

# 养心康片通过(Akt/AMPK)-mTOR通路抑制心梗后心力衰竭模型兔心肌细胞凋亡的机制

任培华\*, 王鹏, 廖东江, 李振球, 朱汉平, 胡素珍  
(广州医科大学附属第一医院, 广州 510120)

**[摘要]** 目的:观察养心康片通过[蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated kinase, AMPK)]-乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路对心梗后心力衰竭模型兔心肌细胞凋亡的影响。方法:应用结扎冠脉的方法建立心梗后心力衰竭兔模型,随机分为模型组,养心康组,AMPK 抑制剂组(10 mg·kg<sup>-1</sup> Compound C 腹腔注射,每日2次),Akt 抑制剂组(10 mg·kg<sup>-1</sup> casodex 灌胃,每日2次)和 mTOR 抑制剂组(0.5 mg·kg<sup>-1</sup> rapamycin 灌胃,每日2次),并设立正常组,每组5只,共30只。给予养心康片0.51 g·kg<sup>-1</sup>灌胃,每日1次,正常组和模型组给予等体积的蒸馏水灌胃,共4周。心脏彩超检测心功能,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测心肌 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)蛋白表达,原位末端凋亡法(TUNEL)检测心肌细胞凋亡。结果:与正常组比较,模型组的左室射血分数(LVEF)值降低( $P < 0.01$ ),Bcl-2,Bax 蛋白表达量增高( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),Bcl-2/Bax 降低( $P < 0.01$ ),心肌细胞凋亡率升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,养心康组的 LVEF 值升高( $P < 0.01$ ),Bax 蛋白表达量降低( $P < 0.01$ ),Bcl-2/Bax 升高( $P < 0.01$ ),心肌细胞凋亡率降低( $P < 0.01$ )。与抑制剂各组比较,养心康组的 LVEF 值升高( $P < 0.01$ ),Bcl-2/Bax 升高( $P < 0.01$ ),心肌细胞凋亡率降低( $P < 0.01$ )。结论:养心康片可通过干预(Akt/AMPK)-mTOR 通路调控心肌细胞 Bcl-2,Bax 蛋白表达水平减少心肌细胞凋亡,改善心梗后心衰模型的心脏功能。

**[关键词]** 养心康片;心力衰竭;蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) /腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated kinase, AMPK) -乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 通路;心功能;心肌细胞凋亡

**[中图分类号]** R22;R24;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)16-0124-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181533

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180516.0930.016.html>

**[网络出版时间]** 2018-05-17 14:14

## Mechanism of Yangxinkang Tablet in Inhibiting Cardiomyocyte Apoptosis in Rabbit with Heart Failure After Myocardial Infarction Through Akt/AMPK-mTOR Pathway

REN Pei-hua\*, WANG Peng, LIAO Dong-jiang, LI Zhen-qiu, ZHU Han-ping, HU Su-zhen  
(The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Yangxinkang tablet on cardiomyocyte apoptosis in rabbit with heart failure after myocardial infarction through protein kinase B (Akt) /AMP-activated kinase (AMPK) -the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. **Method:** The rabbit model of heart failure was established through ligation of coronary artery. A total of 30 experimental animals were randomly divided into model group, Yangxinkang group, AMPK inhibitor group (10 mg·kg<sup>-1</sup> Compound C, intraperitoneal injection, 2 times a day), Akt inhibitor group (10 mg·kg<sup>-1</sup> casodex, intragastric administration, 2 times a day) and mTOR inhibitor group (0.5 mg·kg<sup>-1</sup> rapamycin, intragastric administration, 2 times a day), and a blank control group was also set up,

**[收稿日期]** 20180208(004)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81673902);广州市教育局项目(1201411088);广东省中医药局项目(20142093)

