

• 实验研究 •

艾司洛尔对缺氧复氧诱导的心肌细胞 AMPK/GSK-3 β 通路及凋亡的影响赵鑫¹, 蔡丹霞², 王贺³

1. 河南科技大学第一附属医院 急诊科, 河南 洛阳 471003

2. 河南科技大学第一附属医院 心内科, 河南 洛阳 471003

3. 河南中医药大学第一附属医院 心内科, 河南 郑州 450000

摘要: 目的 探讨艾司洛尔对缺氧复氧诱导的心肌细胞凋亡的影响, 并初步研究其作用机制。方法 体外培养大鼠心肌细胞(H9c2), 并建立缺氧/复氧(I/R)损伤模型, 随机分为对照组、H/R组和艾司洛尔低、中、高剂量(0.2、5.0、25.0 $\mu\text{mol/L}$)组; 噻唑蓝(MTT)法检测各组H9c2细胞存活率变化情况; 膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)法检测各组H9c2细胞凋亡情况; 蛋白印迹分析法检测各组H9c2细胞Bcl-2相关X蛋白(Bax)、半胱天冬氨酸酶-3(Caspase-3)、Bcl-2蛋白及腺苷单磷酸激活的蛋白激酶(AMPK)、糖原合酶激酶3 β (GSK-3 β)磷酸化水平; 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测各组H9c2细胞AMPK、GSK-3 β mRNA表达情况。结果 与对照组相比, H/R组H9c2细胞存活率、Bcl-2蛋白表达水平、AMPK、GSK-3 β 蛋白磷酸化水平显著降低($P < 0.05$), 细胞凋亡率、Bax、Caspase-3蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$); 与H/R组相比, 艾司洛尔低、中、高剂量组H9c2细胞存活率、Bcl-2蛋白表达水平、AMPK、GSK-3 β 蛋白磷酸化水平依次升高($P < 0.05$), 细胞凋亡率、H9c2细胞Bax、Caspase-3蛋白表达水平依次降低($P < 0.05$), 均呈剂量依赖性。结论 艾司洛尔能够抑制I/R诱导下心肌细胞的凋亡, 可能与激活AMPK/GSK-3 β 磷酸化水平相关。

关键词: 艾司洛尔; 缺氧复氧; 心肌细胞; 凋亡; 腺苷单磷酸激活的蛋白激酶; 糖原合酶激酶3 β

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)02-0213-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.02.001

Effects of esmolol on AMPK/GSK-3 β pathway and apoptosis of cardiomyocytes induced by anoxia and reoxygenationZHAO Xin¹, CAI Dan-xia², WANG He³

1. Emergency Department of the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

3. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

Abstract: **Objective** To study the effect of esmolol on cardiomyocyte apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation and its mechanism. **Methods** The rat cardiomyocytes (H9c2) were cultured *in vitro*, and the model of hypoxia/reoxygenation (I/R) injury was established. H9c2 cells was divided into control group, H/R group, esmolol low dose group, esmolol medium dose group and esmolol high dose group (0.2, 5.0, 25.0 $\mu\text{mol/L}$). The survival rate of H9c2 cells was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. The apoptosis of H9c2 cells was detected by Annexin V-FITC/PI method. The phosphorylation levels of Bcl-2 related X protein (Bax), Caspase-3, Bcl-2 protein, adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) and glycylase kinase-3 β (GSK-3 β) in H9c2 cells were detected by Western blotting. The expression of AMPK and GSK-3 β mRNAs in H9c2 cells were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR). **Results** Compared with the control group, the survival rate, Bcl-2 protein expression level, AMPK and GSK-3 β protein phosphorylation levels of H9c2 cells in H/R group were significantly lower ($P < 0.05$),

收稿日期: 2020-08-12

基金项目: 河南省中医药科学研究专项课题(2019ZY2139)

