

高尿酸通过氧化应激诱导心肌细胞胰岛素抵抗

陈映群,张卫星,李 智

摘要 目的 探讨高尿酸对心肌细胞糖代谢、胰岛素抵抗的影响及其可能分子机制。方法 将大鼠 H9c2 心肌细胞暴露于高尿酸环境,胰岛素刺激下荧光葡萄糖 2-NBDG 标记心肌细胞葡萄糖摄取,通过倒置荧光显微镜及流式细胞仪检测心肌细胞对葡萄糖的摄取及心肌细胞内活性氧生成;蛋白印迹分析检测磷酸化胰岛素受体底物 1 (IRS1, Ser307) 和磷酸化 Akt (Ser473) 水平;动物模型上,检测高尿酸对胰岛素抵抗、心肌组织胰岛素信号通路相关蛋白表达的影响。结果 高尿酸显著抑制心肌细胞对葡萄糖的摄取,抗氧化剂 NAC 可恢复心肌细胞对葡萄糖的摄取;高尿酸激活胰岛素信号通路负调节蛋白 IRS1 磷酸化,同时抑制心肌细胞胰岛素信号通路蛋白 Akt 磷酸化,这些作用可被抗氧化剂 NAC 阻滞。结论 高尿酸通过氧化应激诱导胰岛素抵抗并抑制心肌细胞对葡萄糖摄取,为防治高尿酸相关代谢性心血管疾病提供理论依据。

关键词 高尿酸;心肌细胞;胰岛素抵抗;葡萄糖摄取

中图分类号 R 541.8

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)03-0418-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.03.015

高尿酸已经被证实与心血管疾病密切相关,包括高血压、缺血性心脏病、心力衰竭和心源性猝死等^[1-5]。动物实验发现高尿酸可加重缺血/缺氧条件下小鼠心肌细胞凋亡^[6]。临床研究^[7]表明高尿酸血症是胰岛素抵抗的独立危险因素,基础研究证明高尿酸能诱导肝脏、肌肉和脂肪细胞的胰岛素抵抗。研究^[8]证实胰岛素抵抗是影响心衰预后的一个标志物。然而,高尿酸血症是否可以通过诱导心肌细胞胰岛素抵抗影响心功能目前仍不清楚。高尿酸可增加多种靶细胞内氧化应激^[9-10],课题组前期研究^[5]表明高尿酸处理后肝细胞和胰腺 β 细胞中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生增加,且与胰岛素抵抗有关。高尿酸在胰岛素抵抗及心脏功能障碍中是否起到关键作用尚未确定。该研究通过

体外原代心肌细胞、H9c2 心肌细胞株实验以及高尿酸动物模型,探讨高尿酸对细胞内氧化应激、胰岛素信号通路和胰岛素抵抗的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂 荧光标记葡萄糖 2-(N-7-硝基-2,1,3-苯并恶二唑-4-氨基)-2-脱氧-D-葡萄糖 (简称:2-NB-DG) 购自美国 Invitrogen 公司;氧化应激荧光探针 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (简称:DCFH-DA)、尿酸购自美国 Sigma 公司;抗氧化剂 N-乙酰-L-半胱氨酸 (简称:NAC) 购自美国 ENZO Life Sciences 公司;磷酸化 Akt (Ser473) 和 Akt 抗体购自美国 Bioworld 公司;磷酸化 IRS1 (Ser307) 和 IRS1 (Ser307) 抗体购自美国 Millipore 公司;兔 GAPDH 抗体购自美国 Abcam 公司。所有化学试剂具有分析纯级。尿酸储备溶液浓度为 15 mg/ml,最终实验浓度为 15 mg/dl; NAC 储备溶液浓度为 500 mmol/L,最终实验浓度为 5 mmol/L。

1.2 细胞培养与处理 细胞研究使用 H9c2 大鼠心脏来源的胚胎肌细胞,用含有 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素的 DMEM 或低糖 DMEM 作为培养基进行细胞培养,在 37 °C 含 5% CO₂ 和 95% 空气的细胞培养箱中孵育。根据试验目的将细胞实验分为两部分:① 明确高尿酸可使心肌细胞内 ROS 增加,心肌细胞实验分组为:对照组 (Control)、高尿酸作用组 (HUA)、抗氧化剂作用组 (NAC)、抗氧化剂 + 高尿酸作用组 (NAC + HUA);② 明确高尿酸通过氧化应激抑制心肌细胞对葡萄糖的摄取并诱导心肌细胞胰岛素抵抗,心肌细胞实验分组为:对照组 (Control)、高尿酸作用组 (HUA)、抗氧化剂作用组 (NAC)、抗氧化剂 + 高尿酸作用组 (NAC + HUA)、胰岛素作用组 (Insulin)、胰岛素 + 高尿酸作用组 (Insulin + HUA)、抗氧化剂 + 胰岛素作用组 (NAC + Insulin)、抗氧化剂 + 胰岛素 + 高尿酸作用组 (NAC + Insulin + HUA)。将细胞以 2.0×10^5 个/ml 密度接种在 6 孔板;在含高尿酸处理组,将细胞与含有 15 mg/dl 尿酸在新鲜细胞培养基中孵育 24 h;含抗氧化剂 NAC 作用组,将细胞与含 5 mmol/L NAC 新鲜细胞培养基

