

黄素腺嘌呤二核苷酸通过激活 SCAD 抑制大鼠病理性心肌肥厚和心肌纤维化

马智超¹, 秦学¹, 廖英勤¹, 钟小艺¹, 苏永少¹, 刘培庆², 路静², 周四桂¹

(1. 广东药科大学临床药理学系, 广东省广州市 510006; 2. 中山大学药学院药理与毒理学实验室, 广东省广州市 510006)

[关键词] 黄素腺嘌呤二核苷酸; 短链酰基辅酶 A 脱氢酶; 病理性心肌肥厚; 心肌纤维化; 心肌能量代谢

[摘要] 目的 探究黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)在自发性高血压大鼠病理性心肌肥厚和心肌纤维化中的作用及防治机制。方法 选取 12 周龄的自发性高血压大鼠(SHR)及周龄匹配的 Wistar 大鼠。经尾静脉注射 FAD(每天 1 $\mu\text{mol/kg}$)治疗 10 周后,采用无创血压测量仪检测大鼠的血压及心率;超声心动图和组织学方法观察病理性心肌肥厚和心肌纤维化程度;Western blot 方法检测短链酰基辅酶 A 脱氢酶(SCAD)、Collagen I、Collagen III、 α -SMA 的蛋白表达水平;免疫荧光单标法进一步验证 SCAD 的蛋白表达水平;荧光定量 PCR 检测 SCAD、ANF、脑利钠肽(BNP)以及 Collagen I、Collagen III、 α -SMA 的 mRNA 表达水平;检测 SCAD 酶活性、ATP、游离脂肪酸、BNP 及活性氧含量。结果 自发性高血压大鼠经 FAD 治疗后,收缩压和心率均明显降低;病理性心肌肥厚和心肌纤维化程度得到明显改善;心肌组织中 SCAD 的 mRNA、蛋白表达、酶活性及 ATP 含量均显著增高,游离脂肪酸和活性氧水平明显降低($P<0.05$)。结论 FAD 可能通过激活 SCAD,改善心肌能量代谢,减少氧化应激,从而抑制自发性高血压大鼠病理性心肌肥厚和心肌纤维化。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

FAD inhibits pathological cardiac hypertrophy and cardiac fibrosis in SHR through activating SCAD

MA Zhichao¹, QIN Xue¹, LIAO Yingqin¹, ZHONG Xiaoyi¹, SU Yongshao¹, LIU Peiqing², LU Jing², ZHOU Sigui¹

(1. Department of Clinical Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510006, China;

2. Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

[KEY WORDS] flavin adenine dinucleotide; short-chain acyl-CoA dehydrogenase; cardiac energy metabolism; pathological cardiac hypertrophy; cardiac fibrosis

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effects of flavin adenine dinucleotide (FAD) on cardiac hypertrophy and cardiac fibrosis in spontaneously hypertensive rats (SHR), and to explore the mechanism of FAD on preventing and treating cardiac hypertrophy and cardiac fibrosis. **Methods** 12-week-old SHR and age-matched Wistar rats were selected and divided into Wistar control group, Wistar experimental group, SHR control group and SHR experimental group. After treated with FAD (1 $\mu\text{mol}/(\text{kg} \cdot \text{d})$) in the tail vein for 10 weeks, the systolic blood pressure and heart rate of the rats were detected by non-invasive blood pressure measuring instrument. Cardiac hypertrophy and cardiac fibrosis were observed by echocardiography and histology. The protein expression levels of SCAD (short-chain acyl-CoA dehydrogenase), Collagen I, Collagen III and α -SMA were detected by Western blot. Immunofluorescence single-label method was used to further verify the protein expression level of SCAD. The mRNA expression levels of SCAD, ANF, BNP, Collagen I, Collagen III and α -SMA were detected by quantitative PCR. SCAD enzyme activity, content of ATP, free fatty acids, brain natriuretic peptide (BNP) and reactive oxygen were detected. **Results** Systolic blood pressure and heart rate in

[收稿日期] 2019-11-20

[修回日期] 2020-02-21

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81670239);广东省自然科学基金项目(2016A030313729);广东药科大学“创新强校工程”资助项目(2017SFKC27)

[作者简介] 马智超,硕士研究生,研究方向为心血管药理,E-mail 为 1101839583@qq.com。通信作者周四桂,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向为心血管药理,E-mail 为 zhousg201014@163.com。

SHR were significantly decreased after FAD treatment. Cardiac hypertrophy and cardiac fibrosis were significantly improved. SCAD mRNA, protein expression, enzyme activity and ATP content in the cardiac muscle of SHR were significantly increased. The levels of free fatty acids and reactive oxygen were significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** FAD may inhibit cardiac hypertrophy and cardiac fibrosis in SHR through activating SCAD, improving cardiac energy metabolism and reducing oxidative stress.

心力衰竭是慢性心血管疾病的终末阶段,迄今为止,几乎没有疗法可以进行早期干预或长期有效治疗^[1-2]。高血压引起的病理性心肌肥厚被认为是心脏病发生率和死亡率增高的重要危险因素,长期病理性心肌肥厚能够引起扩张型心肌病、心力衰竭甚至心源性猝死^[3-4]。病理性心脏重塑和心力衰竭的病理特征是不可逆的心肌细胞增大,肌节紊乱,心肌纤维化^[5-6]。

