

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.19.006
文章编号: 1005-8982 (2024) 19-0035-09

实验研究·论著

沙库巴曲缬沙坦钠通过Nrf2/HO-1信号通路 缓解心力衰竭的机制研究*

刘圣山, 裴兆辉, 熊小英, 宋国良, 熊玲兵, 刘衍冬
(南昌市第三医院 心血管内二科, 江西 南昌 330009)

摘要: **目的** 探究沙库巴曲缬沙坦钠通过Nrf2/HO-1信号通路改善心力衰竭(HF)细胞和动物模型的分子机制。**方法** 通过盐酸阿霉素(DOX)处理H9C2细胞后制备HF细胞模型, 然后分别给予沙库巴曲缬沙坦钠(LCZ696)和Nrf2抑制剂(ML385)治疗。将实验细胞分为对照组、DOX组、DOX+LCZ696组、DOX+ML385组、DOX+LCZ696+ML385组。用DOX诱导HF模型小鼠, 并给予LCZ696和ML385治疗, 又分为假手术组、DOX组、DOX+LCZ696组、DOX+LCZ696+ML385组。CCK-8检测细胞活力; 流式细胞术检测细胞凋亡; 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞ROS、MDA、SOD水平, 以及炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)蛋白浓度; Western blotting检测各组细胞和小鼠Bax、Bcl-2、C-Caspase-3、Nrf2和HO-1蛋白相对表达量。观察各组小鼠心脏组织HE、Masson和TUNEL染色。**结果** 与对照组比较, DOX组细胞活力降低($P < 0.05$), 细胞凋亡率升高($P < 0.05$), 炎症因子、ROS、MDA水平和促凋亡蛋白表达均升高($P < 0.05$), SOD水平、Nrf2和HO-1蛋白表达均降低($P < 0.05$); 与DOX组比较, DOX+LCZ696组抑制了DOX造成的细胞损伤, 而DOX+ML385组加重了细胞损伤程度; 与DOX+LCZ696组比较, DOX+LCZ696+ML385组细胞损伤更为严重。而与DOX+ML385组比较, DOX+LCZ696+ML385组细胞损伤减轻。与假手术组比较, DOX诱导小鼠心脏组织损伤严重, DOX+LCZ696组则缓解了DOX造成的损伤, DOX+LCZ696+ML385组损伤加重。**结论** 沙库巴曲缬沙坦钠通过Nrf2/HO-1信号通路可缓解DOX诱导的心肌细胞损伤和小鼠心脏组织损伤。

关键词: 心力衰竭; 沙库巴曲缬沙坦钠; DOX; Nrf2/HO-1通路
中图分类号: R541.6 **文献标识码:** A

Mechanistic study of Sacubitril/Valsartan in alleviating heart failure via the Nrf2/HO-1 signaling pathway*

Liu Sheng-shan, Pei Zhao-hui, Xiong Xiao-ying, Song Guo-liang, Xiong Ling-bing, Liu Yan-dong
(Department of Cardiology, The Third Hospital of Nanchang, Nanchang, Jiangxi 330009, China)

Abstract: **Objective** To explore the molecular mechanism of Sacubitril/Valsartan Sodium improving heart failure cell model and animal model through Nrf2/HO-1 signaling pathway. **Methods** H9C2 cells were treated with Doxorubicin hydrochloride (DOX) to construct a heart failure cell model, and then treated with Sacubitril/Valsartan Sodium (LCZ696) and Nrf2 inhibitor (ML385), respectively. They were divided into five groups: Control, DOX, DOX + LCZ696, DOX + ML385, DOX + LCZ696 + ML385. Mice model of heart failure was induced by DOX and treated with LCZ696 and ML385, which were divided into sham operation group, DOX group, DOX + LCZ696 group, and DOX + LCZ696 + ML385 group. Cell viability and apoptosis was analyzed by CCK-8 and flow

收稿日期: 2024-02-24

* 基金项目: 国家自然科学基金(No:82060351); 江西省卫生健康委科技计划(No:202311276); 南昌市科技支撑计划项目(No:2022-KJZC-013); 南昌市医疗卫生引导性科技计划项目(No:2023YLS035)

[通信作者] 刘衍冬, E-mail: 526054580@qq.com

cytometry. ROS, MDA and SOD levels were detected with the kit. The levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 were detected by ELISA. Bax, Bcl-2, C-caspase-3, Nrf2 and HO-1 proteins was detected via Western blotting. Heart tissue of mice with heart failure was stained by HE, Masson and TUNEL. **Results** Compared with control group, DOX-induced cell viability was significantly decreased ($P < 0.05$); cell apoptosis ratio was increased ($P < 0.05$); the levels of inflammatory factors, ROS, MDA, and pro-apoptotic proteins were increased ($P < 0.05$); SOD level, Nrf2, and HO-1 proteins were decreased ($P < 0.05$). Compared with DOX group, DOX + LCZ696 group significantly inhibited cell damage caused by DOX, while DOX + ML385 group significantly aggravated cell damage. Compared with DOX + LCZ696 group, the cell injury was more severe in DOX + LCZ696 + ML385 group, while the cell injury was reduced in DOX + LCZ696 + ML385 group. Compared with the sham group, the heart tissue damage of mice induced by DOX was serious, the damage caused by DOX was alleviated in DOX + LCZ696 group, and the damage was aggravated in DOX + LCZ696 + ML385 group. **Conclusion** Sacubitril/Valsartan sodium alleviates DOX-induced myocardial cell injury through Nrf2/HO-1 signaling pathway.

