

中图分类号: R965; R972 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)03-0074-07  
doi: 10.3969/j.issn.1006-4931.2024.03.016



# 沙库巴曲缬沙坦对慢性心力衰竭模型小鼠心功能的影响及其作用机制\*

陈静静, 吉秋霞<sup>△</sup>

(南通大学附属海安医院, 江苏 南通 226600)

**摘要:**目的 探讨沙库巴曲缬沙坦对慢性心力衰竭(CHF)模型小鼠心功能的影响及其作用机制。方法 通过主动脉缩窄术复制 CHF 模型小鼠, 将 40 只建模成功的小鼠分为模型组(B 组)、沙库巴曲缬沙坦组(C 组)、沙库巴曲缬沙坦 + EX - 527 组(D 组)、沙库巴曲缬沙坦 + Compound C 组(E 组), 各 10 只; 另取 10 只仅开胸未手术小鼠作为对照组(A 组)。C 组、D 组、E 组小鼠均灌胃 68 mg/kg 沙库巴曲缬沙坦(连续 4 周), D 组和 E 组小鼠另分别腹腔注射 1 次 5 mg/kg 沉默信息调节因子 2 相关酶类 1(Sirt1)抑制剂 EX - 527 和 20 mg/kg 腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)抑制剂 Compound C; A 组和 B 组小鼠均分别灌胃、腹腔注射等量生理盐水。测定小鼠超声心动图指标左室射血分数(LVEF)、左室收缩末期内径(LVESd)、左室舒张末期内径(LVEDd); 苏木精 - 伊红(HE)染色, 观察小鼠的心肌组织病理形态; 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测小鼠血浆肌酸激酶 MB 型同工酶(CK - MB)、心肌肌钙蛋白 I (cTn I)、白细胞介素 6(IL - 6)、肿瘤坏死因子 -  $\alpha$ (TNF -  $\alpha$ )、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH - Px)水平; 采用 TUNEL 法计数小鼠凋亡心肌细胞; 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT - PCR)法和免疫印迹(Western blot)法测定小鼠心肌组织胱天蛋白酶 3(caspase - 3)、Sirt1、AMPK、过氧化物酶体增殖体激活受体  $\gamma$  辅助激活因子 - 1 $\alpha$ (PGC - 1 $\alpha$ ) mRNA 和蛋白表达水平。结果 与 B 组比较, C 组小鼠心肌细胞变性、炎性细胞浸润程度减轻; LVEF, 血浆 SOD 和 GSH - Px 水平, 心肌组织 Sirt1, AMPK, PGC - 1 $\alpha$  mRNA 和蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.05$ ); LVEDd, LVESd, 血浆 CK - MB, cTn I, IL - 6, TNF -  $\alpha$ , MDA 水平, 心肌细胞凋亡率, 心肌组织 caspase - 3 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低( $P < 0.05$ )。与 C 组比较, D 组、E 组小鼠心肌损伤程度加重; LVEF, 血浆 SOD 和 GSH - Px 水平, 心肌组织 Sirt1, AMPK, PGC - 1 $\alpha$  mRNA 和蛋白表达水平均显著降低( $P < 0.05$ ); LVEDd, LVESd, 血浆 CK - MB, cTn I, IL - 6, TNF -  $\alpha$ , MDA 水平, 心肌细胞凋亡率, 心肌组织 caspase - 3 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.05$ )。结论 沙库巴曲缬沙坦可能通过激活 Sirt1/AMPK/PGC - 1 $\alpha$  信号通路而影响 CHF 模型小鼠的心功能。

**关键词:** 沙库巴曲缬沙坦; 慢性心力衰竭; 沉默信息调节因子 2 相关酶类 1; 腺苷酸活化蛋白激酶; 过氧化物酶体增殖体激活受体  $\gamma$  辅助激活因子 - 1 $\alpha$

## Effect and Mechanism of Sacubitril Valsartan on Cardiac Function in Chronic Heart Failure Model Mice

CHEN Jingjing, Ji Qiuxia

(Hai'an Hospital Affiliated to Nantong University, Nantong, Jiangsu, China 226600)

**Abstract: Objective** To investigate the effect and mechanism of sacubitril valsartan on cardiac function in chronic heart failure (CHF) model mice. **Methods** CHF model mice were replicated through aortic constriction surgery. Forty successfully modeled mice were divided into the model group (group B), sacubitril valsartan group (group C), sacubitril valsartan + EX - 527 group (group D), and sacubitril valsartan + Compound C group (group E), with 10 mice in each group; another 10 mice without surgery were selected as the control group (group A). Mice in groups C, D, and E were orally administered 68 mg/kg of sacubitril valsartan (for four weeks). Additionally, mice in groups D and E were intraperitoneally injected with 5 mg/kg of silent mating type information regulation 2 homolog 1 (Sirt1) inhibitor EX - 527 and 20 mg/kg of adenosine monophosphate - activated protein kinase (AMPK) inhibitor Compound C, respectively. Mice in groups A and B were given an equal volume of normal saline by gavage and intraperitoneal injection, respectively. The echocardiography indicators such as left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular end - systolic diameter (LVESd), and left ventricular end - diastolic diameter (LVEDd) of mice were measured. Hematoxylin - eosin (HE) staining was used to observe the histopathological morphology of myocardium. Enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of plasma creatine kinase MB type isoenzyme (CK - MB), cardiac troponin I (cTn I), interleukin - 6 (IL - 6), tumor necrosis factor -  $\alpha$  (TNF -  $\alpha$ ), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and glutathione peroxidase (GSH - Px). TUNEL method was used to determine the apoptosis of