作者简介: 赵鑫(1981—), 本科, 主治医师, 从事内外科疾病科研研究及急诊急救临床工作。E-mail: az7389@163.com

and the apoptosis rate, Bax and caspase-3 protein expression levels were significantly higher ($P < 0.05$). Compared with H/R group, the survival rate, Bcl-2 protein expression level, AMPK and GSK-3 β protein phosphorylation levels of H9c2 cells in esmolol low, middle and high dose groups were increased in turn ($P < 0.05$), and the apoptosis rate, Bax and caspase-3 protein expression levels of H9c2 cells were decreased in turn ($P < 0.05$). Meanwhile, all of them were dose-dependent. **Conclusion** Esmolol can inhibit the apoptosis of cardiomyocytes induced by I/R, which may be related to the activation of AMPK/GSK-3 β phosphorylation.

Key words: esmolol; hypoxia/reoxygenation; cardiomyocyte; apoptosis; adenosine monophosphate-activated protein kinase; glycogen synthase kinase-3 β

心血管疾病是仅次于恶性肿瘤的第二大死亡诱因,与心肌细胞损伤和心脏功能障碍密切相关^[1-2]。抗血小板和抗凝治疗、冠状动脉介入和血管形成治疗及时恢复冠状动脉血流灌注是治疗心血管疾病的最有效方法^[3]。然而,心肌缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤与预后不良相关,可能导致心肌细胞死亡,加重心肌损伤^[4-5]。因此,寻找可以有效预防 I/R 损伤的治疗方法成为心肌保护研究领域的热点。艾司洛尔是一种高选择性的 β_1 受体阻滞剂,输注艾司洛尔能够减少脂多糖诱导的小鼠心脏功能损害,并抑制心肌细胞凋亡^[6]。腺苷单磷酸激活的蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)作为细胞的能量调节因子,其与糖原合酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)信号通路的激活能够抑制大鼠心肌细胞凋亡^[7]。但艾司洛尔对 I/R 诱导心肌细胞损伤的影响及其与 AMPK/GSK-3 β 信号通路的关联尚不清楚。本实验旨在探索艾司洛尔对缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)诱导的心肌细胞凋亡的影响,并初步探索其作用机制,为艾司洛尔在 I/R 损伤的临床应用提供参考。

1 材料

1.1 细胞、药品与试剂

大鼠心肌细胞 H9c2 (GMR5) 购自中国科学院细胞库;盐酸艾司洛尔注射液(批号: 1-19991059) 购自齐鲁制药有限公司; DMEM 高糖(11995)/无糖(90113)培养基、噻唑蓝(MTT)试剂(批号: M8180)、RIPA 裂解液(批号: R0010)、胎牛血清(批号: 11011-8611)、0.25%胰蛋白酶消化液(批号: T1350)、Trizol 试剂盒(批号: 15596-018)、ECL 发光液(批号: PE0010)、逆转录试剂盒(批号: T2210-200T) 购自北京 Solarbio 公司; AMPK、GSK-3 β 及 GAPDH 引物均由上海生工生物工程有限公司合成; Bcl-2 兔抗鼠多克隆抗体(批号: PA5-27094)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)兔抗鼠多克隆抗体(批号: PA5-11378)、Caspase-3 兔抗鼠重组单克隆抗体(批号: 700182)、

AMPK 兔抗鼠重组单克隆抗体(批号: MA5-32122)、p-AMPK 兔抗鼠重组单克隆抗体(批号: PA5-104982)、GAPDH 兔抗鼠多克隆抗体(批号: PA1-16777)、山羊抗兔 IgG (H+L) 二级抗体(批号: A32731) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; GSK-3 β 兔抗鼠单克隆抗体(批号: AG751) 及 p-GSK-3 β 兔抗鼠多克隆抗体(批号: AG763) 购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 主要仪器

BBD6220 二氧化碳细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ELX-8081U 酶标仪、Gel Doc™XR+ 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司); ZS-AE7S 流式细胞仪[中生(苏州)医疗科技有限公司]; 2720 型 PCR 仪(美国 ABI 公司); MA100N 倒置显微镜(日本 Nikon)。

