基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001204

雷帕霉素对早期心力衰竭大鼠心肌细胞自噬功能的影响及意义

杨韶华[1]，李雅倩[2]，周俞龙[3]，张　斌[4]

（1. 河南省三门峡市中心医院 ICU，三门峡　472000；2. 南昌大学第一临床医学院，南昌　330000；3. 河南科技大学附属三门峡市中心医院急诊科，三门峡　472000；4. 河南科技大学附属三门峡市中心医院 ICU，三门峡　472000）

【摘　要】目的：探讨雷帕霉素对早期心力衰竭大鼠心肌细胞自噬功能的影响。**方法**：采用腹主动脉缩窄术方法建立心力衰竭大鼠模型并分为对照组（n=8）和治疗组（n=6）。治疗组大鼠每周腹腔注射雷帕霉素（3 000 U/kg）3 次，总共 4 周；以生理盐水腹腔注射作为对照。于术后 4、8、12 周的不同时间点进行心脏彩超。全部大鼠在第 12 周末经过 24 h 禁食后处死，观察心肌组织细胞形态、心肌细胞凋亡及计算凋亡指数（AI）；应用蛋白免疫印迹方法检测 Cathepsin D 和 Beclin-1 的蛋白表达水平。**结果**：超声心动图显示建模后 4 周时出现心室肥厚，8 周时出现心力衰竭。治疗组 AI 较对照组明显降低[(25.55 ± 2.56)% vs. (34.66 ± 1.46)%，P<0.05)]；与假手术组相比较；对照组（0.867 ± 0.005，0.821 ± 0.003）的 Beclin-1 和 Cathepsin D 的 OD 值明显升高，治疗组（0.423 ± 0.002，0.655 ± 0.001）较对照组降低（P<0.01）。假手术组、治疗组、对照组的心肌细胞自噬率分别为（8.14 ± 1.27）%、（26.73 ± 2.48）%、（34.57 ± 4.06）%（F=1.998，P=0.046）。**结论**：雷帕霉素能降低心肌细胞自噬发生，改善心力衰竭大鼠的心脏功能。

【关键词】雷帕霉素；心力衰竭；自噬

【中图分类号】R541.6　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2016-03-30

Effect and significance of rapamycin on cardiomyocyte autophagy function in early heart failure rat

Yang Shaohua[1], Li Yaqian[2], Zhou Yilong[3], Zhang Bin[4]

(1. Department of Intensive Care Unit, the Central Hospital of Sanmenxia; 2. The First Clinical Medical College of Nanchang University; 3. Department of Emergency, Sanmenxia Central Hospital Affiliated to Henan University of Science and Technology; 4. Department of Intensive Care Unit, Sanmenxia Central Hospital Affiliated to Henan University of Science and Technology)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect and significance of rapamycin on cardiomyocyte autophagy function in early heart failure rat. ***Methods***: The rats were divided into control group (n=8) and treatment group (n=6). The heart failure model was established by abdominal aortic constriction. Rats in the treatment group were intraperitoneally injected with rapamycin (3 000 U/kg) 3 times per week for 4 weeks; saline was injected intraperitoneally as control. At 4 weeks, 8 weeks, 12 weeks after operation, the patients were examined at different time points. All rats were sacrificed at the end of the 12th week after 24 hours of fasting. Myocardial cell morphology, myocardial cell apoptosis and apoptosis index (AI) were observed. Protein expression of Cathepsin D and Beclin-1 was detected by Western blot. ***Results***: Echocardiography showed ventricular hypertrophy at 4 weeks after modeling and heart failure at 8 weeks. The AI was lower in treatment group than in control group[(25.55 ± 2.56)% vs. (34.66 ± 1.46)%, P<0.05]. The levels of Beclin-1 and Cathepsin were significantly higher in the control group (0.867 ± 0.005 and 0.821 ± 0.003) than in sham operated group, and the levels of Beclin-1 and Cathepsin were lower in treatment group (0.423 ± 0.002 and 0.655 ± 0.001) than in control group (P< 0.01). The cardiomyocyte autophagy rate in sham-operated group, treatment group and control group were (8.14 ± 1.27)%, (26.73 ± 2.48)%, (34.57 ± 4.06)% (F=1.998, P=0.046). ***Conclusion***: Rapamycin can effectively inhibit cardiomyocyte autophagy and improve cardiac function in rats with heart failure.