\* 基金项目: 2021 年度江苏省南通市卫生健康委员会科研课题[QB2021028]。

第一作者: 陈静静, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为医院药学, (电子信箱)dum4073@163.com。

<sup>△</sup>通信作者: 吉秋霞, 女, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为临床药学与中药药理学, (电子信箱)yezu717@163.com。

cardiomyocytes. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot were used to determine the expression levels of caspase-3, Sirt1, AMPK, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 $\alpha$ ) mRNA and protein in myocardial tissue of mice. **Results** Compared with those in group B, the degree of myocardial cell degeneration and inflammatory cell infiltration in group C reduced, the levels of LVEF, plasma SOD and GSH-Px, and the expression levels myocardial tissue Sirt1, AMPK, PGC-1 $\alpha$  mRNA and protein in group C significantly increased ( $P < 0.05$ ), while the LVEDd, LVESd, the levels of plasma CK-MB, cTn I, IL-6, TNF- $\alpha$  and MDA, the myocardial cell apoptosis rate, and the expression levels of caspase-3 mRNA and protein in the myocardium in group C significantly reduced ( $P < 0.05$ ). Compared with those in group C, the degree of myocardial injury in group D and group E increased, the levels of LVEF, plasma SOD and GSH-Px, and the expression levels of myocardial tissue Sirt1, AMPK, PGC-1 $\alpha$  mRNA and protein in group D and group E significantly reduced ( $P < 0.05$ ), while the LVEDd, LVESd, the levels of plasma CK-MB, cTn I, IL-6, TNF- $\alpha$  and MDA, the myocardial cell apoptosis rate, and the expression levels of caspase-3 mRNA and protein in the myocardium in group D and group E significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Sacubitril valsartan may affect the cardiac function of CHF model mice by activating Sirt1 / AMPK / PGC-1 $\alpha$  signaling pathway.

**Key words:** sacubitril valsartan; chronic heart failure; Sirt1; AMPK; PGC-1 $\alpha$

慢性心力衰竭(CHF)是心肌病、炎症等多种原因造成的心肌损伤与心功能下降,临床表现为呼吸困难、体液潴留等,属终末期心脏疾病,严重影响患者的健康<sup>[1-3]</sup>。沙库巴曲缬沙坦为复合药物,其中缬沙坦为血管紧张素受体拮抗剂,沙库巴曲为脑啡肽酶抑制剂,可扩张血管,利尿,逆转心室重构,降低心血管死亡风险<sup>[4-5]</sup>。沉默信息调节因子2相关酶类1(Sirt1)属酰基转移酶家族,通过去乙酰化作用影响多种基因的表达,从而调节细胞功能,与细胞的存活、抗氧化应激、抗炎反应等密切相关。Sirt1通常被认为是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸前体(NAD<sup>+</sup>)依赖性去乙酰化酶,其活性受NAD<sup>+</sup>/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸还原态(NADH)比例的调控,其调节作用涉及组蛋白、转录因子、代谢相关蛋白等多种底物。腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)是一种细胞能量感应酶,当细胞感知到能量不足时,AMPK被磷酸化激活,进而调节多种代谢途径,以促进细胞内的腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)生成,并减少ATP消耗,以维持能量平衡。Sirt1通过与AMPK相互作用,可互相影响其活性<sup>[6-7]</sup>。过氧化物酶体增殖体激活受体 $\gamma$ 辅助激活因子-1 $\alpha$ (PGC-1 $\alpha$ )是AMPK的关键下游因子,通过调控线粒体生物合成和氧化磷酸化等途径,促进心肌细胞的能量代谢,从而维持心脏的正常功能,同时可增强抗氧化防御系统,在心肌细胞中提供更强的抗氧化保护作用,有助于应对氧化应激和减少氧化损伤<sup>[8]</sup>。既往研究显示,激活Sirt1 / AMPK / PGC-1 $\alpha$ 信号通路可改善慢性心力衰竭模型大鼠的心功能<sup>[9]</sup>。目前,临床研究主要集中于沙库巴曲缬沙坦对体液调节的机制上,心肌炎症、细胞凋亡也是CHF的重要表现。故本研究中探讨了沙库巴曲缬沙坦对CHF模型小鼠心功能的影响及其作用机制,为其防治心力衰竭提供新的理论依据和

治疗靶点。现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器、试剂与动物

仪器:vevo 3100型超声成像系统(云南莱博科技有限公司);V5800型荧光显微镜(天津微仪光学仪器有限公司);CFX Opus 96型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(上海旦鼎国际贸易有限公司);iBrite™ FL1500型蛋白凝胶成像系统(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