短链酰基辅酶 A 脱氢酶 (short chain acyl-CoA dehydrogenase, SCAD) 是脂肪酸 β 氧化的限速酶,催化短链酰基辅酶 A 的脱氢反应。本课题组的前期研究显示,SCAD 在自发性高血压大鼠心肌肥厚、心肌纤维化中的表达明显下调^[7],在心肌细胞肥大模型、心肌成纤维细胞增殖模型中,SCAD 的表达也明显下调。此外,SCAD siRNA 能显著诱导心肌细胞出现病理性肥大和心肌成纤维细胞增殖^[8-9]。以上研究表明,SCAD 对病理性心肌肥厚和心肌纤维化具有负性调控作用,上调 SCAD 表达有可能成为干预病理性心肌肥厚和心肌纤维化的重要环节之一。研究表明,黄素腺嘌呤二核苷酸 (flavin adenine dinucleotide, FAD) 可以提高大鼠线粒体中的 SCAD 蛋白表达量、mRNA 水平及活性^[10],然而,FAD 是否通过激活 SCAD,从而防治病理性心肌肥厚和心肌纤维化尚不清楚。本研究采用自发性高血压大鼠作为病理性心肌肥厚和心肌纤维化模型,Wistar 大鼠作为正常对照,采用尾静脉注射 FAD 治疗 10 周,观察 FAD 对病理性心肌肥厚和心肌纤维化的影响,为病理性心肌肥厚和心肌纤维化的防治提供新思路。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

Western blot 发光液以及 BCA 蛋白定量试剂盒购于赛默飞公司;单克隆兔抗 Collagen I、Collagen III、SCAD 和 α -SMA 抗体均购于 Abcam 公司;黄素腺嘌呤二核苷酸钠 (FAD)、单克隆鼠抗 α -tubulin 抗体、抗兔二抗及抗鼠二抗均购于 Sigma 公司;real-time PCR 测定试剂盒、TRIzol 和 SYBR Green 购于 TaKaRa 公司;real-time PCR 引物购于上海生工生物

工程公司;SCAD 活性比色法定量测定试剂盒购于上海杰美基因公司;ATP 检测试剂盒购于碧云天生物公司;脑利钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP) 测定试剂盒以及游离脂肪酸 (free fatty acids, FFA) 测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.2 实验动物

12 只 Wistar 雄性大鼠 (11 周龄) 购于广东省实验中心,许可证编号为 SYSK (粤) 2016-0041;12 只 SHR 雄性大鼠 (11 周龄) 购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号为 SCXK (京) 2016-0006。正常饲养 1 周后进行实验。实验分为 4 组。正常生理盐水组 (Wistar+NS): 6 只 12 周龄 Wistar 大鼠,尾静脉注射生理盐水 10 周;SHR 生理盐水组 (SHR+NS): 6 只 12 周龄 SHR,尾静脉注射生理盐水 10 周;正常给药组 (Wistar+FAD): 6 只 12 周龄 Wistar 大鼠,尾静脉注射 FAD (每天 $1 \mu\text{mol/kg}$) 10 周;SHR 给药组 (SHR+FAD): 6 只 12 周龄 SHR,尾静脉注射 FAD (每天 $1 \mu\text{mol/kg}$) 10 周。

1.3 大鼠的血压及心率的测量

FAD 给药剂量通过大鼠与人体间的等效剂量换算式所得^[11],并综合参考 Hashmi^[12] 的 FAD 给药方案。各组大鼠的收缩压和心率通过尾动脉测量法测量,测量时间段为 9:00~13:00。待大鼠处于安静状态下采用无创束尾血压仪测量血压及心率。从给药前的 12 周龄期测量后,间隔 2 周测定 1 次,直至第 10 周给药结束。

1.4 超声心动图检查

FAD 治疗 10 周后,大鼠经异氟烷 (剂量控制: 0%~5%) 吸入麻醉后,超声心动图分别测量大鼠的收缩末期左心室前壁厚度 (left ventricular anterior wall end-systolic dimension, LVAWs)、收缩末期左心室后壁厚度 (left ventricular posterior wall end-systolic dimension, LVPWs)、舒张末期左心室前壁厚度 (LVAW-diastolic dimension, LVAWd)、舒张末期左心室后壁厚度 (LVPW-diastolic dimension, LVPWd)、心脏射血分数 (ejection fraction, EF)、心脏的缩短分数 (fractional shortening, FS)、左心室收缩末期的容积 (left ventricular end systolic volume, LVESV)、左心室舒张末期的容积 LVEDV (left ventricular end diastole

volume)、收缩末期左心室内径(left ventricular dimensions at end systole,LVIDs)、舒张末期左心室内径(left ventricular dimensions at end diastole,LVIDd)。

1.5 左心室质量指数检测

心脏经生理盐水充分灌注后,取出,滤纸吸干。剪去血管、心房及右心室游离壁。左心室质量指数通过计算左心室质量与体质量的比值所得。心脏组织经速冻后于-80℃保存。

1.6 染色观察心脏组织形态、检测指标及定量分析

4%多聚甲醛固定的心肌组织经冲洗、脱水、透明等步骤处理后,进行石蜡包埋并切片,厚度6μm。切片分别进行HE染色、Masson三色法染色、天狼星红染色以及SCAD荧光染色。用计算机软件Image J进行图像分析。通过心脏纵切面的HE染色切片观察心室大小及室壁厚度,并通过测定单个心肌细胞表面积(cardiomyocyte surface area)分析鉴定心肌肥厚程度。通过测量胶原面积和视野面积来计算胶原容积分数(collagen volume fraction,CVF);通过测量Masson三色染色切片血管周围胶原和管腔面积的比值计算血管周围胶原面积(perivascular collagen area,PCVF)通过测量天狼星红染色切片的血管周围胶原计算胶原面积含量。切片在室温下用含10%血清的PBS封闭1h。待封闭步骤完成后直接加入一抗工作液,于4℃保存过夜。用PBS冲洗切片,室温中加入二抗孵育2h。切片经4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)染色后封片。

