善 抵抗素诱导的 H9c2 心肌细胞肥大

曹露<sup>1</sup> 刘鹏<sup>2</sup> 张海明<sup>1</sup> 李海宏<sup>3</sup> 杨丽丽<sup>1</sup> 马瑞芝<sup>1</sup> 荣爱国<sup>1</sup>

(1. 山西省中西医结合医院检验科, 山西 太原 030000; 2. 山西省心血管病医院心外科, 山西 太原 030000;

3. 山西省中西医结合医院输血科, 山西 太原 030000)

**【摘要】目的** 探究雷公藤红素通过调节 Toll 样受体 4/髓样分化因子 88/核因子  $\kappa$ B (TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B) 通路对抵抗素 (Resistin) 诱导的 H9c2 心肌细胞肥大的影响。**方法** (1) 对 H9c2 细胞给予 100 ng/mL 抵抗素处理 6、12、24、48、72 h, 记作正常对照组 (Control)、抵抗素 6 h 组 (Resistin 6 h)、抵抗素 12 h 组 (Resistin 12 h)、抵抗素 24 h 组 (Resistin 24 h)、抵抗素 48 h 组 (Resistin 48 h)、抵抗素 72 h 组 (Resistin 72 h)。(2) 对 H9c2 细胞给予/不予 TLR4 基因干扰, 并用抵抗素诱导 48 h, 记作抵抗素组 (Resistin)、阴性对照组 (Mock) 和 TLR4 基因干扰组 (si-TLR4)。(3) 对 H9c2 细胞给予雷公藤红素/TLR4 通路抑制剂 TAK-242 处理, 并用抵抗素诱导 48 h, 记作抵抗素组 (Resistin)、雷公藤红素组 (Celastrol)、TLR4 抑制剂组 (TAK-242)、雷公藤红素 + TLR4 抑制剂 (TAK-242) 组 (Celastrol + TAK-242)。罗丹明-鬼笔环肽染色观察细胞肥大; 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡率; RT-qPCR 检测细胞心肌肥厚标志物 [心房利尿钠肽 (ANP)、脑钠肽 (BNP)、 $\beta$  肌球蛋白重链 ( $\beta$ -MHC)] mRNA 水平; Western blotting 检测细胞 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B p65、p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平。**结果** (1) 与 Control 组比较, Resistin 24 h 组、Resistin 48 h 组、Resistin 72 h 组细胞明显肥大, ANP、BNP、 $\beta$ -MHC mRNA 水平升高, S 期细胞比例降低, G0/G1 期细胞比例、细胞凋亡率升高, TLR4、MyD88、p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平升高 ( $P$  均  $< 0.05$ )。(2) 与 Resistin 组/Mock 组比较, si-TLR4 组细胞肥大明显改善, 细胞 ANP、BNP、 $\beta$ -MHC mRNA 水平降低, S 期细胞比例升高, G0/G1 期细胞比例、细胞凋亡率降低, TLR4、MyD88、p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平降低 ( $P$  均  $< 0.05$ )。(3) 与 Resistin 组比较, Celastrol 组、TAK-242 组、Celastrol + TAK-242 组细胞肥大明显改善, 细胞 ANP、BNP、 $\beta$ -MHC mRNA 水平降低, S 期细胞比例升高, G0/G1 期细胞比例、细胞凋亡率降低, TLR4、MyD88、p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平降低 ( $P$  均  $< 0.05$ )。**结论** 雷公藤红素通过调节 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路改善抵抗素诱导的 H9c2 心肌细胞肥大。

**【关键词】** 雷公藤红素; TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路; 抵抗素; 糖尿病心脏病; 心肌细胞肥大

**【DOI】** 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2024.12.019

## Celastrol Improves H9c2 Cardiomyocyte Hypertrophy Induced by Resistin by Regulating TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B Pathway

CAO Lu<sup>1</sup>, LIU Peng<sup>2</sup>, ZHANG Haiming<sup>1</sup>, LI Haihong<sup>3</sup>, YANG Lili<sup>1</sup>, MA Ruizhi<sup>1</sup>, RONG Aiguo<sup>1</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine, Shanxi Provincial Integrated TCM and WM Hospital, Taiyuan 030000, Shanxi,

China; 2. Department of Cardiac Surgery, Shanxi Cardiovascular Hospital, Taiyuan 030000, Shanxi, China;

3. Department of Blood Transfusion, Shanxi Provincial Integrated TCM and WM Hospital, Taiyuan 030000, Shanxi, China)

**【Abstract】Objective** To explore the effect of Celastrol on H9c2 cardiomyocyte hypertrophy induced by resistin by regulating the Toll like receptor 4/myeloid differentiation factor 88/nuclear factor- $\kappa$ B (TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B) pathway. **Methods** (1) H9c2 cells were treated with 100 ng/mL resistin for 6, 12, 24, 48, and 72 h, and designated as the normal control group (Control), resistin 6 h group (Resistin 6 h), resistin 12 h group (Resistin 12 h), resistin 24 h group (Resistin 24 h), resistin 48 h group (Resistin 48 h), and resistin 72 h group (Resistin 72 h). (2) H9c2 cells were treated with/without TLR4 gene interference and induced with resistin for 48 h, designated as resistin group (Resistin), negative control group (Mock), and TLR4 gene interference group (si-TLR4). (3) H9c2 cells were treated with Celastrol/TLR4 pathway inhibitor TAK-242 and induced with resistin for 48 h, designated as Resistin group, Celastrol group, TLR4 inhibitor group (TAK-242), Celastrol + TLR4 inhibitor group (Celastrol + TAK-242). Rhodamine-phalloidin staining was used to observe cell hypertrophy; Flow cytometry was used to detect cell cycle and apoptosis rate; RT-qPCR was used to detect cellular cardiac hypertrophy markers atrial

基金项目: 山西省中医药管理局科研课题 (2023ZYTC2013); 经方扶阳山西省重点实验室开放课题研究基金 (202104010910011)

通信作者: 荣爱国, E-mail: rong2629569@163.com

natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), and  $\beta$ -myosin heavy chain ( $\beta$ -MHC) mRNA levels; Western blotting was used to detect TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65, and p-NF- $\kappa$ B p65 protein levels in cells. **Results** (1) Compared with Control group, cell in Resistin 24 h group, Resistin 48 h group, and Resistin 72 h group were significant hypertrophy, ANP, BNP, and  $\beta$ -MHC mRNA levels were increased, the proportion of S phase cells was decreased, while the proportion of G0/G1 phase cells and apoptosis rate were increased, TLR4, MyD88, p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 protein levels were increased (all  $P < 0.05$ ). (2) Compared with Resistin group/Mock group, cell hypertrophy in si-TLR4 group was significant improved, ANP, BNP, and  $\beta$ -MHC mRNA levels were decreased, the proportion of S phase cells was increased, while the proportion of G0/G1 phase cells and apoptosis rate were decreased, TLR4, MyD88, p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 protein levels were decreased (all  $P < 0.05$ ). (3) Compared with Resistin group, cell hypertrophy in Celastrol group, TAK-242 group, Celastrol + TAK-242 group were significant improved, ANP, BNP, and  $\beta$ -MHC mRNA levels were decreased, the proportion of S phase cells were increased, while the proportion of G0/G1 phase cells and apoptosis rate were decreased, TLR4, MyD88, p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 protein levels were decreased (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Celastrol improved H9c2 cardiomyocyte hypertrophy induced by resistin by regulating TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B pathway.