试剂:沙库巴曲缬沙坦钠片(商品名诺欣妥,Nobartis公司,批号为J20171054,规格为每片100 mg);肌酸激酶MB型同工酶(CK-MB)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号为ml037724),心肌肌钙蛋白I(cTn I)ELISA试剂盒(批号为ml001932),白细胞介素6(IL-6)ELISA试剂盒(批号为ml06159),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )ELISA试剂盒(批号为ml002095),均购自上海酶联生物科技有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号为S0101S),丙二醛(MDA)试剂盒(批号为S0131S),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(批号为S0056),均购自上海碧云天生物技术有限公司;Sirt1抑制剂EX-527(批号为HY-15452),AMPK抑制剂Compound C(批号为HY-13418A),均购自美国Med-ChemExpress公司;兔抗鼠胱天蛋白酶3(caspase-3,批号为ab13847),Sirt1(批号为ab110304),磷酸化AMPK(p-AMPK,批号为ab131357),AMPK(批号为ab32047),磷酸化PGC-1 $\alpha$ (p-PGC-1 $\alpha$ ,批号为ab180235),PGC-1 $\alpha$ (批号为ab191838),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,批号为ab8245),山羊抗兔二抗(批号为ab6721),均购自美国Abcam公司。

动物:SPF级C57/BL6雌性小鼠62只,8周龄,购自广东莱迪生物医药研究院有限公司,动物许可证号为

SCXK(粤)2022-0064。小鼠饲养于指定的无病原体隔离设施中,环境温度为22~24℃,相对湿度为40%~60%,12h/12h明暗交替,正常进食、饮水。本研究方案经我院动物伦理委员会批准(批件号为JSN2020-01201号)。

## 1.2 方法

**造模、分组与给药:**将62只小鼠随机分为对照组(13只)和模型组(49只)。通过主动脉缩窄术构建CHF模型,小鼠经30 mg/kg戊巴比妥钠麻醉,打开左前胸暴露心脏,游离腹主动脉,结扎主动脉,抽离手术针,确认腹主动脉畅通,复位心脏,缝合胸腔<sup>[10]</sup>。术后3d,小鼠腹腔注射青霉素预防感染,以主动脉弓缩窄处血流流速大于2400 mm/s为造模成功。对照组小鼠仅开胸,不进行缩窄操作。造模过程中,小鼠死亡12只,其中对照组3只,模型组9只。将造模成功的40只小鼠随机分为模型组(B组)、沙库巴曲缬沙坦组(C组)、沙库巴曲缬沙坦+EX-527组(D组)、沙库巴曲缬沙坦+Compound C组(E组),各10只;将10只对照组小鼠设为A组。C组、D组、E组小鼠均灌胃68 mg/kg沙库巴曲缬沙坦<sup>[11]</sup>,连续4周;D组、E组小鼠除灌胃沙库巴曲缬沙坦外,另外分别腹腔注射1次5 mg/kg Sirt抑制剂EX-527<sup>[12]</sup>、20 mg/kg AMPK抑制剂Compound C<sup>[13]</sup>,C组小鼠腹腔注射等量生理盐水。A组和B组小鼠均分别灌胃、腹腔注射等量生理盐水。

**心脏超声检测:**末次给药后,采用超声成像系统对小鼠进行超声心动图检测,包括左室射血分数(LVEF)、左室收缩末期内径(LVESd)、左室舒张末期内径(LVEDd),连续记录3个心动周期,取平均值。

**血浆心肌酶、炎症因子、氧化应激水平测定:**超声心动图测定结束后,麻醉小鼠,取心脏血,抗凝,离心,取血浆,冻存。按试剂盒说明书测定CK-MB,cTn I,IL-6,TNF- $\alpha$ ,SOD,MDA,GSH-Px水平。

**心肌组织病理形态观察:**各组随机处死5只小鼠,取心脏,用生理盐水冲洗干净心脏残血,将心脏左室前壁组织固定于4%多聚甲醛中,用乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,2  $\mu$ m切片,进行苏木精-伊红(HE)染色,封片,观察小鼠心肌组织病理形态。

**心肌凋亡情况测定:**将小鼠心肌组织包埋于石蜡,4  $\mu$ m切片,脱蜡至水,用蛋白酶K(不含DNA酶)工作液处理15 min,用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗,加TUNEL反应液,在PBS配制的3%过氧化氢溶液(温度为37℃)中孵育20 min,用PBS漂洗,加50  $\mu$ L TUNEL检测液(红色),37℃遮光孵育60 min,用PBS漂洗,用抗荧光淬灭封片液封片,并于荧光显微镜下观察,计数凋亡细胞。

**心肌组织基因测定:**分离各组另5只小鼠的心肌组

织,一部分冻存,一部分采用TRIzol法提取心肌组织总RNA,用无核糖核酸酶的水溶解,采用分光光度计检测RNA的浓度。用逆转录酶将mRNA逆转录为cDNA,-20℃冻存,用SYBR Green Master Mix进行cDNA扩增,使用不同的引物特异性扩增相应的DNA片段,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示mRNA的相对表达量。引物序列见表1。

