

· 药理 ·

气血并治方有效组分干预 H/R 损伤心肌细胞 AMPK 相关糖脂代谢通路的分析

于永慧¹, 张佩¹, 刘剑刚¹, 李澎², 张大武¹, 王承龙^{1*}

(1. 中国中医科学院西苑医院心血管病中心, 北京 100091;

2. 中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 北京 100091)

[摘要] 目的:观察气血并治方有效组分对缺氧/复氧(H/R)损伤心肌细胞一磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)相关糖脂代谢通路的作用机制。方法:分离、提取、培养出生1~2 d SD乳鼠原代心肌细胞,于常规倒置相差显微镜下观察原代心肌细胞形态及生长状态,经 α -横纹肌辅肌动蛋白(α -actinin)免疫荧光染色鉴定为心肌细胞后,进行缺氧3 h复氧2 h处理制作H/R损伤模型,随机分为正常组(正常氧),模型组(缺氧/复氧),曲美他嗪组(缺氧/复氧+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸曲美他嗪, TMZ),气血并治方有效组(缺氧/复氧+1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 气血并治方有效组分, CWQB)。采用实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)测定AMPK代表性亚基心肌一磷酸腺苷活化蛋白激酶 α (AMPK α),及其糖代谢通路中葡萄糖转运体4(GLUT4),磷酸果糖激酶2(PFK2),脂肪酸代谢通路中乙酰辅酶A羧化酶(ACC2),脂肪酸移位酶(FAT/CD36)的基因及蛋白表达情况。结果:与正常组比较,模型组, TMZ组, CWQB组的AMPK α , GLUT4, PFK2基因和蛋白表达上调, ACC2, FAT/CD36基因和蛋白表达下调($P < 0.05$);与模型组比较, TMZ组, CWQB组AMPK α , GLUT4, PFK2, ACC2, FAT/CD36基因和蛋白表达均上调($P < 0.05$),其中TMZ组上调AMPK α , FAT/CD36基因和蛋白,上调GLUT4, PFK2基因表达的效果更为显著($P < 0.05$)。结论:气血并治方有效组分可以激活H/R损伤心肌细胞的AMPK信号通路,增强GLUT4介导的葡萄糖转送, PFK2参与的糖酵解,同时促进FAT/CD36调控的脂肪酸转运,上调ACC2抑制脂肪酸氧化过程,进而提高缺氧/复氧条件下心肌细胞对葡萄糖、脂肪酸等产能底物的利用能力,改善H/R损伤心肌细胞的能量代谢。

[关键词] 气血并治方; 缺氧/复氧; 心肌细胞; 糖脂代谢; 一磷酸腺苷活化蛋白激酶

[中图分类号] R22; R24; R285.5; R289.5; R243 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)06-0089-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180695

AMPK Related Glucose Metabolism and Fatty Acid Oxidation Pathways in Hypoxia/Reoxygenation Myocardial Cells: Intervened by Qixue Bingzhi Recipe

YU Yong-hui¹, ZHANG Pei¹, LIU Jian-gang¹, LI Peng², ZHANG Da-wu¹, WANG Cheng-long^{1*}

(1. Center for Cardiovascular Diseases, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China; 2. Institute of Basic Medical Sciences, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the action mechanism of components of water extract from Qixue Bingzhi recipe (CWQB) for adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) related glucose metabolism and fatty acid oxidation pathways in hypoxia/reoxygenation (H/R) myocardial cells. **Method:** The myocardial cells from 1-2 d newborn SD rats were separated and extracted. Morphology of primary cardiacmyocyte under different duration of culture was observed by an optical microscope. After α -actinin immunofluorescence

[收稿日期] 20170913(022)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81273934)

[第一作者] 于永慧, 博士, 住院医师, 从事中西医结合心血管疾病研究, Tel:010-62835629, E-mail: yu_yonghui@126.com

[通信作者] *王承龙, 教授、博士生导师, 主任医师, 从事中西医结合治疗心血管疾病研究, Tel:010-62835903, E-mail: wcl796@163.com

