

[文章编号] 1007-3949(2017)25-05-0467-08

· 实验研究 ·

## 脂联素通过下调 NOX2 表达减轻急性酒精性心肌损伤

冯炎青, 申宇娟, 白瑞, 边云飞

(山西医科大学第二医院心内科 心血管疾病诊治及临床药理山西省重点实验室, 山西太原市 030000)

[关键词] 脂联素; 急性酒精性心肌损伤; NADPH 氧化酶 2

[摘要] 目的 探讨脂联素(APN)对小鼠急性酒精性心肌损伤的影响及相关机制,为急性酒精性心肌损伤及酒精性心脏病的预防和治疗提供实验依据及新思路。方法 将 8 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为正常对照组( $n=10$ )和正常模型组( $n=15$ ),将 8 周龄雄性纯合子脂联素基因敲除鼠( $APN^{-/-}$ )随机分为  $APN^{-/-}$  对照组( $n=10$ )和  $APN^{-/-}$  模型组( $n=15$ ),各模型组均给予腹腔注射乙醇  $3\text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ,各对照组均给予等量生理盐水腹腔注射。4 组小鼠均正常摄食、饮水,连续 3 天后进行各项指标监测:观察小鼠一般情况;检测血清乳酸脱氢酶(LDH)、血浆 N 末端 B 型脑钠肽原(NT-proBNP);用动物心脏超声机测定心脏结构及功能指标;测定 Caspase 3 活性及 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡;制备心肌组织 HE 染色切片及 Masson 染色切片;制备心肌组织匀浆测定活性氧簇(ROS)、丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)活性;Western blot 检测心肌组织 NADPH 氧化酶 2(NOX2)蛋白表达情况。结果 与正常对照组相比,正常模型组射血分数明显下降( $P<0.01$ );血清 LDH、血浆 NT-proBNP 浓度分别升高 1.98 倍、5.13 倍( $P<0.01$ );HE 染色及 Masson 染色显示心肌结构及肌纤维改变、胶原纤维增多,胶原容积分数(CVF)值升高 2.63 倍( $P<0.01$ );心肌组织内 Caspase 3 活性升高 2.58 倍( $P<0.01$ ),TUNEL 法显示阳性凋亡心肌细胞增加 12.67 倍( $P<0.01$ );心肌组织内 ROS、MDA 含量分别升高 1.68 倍、2.87 倍( $P<0.01$ ),SOD 活性升高 2.92 倍( $P<0.01$ );NOX2 蛋白表达量升高 1.87 倍( $P<0.01$ )。与  $APN^{-/-}$  对照组相比, $APN^{-/-}$  模型组上述指标均明显升高(均  $P<0.01$ )。与正常模型组相比, $APN^{-/-}$  模型组小鼠射血分数下降更为明显( $P<0.01$ ),血清 LDH、血浆 NT-proBNP 浓度分别升高 1.30 倍、1.25 倍( $P<0.01$ );HE 及 Masson 染色显示心肌结构及肌纤维改变、胶原纤维增多,CVF 值升高 1.55 倍;心肌组织内 Caspase 3 活性升高 1.66 倍( $P<0.01$ ),TUNEL 法显示阳性凋亡心肌细胞比例升高 1.64 倍( $P<0.01$ );心肌组织内 ROS、MDA 含量分别升高 1.42 倍、1.39 倍( $P<0.01$ ),SOD 活性降低 28%( $P<0.01$ );NOX2 蛋白表达量升高 1.44 倍( $P<0.01$ )。结论 脂联素可以减轻小鼠急性酒精性心肌损伤,其机制与脂联素抑制 NOX2 蛋白表达发挥抗氧化应激作用有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Adiponectin attenuates acute alcoholic myocardial injury by down regulating NOX2 expression

FENG Yan-Qing, SHEN Yu-Juan, BAI Rui, BIAN Yun-Fei

(Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Shanxi Medical University & Shanxi Provincial Key Laboratory of Cardiovascular Disease Diagnosis and Treatment, and Clinical Pharmacology, Taiyuan, Shanxi 030000, China)

[KEY WORDS] Adiponectin; Acute alcoholic myocardial injury; NADPH oxidase 2

[ABSTRACT] Aim To explore the effect of adiponectin (APN) on acute alcohol induced myocardial injury in mice and related mechanism, and to provide experimental basis and new ideas for the prevention and treatment of acute alcoholic myocardial injury and alcoholic cardiomyopathy. Methods 8 week old C57BL/6J male mice were randomly divided into normal control group ( $n=10$ ) and normal model group ( $n=15$ ). 8 week old male SPF homozygous adiponectin knockout ( $APN^{-/-}$ ) mice were randomly divided into  $APN^{-/-}$  control group ( $n=10$ ) and  $APN^{-/-}$  model group ( $n=15$ ). Model groups were given intraperitoneal injection of ethanol  $3\text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ , control groups received normal saline intraperitoneal injection. 4 groups of mice were normal feeding, drinking water. After 3 days, the indicators were monitored: the general condition of mice was observed, serum lactate dehydrogenase (LDH) and N-terminal B type natriuretic peptide

[收稿日期] 2016-12-26

[修回日期] 2017-02-24

[作者简介] 冯炎青,硕士研究生,研究方向为心血管疾病临床及药理,E-mail 为 1258772646@qq.com。通讯作者边云飞,博士,教授,博士研究生导师,研究方向为心血管疾病临床及药理,E-mail 为 yunfeibian@sina.com。