表1 引物序列

Tab. 1 Primer sequence

基因	引物序列(5'-3')
caspase-3	F:TGGACAACAACGAAACCTC;R:ACACAAGCCCATTTTCAGG
Sirt1	F:GCTCGCCTTGTCTGTGACTTCC;R:GTGACACAGAGATGGCTGGAACCTG
AMPK	F:TTGCGTGTGCGAAGGAAGAACC;R:CCGATCTCTGTGGACTAGCACTCC
PGC-1 $\alpha$	F:CGGTGGATGAAGACGGATTGCC;R:ATTGTAGCTGAGCTGAGAGTTGCC
GAPDH	F:GTTGTGGCTCTGACATGCT;R:CCCAGGATGCCCTTACT

**小鼠心肌组织蛋白测定:**取冻存的小鼠心肌组织,匀浆,离心,提取总蛋白并检测蛋白浓度,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE);电泳结束后,转膜,封闭,分别加入兔抗鼠caspase-3,Sirt1,p-AMPK,AMPK,p-PGC-1 $\alpha$ ,PGC-1 $\alpha$ ,GAPDH一抗(稀释比GAPDH为1:5000,其余均为1:1000),4℃孵育过夜,TBST洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗稀释液(稀释比为1:5000),室温孵育1h,TBST洗膜。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)法和免疫印迹(Western blot)法测定小鼠caspase-3,Sirt1,AMPK,PGC-1 $\alpha$  mRNA和蛋白表达水平,蛋白凝胶成像系统成像,采用Image Pro Plus 6.0图像软件分析蛋白条带灰度值。

## 1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用SNK-q检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 超声心动图指标

与A组比较,B组小鼠的LVEF水平显著降低( $P < 0.05$ ),LVEDd和LVESd水平均显著升高( $P < 0.05$ );与B组比较,C组小鼠的LVEF水平显著升高( $P < 0.05$ ),LVEDd和LVESd水平均显著降低( $P < 0.05$ );与C组比较,D组、E组小鼠的LVEF水平均显著降低( $P < 0.05$ ),LVEDd和LVESd水平均显著升高( $P < 0.05$ )。详见表2。

### 2.2 心肌酶水平

与A组比较,B组小鼠血浆CK-MB和cTn I水平均显著升高( $P < 0.05$ );与B组比较,C组小鼠血浆CK-MB和cTn I水平均显著降低( $P < 0.05$ );与C组比较,D组、E组小鼠血浆CK-MB和cTn I水平均显著升高( $P < 0.05$ )。详见表3。

表2 各组小鼠超声心动图指标比较( $\bar{X} \pm s, n = 10$ )

Tab. 2 Comparison of echocardiographic indicators of mice in each group ( $\bar{X} \pm s, n = 10$ )

组别	LVEF(%)	LVEDd(mm)	LVESd(mm)
A组	72.39 ± 4.15	6.73 ± 0.54	3.95 ± 0.39
B组	41.56 ± 5.23 <sup>a</sup>	10.45 ± 0.58 <sup>a</sup>	6.76 ± 0.38 <sup>a</sup>
C组	58.62 ± 6.24 <sup>b</sup>	7.64 ± 0.77 <sup>b</sup>	5.02 ± 0.36 <sup>b</sup>
D组	49.15 ± 4.76 <sup>c</sup>	8.43 ± 0.76 <sup>c</sup>	5.53 ± 0.35 <sup>c</sup>
E组	45.72 ± 4.84 <sup>c</sup>	9.84 ± 0.63 <sup>c</sup>	5.95 ± 0.54 <sup>c</sup>

注:与A组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与B组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与C组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。表3至表6、图3同。

Note: Compared with those in group A, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; Compared with those in group B, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; Compared with those in group C, <sup>c</sup> $P < 0.05$  (for Tab. 2 - 6, and Fig. 3).

表3 各组小鼠血浆心肌酶水平比较( $\bar{X} \pm s, n = 10$ )

Tab. 3 Comparison of plasma myocardial enzyme levels of mice in each group ( $\bar{X} \pm s, n = 10$ )

组别	CK-MB(U/L)	cTn I (pg/mL)
A组	95.26 ± 11.84	11.23 ± 1.15
B组	267.49 ± 33.26 <sup>a</sup>	18.76 ± 1.62 <sup>a</sup>
C组	156.72 ± 19.52 <sup>b</sup>	9.24 ± 0.90 <sup>b</sup>
D组	199.60 ± 24.32 <sup>c</sup>	12.05 ± 0.95 <sup>c</sup>
E组	189.71 ± 23.61 <sup>c</sup>	12.95 ± 1.16 <sup>c</sup>

### 2.3 炎症因子水平

与A组比较,B组小鼠血浆IL-6和TNF- $\alpha$ 水平均显著升高( $P < 0.05$ );与B组比较,C组小鼠血浆IL-6和TNF- $\alpha$ 水平均显著降低( $P < 0.05$ );与C组比较,D组、E组小鼠血浆IL-6和TNF- $\alpha$ 水平均显著升高( $P < 0.05$ )。详见表4。

