

## Urocortin-I 通过激活 Akt/GSK-3 $\beta$ 改善 I/R 心肌单相动作电位及氧化炎症反应

牛欢<sup>1</sup>, 陈曼丽<sup>2</sup>, 董博<sup>1</sup>, 何智余<sup>3</sup>, 杨波<sup>3</sup>

(1. 深圳大学总医院心内科, 广东省深圳市 518005; 2. 深圳市福田区妇幼保健院内科, 广东省深圳市 518017; 3. 兰州大学第一医院心内科, 甘肃省兰州市 730000)

[关键词] Urocortin-I; 心肌缺血再灌注; 单相动作电位; 氧化应激; 炎症反应; Akt/GSK-3 $\beta$  通路

[摘要] 目的 研究 Urocortin-I 通过激活蛋白激酶 B(Akt)/糖原合成酶激酶 3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ ) 通路, 对缺血再灌注(I/R)心肌单相动作电位及氧化炎症反应的作用。方法 制备离体心肌 Langendorff 灌注模型, 并分为对照组、I/R 组、Urocortin-I 组、Urocortin-I+LY 组。对照组进行常规灌注; I/R 组给予常规预处理、Urocortin-I 组给予 Urocortin-I 预处理、Urocortin-I+LY 组给予 Urocortin-I+LY294002 预处理后, 均进行缺血再灌注处理。比较 4 组间心肌酶、心肌梗死面积、单相动作电位、炎症因子、氧化应激产物、Akt/GSK-3 $\beta$  通路分子的差异。结果 与对照组比较, I/R 组乳酸脱氢酶(LDH)、磷酸肌酸激酶同工酶(CK-MB)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 6(IL-6)、细胞间黏附分子 1(ICAM-1)、活性氧簇(ROS)、丙二醛(MDA)的含量及心肌梗死面积明显增加, APA、APD50、APD90 的水平及 p-Akt、p-GSK-3 $\beta$  的含量明显减少( $P < 0.05$ )。与 I/R 组比较, Urocortin-I 组 LDH、CK-MB、TNF- $\alpha$ 、IL-6、ICAM-1、ROS、MDA 的含量及心肌梗死面积明显减少, APA、APD50、APD90 的水平及 p-Akt、p-GSK-3 $\beta$  的含量明显增加( $P < 0.05$ )。与 Urocortin-I 组比较, Urocortin-I+LY 组 LDH、CK-MB、TNF- $\alpha$ 、IL-6、ICAM-1、ROS、MDA 的含量及心肌梗死面积明显增加, APA、APD50、APD90 的水平及 p-Akt、p-GSK-3 $\beta$  的含量明显减少( $P < 0.05$ )。结论 Urocortin-I 通过激活 Akt/GSK-3 $\beta$  通路改善 I/R 心肌的单相动作电位及氧化炎症反应。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Urocortin-I improves monophasic action potential and oxidative inflammation in I/R myocardium by activating Akt/GSK-3 $\beta$ pathway

NIU Huan<sup>1</sup>, CHEN Manli<sup>2</sup>, DONG Bo<sup>1</sup>, HE Zhiyu<sup>3</sup>, YANG Bo<sup>3</sup>

(1. Department of Cardiology, General Hospital of Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518005, China; 2. Department of Cardiology, Shenzhen Futian District Maternal and Child Health Care Physician, Shenzhen, Guangdong 518017, China; 3. Department of Cardiology, Lanzhou University First Hospital, Lanzhou, Gansu 730000, China)

[KEY WORDS] Urocortin-I; myocardial ischemia-reperfusion; monophasic action potential; oxidative stress; inflammatory response; Akt/GSK-3 $\beta$  pathway

[ABSTRACT] **Aim** To explore the improvement effects of Urocortin-I on myocardial monophasic action potential and oxidative inflammatory response in ischemia-reperfusion (I/R) myocardium by activating Akt/GSK-3 $\beta$  pathway.

