

基于 Akt/mTOR 及 ERK/mTOR 信号通路探究活心丸对心肌肥大大鼠自噬的影响

高展旺¹, 张 昕¹, 莫尊汇^{2,3}, 廖弈秋^{2,3}, 王玲娜^{1*}

1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 广州白云山医药集团股份有限公司白云山制药总厂, 广东 广州 510515

3. 广东省化学药原料与制剂关键技术研究重点实验室, 广东 广州 510515

摘 要:目的 基于蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 及细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)/mTOR 信号通路探究活心丸对心肌肥大大鼠自噬的影响。方法 SD 大鼠 ip 盐酸异丙肾上腺素诱导心肌肥大, 分别给予活心丸和盐酸普萘洛尔进行干预, 检测大鼠超声心动图, 采用 ELISA 法检测大鼠血清中心肌肥大指标心房钠尿肽 (atrial natriuretic peptide, ANP)、脑钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP) 及炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 水平; 采用苏木素-伊红 (HE) 和 Masson 染色观察大鼠心肌组织病理变化; 采用免疫组化法检测大鼠心肌组织微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3) 蛋白表达情况; 采用 Western blotting 法检测大鼠心肌组织 ERK、磷酸化 ERK (phosphorylated ERK, p-ERK)、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR 和 LC3 蛋白表达情况。结果 与模型组相比, 各给药组大鼠心肌肥大缓解, 心肌组织病理损伤减轻, 血清中 ANP、BNP、TNF- α 和 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001); 心肌组织中 p-ERK/ERK、p-Akt/Akt 和 p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), LC3 II/LC3 I 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$)。结论 活心丸通过抑制自噬减轻大鼠心肌肥大, 其机制可能与激活 Akt/mTOR 及 ERK/mTOR 通路相关。

关键词: 活心丸; 心肌肥大; 自噬; 蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路; 细胞外调节蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2022)05-1442-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.05.019

Effect of Huoxin Pills on autophagy of cardiac hypertrophy rats based on Akt/mTOR and ERK/mTOR signaling pathways

GAO Zhan-wang¹, ZHANG Xin¹, MO Zun-hui^{2,3}, LIAO Yi-qiu^{2,3}, WANG Ling-li¹

1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. Baiyunshan Pharmaceutical General Factory, Guangzhou Baiyunshan Pharmaceutical Holdings Co., Ltd., Guangzhou 510515, China

3. Key Laboratory of Key Technology Research on Chemical Raw Materials and Preparations of Guangdong Province, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To explore the effect of Huoxin Pills (活心丸) on autophagy in rats with cardiac hypertrophy based on protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) and extracellular regulated protein kinases (ERK)/mTOR signaling pathways.

Methods SD rats were ip isoproterenol to induce cardiac hypertrophy, Huoxin Pills and propranolol hydrochloride were given for intervention, echocardiography of rats was detected, ELISA method was used to detect levels of cardiac hypertrophy indicators atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP) and inflammatory factors TNF- α and IL-6 in serum of rats; HE and Masson staining were used to observe the pathological changes of myocardial tissue in rats; Immunohistochemistry was used to detect microtubule associated protein 1 light chain 3 (LC3) protein expression in myocardial tissue of rats; Western blotting was used to detect

收稿日期: 2021-11-03

基金项目: 广州市科技计划项目 (202103000049)

作者简介: 高展旺 (1998—), 男, 硕士, 研究方向为中药学。Tel: 16624670427 E-mail: 20201110890@stu.gzucm.edu.cn

*通信作者: 王玲娜, 女, 硕士生导师, 副研究员, 主要从事中药学及其药理学研究。E-mail: wlingli@gzucm.edu.cn

the protein expressions of ERK, phosphorylated ERK (p-ERK), Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR and LC3 in myocardial tissue of rats.

Results Compared with model group, myocardial hypertrophy of rats in each administration group was relieved, pathological damage of myocardial tissue was alleviated, and levels of ANP, BNP, TNF- α and IL-6 in serum were significantly decreased ($P < 0.01, 0.001$); Protein expression levels of p-ERK/ERK, p-Akt/Akt and p-mTOR/mTOR were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), and LC3 II/LC3 I protein expression level was significantly decreased ($P < 0.001$). **Conclusion** Huoxin Pills can reduce cardiac hypertrophy in rats by inhibiting autophagy, and its mechanism may be related to the activation of Akt/mTOR and ERK/mTOR pathways.