**【Keywords】** Celastrol; TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B pathway; Resistin; Diabetic cardiomyopathy; Cardiomyocyte hypertrophy

糖尿病心肌病 (diabetic cardiomyopathy, DCM) 是临床较常见的糖尿病并发症,是指由长期糖尿病引起的独立于高血压、冠心病等疾病的特异性心肌病变,以病理性心肌肥厚为特征;病理性心肌肥厚能够诱导患者出现心功能异常,最终进展为心力衰竭、心律失常和心源性休克,甚至猝死<sup>[1]</sup>。临床流行病学研究<sup>[2]</sup>显示,糖尿病患者发生心力衰竭的危险性持续增加,在排除伴有冠心病或风湿性心脏病后,糖尿病患者心力衰竭的发生率更高;在排除年龄、血压、体重和血清胆固醇等因素后,这种增加的危险性仍存在。然而,目前尚无治疗 DCM 的特效方法,临床主要采用控制血糖、血压、血脂和抗心力衰竭等方式缓解病情,虽然已经发现了许多关于 DCM 的致病机制、预防和治疗靶点,但对于预防或治疗的最佳策略还未达成共识。在 DCM 众多致病因素中,胰岛素抵抗是导致心肌肥厚、心肌纤维化及细胞凋亡的主要驱动因素<sup>[3]</sup>。抵抗素是一种由脂肪细胞分泌的多肽类激素,能够作用于骨骼肌细胞、干细胞和脂肪细胞,降低其对胰岛素的敏感性,从而产生胰岛素抵抗<sup>[4]</sup>。研究<sup>[5]</sup>显示,糖尿病及肥胖患者血抵抗素水平显著升高,抵抗素能够促进胰岛素抵抗和糖尿病进展。另有研究显示,心力衰竭与抵抗素水平呈正相关<sup>[6]</sup>,且抵抗素能够诱导 H9c2 心肌细胞肥大<sup>[7]</sup>。上述研究表明抵抗素可能与诱发病理性心肌肥厚及心力衰竭有关。Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 是一种重要的免疫调节蛋白,可通过识别病原体相关分子模式,激活相关细胞因子,介导炎症介质的释放<sup>[8]</sup>。TLR4 和下游配体髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 结合后,可激活核因子  $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 表达, NF- $\kappa$ B 与抑制蛋白 I $\kappa$ B $\alpha$  解离后转移至细胞核内,从而参与各种炎症介质的表达<sup>[9]</sup>。研究<sup>[10]</sup>显示,抑制 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路的过度激活能够减轻 DCM

心肌细胞凋亡。此外,抵抗素可通过 TLR4 途径诱发胰岛素抵抗<sup>[11]</sup>,且 TLR4 通路的激活能够使心肌发生不良性结构重构,并诱导左心室肥厚<sup>[12]</sup>。由此可见,TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路在病理性心肌肥厚中发挥重要调节作用。雷公藤红素是一种具有生物活性的天然三萜类化合物,主要来源于中药雷公藤的根皮,具有较强的抗氧化、抗炎、抗肿瘤活性<sup>[13]</sup>。研究<sup>[14]</sup>显示,雷公藤红素可抑制血管紧张素转换酶通路减轻链脲佐菌素诱导的小鼠 DCM。此外,雷公藤红素能够减轻 TLR4 激活介导的胰岛素抵抗<sup>[15]</sup>,并减轻血管紧张素 II 诱导的心脏重构<sup>[16]</sup>。然而,雷公藤红素对抵抗素诱导的病理性心肌肥厚的作用及其机制尚未报道。

基于此,本研究拟探究雷公藤红素对抵抗素诱导的 H9c2 心肌细胞肥大的影响,以及 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路在其中的调节作用,以期完善并优化糖尿病病理性心肌肥厚的防治策略奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞

大鼠 H9c2 心肌细胞购自上海雅吉生物科技有限公司(货号:YS117C);H9c2 细胞接种于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中,并放于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养,每 2 ~ 3 d 换一次培养液,待细胞长到 70% ~ 80% 时传代培养。

### 1.2 试剂和仪器

抵抗素(货号:FY-P524527)购自武汉菲越生物科技有限公司;雷公藤红素(货号:PS0048-0020)购自成都普思生物科技股份有限公司;TLR4 抑制剂 TAK-242 (货号:M04333)购自北京百奥莱博科技有限公司;心房利尿钠肽 (atrial natriuretic peptide, ANP)、脑钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP)、 $\beta$  肌球蛋白重链 ( $\beta$ -myosin heavy chain,  $\beta$ -MHC) 引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司;兔多抗 TLR4、兔多抗 MyD88、

兔多抗 p-NF- $\kappa$ B p65 (货号:bs-20594R、bs-1047R、bs-3485R);兔多抗 NF- $\kappa$ B p65 (货号:ab19870)购自英国 abcam 公司。

DFM-90C 倒置荧光显微镜购自上海蔡康光学仪器有限公司;CytoFLEX 流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 公司;ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司;165-8001 垂直电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司。

### 1.3 病理性心肌肥厚 H9c2 细胞模型制备和分组

(1) H9c2 细胞随机分为 6 组:正常对照组 (Control)、抵抗素 6 h 组 (Resistin 6 h)、抵抗素 12 h 组 (Resistin 12 h)、抵抗素 24 h 组 (Resistin 24 h)、抵抗素 48 h 组 (Resistin 48 h)、抵抗素 72 h 组 (Resistin 72 h)。Control 组细胞正常培养,不做任何处理;各抵抗素组细胞分别给予 100 ng/mL 抵抗素处理 6、12、24、48、72 h。培养结束后,收集细胞备用。

(2) H9c2 细胞随机分为 3 组:抵抗素组 (Resistin)、阴性对照组 (Mock) 和 TLR4 基因干扰组 (si-TLR4)。Resistin 组细胞不做转染处理;Mock 组、si-TLR4 组细胞使用脂质体转染法,分别将不含/含 TLR4 基因的 siRNA 质粒转染 H9c2 心肌细胞 48 h。转染步骤如下:分别取 1  $\mu$ g 不含/含 TLR4 基因的 siRNA 溶于 50  $\mu$ L 培养基中,向其中加入 3  $\mu$ L Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 混匀,再加入 Mock 组、si-TLR4 组细胞中,转染 48 h 后,经遗传霉素筛选出不表达 TLR4 的稳定细胞株。随后,各组细胞均给予 100 ng/mL 抵抗素<sup>[17]</sup>处理 48 h。培养结束后,收集细胞备用。