**Methods** Langendorff perfusion model of isolated myocardium was prepared and then divided into control group, I/R group, Urocortin-I group and Urocortin-I+LY group. The control group was given routine perfusion, I/R group was given routine preconditioning, Urocortin-I group was given Urocortin-I preconditioning, Urocortin-I + LY group was given Urocortin-I and LY294002 preconditioning before ischemia-reperfusion. The differences of myocardial enzymes, infarct size, monophasic action potential, inflammatory factors, oxidative stress products and Akt/GSK-3 $\beta$  pathway molecules among the four groups were compared. **Results** Compared with the control group, the contents of LDH, CK-MB, TNF- $\alpha$ , IL-6, ICAM-1, ROS, MDA and the size of myocardial infarction significantly increased, while the levels of APA, APD50, APD90 and the expression of p-Akt, p-GSK-3 $\beta$  significantly decreased in the I/R group ( $P < 0.05$ ). Compared

[收稿日期] 2019-04-29

[修回日期] 2019-08-29

[基金项目] 甘肃省卫生行业科研计划项目(GSWKY-2015-45)

[作者简介] 牛欢, 硕士, 主治医师, 研究方向为心脏电生理, E-mail 为 yangao70301@163.com。

with the I/R group, the contents of LDH, CK-MB, TNF- $\alpha$ , IL-6, ICAM-1, ROS, MDA and the size of myocardial infarction significantly decreased, while the levels of APA, APD50, APD90 and the expressions of p-Akt, p-GSK-3 $\beta$  significantly increased in the Urocortin-I group ( $P < 0.05$ ). Compared with the Urocortin-I group, the contents of LDH, CK-MB, TNF- $\alpha$ , IL-6, ICAM-1, ROS, MDA and the size of myocardial infarction significantly increased, while the levels of APA, APD50, APD90 and the expressions of p-Akt, p-GSK-3 $\beta$  significantly decreased in the Urocortin-I+LY group ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** Urocortin-I improves monophasic action potential and oxidative inflammation in I/R myocardium by activating Akt/GSK-3 $\beta$  pathway.

心肌缺血再灌注 (ischemia-reperfusion, I/R) 是影响心肌缺血后再灌注治疗效果的主要病理因素<sup>[1-2]</sup>。在心肌 I/R 的过程中,一方面 ATP 通道开放、钾离子大量外流可引起心肌复极化的异常、表现为单相动作电位幅度及时程的改变,同时增加恶性心律失常的发生风险;另一方面单核巨噬细胞、中性粒细胞等在局部心肌大量浸润、释放大细胞因子及氧自由基,进而造成心肌发生氧化炎症反应过度激活并发生损伤<sup>[3-4]</sup>。Urocortin-I 是促肾上腺皮质激素家族中的新成员,在心力衰竭、糖尿病心肌病的动物模型中能够发挥心肌保护作用。在心肌 I/R 过程中,Urocortin-I 已经被证实能够在 Langendorff 离体心肌灌注系统以及离体心肌细胞中抑制氧化炎症反应并发挥保护作用,但 Urocortin-I 发挥上述心肌保护作用的分子机制尚未明确、对心肌细胞单相动作电位幅度及时程的影响也未见报道。

蛋白激酶 B (Akt)/糖原合成酶激酶 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) 通路是目前已知在心肌 I/R 损伤过程中参与炎症反应、氧化应激反应、动作电位调控的信号通路,I/R 的刺激能够使 Akt 及 GSK-3 $\beta$  两种信号分子发生去磷酸化,进而造成炎症反应、氧化应激反应过度激活以及动作电位幅度、时程异常。因此,本实验将通过离体 Langendorff 灌注系统制备心肌 I/R 模型,分析 Urocortin-I 对 I/R 心肌单相动作电位的影响以及对 I/R 心肌氧化炎症反应的作用,并探究 Urocortin-I 的保护作用是否与激活 Akt/GSK-3 $\beta$  通路有关。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物、试剂与仪器

成年雄性 SPF 级 SD 大鼠购自浙江维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(浙)2018-0001。饲养条件为温度 22~24 $^{\circ}$ C、湿度 50%、自由摄食饮水。

