

## 阿利吉仑通过调控线粒体介导的凋亡通路改善 心肌缺血再灌注损伤

古钊林, 吴冰璇, 黄振华, 陈伟栋, 韦秋霞, 詹红  
(中山大学附属第一医院, 广东省广州市 510080)

[关键词] 阿利吉仑; 心肌缺血再灌注损伤; 线粒体; 细胞凋亡

[摘要] 目的 通过体外构建心肌细胞缺氧复氧模型(H/R)模拟体内心肌细胞缺血再灌注,验证阿利吉仑(Aliskiren)对于改善心肌细胞缺血再灌注的药物效果,同时探究细胞凋亡在其中的机制。方法 将细胞实验分为四组:正常氧供应组即对照组(Control)、缺氧复氧组(H/R)、阿利吉仑+缺氧复氧组(阿利吉仑+H/R)、NF- $\kappa$ B P65 特异抑制剂+缺氧复氧组(bay11-7082+H/R)。使用 CCK-8 检测不同浓度阿利吉仑处理的心肌细胞存活率,ELISA 检测各实验组炎症因子肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素 6(IL-6)水平。Hoechst33258 染色、Annexin V/PI 双染流式细胞仪检测各组心肌细胞凋亡比例,JC-1 试剂盒测量线粒体膜电位及心肌细胞 ATP 含量。同时采用 Caspase-3 试剂盒检测各组心肌细胞凋亡蛋白酶的活性。结果 阿利吉仑小于 20 mmol/L 时与心肌细胞活性存在正相关关系,而在 20 mmol/L 和 80 mmol/L 之间,两者之间存在负相关关系,文章中阿利吉仑的最佳处理浓度是 20 mmol/L,此时的心肌细胞活性最高(76.40% $\pm$ 1.64%)。相比 H/R 组,阿利吉仑能降低 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平 [(129.33 $\pm$ 5.86) ng/L 比 (319.00 $\pm$ 4.58) ng/L,  $P$ <0.05; (29.67 $\pm$ 1.53) ng/L 比 (64.67 $\pm$ 2.08) ng/L,  $P$ <0.05],同时显著降低心肌细胞的凋亡率 [(7.23% $\pm$ 1.14%) 比 (32.25% $\pm$ 3.15%),  $P$ <0.05],并具有降低能量代谢障碍心肌细胞所占比例 [(6.9% $\pm$ 1.6%) 比 (13.5% $\pm$ 1.7%),  $P$ <0.05]、稳定线粒体膜电位的功能 [(3.90 $\pm$ 0.60) 比 (1.80 $\pm$ 0.16),  $P$ <0.05]。另外,抑制凋亡蛋白酶 Caspase-3 的活性 [(2.26 $\pm$ 0.35) 比 (3.26 $\pm$ 0.62),  $P$ <0.05],且阿利吉仑+H/R 组与 bay11-7082+H/R 组的各项实验结果无统计学差异。结论 阿利吉仑可以通过抑制炎症反应、调控线粒体受体介导的凋亡,改善缺血心肌细胞缺血再灌注损伤,且阿利吉仑的调控凋亡作用可能与 NF- $\kappa$ B 表达抑制有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Aliskiren protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via regulating mitochondrial-mediated apoptosis pathway

GU Qianlin, WU Bingxuan, HUANG Zhenhua, CHEN Weidong, WEI Qiuxia, ZHAN Hong

(The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[KEY WORDS] Aliskiren; myocardial ischemia/reperfusion injury; mitochondria; apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** Through simulating the ischemia/reperfusion of cardiomyocytes in vivo by constructing a model of cardiomyocyte hypoxia and reoxygenation in vitro, to verify the effect of Aliskiren on improving the myocardial ischemia/reperfusion injury and to explore its mechanism in regulating apoptosis. **Methods** Cell experiments were divided into four groups: normal oxygen supply group (Control), hypoxia/reoxygenation group (H/R), Aliskiren+H/R group, NF- $\kappa$ B P65 specific inhibitor (bay11-7082)+H/R group. CCK-8 was used to detect the survival rate of cardiomyocytes pretreated with different concentrations of Aliskiren, and ELISA was performed to determine the levels of inflammatory factors (TNF- $\alpha$ , IL-6) in each experimental group. Hoechst33258 staining and Annexin V/PI dual staining flow cytometry were conducted to evaluate the myocardial cell apoptosis ratio in each group. The JC-1 kit was used to measure mitochondrial membrane potential and cardiomyocyte ATP content. Meanwhile, the Caspase-3 activity kit was performed to detect the activity of apoptotic proteases in each group. **Results** When the concentration of Aliskiren was less than 20 mmol/L, a posi-

[收稿日期] 2020-01-05

[修回日期] 2020-05-13

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81801948);广州市科技项目(201804010007)

[作者简介] 古钊林, 硕士研究生, 研究方向为心血管急危重症, E-mail 为 740675852@qq.com。通信作者詹红, 硕士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管急危重症, E-mail 为 zhanhong81@126.com。

tive correlation with cardiomyocyte activity was showed, and when between 40 mmol/L and 80 mmol/L, there was a negative correlation. The optimal concentration of Aliskiren was 20 mmol/L at which the myocardial cell activity is the highest.

