

· 实验研究 ·

AMPK 通路在硫化氢后处理减轻 2 型糖尿病大鼠心肌缺血-再灌注损伤中的作用

孙波 王琛 赵雯洁 乔世刚

【摘要】 目的 观察硫化氢后处理对 2 型糖尿病大鼠心肌缺血-再灌注(ischemia reperfusion, IR)损伤的效果,探讨 AMP 依赖的蛋白激酶(AMPK)通路在其中发挥的作用。**方法** 雄性 SD 大鼠 84 只,1 月龄,体重 100~150 g,采用随机数字表法分为六组:假手术组(Sham 组)、IR 组、AMPK 抑制剂 compound c 组(CC 组)、compound c 溶剂组(DMSO 组)、硫化氢后处理组(NaHS 组)和 CC+NaHS 组,每组 14 只。成功建立糖尿病模型后,Sham 组仅开胸但不结扎阻断血流;IR 组在开胸分离左冠状动脉前降支后用止血钳夹紧圈套管缺血 30 min,松开圈套管再灌注 4 h 后取心脏;CC 组于术前 1 h 腹腔注射 CC 250 μ g/kg,其余操作同 IR 组;DMSO 组于术前 1 h 给予同样剂量的 DMSO,其余操作同 IR 组;NaHS 组于开放左冠状动脉 1 min 内快速静脉注射 NaHS 0.05 mg/kg,再灌注 4 h;CC+NaHS 组:于术前 1 h 腹腔注射 CC,随后于冠状动脉左前降支阻断 30 min,同样于开放左冠状动脉 1 min 内快速静脉注射 NaHS 0.05 mg/kg,再灌注 4 h。之后对所有动物进行安乐死,采用 TTC 染色法测定心肌梗死范围,Western blot 法测定 AMPK、LC3、p62 蛋白含量。**结果** 与 Sham 组比较,其余五组再灌注 4 h 时大鼠心肌梗死范围明显增加,AMPK、LC3、p62 蛋白含量明显升高($P<0.05$);与 IR 组比较,NaHS 组大鼠再灌注 4 h 时心肌梗死范围明显减小($P<0.05$),AMPK 蛋白含量明显升高,LC3、p62 蛋白含量明显降低($P<0.05$);与 NaHS 组比较,CC+NaHS 组再灌注 4 h 时心肌梗死范围明显增加,AMPK 水平明显降低,LC3、p62 蛋白表达含量明显升高($P<0.05$)。CC 组与 DMSO 组上述各指标差异无统计学意义。**结论** 硫化氢后处理能减轻 2 型糖尿病大鼠缺血-再灌注损伤后心肌梗死,其机制与调节自噬小体清除及修复 AMPK 通路调控的自噬流有关。

【关键词】 AMP 依赖的蛋白激酶;硫化氢;心肌再灌注损伤;2 型糖尿病

Role of AMP-activated protein kinase in hydrogen sulfide postconditioning protecting on type 2 diabetic rats with myocardial ischemia reperfusion injury SUN Bo, WANG Chen, ZHAO Wenjie, QIAO Shigang. Department of Anesthesiology, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Soochow 215004, China

Corresponding author: QIAO Shigang, Email: qiaoshigang@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of hydrogen sulfide (H_2S or NaHS) on myocardial ischemia reperfusion injury induced in type 2 diabetic rats in vivo and the role of AMP-activated protein kinase (AMPK) signal pathway. **Methods** The induced type 2 diabetic rat models were anesthetized, left thoracotomy were performed. All the models were randomly divided into six groups ($n=14$): group Sham; group IR; the left anterior descending artery was ligated 30 min, reperfused for 4 hours; group CC: prior to thoracotomy, compound c was intraperitoneally injected 250 μ g/kg, then received the same treatment as group IR; group DMSO received the same treatment as compound c group but DMSO was injected intraperitoneally as control; group NaHS: the left anterior descending artery was injected NaHS 0.05 mg/kg then reperfused for 4 hours; group CC+NaHS: prior to thoracotomy, compound c was intraperitoneally injected 250 μ g/kg, then NaHS 0.05 mg/kg injected intravenously and reperfused 4 hours. All the rat models euthanatized, infarcted area was detected by TTC assay. The AMPK, LC3 and p62 were analyzed by Western blot. **Results** Compared with group Sham, the infarcted area and concentration of AMPK, LC3 and p62 were increased in other groups ($P<0.05$). Compared with group IR, the infarcted area and concentration of LC3, p62 markedly decreased in group NaHS ($P<0.05$). Compared with group NaHS, the infarcted