identified cardiomyocytes, the H/R models were made by depriving oxygen for 3 hours and then regaining oxygen for 2 hours. Then the cardiomyocytes were randomly divided into four groups: control group (with normal oxygen), H/R group (the H/R model), trimetazidine (TMZ) group, and CWQB group. The H/R cardiomyocytes in TMZ group were treated by TMZ $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; H/R cardiomyocytes in CWQB group were treated by CWQB $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Finally, the mRNA and protein expressions of adenosine monophosphate activated protein kinase- α (AMPK α) together with its related glucose metabolism pathway including glucose transporter4 (GLUT4) and phosphate fructose kinase 2 (PFK2), fatty acid metabolism pathway including fatty acid translocase/CD36 (FAT/CD36) and acetyl-CoA carboxylase 2 (ACC2) were figured out by Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot. **Result:** As compared with the control group, both mRNA and protein expressions of AMPK α , GLUT4, PFK2 were increased, while ACC2, FAT/CD36 mRNA and protein expressions were decreased in H/R group, TMZ group, and CWQB group ($P < 0.05$). As compared with H/R group, the mRNA and protein expressions of AMPK α , GLUT4, PFK2, ACC2 and FAT/CD36 were increased significantly in TMZ group and CWQB group ($P < 0.05$). By the way, the up-regulation of mRNA and protein expressions of AMPK α and FAT/CD36, as well as mRNA expressions of GLUT4 and PFK2 in TMZ group were more obvious than those in CWQB group ($P < 0.05$). **Conclusion:** CWQB can activate the AMPK pathway in H/R cardiomyocytes, enhance glucose transport mediated by GLUT4 and glycolysis mediated by PFK2, promote the absorption of fatty acid adjusted by FAT/CD36, and inhibit its oxidation by up-regulating ACC2. Therefore, CWQB recipe can improve the utilization of energy materials in myocardial cells under H/R situation, and then optimize the energy metabolism to prevent damages caused by energy deficiency.

[**Key words**] Qixue Bingzhi recipe (CWQB); hypoxia/reoxygenation (H/R); cardiomyocytes; glucose metabolism and fatty acid oxidation; adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK)

能量代谢是维持心脏正常舒缩功能的重要动力来源,任何导致能量供应不足、消耗过多、利用障碍的因素都会影响心肌功能,导致缺血性心脏病,甚至发生心力衰竭。心肌缺血缺氧时,作为心肌能量生成主要底物来源——葡萄糖、脂肪酸、氨基酸等的氧化产能过程受到不同程度的抑制^[1],引起一磷酸腺苷(AMP)浓度上升、三磷酸腺苷(ATP)浓度下降,继而激活具有“代谢感受器”之称的一磷酸腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)^[2]。AMPK可以通过促进细胞内葡萄糖转运体4(GLUT4)移位到胞膜加强葡萄糖转移和运送,同时激活糖酵解途径中的主要调控子磷酸果糖激酶2(PFK2)直接活化糖酵解;AMPK还可以使乙酰辅酶A羧化酶2(ACC2)苏氨酸残基磷酸化后失活,减少了丙二酰CoA对肉碱脂酰转移酶I的抑制作用,并且促进脂肪酸移位酶(FAT/CD36)介导的心肌细胞对脂肪酸的吸取,使脂肪酸氧化增加^[3]。AMPK激活葡萄糖、脂肪酸相关能量代谢通路的作用已成为调控缺血心肌能量代谢的主要机制和治疗靶点^[4]。

气血并治方是由传统化痰名方——血府逐瘀汤化裁而来,为中国中医科学院西苑医院治疗动脉粥样硬化等心血管疾病的有效院内制剂,具有活血

理气之功效,已申请国家专利^[5]。现代药理研究表明,其全方提取物具有降低血脂、改善血液流变、保护内皮功能、减轻炎症反应等心血管保护作用^[6-7]。本实验首次从改善心肌能量代谢的角度研究其对缺血心肌保护作用的分子机制。研究发现,缺氧/复氧发生时伴有心肌能量代谢水平的下降,表现为三磷酸腺苷等直接供能物质的减少。活血中药等有效成分及配伍可以通过影响葡萄糖和脂肪酸氧化,提高三磷酸腺苷的含量,改善心肌能量代谢^[8-10],从而治疗缺血性心脏病,但对其是否与AMPK相关代谢信号通路相关目前尚缺乏研究。本实验将观察气血并治方有效组分干预缺氧/复氧心肌细胞AMPK相关糖代谢通路(AMPK/GLUT4/PFK2),脂肪酸代谢通路(AMPK/FAT/CD36/ACC2)的蛋白及基因表达情况,为临床应用气血并治方改善缺血心肌能量代谢提供上游依据。

1 材料

1.1 动物 出生1~2d的SD乳鼠,雄性,清洁级,体质量16~18g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2012-0001。本实验符合北京实验动物福利伦理审查指南的相关要求。

1.2 药物 气血并治方(由川芎、赤芍、桃仁、红

花、柴胡、枳壳按照 3:3:3:2:2 组成,全方水提取物有效组分由浙江大学药学院提供,主要成分为芍药苷、总黄酮、总糖、无机盐、总蛋白、总酸类物质,每克 CWQB 相当于含生药 33.16 g^[11];盐酸曲美他嗪(中国食品药品检定研究院,批号 100889-201302,约 100 mg/支)。