Compared with the H/R group, Aliskiren can decrease the expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 ((129.33 $\pm$ 5.86) ng/L vs (319.00 $\pm$ 4.58) ng/L,  $P<0.05$ ; (29.67 $\pm$ 1.53) ng/L vs (64.67 $\pm$ 2.08) ng/L,  $P<0.05$ ), and significantly reduce the apoptosis rate of cardiomyocytes ((7.23% $\pm$ 1.14%) vs (32.25% $\pm$ 3.15%),  $P<0.05$ ), and reduced the proportion of cardiomyocytes with energy disorders ((6.9% $\pm$ 1.6%) vs (13.5% $\pm$ 1.7%),  $P<0.05$ ), what's more, Aliskiren can gain the function of stabilizing mitochondrial membrane potential ((3.90 $\pm$ 0.60) vs (1.80 $\pm$ 0.16),  $P<0.05$ ) and inhibit the activity of apoptotic protease Caspase-3 ((2.26 $\pm$ 0.35) vs (3.26 $\pm$ 0.62),  $P<0.05$ ). It is of great importance that there was no statistical difference in the experimental results between Aliskiren+H/R group and bay11-7082+H/R group.

**Conclusion** Aliskiren can improve myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting inflammatory response and regulating mitochondrial receptor-mediated apoptosis. Based on the experimental results, it can be speculated that the role of Aliskiren in regulating apoptosis may be related to inhibition of NF- $\kappa$ B expression.

世界卫生组织(WHO)统计,全球每年约2000万患者死于心血管疾病,是人类死亡的第一病因,尤其以急性心肌梗死为甚。急性心肌梗死后,及时高效地恢复冠状动脉血流是治疗的主要策略。但在心肌缺血再灌注血流复流的过程中有时会加重心肌组织的额外损伤,造成缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, I/RI)。众多的临床观察发现心肌缺血再灌注会加重心肌损伤,并伴有心肌氧化损伤及心肌细胞过度凋亡等病理变化过程,是心血管疾病冠状动脉再灌注后危害患者健康的重要危险因素。为了提高心肌缺血再灌注患者预后,防治心肌缺血再灌注损伤是亟待解决的问题。

目前,研究发现缺血再灌注损伤机制主要包括氧自由基产生过多、细胞内Ca<sup>2+</sup>超载及白细胞的激活。尽管目前机制较为明了,但基于缺血再灌注损伤病理生理过程的复杂性,尚无明确改善心肌缺血再灌注损伤的有效治疗方案。故而探索心肌缺血再灌注损伤的病理生理过程及新的治疗方法尤为重要。研究表明,缬沙坦作为血管紧张素II型受体阻滞剂(angiotensin II receptor blocker, ARB),具有抑制缺血再灌注炎症反应及细胞凋亡而减轻大鼠模型中的心肌缺血再灌注损伤的作用<sup>[1-2]</sup>。阿利吉仑(Aliskiren)作为第二代非肽类肾素抑制剂,是第一种口服有效的肾素抑制剂。在动物模型中,阿利吉仑可增加一氧化氮(nitric oxide, NO)的生物利用度、增加血浆缓激肽水平,并抑制动脉粥样硬化,减少心肌梗死面积及改善心肌左心室重塑,同时具有改善心肌缺血再灌注的作用<sup>[3]</sup>。阿利吉仑相比血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)或ARB药物具有从源头上阻断肾素血管紧张素系统(renin-angiotensin-aldosterone, RAAS)避免“醛固酮逃逸现象”的优势,且具有改善心肌缺血再灌注损伤的作用。一项阿利

吉仑与安慰剂(ACEI或ARB)相比较的临床试验表明:阿利吉仑较ACEI或ARB具有更强的抑制左心室重构(left ventricular remodeling, LVR)缩小心肌梗死面积及改善缺血再灌注损伤的作用<sup>[4]</sup>。鉴于临床上观察到的阿利吉仑对于缩小心肌细胞梗死灶及抑制左心室重构的药物效果,故而探究心肌缺血再灌注损伤,寻找治疗靶点对于临床上挽救心肌、改善心肌功能具有重要意义。本研究通过体外构建心肌细胞缺血再灌注模型,旨在细胞水平验证阿利吉仑保护心肌缺血再灌注损伤的效果,并探究其中涉及的病理生理过程。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料及来源

心肌H9c2细胞株购自Procell公司,阿利吉仑购于APEXBio公司,NF- $\kappa$ B P65抑制剂bay11-7082来源于InvivoGen公司,DMEM高糖培养基购于Biowest公司,青链霉素混合液(100 $\times$ )从GIBCO公司购买,Hoechst33258染色试剂盒由BIOFIL公司提供,Annexin V-FITC/PI由Abnova公司提供,ELISA试剂盒和JC-1试剂盒由ABCAM公司提供,Caspase-3活性试剂盒由Abbkine公司提供,胎牛血清从GIBCO公司购买。主要的仪器包括流式细胞仪(Beckman Coulter Brea,美国)、低氧培养箱(中首嘉莘科技有限公司)、荧光倒置显微镜(Leica DMi8,德国)、多功能酶标仪Spectra Max M2(Molecular Devices Corp,美国)。