基金项目:江苏省自然科学基金面上研究项目(BK20141187);苏州市科技计划项目(SYS201473,SS201613);苏州大学科研预研基金项目(SDY2015A18)

作者单位:215004 苏州大学附属第二医院麻醉科

通信作者:乔世刚,Email: qiaoshigang@163.com

area and concentration of LC3, p62 significantly increased but AMPK down-regulated in group CC+NaHS ($P<0.05$). **Conclusion** Hydrogen sulfide could alleviate myocardial infarction via AMPK signal pathway in type 2 diabetic rats' IR models.

【Key words】 AMP-activated protein kinase; Hydrogen sulfide; Myocardial ischemia/reperfusion; Type 2 diabetes mellitus; Autophagy

2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)严重威胁着患者的健康^[1]。心肌梗死是 T2DM 患者末期常见的心脏并发症,是导致糖尿病患者死亡的主要原因^[2]。硫化氢是具有生物活性的气体信号分子,有研究表明硫化氢后处理可明显减轻缺血性心肌梗死^[3],但其能否减轻 T2DM 心脏缺血-再灌注(ischemia reperfusion, IR)损伤却不明确。自噬广泛存在于许多疾病的病理生理过程,通过清除异常蛋白质和衰老细胞器维持细胞稳态和更新,但高糖状态下心肌的自噬活性受破坏,蓄积的自噬小体加剧缺血心肌的损伤^[4]。因此如何减少自噬小体的生成是心脏保护的重点。自噬溶酶体调节自噬小体生成的过程中,AMPK 通路是主要途径之一。AMPK 磷酸化可通过影响 mTOR 活性发挥作用并通过磷酸化 S6K1,进而磷酸化核糖体蛋白促进 mRNA 翻译,同时促使核糖体与内质网的黏附而抑制内质网膜脱落形成自噬体膜^[5]。本实验拟观察硫化氢后处理对 T2DM 大鼠心肌 IR 损伤的作用并探讨 AMPK 调控的自噬在其中的作用。

材料与方法

动物选择与分组 选择 SPF 级雄性 SD 大鼠[SCXK(苏)2013-0003]84 只,1 月龄,体重 100~150 g。采用随机数字表法将大鼠分为六组:假手术组(Sham 组)、IR 组、AMPK 抑制剂 compound c 组(CC 组)、compound c 溶剂组(DMSO 组)、硫化氢后处理组(NaHS 组)和 CC+NaHS 组,每组 14 只。

糖尿病模型制备 普通饲料适应性饲养 1 周后开始喂食高脂高糖饲料,4 周后对空腹 6 h 的大鼠一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ)50 mg/kg(使用前溶于 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液),72 h 后取尾静脉血测血糖,大鼠血糖值 ≥ 16.7 mmol/L 视为糖尿病模型成功^[5]。每周监测体重,每 2 周监测血糖。

心肌 IR 损伤模型的制备 参照文献^[6]的方法,腹腔内注射戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉大鼠,内静脉置管用于补液和给药,右侧颈内动脉置入充满肝素的导管,连接 V24E 多通道生理记录仪连续监测血流动力学指标。气管切开并插入气管导管,连接 ALC-V9 动物呼吸机行 PEEP;吸入氧浓度

33%,氧流量 3 L/min,调节呼吸频率或潮气量,维持 pH 7.35~7.45, PaCO₂ 35~45 mm Hg, PaO₂ 90~150 mm Hg。采用智能恒温控制仪(JR-1)维持大鼠温度在 36~37℃。于第 5 肋间行左胸切术,打开心包,6-0 无损伤缝合线绕过左冠状动脉前降支(LAD)近端深面并穿入圈套管,平衡 30 min。止血钳夹紧圈套管缺血 30 min(心外膜发绀苍白、心电图一过性心律失常、ST 段弓背向上抬高表示缺血成功),松开圈套管再灌注 4 h(心外膜重新充血为再灌注成功)。