(3) H9c2 细胞随机分为 4 组:抵抗素组 (Resistin)、雷公藤红素组 (Celastrol)、TLR4 抑制剂组 (TAK-242)、雷公藤红素 + TLR4 抑制剂组 (Celastrol + TAK-242)。各组细胞均给予 100 ng/mL 抵抗素处理 48 h。随后,Celastrol 组、TAK-242 组、Celastrol + TAK-242 组细胞分别或同时加入雷公藤红素 (800 nmol/L)<sup>[18]</sup>和 TAK-242 (25  $\mu$ mol/L)<sup>[19]</sup>处理 24 h。培养结束后,收集细胞备用。

### 1.4 罗丹明-鬼笔环肽染色

收集 H9c2 细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 50  $\mu$ L 培养基重悬细胞,细胞在 4% 多聚甲醛溶液中室温固定 30 min,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤 3 次,加入 0.1% Triton X-100 渗透 5 min, PBS 洗涤 3 次,加入罗丹明-鬼笔环肽工作液室温孵育 60 min, PBS 洗涤 3 次,加入碘化丙啉 (propidium iodide, PI) 染液复染,荧光显微镜观察染色情况。

### 1.5 流式细胞术检测

细胞周期:收集 H9c2 细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 1 mL PBS 重悬,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 1 mL 70% 乙醇 4  $^{\circ}$ C 固定 4 h,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 1 mL PBS 重悬,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 500  $\mu$ L PI 染液,37  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,使用流式细胞仪进行分析。

细胞凋亡:收集 H9c2 细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 200  $\mu$ L 结合缓冲液重悬,加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 室温避光孵育 10 min,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 200  $\mu$ L 结合缓冲液重悬,加入 5  $\mu$ L PI 染液复染,使用流式细胞仪进行分析。

### 1.6 RT-qPCR 检测

使用 TRIzol<sup>®</sup> 试剂从 H9c2 细胞中提取总 RNA,使用 NanoDrop<sup>TM</sup> 分光光度计测量 RNA 浓度,使用 cDNA 逆转录试剂盒 PrimeScript RT Master Mix 进行逆转录,反应条件为:37  $^{\circ}$ C 15 min,85  $^{\circ}$ C 5 s。使用 TB Green Premix Ex Taq II 对获得的 cDNA 进行 PCR 扩增,使用荧光定量 PCR 仪进行扩增反应,反应条件为:95  $^{\circ}$ C 30 s、95  $^{\circ}$ C 3 s、60  $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环, $\beta$ -actin 用作内标,使用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  公式计算 ANP、BNP、 $\beta$ -MHC mRNA 表达水平。引物序列如下,ANP-F:5'-AGGCCATATTGGAGCAAATC-3',ANP-R:5'-CATCTTCTCCTCCAGGTGCT-3';BNP-F:5'-GTGCTGCCCCAGATGATTCT-3',BNP-R:5'-GCAGC-TTCTGCATCGTGGAT-3'; $\beta$ -MHC-F:5'-TGCTCTACAA-TCTCAAGGAGAGCT-3', $\beta$ -MHC-R:5'-TGTTGACGG-TCTTACCAGCTC-3'; $\beta$ -actin-F:5'-GAACCCTAAGGCC-AACCG-3', $\beta$ -actin-R:5'-TACGTACATGGCTGGGGTGT-3'。

### 1.7 Western blotting 检测

使用 RIPA 裂解试剂从 H9c2 细胞中提取总蛋白,使用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白与上样缓冲液混合加热变性,配制 5% 浓缩胶和 10% 分离胶,通过 SDS-PAGE 分离蛋白,反应条件为:浓缩胶 90 V 30 min,120 V 50 min。将凝胶中的蛋白转移到 PVDF 膜上,反应条件为:200 mA 90 min。PVDF 膜使用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,PVDF 膜与一抗 (TLR4、MyD88、p-NF- $\kappa$ B p65、NF- $\kappa$ B p65、 $\beta$ -actin,以 1:2 000 稀释)4  $^{\circ}$ C 下孵育过夜,使用含吐温-20 的 Tris 磷酸缓冲液洗涤 3 次后,PVDF 膜与 HRP 偶联的二抗 (以 1:5 000 稀释)室温下孵育 2 h。使用增强化学发光试剂显色,显影,曝光。以  $\beta$ -actin 作内标,通过 Image J 软件计算 TLR4、MyD88、p-NF- $\kappa$ B p65、NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平。

### 1.8 统计学方法

使用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。细胞



ANP、BNP、 $\beta$ -MHC mRNA 水平, TLR4、MyD88、p-NF- $\kappa$ B p65、NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平均为计量数据, 均符合正态分布, 以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间数据的比较使用单因素方差分析, 多组间两两比较使用 LSD-*t* 检验。  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 抵抗素诱导 H9c2 心肌细胞肥大

罗丹明-鬼笔环肽染色显示, 抵抗素处理 24 h 以上, 能明显诱导 H9c2 细胞肥大 ( $P < 0.05$ , 图 1A)。同时, RT-qPCR 结果显示, 与 Control 组比较, Resistin 24 h 组、Resistin 48 h 组、Resistin 72 h 组细胞心肌肥厚标志物 ANP、BNP、 $\beta$ -MHC mRNA 水平明显升高 ( $P < 0.05$ , 图 1B)。

流式细胞术结果显示, 与 Control 组比较, Resistin 24 h 组、Resistin 48 h 组、Resistin 72 h 组 S 期细胞比例明显降低, G0/G1 期细胞比例、细胞凋亡率明显升高 ( $P < 0.05$ , 图 1C 和 1D)。