### 1.2 细胞实验的分组及缺氧复氧模型的构建

将细胞实验分为正常氧供应组即对照组(Control)、缺氧复氧组(H/R组)、阿利吉仑+H/R组(心肌细胞缺氧诱导后加入阿利吉仑,然后进行复氧处理)、NF- $\kappa$ B P65特异抑制剂bay11-7082+H/R组

(心肌细胞缺氧诱导后加入 bay11-7082 然后进行复氧处理)。将细胞以  $1 \times 10^6$  个/孔的密度转移至 6 孔培养板,将细胞分为四组。用不含 FBS 和葡萄糖的 DMEM 代替正常培养基,并将细胞置于  $37^\circ\text{C}$  的低氧温箱中( $95\% \text{N}_2$ ;  $5\% \text{CO}_2$ ) 中 12 h。然后用含 10% FBS 的普通培养基将细胞再充氧 3 h。在整个实验过程中,对照组均用完全培养基处理。

### 1.3 CCK-8 酶标仪检测细胞存活率

将对数生长期的心肌细胞接种于 96 孔板,每孔加入细胞悬液  $150 \mu\text{L}$ (同时设置 6 个复孔)放入培养箱中培养 24~48 h 后低氧处理 12 h。对细胞进行复氧,时间分别为 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h,然后在每个孔中加入  $15 \mu\text{L}$  CCK-8 试剂孵育 60 min,酶标仪检测 450 nm 处吸光度;当心肌细胞的活性明显下降后而随着时间的增加不再有明显改变时,此时的复氧时间为本研究的最佳复氧时间。在最佳复氧时间确定后,将不同浓度(0、5、10、20、40、80 mmol/L)阿利吉仑加入缺氧 12 h 后的心肌细胞中进行复氧处理,然后用酶标仪检测 450 nm 处各孔的吸光度。细胞存活率 =  $(A_{\text{实验组孔}} - A_{\text{空白组孔}}) / (A_{\text{对照组孔}} - A_{\text{空白组孔}})$ 。

### 1.4 ELISA 法检测白细胞介素 6(IL-6)及肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 水平

按照产品的说明书配制标准品工作液,设置标准孔与待测样品孔。标准孔各加标准品  $50 \mu\text{L}$ ,加入  $10 \mu\text{L}$  待测样品后,再加入  $40 \mu\text{L}$  的样本稀释液混匀。将样品加于酶标板孔底部。在  $37^\circ\text{C}$  恒温摇床上孵育 90 min;吸干液体后在每孔加入  $50 \mu\text{L}$  生物素标记的抗体,在  $37^\circ\text{C}$  摇床上孵育 60 min;再次甩干各孔的液体后,使用适量洗涤液洗 3 次;然后加入  $50 \mu\text{L}$  辣根过氧化物酶(HRP),置于  $37^\circ\text{C}$  温箱孵育 30 min;在每孔各加入  $50 \mu\text{L}$  底物 A、B,轻轻振荡后,于  $37^\circ\text{C}$  温箱孵育 15 min 左右,定时观察每孔反应的颜色;取出酶标板,迅速加入  $50 \mu\text{L}$  反应终止液,在酶标仪 450 nm 处测待测样品的浓度。

### 1.5 Hoechst33258 染色

将干净的盖玻片置于 6 孔板内,种入细胞培养过夜,培养至 50%~80% 满。造模后经不同实验方法刺激细胞,吸尽培养液,加入 0.5 mL 甲醛固定液,固定 10 min 或更长时间。去固定液,用 PBS 洗两遍,每次 3 min。加入 0.5 mL Hoechst33258 染色液,染色 5 min。用 PBS 洗两遍,每次 3 min。滴一滴抗荧光淬灭封片液在载玻片上,盖上盖玻片。使用荧光显微镜可检测到呈蓝色的细胞核。

### 1.6 Annexin V/PI 流式细胞仪检测细胞凋亡

细胞造模及实验干预处理后,加入胰蛋白酶消化,待显微镜下观察细胞变圆、漂浮,加入血清蛋白终止消化后收集液体,  $800 \text{ r/min}$  离心 5 min 后收集细胞;弃上清及加入 PBS 重悬细胞,再次离心,重复操作 2 次;取 Falcon 试管,按标本顺序编好阴性对照管和标本管号。洗细胞两次,再用  $1 \times$  Binding Buffer 缓冲液制成  $1 \times 10^9$  cells/L 的悬液。将收集的细胞经滤过膜滤过后,在 Falcon 试管中加入  $100 \mu\text{L}$  细胞悬液。加入适量的 Annexin V 与 PI 染色剂,混合均匀后,置于室温  $25^\circ\text{C}$  左右静置 1 h。各试验管中分别加入  $1 \times$  Binding Buffer 缓冲液  $400 \mu\text{L}$ 。1 h 内上流式细胞仪测定结果。

### 1.7 JC-1 试剂盒测量线粒体膜电位及 ATP 含量

按说明书配制 JC-1 染色工作液设置阳性对照:把试剂盒中提供的 CCCP(10 mmol/L)推荐按照 1:1 000 的比例加入到细胞培养液中,稀释至  $10 \mu\text{mol/L}$  处理 20 min。对于 6 孔板,吸除培养液,用 PBS 洗涤细胞一次,加入 1 mL 细胞培养液。加入 1 mL JC-1 染色工作液,充分混匀。细胞培养箱孵育 20 min。在孵育期间,配制适量的 JC-1 染色缓冲液(1 $\times$ )。孵育结束后,吸除上清,用 JC-1 染色缓冲液(1 $\times$ )洗涤 2 次,加入 Binding Buffer 后流式细胞仪处理检测 ATP 含量。酶标仪检测荧光。