1.3 试剂 0.25% 胰蛋白酶,青霉素-链霉素,胎牛血清,高糖杜氏改良(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)培养基,无糖 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,批号分别为 25200056, 15140-122, 10099-144, C11995500BT, 11966025);脱氧核糖核酸酶(德国 Roche 公司,批号 104159);II 型胶原酶(美国 Sigma 公司,批号 17101015); α -横纹肌辅肌动蛋白(α -actinin)单克隆抗体,浓缩型 SABC-Dylight488 小鼠 IgG 免疫组化染色试剂盒(武汉 Boster 公司,批号分别为 BM003, SA1092);trizol 总 RNA 提取试剂(北京天根生化科技有限公司,批号 DP405-02);SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II, PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser, DL2000 DNA Marker(大连 TaKaRa 公司,批号分别为 RR82LR, RR047B, 3427Q);AMPK α 兔多克隆抗体, GLUT4 大鼠多克隆抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab3760, ab65267);PFK2 兔多克隆抗体(美国 CST 公司,批号 13123);ACC2 兔多克隆抗体(美国 Lsbio 公司,批号 LS-C11717);FAT/CD36 兔多克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号 ab133625);山羊抗兔 IgG(H+L) HRP 抗体,山羊抗小鼠 IgG(H+L) HRP 抗体(北京 TDY Biotech 公司,批号分别为 S004, BM003)。

1.4 仪器 AC2-4S1 型垂直流超净工作台(新加坡 Esco 公司);Forma 310 型 CO₂ 直热式培养箱(美国 Thermo Scientific 公司);KDC-140HR 型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);MultiSkán3 型酶标仪(美国 Thermo 公司);Mini P-4 型电泳槽(北京 Cavoy 公司);Mini-PROTEAN Tetra 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);QL-902 型涡旋振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);NANODROP 2000 型分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司);Tanon 1600 型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);ABI7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 原代心肌细胞的分离、提取、培养 出生 1~2 d 的雄性 SD 乳鼠 12 只,脱臼处死,75% 乙醇浸泡

5 min。碘伏消毒胸腹部皮肤,用眼科剪剪开胸部皮肤及肋骨,暴露胸腔。弯镊摘取心脏,迅速放入含有普通肝素的磷酸盐缓冲液(PBS)中,挤出血液,剪掉心房及大动脉组织,PBS 清洗心脏数遍。用紧密贴合的双层刀片将心脏组织切碎成约 1 mm³ 大小的组织粒,移入 15 mL 离心管中,加入消化液(0.125% 胰蛋白酶 + 0.1% II 型胶原酶 + 0.05% DNA 酶)在 37 °C 条件下分次消化(第 1 次 50 min,以后每次 15~25 min,消化 3~5 次),收集除首次消化的细胞悬液,经离心后加入等体积含 10% 胎牛血清,1% 青、链霉素的高糖 DMEM 培养基终止消化,吹打均匀后经 200 目筛网过滤,置于 37 °C CO₂ 直热式培养箱中差速贴壁去除成纤维细胞,每次 30 min,共 2 次。将去除成纤维细胞、未贴壁的原代心肌细胞以 5 × 10⁵ 个/mL 的密度接种于 90 mm 培养皿中,加入 10% 胎牛血清,1% 青、链霉素的高糖 DMEM 培养基,置于 37 °C 培养箱中继续培养。24 h 后换液,取培养第 3~4 天的原代心肌细胞进行实验。

2.2 原代心肌细胞 H/R 损伤模型的建立 参照文献[12]方法,采用缺氧 3 h 复氧 2 h 制作原代心肌细胞 H/R 损伤模型,具体方法为向盛有无糖 DMEM 培养液的离心管中充入缺氧混合气体(95% N₂ + 5% CO₂)15 min,制作无糖无氧 DMEM 培养液。采用无糖 DMEM 培养液清洗细胞原有的培养液后更换为无氧无糖 DMEM 培养液,然后置于自制密闭盒中持续充入 95% N₂ + 5% CO₂ 混合气 15 min 以充分排尽密闭盒中的残余氧气,置于 37 °C 的 CO₂ 培养箱中孵育 3 h 后更换为复氧培养液(高糖 DMEM 培养液)培养 2 h。

2.3 实验分组及处理 取培养第 3~4 天的原代心肌细胞进行实验,分为①正常组:原代心肌细胞于 37 °C 的 CO₂ 培养箱中培养 3 h 后取出,换成复氧培养液继续培养 2 h,不加药物干预;②模型组:原代心肌细胞进行缺氧 3 h 复氧 2 h 处理,不加药物干预;③曲美他嗪 + H/R 组(TMZ):原代心肌细胞进行缺氧 3 h 和复氧 2 h 处理,缺氧培养液及复氧培养液中均加入浓度为 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TMZ;④气血并治方有效组分 + H/R 组(CWQB):原代心肌细胞进行缺氧 3 h 和复氧 2 h 处理,缺氧培养液及复氧培养液中均加入 1 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CWQB^[13]。