Keywords: heart failure; sacubitril/valsartan; doxorubicin hydrochloride; Nrf2/HO-1 pathway

心力衰竭(heart failure, HF)是一种慢性进行性临床综合征,由心脏结构或功能异常引起,主要表现左心室射血分数降低或保留^[1]。HF常伴有各种复杂的临床循环病理生理综合征和肺循环充血,严重影响人们的生活质量^[2]。HF主要表现为呼吸短促和疲劳,常伴有典型体征,如肺啰音(异常的噼啪声)、外周水肿或颈静脉扩张^[1]。我国人口老龄化愈发严重,导致HF发病率上升,HF已成为一个重大的医疗问题,给医疗系统带来严峻的考验^[3]。沙库巴曲缬沙坦钠(LCZ696)是一种血管紧张素 II 1 型受体-脑啡肽酶抑制剂,具有抗炎、抗氧化、免疫抑制、抗凋亡等作用,是一种新型治疗 HF 的药物。沙库巴曲缬沙坦钠可以同时抑制脑啡肽酶和肾素-血管紧张素-醛固酮系统活性,抑制血管收缩、排钠利尿、降低血压,逆转心肌肥厚和心肌纤维化,从而改善 HF 患者的心脏功能^[4-5]。沙库巴曲缬沙坦钠片用于治疗射血分数降低的 HF 患者可有效改善心功能各项指标,且不良反应较少^[6-7]。但其作用机制有待进一步阐明,而信号通路核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/血红素加氧酶 1(heme oxygenase-1, HO-1)是机体内最重要的内源性抗氧化信号通路,可调控抗氧化酶及谷胱甘肽的水平,清除细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS),抑制氧化应激,减轻机体损伤^[8]。Nrf2/HO-1 信号通路已被证明在改善 HF 中发挥重要作用,激活该通路能够显著缓解心肌细胞的氧化应激和损伤,而抑制该通路则加重心肌细胞损伤^[9-10]。本研究主要探究沙库巴曲缬沙坦钠是否

参与调控 Nrf2/HO-1 信号通路及改善 HF 心肌细胞模型的功能,从而为临床应用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大鼠心肌细胞(H9C2)购自长沙海星生物科技有限公司,20 只雄性 C57BL/6 小鼠购自长沙斯莱克景达实验动物有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2024-0009;实验动物使用许可证号:SYXK(湘)2019-0017]。LCZ696、ML385 均购自美国 Med Chem Express 公司,盐酸阿霉素(DOX)购自上海麦克林生化科技股份有限公司,CCK-8 检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,蛋白免疫印迹使用的抗体(Bax、Bcl-2、C-Caspase-3、Nrf2、HO-1、GAPDH)均购自美国 Proteintech 公司,DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司,Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒、ROS 检测试剂盒、MDA 检测试剂盒、SOD 检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司,TNF- α 、IL-6、IL-1 β 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司;苏木精-伊红染色液购自广州维格斯生物科技有限公司,Masson 三色染色液购自武汉福因德生物,TUNEL 染色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

超净工作台(苏州华宇净化设备公司),恒温水浴锅(上海博迅医疗生物公司),二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),生物组织摊烤

片机(武汉俊杰电子有限公司), 徕卡组织切片机和酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司), 倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养及处理 使用 DMEM 培养基(10% 胎牛血清、1% 谷氨酰胺、100 u/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素), 将大鼠心肌细胞(H9C2)置于 37 ℃、5% 二氧化碳培养箱中培养, H9C2 细胞每 2~3 天传代 1 次。细胞按照以下方法处理并分组: 对照组使用 DMSO 溶剂处理细胞; DOX 组使用 5 μmol/L DOX 处理细胞 24 h; DOX + LCZ696 组在 DOX 组基础上加入 LCZ696 (10 μmol/L) 处理细胞 1 h; DOX + ML385 组在 DOX 组基础上加入 ML385 (1 μmol/L) 处理细胞 1 h; DOX + LCZ696 + ML385 组在 DOX 组基础上加入 LCZ696 (10 μmol/L) 和 ML385 (1 μmol/L) 处理细胞 1 h。

1.3.2 CCK-8 法检测细胞活力 细胞消化后制成细胞悬液, 96 孔板中每孔加入 100 μL 细胞悬液, 置于 37 ℃、5% 二氧化碳培养箱中培养 24 h; 按照 1.3.1 细胞培养及处理的方法进行操作, 继续培养 24 h 后每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL, 于培养箱内孵育 4 h; 酶标仪测定 450 nm 处的光密度(optical density, OD) 值。

1.3.3 流式细胞术检测细胞凋亡 各组细胞处理后消化收集, 离心洗涤, 加入 300 μL 缓冲液重悬细胞, 再加入 5 μL PI 和 15 μL Annexin V-FITC, 避光反应 15 min, 加入 200 μL 的缓冲液后上机检测, 采用 Flow Jo 软件分析细胞凋亡情况。