### 1.8 Caspase-3 试剂盒检测 Caspase-3 活性

按照产品说明书测定 pNA 标准曲线。吸取细胞培养液,用胰酶消化贴壁细胞,并收集至备用的细胞培养液中。 $600 \text{ g}$  离心 5 min 收集细胞,吸除上清,PBS 洗涤。重悬沉淀后加入裂解液裂解 15 min。然后转移至离心机离心 15 min,将上清液转移离心管,测定 Caspase-3 的酶活性。在上清液中加入 Ac-DEVD-pNA(2 mmol/L)混匀,置于  $37^\circ\text{C}$  温箱中孵育 60~120 min。当发现颜色变化明显时,通过酶标仪检测波长为 405 nm 的 OD 值。样品的  $\text{OD}_{405}$  减去空白对照的  $\text{OD}_{405}$ ,即为样品中 Caspase-3 的 pNA 值。根据标准曲线计算出样品的 pNA。通过计算实验组 Caspase-3 值与对照组 Caspase-3 值的比值来反应 Caspase-3 的变化程度。

### 1.9 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件对数据进行统计分析。计量资料采用  $(\bar{x} \pm s)$  表示。方差分析(ANOVA)用于检测多组间的差异,Student-Newman-Keuls(SNK)- $q$  检验用于检测两组间差异。 $P < 0.05$  表示有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 最佳的缺氧复氧时间和最佳阿利吉仑浓度

通过 CCK-8 酶标仪测量各组实验处理后的吸光度从而确定各组的细胞活力。本研究结果发现: 相比缺氧 12 h 还未进行复氧的细胞, H9c2 细胞在复氧 3 h 时, 细胞活力显著下降 [ (41.50%±1.50%) 比 (74.80%±1.66%)  $P<0.05$  ], 而随着复氧时间的增

加, 各组实验细胞活性虽有降低, 但差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。阿利吉仑小于 20 mmol/L 时, 与心肌细胞活性存在正相关关系, 而在 20 mmol/L 和 80 mmol/L 之间, 两者之间存在负相关关系, 本研究阿利吉仑的最佳处理浓度为 20 mmol/L, 此时心肌细胞活性最高 (76.40%±1.64%)。综合上述研究结果得出: 本研究最合适的复氧时间和阿利吉仑处理浓度分别为 3 h 和 20 mmol/L (图 1)。

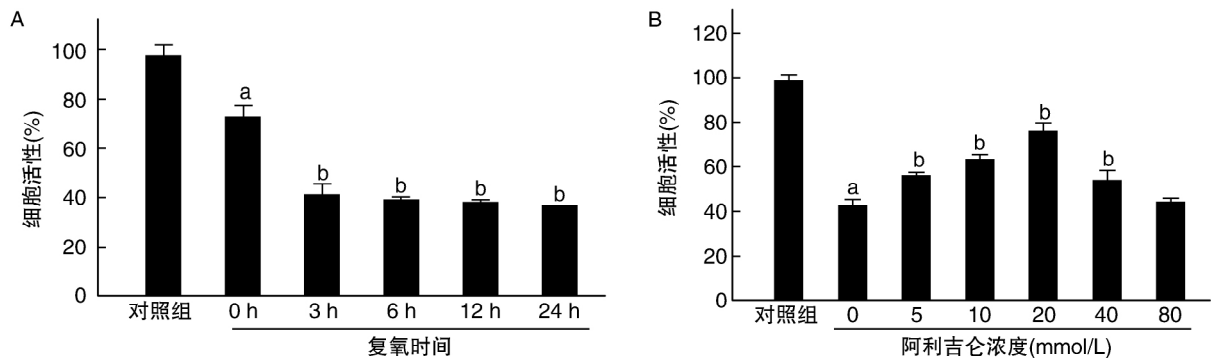


图 1. 复氧时间 (A) 和阿利吉仑浓度 (B) 与细胞活性的关系比较。

a 为  $P<0.05$  与对照组比较; b 为  $P<0.05$  与 0 h 或 0 mmol/L 阿利吉仑

Figure 1. Relationship between reoxygenation time (A), Aliskiren concentration (B) and cell activity

### 2.2 阿利吉仑降低缺氧复氧诱导的心肌细胞炎症因子水平

研究表明, 炎症细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 参与了心肌 I/R 损伤的疾病发展及病理生理过程<sup>[5]</sup>。本研究结果发现, 与对照组相比, H/R 诱导能明显增加心肌细胞 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的水平 ( $P<0.05$ ); 与 H/R 组比较, 使用阿利吉仑和 NF- $\kappa$ B P65 抑制剂 bay11-7082 进行预处理后能明显降低 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平 ( $P<0.05$ ); 然而在阿利吉仑+H/R 组与 bay11-7082+H/R 组之间, TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达无统计学差异 ( $P>0.05$ ; 表 1)。表明阿利吉仑能降低心肌细胞缺血再灌注后炎症因子的水平。