【Key words】rapamycin; heart failure; autophagy

作者介绍：杨韶华，Email：yangshaohua123789@163.com，研究方向：急危重症方面的研究与治疗。

通信作者：周俞龙，Email：125471005@qq.com。

优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170313.1119.062.html（2017-03-13）

慢性心力衰竭是心血管疾病的终末期，对患者及其家庭带来了巨大的负担[1]。目前，关于如何有效治疗慢性心力衰竭已成为大多数心血管学者所面临的难题。近年来，体外药理学实验和临床试验均发现雷帕霉素对心肌细胞具有保护作用，并且已被应用于药物洗脱支架[2-3]。但雷帕霉素药物在慢性心力衰竭疾病中的作用尚不明确。细胞自噬是指溶酶体消化降解细胞内受损、变性或衰老的细胞器和蛋白质的过程。本实验通过雷帕霉素对慢性心力衰竭大鼠的作用研究，以心肌细胞自噬率、心超和 Beclin-1、Cathepsin D 的表达等指标，探讨雷帕霉素抗心力衰竭的作用及其机制。本研究的结果将为慢性心力衰竭疾病的防治提供新的途径和思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 20 只 SFP 级、雄性 SD 大鼠，年龄 8~12周，体质量 240 g 左右，由四川大学华西医学中心实验动物中心提供。

1.1.2 试剂 雷帕霉素（三生制药公司，沈阳），Cathepsin D 单克隆抗体（武汉博士德牛物工程有限公司，BM1577）与 Beclin-1 单克隆抗体（Abcam 公司，ab114071），TUNEL 试剂盒（Sigma 公司，美国），GAPDH 抗体（ProteinTech Group，美国）。

1.2 方法

1.2.1 大鼠心力衰竭模型的构建 应用腹主动脉缩窄手术的方法来建立慢性心力衰竭动物模型 14 只。方法如下：大鼠禁食后应用腹腔注射 10%水合氯醛（3 mL/kg），麻醉后打开腹腔暴露和分离出腹主动脉，于腹主动脉旁置入 7 号针后用 4-0 丝线穿过分离出的腹主动脉和 7 号针，慢慢结扎后使拔出针时有紧箍感，缩窄腹主动脉 60%~70%，缝合腹腔。术后均行抗感染治疗。6 只大鼠假手术：除不结扎腹主动脉外其余步骤相同。

1.2.2 实验分组 心力衰竭大鼠分为 2 组：治疗组（n=8）和对照组（n=6），治疗组中的大鼠每周腹腔注射雷帕霉素（3 000 U/kg）3 次，持续时间为 4 周。对照组以生理盐水代替。假手术组中大鼠的处理同对照组。

1.2.3 心超检查 用于检测大鼠心肌功能的心彩检查于术后 4、8、12 周的不同时间点进行。步骤如下：禁食后用 10%水合氯醛（3 mL/kg）麻醉 SD 大鼠，应用高频线控探头和飞利浦 IE33 型超声心动仪（上海创讯医疗器械有限公司提供，探头频率控制在 1.0~5.0 MHZ，横向检测）作心脏检查。检测指标包括：舒张末期室间隔厚度（interventricular septal depth，IVSd）、收缩末期室间隔厚度（interventricular septal thickness at end-systole，IVSs）、左室射血分数（left ventricular ejection fraction，LVEF），收缩末期左心室后壁厚度（left ventricular posterior wall systole，LVPWs）与舒张末期左心室后壁厚度（left ventricular posterior wall，diastole，LVPWd）。

1.2.4 心肌组织标本收集 所有大鼠经麻醉后切开胸骨，选取心尖部心肌组织，迅速置于液氮保存。使用预冷的生理盐水溶液灌注剩余部分心肌组织 2~3 min，接着应用 4%多聚甲醛溶液进行灌注固定，然后进行常规苏木精-伊红染色，在光镜显微镜（200×）下检查各组心肌组织病理生理和形态结构，并随机选取 4 张切片。

1.2.5 细胞自噬率的检测 从各组中随机取切片 3 张，根据 Cyto-ID 细胞自噬检测试剂盒（广州波柏贸易有限公司提供）的操作说明在荧光显微镜下观察自噬心肌细胞（荧光显微镜下自噬心肌细胞的 LC3 在细胞质中大量聚集）。DAB 显色后在高倍显微镜（400×）下随机采取 6 个不重叠的视野，阳性细胞指细胞质中出现自噬小体。心肌细胞自噬指数（AI）=单视野自噬阳性细胞数/单视野总细胞计数×100%。