2 方法

2.1 细胞培养

将 10%胎牛血清和 100 mg/mL 双抗添加至 DMEM 培养基,制成 DMEM 完全培养基。将购买的 H9c2 细胞复苏、解冻后,用 DMEM 完全培养基重悬,置于 37 °C、5%CO₂ 环境下孵育,每 2~3 天更换一次新鲜培养基,将细胞传代或 70%~80% 融合后,胰酶消化收集,用于后续实验。

2.2 H/R 模型的建立^[8]及实验分组

待“2.1”项 H9c2 细胞融合 70%左右,更换培养液为无血清低糖 DMEM 培养基(模拟缺血),置于缺氧培养环境(37 °C, 5%CO₂、95%N₂)持续培养 6 h,模拟缺氧过程。随后更换培养液为高糖 DMEM 完全培养基,置于 37 °C, 5%CO₂ 培养箱中培养 6 h,模拟复氧过程。收集上述 H9c2 细胞,随机分为 H/R 组及艾司洛尔低、中、高剂量组,分别用不同浓度的艾司洛尔(0.2、5.0、25.0 μ mol/L,该浓度是由前期预试验确定;在该浓度范围内,艾司洛尔对正常 H9c2 细胞无影响)处理各组细胞 24 h, H/R 组不做药物处理,收集细胞用于后续实验。另取“2.1”项正常培养的 H9c2 细胞,设置为对照组。

2.3 MTT 实验

将 H9c2 细胞接种于 96 孔细胞板 (4.5×10^4 个/孔), 每组 6 个复孔, 按照“2.2”项步骤处理后, 加入 200 μL /孔 MTT 溶液, 孵育 4 h, 每孔加入 200 μL 二甲基亚砷溶解紫色晶体, 利用酶标仪在 490 nm 处记录各孔吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

存活率 = 实验组 A 值 / 对照组 A 值

2.4 Annexin V-FITC/PI 实验

收集“2.2”项各组 H9c2 细胞, 按照 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明书, 重悬细胞至密度为 1.0×10^6 个/mL。取 100 μL 置于离心管, 依次加入 10 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI, 轻轻吹打混匀, 避光保存 15 min, 添加 400 μL 结合缓冲液稀释后, 1 h 内在流式细胞仪上检测各组细胞凋亡情况。

凋亡率 = 凋亡早期细胞比例 + 凋亡晚期细胞比例

2.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实验

参照 Trizol 试剂盒说明书, 提取“2.2”项各组 H9c2 细胞总 RNA, 逆转录反应得 cDNA。取 1.0 μL cDNA, 上下引物各 1 μL , 进行 PCR 扩增。PCR 反应参数设置如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 进行 40 次循环。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 AMPK、GSK-3 β 表达情况。AMPK、GSK-3 β 及 GAPDH 引物序列见表 1。

表 1 AMPK、GSK-3 β 和内参 GAPDH 引物序列

Table 1 Primer sequences of AMPK, GSK-3 β and GAPDH

基因	引物
AMPK	上游 (5'→3') TTGAAACCTGAAAATGTCCTGCT 下游 (5'→3') CAGGGATGAGTTCGCACTT
GSK-3 β	上游 (5'→3') AGGCTGTGTGTTGGCTGAAT 下游 (5'→3') TTTGCTCCCTTGTGTTGTT
GAPDH	上游 (5'→3') CACATGCCGCCTGGAGAAAC 下游 (5'→3') AGCCCAGGATGCCCTTTAGT

2.6 蛋白免疫印迹分析实验

收集“2.2”项各组细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下加入 RIPA 裂解液, 裂解 30 min, 离心收集上清液, 采用 BCA 法检测蛋白质量浓度。分别取 30 μg 蛋白质, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 转移至聚偏二氟乙烯膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下加入一抗 AMPK、p-AMPK、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 、Bax、Caspase-3、Bcl-2 (1:1 000) 及 GAPDH (1:5 000), 孵育过夜, 洗涤、加入二抗 (1:5 000), 室温孵育 2 h, 曝光显影, 观察条带并记录, 以 GAPDH 为内参,