表 1. 阿利吉仑对 H/R 后炎症因子的影响

Table 1. Effects of Aliskiren on inflammatory factors after H/R

分组	TNF- $\alpha$ ( ng/L)	IL-6( ng/L)
对照组	54.67±3.21	12.03±1.05
H/R 组	319.00±4.58 <sup>a</sup>	64.67±2.08 <sup>a</sup>
阿利吉仑+H/R 组	129.33±5.86 <sup>ab</sup>	29.67±1.53 <sup>ab</sup>
bay11-7082+H/R 组	126.77±1.53 <sup>ab</sup>	26.00±2.00 <sup>ab</sup>

a 为  $P<0.05$  与对照组比较; b 为  $P<0.05$  与 H/R 组比较。

### 2.3 阿利吉仑和 NF- $\kappa$ B P65 抑制剂可通过线粒体途径降低 H/R 刺激的凋亡水平

2.3.1 阿利吉仑降低细胞凋亡数量及比率 Ho-echst33258 荧光染色结果表明, 与对照组相比, H/R 诱导后的大鼠心肌 H9c2 细胞的荧光明显较强, 且蓝染细胞核的细胞明显较多。相比 H/R 组, 阿利吉仑+H/R 组和 bay11-7082+H/R 组的凋亡细胞数量减少、凋亡信号减弱 (图 2)。

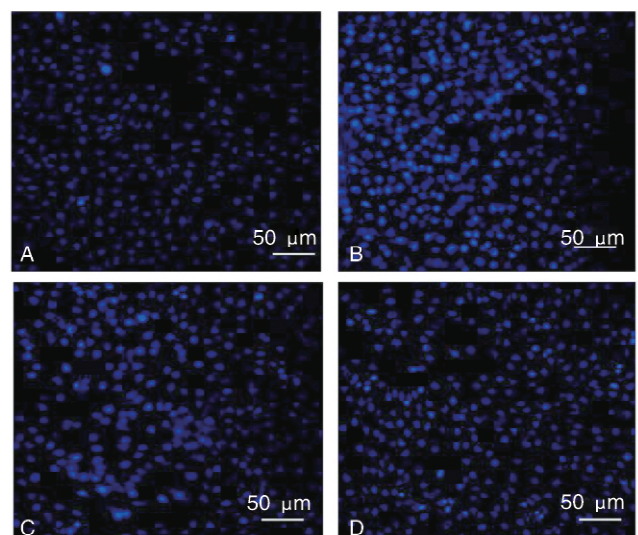


图 2. 心肌细胞 Hoechst33258 荧光染色结果 A 为对照组, B 为 H/R 组, C 为阿利吉仑+H/R 组, D 为 bay11-7082+H/R 组。

Figure 2. Hoechst33258 results of myocardial cells in each group

与对照组相比, H/R 组心肌细胞凋亡率显著增加 [ (32.25% ± 3.15%) 比 (6.20% ± 1.14%) ,  $P < 0.05$  ]。同时阿利吉仑+H/R 组 (7.23% ± 1.14%) 和 bay11-7082+H/R 组 (7.31% ± 0.86%) 心肌细胞凋亡

率则较 H/R 组明显减少 ( $P < 0.05$ ) , 且两组之间无统计学差异 ( $P > 0.05$  图 3)。综上所述阿利吉仑能降低 H/R 诱导的心肌细胞凋亡。

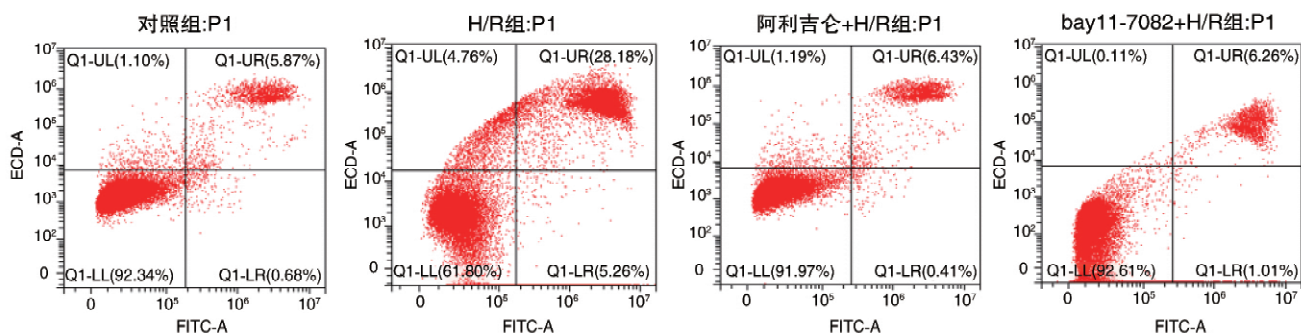


图 3. 心肌细胞流式细胞凋亡率结果

Figure 3. Flow cytometry analysis of the apoptotic rate in four groups

2.3.2 阿利吉仑抑制凋亡执行蛋白酶 Caspase-3 活性 与对照组相比, H/R 组 Caspase-3 活性显著升高 [ (3.26 ± 0.62) 比 1 ,  $P < 0.05$  ]。然而与 H/R 组比较, 阿利吉仑处理组 (2.26 ± 0.35) 和 bay11-7082 处理组 (2.13 ± 0.23) 均明显降低了 H/R 诱导的 H9c2 细胞 Caspase-3 蛋白酶活性 ( $P < 0.05$ ) , 且两组之间无统计学差异 ( $P > 0.05$  , 图 4)。以上结果提示阿利吉仑能抑制 H/R 诱导的大鼠心肌细胞凋亡蛋白酶 Caspase-3 活性, 从而抑制凋亡执行。