2.4 原代心肌细胞形态观察及纯度鉴定 在常规倒置相差显微镜下观察培养 0, 24, 48, 72 h, 以及缺氧 3 h, 缺氧 3 h 复氧 2 h 后原代心肌细胞的形态及

生长状况。另外,取培养 72 h 的原代心肌细胞,采用 α -actinin 免疫荧光染色法进行心肌细胞的纯度鉴定。具体方法为以多聚赖氨酸包被无菌盖玻片于 24 孔板中,将心肌细胞以 2×10^5 个/mL 的密度接种。细胞爬片 72 h 后弃上清,4% 多聚甲醛固定,经 3% H_2O_2 孵育,3% TritonX-100 打孔通透、山羊血清室温封闭后,滴加 1:100 的 α -actinin 抗体 4 $^{\circ}C$ 过夜,然后加入 1:100 的生物素标记羊抗小鼠 IgG 和 1:200 的 SABC-DyLight488 室温孵育 30 min,DAPI 染液进行核染,抗荧光淬灭封片液封片。最后在荧光显微镜下观察,染色阳性的为原代心肌细胞。

2.5 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 法测定 AMPK 相关基因表达 采用 trizol 总 RNA 提取试剂进行样本 RNA 提取,使用 NanoDrop[®] ND-2000 分光光度计测定 RNA 浓度和纯度。取 1.0 μg 总 RNA,按照 PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒操作进行 cDNA 反转录,以 GAPDH 为内参进行 PCR 扩增反应,引物由 Invitrogen 公司合成,引物设计见表 1。

表 1 AMPK 相关糖脂代谢通路基因引物序列
Table 1 Gene primer sequence of AMPK related glucose metabolism and fatty acid oxidation pathways

引物	序列(5'-3')	产物大小/bp
AMPK α	上游 CAACAAGCCCACCCGATTC	221
	下游 TGCTCTACACACTTCTGCCATGAT	
PFK2	上游 CGCAGATGAGTTGAAGTACT	167
	下游 TCCTTACAGGGTTTGGCTC	
GLUT4	上游 CCATCCCCTGGTTCATTGTG	137
	下游 ACCCATAGCATCCGCAACAT	
ACC2	上游 GGGACTTCAACCAGGAGCATC	121
	下游 AGACTGTCCAGATGTAGGCG	
FAT/CD36	上游 ATGAGACTGGGACCATCGGC	123
	下游 CAACAAACATGACTACTCCAACACC	
GAPDH	上游 CCTTCCGTGTTCTACCCC	131
	下游 GCCCAGGATGCCCTTTAGTG	

PCR 循环程序反应条件为 95 $^{\circ}C$, 30 s; 40 个 PCR 个循环,95 $^{\circ}C$, 5 s; 60 $^{\circ}C$, 40 s。扩增反应结束后,按(95 $^{\circ}C$, 10 s; 60 $^{\circ}C$, 60 s; 95 $^{\circ}C$, 15 s) 60 $^{\circ}C$ 缓慢加热到 99 $^{\circ}C$ 条件建立 PCR 产物的溶解曲线。用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测 RNA 完整性,并通过 Tanon1600 凝胶成像系统进行扩增产物的分析。以各样品目的基因和内参基因扩增条带的光强度比值来表示 mRNA 表达的相对量,结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对

定量公式计算。

2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 测定 AMPK 相关蛋白表达 细胞样品经 RIPA 进行蛋白抽提、调整浓度后,按 10 μL /孔加样进行检测,在 300 mA 恒流条件下转至 0.45 μm 孔径 NC 膜 (ACC2 转膜 2.5 h, PFK2, AMPK α , GLUT4, FAT/CD36 转膜 1 h), 封闭 30 min。将兔 AMPK α (1:5 000), 兔 PFK2 (1:5 000), 大鼠 GLUT4 (1:500), 兔 ACC2 (1:500), 兔 FAT/CD36 (1:2 000) 抗体室温孵育 10 min, 4 $^{\circ}C$ 过夜。二抗 [山羊抗兔 IgG (H+L) HRP 1:10 000, 山羊抗小鼠 IgG (H+L) HRP 1:10 000] 轻摇孵育 40 min, 洗膜后 ECL 放光检测蛋白,以各组目的条带与内参 GAPDH (1:20 000) 条带的灰度值比值来表示蛋白的相对表达量。