Urocortin-I、Akt 抑制剂 LY294002 购自 Sigma 公司,K-H 液、ST. Thomas 停跳液购自上海索莱宝生物

科技公司,乳酸脱氢酶(LDH)、磷酸肌酸激酶同工酶(CK-MB)的分光光度检测试剂盒购自上海艾美捷科技公司,BCA 蛋白定量试剂盒、RIPA 裂解液、活性氧簇(ROS)购自上海碧云天公司,肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 6(IL-6)、细胞间黏附分子 1(ICAM-1)的酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒购自上海酶联公司,丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成研究所,p-Akt、总 Akt、p-GSK-3 $\beta$ 、总 GSK-3 $\beta$  的一抗购自 Santa Cruz 公司。UP-100 型 Langendorff 灌注系统购自北京自然基因科技公司,化学显影仪购自 ABI 公司。

### 1.2 离体心肌 Langendorff 灌注模型的建立

戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉,开胸取出大鼠心脏并放入 4 $^{\circ}$ C 预冷 K-H 液中,剥离残留的肺组织及周围筋膜等其他组织,将主动脉与 Langendorff 灌注装置连接,用 K-H 液进行逆流灌注、维持灌注压在 70 mmHg,平衡 20 min 后,心率 >250 次/分、冠状动脉流量 >5 mL/min 为 Langendorff 灌注模型制备成功。

### 1.3 分组及处理方法

共制备离体 Langendorff 灌注的心肌模型 48 例,随机分为对照组、I/R 组、Urocortin-I 组、Urocortin-I+LY 组,每组 12 例。对照组给予 K-H 液灌注、持续 130 min;I/R 组给予 K-H 液续灌 30 min,换为 32 $^{\circ}$ C ST. Thomas 停跳液灌注、使全心缺血 40 min,而后再换为 K-H 液复灌 60 min;Urocortin-I 组给予含有 10<sup>-8</sup> mol/L Urocortin-I 的 K-H 液续灌 30 min,而后按照 I/R 组相同的方法进行缺血和复灌;Urocortin-I+LY 组给予含有 10<sup>-8</sup> mol/L Urocortin-I 和 15  $\mu$ mol/L LY294002 的 K-H 液续灌 30 min,而后按照 I/R 组相同的方法进行缺血和复灌。

### 1.4 心肌流出液中 LDH、CK-MB 含量的测定

每组随机选择 6 例心脏,在干预完成后收集心肌流出液,采用试剂盒检测 LDH、CK-MB 的含量,操作均按试剂盒说明书进行。

### 1.5 TTC 染色测心肌梗死面积

完成心肌流出液收集后,-20 $^{\circ}$ C 冷冻心脏 20

min,沿心脏短轴将心脏切为 1~2 mm 切片,用 1% TTC 溶液对心脏切片进行染色,37 °C 15 min、10% 多聚甲醛固定过夜,第二天用相机拍照记录。染红色的为正常心肌、染白色或灰色的为梗死心肌,计算梗死心肌占全部心肌的百分比。

### 1.6 心肌单相动作电位的测定

取每组剩余的 6 例心脏,将记录电极放置在左心室前壁表面、参考电极放置在主动脉根部,记录心肌的动作电位幅度(APA)、复极化 50% 的动作电位时程(APD50)、复极化 90% 的动作电位时程(APD90)。

### 1.7 炎症因子及氧化应激产物的测定

完成单相动作电位测定后,用 RIPA 裂解液提取心肌组织中的总蛋白,采用试剂盒测定总蛋白、TNF- $\alpha$ 、IL-6、ICAM-1、ROS、MDA 的含量,计算每毫克总蛋白中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、ICAM-1、ROS、MDA 的含量。

### 1.8 信号通路分子含量的测定

取 RIPA 裂解液抽提得到心肌蛋白样本 30  $\mu$ g、加入 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中,100 V 电泳至上层胶与下层胶分界处,120 V 电泳至下层胶的下缘,电转移至 NC 膜,5% 脱脂牛奶封闭 NC 膜 1 h,p-Akt、总 Akt、p-GSK-3 $\beta$ 、总 GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -actin 的一抗 4 °C 孵育过夜,二抗室温孵育 2 h,最后加入 ECL 显影液并在显影仪中曝光得到蛋白条带,根据条带灰度值计算蛋白含量。