计算目标蛋白与内参 GAPDH 比值。

2.7 统计学方法

以统计学软件 SPSS 22.0 分析实验数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 描述, 多组间比较使用单因素方差分析, 进一步两组间比较行 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 艾司洛尔对 H/R 诱导的 H9c2 细胞活性影响

与对照组相比, H/R 组 H9c2 细胞存活率显著降低 ($P < 0.05$); 与 H/R 组相比, 艾司洛尔低、中、高剂量组 H9c2 细胞存活率依次升高 ($P < 0.05$), 呈剂量依赖性。见表 2。

表 2 艾司洛尔对 H/R 诱导的 H9c2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of esmolol on survival rate of H9c2 cells induced by H/R ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	C/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	H9c2 细胞存活率/%
对照	—	97.52 $\pm$ 2.27
H/R	—	57.77 $\pm$ 2.01*
艾司洛尔	0.2	68.18 $\pm$ 1.93 [#]
	5.0	79.97 $\pm$ 2.00 ^{#△}
	25.0	88.43 $\pm$ 1.65 ^{#△▲}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 H/R 组比较: [#] $P < 0.05$; 与艾司洛尔低剂量组比较: [△] $P < 0.05$; 与艾司洛尔中剂量组比较: [▲] $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs H/R group; [△] $P < 0.05$ vs low dose of esmolol group; [▲] $P < 0.05$ vs middle dose of esmolol group

3.2 艾司洛尔对 H/R 诱导的 H9c2 细胞凋亡的影响

与对照组相比, H/R 组 H9c2 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$); 与 H/R 组相比, 艾司洛尔低、中、高剂量组 H9c2 细胞凋亡率依次降低 ($P < 0.05$), 呈剂量依赖性。见图 1 和表 3。

3.3 艾司洛尔对 H/R 诱导下 H9c2 细胞凋亡相关蛋白 Bax、Caspase-3 及 Bcl-2 表达的影响

与对照组相比, H/R 组 H9c2 细胞 Bax、Caspase-3 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$); 与 H/R 组相比, 艾司洛尔低、中、高剂量组 H9c2 细胞 Bax、Caspase-3 蛋白表达水平依次降低 ($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$), 呈剂量依赖性。见图 2 和表 4。