Key words: Huoxin Pills; cardiac hypertrophy; autophagy; protein kinase B/mTOR pathway; extracellular regulated protein kinases/mTOR pathway

心力衰竭是一种使心脏无法维持向机体供应含氧血液的衰弱状况^[1]。造成心力衰竭的原因可能为慢性心脏应激或损伤,包括压力或容量超负荷(如高血压、心脏瓣膜病)及心肌梗塞和遗传疾病^[2]。心脏最初为了恢复正常心血管功能,通过增加大小和质量的方式来对超负荷或心脏损伤进行代偿性反应,这种心脏扩大的现象通常被称为病理性心肌肥大。心肌肥大虽可以有效维持心脏的正常功能,但持续病理性心肌肥大会导致心肌结构和功能异常,发生心脏重构,最终导致心力衰竭^[3-4]。因此改善心肌肥大对预防心力衰竭至关重要。

近年来,随着中医药事业的发展,中医药在防治心血管疾病的治未病和防病变方面发挥着独特优势^[5]。活心丸为国家中药保护品种、常用中医药方剂,人参、附子为君药,发挥补气、温阳之功效;臣药由灵芝、蟾酥、红花组成,3味药共行通经活血之效;同时配以4味动物药,达到解毒、醒神、镇心、定志、安魂的作用;冰片作为佐使药,发挥通窍开经络、引药透达的作用,在临床上已广泛用于治疗心力衰竭及冠心病^[6-8]。但其治疗心肌肥大的机制未见明确报道。

自噬是维持心脏内稳态的重要生理活动,主要利用溶酶体消化损伤、衰老或过量的细胞质物质如细胞器和长寿蛋白^[9]。基础自噬对于维持细胞稳态至关重要,而过度的自噬活动会加剧心脏肥大,并可能导致心力衰竭的发生^[1]。抑制过度的自噬活动已成为一种新颖且有前景的治疗心肌肥大策略^[10-11]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)信号通路与自噬密切相关。因此,本研究旨在探究活心丸是否通过作用于 MAPK 和 PI3K/Akt 信号通路调节自噬,进而抑制心肌肥大,为活心丸治疗心肌肥大及相关心血管疾病提供依据。

1 材料和方法

1.1 网络药理学分析

使用 TCMSP 数据库(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmspsearch.php>)和 BATMAN 数据库(<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman>)收集活心丸的主要活性成分和靶点。以口服生物利用度 $\geq 30\%$ 和类药性 ≥ 0.18 为条件,筛选 TCMSP 数据库中活心丸的活性成分;以 Score cutoff ≥ 39 为条件,筛选 BATMAN 数据库中活心丸动物药的活性成分。

从 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)和 OMIM 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)中筛选心肌肥大相关的靶点。使用 Venn 图获得活心丸活性成分和心肌肥大的交集靶点,利用 R 语言进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析,对 KEGG 通路富集分析前 30 个条目进行可视化分析。

1.2 体内验证实验

1.2.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,6~8 周龄,体质量 180~220 g,购自广东省医学实验动物中心,动物合格证号 SCXK(粤)2018-0002。动物饲养于广州中医药大学中药学院动物实验室,温度(25 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度 60%~70%,人工 12 h 光/暗循环(8:00~20:00),动物喂食标准为大鼠标准饲料和无菌水。动物实验经广州中医药大学伦理委员会批准(批准号 ZYD-2021-074)。

1.2.2 药品与试剂 盐酸异丙肾上腺素(质量分数 99.0%,批号 C10935510)购自上海麦克林生化科技有限公司;普萘洛尔(批号 2020117)购自天津力生制药股份有限公司;活心丸(批号 1190002)购自广州白云山制药总厂;细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)抗体、磷酸化 ERK(phosphorylated ERK, p-ERK)抗体、Akt 抗体、p-Akt 抗体、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)抗体、p-

mTOR 抗体、微管相关蛋白 1 轻链 3B (microtubule associated protein 1 light chain 3B, LC3B) 抗体、 β -actin 抗体和 HPR 标记的二抗购自美国 Affinity 公司; BCA 蛋白定量测定试剂盒 (批号 BB20101) 购自贝博公司; 心房钠尿肽 (atrial natriuretic peptide, ANP)、脑钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒购自江苏酶免实业有限公司, 批号分别为 MM-21097R2、MM-0060M1、MM-0180R1、MM-0190R1。

1.2.3 仪器 Vevo 2100 型超高分辨率小动物超声实时影像系统 (加拿大 Visual Sonics 公司); D3024R 型高速冷冻离心机 (美国 Scilogex 公司); Eclipse Ci-L 型正置白光拍照显微镜 (日本 Nikon 公司); JJ-12J 型脱水机、RM2016 型切片机、JB-L5 型冻台 (武汉俊杰电子有限公司); JB-P5 型包埋机 (上海徕卡仪器有限公司)。