### 1.9 统计学方法

采用 SPSS22.0 软件录入数据,以  $\bar{x} \pm s$  表示,4 组间计量资料经方差齐性检验符合方差齐性后,进行单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 4 组心肌流出液中 LDH、CK-MB 含量的比较

采用分光光度检测试剂盒检测心肌流出液中 LDH、CK-MB 的含量,结果见表 1。与对照组比较,I/R 组心肌流出液中 LDH、CK-MB 的含量明显增加( $P < 0.05$ );与 I/R 组比较,Urocortin-I 组心肌流出液中 LDH、CK-MB 的含量明显减少( $P < 0.05$ );与 Urocortin-I 组比较,Urocortin-I + LY 组心肌流出液中 LDH、CK-MB 的含量明显增加( $P < 0.05$ )。

### 2.2 4 组心肌梗死面积的比较

采用 TTC 染色检测心肌梗死面积,结果见图 1。与对照组比较,I/R 组的心肌梗死面积明显增加( $P$

$< 0.05$ );与 I/R 组比较,Urocortin-I 组的心肌梗死面积明显减少( $P < 0.05$ );与 Urocortin-I 组比较,Urocortin-I + LY 组的心肌梗死面积明显增加( $P < 0.05$ )。

表 1. 4 组心肌流出液中 LDH、CK-MB 含量的比较

Table 1. Comparison of LDH, CK-MB contents in myocardial effluent among 4 groups

分组	n	LDH(U/L)	CK-MB(U/L)
对照组	6	13.21 $\pm$ 2.99	3.59 $\pm$ 0.68
I/R 组	6	72.39 $\pm$ 11.95 <sup>a</sup>	32.45 $\pm$ 6.71 <sup>a</sup>
Urocortin-I 组	6	32.12 $\pm$ 5.68 <sup>b</sup>	9.19 $\pm$ 1.42 <sup>b</sup>
Urocortin-I+LY 组	6	60.19 $\pm$ 9.12 <sup>c</sup>	24.23 $\pm$ 5.61 <sup>c</sup>

a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ ,与 I/R 组比较; c 为  $P < 0.05$ ,与 Urocortin-I 组比较。

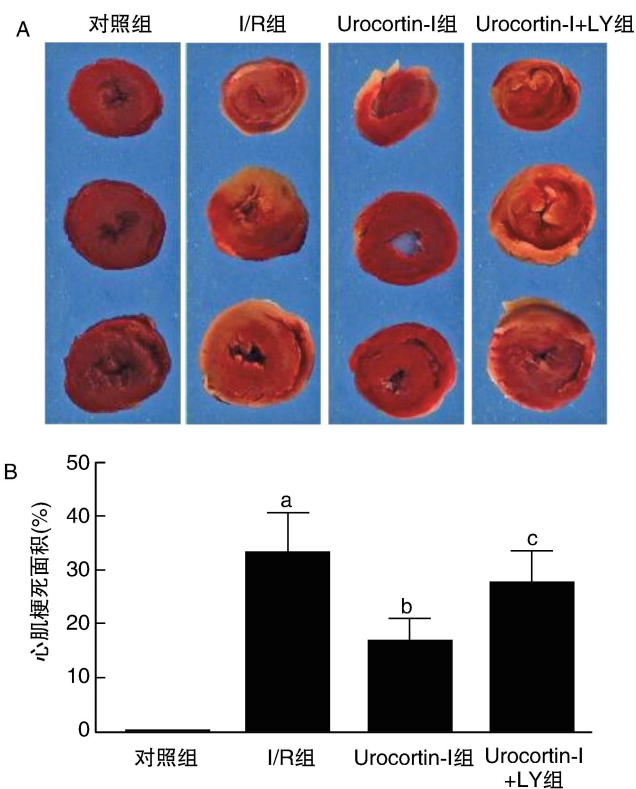


图 1. 4 组心肌梗死面积的比较(TTC 染色) a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ ,与 I/R 组比较; c 为  $P < 0.05$ ,与 Urocortin-I 组比较。

Figure 1. Comparison of myocardial infarct size among 4 groups (TTC staining)