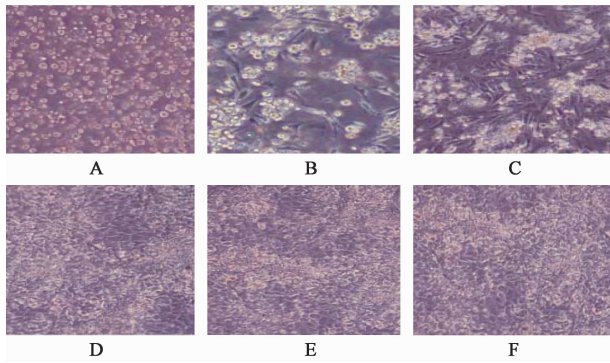
2.7 统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS 18.0 统计软件处理,进行正态分布、方差齐性检验,采用方差分析检验或非参数检验进行多组数据之间的比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同培养条件的原代心肌细胞形态变化 常规倒置显微镜下可见培养 0 h 的原代心肌细胞形态呈圆形或椭圆形,胞浆饱满,悬浮于培养液中;培养 24 h 后可见心肌细胞大部分贴壁,形态呈多角形或梭形,部分聚集成团,少量细胞开始微弱且不规则的搏动;培养 48 h 后可见大量心肌细胞聚集成团,出现节律性、同步性的搏动,搏动幅度更加有力;培养 72 h 后可见心肌细胞的伪足交织成网,细胞簇融合呈放射状态并出现稳定的收缩搏动。进行缺氧 3 h 及缺氧 3 h 复氧 2 h 造模后,心肌细胞形态尚无明显改变,但搏动力度减弱,部分细胞团的搏动欠规则。见图 1。

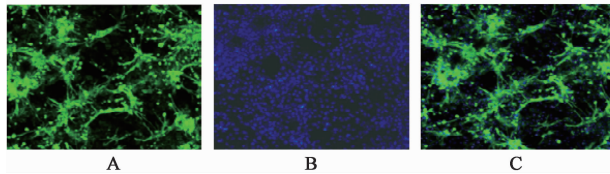
心肌细胞胞浆中的 α -actinin 可被特异性染成绿色,同时 DAPI 染色的细胞核呈蓝色;而胞浆不显绿色,仅胞核呈蓝色的为非心肌细胞。结果显示,此次实验中培养的 α -actinin 染色阳性的心肌细胞占总数的 95% 以上。见图 2。

3.2 CWQB 对 H/R 心肌细胞 AMPK 相关糖脂代谢通路基因表达的影响 各组 RNA 样品电泳条带清晰,未见核糖 RNA 带的弥散现象,表明 RNA 未被降解,其完整性良好,可以进行下一步实验。见图 3。与正常组比较,模型组, TMZ 组, CWQB 组的 AMPK α 基因表达上调 ($P < 0.05$), 与模型组比较, TMZ 组, CWQB 组 AMPK α 基因表达上调 ($P < 0.05$), 其中 TH 组 AMPK α 基因上调更为显著 ($P < 0.01$)。提示 H/R 使心肌细胞活化 AMPK α 基因上调, TMZ,



A. 培养 0 h; B. 培养 24 h; C. 培养 48 h; D. 培养 72 h; E. 缺氧 3 h; F. 缺氧 3 h 复氧 2 h

图 1 不同培养条件的原代心肌细胞形态变化 (光镜, $\times 100$)
Fig. 1 Morphology of primary cardiac myocyte under different duration of culture observed by optical microscope (light microscopy, $\times 100$)

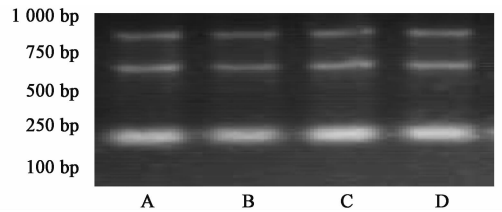


A. α -actinin 特异性染色的胞浆; B. DAPI 染色的细胞核; C. α -actinin 特异性染色与 DAPI 染色重叠

图 2 原代心肌细胞免疫染色情况 (免疫荧光, $\times 100$)
Fig. 2 Immunofluorescence images of primary cardiac myocyte observed under an fluorescence microscope (immunofluorescence, $\times 100$)

CWQB 能不同程度地促进活化 AMPK α 的基因表达。见表 2。

与正常组比较,模型组, TMZ 组, CWQB 组 PFK2, GLUT4 基因表达增加, 而 FAT/CD36, ACC2 表达水平显著下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较, TMZ 组, CWQB 组 GLUT4, PFK2, FAT/CD36, ACC2 基因表达水平上调 ($P < 0.05$), 其中 TMZ 组上调 GLUT4, PFK2, FAT/CD36 基因表达更为显著 ($P < 0.01$), 在 ACC2 基因表达方面, TMZ 组与 CWQB 组之间不存在显著差异。见表 2。提示 CWQB 与 TMZ 均能不同程度地提高 H/R 损伤心肌细胞葡萄糖转运及无氧糖酵解过程, 促进受到抑制的脂肪酸转运及其代谢, 增进葡萄糖和脂肪酸在病理条件下的产能效力。



A. 正常组; B. 模型组; C. TMZ 组; D. CWQB 组 (图 4 同)
图 3 CWQB 对 H/R 心肌细胞基因表达的影响总 RNA 电泳
Fig. 3 Electrophoresis graph of total RNA in CWQB intervened H/R cardiomyocytes