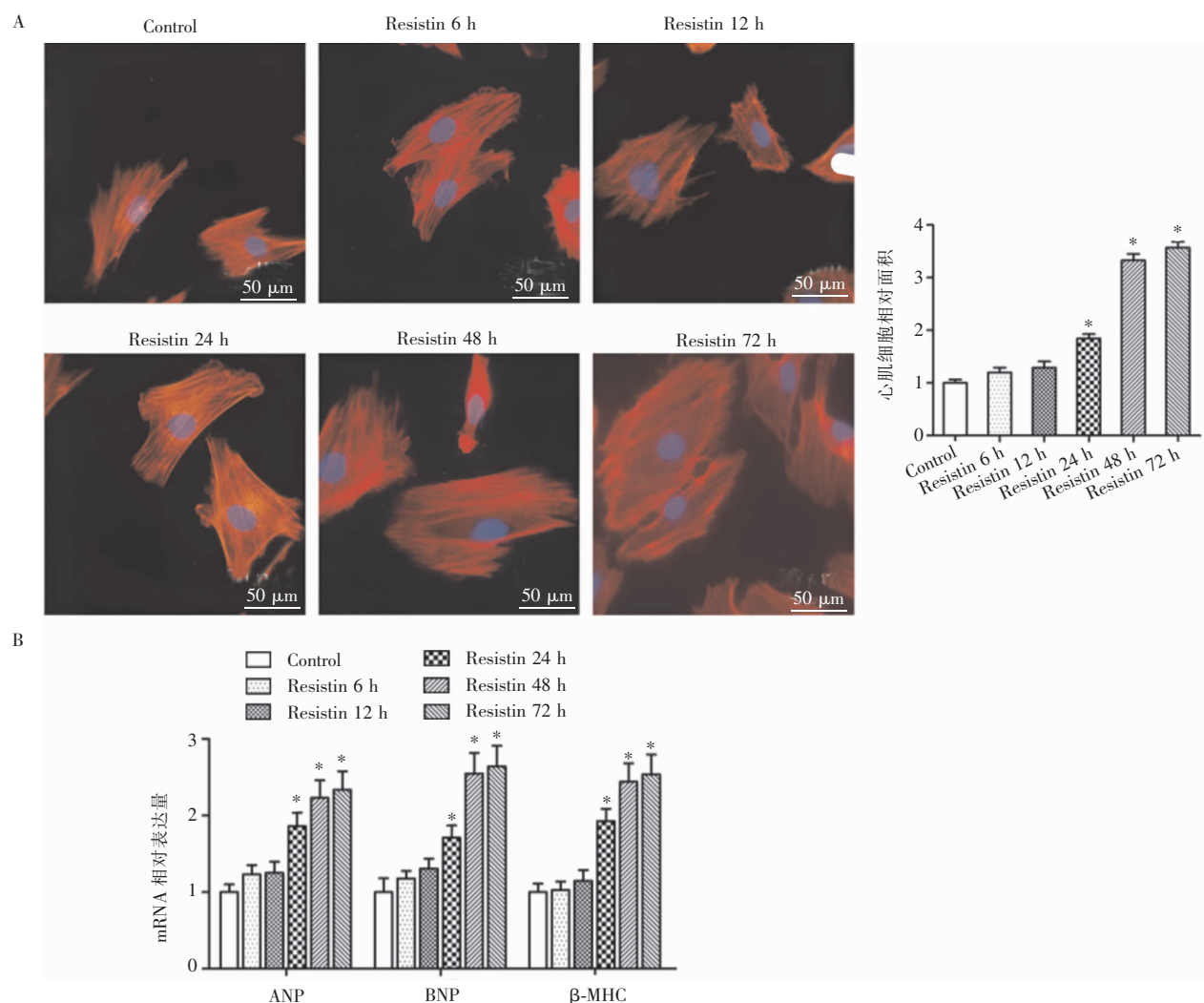
Western blotting 结果显示, 与 Control 组比较, Resistin 24 h 组、Resistin 48 h 组、Resistin 72 h 组细胞 TLR4、MyD88、p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平明显升高 ( $P < 0.05$ , 图 1E)。

### 2.2 抵抗素调节 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路诱导 H9c2 心肌细胞肥大

罗丹明-鬼笔环肽染色显示, TLR4 基因干扰能够明显抑制 H9c2 细胞肥大 ( $P < 0.05$ , 图 2A)。同时, RT-qPCR 结果显示, 与 Resistin 组/Mock 组比较, si-TLR4 组细胞心肌肥厚标志物 ANP、BNP、 $\beta$ -MHC mRNA 水平明显降低 ( $P < 0.05$ , 图 2B)。

流式细胞术结果显示, 与 Resistin 组/Mock 组比较, si-TLR4 组 S 期细胞比例明显升高, G0/G1 期细胞比例、细胞凋亡率明显降低 ( $P < 0.05$ , 图 2C 和 2D)。

Western blotting 结果显示, 与 Resistin 组/Mock 组比较, si-TLR4 组细胞 TLR4、MyD88、p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平明显降低 ( $P < 0.05$ , 图 2E)。