**[通信作者]** \*任培华,博士,副教授,副主任医师,从事中医药防治心脑血管疾病临床研究工作,E-mail:dhyrph111hy@163.com

with 5 in each group. Yangxinkang tablet ( $0.51 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) were intragastrically administered once a day. Blank control group and experimental groups were given the equivalent volume of distilled water for 4 weeks. Heart function was detected by color Doppler ultrasound, Bcl-2 and Bax protein expressions were detected by Western blot, and cardiomyocyte apoptosis was detected by TdT-mediated DUTP nick end labeling (TUNEL). **Result:** Compared with the blank control group, the LVEF value of the model group decreased ( $P < 0.01$ ), the expressions of Bcl-2 and Bax protein increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the Bcl-2/Bax ratio decreased ( $P < 0.01$ ), and cardiomyocyte apoptosis rate was increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the LVEF value of the Yangxinkang group was increased ( $P < 0.01$ ), the expression of Bax protein was decreased ( $P < 0.01$ ), the Bcl-2/Bax ratio was increased ( $P < 0.01$ ), and the cardiomyocyte apoptosis rate was decreased ( $P < 0.01$ ). Compared with each inhibitor groups, the LVEF value of Yangxinkang group was increased ( $P < 0.01$ ), Bcl-2/Bax ratio was increased ( $P < 0.01$ ), and the cardiomyocyte apoptosis rate was decreased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Yangxinkang tablet can regulate the expressions of Bcl-2 and Bax protein in cardiac myocytes, reduce cardiomyocyte apoptosis through Akt/AMPK-mTOR pathway and improve the cardiac function of heart failure model after myocardial infarction.

[**Key words**] Yangxinkang tablet; heart failure; protein kinase B (Akt) /AMP-activated kinase (AMPK) -the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway; cardiac function; cardiomyocyte apoptosis

心力衰竭是各种心脏疾病的终末阶段,有研究结果显示,心衰的患病率约为 1.5% ~ 2.0%,65 岁以上可达 6% ~ 10%,心衰患者的病死率高,约有 50% 的患者在 5 年内死亡,心衰的远期预后不良<sup>[1-2]</sup>。心室重构是导致心力衰竭的重要机制之一<sup>[3]</sup>,心肌细胞凋亡是加重心室重构和心力衰竭的重要因素。研究显示细胞凋亡涉及心脏衰竭进程中的缺血、梗死、炎症和左心室功能障碍等多个环节,抑制心肌细胞凋亡是防治心力衰竭的重要途径<sup>[4]</sup>。研究发现乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路是调控细胞凋亡的重要通路,mTOR 主要受上游信号蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 和腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated kinase, AMPK) 的调控<sup>[5]</sup>。Akt 激活后可以通过激活 mTOR 抑制细胞凋亡。AMPK 激活后可下调 mTOR 活性促进细胞凋亡<sup>[6]</sup>。(Akt/AMPK)-mTOR 信号通路对细胞凋亡具有双向调节作用,干预 (Akt/AMPK)-mTOR 信号通路可能是抑制心肌细胞凋亡,防治心力衰竭的有效途径。

养心康片是本课题组运用中医药治疗慢性心力衰竭的经验总结,临床研究结果显示养心康治疗慢性心力衰竭的改善心功能的总有效率为 83.9%,改善临床症状的总有效率为 88.4%,疗效均优于对照组<sup>[7]</sup>。实验研究结果显示养心康可以改善心梗后心力衰竭模型的心功能、心脏指数、室壁厚度和心肌细胞凋亡指数,表明养心康可以抑制心梗后心衰模型的心肌细胞凋亡,改善心室重构<sup>[8]</sup>,但作用机制

尚不清楚。前期研究还发现,养心康能够升高心衰模型心肌细胞 ATP 含量,降低心肌细胞 AMP 含量,影响 AMP/ATP<sup>[9]</sup>。AMP/ATP 升高是激活 AMPK 的主要因素,而 (Akt/AMPK)-mTOR 信号通路是调控心肌细胞凋亡的重要途径,因此,养心康抑制心肌细胞凋亡的作用可能是通过调控 (Akt/AMPK)-mTOR 信号通路而实现的。本研究通过特异性阻断 (Akt/AMPK)-mTOR 信号通路观察养心康对心梗后心衰模型心功能、心肌细胞凋亡的影响,探讨本方的作用机制,为中医药防治心力衰竭提供新的思路。

## 1 材料

**1.1 动物** 实验动物为新西兰兔,雌雄各半,体重(2.5 ± 0.5) kg,共 30 只,由广州中医药大学实验中心提供,动物许可证号 SYXK(粤)2013-0085。实验方案经广州医科大学附属第一医院伦理委员会批准(编号 G201603-008),研究方案符合动物伦理的各项要求。

**1.2 药物及试剂** 养心康片(心阴片)由广州中医药大学第一附属医院提供(0.25 g/片;批准文号粤药制字 Z20071178,批号 20170503)。信号通路干预药物:AMPK 抑制剂 Compound C, Akt 抑制剂 Casodex, mTOR 抑制剂 Rapamycin(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号分别为 F1503029, H1504074, J1529028)。AMPK,磷酸化-AMPK (p-AMPK),Akt, p-Akt,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 253219, 253516, 292003, 406019, 406532);

mTOR, p-mTOR, B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)抗体[艾博抗(上海)贸易有限公司,批号分别为 GR160211-3, GR112975, GR151406-18, GR241557],原位末端凋亡法(TUNEL)细胞凋亡原位检测试剂盒[普洛麦格(北京)生物技术有限公司,批号 0000160840]。