3.4 艾司洛尔对 H/R 诱导下 H9c2 细胞 AMPK、GSK-3 β 表达的影响

与对照组相比, H/R 组 H9c2 细胞 AMPK、GSK-3 β 蛋白磷酸化水平显著降低 ($P < 0.05$); 与

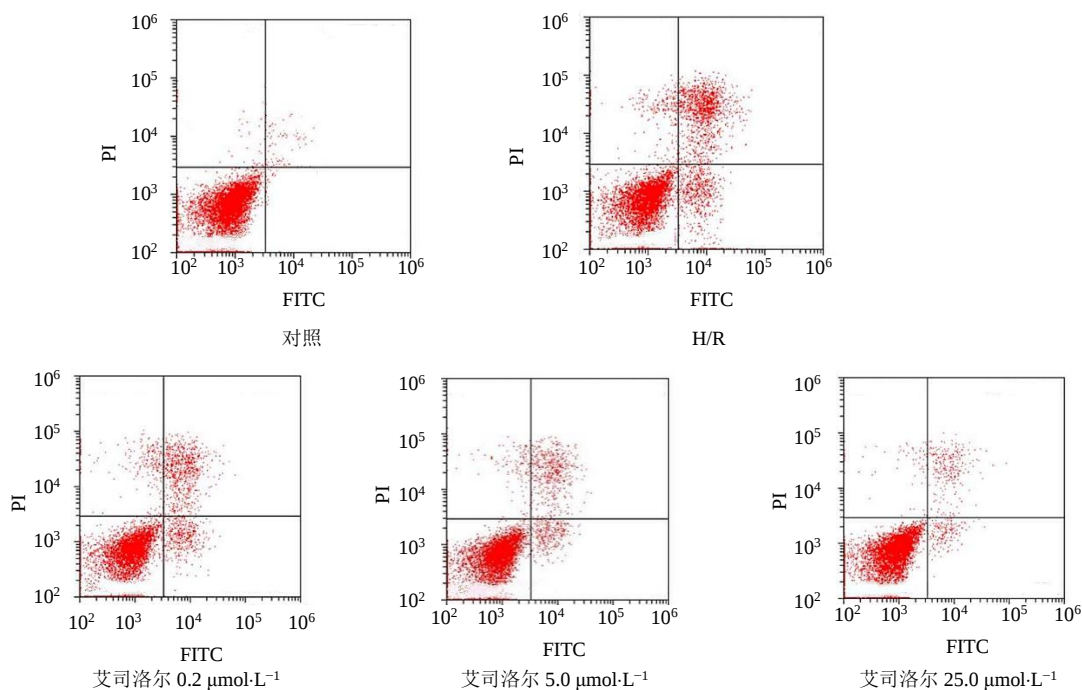


图 1 各组 H9c2 细胞凋亡变化情况

Fig. 1 Changes of H9c2 cell apoptosis in each group

表 3 艾司洛尔对 H9c2 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 3 Effect of esmolol on H9c2 cell apoptosis rate ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	C/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	H9c2 细胞凋亡率/%
对照	—	2.11 ± 0.84
H/R	—	27.32 ± 1.27*
艾司洛尔	0.2	16.68 ± 1.16 [#]
	5.0	11.13 ± 1.30 ^{#△}
	25.0	5.42 ± 1.02 ^{#△▲}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 H/R 组比较: [#] $P < 0.05$; 与艾司洛尔低剂量组比较: [△] $P < 0.05$; 与艾司洛尔中剂量组比较: [▲] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs H/R group; [△] $P < 0.05$ vs low dose of esmolol group; [▲] $P < 0.05$ vs middle dose of esmolol group

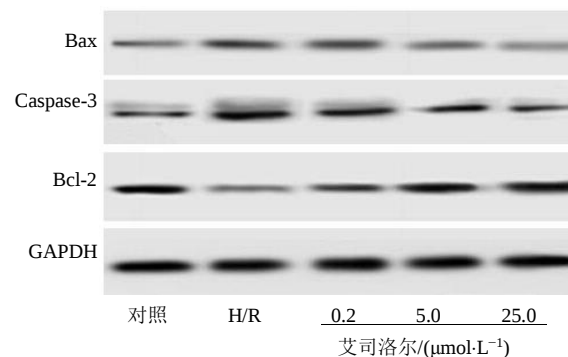


图 2 各组 H9c2 细胞 Bax、Caspase-3 及 Bcl-2 蛋白表达电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of Bax, Caspase-3 and Bcl-2 protein expression in H9c2 cells of each group

表 4 艾司洛尔对 H9c2 细胞 Bax、Caspase-3 及 Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 4 Effect of esmolol on protein expression of Bax, Caspase-3 and Bcl-2 in H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	C/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Bax/GADPH	Caspase-3/GADPH	Bcl-2/GADPH
对照	—	0.19 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.81 ± 0.02
H/R	—	0.66 ± 0.03*	0.86 ± 0.03*	0.26 ± 0.01*
艾司洛尔	0.2	0.54 ± 0.02 [#]	0.70 ± 0.02 [#]	0.49 ± 0.01 [#]
	5.0	0.42 ± 0.02 ^{#△}	0.51 ± 0.01 ^{#△}	0.89 ± 0.03 ^{#△}
	25.0	0.26 ± 0.01 ^{#△▲}	0.22 ± 0.02 ^{#△▲}	1.04 ± 0.02 ^{#△▲}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 H/R 组比较: [#] $P < 0.05$; 与艾司洛尔低剂量组比较: [△] $P < 0.05$; 与艾司洛尔中剂量组比较: [▲] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs H/R group; [△] $P < 0.05$ vs low dose of esmolol group; [▲] $P < 0.05$ vs middle dose of esmolol group