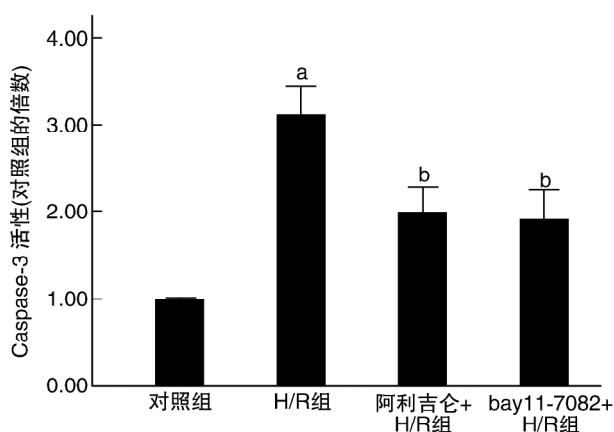


图 4. H9c2 细胞的 Caspase-3 活性 a 为  $P < 0.05$  , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$  , 与 H/R 组比较。

Figure 4. Caspase-3 activity of H9c2 cells in four groups

2.3.3 阿利吉仑提高心肌细胞 ATP 含量及稳定线粒体膜电位 当细胞缺氧状态时, 细胞 ATP 含量下降。对心肌细胞进行 JC-1 染色后行流式细胞术检测, 正常未发生凋亡的细胞位于 A2 门框外, 具有足

量的 ATP, 而居 A2 门框内的橙红色细胞则是 ATP 含量水平下降的细胞。在图 5A 中结果发现, 与对照组相比, H/R 组中居于 A2 区域中的红色荧光细胞所占比例显著增多 [ (13.5% ± 1.7%) 比 (4.3% ± 1.2%) ,  $P < 0.05$  ]; 而给予阿利吉仑 (6.9% ± 1.6%) 或 NF- $\kappa$ B P65 抑制剂 bay11-7082 (5.5% ± 1.5%) 后, 两组位于 A2 区域中的红色荧光细胞所占比例均下降 ( $P < 0.05$ ) , 且两组之间无统计学差异 ( $P > 0.05$  ; 图 5A)。

与对照组相比, H/R 组 H9c2 细胞线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential,  $\Delta\psi_m$ ) 明显降低 [ (1.80 ± 0.16) 比 (5.53 ± 0.38) ,  $P < 0.05$  ]。在阿利吉仑或 bay11-7082 处理后, 与 H/R 组相比, 阿利吉仑+H/R 组 (3.90 ± 0.60) 及 bay11-7082+H/R 组 (3.66 ± 0.96) 心肌细胞的线粒体膜电位明显升高 ( $P < 0.05$ ) , 且两者之间无统计学差异 ( $P > 0.05$  , 图 5B)。以上结果提示阿利吉仑能增加 H/R 刺激下心肌细胞线粒体的 ATP 含量及稳定线粒体膜电位水平。

### 3 讨论

据统计, 2019 年中国约有 54 万人死于心脏猝死, 解决心血管疾病及其所带来的并发症是提高人民卫生健康的一大策略。目前对于治疗心肌梗死的最主要策略是尽早恢复冠状动脉血流、挽救濒死心肌减少并发症改善心肌功能。然而血流再通所导致的缺血再灌注损伤大大限制了治疗效果, 其中



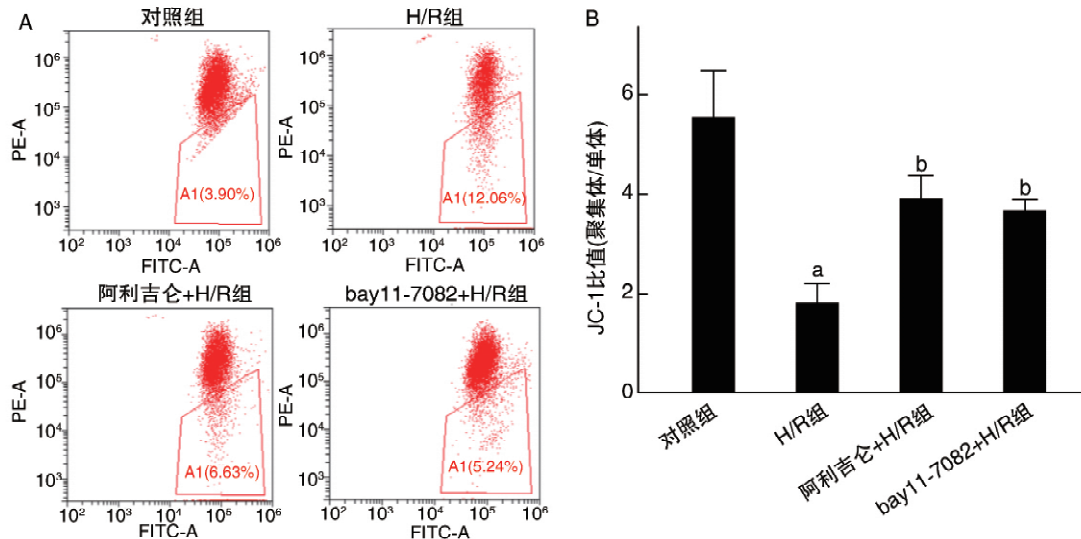


图 5. JC-1 染色流式细胞仪检测 ATP 含量 (A) 及线粒体膜电位水平 (B) a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 H/R 组比较。