心肌梗死范围的测定 于再灌注 4 h 结束时颈内静脉注射 5%伊文思蓝使心脏正常区域蓝染,迅速取出心脏,分离左心室,-80℃冷冻 5 min 后用心脏切割器横断分割成 5~6 块 2 mm 厚的组织。分割后的组织置于 1% 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC,批号:T8877)染色,避光恒温孵育 15 min。PBS 缓冲液冲洗后 10%甲醛固定 24 h。灰白色为梗死区,砖红色为非梗死区。使用 Image J 软件测定心肌梗死范围(左心室梗死区面积占左心室总面积的百分比)。

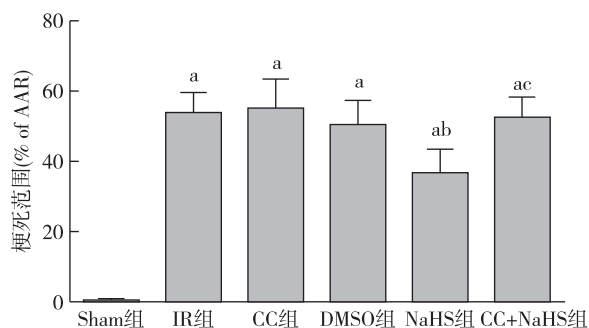
LC3、p62、AMPK 蛋白含量的测定 T2DM 大鼠模型成功后取下心脏,加入裂解液(P0013C)进行低温匀浆裂解提取蛋白^[7]。BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白含量,100℃持续加热 5 min,选用 8%~12%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,转至硝酸纤维素膜,5%脱脂牛奶封闭 2 h 后,分别加入一抗 LC3、p62、AMPK 孵育过夜,TBS-T 溶液漂洗后加入兔源二抗 36℃孵育 2 h,TBS-T 溶液漂洗,最后进行化学增强发光反应,扫描后运用 Image J 软件分析目的带的净光密度值,以目的条带与内参 GAPDH 光密度间的比值反映蛋白含量。

统计分析 采用 Graph Pad Prism 5.0 统计学软件进行分析。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

心肌梗死范围 与 Sham 组比较,其余五组再

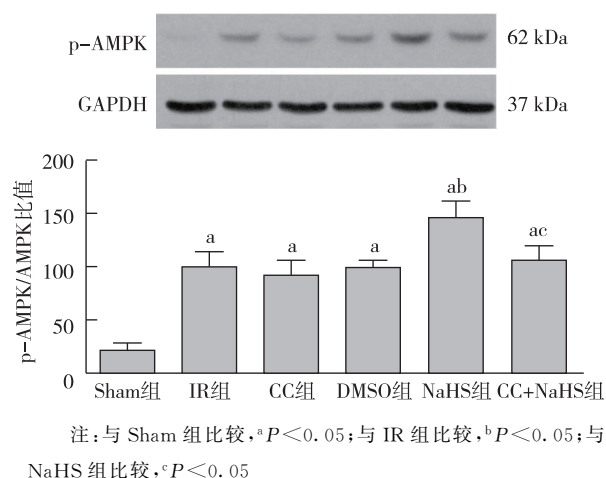
灌注 4 h 时的大鼠心肌梗死范围明显增大 ($P < 0.05$); 与 IR 组比较, NaHS 组大鼠心肌梗死范围明显减小 ($P < 0.05$); 与 NaHS 组比较, CC+NaHS 组心肌梗死范围明显增大 ($P < 0.05$) (图 1)。



注: 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 IR 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 NaHS 组比较, ^c $P < 0.05$

图 1 六组大鼠心肌梗死范围的比较

AMPK、LC3、p62 蛋白含量 与 Sham 组比较, 其余五组再灌注 4 h 时的 AMPK、LC3、p62 蛋白含量明显升高 ($P < 0.05$); 与 IR 组比较, NaHS 组 AMPK 蛋白含量明显升高, LC3、p62 蛋白含量明显降低 ($P < 0.05$); 与 NaHS 组比较, CC+NaHS 组再灌注 4 h 时 AMPK 蛋白含量明显降低, LC3、p62 蛋白含量明显升高 ($P < 0.05$) (图 2~4)。