1.3.4 ELISA 检测细胞 ROS、MDA、SOD 水平 分别处理各组细胞后, 按照 ELISA 试剂盒说明书的操作要求制备细胞样品, 配制相应工作液, 遵循相应步骤检测细胞 ROS、MDA、SOD 水平。

1.3.5 Western blotting 检测 Bax、Bcl-2、C-Caspase-3 蛋白相对表达量 细胞消化后洗涤, RIPA 裂解 30 min, 分离提取细胞全蛋白, BCA 法检测蛋白浓度。样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转至 PVDF 膜, 加入含 5% 脱脂奶粉的封闭液中, 室温下封闭 2 h。分别加入 Bax、Bcl-2、C-Caspase-3、Nrf2、HO-1 和 GAPDH 一抗(1:1 000) 4 ℃ 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次, 加入相应二抗(1:5 000), 振荡孵育 2 h。洗膜后, 加入化学发光试剂显色、胶片曝光。通过

凝胶成像分析系统拍照, 使用 Image J 分析蛋白条带灰度值。

1.3.6 ELISA 检测 TNF-α、IL-6、IL-8 蛋白含量 各组细胞处理培养 24 h 后, 取培养基, 2 500 r/min 离心 10 min, 收集上清液。按照 ELISA 试剂盒说明书的操作要求, 分别将样本溶液、抗体溶液加入板孔中, 密封并在振荡器上室温孵育 1 h。然后用 PBS 清洗并加入 TMB 显影液, 暗室孵育 10 min 后加入终止液, 在振荡器上摇匀, 置于酶联免疫检测仪检测 TNF-α、IL-6、IL-8 蛋白含量。

1.3.7 HF 模型小鼠复制 小鼠饲养在 21~22 ℃、50%~60% 湿度、12 h 明暗循环的环境中, 自由获取食物和水。将小鼠随机分为 4 组, 每组 5 只, 分别为假手术组、DOX 组、DOX + LCZ696 组及 DOX + LCZ696 + ML385 组。DOX 组、DOX + LCZ696 组、DOX + LCZ696 + ML385 组小鼠均一次性腹腔注射 DOX (15 mg/kg), 假手术组小鼠则给予等量生理盐水。从注射 DOX 前 2 天开始, DOX + LCZ696 组和 DOX + LCZ696 + ML385 组小鼠腹腔注射 LCZ696 (50 mg/kg, 1 次/d, 连续注射 1 周), DOX + LCZ696 + ML385 组小鼠于 DOX 注射前 1 h 腹腔注射 ML385 (30 mg/kg)。在不同处理后的第 7 天, 对小鼠实施安乐死, 取心脏进行后续检测。

1.3.8 小鼠心脏组织染色 ①HE 染色观察心肌组织: 小鼠心脏经 4% 多聚甲醛 4 ℃ 固定过夜后石蜡包埋, 切成 4 μm 薄片。吹片至石蜡融化, 脱水后苏木精染色 10 min 后用自来水冲洗。吸干水将切片于乙醇溶液中分化, 流水冲洗 15 min 后吸干水分, 伊红染色 10 min。常规脱水、透明、封片, 显微镜下拍照观察。②Masson 染色观察心肌纤维化: 小鼠心脏石蜡切片脱蜡至水, 铬化处理或去汞盐沉淀(甲醛固定的组织此步骤可省略)。依次自来水、蒸馏水水洗, 用苏木精染核 5~10 min。充分水洗后用 Masson 复合染色液染色 10~20 min, 蒸馏水水洗。1% 磷钼酸水溶液分化 3~5 min。不经水洗, 直接用苯胺蓝或光绿液染 5 min。以 1% 冰醋酸水溶液浸洗片刻。常规脱水、透明、封片, 显微镜下拍照观察。③TUNEL 染色观察心肌细胞凋亡: 小鼠心脏石蜡切片脱蜡水化后, 滴加 100 μL 蛋白酶 K 工作液, 37 ℃ 反应 30 min, PBS 浸洗 3 次。滴加 50 μL 的 TUNEL 反应混合物, 37 ℃ 避光孵育 60 min; PBS 洗涤 1 次, 滴加反应终止液室温孵育 10 min; PBS 洗涤 3 次; 再滴加 50 μL

Streptavidin-HRP 工作液,湿盒中 37 ℃ 避光反应 30 min;PBS 充分浸洗 3 次各 5 min。滴加 50 μ L DAB 显色工作液,室温显色 30 s~5 min;蒸馏水稍洗终止显色。苏木精染色 30 s 后流水冲洗。常规分化、脱水、透明、封片,显微镜下拍照观察。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 18.0 统计软件。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用方差分析,两两比较用 LSD-*t* 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 沙库巴曲缬沙坦钠对 HF 细胞模型细胞活力和凋亡的影响

CCK-8 法检测结果显示,5 组细胞活力比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组相比,DOX 诱导的细胞活力降低($P < 0.05$);DOX+LCZ696 组细胞活力高于 DOX 组($P < 0.05$);DOX+ML385 组细胞活力低于 DOX 组($P < 0.05$);DOX+LCZ696+ML385 组细胞活力低于 DOX+LCZ696

组($P < 0.05$),高于 DOX+ML385 组($P < 0.05$)。流式细胞术检测结果显示,5 组细胞凋亡率的比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较,DOX 组的细胞凋亡率升高($P < 0.05$);DOX+LCZ696 组细胞凋亡率低于 DOX 组($P < 0.05$);DOX+ML385 组细胞凋亡率高于 DOX 组($P < 0.05$);DOX+LCZ696+ML385 组细胞凋亡率高于 DOX+LCZ696 组($P < 0.05$),低于 DOX+ML385 组($P < 0.05$)。见表 1 和图 1。