2021-10-17 接收

基金项目:广东省医学科研基金 (编号:A2021059)

作者单位:北京大学深圳医院重症医学科,深圳 518035

作者简介:陈映群,男,副主任医师,责任作者,E-mail:13288767018@

126.com

预处理 30 min;然后收集细胞用于生物化学或分子测定。所有实验至少重复 3 次。

1.3 荧光显微镜分析心肌细胞对荧光葡萄糖摄取

使用荧光显微镜(CX21 倒置荧光显微镜,日本奥林巴斯公司)对心肌细胞对荧光葡萄糖摄取进行定性分析。2-NBDG 是一种 2-脱氧荧光葡萄糖的类似物,被细胞吸收以后,由于无法代谢而在细胞内积累,因此可作为细胞葡萄糖代谢的示踪剂,荧光强度反映了葡萄糖吸收的情况。本实验通过荧光葡萄糖类似物 2-NBDG 评估 H9c2 心肌细胞对的葡萄糖摄取。用含 FBS 的低糖 DMEM 培养基处理细胞 24 h,然后用含有胰岛素(100 nmol/L)和 2-NBDG(100 μ mol/L)的 KRB 缓冲液替换培养基。在 37 $^{\circ}$ C 下作用 30 min,用激发和发射波长分别为 485 nm 和 535 nm 的荧光测定 H9c2 心肌细胞对的葡萄糖摄取。

1.4 流式细胞仪分析心肌细胞对荧光葡萄糖摄取

使用流式细胞仪(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)对心肌细胞对荧光葡萄糖摄取进行定量分析。用含 FBS 的低糖 DMEM 培养基处理细胞 24 h,然后用含有胰岛素(100 nmol/L)和 2-NBDG(100 μ mol/L)的 KRB 缓冲液替换培养基在 37 $^{\circ}$ C 下 30 min。处理后从培养基中洗去游离的 2-NBDG,分别在激发和发射波长为 488 nm 和 525 nm 下通过流式细胞术测量心肌细胞对葡萄糖 2-NBDG 的摄取。数据分析使用流式细胞仪相关软件。统计分析使用单因素方差分析及 Tukey-Kramer 多重比较分析。

1.5 细胞内活性氧 ROS 测定 将细胞在 6 孔板(2.0×10^5 个/孔)中传代培养并使其附着作用于高尿酸 24 h,并如上所述在 37 $^{\circ}$ C 用 10 mmol/L DCFH-DA 染色 30 min。通过荧光显微镜对染色的细胞成像,并分别在激发和发射波长为 530 nm 和 480 nm

下通过流式细胞术对细胞内 ROS 分析。

1.6 急性高尿酸模型的构建 8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠,体质量(20 ± 2)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。经汕头大学医学院动物伦理委员会批准。给予标准饮食,实验前经过 1 周的环境适应时间。取 9 周龄小鼠 12 只,随机选择 6 只作为对照组,另外 6 只作为实验组。对照组和实验组小鼠禁食过夜,对照组根据体质量给予 0.5% 羧甲基纤维素钠灌胃和腹腔注射,实验组给予 500 mg/kg 次黄嘌呤灌胃以及 300 mg/kg 氧嗪酸钾腹腔注射处理;用磷钨酸法检测不同时间(0、1、2、3、4、6 h)小鼠血清中尿酸水平,建立急性高尿酸模型。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 20.0 版进行数据分析。所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较使用单因素方差分析,组间两两比较采用 Q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高尿酸抑制胰岛素诱导的 H9c2 心肌细胞对葡萄糖摄取 为了确定高尿酸是否在体外诱导心肌细胞胰岛素抵抗,将 H9c2 心肌细胞用不同浓度(0、5、10、15、20 mg/dl)的尿酸预处理不同时间(0、0.5、1.0、8.0、16.0、24.0 h),通过流式细胞仪对胰岛素刺激的心肌细胞 2-NBDG 摄取进行测定,结果发现胰岛素显著增加 H9c2 心肌细胞中 2-NBDG 摄取,高尿酸(15 mg/dl)预处理 24 h 后明显抑制心肌细胞胰岛素诱导的 2-NBDG 摄取率[(23.13 ± 1.92)% vs (72.85 ± 4.88)%, $P < 0.05$]。因此,高尿酸诱导心肌细胞胰岛素抵抗并抑制胰岛素刺激下心肌细胞葡萄糖的摄取。见图 1。