(NT-proBNP) were detected, cardiac structure and function index were detected by mouse heart ultrasonic machine, myocardial cell apoptosis was detected by TUNEL and the activity of Caspase 3 was determined, myocardial tissue HE staining and Masson staining were prepared, myocardial tissue homogenate reactive oxygen species (ROS) content, malondialdehyde (MDA) content and superoxide dismutase (SOD) activity were detected, Western blot was used to detect NADPH oxidase 2 (NOX2) protein expression in myocardial tissue. **Results** Compared with normal control group, ejection fraction of normal model group decreased significantly ( $P<0.01$ ); serum LDH and plasma NT-proBNP concentration of normal model group were increased by 1.98 times, 5.13 times ( $P<0.01$ ); HE staining and Masson staining showed myocardial structure and muscle fiber changes, collagen fibers increased, collagen volume fraction (CVF) value increased 2.63 times in normal model group ( $P<0.01$ ); the activity of Caspase 3 in myocardial tissue increased 2.58 times ( $P<0.01$ ), positive myocardial cell apoptosis increased 12.67 times by TUNEL in normal model group ( $P<0.01$ ); ROS content and MDA content in myocardium were increased by 1.68 times, 2.87 times ( $P<0.01$ ), SOD activity increased 2.92 times in normal model group ( $P<0.01$ ); the expression of NOX2 protein increased 1.87 times in normal model group ( $P<0.01$ ). Compared with control group, the above indicators in APN<sup>-/-</sup> model group were significantly increased ( $P<0.01$ ). Compared with normal group, serum LDH and plasma NT-proBNP concentration were increased by 1.30 times, 1.25 times in APN<sup>-/-</sup> model group ( $P<0.01$ ); HE and Masson staining showed the myocardial structure and muscle fiber changes, collagen fibers increased, CVF value increased by 1.55 times in APN<sup>-/-</sup> model group; the activity of Caspase 3 in myocardial tissue increased 1.66 times ( $P<0.01$ ), the myocardial cell apoptosis ratio was 1.64 times higher in APN<sup>-/-</sup> model group ( $P<0.01$ ); ROS content and MDA content in myocardium were increased by 1.42 times, 1.39 times ( $P<0.01$ ), SOD activity decreased 28% in APN<sup>-/-</sup> model group ( $P<0.01$ ), the expression of NOX2 protein increased 1.44 times in APN<sup>-/-</sup> model group ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Adiponectin can reduce acute alcoholic myocardial injury in mice, and its mechanism may be related to the inhibition of NOX2 protein expression and the effect of anti-oxidative stress.

短期大量饮酒可导致急性心肌损伤,心功能短期内迅速下降,甚至危及生命。而长期大量饮酒也可造成酒精性心肌病,病理改变包括心肌纤维断裂等,导致心室收缩功能减低,射血分数下降,最终引起心力衰竭,甚至危及生命<sup>[1-2]</sup>。对于酒精性心肌病的发病机制,一些研究提出假设,包括乙醇及其代谢产物的毒性作用<sup>[3]</sup>、脂蛋白及载脂蛋白颗粒的修饰改变、活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)产物及脂肪酸的堆积<sup>[4]</sup>。近期有研究表明氧化应激损伤可能参与了急性酒精性心肌损伤及酒精性心肌病的发生<sup>[5-6]</sup>。脂联素(adiponectin, APN)是一种脂肪细胞分泌的细胞因子,对调节代谢、保护血管与心脏有非常重要的作用。有研究指出APN的抗氧化应激作用是其发挥心脏保护作用的主要机制之一<sup>[7]</sup>。NADPH 氧化酶家族是心血管系统中ROS的主要来源之一,其中NADPH 氧化酶2(NADPH oxidase 2, NOX2)亚型广泛表达于心血管系统,如心肌细胞、内皮细胞和血管平滑肌细胞,在多种心血管疾病病理生理中发挥重要作用<sup>[8-9]</sup>。研究表明,NOX2 可产生多种ROS成分,参与氧化应激的发生,从而造成组织损伤<sup>[10]</sup>。目前对脂联素的研究颇多,而脂联素与急性酒精性心肌损伤及酒精性心肌病之间的研究甚少。本研究通过建立小鼠急性酒精性心肌损伤模型,探讨APN 对急性酒精性心

肌损伤的影响及相关机制,同时也间接研究酒精性心肌病的发生<sup>[11]</sup>,为急性酒精性心肌损伤及酒精性心肌病的预防和治疗提供实验依据及新思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物和试剂

正常8周龄小鼠(SPF级C57BL/6J,25只)购自山西医科大学实验动物中心,8周龄雄性纯合子APN基因敲除(APN<sup>-/-</sup>)小鼠(SPF级近交系C57BL/6J,25只)购自山西医科大学第二医院心血管疾病诊治与临床药理实验室。小鼠N末端B型脑钠肽原(N-terminal B type natriuretic peptide, NT-proBNP)ELISA试剂盒、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、ROS、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);TUNEL法检测细胞凋亡试剂盒、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗、组织蛋白提取试剂(武汉博士德生物工程有限公司);NOX2一抗(Abcam上海贸易有限公司)。动物心脏超声机及专用探头(台湾S-sharp公司)。

### 1.2 模型的建立与实验分组

25只正常小鼠随机分为正常对照组( $n=10$ )和

正常模型组( $n=15$ )，25只APN<sup>-/-</sup>小鼠随机分为APN<sup>-/-</sup>对照组( $n=10$ )和APN<sup>-/-</sup>模型组( $n=15$ )。各模型组给予腹腔注射乙醇3 g/(kg·d)，各对照组给予等量生理盐水腹腔注射。小鼠饲养于SPF级环境内，温度控制在(22±2)℃，保持相对湿度(55±5)%，明暗交替各12 h。4组小鼠均自由摄食和饮水。3天后，各组小鼠麻醉后处死(氯胺酮80 mg/kg，甲苯噻嗪12 mg/kg，腹腔注射)。期间观察小鼠一般状况及死亡情况。

