



黄芪甲苷激活ROCK/JNK介导自噬减轻异丙肾上腺素诱导的小鼠心肌纤维化

武菲菲, 张綃绮, 连敬, 杨晶, 翟蒙恩, 乔锐, 徐臣年, 杨婷婷

Alleviation of isoproterenol-induced myocardial fibrosis in mice by autophagy regulated by Astragaloside through activating ROCK/JNK pathway

WU Feifei, ZHANG Xiaoqi, LIAN Jing, YANG Jing, ZHAI Menggen, QIAO Rui, XU Chennian, YANG Tingting

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202212056>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

巨噬源性泡沫细胞中p62蛋白上调作用和机制的研究

A study on the role and mechanism of upregulated p62 protein in macrophage-derived foam cells

药学实践与服务. 2019, 37(5): 400-405,426 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.05.004

$\alpha 7$ n型乙酰胆碱能受体在小胶质细胞中下调炎症水平的作用及其机制研究

The anti-inflammatory role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in microglial cells and its mechanisms

药学实践与服务. 2021, 39(4): 340-344, 358 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202103028

HPLC-ELSD法测定胃康颗粒中人参皂苷Rb₁和黄芪甲苷的含量

Detection of the contents of ginsenoside Rb₁ and astragaloside IV in Weikang granules by HPLC-ELSD

药学实践与服务. 2020, 38(4): 359-363 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202001083

紫草素对四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠TGF- $\beta 1$ 的影响

Effect of shikonin on expression of TGF- $\beta 1$ in liver fibrosis induced by CCl₄ in rats

药学实践与服务. 2018, 36(5): 453-456 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.05.016

同型半胱氨酸激活JNK信号通路诱导血管平滑肌细胞氧化应激的损伤研究

Oxidative stress induced by homocysteine via activating JNK signaling pathway in vascular smooth muscle cells

药学实践与服务. 2018, 36(6): 499-502,511 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.06.005

来氟米特通过调节miR-449a在肺纤维化中的机制研究

Mechanism of leflunomide in regulating pulmonary fibrosis by regulating miR-449a

药学实践与服务. 2020, 38(4): 296-300, 306 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.201910073



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

黄芪甲苷激活 ROCK/JNK 介导自噬减轻异丙肾上腺素诱导的小鼠心肌纤维化

武菲菲¹, 张娟娟¹, 连敬¹, 杨晶¹, 翟蒙恩¹, 乔锐², 徐臣年^{1,3}, 杨婷婷¹ (1. 空军军医大学第一附属医院心血管外科, 陕西西安 710032; 2. 北部战区总医院干部病房一科, 辽宁沈阳 110016; 3. 陆军七十九集团军医院胸心外科, 辽宁辽阳 111000)

[摘要] 目的 探讨黄芪甲苷(AS-IV)激活 ROCK/JNK 调控自噬, 改善异丙肾上腺素(ISO)诱导的小鼠心肌纤维化(MF)的作用及机制。方法 将小鼠随机分为对照组、ISO 诱导心肌纤维化组(MF 组)、黄芪甲苷组、黄芪甲苷与 Y-33075(ROCK 抑制剂)联合组(黄芪甲苷+Y-33075 组), 重复给药持续 30 d 后, 检测小鼠血清 LDH、BNP、CTGF 水平, 超声检测心功能指标, 天狼猩红、Masson 染色检测各组小鼠心肌结构及组织纤维化程度, DHE 检测各组小鼠心肌组织氧化应激(ROS)水平, 蛋白印迹法检测心肌组织 ROCK、JNK、Atg5、Beclin 1、LC3 I/II 表达。结果 与黄芪甲苷组比较, 黄芪甲苷+Y-33075 组的 EF 值降低, 心肌纤维化程度增加, 血清 LDH、BNP、CTGF 水平升高, 心肌组织 ROS 水平增高, ROCK、JNK、Atg5、Beclin 1、LC3 I/II 表达水平表达降低($P<0.05$), 表明 Y-33075 能够阻断黄芪甲苷对心肌纤维化的保护作用, 并抑制黄芪甲苷对 ROCK 和 JNK 的调控。结论 黄芪甲苷通过激活 ROCK/JNK 信号促进自噬减轻小鼠心肌纤维化。

[关键词] 心肌纤维化; 自噬; ROCK/JNK; 黄芪甲苷; 小鼠

[文章编号] 2097-2024(2023)08-0478-07

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202212056

Alleviation of isoproterenol-induced myocardial fibrosis in mice by autophagy regulated by Astragaloside IV through activating ROCK/JNK pathway