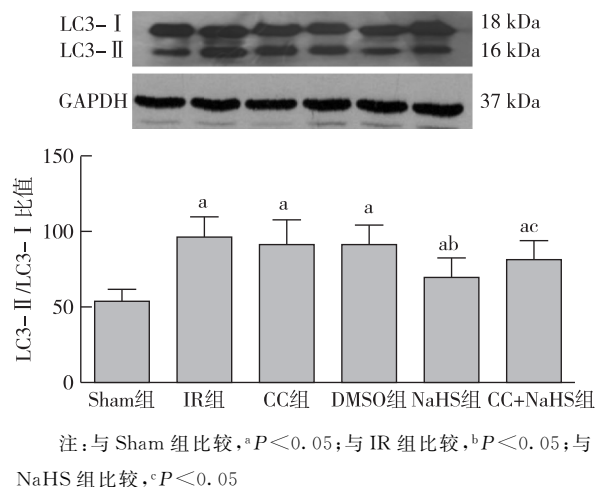


注: 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 IR 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 NaHS 组比较, ^c $P < 0.05$

图 2 六组大鼠再灌注 4 h 后 p-AMPK 蛋白含量的比较

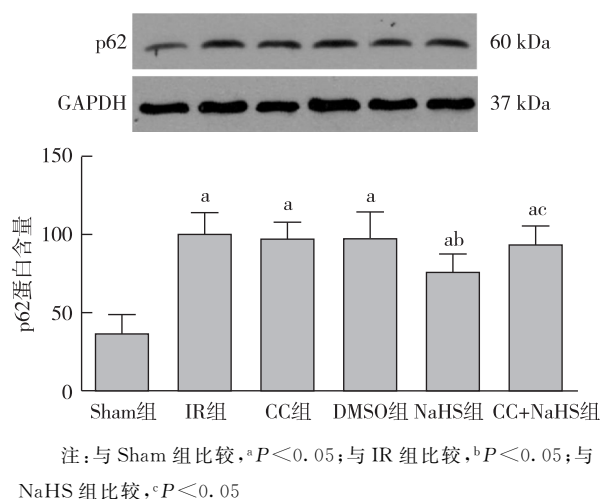
讨 论

参照文献[7]的方法, 本研究中采用高脂高糖喂养+链脲佐菌素注射制备 T2DM 模型, 每 2 周取尾静脉血监测血糖, 大鼠血糖值 ≥ 16.7 mmol/L 录入实验中。体重、心脏重量和血糖水平显示 T2DM 大鼠较正常大鼠明显升高, 胰岛素水平降低, 提示



注: 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 IR 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 NaHS 组比较, ^c $P < 0.05$

图 3 六组大鼠再灌注 4 h 后 LC3 蛋白含量的比较



注: 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 IR 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 NaHS 组比较, ^c $P < 0.05$

图 4 六组大鼠再灌注 4 h 后 p62 蛋白含量的比较

T2DM 模型制备成功。

研究表明, 内源性硫化氢参与许多心血管系统的生理与病理生理过程, 具有舒张血管、抑制血管平滑肌细胞增殖以及抑制心肌细胞凋亡等作用^[8]。硫化氢在体内以 H_2S 和 NaHS 两种形式存在, 两者间维持一定的动态平衡。NaHS 与内源性硫化氢的存在方式相似, NaHS 能迅速溶解于生理性缓冲溶液, 且相较于 H_2S 饱和溶液能更准确地定量, 因此选择 NaHS 溶液作为外源性硫化氢供体具有明显优势。

高糖状态下氧自由基增多及脂质代谢紊乱加重了心肌及血管内皮细胞损伤, 高血糖会加重 IR 时的心肌损伤。心血管组织中, 硫化氢的生成主要通过胱硫醚- γ -裂解酶(CSE)催化, 高糖环境下可导致内源性硫化氢减少, CSE mRNA 水平及 CSE 酶

活性降低^[9]。本课题组报道硫化氢对正常大鼠 IR 心肌具有保护作用^[7],其机制可能与改变心肌自噬活性相关。心肌 IR 破坏细胞内自噬活性,从而使细胞内的自噬小体大量积聚,过度积聚的自噬小体降解细胞内重要蛋白和细胞器,从而使细胞形成不可逆损伤,最终导致心肌细胞自噬性死亡。硫化氢后处理被认为可修复再灌注后自噬流,减少正常大鼠心肌梗死,但硫化氢后处理是否通过修复心肌自噬流发挥作用却不得而知。本研究显示,IR 组心肌自噬流活性指标 p62 水平升高和自噬标志性蛋白 LC3 表达升高,符合 IR 导致自噬小体大量蓄积的观点。而硫化氢后处理后 p62 和 LC3 明显降低,推测硫化氢后处理对 T2DM 大鼠 IR 损伤发挥保护作用可能与调节自噬小体清除有关。