### 1.3 小鼠心功能、LDH 及 NT-proBNP 测定

实验3天后，使用动物心脏超声机及小鼠专用超声探头测定各组小鼠室壁厚度、左心室舒张期末内径(left ventricular end diastolic diameter, LVEDD)、左心室收缩期末内径(left ventricular end systolic diameter, LVESD)及射血分数。各组小鼠麻醉后，摘取眼球采血2 mL，4℃、3000 r/min离心10 min，取上清置于-80℃保存。按LDH试剂盒说明操作检测血清LDH活性，按小鼠NT-proBNP ELISA试剂盒说明采用生物素双抗体夹心技术检测NT-proBNP。

### 1.4 标本留取

麻醉采血后，开胸取出小鼠心脏，以4℃生理盐水冲洗，无菌纱布吸干，由左心室游离壁切取心肌组织，放入干燥无菌EP管中，置于-80℃冰箱保存，用于制备心肌组织匀浆及Western blot检测。取左心室中段横截面心肌组织数块，置于4%多聚甲醛溶液中固定24 h，脱水，石蜡包埋，切片待检。

### 1.5 心肌组织HE染色、Masson染色及纤维化指标测定

每只小鼠随机选取2张组织切片，脱蜡后行HE染色、Masson染色，逐级乙醇脱水，二甲苯透明，中性树脂包埋，光镜下观察心肌细胞形态、结构、胶原分布状态。采用IPP 6.0软件进行图像分析，心肌组织胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)=胶原面积/所测视野面积×100%，每张切片均取6个视野范围，取平均值。

### 1.6 TUNEL法检测心肌细胞凋亡

心肌组织切片石蜡包埋后，进行脱蜡及水合，PBS漂洗后加Proteinase K工作液于37℃消化0.5 h，PBS漂洗2次，每个样本加封闭液，室温封闭10 min，PBS再次漂洗2次后进入标记反应。滴加50 μL TDT酶反应液于每个样本，加盖玻片，避光，置于湿盒中37℃反应1 h，之后每片滴加50 μL Streptavidin-HRP工作液，加盖玻片，避光，置于湿盒中37℃反应0.5 h，再经3次PBS漂洗后，每个样本滴加50 μL DAB工作液，室温反应10 min。苏木素

轻度复染后，漂洗、脱水，光学显微镜下观察。

### 1.7 ROS、MDA含量及 Caspase 3、SOD活性检测

准确称取小鼠心肌组织重量，按重量(g)：体积(mL)=1:9的比例加入9倍体积的匀浆介质(0.9%生理盐水)，冰水浴条件下，用玻璃组织匀浆器机械匀浆，制备10%心肌组织匀浆，3000 r/min，4℃离心10 min，取上清液按各试剂盒说明操作进行ROS、MDA含量及Caspase 3、SOD活性测定。另取少许上清液BCA法测定蛋白浓度。

### 1.8 Western blot检测NOX2蛋白表达

从-80℃冰箱取出心肌组织，每组称取100 mg，融化后冰水浴条件下，用手术小剪刀在玻璃皿内将心肌组织尽量减碎，之后转移到玻璃组织匀浆器中机械匀浆，加入RIPA+1%PMSF冰水浴下裂解30 min。之后4℃、14000 r/min离心20 min，取少许上清液BCA法测定蛋白浓度后制成蛋白含量相等的样品，所提蛋白经热变性处理，每孔上样25 μL，行SDS-PAGE电泳分离；转膜后，将膜浸入5%脱脂奶粉中，室温摇床封闭2 h。随后加入1:2000稀释的NOX2一抗，4℃摇床过夜。次日，TBS-T洗膜10 min×3次，之后加入1:2000稀释的羊抗兔二抗，室温孵育1 h，TBS-T洗膜15 min×3次。超敏ECL化学显色及曝光后，Image J软件对蛋白条带进行半定量分析。

### 1.9 统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析，组间多重比较采用LSD检验， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