Figure 5. ATP content (A) and mitochondrial membrane potential results (B) measured by flow cytometer with JC-1 staining in each group

冠状动脉血流再通后 1 年内仍有 9% 的病死率以及 10% 的心力衰竭发病率<sup>[6]</sup>。虽然随着胸痛中心的建立、心肌梗死患者绿色通道的开通、早期的支架介入治疗以及临床上新型抗血小板制剂(如阿昔单抗、替格瑞洛)等的发展,心肌缺血再灌注损伤治疗已经大大得到了优化,然而目前对于接受 PCI 治疗的患者,仍然无明确有效的预防心肌再灌注损伤的治疗措施。故而探究心肌缺血再灌注损伤,寻找治疗靶点对于临床上挽救心肌、改善心肌功能具有重要意义。

本研究中,阿利吉仑小于 20 mmol/L 时,与心肌细胞活性存在正相关关系,而在 20 mmol/L 和 80 mmol/L 之间,两者之间存在负相关关系,本研究阿利吉仑的最佳处理浓度为 20 mmol/L,此时心肌细胞活性最高,这一结果与其他文献报道一致<sup>[7]</sup>。而当浓度在 40 mmol/L 至 80 mmol/L 之间,细胞活性反降低,阿利吉仑与细胞活力之间的关系表明阿利吉仑药物效应存在最佳治疗浓度。近年来,有部分国外临床试验报道得出结论:阿利吉仑对于改善急性心肌梗死后心肌缺血再灌注损伤患者的心肌功能和左心室重构(LVR)没有明显的收益甚至有危害作用<sup>[8-9]</sup>。然而绝大多数研究支持的结论是:阿利吉仑可通过其潜在机制改善心肌细胞缺血再灌注损伤。其中可能的解释是,低剂量阿利吉仑不足以维持 RAAS 系统持续的抑制作用,而高剂量的阿利吉仑存在“药物溢出作用”而引起相应的不良反应<sup>[10]</sup>。目前对于最佳浓度的确定,仍需要更多的临

床及实验数据来证实。

从坏死心肌细胞或激活后白细胞释放的炎症因子是凋亡信号,具有启动凋亡程序的作用,炎症因子被认为是评估心肌缺血再灌注损伤的生物标志物。当心肌细胞发生坏死时,炎症细胞如嗜中性粒细胞和巨噬细胞在趋化因子的作用下被募集于梗死灶,并释放 TNF- $\alpha$  和 IL-6 等炎症因子,从而加重心肌缺血再灌注损伤。据报道,无论是体内还是体外,炎症反应触发的凋亡信号转导而导致的心肌细胞凋亡在心肌缺血再灌注损伤过程中都进一步损伤了缺血性心肌细胞<sup>[11]</sup>。NF- $\kappa$ B 是细胞内重要的转录因子,在心肌缺血再灌注损伤诱导的细胞凋亡和引发炎症因子级联反应中起着重要作用<sup>[12-13]</sup>。为探索炎症反应在心肌缺血再灌注的表达,ELISA 法检测炎症细胞因子,结果表明,在 H/R 组中表达则明显增加,而阿利吉仑和 NF- $\kappa$ B 抑制剂预处理后心肌细胞炎症细胞因子(TNF- $\alpha$  和 IL-6)的水平均明显下调,且两组之间无统计学差异。从中可以推测,阿利吉仑下调炎症因子的表达可能是通过抑制 NF- $\kappa$ B 调控的。

有趣的是,各组心肌细胞凋亡的表达情况与 TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达一致。当细胞发生凋亡后,Annexin V-FITC 和 PI 能进入细胞内,通过流式细胞仪检测计算出发生凋亡细胞比率。为评估四组之间心肌细胞凋亡比率,我们采用了 Annexin V-FITC 和 PI 双染后流式细胞术和 Hoechst33258 染色荧光显微镜观察,结果表明与对照组相比,H/R 诱导刺