WU Feifei¹, ZHANG Xiaoqi¹, LIAN Jing¹, YANG Jing¹, ZHAI Mengen¹, QIAO Rui², XU Chennian^{1,3}, YANG Tingting¹ (1. Department of Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Department of the First Cadre Ward, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110016, China; 3. Department of Cardiothoracic Surgery, the Hospital of 79th Group Army, Liaoyang 111000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and mechanism of astragaloside IV (AS-IV) activating ROCK/JNK to regulate autophagy in improving isoproterenol (ISO) induced myocardial fibrosis (MF) in mice. **Methods** The mice were randomly divided into control operation group (Control group), ISO induced myocardial fibrosis group (MF group), AS-IV treatment group (AS-IV group) and combination group of astragaloside IV and Y-33075 (ROCK inhibitor) (astragaloside IV+Y-33075 group). After repeated administration for 30 days. The serum levels of LDH, BNP, CTGF in each group were detected. The cardiac function was detected by ultrasound. Myocardial structure and tissue fibrosis degree in each group were detected by Sirius Red and Masson staining. Oxidative stress (ROS) levels in myocardial tissue of each group were detected by DHE staining and the expression of ROCK, JNK, Atg5, Beclin 1, and LC3 I/II in myocardial tissue were detected by Western blotting. **Results** Compared with AS-IV group, the EF value of AS-IV+Y-33075 group decreased and the degree of myocardial fibrosis increased ($P<0.05$). The serum level of LDH, BNP, CTGF increased and the level of ROS in myocardial tissue increased while the expression of ROCK, JNK, Atg5, Beclin 1, LC3 I/II decreased ($P<0.05$). Y-33075 could block the protective effect of AS-IV on myocardial injury induced by MF and inhibit the regulation of AS-IV on ROCK and JNK. **Conclusion** AS-IV could attenuate myocardial fibrosis in mice by activating ROCK/JNK signal and promoting autophagy.

[Key words] myocardial fibrosis; autophagy; ROCK/JNK; astragaloside IV; mice

病理性心肌纤维化 (myocardial fibrosis, MF) 是

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(82100513); 辽宁省 2023 年第一批中央引导地方科技发展资金(2023JH6/100100034); 沈阳市科学技术计划基金资助项目(20-205-4-039)

[作者简介] 武菲菲, 本科, 研究方向: 心肌纤维化基础机制, Tel: 13572191431, Email: 704290539@qq.com

[通信作者] 杨婷婷, 本科, 研究方向: 心血管微创治疗, Tel: 15291452163, Email: 292200659@qq.com

常见的心血管病理生理表现, 存在于多种心血管疾病, 具体机制尚不明确, 减轻心肌纤维化可能成为缓解房颤等多种心血管疾病治疗的有效靶点^[1-4], 但目前心肌纤维化的治疗尚缺乏有效治疗策略。研究表明, Rho/ROCK/JNK 途径调节多种关键细胞功能, 可以介导细胞凋亡、增殖、分化等, 而抑制 JNK 和 TGF β /Smad 途径可改善 2 型糖尿病大鼠的心肌

纤维化,使 RhoA/ROCK/JNK 成为预防心肌纤维化的潜在治疗靶点^[5-6]。黄芪甲苷(astragaloside IV, AS-IV)是从中药黄芪中提取出的主要活性成分,具有抗氧化、抗炎症、降低血糖等多重药理作用,并且 AS-IV 通过抑制 ROS/Caspase-1/GSDMD 信号通路可减轻心肌梗死诱导的心肌纤维化和心脏重塑^[7-9]。本研究采用异丙肾上腺素诱导小鼠心肌纤维化,探讨黄芪甲苷对心肌纤维化的改善作用以及对 ROCK/JNK 信号的调控作用。

1 材料

6 周龄健康雄性 C57/BL 小鼠,体质量(20.5±1.1) g,购自空军军医大学实验动物中心[许可证号:SYXK(陕)2019-001],实验经空军军医大学伦理委员会批准(No.20220262);Atg5、Beclin-1、LC3 I/II、ROCK、JNK、GAPDH 抗体、黄芪甲苷(美国 Sigma-Aldrich 公司);ROCK 抑制剂 Y-33075(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);异丙肾上腺素(ISO,天津泰泽兴业生物科技有限公司);BNP 试剂盒、结缔组织生长因子(CTGF)试剂盒(美国 R&D Systems 公司);超氧化物阴离子荧光检测探针(DHE,美国 ThermoFisher 公司);多功能酶标仪(美国 Thermo 公司);Olympus FV2000 激光共聚焦显微镜(日本奥林巴斯公司);小动物超声仪(美国 VisualSonics 公司)。

2 方法

2.1 分组及心肌纤维化模型建立

将 60 只 C57/BL 小鼠按照随机数字表法随机分成 4 组,每组 15 只,即对照组、心肌纤维化组(MF 组)、黄芪甲苷组、黄芪甲苷联合 ROCK 抑制剂 Y-33075 组(黄芪甲苷+Y-33075 组)。各组以普通饲料喂养,MF 组、黄芪甲苷组、黄芪甲苷+Y-33075 组于小鼠肩胛间皮下注射异丙肾上腺素(ISO),首次剂量为 5 mg/(kg·d),后以 2.5 mg/(kg·d),重复给药持续 30 d,诱导心肌纤维化模型。对照组于同一部位注射相同体积生理盐水。给药组在造模同时给与药物治疗,黄芪甲苷组按 100 mg/(kg·d)腹腔注射黄芪甲苷,黄芪甲苷+Y-33075 组分别按 100 mg/(kg·d)和 10 mg/(kg·d)腹腔注射黄芪甲苷和 Y-33075,MF 组和对照组腹腔注射等量生理盐水,重复给药持续 30 d。