1.2.4 动物分组和造模 60 只 SD 大鼠适应性饲养 3 d, 随机分为对照组、模型组、普萘洛尔 (40 mg/kg) 组和活心丸低、中、高剂量 (12、24、48 mg/kg, 分别相当于 1、2、4 倍临床等效剂量) 组, 每组 10 只。模型组及各给药组 ip 盐酸异丙肾上腺素 (15 mg/kg), 对照组 ip 等体积 0.9% 氯化钠溶液, 1 次/d, 连续 7 d, 导致大鼠心肌梗大。造模成功后, 各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积 0.9% 氯化钠溶液, 1 次/d, 连续 14 d。

1.2.5 超声心动图检测 末次给药前禁食 24 h, 末次给药后, 大鼠吸入 4.5% 异氟烷气体进行麻醉, 前胸部剃毛备皮, 酒精棉球消毒。取胸骨旁左室短轴切面, 由二维超声引导 M 型曲线并进行测量。测量指标包括超声心动图图像、左心室前壁厚度和左心室后壁厚度。

1.2.6 血清中心肌肥大标志物 (ANP、BNP) 及炎症因子 (TNF- α 、IL-6) 水平的检测 大鼠 ip 戊巴比妥钠麻醉, 腹主动脉采血, 按照试剂盒说明书测定血清中 ANP、BNP、TNF- α 和 IL-6 水平。

1.2.7 脏器系数的测定 采血结束后, 迅速将大鼠心脏组织及胫骨取出, 以预冷的 PBS 溶液洗净, 吸水纸吸干后, 称定心脏质量, 测量胫骨长度, 计算心脏系数, 即心脏质量/体质量、左心室质量/体质量和心脏质量/胫骨长度。

1.2.8 心肌组织病理变化检测 心脏于 4% 多聚甲醛中固定, 留取左室心肌组织, 滤纸拭干, 快速剪

取左室心尖部心肌组织, 于 4% 多聚甲醛中固定, 经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后切片 (厚 4 μ m), 分别进行苏木素-伊红 (HE) 和 Masson 染色, 于显微镜下观察心脏病理变化。

1.2.9 免疫组化法检测心肌组织 LC3 蛋白表达情况 取心脏组织切片, 装片至载玻片, 于 40 $^{\circ}$ C 温水中放置, 捞出后于 37 $^{\circ}$ C 烘箱中晾干。载玻片依次浸入二甲苯、梯度乙醇中脱蜡 10 min, 水洗后, 加入 3% H_2O_2 封闭 10 min, 水洗 2 次, 柠檬酸缓冲液煮 3 min, 冷却至室温, 水洗 2 次, PBS 溶液浸泡 2 次, 每次 5 min。加入正常山羊血清, 于 37 $^{\circ}$ C 烘箱中封闭 30 min, 加入 LC3 抗体 (1:100), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 用 PBS 溶液洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 用 PBS 溶液洗涤后, 加入链霉亲和素-生物素复合物 (1:100), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 加入 DAB 显色, 并用苏木精复染。于光学显微镜下观察并拍照, 采用 Image-Pro plus 软件分析。

1.2.10 Western blotting 法检测心肌组织 ERK、p-ERK、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、LC3B 蛋白表达情况 取大鼠左心室心脏组织, 加入含 1% PMSF 的裂解液后, 4 $^{\circ}$ C、14 000 r/min 离心 15 min, 取上清液。采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行定量, 加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液, 煮沸使蛋白变性, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入无蛋白快速封闭液溶液封闭, TBST 洗脱 5 次, 每次 5 min, 分别加入 ERK、p-ERK、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、LC3B 和 β -actin 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入二抗, 室温孵育 1 h, 加入 ECL 显色剂显影, 采用 Image 软件对蛋白条带进行灰度分析。

1.2.11 统计学分析 采用 SPSS 24.0.0 软件对实验数据进行统计学分析处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差 (One way ANOVA) 分析, 满足方差齐性则用 LSD 分析, 若不满足方差齐性则用 Dunnett T3 分析。

2 结果

2.1 网络药理学分析

活心丸活性成分和心肌肥大共有 161 个交集靶点, 选择前 30 条显著富集的 KEGG 通路, 如图 1 所示, 富集的通路包括糖尿病并发症中的晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGE) - AGE 受体 (receptor of AGEs, RAGE) 信号通路、流体剪切应力和动脉粥样硬化、脂质与动脉粥样硬