表 2 CWQB 对 H/R 损伤心肌细胞 AMPK 相关糖脂代谢通路基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of CWQB on mRNA expression levels of AMPK related glucose metabolism and fatty acid oxidation pathways ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	AMPK α	PFK2	GLUT4	ACC2	FAT/CD36
正常	-	0.84 \pm 0.05	1.00 \pm 0.04	0.97 \pm 0.07	0.94 \pm 0.08	1.03 \pm 0.03
模型	-	1.01 \pm 0.03 ¹⁾	1.25 \pm 0.08 ¹⁾	1.21 \pm 0.01 ¹⁾	0.40 \pm 0.05 ²⁾	0.38 \pm 0.08 ²⁾
TMZ	0.1	1.28 \pm 0.09 ^{2,4)}	1.93 \pm 0.03 ^{2,4)}	1.54 \pm 0.05 ^{2,4)}	0.66 \pm 0.08 ^{1,3)}	0.78 \pm 0.04 ^{1,3)}
CWQB	1.0	1.16 \pm 0.03 ^{2,3)}	1.37 \pm 0.03 ^{2,3)}	1.41 \pm 0.07 ^{2,3)}	0.71 \pm 0.12 ^{1,3)}	0.67 \pm 0.10 ^{1,3)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.3 CWQB 对 H/R 心肌细胞 AMPK 相关糖脂代谢通蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组, TMZ 组, CWQB 组的 AMPK α 蛋白含量明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, TMZ 组, CWQB 组 AMPK α 蛋白表达上调 ($P < 0.01$), 其中 TMZ 组上调 AMPK α 蛋白表达较 CWQB 组更为显著 ($P < 0.05$)。提示 TMZ, CWQB 能够促进 H/R 条件下心肌细胞 AMPK α 蛋白活化的增加。见表 3, 图 4。

与正常组比较,模型组, TMZ 组, CWQB 组 PFK2, GLUT4 蛋白表达增加, ACC2, FAT/CD36 蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较,

TMZ 组, CWQB 组 PFK2, GLUT4, ACC2, FAT/CD36 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$), 其中 TMZ 组 FAT/CD36 蛋白表达水平升高更为明显 ($P < 0.05$)。提示心肌发生缺氧、缺血时, 葡萄糖和脂肪酸代谢途径受到一定程度的阻碍, CWQB 与 TMZ 能促进 H/R 心肌细胞 AMPK 相关糖脂转运及无氧糖酵解、脂肪酸氧化过程中相关蛋白的表达。见表 3, 图 4。

4 讨论

正常心肌的能量代谢包括底物的吸收转运, 线粒体氧化磷酸化, ATP 的释放和利用 3 个连续的主

表 3 CWQB 对 H/R 损伤心肌细胞 AMPK 相关糖脂代谢通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of CWQB on protein expression levels of AMPK related glucose metabolism and fatty acid oxidation pathways ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	AMPK α /GAPDH	PFK2/GAPDH	GLUT4/GAPDH	ACC2/GAPDH	FAT/CD36/GAPDH
正常	-	0.14 \pm 0.06	0.47 \pm 0.06	0.29 \pm 0.08	0.15 \pm 0.06	0.32 \pm 0.04
模型	-	0.26 \pm 0.08 ²⁾	0.63 \pm 0.07 ²⁾	0.32 \pm 0.07 ¹⁾	0.05 \pm 0.02 ¹⁾	0.15 \pm 0.05 ²⁾
TMZ	0.1	0.67 \pm 0.06 ^{2,4)}	0.74 \pm 0.12 ^{2,3)}	0.58 \pm 0.02 ^{2,3)}	0.17 \pm 0.03 ³⁾	0.60 \pm 0.04 ^{2,4)}
CWQB	1.0	0.50 \pm 0.05 ^{2,4)}	0.79 \pm 0.01 ^{2,3)}	0.52 \pm 0.02 ²⁾³⁾	0.14 \pm 0.02 ³⁾	0.36 \pm 0.06 ³⁾

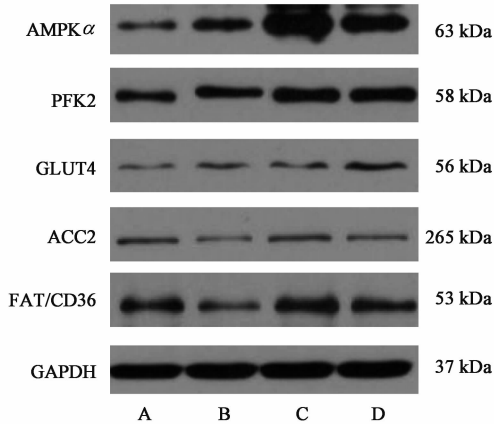


图 4 CWQB 对 H/R 损伤心肌细胞 AMPK 相关糖脂代谢通路的蛋白表达电泳

Fig. 4 Effect of CWQB on protein expression levels of AMPK related glucose metabolism and fatty acid oxidation pathways