H/R 组相比, 艾司洛尔低、中、高剂量组 H9c2 细胞 AMPK、GSK-3 β 蛋白磷酸化水平依次升高 ($P < 0.05$), 呈剂量依赖性。见图 3 和表 5。

4 讨论

细胞凋亡级联反应、氧化应激和炎症等是 I/R 引起心肌组织受损的主要原因, 但临床试验尚未发现用于减轻 I/R 损伤的有效药物^[9]。因此开发预防 I/R 损伤的有效干预措施和策略具有重要临床意义。H/R 诱导心肌细胞损伤模型已被广泛用于模拟体内心肌 I/R 损伤^[10], 本研究结果显示, 与对照组相比, H/R 组 H9c2 细胞存活率显著降低, 凋亡率显著升高, 表明成功构建了 H/R 损伤模型。

心肌细胞凋亡与 I/R 损伤密切相关, 可能导致心肌收缩功能障碍, 加重心肌损伤^[11]。Bcl-2 和 Bax

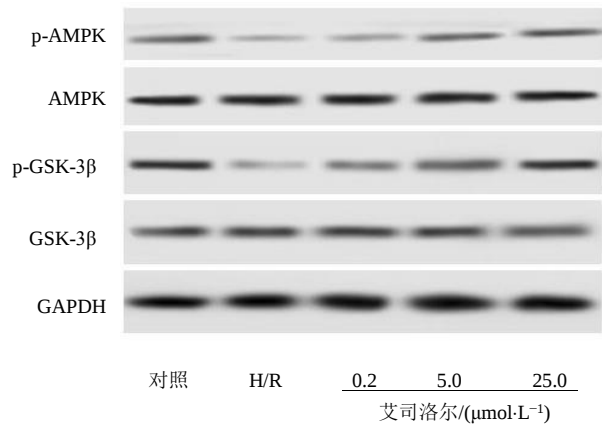


图 3 各组 H9c2 细胞 AMPK、GSK-3 β 蛋白表达电泳图
Fig. 3 Electrophoresis of AMPK and GSK-3 β protein expression in H9c2 cells of each group

表 5 艾司洛尔对 H9c2 细胞 AMPK、GSK-3 β mRNA 及蛋白磷酸化水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effect of esmolol on mRNA expression of AMPK, GSK-3 β and protein phosphorylation in H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	C/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	mRNA 表达量		蛋白表达量	
		AMPK/GAPDH	GSK-3 β /GAPDH	p-AMPK/AMPK	p-GSK-3 β /GSK-3 β
对照	—	1.04 $\pm$ 0.02	0.99 $\pm$ 0.03	1.09 $\pm$ 0.03	1.24 $\pm$ 0.03
H/R	—	0.21 $\pm$ 0.01*	0.18 $\pm$ 0.01*	0.17 $\pm$ 0.01*	0.22 $\pm$ 0.02*
艾司洛尔	0.2	0.47 $\pm$ 0.02 [#]	0.46 $\pm$ 0.01 [#]	0.26 $\pm$ 0.02 [#]	0.51 $\pm$ 0.01 [#]
	5.0	0.85 $\pm$ 0.02 ^{#Δ}	0.89 $\pm$ 0.03 ^{#Δ}	0.58 $\pm$ 0.02 ^{#Δ}	1.10 $\pm$ 0.02 ^{#Δ}
	25.0	1.16 $\pm$ 0.03 ^{#$\Delta$$\blacktriangle$}	1.14 $\pm$ 0.02 ^{#$\Delta$$\blacktriangle$}	0.71 $\pm$ 0.03 ^{#$\Delta$$\blacktriangle$}	1.26 $\pm$ 0.02 ^{#$\Delta$$\blacktriangle$}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 H/R 组比较: [#] $P < 0.05$; 与艾司洛尔低剂量组比较: ^{Δ} $P < 0.05$; 与艾司洛尔中剂量组比较: ^{$\blacktriangle$} $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs H/R group; ^{Δ} $P < 0.05$ vs low dose of esmolol group; ^{$\blacktriangle$} $P < 0.05$ vs middle dose of esmolol group