1.7 活性氧(ROS)含量测定

组织包埋后通过冰冻切片法将组织切片,切薄片至5μm厚度。组织切片经4℃丙酮固定后烘

干,切片经含10%血清的PBS封闭1.5h后加入一抗工作液,于4℃保存过夜。用PBS冲洗切片,室温中二抗孵育组织切片2h。切片经DAPI染核后封片。Image J分析图像的平均荧光强度。

1.8 蛋白质免疫印迹法

使用补充了蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液提取总蛋白,并通过Pierce BCA蛋白分析试剂盒测量蛋白浓度。蛋白质上样于12%预制的SDS-PAGE凝胶中,并通过电泳分离。电泳分离后,蛋白质转移到PVDF膜上(Millipore,Bedford,MA,USA)。在室温下,用Tween-20(TBST)在Tris缓冲盐水中5%BSA封闭印迹1h。用TBST洗涤3次后,加入一抗后在室温下孵育,包括兔抗SCAD单克隆抗体(1:1000稀释)、Collagen I抗体(1:1000稀释)、Collagen III抗体(1:1000稀释)、α-SMA抗体(1:1000稀释)、α-tubulin单克隆抗体(1:5000稀释),然后使用兔IgG1二抗(1:10000稀释)孵育1h。最后,用化学发光底物(Thermo,Waltham,MA,USA)检测蛋白质表达水平。使用Image J系统分析结果。

1.9 实时荧光定量PCR

严格按照TRIZOL(TaKaRA Japan)试剂盒说明书提取大鼠心肌组织总RNA。使用带有Gdna Eraser(日本TaKaRA公司)的PrimeScript™ RT试剂盒,在37℃进行15 min,在85℃5 s进行反转录。使用SYBR® Premix EX Taq™(日本TaKaRA公司)进行实时PCR。基因表达的相对定量采用2^{-ΔΔCt}方法计算结果,使用GAPDH表达将数据标准化。引物序列如表1所示。

表1. 引物序列

Table 1. The sequences of the primers

| Gene | Forward | Reverse |
|--------------|----------------------------|---------------------------------|
| SCAD | 5'-TGCCCTATGTTTCGCACCTC-3' | 5'-TTCAATGCCCATCATCCCTT-3' |
| ANF | 5'-GGAAGTCAACCCGTCTCA-3' | 5'-ACGCCGTTGGCTACCATCTTG-3' |
| BNP | 5'-TTTGGGCAGAAGATAGACCG-3' | 5'-AGCCCTCAGTTTGCTTTT-3' |
| Collagen III | 5'-CCACGAGGTGACAAAGGTGA-3' | 5'-GCCAGGGAATCCTCGATGT-3' |
| Collagen I | 5'-CCCTGAAGTCAGCTGCAT-3' | 5'-ATATTCTTCTGGGCAGAA-3' |
| α-SMA | 5'-TCCAGAGTCCACAATACCAG-3' | 5'-AATGACCCAGATTATGTTTGAGACC-3' |
| GADPH | 5'-AGGAGTAAGAAACCCTGGAC-3' | 5'-CTGGGATGGAATTGTGAG-3' |

1.10 SCAD 酶活性检测

心肌组织经液氮储存过夜后取出,加入裂解

液,经手动研磨器充分研磨。按照SCAD酶活性试剂盒说明书步骤进行。通过心肌组织蛋白的浓度

标准化各组样品,最后测量 600 nm 波长下的吸光度并计算出心肌组织中的 SCAD 酶活性。

1.11 ATP 含量测定

严格按照 ATP 检测试剂盒说明书进行操作。用连续波长多功能酶标仪(Luminometer)检测样品、标准品的 RLU 值。设定标准曲线,并将样品 RLU 值代入标准曲线中,计算出 ATP 含量。

1.12 游离脂肪酸含量检测

心肌组织加入裂解液,经手动研磨器充分研磨。通过 ELISA 试剂盒分别检测大鼠的血清及心肌组织的游离脂肪酸含量。最后测量 450 nm 波长下的吸光度并分别计算血清和心肌组织的游离脂肪酸含量。

1.13 脑利钠肽(BNP)含量检测

严格按照 BNP 检测试剂盒说明书进行操作,测定心肌组织的 BNP 含量。

1.14 统计学分析

数据的单因素方差分析在 SPSS13.0 软件下进行,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 FAD 对 SHR 血压及心率的影响

Wistar+NS 组大鼠和 Wistar+FAD 组大鼠的收缩压均维持在正常血压范围内。给药前(12 周龄),SHR+FAD 组和 SHR+NS 组大鼠的收缩压和心率均无统计学差异。随着周龄增加,相比于 Wistar+NS 组,SHR+NS 组大鼠的收缩压和心率明显升高($P < 0.01$),与 SHR+NS 组相比,尾静脉注射 FAD 治疗后,SHR 组大鼠的收缩压和心率显著降低($P < 0.01$)。图 1 结果表明,FAD 显著降低了 SHR 的血压和心率。