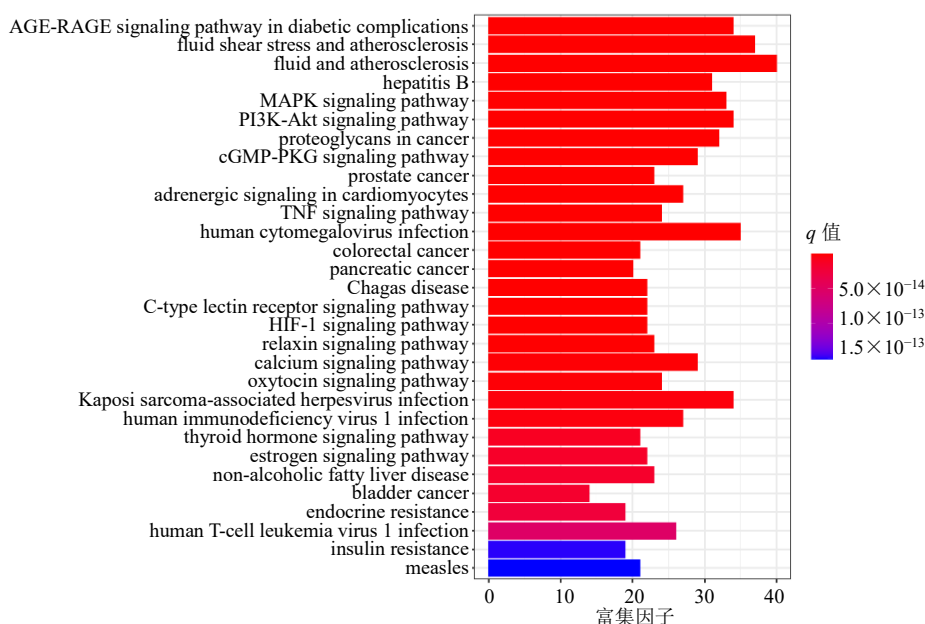


图 1 活心丸活性成分-心肌肥大交集靶点的 KEGG 通路富集分析 (前 30)

Fig. 1 KEGG pathway enrichment analysis of active components of Huoxin Pills-cardiac hypertrophy targets (top 30)

化、乙型肝炎、MAPK 信号通路和 PI3K/Akt 信号通路。MAPK 信号通路和 PI3K/Akt 信号通路作为自噬的上游信号通路，可以通过磷酸化多种底物，调控自噬。

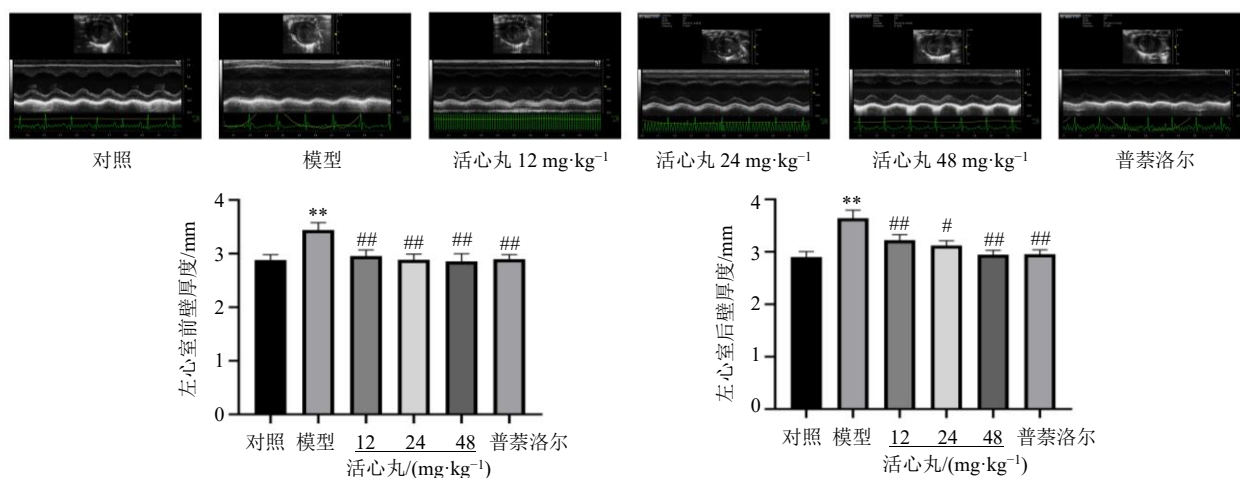
2.2 活心丸对心肌肥大大鼠超声心动图及心脏系数的影响

如图 2、3 所示，与对照组比较，模型组大鼠左心室前壁厚、左心室后壁厚、心脏质量/体质量、左心室质量/体质量和心脏质量/胫骨长度显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组相比，各给药组大鼠左心室前

壁、左心室后壁、心脏质量/体质量、左心室质量/体质量和心脏质量/胫骨长度显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