表4 各组小鼠炎症因子水平比较( $\bar{X} \pm s, \text{pg} / \text{mL}, n = 10$ )

Tab. 4 Comparison of inflammatory factor levels of mice in each group ( $\bar{X} \pm s, \text{pg} / \text{mL}, n = 10$ )

组别	IL-6	TNF- $\alpha$
A组	55.28 ± 6.91	80.66 ± 10.08
B组	176.39 ± 22.04 <sup>a</sup>	176.52 ± 22.01 <sup>a</sup>
C组	104.35 ± 13.01 <sup>b</sup>	112.55 ± 14.03 <sup>b</sup>
D组	144.30 ± 18.21 <sup>c</sup>	138.60 ± 16.92 <sup>c</sup>
E组	145.58 ± 18.16 <sup>c</sup>	137.91 ± 17.61 <sup>c</sup>

### 2.4 氧化应激水平

与A组比较,B组小鼠MDA水平显著升高( $P < 0.05$ ),SOD和GSH-Px水平均显著降低( $P < 0.05$ );与B组比较,C组小鼠MDA水平显著降低( $P < 0.05$ ),SOD和GSH-Px水平均显著升高( $P < 0.05$ );与C组比较,D组、E组小鼠MDA水平均显著升高( $P < 0.05$ ),SOD和GSH-Px水平均显著降低( $P < 0.05$ )。详见表5。

表5 各组小鼠氧化应激水平比较( $\bar{X} \pm s, n = 10$ )

Tab. 5 Comparison of oxidative stress levels of mice in each group ( $\bar{X} \pm s, n = 10$ )

组别	SOD(U/mg prot)	MDA(nmol/L)	GSH-Px(U/mg prot)
A组	140.58 ± 17.52	6.72 ± 0.80	350.51 ± 43.16
B组	58.71 ± 7.34 <sup>a</sup>	35.61 ± 4.45 <sup>a</sup>	122.86 ± 15.35 <sup>a</sup>
C组	94.26 ± 11.60 <sup>b</sup>	20.31 ± 2.51 <sup>b</sup>	215.64 ± 26.90 <sup>b</sup>
D组	70.38 ± 8.72 <sup>c</sup>	29.24 ± 3.66 <sup>c</sup>	155.64 ± 19.41 <sup>c</sup>
E组	68.59 ± 8.56 <sup>c</sup>	30.16 ± 3.70 <sup>c</sup>	150.47 ± 18.72 <sup>c</sup>

### 2.5 心肌组织病理

A组小鼠心肌结构完整,排列整齐,未见炎性细胞浸润;B组小鼠心肌存在局灶性坏死,肌纤维间隔变大,炎性细胞浸润明显;C组小鼠心肌细胞变性、炎性细胞浸润程度较B组减轻;D组、E组小鼠心肌损伤程度较C组加重。详见图1。

### 2.6 心肌细胞凋亡情况

与A组比较,B组小鼠细胞凋亡率显著升高( $P < 0.05$ );与B组比较,C组小鼠细胞凋亡率显著降低( $P < 0.05$ );与C组比较,D组、E组小鼠心肌细胞凋亡率均显著升高( $P < 0.05$ )。详见表6和图2。

表6 各组小鼠细胞凋亡率比较( $\bar{X} \pm s, \%, n = 5$ )

Tab. 6 Comparison of apoptosis rate of mice in each group ( $\bar{X} \pm s, \%, n = 5$ )

组别	细胞凋亡率	组别	细胞凋亡率
A组	7.63 ± 0.91	D组	19.26 ± 2.40 <sup>c</sup>
B组	25.42 ± 3.16 <sup>a</sup>	E组	19.77 ± 2.42 <sup>c</sup>
C组	14.39 ± 1.72 <sup>b</sup>		

### 2.7 心肌组织 caspase-3, Sirt1, AMPK, PGC-1 $\alpha$ mRNA 和蛋白表达水平

与A组比较,B组小鼠心肌组织 caspase-3 mRNA

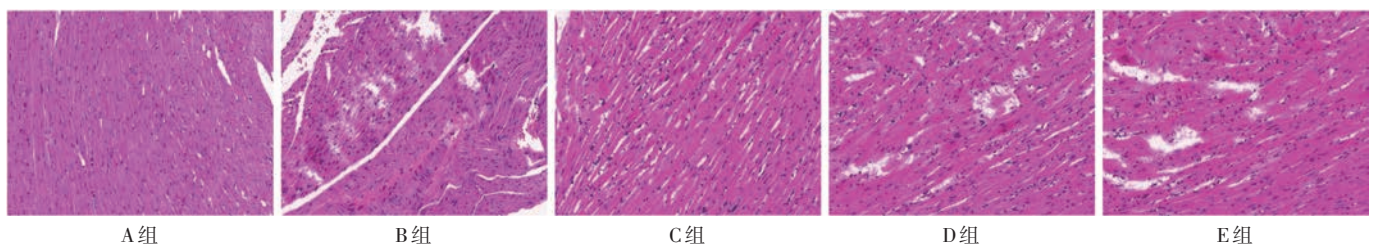


图1 各组小鼠心肌组织病理苏木精-伊红染色图( $\times 200, n = 5$ )