2.2 高尿酸诱导 H9c2 心肌细胞的氧化应激 与

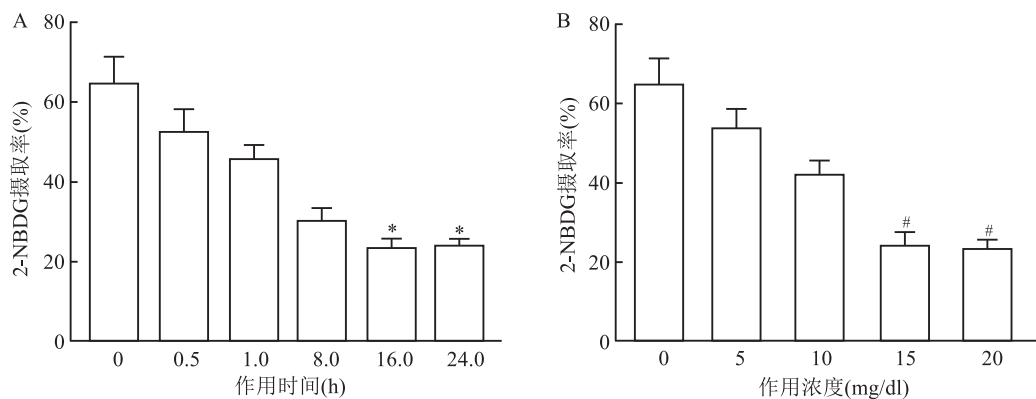


图1 尿酸对 H9c2 心肌细胞 2-NBDG 摄取的影响

A: 15 mg/dl 尿酸浓度预处理 H9c2 心肌细胞不同时间,确定最佳实验时间;B: 用不同尿酸浓度预处理 H9c2 心肌细胞 24 h,确定最佳尿酸实验浓度;与 15 mg/dl 尿酸浓度预处理 H9c2 心肌细胞 0、0.5、1 h 比较: * $P < 0.05$;与 0、5、10 mg/dl 尿酸浓度比较: # $P < 0.05$

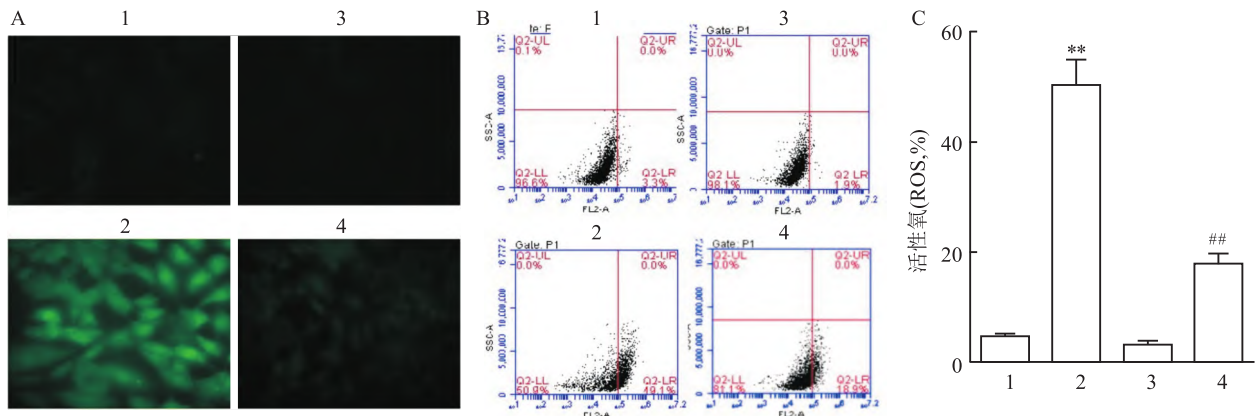


图2 高尿酸对H9c2心肌细胞ROS的影响

A: DCFH-DA染色后行荧光显微镜定性分析; B: 流式细胞仪定量分析; C: 流式细胞仪定量分析统计图; 1: Control组; 2: HUA组; 3: NAC组; 4: NAC + HUA组; 与Control组比较: ** $P < 0.01$; 与HUA组比较: ## $P < 0.01$