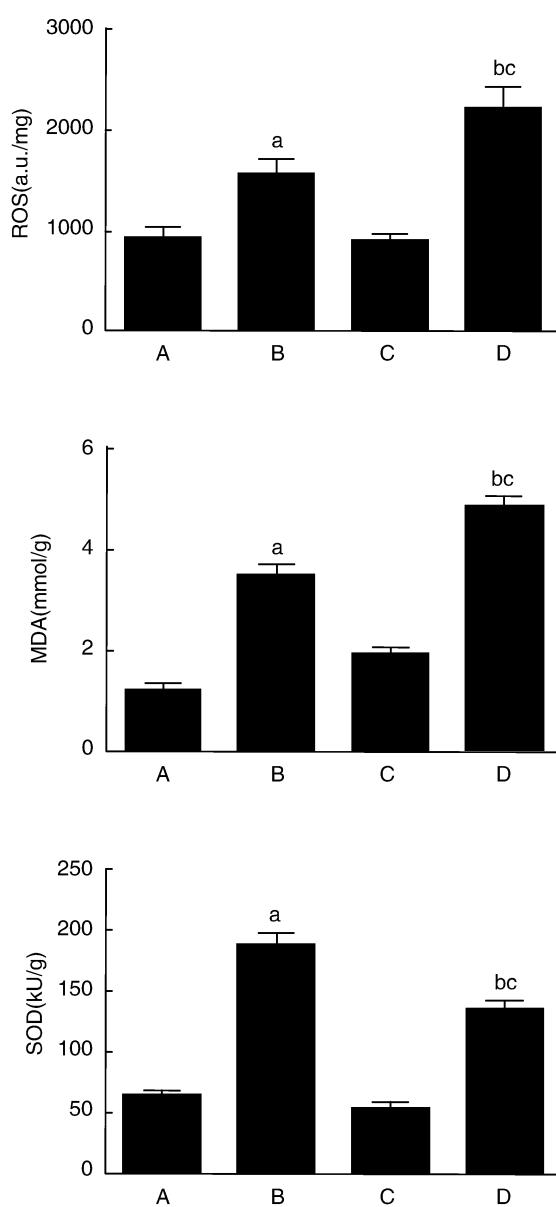
### 2.1 小鼠的一般情况

对照组小鼠反应、活动、饮食均正常，且均存活；模型组小鼠反应迟钝、活动减少、饮食量下降，其中APN<sup>-/-</sup>模型组小鼠较正常模型组更明显。实验过程中APN<sup>-/-</sup>模型组和正常模型组小鼠各死亡3只，实验结束时剩余44只。

### 2.2 小鼠心肌组织ROS、MDA含量及 SOD活性比较

与正常对照组相比，正常模型组ROS含量升高1.68倍( $P<0.01$ )；与APN<sup>-/-</sup>对照组相比，APN<sup>-/-</sup>模型组ROS含量升高2.45倍( $P<0.01$ )；与正常模型组相比，APN<sup>-/-</sup>模型组ROS含量升高更明显，达1.42倍( $P<0.01$ )。与正常对照组相比，正常模型组

MDA 含量升高 2.87 倍 ( $P<0.01$ )；与 APN<sup>-/-</sup> 对照组相比，APN<sup>-/-</sup> 模型组 MDA 含量升高 2.52 倍 ( $P<0.01$ )；与正常模型组相比，APN<sup>-/-</sup> 模型组 MDA 含量升高更明显，达 1.39 倍 ( $P<0.01$ )。与正常对照组相比，正常模型组 SOD 活性升高 2.92 倍 ( $P<0.01$ )；与 APN<sup>-/-</sup> 对照组相比，APN<sup>-/-</sup> 模型组 SOD 活性升高 2.51 倍 ( $P<0.01$ )；与正常模型组相比，APN<sup>-/-</sup> 模型组 SOD 活性下降了 28% ( $P<0.01$ ；图 1)。

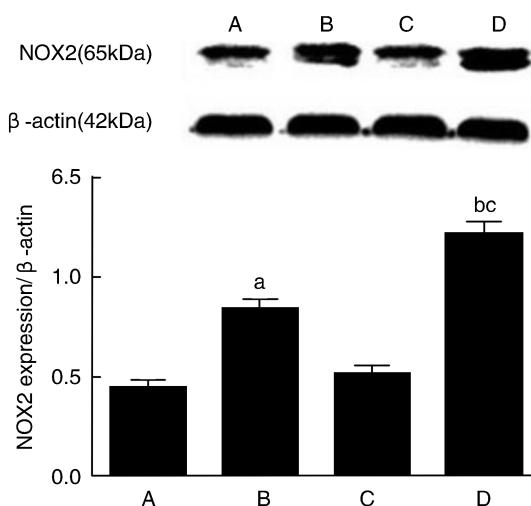


**图 1. 各组小鼠心肌组织内 ROS、MDA 含量及 SOD 活性**  
A 为正常对照组 ( $n=10$ )，B 为正常模型组 ( $n=12$ )，C 为 APN<sup>-/-</sup> 对照组 ( $n=10$ )，D 为 APN<sup>-/-</sup> 模型组 ( $n=12$ )。a 为  $P<0.01$ ，与正常对照组比较；b 为  $P<0.01$ ，与 APN<sup>-/-</sup> 对照组比较；c 为  $P<0.01$ ，与正常模型组比较。

**Figure 1. ROS, MDA contents and SOD activity in myocardial tissue of mice**

### 2.3 小鼠心肌组织 NOX2 蛋白表达

与正常对照组相比，正常模型组 NOX2 蛋白表达量升高 1.87 倍 ( $P<0.01$ )；与 APN<sup>-/-</sup> 对照组比较，APN<sup>-/-</sup> 模型组 NOX2 蛋白表达量升高 2.36 倍 ( $P<0.01$ )；与正常模型组相比，APN<sup>-/-</sup> 模型组 NOX2 蛋白表达量升高更明显，达 1.44 倍 ( $P<0.01$ ；图 2)。



**图 2. 各组小鼠心肌组织 NOX2 的蛋白表达** A 为正常对照组 ( $n=10$ )，B 为正常模型组 ( $n=12$ )，C 为 APN<sup>-/-</sup> 对照组 ( $n=10$ )，D 为 APN<sup>-/-</sup> 模型组 ( $n=12$ )。a 为  $P<0.01$ ，与正常对照组比较；b 为  $P<0.01$ ，与 APN<sup>-/-</sup> 对照组比较；c 为  $P<0.01$ ，与正常模型组比较。

**Figure 2. The expression of NOX2 protein in the myocardium of each group**

### 2.4 小鼠心功能指标变化

各组小鼠心率、室壁厚度、LVEDD 及 LVESD 基本正常，且组间无显著性差异。与正常对照组相比，正常模型组射血分数明显下降 ( $P<0.01$ )；与 APN<sup>-/-</sup> 对照组比较，APN<sup>-/-</sup> 模型组射血分数明显下降 ( $P<0.01$ )；与正常模型组相比，APN<sup>-/-</sup> 模型组射血分数下降更明显 ( $P<0.01$ ；表 1)。