要环节。因此当心肌发生能量代谢时,首先表现为底物利用的障碍^[14]。脂肪酸有氧氧化是正常心肌能量的主要来源,当心肌发生缺血、缺氧时,无氧糖酵解取代脂肪酸氧化成为心脏能量来源的主要途径^[15]。近代学者认为,现代西医学中的“能量”与中医的“气”有着密切的联系,心肌能量代谢模式的改变可以表现为“气”发生异常的一些证候,如出现气虚、血瘀等证候,都可能是心肌能量代谢障碍的外在表现。在心肌缺血、缺氧病理状态下,随着 AMP 浓度的上升及 ATP 浓度的下降,AMPK 信号通路被磷酸化激活^[16],通过调控其代谢通路中的下游因子,如增加葡萄糖摄取和刺激糖酵解,使脂肪酸的摄取和氧化趋于正常化^[17],从而发挥调控能量代谢及维持细胞能量供求平衡的作用。AMPK 是由 α ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$), β ($\beta_1, \beta_2, \beta_3$) 和 γ ($\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$) 3 个亚单位组成的 1 个异源三聚体^[18],其中 α 亚单位含有一个重要的 Thr/Ser 蛋白激酶具有催化作用, α 亚单位中的 Thr172 位点,其磷酸化对 AMPK 活化具有重要的调节作用^[19]。故实验研究所涉及 AMPK 的活性蛋白检测及总含量通常指的是其 α 亚单位。本实验研究通过基因和蛋白检测发现,缺氧/复氧后 AMPK α 的表达水平明显上调,说明心肌细胞 AMPK 信号通

路被激活。同时,加入 TMZ, CWQB 后,AMPK α 的基因和蛋白表达进一步上调,说明 TMZ, CWQB 均能促进 AMPK α 磷酸化,从而发挥对能量代谢的调控作用。

在糖代谢方面,各组 PFK2, GLUT4 基因和蛋白表达较正常组明显增加,说明缺氧/复氧损伤时,心肌细胞通过促进 GLUT4 表达,加强细胞内外葡萄糖转移和运送,同时激活糖酵解途径中 PFK2 活化糖酵解,这种适应性代谢反应可以保护心肌细胞在缺氧/复氧条件下生成足够的能量。同时,加入 TMZ, CWQB 后,二者表达进一步上调甚至高于正常组,说明二者均能够通过促进葡萄糖转运和糖酵解,改善 AMPK 相关的糖代谢过程。

在脂肪酸代谢方面,由于脂肪酸是正常心肌细胞产生 ATP 能量的主要底物,CD36 是心脏 FAT 的主要形式,是心脏利用和吸取脂肪酸的主要转位酶^[20]。当心肌发生缺血、缺氧时,H/R 组细胞 FAT/CD36 表达下调,说明此时脂肪酸代谢受到明显抑制。药物干预后,FAT/CD36 基因和蛋白表达均上调,呈现脂肪酸代谢的促进作用,但上升水平低于正常组,说明此时药物对 AMPK 的激活作用大于非 AMPK 途径造成的 FAT/CD36 下调,即 CWQB 可以通过激活 AMPK 信号通路使缺氧/复氧病理状态下受抑制的 FAT/CD36 相关脂肪酸氧化代谢趋于正常化。正常心肌细胞中少量有活性的 ACC2 催化生成丙二酰辅酶 A,阻滞并调控的位于线粒体外膜的脂肪酸氧化磷酸化限速酶-肉碱脂酰转移酶 I,从而限制脂肪酸的有氧氧化过程^[21]。当心肌缺血缺氧时,模型组 ACC2 的表达下降、苏氨酸残基磷酸化后失活减少,降低了丙二酰 CoA 对肉碱脂酰转移酶 I 的抑制作用,脂肪酸氧化过程加强。药物干预通过激活 AMPK 信号通路导致 ACC2 表达上调,苏氨酸残基磷酸化后失活增多,从而发挥其正常生理状态下抑制脂肪酸代谢的作用,同样说明气血并治方有效组分 CWQB 可以抑制缺氧/复氧病理状态下增高的 ACC2 相关脂肪酸氧化代谢过程。

本实验研究发现,CWQB可以通过激活H/R损伤心肌细胞的AMPK信号通路,增强GLUT4介导的葡萄糖转运和PFK2活化的糖酵解过程,并且促进FAT/CD36相关的脂肪酸吸收、参与ACC2介导的脂肪酸氧化过程,从底物水平上提高了缺氧/复氧条件下心肌细胞对能量原料的利用率。可见,CWQB能够在原有改善血液流变、减轻炎症反应等心血管药理作用基础上,从AMPK相关分子上游减轻缺氧/复氧损伤后心肌细胞的能量代谢障碍,保障了心肌细胞发挥正常生理功能所需的燃料和动力。因此,CWQB在临床伴随有心脏能量代谢障碍的疾病,如缺血性心脏病、心力衰竭的防治中具有一定的研究价值。

[参考文献]

[1] Lopaschuk G D, Ussher J R, Folmes C D, et al. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease [J]. *Physiol Rev*, 2010, 90(1): 207-258.