Control组比较,高尿酸预处理24 h后H9c2心肌细胞内的ROS水平明显升高[Control: $(4.15 \pm 0.89)\%$ vs HUA: $(50.03 \pm 4.53)\%$, $P < 0.05$].用抗氧化剂NAC预处理能够部分逆转心肌细胞内高尿酸产生的ROS[HUA + NAC: $(17.55 \pm 1.85)\%$ vs HUA: $(50.03 \pm 4.53)\%$, $P < 0.05$],表明高尿酸可直接引起H9c2心肌细胞的氧化应激。见图2。

2.3 高尿酸通过氧化应激诱导H9c2和原代心肌细胞胰岛素抵抗 抗氧化剂NAC预处理逆转了高尿酸抑制的胰岛素诱导H9c2心肌细胞2-NBDG葡萄糖摄取[NAC + Insulin + HUA: $(62.20 \pm 4.51)\%$ vs Insulin + HUA: $(31.98 \pm 3.74)\%$, $P < 0.05$],表明氧化应激在高尿酸诱导的心肌细胞胰岛素抵抗中起到关键作用。见图3。

2.4 高尿酸激活心肌细胞胰岛素负调节蛋白IRS1(Ser307)磷酸化,抑制胰岛素信号蛋白Akt磷酸化

与激活胰岛素信号传导的其他磷酸化位点的IRS1(Ser307)比较,磷酸化IRS1(Ser307)抑制胰岛素信号传导。在本研究中,高尿酸增加H9c2心肌细胞中的磷酸化IRS1(Ser307)水平(HUA vs Control: $P < 0.01$, $F = 27.71$)。此外,高尿酸部分逆转了胰岛素对H9c2心肌细胞中磷酸化IRS1(Ser307)的抑制(HUA + Insulin vs Insulin: $P < 0.01$, $Q = 11.70$)。为了确定高尿酸诱导的氧化应激是否激活H9c2心肌细胞中的磷酸化IRS1(Ser307),课题组用抗氧化剂NAC预处理细胞观察高尿酸诱导磷酸化IRS1(Ser307)水平的表达。NAC抵消了高尿酸诱导的磷酸化IRS1(Ser307)过表达(NAC + HUA vs HUA: $P < 0.05$, $Q = 4.79$),表明氧化应激在高尿酸诱导心肌细胞胰岛素抵抗中起到关键作用。见图

4A。

Akt是胰岛素依赖性PI3K通路在信号转导过程中激活的Ser/Thr蛋白激酶。课题组检测了高尿酸在H9c2细胞中是否抑制了胰岛素诱导的Akt磷酸化,结果显示高尿酸显著抑制胰岛素诱导的磷酸化Akt水平(HUA + Insulin vs Insulin: $P < 0.01$, $Q = 9.45$)。见图4B。

另外,课题组进一步讨论了抗氧化剂NAC对高尿酸抑制心肌细胞Akt磷酸化的影响。NAC不影响胰岛素诱导的磷酸化Akt水平,但明显改善高尿酸对胰岛素诱导的磷酸化Akt的抑制(NAC + HUA + Insulin vs HUA + Insulin: $P < 0.05$, $Q = 5.08$)。抗氧化剂逆转高尿酸对磷酸化Akt水平的抑制,证明氧化应激在高尿酸对胰岛素下游信号通路具有重要影响。见图4B。

2.5 高尿酸血症增加磷酸化IRS1(Ser307)水平并抑制小鼠心肌组织中胰岛素诱导的Akt磷酸化

高尿酸血症小鼠模型中血清尿酸水平高于诱导前,这与原发性高尿酸血症患者一致。在葡萄糖或胰岛素注射后15和30 min,小鼠模型显示葡萄糖耐量受损($P < 0.05$,图5A)和胰岛素耐受($P < 0.05$,图5B)。进而检测急性高尿酸血症对小鼠模型的心脏组织中的胰岛素信号通路蛋白的影响。胰岛素腹腔内注射高尿酸血症小鼠10 min,然后处死获得心肌组织。高尿酸血症增加小鼠心肌组织中IRS1(Ser307)的磷酸化水平($P < 0.01$,图5C);在急性高尿酸血症小鼠的心肌组织中磷酸化Akt水平明显低于对照组($P < 0.05$,图5D),表明高尿酸血症在体内明显影响胰岛素下游信号通路的传导。高尿酸通过氧化应激激活磷酸化IRS1(Ser307)水平,进而