**1.3 仪器** Sonix Touch 型彩色多普勒超声诊断仪(加拿大超声医疗技术有限公司);EPS200 型电泳仪(Tanon 公司);101-510-001 型转膜仪(北京百晶生物技术有限公司);UP-250 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝公司);RM2016 型病理切片仪(上海徕卡仪器有限公司);G3250DeadEnd™ 型荧光测定 TUNEL 系统(Promega 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组、造模** 实验前适应性饲养 3 d,参照 Mauric 方法<sup>[10]</sup>通过结扎冠状动脉复制心肌梗死动物模型,10%水合氯醛按照  $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量于兔耳缘静脉注射麻醉,开胸暴露心包,在肺动脉圆锥与左心耳交界处向下 3~5 mm 处用 5-0 线结扎走行于前室间沟内冠状动脉左前降支,双线结扎。肉眼观察结扎远端心室壁苍白,室壁运动减弱或矛盾运动,动态心电图监测 ST 段抬高,判断为建模成功。关闭胸腔,逐层缝合肌肉及皮肤,无菌纱布包扎伤口,术后每天肌注青霉素 20 万 U 预防感染,连续注射 3 d。造模成功后,随机分成模型组,养心康组,AMPK 抑制剂组,Akt 抑制剂组和 mTOR 抑制剂组。并设立正常组,正常组只开胸,预置缝线后不结扎冠脉。每组 5 只,共 30 只。

**2.2 给药方法** 造模后 3 d 开始给药,养心康组给予养心康片  $0.51 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,AMPK 抑制剂组给予养心康片  $0.51 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃 + Compound C  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  腹腔注射(每日 2 次);Akt 抑制剂组每日给予养心康片  $0.51 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃 + casodex  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃(每日 2 次);mTOR 抑制剂组给予养心康片  $0.51 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  + rapamycin  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃(每日 2 次)。将养心康片研磨成粉后加蒸馏水溶解,配成 15 mL 的溶液,每天 1 次灌胃。正常组和模型组给予等体积的蒸馏水灌胃。共 4 周。

**2.3 心脏彩超检测** 实验结束后行心脏彩超检测,探头频率为 1~5 MHz。测量左室射血分数(LVEF),左室短轴缩短率(LVFS)和左室舒张末容积(LVEDV),以上数据均测量 3 个心动周期取平均值。

**2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达** 采用 Western blot 法检测心肌细胞 AMPK $\alpha$ ,

p-AMPK $\alpha$ , Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR, Bax, Bcl-2 的蛋白表达。收集心肌细胞蛋白后,采用聚丙烯酰胺凝胶测目的蛋白,经 SDS-PAGE 电泳后将蛋白转至 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶封闭后,加入相应的一抗:AMPK $\alpha$ , p-AMPK $\alpha$ , Akt, p-Akt, p-mTOR, Bax, Bcl-2 (1:1 000),mTOR (1:2 000),4 ℃ 孵育过夜后,用 TBST 每次 7 min 洗 2 次后,用相应稀释好的二抗(HRP 标记二抗,1:3 000, Forevergen)室温下孵育 1~2 h 后,用 TBST 每次 7 min 洗 3 次后,进行化学发光显影(ECL, Forevergen)。用 Image J 分析目标条带的灰度值。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参照,将正常组目的条带的相对表达量标准化为 1,计算其他各组的相对表达量。

**2.5 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡** 取左心室肌切成  $0.5 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$  的小块,用 4%多聚甲醛磷酸固定,常规脱水、浸蜡、包埋,切片,荧光镜下观察细胞凋亡情况。蓝色点状荧光为核染色,绿色点状荧光为非特异或特异的凋亡细胞核,统计每个视野内凋亡细胞核数和总细胞核数,计算凋亡率。

**2.6 统计学处理** 数据统计采用 SPSS 19.0 软件,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,统计方法应用单因素方差分析。方差齐时,采用 LSD 法;方差不齐时,采用 Tamhane' T2 法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对心力衰竭兔心功能的影响** 与正常组比较,模型组的 LVEDV 值显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,养心康组的 LVEDV 值较模型组降低,其间差别有显著统计学意义( $P < 0.01$ )。养心康组的 LVEDV 值与 AMPK 抑制剂组, Akt 抑制剂组和 mTOR 抑制剂组比较均有降低,其间的差别均具有统计学意义( $P < 0.01$ )。与正常组比较,模型组 LVEF, LVFS 值显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,养心康组显著升高( $P < 0.01$ )。养心康组的 LVEF, LVFS 值较 AMPK 抑制剂组, Akt 抑制剂组和 mTOR 抑制剂组均有升高,其间差别均具有显著统计学意义( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 1。