2.2 心脏超声检测各组小鼠心功能

各组小鼠经 2% 异氟烷麻醉后,四肢插上超声仪电极,探头在乳头肌水平位置用 M 型取样线检

测,测量并计算得出左心室射血分数(LVEF)、左心室短轴缩短率(LVFS)、左心室舒张期前壁厚度(LVAWd)、左心室舒张末期容积(LVEDV)等指标。

2.3 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测小鼠血清 LDH、BNP、CTGF 水平

固定小鼠,剪开并剥离小鼠颈部皮肤、皮下组织,暴露小鼠颈动脉,剪开快速取血 2 ml 至 EP 管中,3000 r/min 离心 15 min,取上层清亮血清。按照 LDH、BNP、CTGF 检测试剂盒说明书检测。

2.4 Masson、天狼星红、DHE 染色检测各组小鼠心肌纤维化程度及 ROS 水平

迅速剪下心脏,冷 PBS 缓冲液冲洗 3 遍,洗净血细胞后,以多聚甲醛(40 g/L)固定 72 h,石蜡包埋、切片,行 Masson、天狼星红染色,在光学显微镜下拍摄染色后的 Masson、天狼星红图像并保存,使用 Image J 软件测定 Masson 染色中胶原阳性蓝色染色面积与组织总面积比值,即胶原容积分数。

心脏在液氮中快速冷冻,并切成 3 μm 厚的切片。冷冻组织切片在黑暗潮湿的小室中用 DHE 反应混合物染色。使用 Olympus FV1000 激光共聚焦显微镜检查每个样品。使用 Image J 软件测定切片中二氢乙锭的荧光强度,以评估心肌组织中活性氧簇(ROS)的产生。

2.5 qPCR 检测各组小鼠心肌组织 BNP、CTGF、Atg5 的 mRNA 相对表达量

测定 BNP、CTGF、Atg5 的表达评估心肌组织纤维化及自噬水平。用 TRIzol 试剂从组织中分离总 RNA,逆转录实验生成 cDNA,用 BIO-RAD 分光光度法测定 RNA 和 cDNA 的浓度和纯度,Primer Premier 6.0 软件设计引物并合成(上海吉凯基因有限公司)。在 iQ™5 RT-PCR 系统中进行 PCR 扩增,采用 2^{-ΔΔct} 法对靶基因表达量进行相对定量。各检测基因引物序列由美国复能基因公司提供(见表 1)。

表 1 相关引物序列

基因	上游序列(5'-3')	下游序列(5'-3')
BNP	TAGCCAGTCTCCAGAAC AAATCC	AAACAACCTCAGCCCGT CA
CTGF	CAGCATGGACGTTTCGTCT G	AACCACGGTTTGGTCTT TGG
Atg5	CAGAAGCTGTTCCGTCCT GT	CCGTGAATCATCACCTG GCT
GAPDH	AGAACATCATCCCTGCAT CC	AGTTGCTGTTGAAGTCG C

2.6 蛋白印迹法检测心肌纤维化组织中自噬的变化

各组小鼠心肌组织取相同质量放入离心管中,

加入预冷 PBS, 剪碎心肌组织, 4℃ 3000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 沉淀中加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 强裂解液, 冰上充分研磨并裂解 30 min, 4℃ 12000 r/min 离心 30 min, 取上清; BCA 法蛋白定量; 电泳并用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温下封闭 2 h, 裁剪目的条带, 放入对应 ROCK(1 : 1000)、JNK(1 : 1000)、Beclin1(1 : 1000)、LC3 I / II (1 : 1000)、Atg5(1 : 1000) 和 GAPDH 抗体(1 : 5000)中, 4℃ 摇床孵育过夜; TBST 洗脱 3 次, 5 min/次, 将目的条带放入山羊抗兔或抗鼠二抗(1 : 5000)中室温摇床孵育 2 h, TBST 洗脱 3 次, 5 min/次, ECL 化学发光液避光检测, Image Lab 统计灰度值。

2.7 LC3 I / II 免疫荧光染色检测心肌组织自噬程度

取小鼠左室前壁组织, 石蜡包埋、切片、脱蜡、复水, 用 PBS 缓冲溶液洗 5 次, 每次 3 min, Triton-X100(2 g/L)处理 15 min, PBS 液冲洗 3 次, 每次 3 min, 山羊血清室温封闭 1.5 h, PBS 液洗 3 次, 每次 3 min, 每个切片加 LC3 I / II 抗体(1 : 100)50 μl, 4℃ 孵育 15 h, PBS 液洗 5 次, 每次 3 min, 暗室内每张切片加荧光二抗(1 : 500)50 μl, PBS 液洗 5 次(3 min/次), 避光条件下每张切片加 DAPI 溶液 50 μl, PBS 液洗 5 次, 每次 3 min, 用荧光防淬灭液封片, 采集图像。

2.8 统计学分析

数据采用 GraphPad Prism 9.0 软件统计和分析。计量资料以(均数±标准差)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 随后采用 Bonferroni 校正及 post hoc *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 Y-33075 阻断 AS-IV 改善 MF 损伤及心功能

与对照组比较, MF 组心脏功能明显降低, LVEF、LVEDV 显著减小, LVAWd 显著增加($P < 0.05$); 与 MF 组比较, 黄芪甲苷组心脏功能得到明显改善, LVAWd 显著减少, LVEF、LVEDV 显著增加($P < 0.05$); 和黄芪甲苷组相比, 黄芪甲苷+Y-33075 组的 LVEF、LVEDV 显著降低($P < 0.05$)。超声结果表明, 黄芪甲苷可以改善 MF 诱发的功能障碍, Y-33075 可阻断黄芪甲苷的心肌保护作用(表 2)。