2.3 活心丸对心肌肥大大鼠血清中 ANP、BNP、TNF- α 和 IL-6 水平的影响

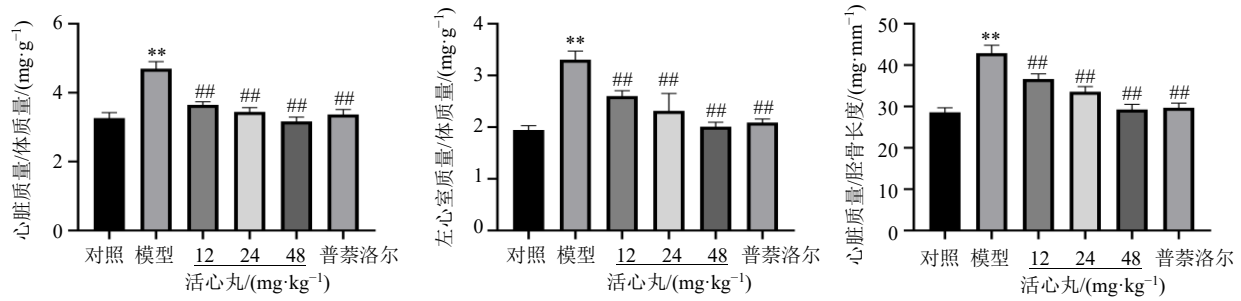
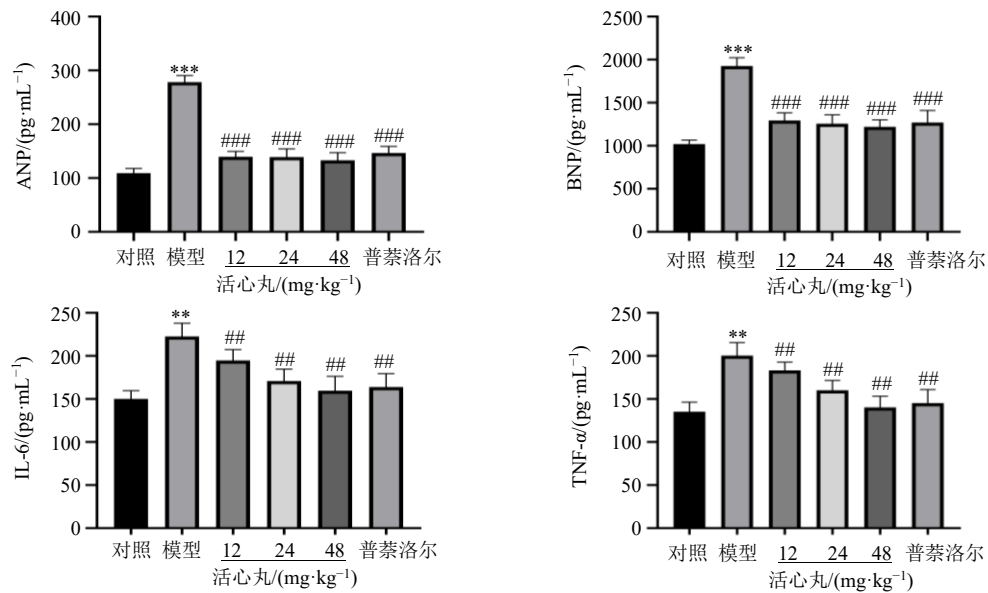
如图 4 所示，与对照组比较，模型组大鼠血清中 ANP、BNP、TNF- α 和 IL-6 水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)；与模型组相比，各给药组大鼠血清中 ANP、BNP、TNF- α 和 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。表明活心丸具有减轻心肌肥大的作用。



与对照组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ ；与模型组比较：# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ ，下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group, same as belows

图 2 活心丸对心肌肥大大鼠超声心动图的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

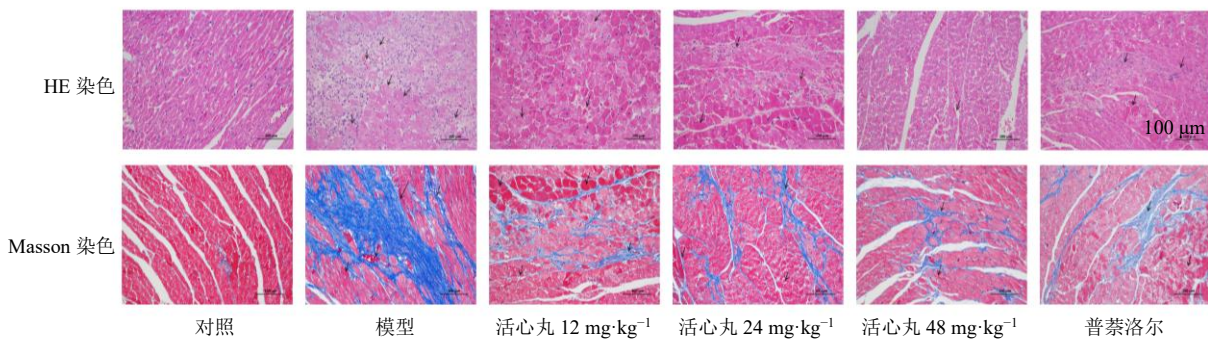
Fig. 2 Effect of Huoxin Pills on echocardiography in rats with cardiac hypertrophy ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