### 2.3 4 组心肌单相动作电位的比较

与对照组比较,I/R 组心室肌的 APA、APD50、APD90 水平明显降低( $P < 0.05$ );与 I/R 组比较,Urocortin-I 组心室肌的 APA、APD50、APD90 水平明显增加( $P < 0.05$ );与 Urocortin-I 组比较,Urocortin-I

+LY 组心室肌的 APA、APD50、APD90 水平明显降低( $P<0.05$ ,表2)。

表 2. 4 组心室肌单相动作电位的比较

Table 2. Comparison of ventricular monophasic action potential among 4 groups

分组	n	APA(mV)	APD50(ms)	APD90(ms)
对照组	6	65.12±9.23	16.51±2.62	76.21±11.37
I/R 组	6	54.03±8.68 <sup>a</sup>	12.77±2.15 <sup>a</sup>	62.56±9.26 <sup>a</sup>
Urocortin-I 组	6	61.36±7.82 <sup>b</sup>	15.36±2.31 <sup>b</sup>	71.44±10.38 <sup>b</sup>
Urocortin-I+LY 组	6	57.23±9.71 <sup>c</sup>	11.76±2.44 <sup>c</sup>	63.14±8.24 <sup>c</sup>

a 为  $P<0.05$ ,与对照组比较; b 为  $P<0.05$ ,与 I/R 组比较; c 为  $P<0.05$ ,与 Urocortin-I 组比较。

#### 2.4 4 组心肌中炎症因子含量的比较

采用 ELISA 试剂盒检测心肌中炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、ICAM-1 的含量,结果见表 3。与对照组比较,I/R 组心肌中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、ICAM-1 的含量明显增加( $P<0.05$ );与 I/R 组比较,Urocortin-I 组心肌中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、ICAM-1 的含量明显减少( $P<0.05$ );与 Urocortin-I 组比较,Urocortin-I+LY 组心肌中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、ICAM-1 的含量明显增加( $P<0.05$ )。

表 3. 4 组心肌中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、ICAM-1 含量的比较

Table 3. Comparison of TNF- $\alpha$ , IL-6, ICAM-1 contents in myocardium among 4 groups

分组	n	TNF- $\alpha$ ( $\mu\text{g/g}$ )	IL-6( $\text{ng/g}$ )	ICAM-1( $\mu\text{g/g}$ )
对照组	6	0.78±0.12	26.31±5.28	11.38±1.96
I/R 组	6	3.25±0.72 <sup>a</sup>	131.44±20.36 <sup>a</sup>	72.31±11.74 <sup>a</sup>
Urocortin-I 组	6	1.36±0.23 <sup>b</sup>	43.12±8.97 <sup>b</sup>	23.53±5.58 <sup>b</sup>
Urocortin-I+LY 组	6	2.51±0.48 <sup>c</sup>	103.66±21.39 <sup>c</sup>	51.32±7.33 <sup>c</sup>

a 为  $P<0.05$ ,与对照组比较; b 为  $P<0.05$ ,与 I/R 组比较; c 为  $P<0.05$ ,与 Urocortin-I 组比较。

#### 2.5 4 组心肌中氧化应激产物含量的比较

采用 TBA 试剂盒检测心肌中氧化应激产物 MDA 的含量,采用 ROS 试剂盒检测心肌中氧化应激产物 ROS 的含量,结果见表 4。与对照组比较,I/R 组心肌中 ROS、MDA 的含量明显增加( $P<0.05$ );与 I/R 组比较,Urocortin-I 组心肌中 ROS、MDA 的含量明显减少( $P<0.05$ );与 Urocortin-I 组比较,Urocortin-I+LY 组心肌中 ROS、MDA 的含量明显增加( $P<0.05$ )。

#### 2.6 4 组心肌中 Akt/GSK-3 $\beta$ 通路分子含量的比较

采用 Western blot 检测心肌中 p-Akt、p-GSK-3 $\beta$  的含量,结果见图 2、表 5。与对照组比较,I/R 组心

肌中 p-Akt、p-GSK-3 $\beta$  的含量明显减少( $P<0.05$ );与 I/R 组比较,Urocortin-I 组心肌中 p-Akt、p-GSK-3 $\beta$  的含量明显增加( $P<0.05$ );与 Urocortin-I 组比较,Urocortin-I+LY 组心肌中 p-Akt、p-GSK-3 $\beta$  的含量明显减少( $P<0.05$ )。