表 2 各组小鼠超声测量心功能结果 ($n=10$)

检测项目	对照组	MF组	黄芪甲苷组	黄芪甲苷+Y-33075组
LVEF (%)	72.31±6.27	35.43±8.12 [*]	55.25±7.43 [^]	40.28±11.36 [#]
LVAWd (mm)	1.51±0.03	1.94±0.25 [*]	1.62±0.20 [^]	1.71±0.18 [#]
LVEDV(μl)	57.92±7.23	49.78±9.36 [*]	56.32±6.28 [^]	50.79±5.46 [#]

* $P < 0.05$, 与对照组比较; [^] $P < 0.05$, 与 MF 组比较; [#] $P < 0.05$, 与黄芪甲苷组比较

与对照组相比, MF 组血清中 LDH、BNP、CTGF 水平显著增加($P < 0.05$), 心肌组织 BNP、CTGF 的 mRNA 表达显著增加($P < 0.05$), Atg5 的 mRNA 表达降低($P < 0.05$); 与 MF 组相比, 黄芪甲苷组血清 LDH、BNP、CTGF 水平显著降低($P < 0.05$), 心肌组织 BNP、CTGF 的 mRNA 表达减少($P < 0.05$), Atg5 的 mRNA 表达增加($P < 0.05$); 黄芪甲苷+Y-33075 组血清中 LDH、BNP、CTGF 水平比黄芪甲苷组显著增加($P < 0.05$), 心肌组织 BNP、CTGF 的 mRNA 表达明显增加($P < 0.05$), Atg5 的 mRNA 表达降低($P < 0.05$), 具体见表 3、表 4。

表 3 各组小鼠血清 LDH、BNP、CTGF 水平比较 ($n=10$)

检测项目	对照组	MF组	黄芪甲苷组	黄芪甲苷+Y-33075组
LDH(U/L)	395.25±30.38	1102.43±62.35 [*]	500.89±19.48 [^]	974.21±101.72 [#]
BNP(ng/L)	80.29±12.90	200.61±31.92 [*]	137.33±19.28 [^]	194.72±26.31 [#]
CTGF(ng/L)	121.91±20.25	213.37±29.58 [*]	163.05±10.29 [^]	189.03±25.42 [#]

* $P < 0.05$, 与对照组比较; [^] $P < 0.05$, 与 MF 组比较; [#] $P < 0.05$, 与黄芪甲苷组比较

表 4 各组小鼠心肌组织 BNP、CTGF、Atg5 的 mRNA 相对表达量 ($n=5$)

项目	对照组	MF组	黄芪甲苷组	黄芪甲苷+Y-33075组
BNP	1	4.02±0.59 [*]	1.59±0.33 [^]	3.98±0.49 [#]
CTGF	1	1.62±0.23 [*]	0.91±0.37 [^]	1.54±0.29 [#]
Atg5	1	0.53±0.09 [*]	2.56±0.61 [^]	0.69±0.30 [#]

* $P < 0.05$, 与对照组比较; [^] $P < 0.05$, 与 MF 组比较; [#] $P < 0.05$, 与黄芪甲苷组比较

3.2 Y-33075 阻断黄芪甲苷改善 MF 改变

心肌组织 Masson、天狼星红染色检测各组小鼠心肌组织结构、胶原含量及纤维化水平。对照组小鼠心肌组织无纤维化, 胶原含量低; MF 组可见心肌结构排列紊乱, 肌纤维断裂明显, 胶原含量高; 与 MF 组相比, 黄芪甲苷组肌纤维排列整齐, 纤维化程度改善, 胶原含量降低; 与黄芪甲苷组相比, 黄芪甲苷+Y-33075 组心肌纤维化程度明显增加, 排

列紊乱,胶原含量增高(图1)。

黄芪甲苷能够显著减轻脓毒症小鼠心肌组织氧化应激损伤。与对照组相比, MF组小鼠肾组织中 ROS 生成量显著增加($P < 0.05$);与 MF 组相比,黄芪甲苷组小鼠心肌组织中 ROS 生成量显著降低($P < 0.05$);而与黄芪甲苷组相比,黄芪甲苷+Y-33075组小鼠 ROS 生成量显著增加($P < 0.05$,图2)。

3.3 Y-33075 阻断黄芪甲苷促进 MF 中自噬水平

蛋白印迹检测结果提示,与对照组比较, MF 组心肌组织中自噬相关蛋白 ROCK、JNK、Atg5、Beclin 1、LC3 I/II 表达水平降低($P < 0.05$);与 MF 组比较,黄芪甲苷组心肌组织 ROCK、JNK、Atg5、Beclin 1、LC3 I/II 表达水平增高($P < 0.05$);而与黄芪甲苷组比较,黄芪甲苷+Y-33075 组心肌组织 ROCK、JNK、Atg5、Beclin 1、LC3 I/II 表达水平降低($P < 0.05$),提示黄芪甲苷可以改善 MF 所致心肌细胞自噬水平的降低,而 Y-33075 能阻断黄芪甲苷的这一作用(图3)。