激后心肌细胞凋亡数量明显增多,而阿利吉仑及 NF- $\kappa$ B 抑制剂 bay11-7082 预处理则明显降低 H/R 诱导的凋亡心肌细胞数量及比率。线粒体介导的细胞凋亡是凋亡执行的重要细胞信号转导通路之一。对细胞进行线粒体膜电位检测可评估细胞线粒体功能状态,评估细胞凋亡。本研究中进行了亲脂性和阳离子性 JC-1 染色剂的测定,以确定 H9c2 细胞的线粒体功能,其结果以红色(聚集体 JC-1)和绿色(单体 JC-1)荧光之间的比率表示。结果表明与对照组相比,H/R 组心肌细胞的线粒体膜电位较低及 ATP 含量较低的细胞比率较多,然而阿利吉仑或 bay11-7082 预处理可提高心肌细胞的线粒体膜电位及 ATP 含量,且两组之间无统计学差异。在细胞凋亡过程中,线粒体受体介导的细胞凋亡途径是重要信号转导通路,而线粒体膜电位降低是凋亡早期主要事件之一,触发呼吸链的解偶联,细胞氧自由基增加,促凋亡蛋白如细胞色素 C、促凋亡因子(AIF)的释放增加及激活 Caspase 级联反应。本研究中,H/R 组 Caspase-3 活性较对照组明显升高,而在阿利吉仑+H/R 组和 bay11-7082+H/R 组中则明显比 H/R 组低,且前两组间无明显统计学差异。凋亡执行者 Caspase-3 是 H9c2 细胞凋亡的早期标志物,具有反映及预测凋亡的作用<sup>[14]</sup>。在细胞增殖的内和在和外在途径以及程序性细胞死亡中起关键作用。Caspase-3 的检测是早期检测某些凋亡相关疾病的关键分子,具有预测的功能<sup>[15]</sup>。综上可知,在细胞凋亡调控中,阿利吉仑具有稳定线粒体膜电位、维持线粒体能量代谢从而通过线粒体介导的信号通路抑制细胞凋亡,提高心肌细胞的活性及存活心肌细胞数量,并推测阿利吉仑的调控凋亡作用可能与 NF- $\kappa$ B 表达抑制有关。

总而言之,我们目前的体外研究有助于从减轻心肌细胞凋亡方面更好地探究阿利吉仑对改善心肌缺血再灌注损伤的作用。实验结果说明,阿利吉仑可以通过抑制炎症反应、调控线粒体受体介导的凋亡,改善缺血心肌细胞缺血再灌注损伤,且根据实验结果可推测阿利吉仑的调控凋亡作用可能与 NF- $\kappa$ B 表达抑制有关。

#### 【参考文献】

[1] White CM, Greene L. Summary of AHRQ's comparative effectiveness review of angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin II receptor blockers added to standard medical therapy for treating stable ischemic heart disease [J]. *J Manag Care Pharm*, 2011, 17(5

Suppl): S1-S15.

- [2] Savarese G, Costanzo P, Cleland JG, et al. A Meta-analysis reporting effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers in patients without heart failure [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 61(2): 131-142.
- [3] Koid SS, Ziogas J, Campbell DJ. Aliskiren reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by a bradykinin B2 receptor-and angiotensin AT2 receptor-mediated mechanism [J]. *Hypertension*, 2014, 63(4): 768-773.
- [4] Solomon SD, Shin SH, Shah A, et al. Effect of the direct renin inhibitor aliskiren on left ventricular remodelling following myocardial infarction with systolic dysfunction [J]. *Eur Heart J*, 2011, 32(10): 1227-1234.
- [5] 罗峰, 苏强. 心肌缺血再灌注损伤防治的研究现状及展望 [J]. *广东医学*, 2019, 40(2): 305-307.
- [6] Chiang MH, Liang CJ, Liu CW, et al. Aliskiren improves ischemia-and oxygen glucose deprivation-induced cardiac injury through activation of autophagy and AMP-activated protein kinase [J]. *Front Pharmacol*, 2017. DOI: 10.3389/fphar.2017.00819
- [7] Zeymer U, Dechend R, Riemer T, et al. Two-year outcomes of patients treated with aliskiren under clinical practice conditions: non-interventional prospective study [J]. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2016, 18(7): 647-654.
- [8] Luo Y, Chen Q. Efficacy of aliskiren supplementation for heart failure: A Meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Herz*, 2019, 44(5): 398-404.
- [9] Ozaki Y, Imanishi T, Tanimoto T, et al. Effect of direct renin inhibitor on left ventricular remodeling in patients with primary acute myocardial infarction [J]. *Int Heart J*, 2014, 55(1): 17-21.
- [10] Tian XH, Liu CL, Jiang HL, et al. Cardioprotection provided by Echinatin against ischemia/reperfusion in isolated rat hearts [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2016. DOI: 10.1186/s12872-016-0294-3.
- [11] Li H, Zhang S, Li F, et al. NLRX1 attenuates apoptosis and inflammatory responses in myocardial ischemia by inhibiting MAVS-dependent NLRP3 inflammasome activation [J]. *Mol Immunol*, 2016, 43(3): 7690-7697.
- [12] Shimamoto A, Chong AJ, Yada M, et al. Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Circulation*, 2006, 114(1 Suppl): I270-I274.
- [13] Ding HS, Yang J, Chen P, et al. The HMGB1-TLR4 axis contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury via regulation of cardiomyocyte apoptosis [J]. *Gene*, 2013, 527(1): 389-393.
- [14] Gao X, Zhang H, Zhuang W, et al. PEDF and PEDF-derived peptide 44mer protect cardiomyocytes against hypoxia-induced apoptosis and necroptosis via anti-oxidative effect [J]. *Sci Rep*, 2014. DOI: 10.1038/srep05637.
- [15] Khalilzadeh B, Shadjou N, Kanberoglu GS, et al. Advances in nanomaterial based optical biosensing and bioimaging of apoptosis via Caspase-3 activity: a review [J]. *Mikrochim Acta*, 2018, 185(9): 434.

(此文编辑 许雪梅)