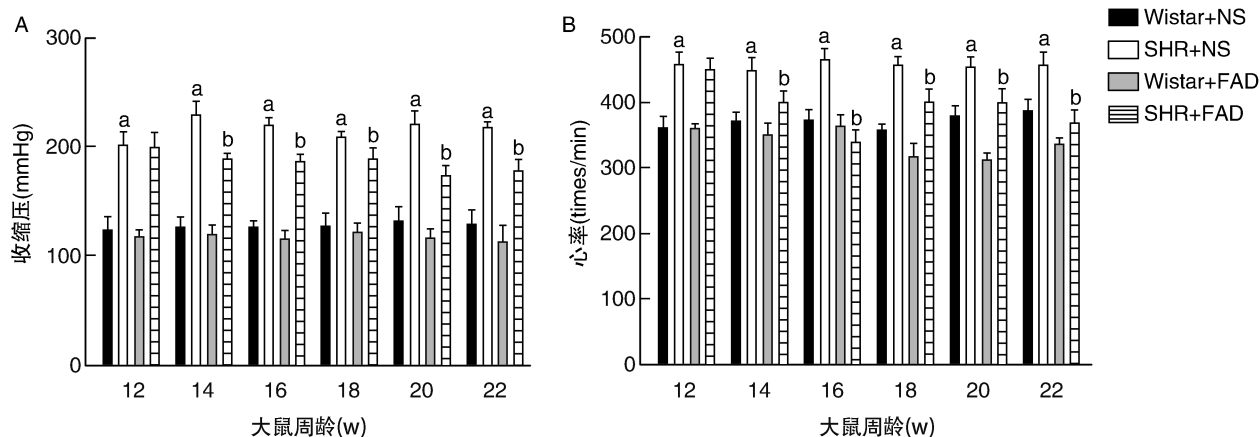


图 1. 各组大鼠血压及心率的变化($n=6$) A 为大鼠在各周龄期的收缩压;B 为大鼠在各周龄期的心率。a 为 $P < 0.01$, 与 Wistar+NS 组比较;b 为 $P < 0.01$, 与 SHR+NS 组比较。

Figure 1. Changes of blood pressure and heart rate in rats ($n=6$)

2.2 FAD 对 SHR 病理性心肌肥厚的影响

与 Wistar+NS 组相比,SHR+NS 组大鼠的心室壁厚度、心肌细胞表面积以及心室质量指数明显增加($P < 0.01$),心室腔明显减小,心肌肥厚标志物 ANF、BNP 的 mRNA 表达量也显著升高。与 SHR+NS 组相比,SHR+FAD 组大鼠经尾静脉注射 FAD 治疗后的心室壁明显变薄,心室腔明显增大,心肌细胞表面积、心室质量指数以及 ANF、BNP mRNA 表达显著下降($P < 0.01$),心肌肥厚程度明显减轻。此外,心肌 BNP 含量也呈现出了一致的变化趋势。图 2 结果表明,FAD 显著改善了 SHR 的病理性心肌肥厚。

2.3 各组大鼠超声心动图的变化

为观察 FAD 对大鼠心功能及心脏结构的影响,本研究进行了超声心动图检测。与 Wistar+NS 组相比,SHR+NS 组大鼠的 EF、FS、LVESV、LVEDV、LVIDs、LVIDd 均显著降低($P < 0.05$),LVAWs、LVAWd、LVPWs、LVPWd 均显著增($P < 0.05$)。然而相比于 SHR+NS 组,经尾静脉注射 FAD 治疗 10 周后,SHR 的 EF、FS、LVESV、LVEDV、LVIDs、LVIDd 均明显增高($P < 0.05$),LVAWs、LVAWd、LVPWs、LVPWd 均明显降低($P < 0.05$)。图 3 结果表明,FAD 对 SHR 心功能及病理性心肌肥厚具有明显的改善作用。

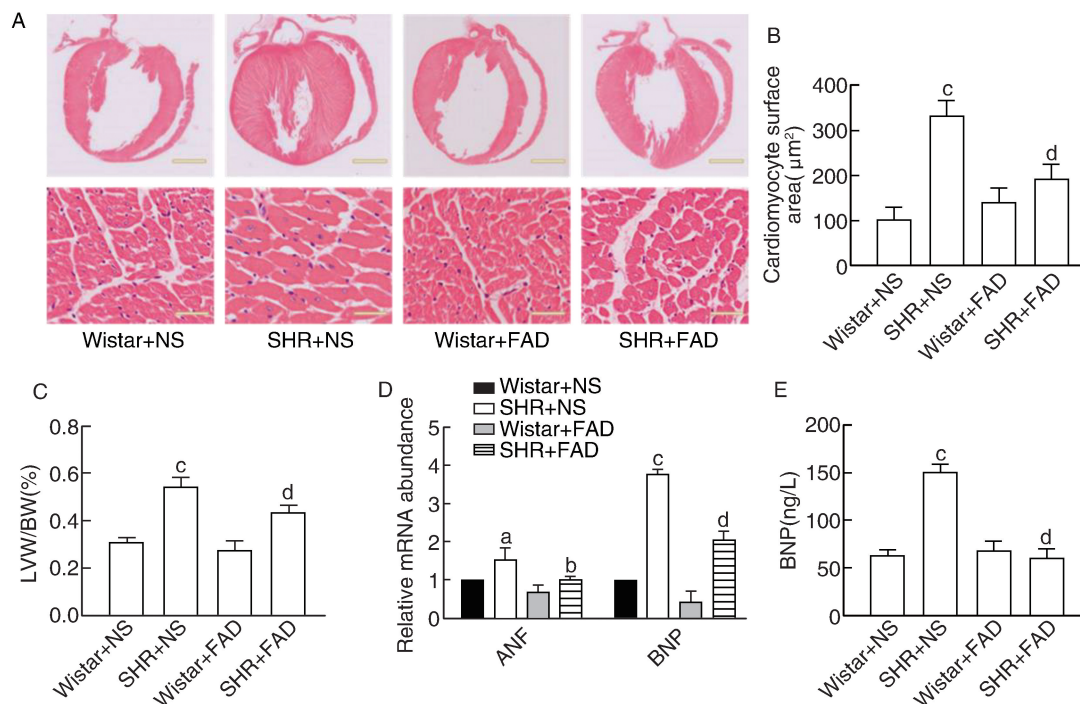


图 2. FAD 对大鼠病理性心肌肥厚的影响 ($n=3$) A 为大鼠心脏 HE 染色切片;B 为心肌细胞表面积统计数据 ($400\times$);C 为左心室质量指数;D 为心肌组织 ANF 和 BNP 的 mRNA 表达;E 为心肌组织中的 BNP 含量。a 为 $P<0.05$, c 为 $P<0.01$, 与 Wistar+NS 组比较; b 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与 SHR+NS 组比较。