心肌 LC3- I/II 免疫荧光染色结果显示,与对照组相比, MF 组 LC3-I/II 蛋白免疫荧光染色数量显

著减少($P > 0.05$);与 MF 组相比,黄芪甲苷组 LC3-I/II 蛋白染色的数量显著增加($P < 0.05$);与黄芪甲苷组相比,黄芪甲苷+Y-33075 组 LC3-I/II 蛋白免疫荧光染色数量显著减少($P < 0.05$),结果也提示黄芪甲苷可以改善 MF 诱发的心肌自噬功能障碍,而 Y-33075 可阻断黄芪甲苷的这一作用(图4)。

4 讨论

病理性心肌纤维化是由多种因素引起的,这些因素可导致胶原纤维过度沉积,胶原浓度和体积分数显著增强,心肌胶原类型和结构排列紊乱,是房颤等多种慢性心血管疾病进展中的重要病理过程,然而心肌纤维化在分子水平的具体机制尚不清楚^[10-13]。研究表明,多种重要机制参与了病理性心肌纤维化的发展过程,其中包括炎症反应、氧化应激、纤维化、细胞死亡等。近年来发现,自噬和泛素-蛋白酶体系统是维持细胞中蛋白稳态的重要途径,研究表明自噬在心肌纤维化过程中起着重要作用^[14-16]。然而,自噬与心肌纤维化的相互作用机制尚不十分清楚,自噬及其调节可能成为治疗心肌纤

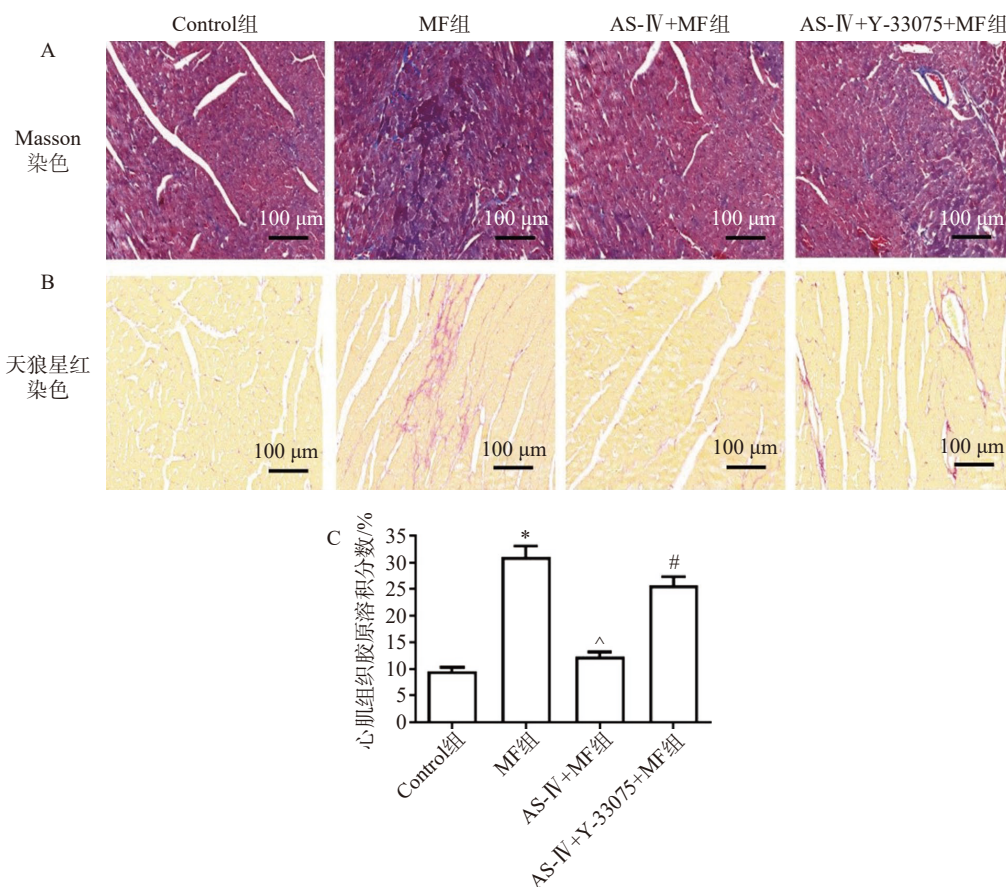


图1 Masson、天狼星红染色检测各组心肌组织纤维化程度($\times 400$, $n=5$)

