

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2010)18-12-0948-03

白藜芦醇通过激活腺苷酸活化蛋白激酶预防酒精性心肌病

马双陶, 杨大春, 李德, 唐兵, 陈劲松, 杨永健

(成都军区总医院心血管内科, 四川省成都市 610083)

[关键词] 白藜芦醇; 酒精性心肌病; 腺苷酸活化蛋白激酶; 内皮型一氧化氮合酶; 一氧化氮

[摘要] 目的 探索白藜芦醇对酒精性心肌病的作用及其分子机制。方法 将雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组、酒精组和酒精+白藜芦醇组, 每组 10 只, 干预 6 个月后用介入生理记录仪检测大鼠的心功能, 采用常规石蜡切片和 HE 染色法评估心脏结构改变, 采用免疫印迹法检测心肌组织中腺苷酸活化蛋白激酶和内皮型一氧化氮合酶及其磷酸化蛋白的表达, 并运用硝酸还原酶法检测心肌组织中一氧化氮水平。结果 6 个月酒精摄入可显著损害大鼠的心功能和心肌显微结构, 添加白藜芦醇能显著削弱酒精对心脏功能和结构的损害作用。酒精摄入可显著降低心肌组织中腺苷酸活化蛋白激酶和内皮型一氧化氮合酶的磷酸化水平, 并降低一氧化氮水平, 而添加白藜芦醇能显著增加腺苷酸活化蛋白激酶和内皮型一氧化氮合酶的磷酸化水平, 并增加心肌组织中一氧化氮水平。结论 白藜芦醇能通过激活腺苷酸活化蛋白激酶/内皮型一氧化氮合酶系统和增加一氧化氮水平来预防酒精性心肌病。

[中图分类号] R542

[文献标识码] A

Resveratrol Prevents Alcoholic Cardiomyopathy Through Activating AMP-Activated Protein Kinase

MA Shuang-Tao, YANG Da-Chun, LI De, TANG Bing, CHEN Jin-Song and YANG Yong-Jian

(Department of Cardiovascular, General Hospital of Chengdu Military Area Command, Chengdu 610083, China)

[KEY WORDS] Resveratrol; Alcoholic Cardiomyopathy; AMP-Activated Protein Kinase; Endothelial Nitric Oxide Synthase; Nitric Oxide

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of resveratrol on alcoholic cardiomyopathy and the underlying molecular mechanisms. **Methods** Male Wistar rats were divided into three groups: control, alcoholic, and alcoholic plus resveratrol group ($n=10$ for each group). After the intervention for six months, the invasive cardiac function of the rats was measured by physiological recorder; the histological structure of heart was evaluated by HE staining; the expression and phosphorylation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in myocardium were determined by western blot; and the nitric oxide (NO) level in myocardium was detected by nitrate reductase method.

Results Alcoholic intake for six months caused a significant decline in cardiac function and an obvious damage in cardiac structure. Oral administration with resveratrol partially reversed alcoholic-induced cardiac damage. Alcoholic intake significantly decreased the phosphorylated level of AMPK and eNOS and consequently decreased the NO level in myocardium. Treatment with resveratrol remarkably attenuated alcoholic-induced decline in the phosphorylation of AMPK and eNOS and decrease in NO level. **Conclusion** Resveratrol activates AMPK/eNOS pathway, increases NO level, and consequently prevents alcoholic cardiomyopathy.

长期大量饮酒可导致酒精性心肌病^[1]。但也有大量研究表明红葡萄酒对心血管系统具有保护作用可能与红葡萄酒中所含的白藜芦醇有关^[2]。近年的研究表明白藜芦醇具有强大的抗氧化应激和代谢调节作用, 对血管功能、动脉粥样硬化和心肌缺血损伤等均有保护作用, 这些保护作用部分归因于其对腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein ki-

nase, AMPK) 的上调和激活作用^[3]。AMPK 激活后能磷酸化内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS), 后者可进一步增加心肌中一氧化氮 (nitric oxide, NO) 的水平, 从而提供心肌保护作用^[4]。本研究拟探讨白藜芦醇对酒精性心肌病的预防作用及其可能机制, 旨在为临床治疗和预防酒精性心肌病提供实验依据。