近几年研究认为,AMPK 通路是调控自噬小体生成的主要途径之一。Xie 等^[10]研究表明,AMPK 活性降低并伴随心肌自噬水平下降是糖尿病心肌病发生的重要因素。应用药物干预的糖尿病小鼠,增强自噬标志性蛋白表达,最后改善了心脏功能。He 等^[11]进一步研究表明激活 AMPK 后,可促进 JUK1-Bcl2 信号通路激活,并干扰 Beclin1-Bcl2 结合。AMPK 磷酸化可通过影响 mTOR 活性发挥作用;当 AMP/ATP 比值增加,AMPK 活性增强,磷酸化激活 TSC1/2 蛋白,从而抑制 mTOR、促进自噬流进程;反之,当 AMP/ATP 比值减小,AMPK 活性降低,增强 mTOR 活性,通过磷酸化 S6K1 抑制自噬小体与溶酶体融合。心肌 IR 时,自噬明显增强,过多激活的自噬小体若不能被溶酶体及时清除则容易导致细胞病理性紊乱。自噬小体和溶酶体维持一定的结合和降解对细胞生存至关重要。LC3、p62 是自噬溶酶体经典的标志物蛋白,通过检测标志蛋白水平的变化可以反映心肌细胞自噬活性的程度。

为明确硫化氢后处理是否通过 AMPK 通路发挥糖尿病缺血心肌保护作用,本研究使用 AMPK 特异性抑制剂 CC。研究表明,CC 取消了硫化氢后处理心肌保护作用,并且促使自噬标志蛋白明显升高^[12],提示 AMPK 通路是硫化氢后处理缺血心肌保护的主要途径。

综上所述,硫化氢后处理能减轻 2 型糖尿病大

鼠缺血-再灌注损伤后心肌梗死,其机制与调节自噬小体清除及修复 AMPK 通路调控的自噬流有关。

参 考 文 献

- [1] Brunstrom M, Carlberg B. Effect of antihypertensive treatment at different blood pressure levels in patients with diabetes mellitus: systematic review and meta-analyses. *BMJ*, 2016, 352: i717.
- [2] Jia G, DeMarco VG, Sowers JR. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12(3): 144-153.
- [3] 吴玉玲, 马继春, 王兴程, 等. 外源性硫化氢对合并高血糖的大鼠心肌缺血再灌注损伤后的作用. *临床心血管病杂志*, 2015, 31(4): 451-454.
- [4] Ma X, Liu H, Foyil SR, et al. Impaired autophagosome clearance contributes to cardiomyocyte death in ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 2012, 125(25): 3170-3181.
- [5] Meijer AJ, Codogno P. Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease. *Mol Aspects Med*, 2006, 27(5-6): 411-425.
- [6] Qiao S, Xie H, Wang C, et al. Delayed anesthetic preconditioning protects against myocardial infarction via activation of nuclear factor-kappaB and upregulation of autophagy. *J Anesth*, 2013, 27(2): 251-260.
- [7] 赵雯洁, 孙波, 王琛, 等. 硫化氢后处理对 2 型糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其与自噬流的相关性研究. *中华危重症医学杂志(电子版)*, 2016, 9(2): 81-86.
- [8] Whiteman M, Gooding KM, Whatmore JL, et al. Adiposity is a major determinant of plasma levels of the novel vasodilator hydrogen sulphide. *Diabetologia*, 2010, 53(8): 1722-1726.
- [9] Yan H, Du J, Tang C. The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(1): 22-27.
- [10] Xie Z, Lau K, Eby B, et al. Improvement of cardiac functions by chronic metformin treatment is associated with enhanced cardiac autophagy in diabetic OVE26 mice. *Diabetes*, 2011, 60(6): 1770-1778.
- [11] He C, Zhu H, Li H, et al. Dissociation of Bcl-2-Bcln1 complex by activated AMPK enhances cardiac autophagy and protects against cardiomyocyte apoptosis in diabetes. *Diabetes*, 2013, 62(4): 1270-1281.
- [12] Andrade-Vieira R, Xu Z, Colp P, et al. Loss of LKB1 expression reduces the latency of ErbB2-mediated mammary gland tumorigenesis, promoting changes in metabolic pathways. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56567.

(收稿日期:2016-09-21)