### 2.5 小鼠 LDH、NT-proBNP 浓度变化

与正常对照组相比，正常模型组 LDH 浓度升高 1.98 倍 ( $P<0.01$ )；与 APN<sup>-/-</sup> 对照组相比，APN<sup>-/-</sup> 模型组 LDH 浓度升高 2.56 倍 ( $P<0.01$ )；与正常模型组相比，APN<sup>-/-</sup> 模型组 LDH 活力升高更明显，达 1.3 倍 ( $P<0.01$ )。与正常对照组相比，正常模型组 NT-proBNP 浓度升高 5.13 倍 ( $P<0.01$ )；与 APN<sup>-/-</sup> 对照组相比，APN<sup>-/-</sup> 模型组 NT-proBNP 浓度升高 5.58 倍 ( $P<0.01$ )；与正常模型组相比，APN<sup>-/-</sup> 模型组 NT-proBNP 浓度升高更明显，达 1.25 倍 ( $P<0.01$ ；图 3)。

表1. 各组小鼠心功能指标比较

Table 1. Comparison of cardiac function indexes of mice in each group

指标	正常对照组( <i>n</i> =10)	正常模型组( <i>n</i> =12)	APN <sup>-/-</sup> 对照组( <i>n</i> =10)	APN <sup>-/-</sup> 模型组( <i>n</i> =12)
心率(次/分)	476±28	487±32	463±30	491±38
室壁厚度(mm)	0.76±0.05	0.81±0.04	0.78±0.04	0.79±0.06
LVEDD(mm)	2.41±0.36	2.45±0.23	2.61±0.19	2.65±0.22
LVESD(mm)	1.41±0.13	1.43±0.17	1.52±0.21	1.46±0.15
射血分数(%)	52.6±3.2	38.8±2.7 <sup>a</sup>	50.4±3.8	28.3±1.8 <sup>bc</sup>

a为*P*<0.01,与正常对照组比较;b为*P*<0.01,与APN<sup>-/-</sup>对照组比较;c为*P*<0.01,与正常模型组比较。

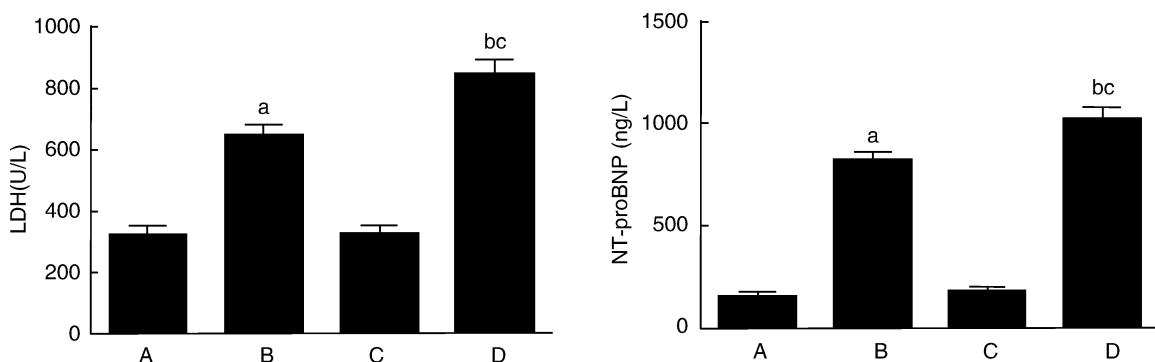


图3. 各组小鼠LDH和NT-proBNP浓度比较 A为正常对照组(*n*=10),B为正常模型组(*n*=12),C为APN<sup>-/-</sup>对照组(*n*=10),D为APN<sup>-/-</sup>模型组(*n*=12)。a为*P*<0.01,与正常对照组比较;b为*P*<0.01,与APN<sup>-/-</sup>对照组比较;c为*P*<0.01,与正常模型组比较。

Figure 3. Comparison of LDH and NT-proBNP concentrations in mice of each group

## 2.6 心肌组织HE、Masson染色情况

HE染色显示,各对照组心肌细胞排列致密均匀,心肌纤维走向连续顺滑;各模型组心肌细胞水肿肥大,胞核皱缩变小,心肌纤维断裂,排列曲折紊乱。与正常模型组相比,APN<sup>-/-</sup>模型组损伤更为明显(图4)。Masson染色显示,心肌纤维呈红色,胶原纤维呈蓝色。与相对照组相比,各模型组心肌

间质胶原纤维增多,且排列紊乱,分布不均。与正常模型组相比,APN<sup>-/-</sup>模型组心肌纤维损伤及纤维化更明显。与正常对照组相比,正常模型组CVF值升高2.63倍(*P*<0.01);与APN<sup>-/-</sup>对照组相比,APN<sup>-/-</sup>模型组CVF值升高2.90倍(*P*<0.01);与正常模型组相比,APN<sup>-/-</sup>模型组CVF值升高更明显,达1.55倍(*P*<0.01;图5)。