**3.2 对心力衰竭兔 AMPK, p-AMPK 蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组的 AMPK, p-AMPK 蛋白表达量显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,养心康组及各抑制剂组 p-AMPK 蛋白显著降低,而仅有 AMPK 抑制剂组 AMPK 蛋白显著降低( $P < 0.01$ )。养心康组的 p-AMPK 蛋白表达量较 Akt 抑制剂组、mTOR 抑制剂组降低,较 AMPK 抑制剂组增高明显( $P < 0.01$ )。见图 1,表 2。

表 1 养心康片对心力衰竭兔 LVEDV, LVEF, LVFS 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 1 Effect of Yangxinkang tablet on LVEDV, LVEF and LVFS in rabbits with heart failure ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	LVEDV/mL	LVEF/%	LVFS/%
正常	-	3.01 ± 0.32 <sup>2)</sup>	78.82 ± 2.55 <sup>2)</sup>	49.16 ± 2.73 <sup>2)</sup>
模型	-	4.68 ± 0.16	59.67 ± 2.50	35.25 ± 2.30
养心康	0.51	3.95 ± 0.16 <sup>2)</sup>	71.01 ± 2.21 <sup>2)</sup>	42.23 ± 2.88 <sup>2)</sup>
AMPK 抑制剂	0.01 + 0.51	4.48 ± 0.25 <sup>4)</sup>	62.62 ± 2.83 <sup>4)</sup>	37.55 ± 2.47 <sup>2,4)</sup>
Akt 抑制剂	0.01 + 0.51	4.35 ± 0.17 <sup>2,4)</sup>	63.06 ± 1.99 <sup>1,4)</sup>	35.50 ± 2.01 <sup>4)</sup>
mTOR 抑制剂	5 × 10 <sup>-4</sup> + 0.51	4.51 ± 0.18 <sup>4)</sup>	64.81 ± 3.20 <sup>2,4)</sup>	38.62 ± 1.56 <sup>1,3)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> P < 0.05, <sup>2)</sup> P < 0.01;与养心康组比较<sup>3)</sup> P < 0.05, <sup>4)</sup> P < 0.01(表 2~6 同)。

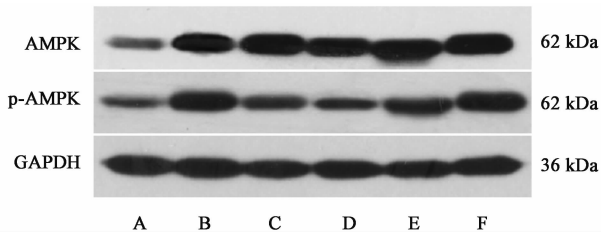


图 1 兔心肌细胞 AMPK, p-AMPK 蛋白表达电泳

Fig. 1 AMPK and p-AMPK protein expression of cardiomyocytes in rabbits with each group

表 2 养心康片对心力衰竭兔心肌细胞 AMPK, p-AMPK 蛋白的相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of Yangxinkang tablet on relative expression of AMPK and p-AMPK protein of cardiomyocytes in rabbits with heart failure ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	AMPK/GAPDH	p-AMPK/GAPDH
正常	-	1.00 <sup>2,4)</sup>	1.00 <sup>2,4)</sup>
模型	-	3.36 ± 0.09	2.73 ± 0.10
养心康	0.51	3.39 ± 0.19	1.91 ± 0.06 <sup>2)</sup>
AMPK 抑制剂	0.01 + 0.51	2.82 ± 0.07 <sup>2,4)</sup>	1.46 ± 0.07 <sup>2,4)</sup>
Akt 抑制剂	0.01 + 0.51	3.48 ± 0.06	2.25 ± 0.06 <sup>2,4)</sup>
mTOR 抑制剂	5 × 10 <sup>-4</sup> + 0.51	3.38 ± 0.12	2.64 ± 0.07 <sup>4)</sup>

### 3.3 对心力衰竭兔 Akt, p-Akt 蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组 p-Akt 蛋白表达量显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,养心康组及各抑制剂组 p-Akt 蛋白显著降低,而仅有 AMPK 抑制剂组 Akt 蛋白显著降低 ( $P < 0.01$ ),养心康组的 p-Akt 蛋白表达量较与 AMPK 抑制剂组, Akt 抑制剂组, mTOR 抑制剂组均有升高,其间差别均具有显著统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见图 2,表 3。