表 4. 4 组心肌中 ROS、MDA 含量的比较

Table 4. Comparison of ROS, MDA contents in myocardium among 4 groups

分组	n	ROS(MFI)	MDA( $\mu\text{mol/mg}$ )
对照组	6	0.32±0.07	2.65±0.52
I/R 组	6	5.61±0.95 <sup>a</sup>	13.28±2.35 <sup>a</sup>
Urocortin-I 组	6	1.46±0.25 <sup>b</sup>	5.12±0.83 <sup>b</sup>
Urocortin-I+LY 组	6	4.82±0.77 <sup>c</sup>	11.56±2.14 <sup>c</sup>

a 为  $P<0.05$ ,与对照组比较; b 为  $P<0.05$ ,与 I/R 组比较; c 为  $P<0.05$ ,与 Urocortin-I 组比较。

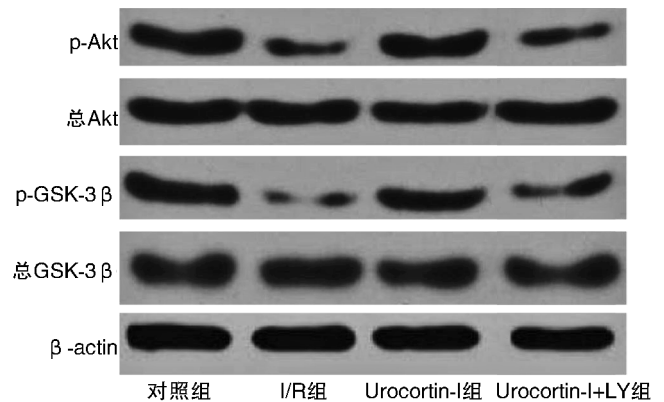


图 2. 4 组心肌中 p-Akt、p-GSK-3 $\beta$  的蛋白条带

Figure 2. Protein bands of p-Akt, p-GSK-3 $\beta$  in myocardium of 4 groups

表 5. 4 组心肌中 p-Akt、p-GSK-3 $\beta$  含量的比较

Table 5. Comparison of p-Akt, p-GSK-3 $\beta$  expression in myocardium among 4 groups

分组	n	p-Akt/总 Akt	p-GSK-3 $\beta$ /总 GSK-3 $\beta$
对照组	6	0.92±0.14	1.04±0.22
I/R 组	6	0.36±0.07 <sup>a</sup>	0.24±0.06 <sup>a</sup>
Urocortin-I 组	6	0.86±0.15 <sup>b</sup>	0.81±0.14 <sup>b</sup>
Urocortin-I+LY 组	6	0.45±0.08 <sup>c</sup>	0.40±0.08 <sup>c</sup>

a 为  $P<0.05$ ,与对照组比较; b 为  $P<0.05$ ,与 I/R 组比较; c 为  $P<0.05$ ,与 Urocortin-I 组比较。

### 3 讨论

在心肌经历 I/R 的过程中,在多种病理生理机制的作用下心肌会出现损伤。心肌 I/R 损伤也是目



前临床治疗中遇到的难点,心肌梗死患者接受 PCI 治疗能够及时再通冠状动脉、恢复缺血心肌的血流,但 I/R 损伤却会影响治疗效果及病情转归。因此,近年来心肌 I/R 损伤的防治成为了心血管领域的研究热点。本实验在离体 Langendorff 灌注系统中建立了心肌 I/R 模型,通过心肌酶 LDH、CK-MB 含量的检测及心肌梗死面积的计算来评价心肌损害的程度。本研究发现,离体心肌经历 I/R 后的 LDH、CK-MB 含量及心肌梗死面积均明显增加,说明 Langendorff 灌注系统中的 I/R 过程引起了离体心肌发生损害。在此基础上,本实验将探究 Urocortin-I 对心肌 I/R 损伤的保护作用。Urocortin-I 的心肌保护作用以及在心力衰竭及糖尿病心肌病的动物模型中被证实<sup>[5-6]</sup>,其发挥心肌保护作用的有效浓度是  $10^{-8}$  mol/L<sup>[7]</sup>,因此本实验选择  $10^{-8}$  mol/L 的 Urocortin-I 在心肌 I/R 前进行预处理,通过观察心肌损伤程度发现,Urocortin-I 预处理能够明显减少 LDH、CK-MB 含量及心肌梗死面积,说明 Urocortin-I 对心肌 I/R 损伤具有保护作用。