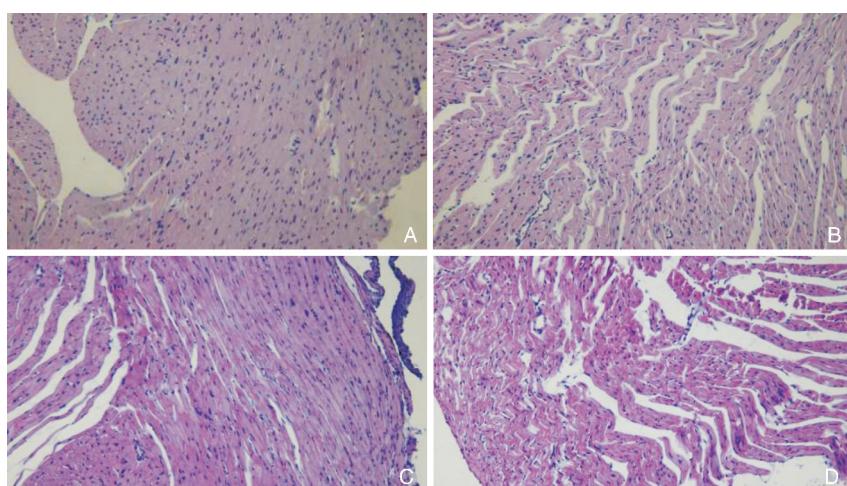
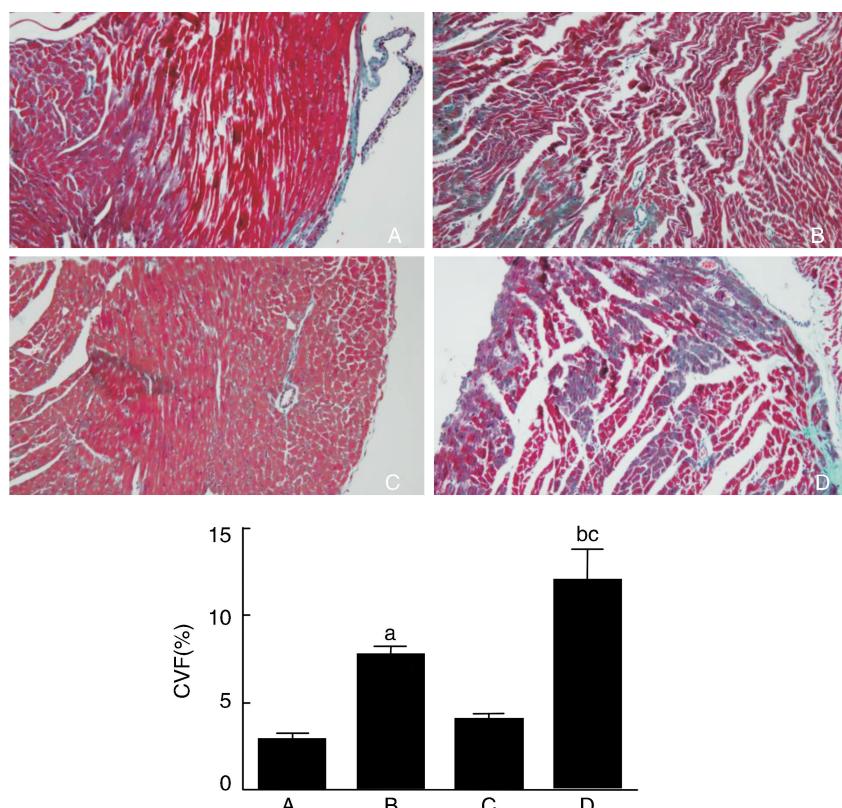


图4. HE染色结果(100×) A为正常对照组(*n*=10),B为正常模型组(*n*=12),C为APN<sup>-/-</sup>对照组(*n*=10),D为APN<sup>-/-</sup>模型组(*n*=12)。a为*P*<0.01,与正常对照组比较;b为*P*<0.01,与APN<sup>-/-</sup>对照组比较;c为*P*<0.01,与正常模型组比较。

Figure 4. HE staining results (100×)

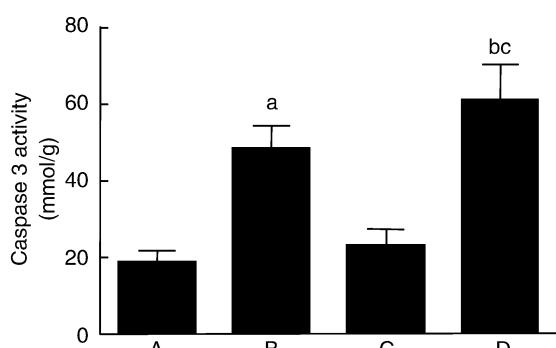


**图 5. Masson 染色结果(100×)及 CVF 值比较** A 为正常对照组( $n=10$ )，B 为正常模型组( $n=12$ )，C 为  $\text{APN}^{-/-}$  对照组( $n=10$ )，D 为  $\text{APN}^{-/-}$  模型组( $n=12$ )。a 为  $P<0.01$ ，与正常对照组比较；b 为  $P<0.01$ ，与  $\text{APN}^{-/-}$  对照组比较；c 为  $P<0.01$ ，与正常模型组比较。

**Figure 5. Masson staining results(100×)and comparison of CVF values**

## 2.7 心肌组织 Caspase 3 活性比较

与正常对照组相比,正常模型组 Caspase 3 活性升高 2.58 倍( $P<0.01$ )；与  $\text{APN}^{-/-}$  对照组比较,  $\text{APN}^{-/-}$  模型组 Caspase 3 活性升高 3.45 倍( $P<0.01$ )；与正常模型组相比,  $\text{APN}^{-/-}$  模型组 Caspase 3 活性升高更明显,达 1.66 倍( $P<0.01$ ;图 6)。



**图 6. 各组小鼠心肌组织 Caspase 3 活性** A 为正常对照组( $n=10$ )，B 为正常模型组( $n=12$ )，C 为  $\text{APN}^{-/-}$  对照组( $n=10$ )，D 为  $\text{APN}^{-/-}$  模型组( $n=12$ )。a 为  $P<0.01$ ，与正常对照组比较；b 为  $P<0.01$ ，与  $\text{APN}^{-/-}$  对照组比较；c 为  $P<0.01$ ，与正常模型组比较。