图 3 活心丸对心肌肥大大鼠心脏系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Fig. 3 Effect of Huoxin Pills on cardiac coefficient of cardiac hypertrophy in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)图 4 活心丸对心肌肥大大鼠血清中 ANP、BNP、IL-6 和 TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Fig. 4 Effect of Huoxin Pills on ANP, BNP, IL-6 and TNF- α levels in serum of cardiac hypertrophic rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.4 活心丸对心肌肥大大鼠心肌组织病理变化的影响

HE 染色 (图 5) 结果显示, 对照组大鼠心肌细胞排列有序, 细胞核在中心。模型组心肌细胞肥大,

呈方形, 细胞核被溶解, 细胞边界不清晰, 大量心肌细胞出现死亡。各给药组心肌细胞损伤减轻, 细胞核位置清晰, 坏死细胞较少。Masson 染色结果显示, 模型组心肌纤维化面积较对照组大, 各给药组



箭头表示心肌细胞损伤 (肥大、炎症浸润、心肌纤维化)

Arrows indicate cardiomyocyte damage (hypertrophy, inflammatory infiltration and myocardial fibrosis)

图 5 活心丸对心肌肥大大鼠心肌组织病理变化的影响 ($\times 200$)Fig. 5 Effect of Huoxin Pills on pathological changes of myocardium in rats with cardiac hypertrophy ($\times 200$)

心肌纤维化面积明显减少。以上结果表明活心丸可以改善盐酸异丙肾上腺素诱导的心肌肥大大鼠的心肌组织结构并减少心肌纤维化。

2.5 活心丸对心肌肥大大鼠心肌组织 LC3 蛋白表达的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠心肌组织 LC3 阳性表达增多 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 各给药组大鼠心肌组织 LC3 阳性表达减少 ($P < 0.01$ 、 0.001), 表明活心丸能够抑制心肌肥大大鼠心肌细胞自噬。

2.6 活心丸对心肌肥大大鼠心肌组织 ERK、p-ERK、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR 和 LC3 蛋白表达的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠心肌组织中 p-ERK/ERK、p-Akt/Akt 和 p-mTOR/mTOR

蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), LC3 II/LC3 I 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 各给药组大鼠心肌组织中 p-ERK/ERK、p-Akt/Akt 和 p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), LC3 II/LC3 I 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$)。表明活心丸对异丙肾上腺素诱导的心肌细胞过度自噬的抑制作用, 可能与激活 Akt/mTOR 和 ERK/mTOR 通路有关。

3 讨论

病理性心肌肥大是心血管发病率和死亡率增加的一种独立危险因素, 最终会发展成心力衰竭^[11-12]。心肌肥大的发病机制十分复杂, 越来越多的证据表明, 平衡自噬活动可以预防心脏肥大^[13]。自噬从低等真核生物到哺乳动物都是保守的, 是一种正常的生理降解机制。它是一种重要的分解代谢降解过程,

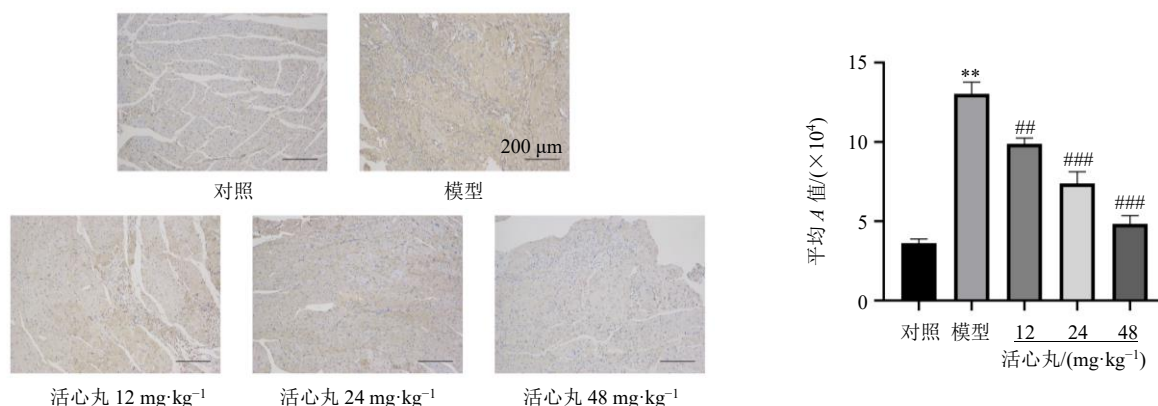


图 6 活心丸对心肌肥大大鼠心肌组织 LC3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of Huoxin Pills on LC3 protein expression in cardiac tissue of rats with cardiac hypertrophy ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