A. Masson 染色代表性图像; B. 天狼星红染色代表性图像; C. 各组心肌组织胶原容积分数;

* $P < 0.05$, 与对照组比较; ^ $P < 0.05$, 与 MF 组比较; # $P < 0.05$, 与黄芪甲苷组比较

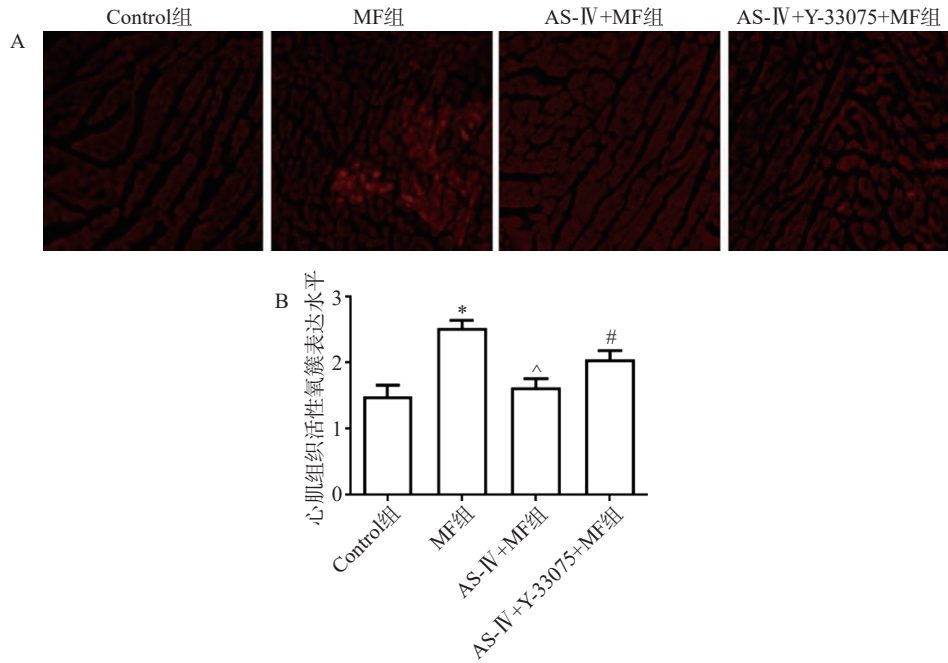


图2 DHE染色检测各组小鼠心肌组织氧化应激水平($\times 400$, $n=5$)
A. DHE染色代表性图像; B. 各组心肌组织活性氧簇表达水平统计图;
* $P<0.05$, 与对照组比较; ^ $P<0.05$, 与MF组比较; # $P<0.05$, 与黄芪甲苷组比较

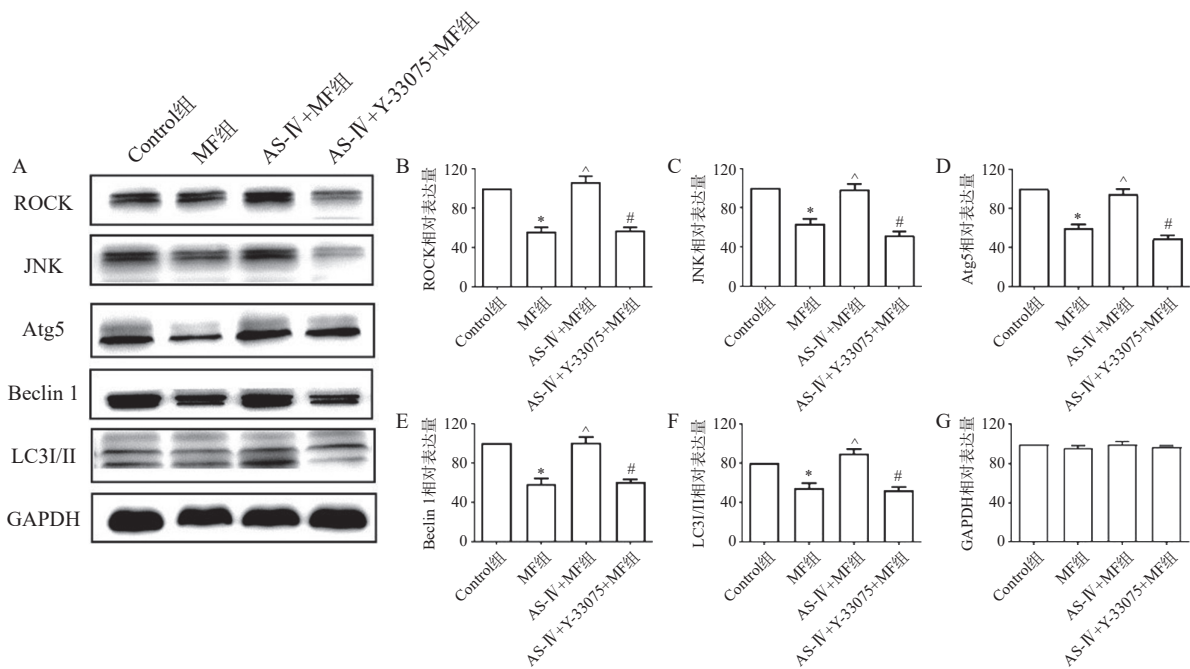


图3 Y-33075阻断黄芪甲苷改善MF所致心肌细胞自噬($n=5$)

A. ROCK、JNK、Atg5、Beclin 1、LC3 I/II和GAPDH的免疫印迹图; B-G. ROCK、JNK、Atg5、Beclin 1、LC3 I/II和GAPDH的表达水平;
* $P<0.05$, 与对照组比较; ^ $P<0.05$, 与MF组比较; # $P<0.05$, 与黄芪甲苷组比较

维化的潜在策略。

近年来多项研究发现,一种来源于豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的黄酮类化合物黄芪甲苷,在心血管相关疾病中发挥了重要的保护作用^[13-14]。然而,黄芪甲苷能否减轻心肌纤维化及其潜在分子机制还有待进一步探究。