Fig. 1 HE images of myocardial pathology of mice in each group ( $\times 200, n = 5$ )

和蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.05$ ), Sirt1, AMPK, PGC-1 $\alpha$  mRNA和蛋白表达水平均显著降低( $P < 0.05$ );

与B组比较, C组小鼠心肌组织 caspase-3 mRNA和蛋白表达水平均显著降低( $P < 0.05$ ), Sirt1, AMPK, PGC-1 $\alpha$  mRNA和蛋白水平均显著升高( $P < 0.05$ ); 与C组比较, D组、E组小鼠心肌组织 caspase-3 mRNA和蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.05$ ), Sirt1, AMPK, PGC-1 $\alpha$  mRNA和蛋白表达水平均显著降低( $P < 0.05$ )。详见图3。

### 3 讨论

CHF患者心肌结构与功能均发生改变, 心脏泵血不足, 无法为全身提供能量。沙库巴曲缬沙坦可作用于脑啡肽酶、肾素-血管紧张素系统, 发挥利尿、扩张血管、逆转心室重构作用。心室重构是CHF发生、发展的重要机制, 故沙库巴曲缬沙坦可用于治疗CHF, 降低患者心血管死亡的风险。目前, 沙库巴曲缬沙坦对CHF的治疗机制仍不完善, 故本研究中对展开探讨。本研究中成功构建CHF小鼠模型, 表现为主动脉弓缩窄处血液流速大于2400 mm/s。小鼠心肌组织病理HE染色图显示, 小鼠心肌组织存在大量坏死与炎性细胞浸润, 心肌纤维排列紊乱, 细胞凋亡率升高, 与既往研究<sup>[14]</sup>结果一致。经沙库巴曲缬沙坦治疗后, 小鼠心肌损伤程度减轻, 心肌细胞凋亡率降低, 提示沙库巴曲缬沙坦可抑制CHF模型小鼠心肌细胞的凋亡, 保护小鼠的心肌组织, 但具体机制仍有待进一步探究。

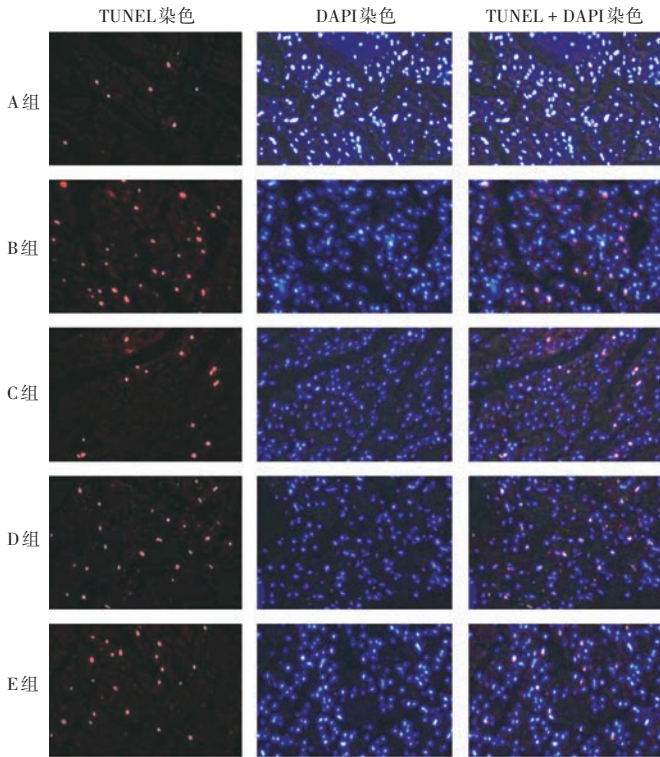


图2 各组小鼠心肌细胞凋亡情况( $\times 200, n = 5$ )  
Fig. 2 Apoptosis of cardiomyocyte of mice in each group ( $\times 200, n = 5$ )