1.2.6 Beclin-1 和 Cathepsin D 蛋白表达的检测 采用 Western blot 测定心肌组织中 Cathepsin D 和 Beclin-1 蛋白表达水平。方法如下：研磨与裂解心肌组织，用 SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离，应用电印迹转移的方法将蛋白质转至 PVDF 膜，剪膜获取目标条带，应用含有 5%脱脂奶粉的 TBS-T 溶液常温封闭 2 h，加入一抗，4 ℃过夜。充分洗膜后加入二抗孵育 2 h，加入二氨基联苯胺（DAB）显色剂后进行曝光和扫描胶片。以 GAPDH 表达作对照，计算各组目的条带（Cathepsin D 或 Beclin-1 蛋白）的吸光度（absorbance，A）值。

1.3 统计学处理

所有数据分析应用 SPSS 16.0 软件。计数资料用率表示，组间比较应用卡方检验；计量资料用均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，建模后 4、8、12 周，各组超声心动图检查指标的比较采用重复测量方差分析，其他多组间计量资料比较采用单因素方差分析，其组间两两比较采用 LSD-t 检验；2 组间计量资料比较采用成组设计 t 检验。检验水准 α=0.05。

2 结 果

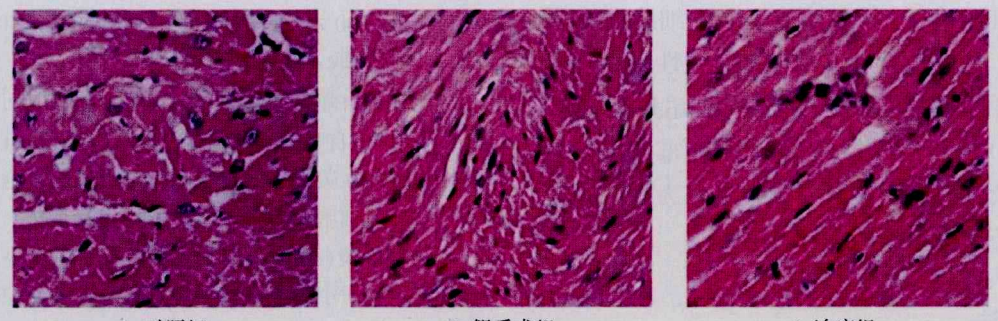
2.1 各组心超检测指标的结果

术后 4 周，与模型组相比较，假手术组中的 IVSs、LVPWs、IVSd 和 LVPWd 指标明显降低（P<0.05），而 2 组之间的LVEF 无统计学差异（P>0.05），表明模型组中的大鼠出现心肌肥厚，但是这种心肌结构的改变还没有对心功能产生影响。术后 8 周，模型组相比较，假手术组中的 IVSs、LVPWs、IVSd 和LVPWd 明显降低（P<0.05），而 LVEF 明显升高（P<0.05），表明模型组中的大鼠出现持续性心肌肥厚，并且已对心功能产生了不良影响，成功构建了慢性心力衰竭大鼠模型。术后 12 周，与对照组相比，假手术组中的 IVSs、LVPWs、IVSd 和LVPWd 明显降

低（$P<0.05$），而 LVEF 明显升高（$P<0.05$），表明未进行雷帕霉素治疗的大鼠的慢性心力衰竭进一步加重。治疗组中大鼠心超指标 IVSd、LVPWs、IVSs 和 LVPWd 比对照组明显降低（$P<0.05$），LVEF 明显升高（$P<0.05$），表明雷帕霉素对大鼠心室肥厚有逆转作用，可以改善心功能（图 1，表 1、表 2）。

2.2 心肌细胞自噬的检测结果

假手术组在透视电镜下可见细胞核清晰、体积较大、边界清楚。对照组可见大量气泡样结构，此为发生自噬的心肌细胞中特有的自噬小体。治疗组吞噬泡和自噬小体较对照组明显减少。假手术组、治疗组、对照组的心肌细胞自噬率分别为（8.14 ± 1.27）%、（26.73 ± 2.48）%、（34.57 ± 4.06）%（$F=1.998$，$P=0.046$）。与假手术组比较，对照组的心肌细胞自噬率明显增加；治疗组中的心肌细胞自噬率比假手术组高，比对照组低（$P<0.05$），如图 2 所示。