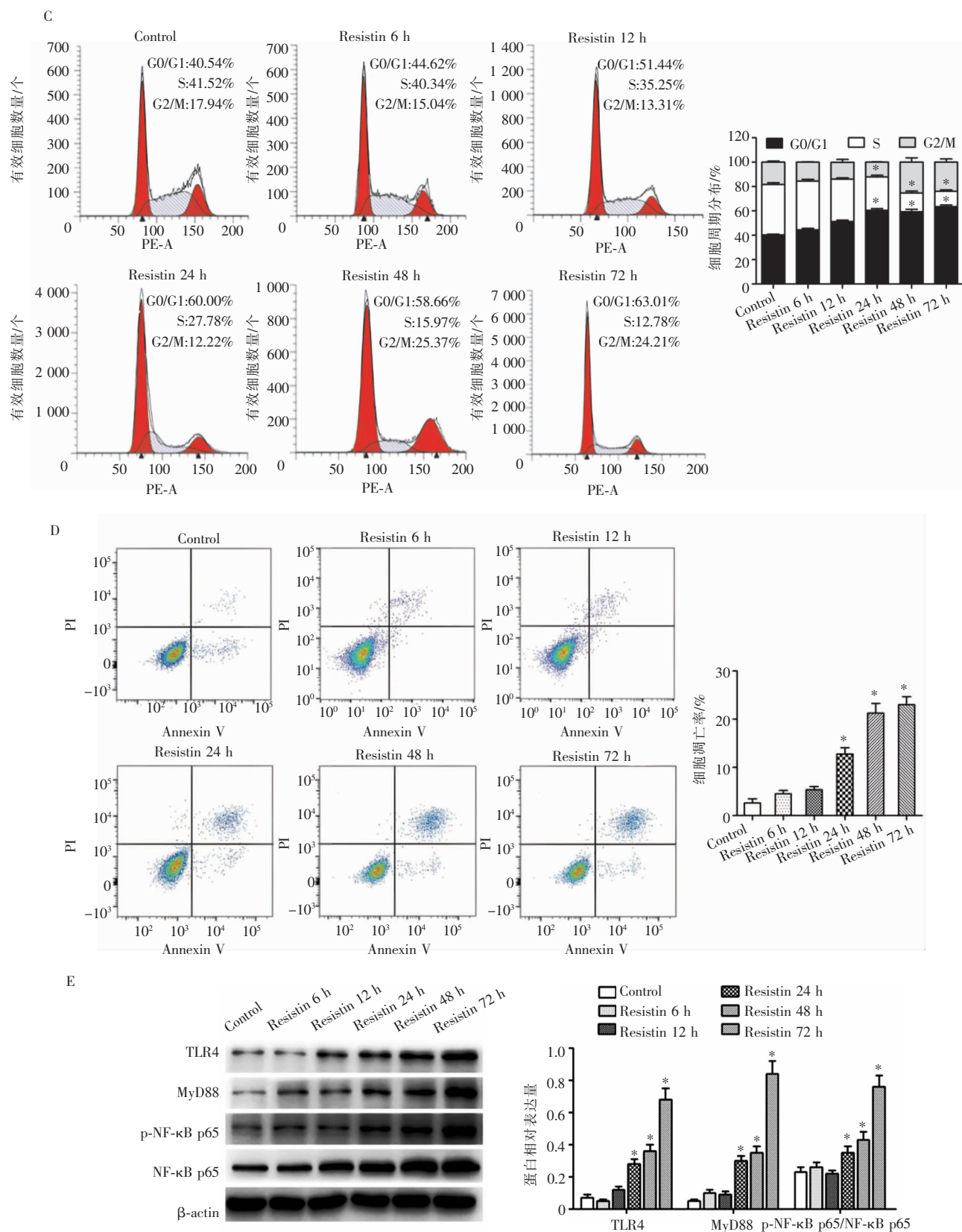
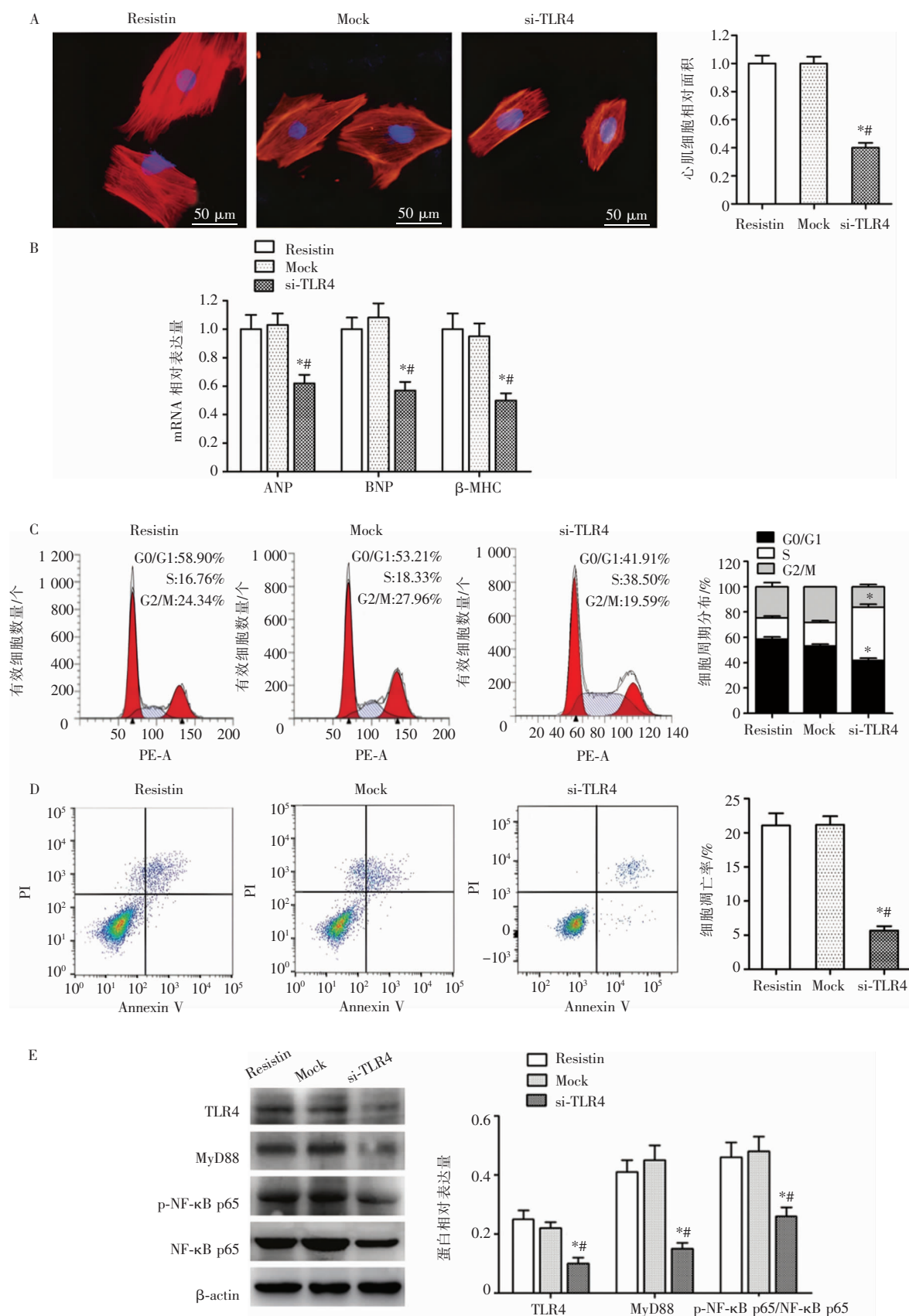


图 1 抵抗素诱导 H9c2 心肌细胞肥大



注:A 为罗丹明-鬼笔环肽染色;B 为 RT-qPCR 检测;C 为细胞周期检测;D 为细胞凋亡检测;E 为 Western blotting 检测。\* 表示与 Resistin 组比较,  $P < 0.05$ ; # 表示与 Mock 组比较,  $P < 0.05$ 。

图 2 抵抗素调节 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路诱导 H9c2 心肌细胞肥大

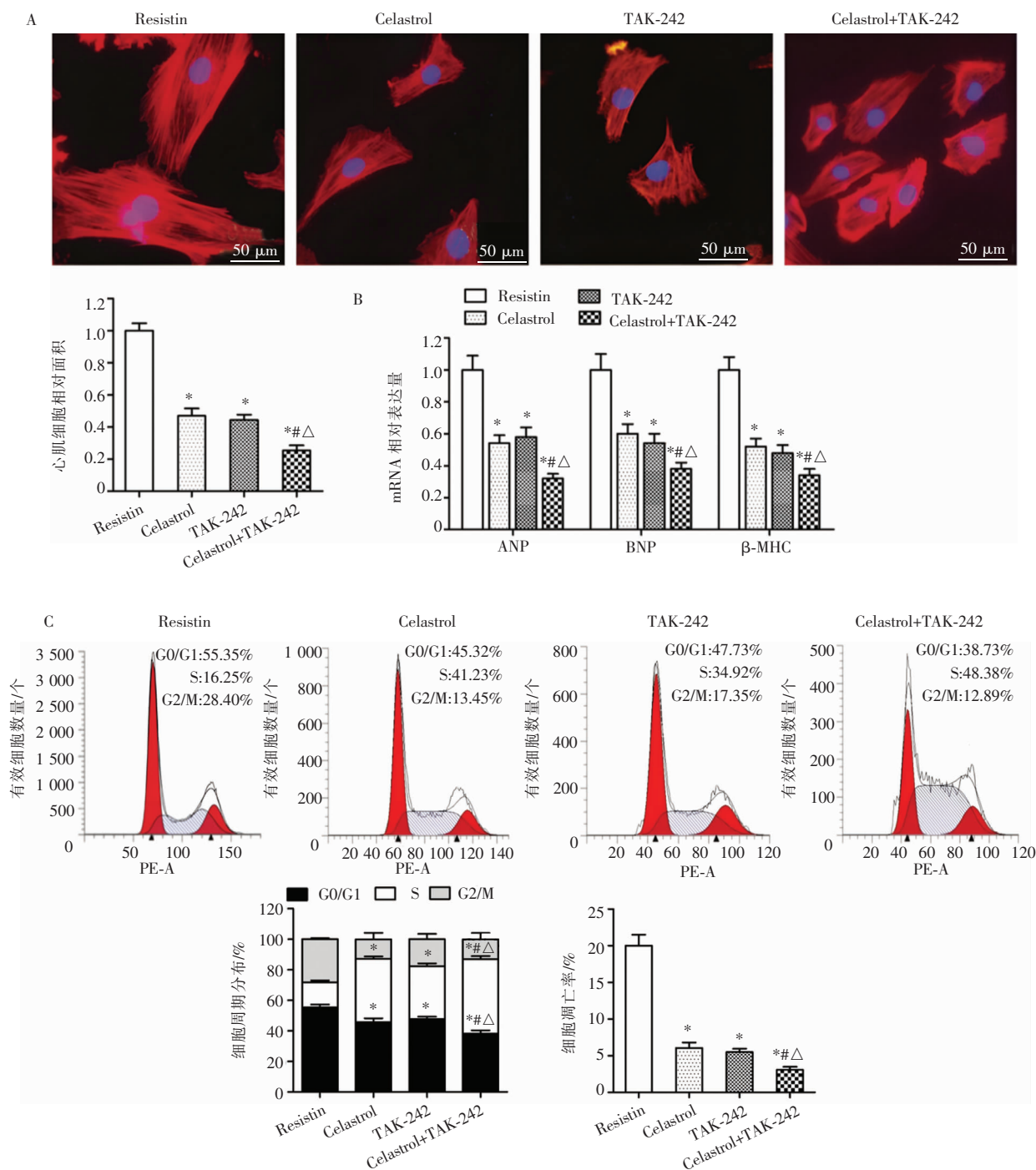
### 2.3 雷公藤红素调节 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路改善抵抗素诱导的 H9c2 心肌细胞肥大