表 1 细胞活力和细胞凋亡率 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞活力	细胞凋亡率
对照组	100.00 $\pm$ 3.83	3.83 $\pm$ 1.39
DOX 组	71.36 $\pm$ 4.81 ^①	21.77 $\pm$ 3.06 ^①
DOX + LCZ696 组	86.35 $\pm$ 3.67 ^②	12.13 $\pm$ 2.31 ^②
DOX + ML385 组	57.06 $\pm$ 4.50 ^②	31.60 $\pm$ 2.76 ^②
DOX + LCZ696 + ML385 组	73.22 $\pm$ 4.24 ^{③④}	20.27 $\pm$ 2.30 ^{③④}
<i>F</i> 值	44.320	36.870
<i>P</i> 值	0.000	0.000

注:①与对照组比较, $P < 0.05$;②与 DOX 组比较, $P < 0.05$;③与 DOX+LCZ696 组比较, $P < 0.05$;④与 DOX+ML385 组比较, $P < 0.05$ 。

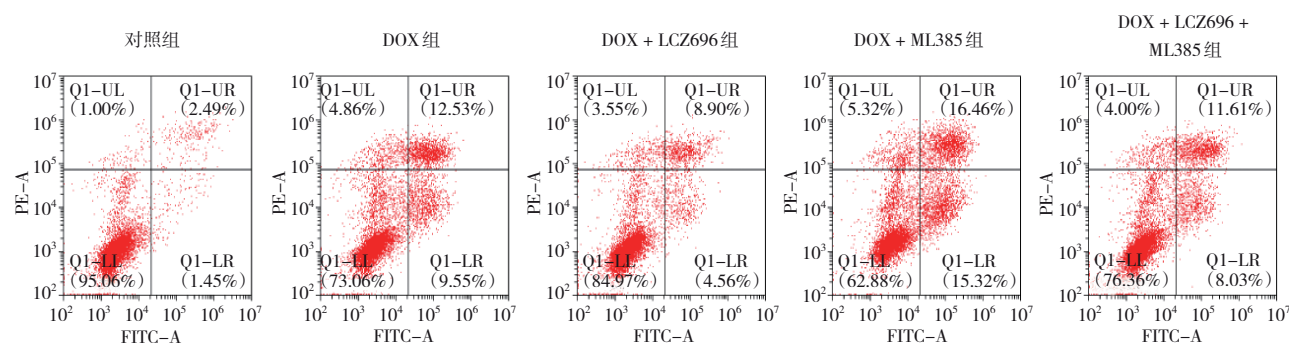


图 1 流式细胞术检测细胞凋亡

2.2 沙库巴曲缬沙坦钠对 HF 细胞模型凋亡相关蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果显示,各组细胞模型凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、C-Caspase-3 的相对表达量比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较,DOX 组 Bax 和 C-Caspase-3 蛋白相对表达量升高,Bcl-2 蛋白相对表达量降低($P < 0.05$);DOX+LCZ696 组 Bax 和 C-Caspase-3 蛋白相对表达量低于 DOX 组,Bcl-2 蛋白相对表达量高于 DOX 组($P < 0.05$);DOX+ML385 组 Bax 和 C-

Caspase 3 蛋白相对表达量高于 DOX 组,Bcl-2 蛋白相对表达量低于 DOX 组($P < 0.05$);DOX+LCZ696+ML385 组 Bax 和 C-Caspase-3 蛋白相对表达量高于 DOX+LCZ696 组,Bcl-2 蛋白相对表达量低于 DOX+LCZ696 组($P < 0.05$),Bax 和 C-Caspase-3 蛋白相对表达量低于 DOX+ML385 组,Bcl-2 蛋白相对表达量高于 DOX+ML385 组($P < 0.05$)。见表 2 和图 2。

2.3 沙库巴曲缬沙坦钠对 HF 细胞模型中 ROS 相对水平、MDA 水平、SOD 水平的影响

各组细胞 ROS 相对水平、MDA 水平、SOD 水平

表 2 各组细胞 Bax、Bcl-2、C-Caspase-3 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bax	Bcl-2	C-Caspase-3
对照组	0.09 ± 0.02	0.64 ± 0.04	0.05 ± 0.03
DOX 组	0.36 ± 0.05 ^①	0.13 ± 0.04 ^①	0.46 ± 0.06 ^①
DOX + LCZ696 组	0.12 ± 0.04 ^②	0.44 ± 0.05 ^②	0.23 ± 0.05 ^②
DOX + ML385 组	0.59 ± 0.06 ^②	0.04 ± 0.02 ^②	0.62 ± 0.03 ^②
DOX + LCZ696 + ML385 组	0.36 ± 0.04 ^{③④}	0.11 ± 0.05 ^{③④}	0.44 ± 0.03 ^{③④}
F 值	64.730	120.010	86.790
P 值	0.000	0.000	0.000

注：①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与 DOX 组比较, $P < 0.05$; ③与 DOX+LCZ696 组比较, $P < 0.05$; ④与 DOX+ML385 组比较, $P < 0.05$ 。