Figure 2. Effect of FAD on cardiac hypertrophy in rats ($n=3$)

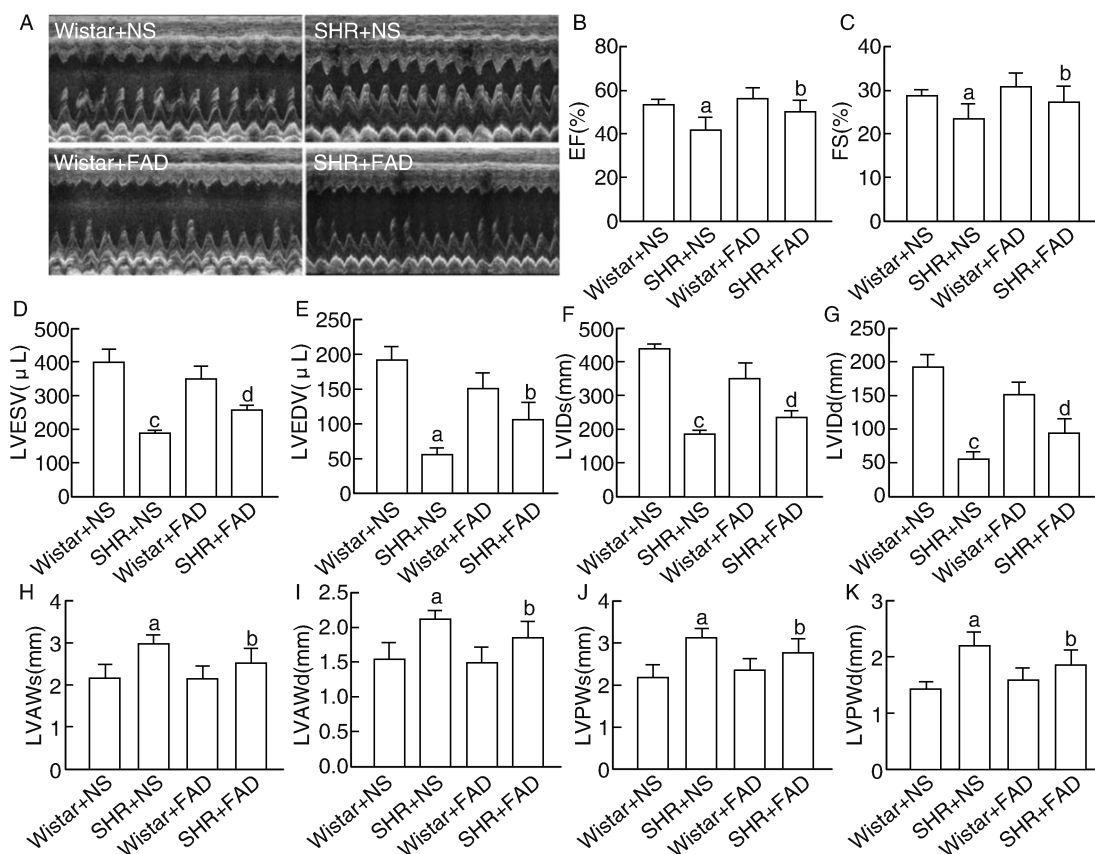


图 3. 各组大鼠超声心动图及参数 ($n=6$) A 为各组超声心动二维图像代表图;B-K 为超声心动图各项指标。a 为 $P<0.01$, 与 Wistar+NS 组比较; b 为 $P<0.01$, 与 SHR+NS 组比较。

Figure 3. Echocardiogram and parameters of rats in each group ($n=6$)

2.4 FAD 对 SHR 心肌纤维化的影响

大鼠心脏的染色结果显示,与 Wistar+NS 组相比,SHR+NS 组大鼠的胶原容积分数(CVF)、血管周围胶原面积(PVCA)、胶原含量以及羟脯氨酸含量均显著增加($P<0.01$);与 SHR+NS 组相比,经 FAD 治疗后,SHR 的 CVF、PVCA、胶原含量以及羟脯氨酸含量明显降低($P<0.01$)。相比 Wistar+NS 组,

SHR+NS 组大鼠 SCAD 的蛋白和 mRNA 表达显著下调($P<0.01$),Collagen III、Collagen I 和 α -SMA 的表达则显著提高($P<0.01$);与 SHR+NS 组相比,经 FAD 治疗后,SCAD 蛋白和 mRNA 在 SHR 组的表达显著增高($P<0.01$),Collagen III、Collagen I 和 α -SMA 的表达则显著降低($P<0.01$)。图 4 结果表明,FAD 显著改善了 SHR 大鼠的心肌纤维化。