罗丹明-鬼笔环肽染色显示, Celastrol/TAK-242 处理能够明显抑制 H9c2 细胞肥大 ( $P < 0.05$ , 图 3A)。同时, RT-qPCR 结果显示, 与 Resistin 组比较, Celastrol 组、TAK-242 组、Celastrol + TAK-242 组细胞心肌肥厚标志物 ANP、BNP、 $\beta$ -MHC mRNA 水平明显降低 ( $P < 0.05$ ); 且 Celastrol + TAK-242 组效果优于 Celastrol 组、TAK-242 组 ( $P < 0.05$ , 图 3B)。

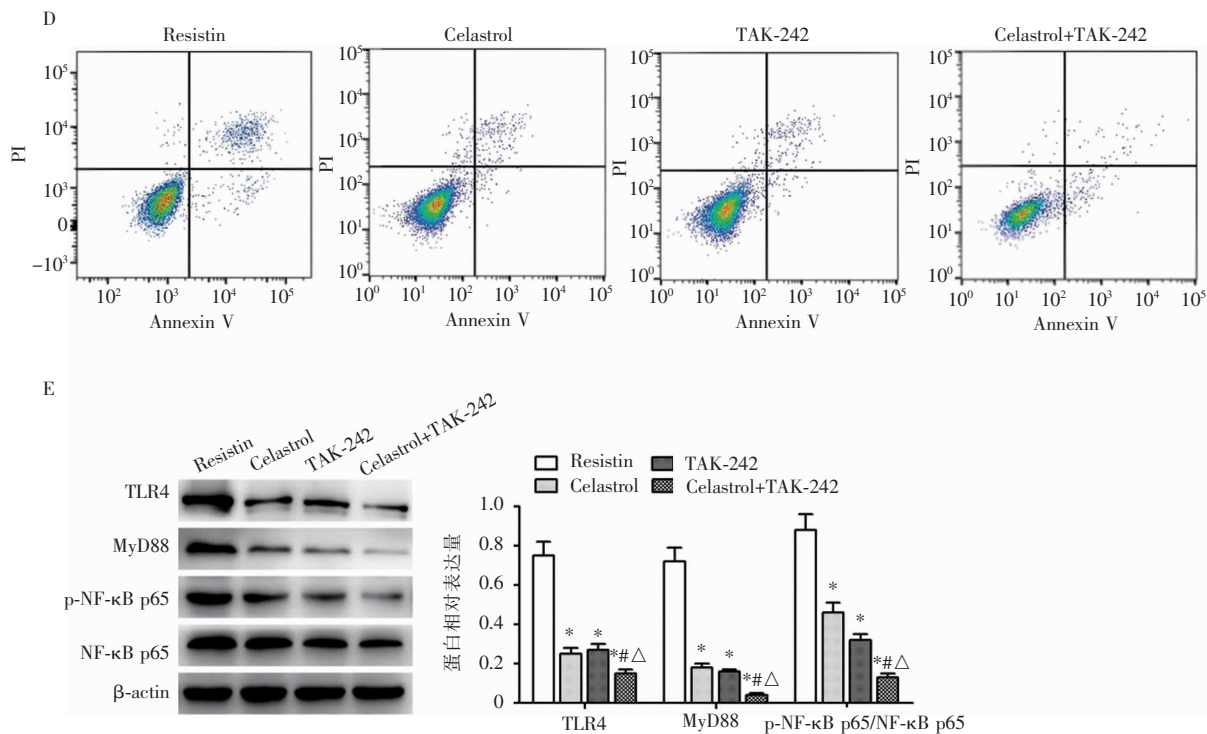
流式细胞术结果显示, 与 Resistin 组比较,

Celastrol 组、TAK-242 组、Celastrol + TAK-242 组 S 期细胞比例明显升高, G0/G1 期细胞比例、细胞凋亡率明显降低 ( $P < 0.05$ ); 且 Celastrol + TAK-242 组效果优于 Celastrol 组、TAK-242 组 ( $P < 0.05$ , 图 3C 和 3D)。

Western blotting 结果显示, 与 Resistin 组比较, Celastrol 组、TAK-242 组、Celastrol + TAK-242 组细胞 TLR4、MyD88、p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平明显降低 ( $P < 0.05$ ); 且 Celastrol + TAK-242 组效果优于 Celastrol 组、TAK-242 组 ( $P < 0.05$ , 图 3E)。







注:A为罗丹明-鬼笔环肽染色;B为RT-qPCR检测;C为细胞周期检测;D为细胞凋亡检测;E为Western blotting检测。\*表示与Resistin组比较, $P < 0.05$ ;#表示与Celastrol组比较, $P < 0.05$ ;△表示与TAK-242组比较, $P < 0.05$ 。