[收稿日期] 2010-09-25 [修回日期] 2010-11-04

[基金项目] 成都军区医学科研十一五课题 (MB09023)

[作者简介] 马双陶, 硕士, 医师, 研究方向为心力衰竭的分子机制, E-mail 为 shuangtao@yahoo.cn。通讯作者杨永健, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为心肌病重构的发病机制, E-mail 为 yongjian@yahoo.cn。

1 材料和方法

1.1 主要材料

健康雄性 Wistar 大鼠 30 只, 体重 250~300 g

购自第三军医大学实验动物中心 [SCXK(渝) 2007-0003], 所有实验严格按照实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。白藜芦醇购自陕西中林医药有限公司。速眠新[®]购自长春市军需大学兽医研究所。抗 AMPK、抗磷酸化 AMPK、抗 eNOS 和抗磷酸化 eNOS 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。NO 检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.2 动物分组与干预

大鼠随机分为 3 组, 每组 10 只: 对照组、酒精组和酒精 + 白藜芦醇组 (白藜芦醇组)。酒精组和白藜芦醇组在第 1 周给予含 10% 乙醇的饮用水, 第 2 周给予含 20% 乙醇的饮用水, 第 3 周至实验结束均给予含 36% 乙醇的饮用水, 动物模型的构建参照文献 [5], 以心肌显著纤维化和心脏舒缩功能的显著降低为成模标准。白藜芦醇组大鼠给予含 0.5% 白藜芦醇的饲料^[6]。

1.3 心脏功能测定

酒精及药物干预 6 个月后, 采用 1 mL/kg 速眠新[®]肌肉注射麻醉满意后, 固定、备皮、消毒、铺巾, 分离右颈动脉, 插管至左心室, 采用多导生理记录仪 (PowerLab, 澳大利亚 AD Instruments 公司) 记录左室压力曲线, 并采用配套的 Chart5.0 软件分析血流动力学相关指标, 计算左室舒张末期压力 (LVEDP)、左室收缩末期压力 (LVESP), 等容收缩期左室内压力上升最大速率 (+ dp/dt) 和等容舒张期左室压力下降最大速率 (- dp/dt)。实验结束后处死大鼠, 迅速取出心肌标本, 分别冻存于 -70℃ 冰箱和 10% 福尔马林中。

1.4 心脏结构评估

各组心肌组织经福尔马林固定后, 行常规石蜡纵切片和 HE 染色后在光学显微镜下观察心肌组织结构的改变。

1.5 免疫印迹法

采用免疫印迹法检测各组大鼠心肌组织中 AMPK 及磷酸化 AMPK (p-AMPK)、eNOS 和磷酸化 eNOS (p-eNOS) 蛋白的表达。按常规方法提取总蛋白, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳后转至 PVDF 膜上, 加入一抗在 4℃ 冰箱中孵育过夜, 加入二抗后在 37℃ 摇床中孵育 4 h 将膜置于化学发光剂中曝光, 胶片显影及定影。用 Gel Doc 2000 Imager (Bio-Rad) 进行半定量, 以磷酸化蛋白与总蛋白光密度比值作为磷酸化水平。

1.6 心肌组织匀浆裂解液中一氧化氮的测定

采用硝酸还原酶法, 将 NO_3^- 还原为 NO_2^- , 经 Griess 试剂显色后通过显色深浅来反应 NO 的浓度。

本实验采用可见分光光度计测定吸光度值, 波长为 550 nm。计算公式: $\text{NO} (\mu\text{mol/L}) = (\text{样品管吸光度} - \text{空白管吸光度}) / (\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}) \times \text{标准品浓度} (100 \mu\text{mol/L}) \times \text{样品稀释倍数}$ 。

1.7 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.5 版本软件进行统计学分析, 两组间差异比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 白藜芦醇对酒精性心肌病大鼠心脏功能的影响

长期酒精摄入导致左室舒张末期压力 (LV-EDP) 显著增加, 左室收缩末期压力 (LVESP) 显著降低, + dp/dt 和 - dp/dt 均显著降低 ($P < 0.01$; 表 1)。与酒精组比较, 白藜芦醇组大鼠 LVEDP 显著降低, LVESP 显著增加, + dp/dt 和 - dp/dt 均显著增加 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$; 表 1)。