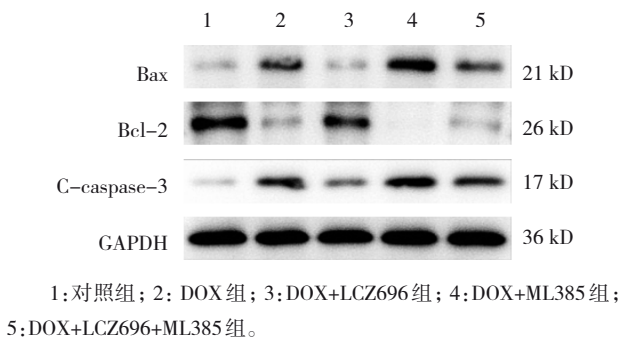


图 2 各组细胞 Bax、Bcl-2、C-caspase-3 蛋白表达

比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P <$

0.05)。与对照组比较, DOX 组 ROS 相对水平、MDA 水平升高, SOD 水平降低 ($P < 0.05$); DOX+LCZ696 组 ROS 相对水平、MDA 水平低于 DOX 组, SOD 水平高于 DOX 组 ($P < 0.05$); DOX+ML385 组 ROS 相对水平、MDA 水平高于 DOX 组, SOD 水平低于 DOX 组 ($P < 0.05$); DOX+LCZ696+ML385 组 ROS 相对水平、MDA 水平高于 DOX+LCZ696 组, SOD 水平低于 DOX+LCZ696 组 ($P < 0.05$), ROS 相对水平、MDA 水平低于 DOX+ML385 组, SOD 水平高于 DOX+ML385 组 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组细胞 ROS 相对水平、MDA 水平及 SOD 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ROS 相对水平	MDA/(nmol/mg)	SOD/(u/mL)
对照组	1.00 ± 0.11	5.05 ± 1.90	63.42 ± 3.32
DOX 组	3.96 ± 0.50 ^①	25.08 ± 2.82 ^①	25.93 ± 3.43 ^①
DOX + LCZ696 组	2.05 ± 0.67 ^②	15.07 ± 2.70 ^②	48.79 ± 4.31 ^②
DOX + ML385 组	6.78 ± 0.78 ^②	32.23 ± 3.49 ^②	15.35 ± 4.38 ^②
DOX + LCZ696 + ML385 组	3.63 ± 0.43 ^{③④}	24.21 ± 2.08 ^{③④}	25.51 ± 2.16 ^{③④}
F 值	48.100	46.670	89.320
P 值	0.000	0.000	0.000

注：①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与 DOX 组比较, $P < 0.05$; ③与 DOX+LCZ696 组比较, $P < 0.05$; ④与 DOX+ML385 组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 沙库巴曲缬沙坦钠对 HF 细胞模型中炎症因子水平的影响

ELISA 检测结果显示, 各组细胞 TNF- α 、IL-6、IL-8 的水平比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组比较, DOX 组各炎症因子水平升高 ($P < 0.05$); DOX+LCZ696 组各炎症因子水平低于 DOX 组 ($P < 0.05$); DOX+ML385 组各炎症因子水平高于 DOX 组 ($P < 0.05$); DOX+LCZ696+ML385 组各炎症因子水平高于 DOX+LCZ696 组 ($P < 0.05$), 低

于 DOX+ML385 组 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.5 沙库巴曲缬沙坦钠对 HF 细胞模型中 Nrf2/HO-1 通路的影响

Western blotting 结果显示, 各组细胞 Nrf2 和 HO-1 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组比较, DOX 组 Nrf2 和 HO-1 蛋白水平降低 ($P < 0.05$); DOX+LCZ696 组 Nrf2 和 HO-1 蛋白水平高于 DOX 组 ($P < 0.05$); DOX+ML385 组 Nrf2 和 HO-1 蛋白水平低于 DOX 组 ($P <$

表 4 各组细胞 TNF- α 、IL-6、IL-8 蛋白含量的比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α /(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	IL-8/(pg/mL)
对照组	79.16 $\pm$ 12.84	52.43 $\pm$ 10.47	43.86 $\pm$ 12.27
DOX 组	259.50 $\pm$ 16.04 ^①	170.31 $\pm$ 12.14 ^①	142.86 $\pm$ 18.26 ^①
DOX + LCZ696 组	155.19 $\pm$ 24.66 ^②	121.43 $\pm$ 19.59 ^②	94.95 $\pm$ 14.28 ^②
DOX + ML385 组	343.14 $\pm$ 34.58 ^②	230.63 $\pm$ 27.55 ^②	197.48 $\pm$ 13.04 ^②
DOX + LCZ696 + ML385 组	253.20 $\pm$ 19.63 ^{③④}	170.08 $\pm$ 14.99 ^{③④}	144.63 $\pm$ 16.98 ^{③④}
F 值	60.090	40.750	43.990
P 值	0.000	0.000	0.000

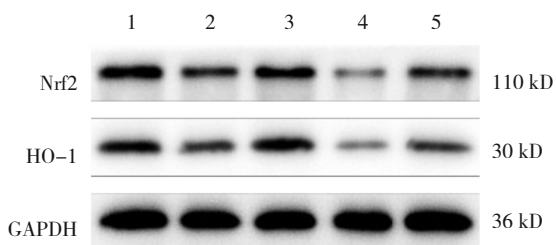
注：①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与 DOX 组比较, $P < 0.05$; ③与 DOX+LCZ696 组比较, $P < 0.05$; ④与 DOX+ML385 组比较, $P < 0.05$ 。

0.05); DOX+LCZ696+ML385 组 Nrf2 和 HO-1 蛋白水平低于 DOX+LCZ696 组 ($P < 0.05$), 高于 DOX+ML385 组 ($P < 0.05$)。见表 5 和图 3。