### 3.4 对心力衰竭兔 mTOR, p-mTOR 蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组 mTOR, p-mTOR 蛋白表达均显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,养心康组, Akt 抑制剂组, mTOR 抑制剂组 p-mTOR 蛋白表

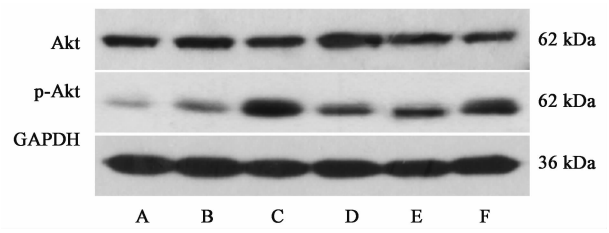


图 2 各组兔心肌细胞 Akt, p-Akt 蛋白表达电泳

Fig. 2 Akt and p-Akt protein expression of cardiomyocytes in rabbits with each group

表 3 养心康片对心力衰竭兔心肌细胞 Akt, p-Akt 蛋白的相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of Yangxinkang tablet on relative expression of Akt and p-Akt protein of cardiomyocytes in rabbits with heart failure ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Akt/GAPDH	p-Akt/GAPDH
正常	-	1.00	1.00 <sup>2,4)</sup>
模型	-	1.15 ± 0.02	2.54 ± 0.07
养心康	0.51	1.18 ± 0.03	6.35 ± 0.10 <sup>2)</sup>
AMPK 抑制剂	0.01 + 0.51	1.37 ± 0.05 <sup>2,4)</sup>	3.64 ± 0.07 <sup>2,4)</sup>
Akt 抑制剂	0.01 + 0.51	1.09 ± 0.04	3.32 ± 0.04 <sup>2,4)</sup>
mTOR 抑制剂	5 × 10 <sup>-4</sup> + 0.51	1.09 ± 0.02	4.74 ± 0.07 <sup>2,4)</sup>

达显著降低,而仅有 mTOR 抑制剂组 mTOR 蛋白明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ );养心康组的 p-mTOR 的蛋白表达量较 Akt 抑制剂组, mTOR 抑制剂组升高,其间差别具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见图 3,表 4。

### 3.5 对心力衰竭兔 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组 Bcl-2, Bax 蛋白表达明显升高, Bcl-2/Bax 明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ );与模型组比较,养心康组 Bcl-2 蛋白差别无统计学意义, AMPK 抑制剂组和 Akt 抑制剂组明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),养心康组及 AMPK 抑制剂组 Bax 蛋白明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。养心康组的

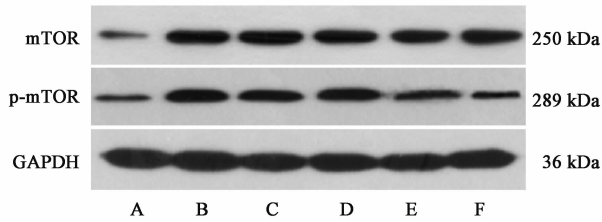


图 3 各组兔心肌细胞 mTOR, p-mTOR 蛋白表达电泳  
Fig. 3 mTOR and p-mTOR protein expression of cardiomyocytes in rabbits with each group

表 4 养心康片对心力衰竭兔心肌细胞 mTOR, p-mTOR 蛋白的相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of Yangxinkang tablet on relative expression of mTOR and p-mTOR protein of cardiomyocytes in rabbits with heart failure ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	mTOR/GAPDH	p-mTOR/GAPDH
正常	-	1.00 <sup>4)</sup>	1.00 <sup>4)</sup>
模型	-	3.75 ± 0.07	2.63 ± 0.02
养心康	0.51	3.86 ± 0.06	2.18 ± 0.03 <sup>2)</sup>
AMPK 抑制剂	0.01 + 0.51	3.64 ± 0.07	2.47 ± 0.06
Akt 抑制剂	0.01 + 0.51	3.43 ± 0.04 <sup>3)</sup>	1.52 ± 0.04 <sup>2,4)</sup>
mTOR 抑制剂	5 × 10 <sup>-4</sup> + 0.51	3.18 ± 0.04 <sup>1,4)</sup>	1.19 ± 0.04 <sup>2,4)</sup>

Bcl-2/Bax 最高,与其他各组比较差别均具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见图 4,表 5。

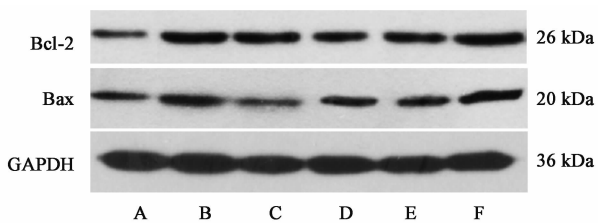


图 4 各组兔心肌 Bcl-2, Bax 蛋白表达电泳  
Fig. 4 Bcl-2 and Bax protein expression of cardiomyocytes in rabbits with each group