表 1 白藜芦醇对酒精性心肌病大鼠心脏功能的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	LVEDP (mmHg)	LVESP (mmHg)	+ dp/dt (mmHg/s)	- dp/dt (mmHg/s)
对照组	2.48 ± 0.83	86.92 ± 3.99	5691 ± 62	4503 ± 61
酒精组	5.68 ± 0.75 ^a	64.90 ± 5.95 ^a	5468 ± 77 ^a	4153 ± 34 ^a
白藜芦醇组	3.81 ± 0.71 ^b	79.30 ± 6.96 ^b	5581 ± 71 ^c	4306 ± 54 ^b

a 为 $P < 0.01$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, c 为 $P < 0.05$ 与酒精组比较。

2.2 白藜芦醇对酒精性心肌病大鼠心脏结构的影响

对照组大鼠心肌纤维排列整齐, 心肌纤维无变性, 未见间质纤维增生。酒精组大鼠心肌纤维排列紊乱, 心肌纤维存在大量空泡变性, 可见间质纤维增生明显。而白藜芦醇组大鼠心肌组织结构较酒精组有明显改善, 空泡变性显著减轻, 且纤维增生远远少于酒精组 (图 1)。

2.3 白藜芦醇对酒精性心肌病大鼠 AMPK/eNOS 表达的影响

酒精组心肌组织中 AMPK 的磷酸化水平显著低于对照组 (0.40 ± 0.03 比 1.02 ± 0.04 , $P < 0.01$), 而白藜芦醇组 AMPK 的磷酸化水平显著高于酒精组 (0.80 ± 0.05 比 0.40 ± 0.03 , $P < 0.01$; 图 2)。酒精组心肌组织中 eNOS 的磷酸化水平显著低于对照组 (0.12 ± 0.03 比 0.45 ± 0.04 , $P < 0.01$), 而白藜芦醇组 eNOS 的磷酸化水平显著高于酒精组

(0.32 ± 0.04 比 0.12 ± 0.03 , $P < 0.01$; 图 3)。

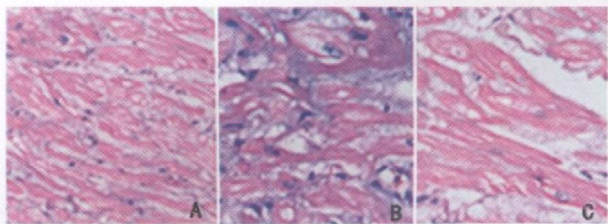


图 1. 白藜芦醇对酒精性心肌病大鼠心脏结构的影响 ($\times 400$) A 为对照组, B 为酒精组, C 为酒精 + 白藜芦醇组。

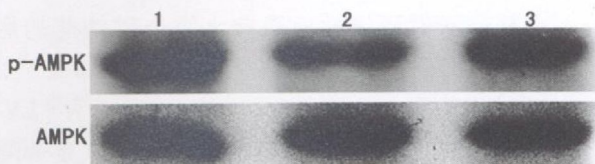


图 2. 白藜芦醇对酒精性心肌病大鼠心脏组织中 AMPK 和磷酸化 AMPK 的影响 1 为对照组, 2 为酒精组, 3 为酒精 + 白藜芦醇组。

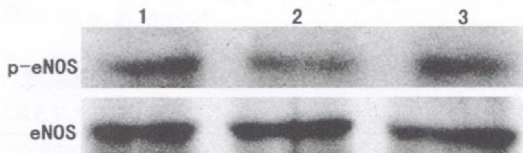


图 3. 白藜芦醇对酒精性心肌病大鼠心脏组织中 eNOS 和磷酸化 eNOS 的影响 1 为对照组, 2 为酒精组, 3 为酒精 + 白藜芦醇组。

2.4 白藜芦醇对酒精性心肌病大鼠心肌组织中一氧化氮水平的影响

酒精组心肌组织中 NO 的水平显著低于对照组 (22.56 ± 4.56 比 62.59 ± 7.56 , $P < 0.01$), 而白藜芦醇组 NO 的水平显著高于酒精组 (45.68 ± 10.56 比 22.56 ± 4.56 , $P < 0.01$)。