表 5 各组细胞 Nrf2、HO-1 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Nrf2	HO-1
对照组	0.61 $\pm$ 0.04	0.53 $\pm$ 0.04
DOX 组	0.46 $\pm$ 0.04 ^①	0.41 $\pm$ 0.03 ^①
DOX + LCZ696 组	0.59 $\pm$ 0.04 ^②	0.58 $\pm$ 0.06 ^②
DOX + ML385 组	0.24 $\pm$ 0.03 ^②	0.19 $\pm$ 0.03 ^②
DOX + LCZ696 + ML385 组	0.45 $\pm$ 0.04 ^{③④}	0.38 $\pm$ 0.04 ^{③④}
F 值	42.670	42.630
P 值	0.000	0.000

注：①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与 DOX 组比较, $P < 0.05$; ③与 DOX+LCZ696 组比较, $P < 0.05$; ④与 DOX+ML385 组比较, $P < 0.05$ 。



1: 对照组; 2: DOX 组; 3: DOX+LCZ696 组; 4: DOX+ML385 组; 5: DOX+LCZ696+ML385 组。

图 3 各组细胞 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达

2.6 沙库巴曲缬沙坦钠对 HF 模型小鼠的影响

经 HE、Masson 和 TUNEL 染色小鼠心脏组织观察沙库巴曲缬沙坦钠对 HF 模型小鼠的作用。各组 Masson 和 TUNEL 染色阳性率比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与假手术组相

比, DOX 组心肌细胞胞质空泡化和核肿胀明显, 小鼠心肌间质有大量胶原纤维分布, Masson 染色阳性率升高 ($P < 0.05$), 且凋亡细胞数量较多, TUNEL 染色阳性率升高 ($P < 0.05$); 与 DOX 组比较, DOX+LCZ696 组心肌细胞损伤较少, 胶原纤维数量减少, Masson 染色阳性率降低 ($P < 0.05$), 凋亡细胞数量明显减少, TUNEL 染色阳性率降低 ($P < 0.05$); DOX+LCZ696+ML385 组则较 DOX+LCZ696 组心肌细胞损伤程度增加。见表 6 和图 4。

表 6 Masson 和 TUNEL 染色阳性率比较 ($n=5$, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	Masson	TUNEL
假手术组	5.50 $\pm$ 1.80	1.84 $\pm$ 0.92
DOX 组	27.80 $\pm$ 5.35 ^①	20.92 $\pm$ 4.22 ^①
DOX+LCZ696 组	13.02 $\pm$ 3.87 ^②	6.41 $\pm$ 2.42 ^②
DOX+LCZ696+ML385 组	24.62 $\pm$ 4.51 ^③	17.85 $\pm$ 3.09 ^③
F 值	31.840	48.500
P 值	0.000	0.000

注：①与假手术组比较, $P < 0.05$; ②与 DOX 组比较, $P < 0.05$; ③与 DOX+LCZ696 组比较, $P < 0.05$ 。

2.7 沙库巴曲缬沙坦钠对 HF 模型小鼠 Nrf2/HO-1 通路的影响

Western blotting 结果显示, 各组 HF 模型小鼠 Nrf2 和 HO-1 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与假手术组比较, DOX 组 Nrf2 和 HO-1 蛋白相对表达量降低 ($P < 0.05$); DOX+LCZ696 组 Nrf2 和 HO-1 蛋白相对表达量均高于 DOX 组 ($P < 0.05$); DOX+LCZ696+ML385 组 Nrf2 和 HO-1 蛋白相对表达量均低于 DOX+LCZ696

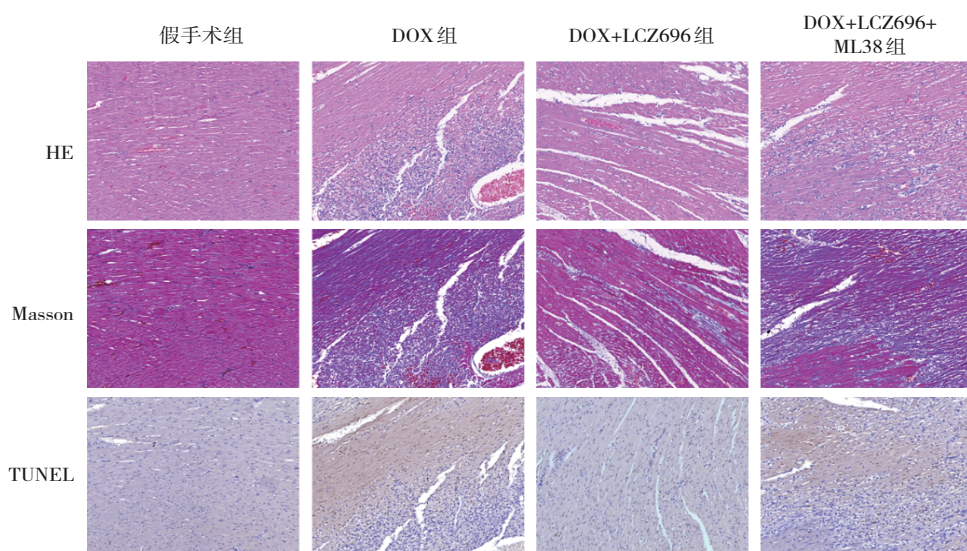


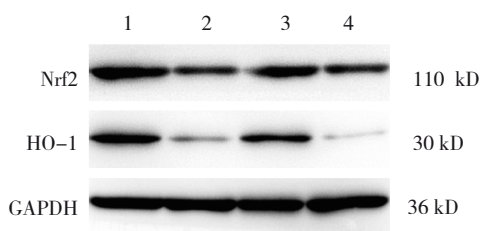
图4 HE、Masson和TUNEL染色小鼠心脏组织 (×200)