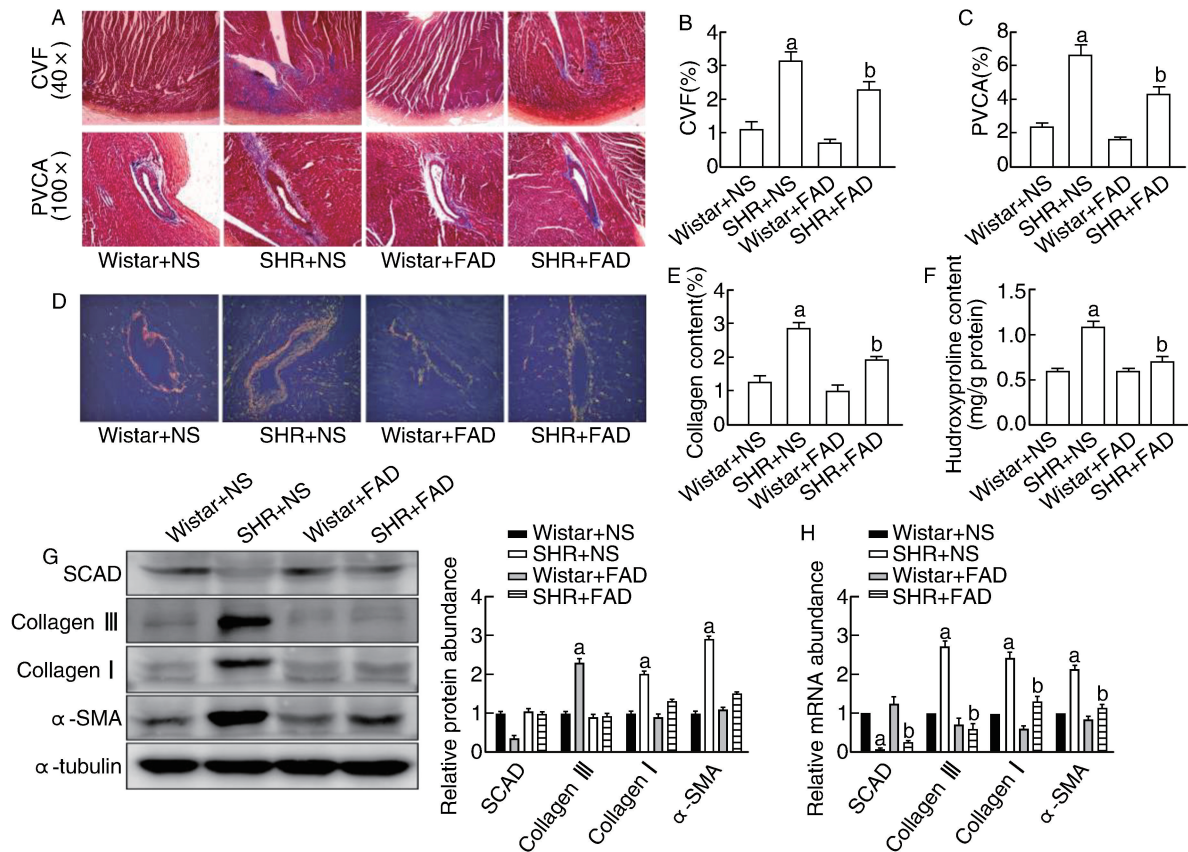


图 4. FAD 对大鼠心肌纤维化的影响($n=3$) A 为大鼠心脏 Masson 染色切片;B 为间质胶原容积分数(CVF);C 为血管周围胶原面积(PVCA);D-E 为各组大鼠心肌组织天狼星红染色切片效果图(100 \times)及胶原含量统计分析;F 为心肌羟脯氨酸含量;G 为蛋白免疫印迹结果及分析,H 为心肌组织的 Collagen III、 α -SMA 和 SCAD 的 mRNA 相对表达量。a 为 $P<0.05$,c 为 $P<0.01$,与 Wistar+NS 组比较;b 为 $P<0.05$,d 为 $P<0.01$,与 SHR+NS 组比较。

Figure 4. Effect of FAD on cardiac fibrosis in rats($n=3$)

2.5 FAD 对 SHR 心肌能量代谢的影响

如图 5 所示,与 Wistar+NS 组相比,SHR+NS 组大鼠心肌中的 SCAD 表达量、酶活性以及 ATP 含量显著降低($P<0.01$),而血清、心肌游离脂肪酸和心肌活性氧含量均明显增高($P<0.05$);与 SHR+NS 组相比,SCAD 表达量、酶活性以及 ATP 含量在 SHR+FAD 组大鼠心肌中显著提高($P<0.01$),血清、心肌游离脂肪酸和活性氧含量则明显降低。经 FAD 治疗后,上述指标均得到明显的改善,表明 FAD 可能改善了 SHR 的心肌能量代谢障碍。

3 讨论

在这项研究中,SHR 大鼠经 FAD 治疗后血压及心率显著降低。前期的研究表明,SHR 大鼠心肌中的 SCAD 表达及酶活性均显著下调,而经游泳训练后的 SHR 大鼠的 SCAD 表达、酶活性明显升高,收缩压及心率显著降低^[7-8]。游泳训练和 FAD 的治疗均能上调 SHR 大鼠心肌中 SCAD 表达以及酶活性,这表明收缩压和心率的降低可能涉及 SCAD 的激活。已有研究表明,FAD 对体内血液动力学反应可能通过交感神经末梢释放去甲肾上腺素来抑制神