**3.6 对心力衰竭兔心肌细胞凋亡的影响** 与正常组比较,模型组的心肌细胞凋亡率显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,养心康组,AMPK 抑制剂组和 Akt 抑制剂组显著降低 ( $P < 0.01$ )。养心康组的心肌细胞凋亡率较 AMPK 抑制剂组, Akt 抑制剂组和 mTOR 抑制剂组均有降低,其间差别均有显著统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见图 5,表 6。

#### 4 讨论

慢性心力衰竭是多种心脏疾病的终末阶段,是严重威胁我国人民生命健康的疾病之一。心衰患者的 5 年死亡率达到 50%,ACEI 和  $\beta$  受体拮抗剂在

表 5 养心康片对心力衰竭兔心肌 Bcl-2, Bax 蛋白的相对表达量及 Bcl-2/Bax 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of Yangxinkang tablet on relative expression of Bcl-2, Bax protein and Bcl-2/Bax ratio of cardiomyocytes in rabbits with heart failure ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Bcl-2 /GAPDH	Bax /GAPDH	Bcl-2 /Bax
正常	-	1.00 <sup>1)</sup>	1.00 <sup>2)</sup>	1.00 <sup>4)</sup>
模型	-	1.41 ± 0.02	1.62 ± 0.03	0.87 ± 0.02
养心康	0.51	1.49 ± 0.04	1.23 ± 0.04 <sup>2)</sup>	1.21 ± 0.05 <sup>2)</sup>
AMPK 抑制剂	0.01 + 0.51	1.15 ± 0.02 <sup>2,4)</sup>	1.40 ± 0.03 <sup>1)</sup>	0.82 ± 0.03 <sup>4)</sup>
Akt 抑制剂	0.01 + 0.51	1.25 ± 0.03 <sup>1,3)</sup>	1.48 ± 0.04 <sup>3)</sup>	0.85 ± 0.03 <sup>4)</sup>
mTOR 抑制剂	5 × 10 <sup>-4</sup> + 0.51	1.39 ± 0.02	1.59 ± 0.04 <sup>4)</sup>	0.87 ± 0.02 <sup>4)</sup>

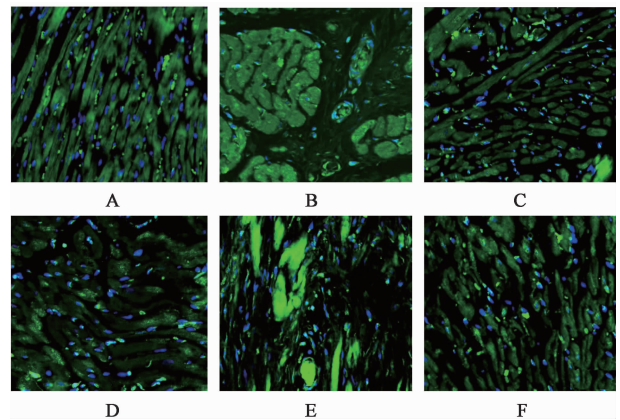


图 5 养心康片对心力衰竭兔心肌细胞凋亡的影响 (TUNEL, × 200)  
Fig. 5 Effect of Yangxinkang tablet on cardiomyocyte apoptosis in rabbits with heart failure (TUNEL, × 200)

表 6 养心康片对心力衰竭兔心肌细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
Table 6 Effect of Yangxinkang tablet on cardiomyocyte apoptosis rate in rabbits with heart failure ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	凋亡率/%
正常	-	4.4 ± 1.14 <sup>2)</sup>
模型	-	26.0 ± 1.22
养心康	0.51	17.8 ± 1.48 <sup>2)</sup>
AMPK 抑制剂	0.01 + 0.51	21.4 ± 1.14 <sup>2,4)</sup>
Akt 抑制剂	0.01 + 0.51	22.2 ± 0.83 <sup>2,4)</sup>
mTOR 抑制剂	5 × 10 <sup>-4</sup> + 0.51	23.4 ± 1.14 <sup>4)</sup>

心衰治疗中的规范化应用使心衰的预后有所改善,但目前的治疗方案仍无法改变其高发病率、高死亡率现状,心衰的远期预后不良<sup>[11-12]</sup>。心室重构是导致心力衰竭的重要机制之一<sup>[3]</sup>,心肌细胞凋亡是导致心室重构和心力衰竭的重要因素。在慢性心力衰竭发生、发展过程中所出现的多种因素,缺血,缺