[2] Chanda D, Luiken J F P, Glatz J F C. Signaling pathways involved in cardiac energy metabolism [J]. *Febs Lett*, 2016, 590(15): 2364-2374.

[3] Heidrich F, Schotola H, Popov A F, et al. AMPK-activated protein kinase and its role in energy metabolism of the heart [J]. *Curr Cardiol Rev*, 2010, 6(4): 337-342.

[4] Baskin K K, Taegtmeyer H. An expanded role for AMP-activated protein kinase regulator of myocardial protein degradation [J]. *Trends Cardiovas Med*, 2011, 21(4): 124-127.

[5] 史大卓,刘剑刚,徐浩.一种防治动脉粥样硬化的中药及其制备方法,中国:CN1709428A[P].2005.

[6] 刘剑刚,马鲁波,史大卓,等.气血并治方组不同配伍干预高脂血症大鼠的比较研究[J].*世界科学技术—中医药现代化*,2014,16(9):1896-1903.

[7] DONG G J, LIU J G, SHI D Z, et al. Effects of water extractives of a Qi and blood regulating prescription on early atherosclerosis of apolipo-protein E deficient mice [J]. *Chin J Integr Med*, 2007, 5(1):45-49.

[8] LV L, JIANG S, XU J, et al. Effect of ligustrazine against myocardial ischaemia-reperfusion injury in rats [J]. *Heart*, 2012, 98(2):20-27.

[9] WEI B, YOUM G, LING J J, et al. Regulation of antioxidant system, lipids and fatty acid β -oxidation contributes to the cardioprotective effect of sodium *tanshinone* II_A sulphonate in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats [J]. *Atherosclerosis*, 2013, 230(1):148-156.

[10] Arpornsuwan T, Changsri K, Roytrakul S, et al. The effects of the extracts from *Carthamus tinctorius* L on gene expression related to cholesterol metabolism in rats [J]. *Songklanakarin J Sci Technol*, 2010, 32(2):129-136.

[11] HUANG Z F, LUAN L J, SHAO Q, et al. Study on quality control of effective fraction in qixue bingzhi decoction [J]. *Chin J Chinese Mater Med*, 2005, 30(8): 580-583.

[12] Portal L, Martin V, Assaly R, et al. A model of hypoxia-reoxygenation on isolated adult mouse cardiomyocytes: characterization, comparison with ischemia-reperfusion, and application to the cardioprotective effect of regular treadmill exercise [J]. *J Cardiovas Pharm T*, 2013, 18(4):367-375.

[13] 嵇波,耿萍,刘剑刚,等.气血并治方有效组分配伍对平滑肌细胞增殖和血小板源生长因子及其受体基因表达的影响[J].*中西医结合学报*,2006,4(1):30-34.

[14] Lopaschuk G D, Ussher J R. Evolving concepts of myocardial energy metabolism: more than just fats and carbohydrates [J]. *Circ Res*, 2016, 119(11): 1173-1176.

[15] Kreipke R, WANG Y, Miklas J W, et al. Metabolic Remodeling in early development and cardiomyocyte maturation [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, doi: 10.1016/j.semedb.2016.02.004.

[16] Kim M, Tian R. Targeting AMPK for cardiac protection: opportunities and challenges [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51(4): 548-553.

[17] Lionetti V, Stanley W C, Recchia F A. Modulating fatty acid oxidation in heart failure [J]. *Cardio Vasc Res*, 2011, 90(2):202-209.

[18] Zaha V G, Young L H. AMP-activated protein kinase regulation and biological actions in the heart [J]. *Circ Res*, 2012, 111(6): 800-814.

[19] LI J, Coven D L, Miller E J, et al. Activation of AMPK alpha-and gamma-isoform complexes in the intact ischemic rat heart [J]. *Am J Physiol*, 2006, 291(4): 1927-1934.

[20] Habets D D, Coumans W A, Voshol P J, et al. AMPK-mediated increase in myocardial long-chain fatty acid uptake critically depends on sarcolemmal CD36 [J]. *Biochem Bioph Res Co*,2007, 355(1):204-210.

[21] Hopkins T A, Dyck J R, Lopaschuk G D. AMP-activated protein kinase regulation of fatty acid oxidation in the ischaemic heart [J]. *Biochem Soc T*, 2003, 31(1):207-212.

[责任编辑 邹晓翠]