A. 对照组　　B. 假手术组　　C. 治疗组

图 1　各组大鼠心脏组织的 HE 染色（400×）

Fig.1　HE staining of heart tissue of rats（400×）

表 1　建模后 4、8、12 周假手术组和模型组超声心动图检查指标的比较

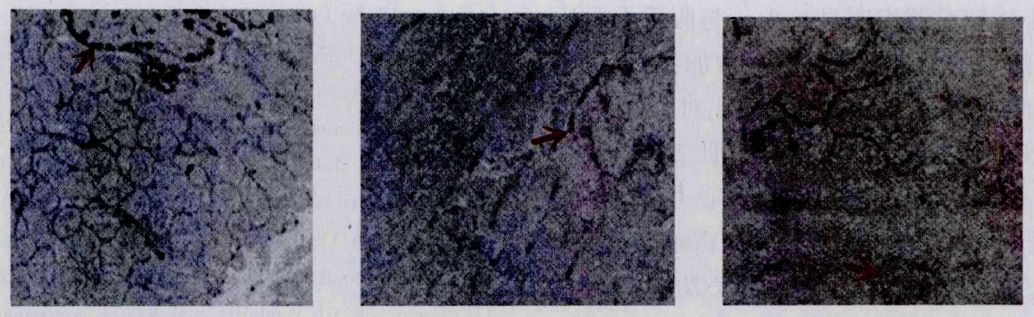
Tab.1　Comparison of the indexes of echocardiography at 1，8，12 weeks after modeling in sham operated group and model group

指标	时间	假手术组	模型组	F 值		P 值
LVPWs（cm）	4周	0.277 ± 0.007	0.357 ± 0.007	分组因素	2.690	0.009
	8周	0.277 ± 0.003	0.368 ± 0.001	时间因素	2.306	0.021
	12周	0.335 ± 0.001	0.402 ± 0.001	分组 × 时间	2.813	0.005
IVSs（cm）	4周	0.287 ± 0.005	0.367 ± 0.004	分组因素	2.168	0.033
	8周	0.346 ± 0.007	0.377 ± 0.008	时间因素	2.479	0.014
	12周	0.345 ± 0.017	0.389 ± 0.006	分组 × 时间	2.015	0.045
LVPWd（cm）	4周	0.146 ± 0.005	0.246 ± 0.006	分组因素	3.098	0.002
	8周	0.175 ± 0.007	0.277 ± 0.001	时间因素	1.982	0.048
	12周	0.245 ± 0.013	0.287 ± 0.001	分组 × 时间	2.396	0.017
IVSd（cm）	4周	0.177 ± 0.006	0.288 ± 0.007	分组因素	2.285	0.023
	8周	0.178 ± 0.001	0.246 ± 0.004	时间因素	2.521	0.011
	12周	0.199 ± 0.001	0.231 ± 0.004	分组 × 时间	2.157	0.035
LVEF	4周	0.878 ± 0.001	0.846 ± 0.005	分组因素	2.415	0.016
	8周	0.845 ± 0.006	0.623 ± 0.001	时间因素	2.079	0.041
	12周	0.824 ± 0.134	0.635 ± 0.004	分组 × 时间	2.763	0.006

表 2　建模后 12 周治疗组和对照组超声心动图检查指标的比较

Tab.2　Comparison of echocardiography indexes in the treatment group and the control group after 12 weeks modeling

指标	治疗组	对照组	t 值	P 值
LVPWs（cm）	0.345 ± 0.002	0.445 ± 0.002	3.300	0.001
IVSs（cm）	0.374 ± 0.023	0.394 ± 0.013	2.369	0.018
LVPWd（cm）	0.234 ± 0.025	0.345 ± 0.011	2.135	0.036
IVSd（cm）	0.215 ± 0.001	0.245 ± 0.012	2.298	0.022
LVEF	0.714 ± 0.001	0.624 ± 0.041	2.856	0.004