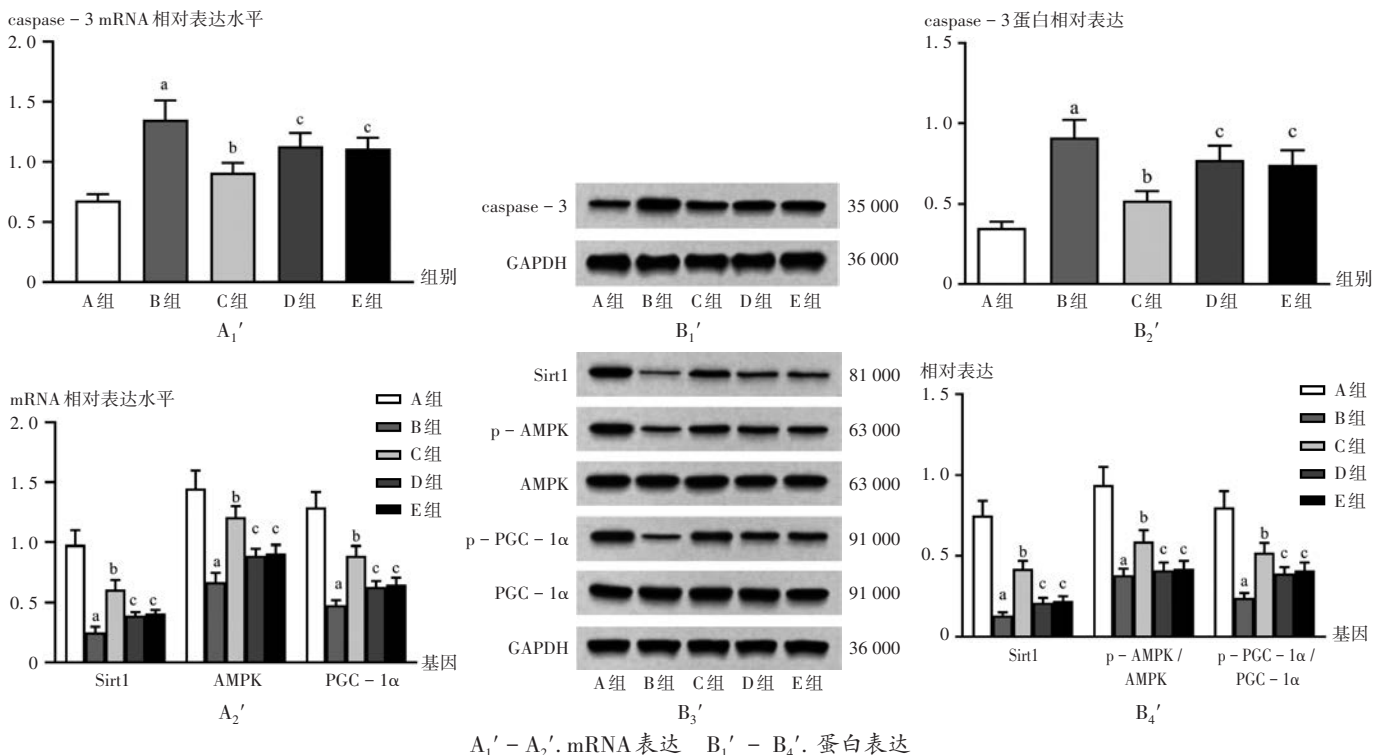


图3 各组小鼠心肌组织 caspase-3, Sirt1, AMPK, PGC-1 $\alpha$  mRNA和蛋白表达水平比较( $n = 5$ )

A<sub>1</sub>' - A<sub>2</sub>'. mRNA expression B<sub>1</sub>' - B<sub>4</sub>'. Protein expression

Fig. 3 Comparison of expression levels of caspase-3, Sirt1, AMPK, and PGC-1 $\alpha$  mRNA and protein in myocardial tissue of mice in each group ( $n = 5$ )

炎性反应在CHF的发展中发挥重要作用。HANNA等<sup>[15]</sup>的研究结果显示,促炎因子TNF- $\alpha$ 和IL-6广泛参与心力衰竭的发病机制,可调节心肌细胞表型与功能,抑制心肌细胞收缩,诱导巨噬细胞的炎症激活。PENA等<sup>[16]</sup>的研究结果显示,通过减轻氧化应激与炎症反应,可消除缺氧诱导的右心衰竭。TNF- $\alpha$ 和IL-6水平升高与机体免疫所诱导的全身炎症反应相关,本研究中经沙库巴曲缬沙坦治疗后,C组小鼠血浆TNF- $\alpha$ 和IL-6水平降低,提示沙库巴曲缬沙坦可通过调节炎症因子的分泌而减轻小鼠的炎症反应。心力衰竭时室壁张力升高,刺激氧自由基产生,内源性抗氧化物活性降低又进一步影响氧自由基的清除,氧自由基可诱发心律失常,诱导心肌细胞凋亡,促进心室重构<sup>[17]</sup>。本研究结果显示,沙库巴曲缬沙坦可降低C组小鼠血浆MDA水平,并升高SOD和GSH-Px水平,提示沙库巴曲缬沙坦可增加心肌清除氧自由基的能力,降低细胞凋亡能力,从而保护心肌组织免受损伤,但保护心肌组织的机制仍有待进一步研究。