图3 雷公藤红素调节TLR4/MyD88/NF-κB通路改善抵抗素诱导的H9c2心肌细胞肥大

### 3 讨论

DCM主要表现为病理性心肌肥厚,病理性心肌肥厚能够诱导心功能降低,是心力衰竭等心血管疾病的独立危险因素<sup>[20]</sup>。抵抗素是由脂肪细胞、巨噬细胞、单核细胞等分泌的细胞因子,被认为与糖尿病和胰岛素抵抗的发展有关<sup>[21]</sup>。研究<sup>[22]</sup>显示,抵抗素在糖尿病大鼠心脏中高表达,并能够诱导心肌肥大和心肌胰岛素抵抗。敲除抵抗素基因能够减轻心力衰竭小鼠心肌纤维化和细胞凋亡,并改善其心脏功能<sup>[23]</sup>。由此可见,抑制抵抗素诱导的心肌细胞肥大可能是改善DCM的有效策略。雷公藤红素具有广泛的药理学作用,与血管紧张素转化酶抑制剂、β受体阻滞剂、钙通道阻滞剂等药物相比,可能具有较低的毒性和副作用,可通过多靶点调节与心肌肥大相关的信号通路,减少心肌细胞的炎症反应、肥大和纤维化<sup>[24-25]</sup>。已有研究显示,雷公藤红素能够减轻野百合碱诱导的大鼠右心室重塑<sup>[26]</sup>,并改善高糖饮食诱导的炎症和胰岛素抵抗<sup>[27]</sup>。然而,雷公藤红素是否能够改善抵抗素诱导的病理性心肌肥厚尚无研究报道。本研究通过抵抗素诱导H9c2心肌细胞肥大,研究心肌细胞肥大模型抵抗素干预最佳时间。罗丹明-鬼笔环肽染色显示,抵抗素处理24 h以上能够明显诱导H9c2细胞肥大;同时,RT-qPCR结果显示,抵抗素处理24 h后,细胞心肌肥厚标志物ANP、BNP、β-MHC mRNA水平明显升高,

且48、72 h时的作用效果显著,因此,选择抵抗素处理48 h作为最佳干预时间。进一步通过流式细胞术检测了抵抗素对H9c2心肌细胞周期和细胞凋亡的影响,发现抵抗素处理24 h后,细胞周期被阻滞,细胞凋亡率升高,说明抵抗素能够诱导H9c2心肌细胞肥大,抑制细胞增殖,并促进细胞凋亡。经过雷公藤红素干预后,H9c2细胞肥大明显改善,心肌肥厚标志物ANP、BNP、β-MHC mRNA水平降低,细胞周期恢复,细胞凋亡率降低,说明雷公藤红素能够改善H9c2心肌细胞肥大,促进细胞增殖,并抑制细胞凋亡,提示雷公藤红素在改善抵抗素诱导的病理性心肌肥厚中发挥重要作用,分析原因可能是雷公藤红素通过其蛋白酶体抑制作用和抗氧化作用,减少心肌细胞内的氧化应激和炎症反应,促进心肌细胞的正常代谢和修复过程。

TLR4是一种模式识别受体,可通过识别病原体相关分子模式,激活相关因子表达,在启动先天免疫中发挥重要作用。TLR4/MyD88/NF-κB通路的激活在心血管疾病的发生、发展中具有广泛的作用<sup>[28]</sup>。研究<sup>[29]</sup>显示,TLR4相关通路介导的炎症反应和细胞凋亡是导致心肌肥大的主要病理生理过程。而抑制TLR4/MyD88/NF-κB通路能够显著改善左心室及心肌细胞肥大<sup>[30]</sup>。本研究显示,抵抗素处理24 h后,细胞TLR4、MyD88、p-NF-κB p65/NF-κB p65蛋白水平明



显升高,说明 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路可能在抵抗素诱导的 H9c2 心肌细胞肥大中发挥调控作用。为进一步研究心肌细胞肥大过程中 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路的作用,本研究利用 siRNA 干扰使 TLR4 基因沉默,发现 TLR4 基因干扰能够明显抑制 H9c2 细胞肥大,阻滞细胞周期,并提高细胞凋亡率。此外,使用 TLR4 通路抑制剂 TAK-242 处理同样能够抑制 H9c2 细胞肥大。说明抵抗素可能通过激活 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路诱导 H9c2 心肌细胞肥大。为进一步研究雷公藤红素减轻抵抗素诱导的 H9c2 心肌细胞肥大的相关机制,本研究观察了雷公藤红素作用后,抵抗素诱导的 H9c2 心肌细胞中 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路相关分子的表达,发现雷公藤红素能够降低细胞中 TLR4、MyD88、p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平,且雷公藤红素联合 TLR4 抑制剂作用效果更显著。说明雷公藤红素改善抵抗素诱导的 H9c2 心肌细胞肥大,可能与调节 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路有关,分析原因可能是雷公藤红素可能通过抑制 TLR4 受体的活化,进而减少 MyD88 的募集和 NF- $\kappa$ B 的活化,从而减轻心肌细胞的炎症反应,这种抑制作用有助于减少促炎性细胞因子的产生,降低心肌细胞的损伤和肥大程度。见图 4。

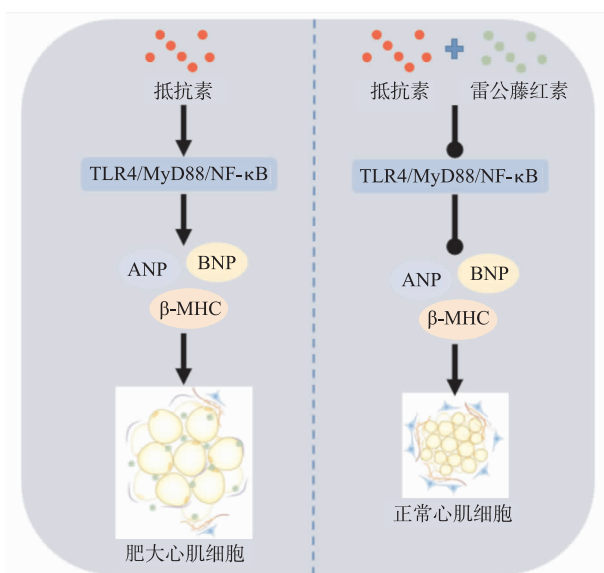


图 4 雷公藤红素调节 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路改善抵抗素诱导的 H9c2 心肌细胞肥大

综上所述,雷公藤红素通过调节 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路改善抵抗素诱导的 H9c2 心肌细胞肥大,这为完善并优化糖尿病病理性心肌肥厚的防治策略奠定了理论和实验基础,并提供了一种潜在的治疗措施。然而,本研究结果仅在体外水平得到证实,接下来仍需进行进一步的体内(大鼠/小鼠)实验,以验证雷公藤红素对治疗 DCM 心肌肥厚的应用潜力。