组 ($P < 0.05$)。见表7和图5。

表7 各组HF模型小鼠Nrf2、HO-1蛋白相对表达量的比较 ($n=5$, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	Nrf2	HO-1
假手术组	0.93 ± 0.08	0.76 ± 0.05
DOX 组	0.53 ± 0.04^{①}	0.25 ± 0.08^{①}
DOX + LCZ696 组	0.73 ± 0.04^{②}	0.48 ± 0.06^{②}
DOX + LCZ696 + ML385 组	0.48 ± 0.05^{③}	0.16 ± 0.04^{③}
F 值	44.750	57.950
P 值	0.000	0.000

注: ①与假手术组比较, $P < 0.05$; ②与DOX组比较, $P < 0.05$; ③与DOX+LCZ696组比较, $P < 0.05$ 。



1:假手术组; 2: DOX组; 3:DOX+LCZ696组; 4:DOX+LCZ696+ML385组。

图5 各组HF模型小鼠Nrf2和HO-1蛋白表达

3 讨论

HF 仍是目前世界范围内影响人类健康的重大问题, 尽管在 HF 治疗和护理质量方面取得了巨大进步, 但全世界每年仍有 3 770 万人患 HF, 经诊断 HF 后 5 年病死率为 50%^[11-12]。因此探究 HF 的

发病机制及开发新的药物对治疗 HF 具有重大意义。本研究通过 DOX 处理 H9C2 细胞构建了 HF 细胞模型, 这一模型已经在先前研究中应用^[13], 进一步使用 LCZ696 治疗, 探究了 LCZ696 在 DOX 诱导的心肌细胞损伤中的作用机制。

沙库巴曲缬沙坦钠目前已经应用于 HF 的临床治疗, 沙库巴曲缬沙坦钠能有效改善 HF 合并心房颤动患者的心功能, 促进心脏功能恢复, 有效减少副作用, 改善患者预后^[14]。有研究报道, 沙库巴曲缬沙坦钠与其他西药或者中药方剂联用显示出良好的治疗效果, 例如活心丸与沙库巴曲缬沙坦联合治疗冠心病合并慢性 HF, 治疗总有效率显著提升, 用药后的不良反应大幅减少, 治疗安全性更高^[15]。本研究结果也证实了 LCZ696 处理能够显著抑制 DOX 诱导的心肌细胞氧化应激和炎症反应, 促进细胞存活, 降低细胞凋亡率。这一结果与先前研究结果一致, LCZ696 抑制 DOX 诱导的心脏毒性^[16]。XIA 等^[17]发现, LCZ696 通过减轻扩张型心肌病小鼠的线粒体功能障碍改善心功能, 这与本研究中 LCZ696 缓解 HF 模型小鼠心脏损伤的作用相似。然而其作用的详细机制仍需进一步探究, 本研究进一步检测了 LCZ696 对 Nrf2/HO-1 信号通路的作用。

Nrf2/HO-1 信号通路是细胞氧化应激和炎症反应的重要通路, 在心血管疾病中发挥重要作用, 进一步的研究有助于阐明 Nrf2/HO-1 信号轴在 HF 治疗中的潜力^[18]。最近研究表明, κ 阿片受体

激动剂通过激活 Nrf2/HO-1 通路和调节 Ca^{2+} -SERCA2a 抑制 HF 大鼠的心肌损伤^[19];槲皮素通过 Nrf2/HO-1 通路改善压力负荷诱导的 HF^[20];DL-3-正丁基苯酚通过激活 Nrf2/HO-1/ Ca^{2+} -SERCA2a 轴,减轻 HF 小鼠的心脏损伤并减少氧化应激和细胞凋亡^[21]。本研究结果同样证实了 ML385 抑制 Nrf2/HO-1 信号通路,促进 DOX 诱导的心肌细胞氧化应激和炎症反应,加重心肌细胞损伤。而 LCZ696 处理则激活了 Nrf2/HO-1 信号通路,缓解 DOX 诱导的心肌细胞氧化应激和炎症反应,减轻心肌细胞损伤;但在 LCZ696 处理同时加入 ML385,由于 ML385 阻断了 Nrf2/HO-1 信号通路也降低了 LCZ696 的治疗作用,这进一步证实了 LCZ696 是通过 Nrf2/HO-1 信号通路缓解 DOX 诱导的心肌细胞损伤。最近研究证实,LCZ696 通过 Nrf2/HO-1 信号通路缓解甲基苯丙胺诱导的认知功能障碍,发挥神经保护作用^[22]。本研究在心肌细胞中同样证实了 LCZ696 对 Nrf2/HO-1 信号通路的作用,同时在 HF 模型小鼠中发现 LCZ696 处理激活了 Nrf2/HO-1 信号通路,缓解了 DOX 诱导的心脏组织损伤;但 ML385 处理后阻断了 Nrf2/HO-1 信号通路也降低了 LCZ696 对心肌组织损伤的缓解作用。

然而目前的研究仍不十分完善,只在 DOX 诱导的细胞和小鼠模型中进行了研究。由于 HF 的病因较多,单纯的 DOX 引起的药物毒性心肌损伤难以全面阐释其中的发病机制,未来还需要在其他 HF 模型中进一步验证沙库巴曲缬沙坦钠的作用效果和机制,另外仍需要在临床作进一步试验来验证本研究的结论。

综上所述,沙库巴曲缬沙坦钠通过 Nrf2/HO-1 信号通路缓解了 DOX 诱导的 HF 细胞模型和 HF 模型小鼠的损伤。这为沙库巴曲缬沙坦钠在 HF 的治疗中提供了更多的理论基础,并为 HF 的新药开发提供了借鉴思路。

参 考 文 献 :

[1] PONIKOWSKI P, VOORS A A, ANKER S D, et al. 2016 ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC[J]. Eur Heart J, 2016, 37(27): 2129-2200.