A. 对照组　　B. 假手术组　　C. 治疗组

图 2　各组心肌细胞电镜下的结构表现

Fig.2　Structure performance of myocardial cell under the electron microscope

2.3　蛋白免疫印迹方法检测心肌细胞 Cathepsin D 与 Beclin-1 蛋白的表达水平

对照组心肌细胞 Beclin-1、Cathepsin D 蛋白表达比假手术组明显增加（P=0.017，P=0.042）；与对照组比较，治疗组的 Beclin-1、Cathepsin D 表达水平明显降低（P=0.035，P=0.021），比假手术组表达升高（P=0.005，P=0.019）（表 3，图 3）。

表 3　各组蛋白相对表达量（OD）的比较

Tab.3　Comparison of the expression of Beclin-1, Cathepsin D protein（OD）between three groups

组别	例数	Beclin-1	Cathepsin D
假手术组	6	0.234 ± 0.001	0.331 ± 0.001
对照组	6	0.867 ± 0.005[a]	0.821 ± 0.003[a]
治疗组	8	0.423 ± 0.002[ab]	0.655 ± 0.001[ab]
F 值		5.855	14.659
P 值		0.008	0.001

注：a，与假手术组比较，P < 0.05；b：与对照组比较，P < 0.05

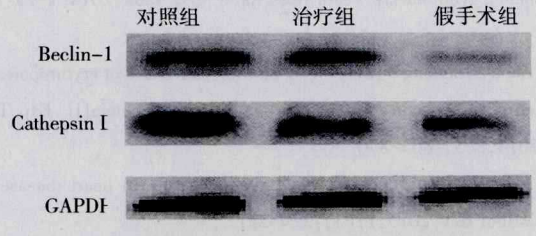


图 3　蛋白免疫印迹方法检测各组心肌细胞 Cathepsin D 与 Beclin-1 蛋白的表达水平

Fig.3　Myocardial cell D and Beclin-1 protein expression level detected by Western blot

3　讨　论

心力衰竭是多种心血管疾病引起心肌损害的最终结果，其病理生理变化过程非常复杂。近年来的研究发现，在心力衰竭发病机制中心肌细胞自噬起着重要的作用[4-5]。自噬过程由溶酶体介导，通常由细胞内缺氧、细胞内压力、饥饿、应激等因素诱导发生，是高度保守细胞内蛋白质和细胞器再循环利用的机制[6]。自噬本是机体的正常生理应激反应，但近年来研究报道，不受控制的自噬反应在多种疾病的病理生理过程中发挥了重要的作用[7-8]。体内外研究报道表明，自噬引起心肌细胞数量降低，造成室壁变薄，心腔增大，进一步恶化心力衰竭[9-10]。

雷帕霉素属于大环内酯类免疫抑制剂，通过阻断 T 淋巴细胞的细胞周期进程来发挥免疫抑制作用[11]。近年来，体外药理学实验和临床试验均发现雷帕霉素对心肌细胞具有保护作用[12]，并且已经被广泛地应用于药物洗脱支架。临床试验发现，雷帕霉素药物洗脱支架可以明显减少支架内血栓形成和再狭窄的发生率，从而显著改善经皮冠状动脉介入治疗的临床疗效[13-14]。但是目前，关于雷帕霉素对于慢性心力衰竭的治疗作用国内外尚未见大规模的报道。本研究通过构建大鼠慢性心力衰竭模型的方式，研究了雷帕霉素对于慢性心力衰竭的治疗作用及其可能的机制。本研究表明，在构建心力衰竭大鼠后 4 周，模型组与假手术组之间的大鼠心超指标 LVEF 无明显差异，可见大鼠心功能未受到影响。造模 8 周后，与模型组相比，假手术组中的 IVSs、LVPWs、IVSd 和 LVPWd 明显降低，LVEF 明显升高，可见大鼠的心功能受到影响，慢性心力衰竭大鼠模型构建成功。12 周后，与对照组相比，治疗组中大鼠心超指标 IVSd、IVSs、LVPWd 和 LVPWs 比对照组明显降低，而 LVEF 明显上升，可见雷帕霉素对心室肥厚有逆转作用，并改善大鼠心脏功能。另外，通过免疫组织化学的方法显示，治疗组吞噬

泡和自噬小体较对照组明显减少。与假手术组比较，对照组的心肌细胞自噬率明显增加；治疗组中的心肌细胞自噬率比假手术组升高，比对照组降低。上述研究数据显示自噬能够导致心肌细胞数量降低，造成心室壁变薄，心室腔增大，在心力衰竭的发生发展过程中发挥了重要的作用。而雷帕霉素能够有效抑制心肌细胞的自噬，从而改善心功能。