蛋白是 Bcl-2 多基因家族的主要成员, 主要通过调节线粒体的通透性发挥凋亡调控机制^[12-13]。Caspase-3 是调控细胞凋亡的关键因子之一, 研究证实^[14-15], Bcl-2 家族能够激活 Caspase-3 信号传导, 参与调节细胞凋亡反应。本研究发现, 与 H/R 组相比, 艾司洛尔低、中、高剂量组 H9c2 细胞存活率、Bcl-2 蛋白显著升高, 凋亡率、Bax、Caspase-3 蛋白显著降低, 提示艾司洛尔能够促进 H/R 诱导下心肌细胞的增殖, 并诱导凋亡。Quintana-Villamandos 等^[16]研究发现, 艾司洛尔短期治疗能够发挥心脏保护作用。此外, 低剂量的盐酸艾司洛尔可以降低心肌梗死患者的心肌损伤^[17]。因此推测, 艾司洛尔可能通过抑制 I/R 诱导的心肌细胞损伤及凋亡, 减缓 H/R 诱导的心脏功能障碍。

AMPK 结构包含 α 亚基、 β 亚基和 γ 亚基, 高度敏感于细胞内的能量变化^[18]。李燕等^[19]研究发

现, 激活 AMPK 蛋白表达, 与抑制小鼠心肌组织凋亡相关。此外, 激活 AMPK 信号通路能够限制 I/R 损伤大鼠的心肌梗死面积, 发挥心脏保护作用^[20]。GSK-3 β 是一种丝氨酸/苏氨酸酶, 已被证实参与调节细胞凋亡^[21]。本研究发现, 与 H/R 组相比, 艾司洛尔低、中、高剂量组 H9c2 细胞 AMPK、GSK-3 β 蛋白磷酸化水平呈剂量依赖性升高, 提示艾司洛尔可能通过激活 AMPK/GSK-3 β 磷酸化水平, 抑制 H/R 诱导的心肌细胞凋亡。Li 等^[22]证实, GSK-3 β 通过激活 AMPK 蛋白表达, 抑制内毒素脂多糖诱导的心肌细胞凋亡, 与本研究结果一致, 推测艾司洛尔可能是用于 I/R 损伤治疗的潜在有效药物。

综上所述, 艾司洛尔能够促进 H/R 诱导下心肌细胞的增殖、并抑制其细胞凋亡, 可能与激活 AMPK/GSK-3 β 磷酸化水平相关, 表明艾司洛尔在改善 I/R 损伤方向的潜在治疗价值, 可能为预防心