本研究旨在探讨自噬与小鼠心肌纤维化的关系,并阐明了黄芪甲苷通过上调自噬改善MF的保护机制。根据本研究结果发现,心肌细胞自噬抑制参与了MF进展,同时,黄芪甲苷可激活ROCK/JNK通路促进细胞自噬改善MF,结果从一定程度上阐明了MF的可能作用机制,并辅助探寻预防和治

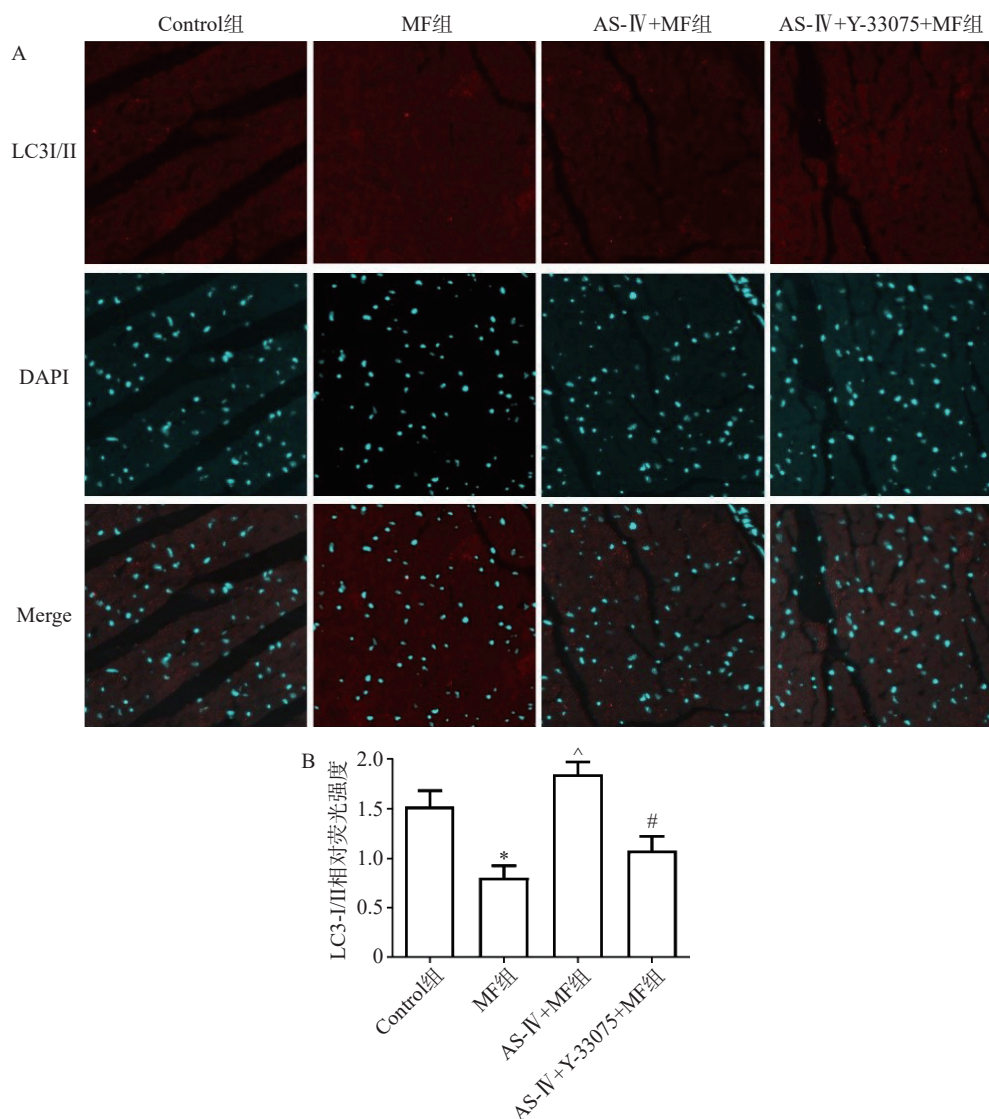


图4 Y-33075 阻断黄芪甲苷改善 MF 所致心肌细胞自噬水平的 LC3-I/II 免疫荧光染色 ($\times 400$, $n=5$)

A. LC3-I/II、DAPI 和 Merge 的免疫荧光染色图像; B. LC3-I/II 相对荧光强度统计图;
* $P<0.05$, 与对照组比较; [^] $P<0.05$, 与 MF 组比较; [#] $P<0.05$, 与黄芪甲苷组比较

疗心肌纤维化的潜在靶点。

Rho 蛋白激酶 (ROCK) 是丝氨酸蛋白激酶家族成员, Rho/ROCK 途径调节多种关键细胞功能, 如基因转录、细胞黏附、神经发育、细胞死亡^[5-6]。Rho/ROCK 的相关研究有助于更好地阐明多种疾病的病理生理过程, 而抑制 Rho/ROCK 也可能成为潜在治疗靶点^[17-19]。细胞自噬在心肌纤维化中起着关键作用, ROCK/JNK 具有自噬调控作用^[17]。黄芪甲苷的心脏保护作用是通过激活细胞自噬介导^[20-21]。本实验结果表明, 在 MF 模型中, ROCK 和 JNK 表达均下调, 而黄芪甲苷组 ROCK 和 JNK 表达恢复。Y-33075 是 ROCK 的抑制剂, Y-33075 处理后可通过阻断 ROCK 减弱黄芪甲苷对 MF 的改善作用。因此, 通过抑制 ROCK/JNK 通路, 部分消除了黄芪甲苷对 MF 的改善作用以及黄芪甲苷