心肌 I/R 损伤的过程涉及多个病理生理环节,包括 ATP 通道开放、钾离子外流所造成的动作电位改变,单核巨噬细胞、中性粒细胞浸润所造成的氧化炎症反应激活。单相动作电位是反应局部组织综合心电图向量的指标,钾离子的大量外流会使心肌细胞的复极化加速<sup>[8-9]</sup>,本实验中 I/R 心肌单相动作电位的 APA、APD50、APD90 均明显减少,说明 I/R 心肌的动作电位时程变短、幅度变小,进而可影响心肌收缩力、增加心律失常发生风险。在单核巨噬细胞、中性粒细胞引起氧化炎症反应激活的过程中,TNF- $\alpha$ 、IL-6、ICAM-1 等细胞因子的大量分泌能够介导炎症反应的级联放大,ROS 的大量生成则能引起脂质发生氧化反应、产生氧化产物 MDA,在炎症氧化反应的共同作用下、心肌损伤加剧<sup>[10-13]</sup>;本实验在 I/R 心肌的 TNF- $\alpha$ 、IL-6、ICAM-1、ROS、MDA 含量均明显增加,说明 I/R 心肌的氧化炎症反应均明显激活。在 I/R 前用 Urocortin-I 进行预处理后,心肌单相动作电位的 APA、APD50、APD90 均明显增加,而心肌中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、ICAM-1、ROS、MDA 的含量均明显减少,说明 Urocortin-I 能够同时改善 I/R 心肌的单相动作电位及氧化炎症反应。

在明确了 Urocortin-I 上述的心肌保护作用后,本实验进一步对介导该作用的可能分子机制进行了探究。丝苏氨酸蛋白激酶 GSK-3 $\beta$  是细胞内一种能够抑制糖原合成的激酶,新近的越来越多研究发现 GSK-3 $\beta$  对线粒体通透性转变孔、核因子  $\kappa$ B 等具

有调控作用<sup>[14-15]</sup>。Akt 是 GSK-3 $\beta$  的上游调控分子,Akt 发生磷酸化后能够催化 GSK-3 $\beta$  也发生磷酸化,p-GSK-3 $\beta$  失去了增加 ATP 释放、激活核因子  $\kappa$ B 的作用;而当 Akt 发生去磷酸化后,GSK-3 $\beta$  的磷酸化程度下降、活性增强,进而通过对线粒体通透性转变孔的调控能够影响 ATP 的释放、改变动作电位的时程和幅度,通过对核因子  $\kappa$ B 的调控能够影响氧化炎症反应的激活<sup>[16-17]</sup>。在本实验中,I/R 心肌中 p-Akt、p-GSK-3 $\beta$  的含量明显减少,Urocortin-I 预处理能够增加 p-Akt、p-GSK-3 $\beta$  的含量,说明心肌 I/R 能够使 Akt/GSK-3 $\beta$  通路发生抑制,而 Urocortin-I 则能使 I/R 心肌中的 Akt/GSK-3 $\beta$  通路发生激活,这也可能是 Urocortin-I 发挥心肌保护作用的机制。为了验证这一机制,Akt 的抑制剂 LY294002 与 Urocortin-I 联合用于 I/R 预处理,在加用 LY294002 后,Urocortin-I 减轻 I/R 心肌损伤、改善 I/R 心肌单相动作电位及氧化炎症反应的作用被削弱,由此证实 Akt/GSK-3 $\beta$  通路的激活介导了 Urocortin-I 减轻 I/R 心肌损伤的作用。