[2] RANGASWAMI J, BHALLA V, BLAIR J E A, et al. Cardiorenal syndrome: classification, pathophysiology, diagnosis, and treatment strategies: a scientific statement from the American Heart Association[J]. Circulation, 2019, 139(16): e840-e878.

[3] NEDKOFF L, WEBER C. Heart failure: not just a disease of the elderly[J]. Heart, 2022, 108(4): 249-250.

[4] 李主云, 钱宝堂, 郝应禄, 等. 沙库巴曲缬沙坦钠治疗不同类型心力衰竭研究进展[J]. 临床合理用药, 2023, 16(20): 177-180.

[5] KHDER Y, SHI V, MCMURRAY J J V, et al. Sacubitril/valsartan (LCZ696) in heart failure[J]. Handb Exp Pharmacol, 2017, 243: 133-165.

[6] 李璐. 沙库巴曲缬沙坦在老年慢性心力衰竭患者中的应用效果[J]. 中国当代医药, 2023, 30(20): 66-69.

[7] 张月婷, 关玲霞, 郁冲, 等. 沙库巴曲缬沙坦钠在心肌梗死后心力衰竭患者中的应用效果[J]. 河南医学研究, 2023, 32(13): 2438-2442.

[8] ZHANG Q, LIU J, DUAN H X Y, et al. Activation of Nrf2/HO-1 signaling: an important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress[J]. J Adv Res, 2021, 34: 43-63.

[9] CHEN X H, WAN W G, GUO Y, et al. Pinocembrin ameliorates post-infarct heart failure through activation of Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Mol Med, 2021, 27(1): 100.

[10] WANG S H, TSAI K L, CHOU W C, et al. Quercetin mitigates cisplatin-induced oxidative damage and apoptosis in cardiomyocytes through Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Am J Chin Med, 2022, 50(5): 1281-1298.

[11] GO A S, MOZAFFARIAN D, ROGER V L, et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2014, 129(3): e28-e292.

[12] CASTIGLIONE V, AIMO A, VERGARO G, et al. Biomarkers for the diagnosis and management of heart failure[J]. Heart Fail Rev, 2022, 27(2): 625-643.

[13] LI H X, ZHANG M X, WANG Y Y, et al. Daidzein alleviates doxorubicin-induced heart failure via the SIRT3/FOXO3a signaling pathway[J]. Food Funct, 2022, 13(18): 9576-9588.

[14] 夏金兰, 曾庆宏, 胡小武. 沙库巴曲缬沙坦钠片对心力衰竭合并心房颤动患者心功能及预后的影响[J]. 中国当代医药, 2023, 30(19): 49-52.

[15] 郑重, 李先维. 活心丸联合沙库巴曲缬沙坦治疗冠心病合并慢性心力衰竭的临床效果[J]. 深圳中西医结合杂志, 2023, 33(7): 32-35.

[16] LIU X M, LI D L, PI W H, et al. LCZ696 protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting ferroptosis via AKT/SIRT3/SOD2 signaling pathway activation[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 113(Pt A): 109379.

[17] XIA Y, CHEN Z W, CHEN A, et al. LCZ696 improves cardiac function via alleviating Drp1-mediated mitochondrial dysfunction in mice with doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy[J]. J Mol Cell Cardiol, 2017, 108: 138-148.

- [18] ZHANG X Y, YU Y H, LEI H Y, et al. The Nrf-2/HO-1 signaling axis: a ray of hope in cardiovascular diseases[J]. *Cardiol Res Pract*, 2020, 2020: 5695723.
- [19] WU T F, YAO H, ZHANG B H, et al. κ Opioid receptor agonist inhibits myocardial injury in heart failure rats through activating Nrf2/HO-1 pathway and regulating Ca^{2+} -SERCA2a[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 7328437.
- [20] 张宁, 刘欣, 刘丽宏. 槲皮素通过 Nrf2/HO-1 通路改善压力负荷诱导的心力衰竭[J]. *解剖科学进展*, 2023, 29(3): 264-266.
- [21] WANG Z Y, ZHANG Y, WANG L, et al. NBP relieves cardiac injury and reduce oxidative stress and cell apoptosis in heart failure mice by activating Nrf2/HO-1/ Ca^{2+} -SERCA2a axis[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 7464893.
- [22] QIAN L Y, RUAN Y E, GONG X S, et al. The neuroprotective effect of LCZ696 on methamphetamine-induced cognitive impairment in mice[J]. *Neurosci Lett*, 2024, 823: 137630.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 刘圣山, 裴兆辉, 熊小英, 等. 沙库巴曲缬沙坦钠通过 Nrf2/HO-1 信号通路缓解心力衰竭的机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(19): 35-43.

Cite this article as: LIU S S, PEI Z H, XIONG X Y, et al. Mechanistic study of Sacubitril/Valsartan in alleviating heart failure via the Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(19): 35-43.