调控细胞自噬的影响。

综上, 本研究的结果表明黄芪甲苷通过激活 ROCK/JNK 通路促进自噬发挥保护作用, 并发现 MF 与 ROCK/JNK 通路介导的自噬有关。然而, 自噬在 MF 等不同疾病的特定阶段的具体作用机制仍不十分明确, 自噬、MF 以及两者之间的关系需要深入研究与进一步探索。

【参考文献】

- [1] LIU J Y, LI W, DENG K Q, et al. The E3 ligase TRIM16 is a key suppressor of pathological cardiac hypertrophy[J]. *Circ Res*, 2022, 130(10): 1586-1600.
- [2] YUAN J, LIU H B, GAO W, et al. MicroRNA-378 suppresses myocardial fibrosis through a paracrine mechanism at the early stage of cardiac hypertrophy following mechanical stress[J]. *Theranostics*, 2018, 8(9): 2565-2582.

- [3] DENG K Q, ZHAO G N, WANG Z H, et al. Targeting transmembrane BAX inhibitor motif containing 1 alleviates pathological cardiac hypertrophy[J]. *Circulation*, 2018, 137(14): 1486-1504.
- [4] ZHAO G J, ZHAO C L, OUYANG S, et al. Ca²⁺-dependent NOX5 (NADPH oxidase 5) exaggerates cardiac hypertrophy through reactive oxygen species production[J]. *Hypertension*, 2020, 76(3): 827-838.
- [5] ZHOU H, LI Y J, WANG M, et al. Involvement of RhoA/ROCK in myocardial fibrosis in a rat model of type 2 diabetes[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(8): 999-1008.
- [6] KANLAYA R, THONGBOONKERD V. Persistent *Escherichia coli* infection in renal tubular cells enhances calcium oxalate crystal-cell adhesion by inducing ezrin translocation to apical membranes via Rho/ROCK pathway[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(7): 381.
- [7] FENG H, ZHU X Y, TANG Y, et al. Astragaloside IV ameliorates diabetic nephropathy in *db/db* mice by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated inflammation[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 48(2): 164.
- [8] 底雪梅, 袁曜晖, 张超, 等. 黄芪甲苷抑制 U937 巨噬细胞 CCL18 表达及其作用机制研究 [J]. *药与实践杂志*, 2019, 37(1): 32-36, 41.
- [9] ZHANG X, QU H, YANG T, et al. Astragaloside IV attenuate MI-induced myocardial fibrosis and cardiac remodeling by inhibiting ROS/caspase-1/GSDMD signaling pathway[J]. *Cell Cycle*, 2022, 21(21): 2309-2322.
- [10] CHEN Y M, GE Z W, HUANG S X, et al. Delphinidin attenuates pathological cardiac hypertrophy via the AMPK/NOX/ MAPK signaling pathway[J]. *Aging*, 2020, 12(6): 5362-5383.
- [11] LIU W J, WANG G, ZHANG C C, et al. MG53, A novel regulator of KChIP2 and Ito, f, plays a critical role in electrophysiological remodeling in cardiac hypertrophy[J]. *Circulation*, 2019, 139: 2142-2156.
- [12] LIN H B, NAITO K, OH Y, et al. Innate immune Nod1/RIP2 signaling is essential for cardiac hypertrophy but requires mitochondrial antiviral signaling protein for signal transductions and energy balance[J]. *Circulation*, 2020, 142(23): 2240-2258.
- [13] LI P L, LIU H, CHEN G P, et al. STEAP3 (Six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3) inhibits pathological cardiac hypertrophy[J]. *Hypertension*, 2020, 76(4): 1219-1230.
- [14] 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.
- [15] VANHOUTTE D, SCHIPS T G, VO A, et al. Thbs1 induces lethal cardiac atrophy through PERK-ATF4 regulated autophagy[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3928.
- [16] TONG M M, SAITO T, ZHAI P Y, et al. Alternative mitophagy protects the heart against obesity-associated cardiomyopathy[J]. *Circ Res*, 2021, 129(12): 1105-1121.
- [17] DENG Z H, JIA Y M, LIU H F, et al. RhoA/ROCK pathway: implication in osteoarthritis and therapeutic targets[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(9): 5324-5331.
- [18] WANG Z H, REN D B, ZHENG P. The role of Rho/ROCK in epileptic seizure-related neuronal damage[J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 37(4): 881-887.
- [19] DIETERLE M P, HUSARI A, STEINBERG T, et al. Role of mechanotransduction in periodontal homeostasis and disease[J]. *J Dent Res*, 2021, 100(11): 1210-1219.
- [20] GUO M, XU J M, WANG S W, et al. Asiaticoside reduces autophagy and improves memory in a rat model of dementia through mTOR signaling pathway regulation[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(3): 645.
- [21] LI Y C, WANG H H, ZHANG R, et al. Antitumor activity of asiaticoside against multiple myeloma drug-resistant cancer cells is mediated by autophagy induction, activation of effector caspases, and inhibition of cell migration, invasion, and STAT-3 signaling pathway[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 1355-1361.

[收稿日期] 2022-12-28 [修回日期] 2023-06-04

[本文编辑] 陈盛新