氧,氧化应激,RAAS 系统激活,炎症因子分泌等均可引起心肌细胞凋亡<sup>[13-14]</sup>。细胞凋亡使心肌细胞大量丢失,如不能打断这进程,必然会导致心力衰竭进行性加重,因此,有效控制心肌细胞凋亡是防治心力衰竭的重要途径。心肌细胞凋亡受到多种蛋白因子调控,其中 Bcl-2 家族蛋白在心肌细胞凋亡的调控起着重要作用。Bcl-2 家族蛋白主要由抗凋亡蛋白(如 Bcl-2, Bcl-xl 等)和促凋亡蛋白(如 Bax, Bad 等)组成,抗凋亡蛋白与促凋亡蛋白之间的相互作用是决定细胞凋亡的主要因素<sup>[15]</sup>。在一定条件下,Bax 蛋白在心肌细胞中表达增多,Bax/Bax 同源二聚体的数量增加,从而诱导细胞凋亡。如 Bcl-2 蛋白表达增多则可导致 Bax/Bax 二聚体解离,从而形成稳定的 Bcl-2/Bax 异源二聚体,从而有效拮抗 Bax 诱导的心肌细胞凋亡。mTOR 信号通路参与了细胞凋亡过程,在多种疾病的发生发展中起着重要作用<sup>[16]</sup>,有研究发现 mTOR 通路通过调控 Bcl-2 家族中抗凋亡因子的表达,在凋亡的线粒体损伤途径中发挥作用<sup>[17]</sup>。mTOR 是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,为磷脂酰肌醇激酶相关激酶蛋白家族成员。mTOR 主要受上游信号蛋白 Akt 和 AMPK 的调控。Akt 激活后可以通过两个途径激活 mTOR,起到抑制细胞凋亡的作用。AMPK 是缺血等饥饿状态下促进心肌细胞凋亡的重要因子,当细缺血、缺氧、肌肉收缩等导致腺嘌呤核苷-磷酸(AMP)/腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)增加时 AMPK 活化,激活的 AMPK 可通过可 TSC-1/TSC-2 复合物抑制 Rheb 活性,从而下调 mTOR 活性,抑制 Bad 的磷酸化失活,促进细胞凋亡<sup>[18]</sup>。(Akt/AMPK)-mTOR 信号通路对细胞凋亡具有双向调节作用,干预(Akt/AMPK)-mTOR 信号通路可能是调控心肌细胞凋亡的有效手段。

以冼绍祥为首的课题组经过长期的临床研究发现气阴两虚、血瘀水停是心衰的主要病机之一,在临床上运用养心康片治疗心衰取得了满意的疗效<sup>[7]</sup>。养心康片由人参、黄芪、麦冬、五味子、毛冬青等药物组成,具有益气养阴、活血利水的作用。实验研究结果<sup>[8,19]</sup>显示,养心康片可以改善心梗后心力衰竭模型心肌细胞的超微结构,降低模型的心脏指数、室壁厚度和心肌细胞凋亡指数,具有抑制心衰模型心肌细胞凋亡,改善心室重构的作用,但具体机制尚不清楚。前期研究发现<sup>[9]</sup>,养心康能够升高心衰模型心肌细胞腺嘌呤核苷三磷酸(ATP),二磷酸腺苷(ADP)含量,降低心肌细胞 AMP 含量,降低 AMP/

ATP,而 AMP/ATP 的增加是激活 AMPK 的重要条件,养心康可能通过调控(Akt/AMPK)-mTOR 信号通路抑制心肌细胞凋亡,从而起到改善心功能,改善心室重构的作用。本研究结果显示养心康组的心功能较模型组明显提高,细胞凋亡指数较模型组明显降低,养心康组的心肌细胞 p-AMPK 蛋白表达量较模型组降低,p-Akt 蛋白表达量较模型组升高。运用特异性(Akt/AMPK)-mTOR 信号通路阻断剂后,AMPK 抑制剂组的心肌细胞 AMPK,p-AMPK 蛋白表达均较养心康组降低,心肌细胞 Akt 蛋白表达较养心康组升高;Akt 抑制剂组的心肌细胞 p-AMPK 蛋白表达较养心康组升高,p-Akt 蛋白表达较养心康组降低;mTOR 抑制剂组的心肌细胞 mTOR,p-mTOR 蛋白表达均较养心康组降低,表明本研究所选用的阻断剂可有效抑制(Akt/AMPK)-mTOR 信号通路。信号通路抑制剂各组的心功能较养心康组降低,心肌细胞凋亡指数较养心康组增高,其效果与 Bcl-2/Bax 值呈正相关。以上研究结果显示养心康片具有改善心梗后心衰模型兔心功能,减少心肌细胞凋亡的作用,特异性阻断(Akt/AMPK)-mTOR 信号通路后,养心康片改善心功能、减少心肌细胞凋亡的作用降低,表明养心康片治疗心力衰竭的作用可能是通过干预(Akt/AMPK)-mTOR 信号通路调控心肌细胞 Bcl-2,Bax 蛋白表达水平,减少心肌细胞凋亡而实现的。