## 参考文献

- [1] Lorenzo-Almorós A, Cepeda-Rodrigo JM, Lorenzo Ó. Diabetic cardiomyopathy [J]. *Rev Clin Esp (Barc)*, 2022, 222(2):100-111.
- [2] Rajbhandari J, Fernandez CJ, Agarwal M, et al. Diabetic heart disease: a clinical update [J]. *World J Diabetes*, 2021, 12(4):383-406.
- [3] Zhang SN, Liu Q, Li XZ, et al. Cardioprotection of *Eucommiae Folium*; the extract and pharmaceutically active compounds attenuate hyperglycemia, mitochondrial dysfunction, calcium dyshomeostasis, insulin resistance, and oxidative stress in diabetic cardiomyopathy db/db mice [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2023, 75(12):1509-1520.
- [4] Wang C, Huang X, Tian S, et al. High plasma resistin levels portend the insulin resistance-associated susceptibility to early cognitive decline in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *J Alzheimers Dis*, 2020, 75(3):807-815.
- [5] Jayaraman S, Devarajan N, Rajagopal P, et al.  $\beta$ -sitosterol circumvents obesity induced inflammation and insulin resistance by down-regulating IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B and JNK signaling pathway in adipocytes of type 2 diabetic rats [J]. *Molecules*, 2021, 26(7):2101.
- [6] Cai X, Allison MA, Ambale-Venkatesh B, et al. Resistin and risks of incident heart failure subtypes and cardiac fibrosis: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis [J]. *ESC Heart Fail*, 2022, 9(5):3452-3460.
- [7] Luo JW, Zheng X, Cheng GC, et al. Resistin-induced cardiomyocyte hypertrophy is inhibited by apelin through the inactivation of extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in H9c2 embryonic rat cardiomyocytes [J]. *Biomed Rep*, 2016, 5(4):473-478.
- [8] Chen H, Liu Y, Yu S, et al. Cannabidiol attenuates periodontal inflammation through inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *J Periodontal Res*, 2023, 58(4):697-707.
- [9] Huang L, Li Y, Cheng Z, et al. PCSK9 promotes endothelial dysfunction during sepsis via the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B and NLRP3 pathways [J]. *Inflammation*, 2023, 46(1):115-128.
- [10] Shi H, Zhou P, Ni YQ, et al. *In vivo and in vitro* studies of Danzhi Jiangtang capsules against diabetic cardiomyopathy via TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Saudi Pharm J*, 2021, 29(12):1432-1440.
- [11] Amine H, Benomar Y, Taouis M. Palmitic acid promotes resistin-induced insulin resistance and inflammation in SH-SY5Y human neuroblastoma [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):5427.
- [12] Ferenčič A, Cuculić D, Stemberga V, et al. Left ventricular hypertrophy is associated with overexpression of HSP60, TLR2, and TLR4 in the myocardium [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2020, 80(3):236-246.
- [13] Qing TL, Jiang XY, Li JF, et al. Celastrol reduces lung inflammation induced by multiwalled carbon nanotubes in mice via NF- $\kappa$ B-signaling pathway [J]. *Inhal Toxicol*, 2024, 36(4):275-281.
- [14] Zhao X, Huang B, Zhang J, et al. Celastrol attenuates streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in mice by inhibiting the ACE/Ang II/AGTR1 signaling pathway [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2023, 15(1):186.
- [15] Zhang X, Wang Y, Ge HY, et al. Celastrol reverses palmitic acid (PA)-caused TLR4-MD2 activation-dependent insulin resistance via disrupting MD2-related cellular binding to PA [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(10):6814-6824.
- [16] Ye S, Luo W, Khan ZA, et al. Celastrol attenuates angiotensin II-induced cardiac remodeling by targeting STAT3 [J]. *Circ Res*, 2020, 126(8):1007-1023.
- [17] Yan X, Wu L, Gao M, et al. Omentin inhibits the resistin-induced hypertrophy of H9c2 cardiomyoblasts by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 23(4):292.
- [18] Ma L, Cao Y, Zhang L, et al. Celastrol mitigates high glucose-induced inflammation and apoptosis in rat H9c2 cardiomyocytes via miR-345-5p/growth arrest-specific 6 [J]. *J Gene Med*, 2020, 22(9):e3201.

- [19] Chen D, Geng Y, Deng Z, et al. Inhibition of TLR4 alleviates heat stroke-induced cardiomyocyte injury by down-regulating inflammation and ferroptosis [J]. *Molecules*, 2023, 28(5):2297.
- [20] Lu QB, Ding Y, Liu Y, et al. Metrn1 ameliorates diabetic cardiomyopathy via inactivation of cGAS/STING signaling dependent on LKB1/AMPK/ULK1-mediated autophagy [J]. *J Adv Res*, 2023, 51:161-179.
- [21] 杨坤, 邓勇志. lncRNA HOTAIR 增强自噬拮抗抗毒素诱导的心肌细胞肥大 [J]. *山西医科大学学报*, 2023, 54(8):1055-1060.
- [22] Kang S, Chemaly ER, Hajjar RJ, et al. Resistin promotes cardiac hypertrophy via the AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin (AMPK/mTOR) and c-Jun N-terminal kinase/insulin receptor substrate 1 (JNK/IRS1) pathways [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(21):18465-18473.
- [23] Zhao B, Bouchareb R, Lebeche D. Resistin deletion protects against heart failure injury by targeting DNA damage response [J]. *Cardiovasc Res*, 2022, 118(8):1947-1963.
- [24] Lu Y, Zeng Z, Bao X, et al. Pristimerin protects against pathological cardiac hypertrophy through improvement of PPAR $\alpha$  pathway [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2023, 473:116572.
- [25] Cheng M, Wu G, Song Y, et al. Celastrol-induced suppression of the MiR-21/ERK signalling pathway attenuates cardiac fibrosis and dysfunction [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(5):1928-1938.
- [26] Li H, Liu Q, Yue Y, et al. Celastrol attenuates the remodeling of pulmonary vascular and right ventricular in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats [J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2022, 12(1):88-102.
- [27] Abu Bakar MH, Mohamad Khalid MSF, Nor Shahril NS, et al. Celastrol attenuates high-fructose diet-induced inflammation and insulin resistance via inhibition of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in rat adipose tissues [J]. *Biofactors*, 2022, 48(1):111-134.
- [28] Chen F, Chen ZQ, Zhong GL, et al. Nicorandil inhibits TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B/NLRP3 signaling pathway to reduce pyroptosis in rats with myocardial infarction [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2021, 246(17):1938-1947.
- [29] Li D, Guo YY, Cen XF, et al. Lupeol protects against cardiac hypertrophy via TLR4-PI3K-Akt-NF- $\kappa$ B pathways [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(8):1989-2002.
- [30] 刁爱芹, 韩梅, 李菁, 等. 雌激素调控 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路减缓心肌肥大作用的研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(10):1994.

收稿日期:2024-07-23

## 投稿须知

1. 投稿请作者根据系统提示填写完整个人信息(基金项目及编号、单位、地址、邮编、手机号码、E-mail、研究方向等)。
2. 稿件请用 word 格式文件上传,格式参照系统首页 2022 投稿格式示例。
3. 文责自负,编辑部可对文稿作文字修改、删减或退请作者修改。投稿刊登后其版权归《心血管病学进展》编辑部。
4. 收到本刊回执 2 个月后未接到本刊录用通知,则稿件仍在审阅研究中,作者如需另投他刊,请先与本刊联系。请勿一稿多投。
5. 本刊已加入中国学术期刊光盘版及网络版等。凡在本刊发表的论文将自然转载其中,如作者有异议,请投稿时声明,否则本刊将视为作者同意。

本刊编辑部