Beclin-1 和 Cathepsin D 是与细胞自噬密切相关的 2 种蛋白。文献发现，Beclin-1 和 Cathepsin D 在正常细胞中表达量极低，而在发生自噬的细胞中表达量明显增高[15]。本研究结果显示，与假手术组比较，对照组的 Beclin-1、Cathepsin D 表达明显升高；与对照组比较，治疗组的 Beclin-1、Cathepsin D 表达明显降低，但高于假手术组，表明自噬在大鼠慢性心力衰竭的发生发展过程中发挥着重要作用。雷帕霉素能够特异性地与哺乳动物的雷帕霉素靶蛋白结合，抑制 mTOR 蛋白激酶的活性，通过抑制心肌细胞自噬来减轻心力衰竭，改善心脏结构和心功能。

综上所述，在慢性心力衰竭大鼠中雷帕霉素能够改善心脏的结构及其功能，其可能的机制是通过抑制心肌细胞自噬而实现的，但是应用于临床尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Braunwald E. The war against heart failure: the Lancet lecture[J]. Lancet, 2015, 385(9970): 812-824.

[2] Qin YJ, Zhang XL, Yu YQ, et al. Cardioprotective effect of erythropoietin on sepsis-induced myocardial injury in rats[J]. World J Emerg Med, 2013, 4(3): 215-222.

[3] Sanchis-Gomar F, Garcia-Gimenez JL, Pareja-Galeano H, et al. Erythropoietin and the heart: physiological effects and the therapeutic perspective[J]. Int J Cardiol, 2014, 171(2): 116-125.

[4] Bogoyevitch MA. An update on the cardiac effects of erythropoietin cardioprotection by erythropoietin and the lessons learnt from studies in neuroprotection[J]. Cardiovasc Res, 2004, 63(2): 208-216.

[5] Kowalczyk M, Banach M, Mikhailidis DP, et al. Erythropoietin update 2011[J]. Med Sci Monit, 2011, 17(11): RA240-247.

[6] Santhanam AV, d'Uscio LV, Katusic ZS. Cardiovascular effects of erythropoietin: an update[J]. Adv Pharmacol, 2010, 60: 257-285.

[7] Gao S, Long CL, Wang RH, et al. K(ATP) activation prevents progression of cardiac hypertrophy to failure induced by pressure overload via protecting endothelial function[J]. Cardiovasc Res, 2009, 83(3): 444-456.

[8] Zhang Y, Zhang L, Yan M, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase causes cell death in rat osteoblasts through inactivation of Akt [J]. Biomed Pharmacother, 2007, 61(5): 277-284.

[9] Zhu M, Feng J, Lucchinetti E, et al. Ischemic postconditioning protects remodeled myocardium via the PI3K-PKB/Akt reperfusion injury salvage kinase pathway[J]. Cardiovasc Res, 2006, 72(1): 152-162.

[10] Mudalagiri NR, Mocanu MM, Di Salvo C, et al. Erythropoietin protects the human myocardium against hypoxia/reoxygenation injury via phosphatidylinositol- 3 kinase and ERK1/2 activation[J]. Br J Pharmacol, 2008, 153(1): 50-56.

[11] Uchiyama T, Engelman RM, Maulik N, et al. Role of Akt signaling in mitochondrial survival pathway triggered by hypoxic preconditioning[J]. Circulation, 2004, 109(24): 3042-3049.

[12] Lee J, Jung K, Kim YS, et al. Diosgenin inhibits melanogenesis through the activation of phosphatidylinositol-3-kinase pathway(PI3K) signaling[J]. Life Sci, 2007, 81(3): 249-254.

[13] Zakhidova KKh. Correlation between concentration of pathological cytokines and erythropoietin in patients with chronic heart failure with anemic syndrome[J]. Vestn Ross Akad Med Nauk, 2014(1-2): 32-37.

[14] Zhou S, Zhuang Y, Zhao W, et al. Protective roles of erythropoiesis-stimulating proteins in chronic heart failure with anemia[J]. Exp Ther Med, 2014, 8(3): 863-870.

[15] Zhu H, He L. Beclin 1 biology and its role in heart disease[J]. Curr Cardiol Rev, 2015, 11(3): 229-237.

（责任编辑：冉明会）