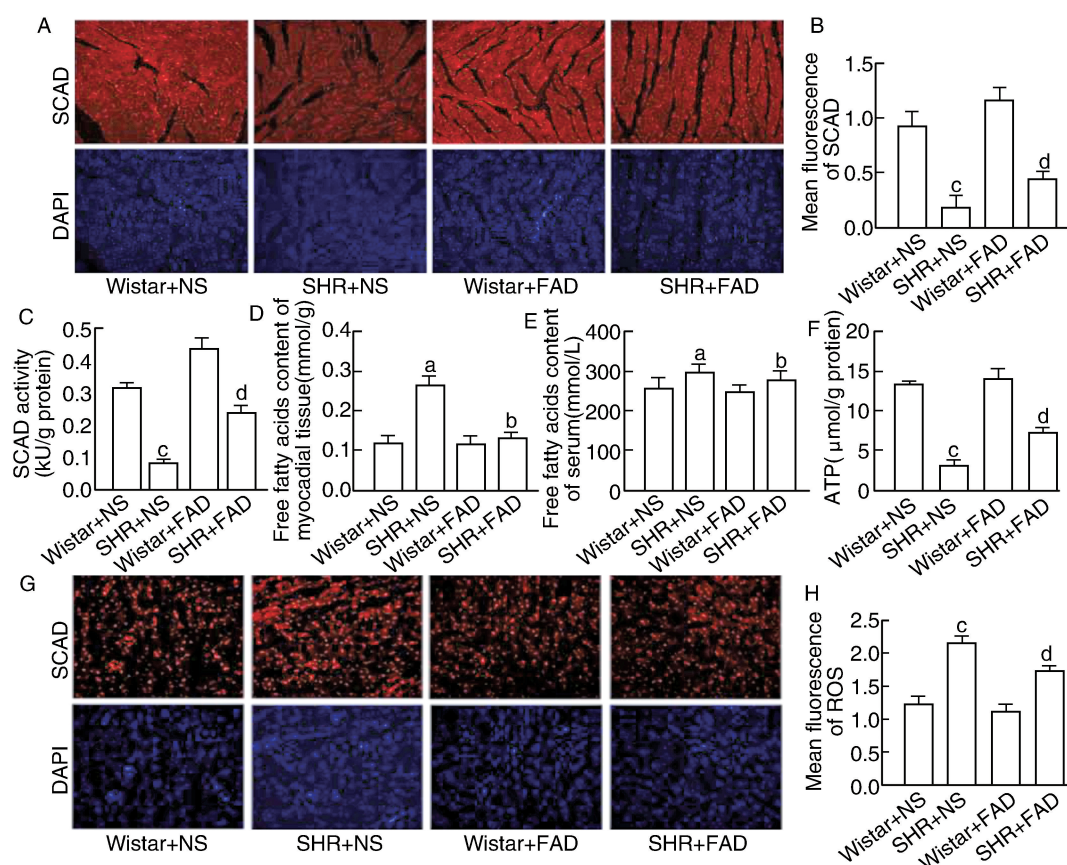


图 5. FAD 对心肌能量代谢的影响 ($n=3$) A-B 为心肌组织中 SCAD 荧光染色图 (200 \times) 及平均荧光强度的分析; C 为心肌组织的 SCAD 酶活性; D 为心肌组织中游离脂肪酸的含量; E 为血清游离脂肪酸的含量; F 为心肌组织中 ATP 的含量; G-H 为心肌组织中活性氧 (ROS) 荧光染色图 (200 \times) 及平均荧光强度分析。a 为 $P<0.05$, c 为 $P<0.01$, 与 Wistar+NS 组比较; b 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与 SHR+NS 组比较。

Figure 5. Effect of FAD on cardiac energy metabolism ($n=3$)

源性血管收缩紧张, FAD 的血管扩张作用可能涉及亚硝酰基因子的释放^[12]。戊巴比妥麻醉的大鼠经全身注射 FAD 会引起心率降低, 可能涉及 FAD 的识别位点激活心肌细胞中一氧化氮合酶活性的增加, FAD 也可能直接激活细胞中的一氧化氮合酶^[13]。越来越多的证据显示 FAD 具有重要的心血管作用, 表明进一步表征 FAD 对心脏及血管的作用机制具有重要的意义。

在病理性心肌肥厚和早期心力衰竭中, 心肌主要的能量来源从脂肪酸氧化转变为糖酵解, 然而糖酵解是胎儿期心脏中代谢的主要能量来源, 这种能量代谢的转变, 损害了心肌能量的产生^[14-15]。作为脂肪酸 β 氧化过程的重要参与者, SCAD 在辅酶 FAD 的作用下, 催化具有 4 至 6 个碳原子脂肪酸脱氢。前期研究结果表明, siRNA 1186 敲低 SCAD 基因后心肌细胞出现肥大反应, 心肌成纤维细胞呈现促进增殖状态^[8-9], SCAD 对病理性心肌肥厚和心肌纤维化具有负性调控作用。本项研究中, 经尾静脉注射 FAD 的 SHR 大鼠心肌中 SCAD 的酶活性、ATP

含量明显升高, 脂肪酸及活性氧含量降低, 这表明 FAD 提高了 SHR 大鼠心肌中脂肪酸氧化率, 从而抑制病理性心肌肥厚和心肌纤维化的进程。对于 FAD 作用机制, 可能有两种途径, 一方面, FAD 增加心肌组织中 SCAD 的表达, FAD 作为氧化还原过程中必不可少的通用辅助因子, 还参与 SCAD 核苷酸合成和蛋白质折叠^[16-17]。文献^[18]一项病例报告中, 一名被确诊为 SCAD 缺陷症的 12 岁女孩, 患有肌无力和肝肿大等急性症状, 肌肉活检显示脂质储存, SCAD 酶活性只有正常人的 35%, SCAD 的蛋白免疫印迹分析显示无表达。然而, 给予核黄素 (100 mg/d) 治疗后, 患者体内 FAD 水平升高, 临床疗效得到显著改善, 肌肉力量正常。实验室检查显示患者的 SCAD 酶活性恢复正常, 蛋白免疫印迹分析中 SCAD 蛋白条带重新出现, 该患者可能是得益于 FAD 对 SCAD 的激活。因此, FAD 作为 SCAD 的辅基进行催化底物脱氢的同时还可能调节包括 SCAD 等相关蛋白的表达。另一方面, FAD 直接激活 SCAD, 从而提高 SCAD 的酶催化活性。Lucas 等^[10]