综上所述,Urocortin-I 能够减轻 I/R 心肌损伤、改善 I/R 心肌的单相动作电位及氧化炎症反应、激活 I/R 心肌的 Akt/GSK-3 $\beta$  通路,Akt/GSK-3 $\beta$  通路的激活部分介导了 Urocortin-I 对 I/R 心肌的保护作用。

#### [参考文献]

- [1] Hausenloy DJ, Chilian W, Crea F, et al. The coronary circulation in acute myocardial ischaemia/reperfusion injury: a target for cardioprotection [J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115(7): 1143-1155.
- [2] Tibaut M, Mekis D, Petrovic D. Pathophysiology of myocardial infarction and acute management strategies [J]. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 2017, 14(3): 150-159.
- [3] Lakota J. Molecular mechanism of ischemia-reperfusion injury after myocardial infarction and its possible targeted treatment [J]. *Int J Cardiol*, 2016, 29(220): 571-572.
- [4] Tse G, Wong ST, Tse V, Yeo JM. Monophasic action potential recordings: which is the recording electrode [J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2016, 27(5): 457-462.
- [5] Calderón-Sánchez E, Díaz I, Ordóñez A, et al. Urocortin-1 mediated cardioprotection involves XIAP and CD40-Lig and recovery: role of EPAC2 and ERK1/2 [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0147375.
- [6] 刘新宇,刘春娜,李思璇,等. Urocortin 对糖尿病心肌病的保护作用与 Akt/GSK-3 $\beta$  信号通路的关系 [J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(7): 973-977.

- [7] Rademaker MT, Richards AM. Urocortins: actions in health and heart failure[J]. Clin Chim Acta, 2017, 474: 76-87.
- [8] Gao Z, Sierra A, Zhu Z, et al. Loss of ATP-sensitive potassium channel surface expression in heart failure underlies dysregulation of action potential duration and myocardial vulnerability to injury[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151337.
- [9] Chen X, Qin M, Jiang W, et al. Electrophysiological characteristics of pressure overload-induced cardiac hypertrophy and its influence on ventricular arrhythmias [J]. PLoS One, 2017, 12(9): e0183671.
- [10] Li H, Sun K, Zhao R, et al. Inflammatory biomarkers of coronary heart disease [J]. Front Biosci (Schol Ed), 2018, 1(10): 185-196.
- [11] Liu WB, Han XH, Guo YY, et al. Effects of tumor necrosis factor and E-selectin on coronary artery flow [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(8): 1843-1849.
- [12] Qiu Z, He Y, Ming H, et al. Lipopolysaccharide (LPS) aggravates high glucose and hypoxia/reoxygenation-induced injury through activating ROS-dependent NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in H9C2 cardiomyocytes [J]. J Diabetes Res, 2019, 17(2019): 815-836.
- [13] Tahrir FG, Langford D, Amini S, et al. Mitochondrial quality control in cardiac cells: Mechanisms and role in cardiac cell injury and disease[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(6): 8122-8133.
- [14] Nikolaou PE, Boengler K, Efentakis P, et al. Investigating and re-evaluating the role of glycogen synthase kinase 3 beta kinase as a molecular target for cardioprotection by using novel pharmacological inhibitors[J]. Cardiovasc Res, 2019, 115(7): 1228-1243.
- [15] Wang Y, Ge C, Chen J, et al. GSK-3 $\beta$  inhibition confers cardioprotection associated with the restoration of mitochondrial function and suppression of endoplasmic reticulum stress in sevoflurane preconditioned rats following ischemia/reperfusion injury[J]. Perfusion, 2018, 33(8): 679-686.
- [16] Hu Y, Li L, Yin W, et al. Protective effect of proanthocyanidins on anoxia-reoxygenation injury of myocardial cells mediated by the PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  pathway and mitochondrial ATP-sensitive potassium channel [J]. Mol Med Rep, 2014, 10(4): 2051-2058.
- [17] He M, Zhang Y, Xie F, et al. Role of PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B and GSK-3 $\beta$  pathways in the rat model of cardiopulmonary bypass-related lung injury [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 747-754.
- (此文编辑 朱雯霞)