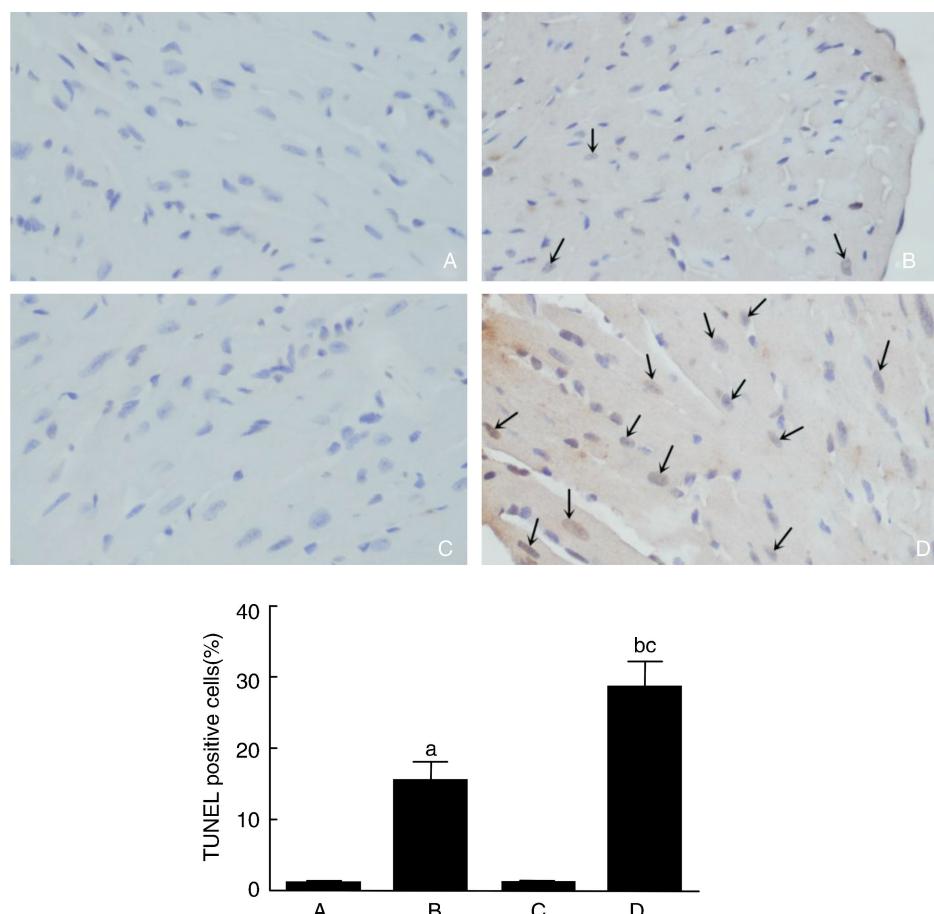
**Figure 6. Caspase 3 activity in the myocardium of mice in each group**

## 2.8 心肌细胞凋亡情况

TUNEL 染色显示,各对照组心肌组织均少见明显细胞凋亡现象,各模型组心肌组织可见凋亡细胞。与正常对照组相比,正常模型组 TUNEL 阳性细胞比例升高 12.67 倍( $P<0.01$ )；与  $\text{APN}^{-/-}$  对照组相比,  $\text{APN}^{-/-}$  模型组 TUNEL 阳性细胞比例升高 19.8 倍( $P<0.01$ )；与正常模型组相比,  $\text{APN}^{-/-}$  模型组 TUNEL 阳性细胞比例升高更明显,达 1.64 倍( $P<0.01$ ;图 7)。

## 3 讨 论

当今社会,酒精消费日趋增多,与其相关的疾病也越来越常见。短期大量饮酒会造成急性心肌损伤,引起心功能下降,甚至危及生命。慢性长期饮酒,也会导致酒精性心肌病,主要表现为心肌肥大及收缩功能障碍<sup>[12]</sup>。本研究通过给予小鼠短期大量酒精冲击,造成急性酒精性心肌损伤模型,从而进行进一步研究<sup>[11]</sup>。本研究发现,短期给予小鼠大量酒精冲击后,小鼠血清 LDH 明显升高,间接说明心肌细胞受损;NT-proBNP 明显升高,射血分数明



**图 7. TUNEL 法检测心肌细胞凋亡(400×)及阳性细胞比例** A 为正常对照组( $n=10$ )，B 为正常模型组( $n=12$ )，C 为 APN<sup>-/-</sup> 对照组( $n=10$ )，D 为 APN<sup>-/-</sup> 模型组( $n=12$ )。a 为  $P<0.01$ ，与正常对照组比较；b 为  $P<0.01$ ，与 APN<sup>-/-</sup> 对照组比较；c 为  $P<0.01$ ，与正常模型组比较。

**Figure 7. Detection of myocardial apoptosis and positive cells proportion by TUNEL staining**

显下降,提示小鼠心功能下降;HE 染色显示心肌细胞水肿肥大,胞核皱缩变小,心肌纤维断裂,排列曲折紊乱;Masson 染色及纤维化指标 VCF 提示心肌纤维化加重;Caspase 3 活性升高及 TUNEL 阳性细胞比例增多,表明心肌细胞凋亡增多。上述结果均提示,急性酒精性心肌损伤模型复制成功。