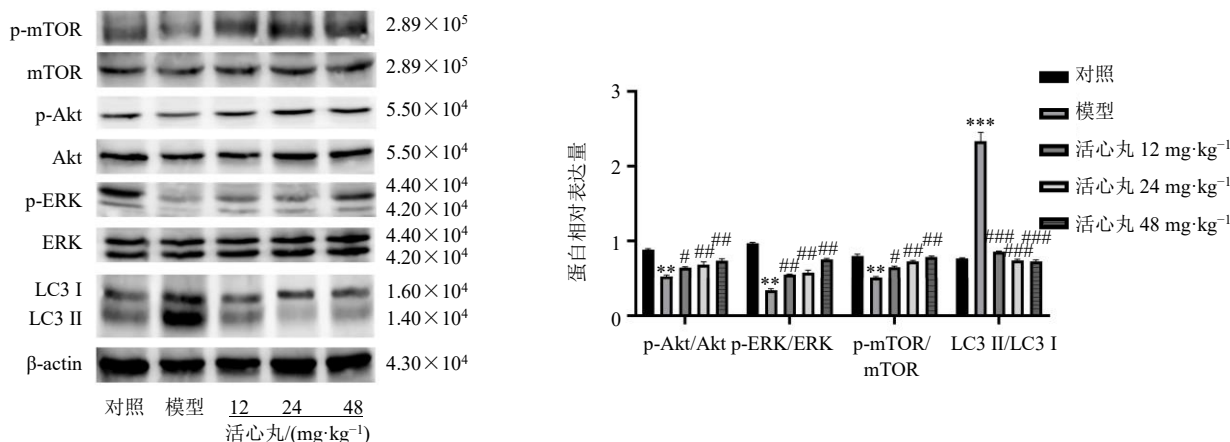


图 7 活心丸对心肌肥大大鼠心肌组织 ERK、p-ERK、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR 和 LC3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of Huoxin Pills on ERK, p-ERK, Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR and LC3 protein expressions in cardiac tissue of rats with cardiac hypertrophy ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

可消除多余蛋白质与细胞器,基础自噬在维持细胞稳态方面发挥重要作用^[9,14]。在横向主动脉缩窄诱导的心肌肥厚和心力衰竭小鼠模型中,心肌细胞中的自噬标志物显著减少,但在接下来的几周内随着心脏肥大的形成而增加^[15]。多种心肌肥厚动物模型中均出现自噬激活^[16-18]。调节自噬水平涉及 AMP 激活蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 通路、B 淋巴细胞瘤 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 蛋白家族和 mTOR 通路等多种信号通路^[14]。其中, mTOR 作为自噬的主要调节剂,对自噬的调节本质上也是生长与代谢之间的调节^[19]。因此,本研究主要基于 MAPK 和 PI3K/Akt 信号通路,探究活心丸调节自噬进而抑制心肌肥大的作用机制。

Akt 是将生长因子信号连接到下游通路的中心节点,与自噬诱导有关。在生长因子存在的情况下, Akt 磷酸化结节性硬化复合体 1/2 (tuberous sclerosis complex 1/2, TSC1/2)、富含脯氨酸 Akt1 底物蛋白 (proline-rich Akt1 substrate of 40 kDa, PRAS40)、糖原合成酶激酶 (glycose sythase kinase3, GSK3)、FoxO 等多种底物,导致这些蛋白质失活。相反,生长因子限制可能导致这些底物的激活,发生随后的自噬启动^[1,9]。ERK 会转移到细胞核并磷酸化多种底物包括环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (cyclic adenosine monophosphate response element binding protein, CREB) 和 Ets 样蛋白 1 (Ets-like protein 1, Elk1) 等转录因子,核靶标的激活或抑制均会导致细胞的生长、增殖以及死亡^[21]。本研究利用异丙肾上腺素造成大鼠心肌肥大,然后给予活心丸进行早期心肌肥大病症治疗。研究结果表明,活心丸可以显著降低大鼠心肌肥大程度和心肌纤维化,对心肌细胞有明显的保护作用,进一步防止由病理性心肌肥大发展为心力衰竭。网络药理学结果表明,活心丸可以通过作用于 MAPK 和 PI3K/Akt 信号通路发挥抗心肌肥大作用。PI3K/Akt 和 MAPK 通路均为 mTOR 的上游调节因子,能够通过激活 mTOR 信号通路抑制细胞自噬活动^[20]。本研究结果表明,活心丸可以上调心肌肥大大鼠心肌组织 p-ERK、p-Akt 蛋白表达水平,进而调控底物 p-mTOR 蛋白表达水平,下调心肌组织中 LC3 II 蛋白表达水平,从而抑制自噬,减轻心肌肥大。