AMPK可被Sirt1去乙酰化激活,又可激活Sirt1,二者属正反馈循环,从而抑制炎症反应<sup>[18]</sup>。PGC-1 $\alpha$ 属AMPK的重要下游因子,可被AMPK直接磷酸化,在心肌损伤疾病的发生中发挥作用<sup>[19]</sup>。p-AMPK可作用于多种下游底物,抑制ATP的消耗,启动生成ATP的途径,维持机体能量代谢平衡,增加细胞内NAD<sup>+</sup>含量,进而使NAD<sup>+</sup>依赖性Sirt1耗竭<sup>[20]</sup>。干扰Sirt1/PGC-1 $\alpha$ 去乙酰化通路可增强氧化应激反应,促进线粒体功能障碍<sup>[21]</sup>。张城林等<sup>[22]</sup>的研究结果显示,激活AMPK/PGC-1 $\alpha$ 通路可通过促进线粒体合成途径,减轻心肌细胞缺氧损伤。李闯等<sup>[23]</sup>的研究结果显示,AMPK/PGC-1 $\alpha$ 通路可反映机体氧化应激状态,在心肌细胞线粒体生物合成与氧化应激反应中发挥作用。本研究结果显示,B组小鼠的心肌组织Sirt1,AMPK,PGC-1 $\alpha$  mRNA和蛋白表达水平均降低,提示CHF发病过程中Sirt1/AMPK/PGC-1 $\alpha$ 通路处于阻滞状态;经沙库巴曲缬沙坦灌胃后,C组小鼠Sirt1,AMPK,PGC-1 $\alpha$  mRNA和蛋白表达水平均显著升高,提示沙库巴曲缬沙坦可能通过激活Sirt1/AMPK/PGC-1 $\alpha$ 通路而抑制CHF小鼠的炎症反应、氧化应激损伤与心肌凋亡,保护心肌组织。在沙库巴曲缬沙坦灌胃基础上添加Sirt1或AMPK抑制剂时,保护作用减弱,进一步验证了上述结论。

综上所述,沙库巴曲缬沙坦可能通过激活Sirt1/AMPK/PGC-1 $\alpha$ 信号通路而影响CHF模型小鼠的心功能,但沙库巴曲缬沙坦影响CHF的信号通路还有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] CHEN L, YU YN, LIU J, et al. Modular networks and genomic variation during progression from stable angina pectoris through ischemic cardiomyopathy to chronic heart failure[J]. *Mol Med*, 2022, 28(1): 140.
- [2] MELERO-MUÑOZ FJ, BUENO-DELGADO MV, MARTÍNEZ-CARRERAS R, et al. Design and development of a heterogeneous active assisted living solution for monitoring and following up with chronic heart failure patients in Spain[J]. *Sensors (Basel)*, 2022, 22(22): 8961.
- [3] GORI M, MARINI M, GONZINI L, et al. Combined neuro-humoral modulation and outcomes in patients with chronic heart failure and mildly reduced or preserved ejection fraction[J]. *J Clin Med*, 2022, 11(22): 6627.
- [4] 张 冀, 范延红, 孙冬冬. 沙库巴曲缬沙坦治疗心力衰竭的研究进展[J]. *心脏杂志*, 2020, 32(2): 193-196.
- [5] 陈礼学. 沙库巴曲缬沙坦对心力衰竭患者的疗效及其机制分析[J]. *心血管康复医学杂志*, 2021, 30(2): 190-194.
- [6] 肖 珊, 马郁文, 李 婧, 等. Angiotensin II通过氧化应激引起巨噬细胞AMPK/SIRT1能量信号紊乱[J]. *南方医科大学学报*, 2021, 41(3): 384-390.
- [7] 张 蕴, 韩新生, 张洪阳, 等. N-乙酰半胱氨酸通过AMPK/SIRT1途径抑制缺氧诱导的大鼠脑血管内皮细胞损伤[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(2): 107-112.
- [8] 刘倩茹, 王新陆, 朱明军, 等. 参附益心颗粒对Ang II诱导的H9c2心肌细胞损伤及PGC-1 $\alpha$ 信号通路相关因子的影响[J]. *中医杂志*, 2022, 63(7): 679-687.
- [9] YU SY, QIAN H, TIAN DW, et al. Linggui Zhugan Decoction activates the SIRT1-AMPK-PGC1 $\alpha$  signaling pathway to improve mitochondrial and oxidative damage in rats with chronic heart failure caused by myocardial infarction[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1074837.
- [10] 王俊岩, 王陵军, 梁碧容, 等. 益气温阳活血法对慢性心力衰竭小鼠认知功能的影响及机制研究[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(6): 58-62.
- [11] 莫壁伶, 余市成, 钟惠娟, 等. 沙库巴曲缬沙坦对慢性心力衰竭小鼠心功能的影响及作用机制[J]. *广西医科大学学报*, 2022, 39(6): 892-897.
- [12] 马 静, 路胜昔, 景风梅, 等. 和厚朴酚对心肌缺血再灌注损伤小鼠SIRT1/FOXO1通路的影响[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2022, 14(3): 340-344.
- [13] 补 娟, 牛晓珊, 党 辉, 等. 抑制AMP活化的蛋白激酶对局灶性脑缺血再灌注小鼠皮质和海马细胞色素c表达的影响[J]. *国际脑血管病杂志*, 2015, 23(3): 189-192.
- [14] ZHANG SY, LIU HB, FANG QQ, et al. Shexiang tongxin dropping pill protects against chronic heart failure in mice via inhibiting the ERK/MAPK and TGF- $\beta$  signaling pathways[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 796354.
- [15] HANNA A, FRANGOGIANNIS NG. Inflammatory cytokines