氧化应激损伤可以诱发生物膜脂质过氧化增强,引起基因突变、DNA 断裂和染色体畸变<sup>[13]</sup>,参与多种心血管疾病的发生、发展。有研究表明,氧化应激损伤可能参与了急性酒精性心肌损伤及酒精性心肌病的发生、发展<sup>[5-6]</sup>。本研究通过检测心肌组织 ROS、MDA 及 SOD 值以反应小鼠的氧化应激水平,结果表明氧化应激过程参与了急性酒精性心肌损伤的发生。

在心血管系统中,ROS 的主要来源之一是 NADPH 氧化酶系,且其介导的氧化应激损伤参与多种心血管疾病的发生<sup>[14]</sup>。NOX2 是心血管系统 NADPH 氧化酶系的主要亚型之一,是 ROS 的主要

供体之一,NOX2 在多种心血管疾病包括心肌损伤中发挥重要作用<sup>[15-16]</sup>。

APN 是由脂肪细胞分泌的一种生物活性因子。研究表明,APN 具有调节胰岛素抵抗,调节糖脂代谢,抗炎,抗动脉粥样硬化等多种生理功能<sup>[17]</sup>。多项研究结果表明,APN 的抗氧化应激作用是保护心血管的主要机制之一<sup>[7,18]</sup>。

目前对于脂联素的研究较多,对急性酒精性心肌损伤的研究也不少,而鲜有对于二者之间的研究。本研究根据上述文献结果,大胆提出“APN 可通过下调 NOX2 表达,减少 ROS 产生,发挥抗氧化应激作用,进而减轻小鼠急性酒精性心肌损伤”的假设,用动物实验模型进行验证。

本研究结果表明:①短期大量酒精冲击可造成小鼠急性酒精性心肌损伤;②氧化应激损伤参与了急性酒精性心肌损伤的发生;③APN 可通过下调 NOX2 蛋白表达减轻氧化应激损伤。总之,验证了我们提出的假设,APN 可通过下调 NOX2 的表达发

挥抗氧化应激作用进而减轻小鼠急性酒精性心肌损伤。本研究拓宽了 APN 的研究范畴,为急性酒精性心肌损伤及酒精性心肌病的研究提供新的思路及研究方法。当然,本研究也有局限之处,比如对于 APN 下调 NOX2 蛋白表达的信号转导通路等,需要进一步深入研究。

#### [参考文献]

- [1] Guzzo-Merello G, Segovia J, Dominguez F, et al. Natural history and prognostic factors in alcoholic cardiomyopathy [J]. *JACC: Heart Failure*, 2015, 3(1): 78-86.
- [2] Piano MR, Phillips SA. Alcoholic cardiomyopathy: pathophysiological insights [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2014, 14(4): 291-308.
- [3] Szabo G, Hoek JB, Darley-Usmar V, et al. RSA 2004: combined basic research satellite symposium-session three: alcohol and mitochondrial metabolism: at the crossroads of life and death [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2005, 29: 1749-752.
- [4] Hannuksela ML, Liisanantti MK, Savolainen MJ. Effect of alcohol on lipids and lipoproteins in relation to atherosclerosis [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2002, 39: 225-283.
- [5] Matyas C, Varga ZV, Mukhopadhyay P, et al. Chronic plus binge ethanol feeding induces myocardial oxidative stress, mitochondrial and cardiovascular dysfunction, and steatosis [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016, 310(11): H1 658-670.
- [6] Wang Y, Zhao J, Yang W, et al. High-dose alcohol induces reactive oxygen species-mediated apoptosis via PKC-β/p66Shc in mouse primary cardiomyocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 456(2): 656-661.
- [7] Tao L, Gao E, Jiao X, et al. Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress [J]. *Circulation*, 2007, 115(11): 1408-416.
- [8] Forte M, Nocella C, De Falco E, et al. The pathophysiological role of NOX2 in hypertension and organ damage [J]. *High Blood Press Cardiovasc Prev*, 2016, 23(4): 355-364.
- [9] Gray SP, Jandeleit-Dahm KA. The role of NADPH oxidase in vascular disease-hypertension, atherosclerosis & stroke [J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(41): 5 933-944.
- [10] Matsushima S, Tsutsui H, Sadoshima J. Physiological and pathological functions of NADPH oxidases during myocardial ischemia-reperfusion [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2014, 24(5): 202-205.
- [11] Kandadi MR, Hu N, Ren J. ULK1 plays a critical role in AMPK-mediated myocardial autophagy and contractile dysfunction following acute alcohol challenge [J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(27): 4 874-887.
- [12] Fernández-Solà J, Planavila Porta A. New treatment strategies for alcohol-induced heart damage [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(10): 1651.
- [13] Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, et al. Extranuclear protection of chromosomal DNA from oxidative stress [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2011, 108(4): 1 711-716.
- [14] García-Redondo AB, Aguado A, Briones AM, et al. NADPH oxidases and vascular remodeling in cardiovascular diseases [J]. *Pharm Res*, 2016, 114: 110-120.
- [15] Loffredo L, Carnevale R, Cangemi R, et al. NOX2 upregulation is associated with artery dysfunction in patients with peripheral artery disease [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 165(1): 184-192.
- [16] Maejima Y, Kuroda J, Matsushima S, et al. Regulation of myocardial growth and death by NADPH oxidase [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(3): 408-416.
- [17] 刘慧荣, 王雅静, 王晓樑, 等. 脂联素:一种治疗心血管损伤的新靶点 [J]. 转化医学研究(电子版), 2012, 2(1): 20-23.
- [18] Matsuda M, Shimomura I. Roles of oxidative stress, adiponectin, and nuclear hormone receptors in obesity-associated insulin resistance and cardiovascular risk [J]. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2014, 19(2): 75-88.

(此文编辑 文玉珊)