的实验表明,与蛋白质的全息形式对比,FAD 甚至可以进一步稳定蛋白质全息形式,即当酶蛋白的辅酶结合位点结合率达到 95% 时,额外补充的过量 FAD 仍能进一步提高酶催化活性。文献^[19]表明,提高蛋白质稳定性的功能性配体在理论上可以用作小分子药理伴侣,可以在相关的代谢性疾病中,将受影响的蛋白质水平恢复至疾病的阈值水平之上。生理浓度的 FAD 辅因子是线粒体酰基辅酶 A 脱氢酶的潜在稳定剂,这种稳定作用可能是由于结合和未结合的辅因子之间,平衡向有利于结合形式的方向移动而引起,从而改善了蛋白质的稳定性,增加了终点残留活性。因此,尽管未能确定 SHR 大鼠的心肌组织中 FAD 是否缺乏,但 SHR 和正常组大鼠经尾静脉注射的 FAD 明显进一步提升了 SCAD 的酶活性,这一点符合 Lucas 的实验观点。

从结果上分析,FAD 可能通过激活 SCAD,增强脂肪酸氧化,减少氧化应激,从而改善心肌能量代谢异常,进而延缓病理性心肌肥厚和心肌纤维化的进程。FAD 可以促进 SCAD 的蛋白表达,稳定 SCAD 蛋白结构稳定性并降低 SCAD 蛋白降解;其次,FAD 直接激活 SCAD,提高酶催化活性,最终改善心肌的能量代谢。能量代谢障碍参与多种心血管疾病的发展进程,因此能量代谢疗法作为心力衰竭等多种心血管疾病的治疗手段颇有前景^[20-21]。FAD 有望成为防治病理性心肌肥厚和心肌纤维化的新型药物,从而预防其向心力衰竭发展。然而,FAD 通过激活 SCAD,从而改善心功能的作用机制,尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Han Y, Yang W, Cui W, et al. Development of functional hydrogels for heart failure[J]. *J Mater Chem B*, 2019, 10(7): 1563-1580.
- [2] Metra M, Teerlink JR. Heart failure[J]. *Lancet*, 2017, 390(10106): 1981-1995.
- [3] Osmar AC, José FA, Judith MT, et al. Myocardial fibrosis as a pathway of prediction of ventricular arrhythmias and sudden cardiac death in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy[J]. *Crit Pathw Cardiol*, 2019, 18(2): 89-97.
- [4] Brieler J, Breeden MA, Tucker J, et al. Cardiomyopathy: an overview[J]. *Am Fam Physician*, 2017, 96(10): 640-646.
- [5] Fang J, Li T, Zhu X, et al. Control of pathological cardiac hypertrophy by transcriptional corepressor irf2bp2 (interferon regulatory factor-2 binding protein 2)[J]. *Hypertension*, 2017, 70(3): 515-523.
- [6] Deng KQ, Wang A, Ji YX, Suppressor of ikk α is an essential negative regulator of pathological cardiac hypertrophy[J]. *Nat Commun*, 2016, 7(30): 11432-11453.
- [7] 周四桂,王平,路遥,等.短链酰基辅酶 A 脱氢酶在大鼠生理性和病理性心肌肥大中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(11): 1921-1927.
- [8] 舒朝辉,曾振华,黄秋菊,等.短链酰基辅酶 A 脱氢酶在心脏成纤维细胞胶原表达和细胞增殖中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 32(12): 2184-2191.
- [9] 黄秋菊,黄金贤,罗佳妮,等. ERK1/2/PPAR α /SCAD 信号途径对生理性和病理性心肌肥大的调控[J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(8): 1427-1452.
- [10] Lucas TG, Bárbara J, Rodrigues JV, et al. Cofactors and metabolites as potential stabilizers of mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(12): 1658-1663.
- [11] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [12] Hashmi MP, Graves JE, Sandock K, et al. Hemodynamic responses elicited by systemic injections of flavin adenine dinucleotide in anesthetized rats[J]. *J Cardiovasc Pharm*, 2007, 50(1): 94-102.
- [13] Hashmi MP, Sandock K, Bates JN, et al. Flavin adenine dinucleotide may release preformed stores of nitrosyl factors from the vascular endothelium of conscious rats[J]. *J Cardiovasc Pharm*, 2007, 50(2): 142-154.
- [14] Dong Z, Zhao P, Xu M, et al. Astragaloside IV alleviates heart failure via activating PPAR α to switch glycolysis to fatty acid β -oxidation[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2691.
- [15] 冯翔宇,李秀华,谢亚芹,等.曲美他嗪与雷米普利对慢性心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡及 bax, bcl-2 蛋白表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(15): 3626-3629.
- [16] Yamagami R, Yamashita K, Nishimasu H, et al. The tRNA recognition mechanism of folate/FAD-dependent tRNA methyltransferase (TrmFO)[J]. *J Bio Chem*, 2012, 287(51): 2480-2494.
- [17] Forneris F, Orru R, Bonivento D, et al. ThermoFADa thermofluor-adapted flavin adhoc detection system for protein folding and ligand binding[J]. *FEBS J*, 2009, 276(10): 2833-2840.
- [18] Van MBT, Duran M, Wanders RJA, et al. Flavin adenine dinucleotide status and the effects of high-dose riboflavin treatment in short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency[J]. *Pediatr Res*, 2010, 67(3): 304-308.
- [19] Mario M, David C, Manuel OÁ, et al. Pharmacological chaperones and coenzyme Q10 treatment improves mutant beta-glucocerebrosidase activity and mitochondrial function in neuronopathic forms of gaucher disease[J]. *Sci Rep*, 2015, 5(6): 10903.
- [20] Brown D, Perry J, Allen M, et al. Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2017, 14(4): 238-250.
- [21] 邓洁,倪晶宇,黄钰婷,等.心力衰竭与心肌能量代谢关系的研究进展[J]. *中国临床药理学杂志*. 2019, 35(11): 1213-1216.

(此文编辑 朱雯霞)