综上所述,活心丸可以通过激活 Akt/mTOR 和 MAPK/ERK/mTOR 信号通路抑制自噬,从而调节病理性心脏肥大。同时,活心丸与自噬之间的相互作

用为减轻心肌肥大提供了新的策略,也证实了活心丸具有多靶点的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Tham Y K, Bernardo B C, Ooi J Y, *et al.* Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: Signaling pathways and novel therapeutic targets [J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(9): 1401-1438.
- [2] Heinzel F R, Hohendanner F, Jin G, *et al.* Myocardial hypertrophy and its role in heart failure with preserved ejection fraction [J]. *J Appl Physiol*, 2015, 119(10): 1233-1242.
- [3] Mervaala E, Biala A, Merasto S, *et al.* Metabolomics in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy [J]. *Hypertension*, 2010, 55(2): 508-515.
- [4] Frey N, Olson E N. Cardiac hypertrophy: The good, the bad, and the ugly [J]. *Annu Rev Physiol*, 2003, 65: 45-79.
- [5] Wang Y, Wang Q Y, Li C, *et al.* A review of Chinese herbal medicine for the treatment of chronic heart failure [J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(34): 5115-5124.
- [6] 阳成俊, 杨欢. 活心丸联合西药治疗对急性心肌梗死患者心功能的影响 [J]. *实用医技杂志*, 2020, 27(10): 1360-1362.
- [7] Peng M Z, Yang M L, Shen A L, *et al.* Huoxin pill attenuates cardiac fibrosis by suppressing TGF- β 1/Smad2/3 pathway in isoproterenol-induced heart failure rats [J]. *Chin J Integr Med*, 2021, 27(6): 424-431.
- [8] 闫思雨, 梁晓鹏, 陆培培, 等. 活心丸治疗冠心病临床应用特点探讨 [J]. *中国循环杂志*, 2018, 33(S1): 96-97.
- [9] Wu X Q, Liu Z M, Yu X Y, *et al.* Autophagy and cardiac diseases: Therapeutic potential of natural products [J]. *Med Res Rev*, 2021, 41(1): 314-341.
- [10] Guan P, Sun Z M, Wang N, *et al.* Resveratrol prevents chronic intermittent hypoxia-induced cardiac hypertrophy by targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Life Sci*, 2019, 233: 116748.
- [11] Fan C L, Tang X Y, Ye M N, *et al.* Qi-Li-Qiang-Xin alleviates isoproterenol-induced myocardial injury by inhibiting excessive autophagy via activating AKT/ mTOR pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1329.
- [12] Ambrosy A P, Fonarow G C, Butler J, *et al.* The global health and economic burden of hospitalizations for heart failure: Lessons learned from hospitalized heart failure registries [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63(12): 1123-1133.
- [13] Wang X J, Cui T X. Autophagy modulation: A potential therapeutic approach in cardiac hypertrophy [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017, 313(2): H304-H319.

- [14] Li L F, Xu J, He L, *et al.* The role of autophagy in cardiac hypertrophy [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2016, 48(6): 491-500.
- [15] Mariño G, Pietrocola F, Kong Y L, *et al.* Dimethyl α -ketoglutarate inhibits maladaptive autophagy in pressure overload-induced cardiomyopathy [J]. *Autophagy*, 2014, 10(5): 930-932.
- [16] Yang T R, Miao Y B, Zhang T, *et al.* Ginsenoside Rb1 inhibits autophagy through regulation of Rho/ROCK and PI3K/mTOR pathways in a pressure-overload heart failure rat model [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2018, 70(6): 830-838.
- [17] 陈广琴, 白法文, 洪钰杰. 黄芪多糖对腹主动脉缩窄大鼠心肌肥厚及自噬的影响 [J]. 广西医科大学学报, 2021, 38(7): 1369-1373.
- [18] Ucar A, Gupta S K, Fiedler J, *et al.* The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy [J]. *Nat Commun*, 2012, 3: 1078.
- [19] Kim Y C, Guan K L. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(1): 25-32.
- [20] Ba L N, Gao J Q, Chen Y P, *et al.* Allicin attenuates pathological cardiac hypertrophy by inhibiting autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK/mTOR signaling pathways [J]. *Phytomedicine*, 2019, 58: 152765.
- [21] Gallo S, Vitacolonna A, Bonzano A, *et al.* ERK: A key player in the pathophysiology of cardiac hypertrophy [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9): 2164.

[责任编辑 李亚楠]