[参考文献]

- [1] Mancini D, Lietz K. Selection of cardiac transplantation candidates in 2010 [J]. Circulation, 2010, 122(2): 173-183.
- [2] Roger V L, Go A S, Lloyd-Jones D M, et al. Heart disease and stroke statistics--2012 update; a report from the American Heart Association [J]. Circulation, 2012, 125(1): e2-e220.
- [3] Fedak P W, Verma S, Weisel R D, et al. Cardiac remodeling and failure; from molecules to man [J]. Cardiovasc Pathol, 2005, 14(1): 1-11.
- [4] 赵欣梅, 张玉彬. 细胞凋亡与心力衰竭[J]. 药学研究, 2017, 36(8): 467-470.
- [5] Hansel D E, Platt E, Orloff M, et al. Mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates cellular proliferation and tumor growth in urothelial carcinoma [J]. Am J Pathol, 2010, 176(6): 3062-3072.
- [6] Hong-Brown L Q, Brown C R, Navaratnarajah M, et al. Activation of MPK/TSC2/PLD by alcohol regulates mTORC1 and mTORC2 assembly in C2C12 myocytes

- [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2013, 37: 1849-1861.
- [7] XIAN S X, YANG Z Q, REN P H, et al. Effect of Yangxinkang tablets (养心康片) on chronic heart failure; a multi-center randomized double-blind placebo-controlled trial[J]. Chin J Integr Med, 2015, 21(10): 733-742.
- [8] 任培华, 洗绍祥, 杨忠奇, 等. 养心康片对慢性心功能不全模型兔心功能 TNF- $\alpha$ , IL-6 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 237-240.
- [9] 周凤娇. 养心康片干预慢性心力衰竭心气虚证的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2008.
- [10] Mauric P Y, Marjorie B, Stuart M C. Comparison of *in vivo* and *in vitro* haemodynamic function in experimental heart failure; use of echocardiography [J]. Cardio Res, 1996, 31(6): 873-881.
- [11] Hunt S A. ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American college of cardiology/american heart association task force on practice guidelines (writing committee to update the 2001 guidelines for the evaluation and management of heart failure) [J]. J Am Coll Cardiol, 2005, 46(6): e1-e82.
- [12] 孙路路, 吕蓉, 梁涛, 等. 心力衰竭患者出院后1年内预后状况及影响因素分析[J]. 中国循环杂志, 2013, 28: 125-128.
- [13] Consili C, Gatta L, Iellamo F, et al. Severity of left ventricular dysfunction in heart failure patients affects the degree of serum-induced cardiomyocyte apoptosis. Importance of inflammatory response and metabolism [J]. Int J Cardiol, 2013, 167(6): 2859-2866.
- [14] 李梦婷, 彭成, 谢晓芳. 心力衰竭小型动物模型研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(5): 213-219.
- [15] Kumar P, Coltas I K, Kumar B, et al. Bel-2 protects endothelial cells against gamma-radiation via a Raf-MEK-ERK-survivin signaling pathway that is independent of cytochrome C release [J]. Cancer Res, 2007, 67(3): 1193-1202.
- [16] SUN Y W, HUANG W J, Hsiao C J, et al. Methoxychalcone induces cell-cycle arrest and apoptosis in human hormone-resistant prostate cancer cells through PI 3-kinase-independent inhibition of mTOR pathways [J]. Prostate, 2010, 70(12): 1295-1306.
- [17] YU C C, WU P J, Hsu J L, et al. Ardisianone, a natural benzoquinone, efficiently induces apoptosis in human hormone-refractory prostate cancers through mitochondrial damage stress and survivin downregulation [J]. Prostate, 2013, 73(2): 133-145.
- [18] Kimura N, Tokunaga C, Dalal S, et al. A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway [J]. Genes Cells, 2003, 8(1): 65-79.
- [19] 任培华, 洗绍祥, 孙敬河, 等. 养心康片对慢性心功能不全模型兔心肌细胞超微结构的影响[J]. 中国中医急症, 2012, 21(4): 550-554.

[责任编辑 周冰冰]