3 讨论

酒精性心肌病的发病机制目前尚不十分清楚。既往的研究表明酒精对心肌的损害机制可能包括氧化应激损伤和能量代谢障碍, 氧化应激增强的主要表现为心肌中超氧阴离子产生增多, 后者可淬灭心肌中的 NO, 从而导致其对心脏的保护作用降低, 导致心肌氧化应激损伤^[7]。本研究表明酒精性心肌病大鼠心肌组织中 AMPK 的磷酸化水平减低, 进一步导致 eNOS 的磷酸化水平降低, 从而致使 NO 的产生减少。这可能是酒精性心肌病发病的新机制, 因此, 针对此机制的治疗措施可能对酒精性心肌病具

有保护作用。

白藜芦醇系蒽醌萜类化合物, 主要来源于蓼科植物虎杖的根茎提取物, 同时也存在于红葡萄酒中。白藜芦醇具有强大的抗氧化作用, 对心血管系统具有保护效应^[8], 但具体机制尚不清楚。研究表明白藜芦醇可使酒精性心肌病心肌组织中失活的 AMPK 和 eNOS 系统恢复活性状态, 从而增加 NO 的水平来发挥心肌保护作用。AMPK 除了作为 eNOS 的磷酸化激酶外, 还具有代谢调控作用, 具有改善心肌代谢的作用。因此, 白藜芦醇对心肌的保护效应部分可能还源于其对心肌代谢紊乱的纠正作用。

长期大量饮酒对心肌具有损害作用^[9], 但适量饮用红葡萄酒可能具有心血管保护作用^[10]。本研究提供了部分证据, 认为红葡萄酒中所含的白藜芦醇可能部分对抗大量酒精对心肌的损害作用, 而适量饮酒的状态下加用白藜芦醇是否具有额外的保护作用有待进一步研究。

综上所述, 本研究一方面揭示了 AMPK/eNOS 系统失活与 NO 水平的降低可能是酒精性心肌病的发病机制之一; 另一方面证实了白藜芦醇可能是酒精性心肌病的新型预防药物。此外, 本研究也为研究红葡萄酒对心血管系统的保护机制提供了部分实验依据。

[参考文献]

- [1] Piano MR. Alcoholic cardiomyopathy: incidence, clinical characteristics and pathophysiology [J]. *Chest* 2002; **121** (5): 1638-650.
- [2] Cordova AC, Jackson LS, Berke-Schlesel DW, et al. The cardiovascular protective effect of red wine [J]. *J Am Coll Surg* 2005; **200** (3): 428-439.
- [3] Bradamante S, Barenghi L, Villa A. Cardiovascular protective effects of resveratrol [J]. *Cardiovasc Drug Rev* 2004; **22** (3): 169-188.
- [4] 马双陶, 陈卫军. 血流切应力调控内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 的分子机制 [J]. *国际生物医学工程杂志*, 2007; **30** (4): 255-260.
- [5] Licheri D, Vargiu R, Fadda E, et al. Long-term voluntary ethanol consumption induces impairment of the mechanical performance in the papillary muscle of Sardinian alcohol-preferring rats [J]. *Alcohol Alcohol* 2001; **36** (1): 44-47.
- [6] Kasdallah-Crissa A, Momagui B, Aouani E, et al. Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats [J]. *Alcohol Alcohol* 2006; **41** (3): 236-239.
- [7] Ren J. Mechanisms of alcoholic heart disease [J]. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2008; **2** (6): 497-506.
- [8] 王志荣, 黄元铸, 邹建刚, 等. 红葡萄酒及白藜芦醇对血小板聚集的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002; **10** (2): 129-131.
- [9] Streppel MT, Ocke MC, Boshuizen HC, et al. Long-term wine consumption is related to cardiovascular mortality and life expectancy independently of moderate alcohol intake: the Zutphen Study [J]. *J Epidemiol Community Health* 2009; **63** (7): 534-540.
- [10] Lekert JF, Rathel TR, Wohlfart P, et al. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells [J]. *Circulation* 2002; **106** (13): 1614-617.

(此文编辑 李小玲)