血管疾病 I/R 损伤并发症提供了理论参考。本实验将进一步联合小鼠模型和临床试验, 针对艾司洛尔对 I/R 损伤造成的心脏功能障碍进行积极深入的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lu D, Thum T. RNA-based diagnostic and therapeutic strategies for cardiovascular disease[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(11): 661-674.
- [2] Zhang R Y, Qiao Z Y, Liu H J, et al. Sonic hedgehog signaling regulates hypoxia/reoxygenation-induced H9C2 myocardial cell apoptosis [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(5): 4193 - 4200.
- [3] Ren Z, Xiao W, Zeng Y, et al. Fibroblast growth factor-21 alleviates hypoxia/reoxygenation injury in H9c2 cardiomyocytes by promoting autophagic flux [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(3): 1321-1330.
- [4] 刘 丹, 潘连红, 金良友, 等. 柚皮苷预处理通过抑制内质网应激凋亡途径减轻心肌细胞缺氧/复氧损伤 [J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(2): 214-218.
- [5] 刘启方, 黄 晶, 徐 敏. miR-25 对缺氧/复氧诱导的 H9 c2 细胞凋亡的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(7): 1214-1221.
- [6] Wang Z, Wu Q, Nie X, et al. Infusion of esmolol attenuates lipopolysaccharide-induced myocardial dysfunction [J]. *J Surg Res*, 2016, 200(1): 283-289.
- [7] Tian X, Zhou Y, Wang Y, et al. Mitochondrial dysfunction and apoptosis are attenuated on κ -opioid receptor activation through AMPK/GSK-3 β pathway after myocardial ischemia and reperfusion [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2019, 73(2): 70-81.
- [8] Liao B, Chen R, Lin F, et al. Imperatorin protects H9c2 cardiomyoblasts cells from hypoxia/reoxygenation-induced injury through activation of ERK signaling pathway [J]. *Saudi Pharm J*, 2017, 25(4): 615-619.
- [9] Yang Q, He G W, Underwood M J, et al. Cellular and molecular mechanisms of endothelial ischemia/reperfusion injury: perspectives and implications for postischemic myocardial protection [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(2): 765-777.
- [10] Song H, Feng X, Zhang H, et al. METTL3 and ALKBH5 oppositely regulate m6A modification of TFEB mRNA, which dictates the fate of hypoxia/reoxygenation-treated cardiomyocytes [J]. *Autophagy*, 2019, 15(8): 1419-1437.
- [11] Yao L, Chen H, Wu Q, et al. Hydrogen-rich saline alleviates inflammation and apoptosis in myocardial I/R injury via PINK-mediated autophagy [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(3): 1048-1062.
- [12] 罗 吉, 罗 燕, 李勇敏, 等. 重楼皂苷 I 对结肠癌 HCT116 细胞凋亡及 Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(6): 172-176.
- [13] 李攀登, 王永红, 肖芸, 等. 氢醌对人白血病细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 表达的影响 [J]. *现代预防医学*, 2018, 45(5): 116-120.
- [14] Montiel-Cervantes L A, Reyes-Maldonado E, Garcia-Chavez J, et al. Prognostic value of CD95, active Caspase-3, and Bcl-2 expression in adult patients with De Novo acute lymphoblastic leukemia [J]. *Arch Med Res*, 2018, 49(1): 44-50.
- [15] Wang X, Pan J, Liu D, et al. Nicorandil alleviates apoptosis in diabetic cardiomyopathy through PI3K/Akt pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(8): 5349-5359.
- [16] Quintana-Villamandos B, Delgado-Martos M J, Delgado-Baeza E. Early reversal cardiac with esmolol in hypertensive rats: The role of subcellular organelle phenotype [J]. *Pharmacol Rep*, 2019, 71(6): 1125-1132.
- [17] 孙 冰, 王海昌, 王海燕. 经皮冠状动脉介入术中静脉应用盐酸艾司洛尔对急性 ST 段抬高型心肌梗死患者临床疗效及安全性 [J]. *心脏杂志*, 2019(6): 660-666.
- [18] 赵汝舟, 余志斌, 张 琳. 缺氧预处理激活 AMPK 对大鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用 [J]. *解放军医学杂志*, 2019, 44(2): 36-42.
- [19] 李 燕, 冯 健, 谢发江, 等. 柚皮素通过调控 AMPK/Nrf2/HO-1 信号通路减轻糖尿病小鼠心肌损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(1): 38-46.
- [20] Zhang P, Liu X, Huang G, et al. Barbaloin pretreatment attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via activation of AMPK [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 490(4): 1215-1220.
- [21] Su D, Zhao J, Hu S, et al. GSK3 β and MCL-1 mediate cardiomyocyte apoptosis in response to high glucose [J]. *Histochem Cell Biol*, 2019, 152(3): 217-225.
- [22] Li Z, Zhu H, Liu C, et al. GSK-3 β inhibition protects the rat heart from the lipopolysaccharide-induced inflammation injury via suppressing FOXO3A activity [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(11): 7796-7809.

[责任编辑 刘东博]