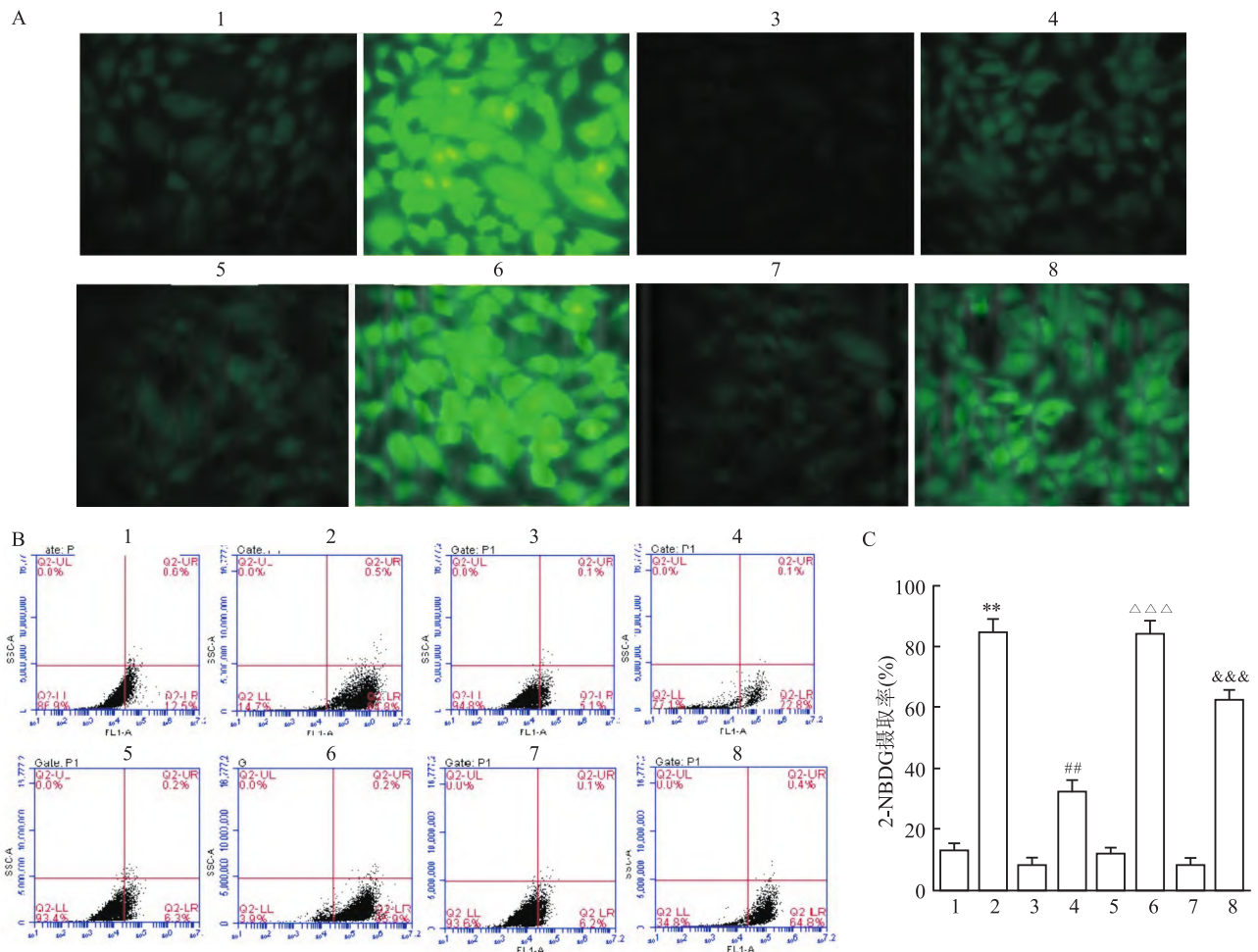


图3 高尿酸对 H9c2 心肌细胞 2-NBDG 葡萄糖摄取的影响

A: 用高尿酸预处理细胞,通过荧光显微镜定性分析基础或胰岛素刺激下细胞对 2-NBDG 葡萄糖摄取;B: 流式细胞术对细胞 2-NBDG 葡萄糖摄取定量分析;C: 流式细胞仪定量分析统计图;1: Control 组;2: Insulin 组;3: HUA 组;4: Insulin + HUA 组;5: NAC 组;6: NAC + Insulin 组;7: NAC + HUA 组;8: NAC + Insulin + HUA 组;与 Control 组比较: ** $P < 0.01$;与 Insulin 组及 HUA 组比较: ## $P < 0.01$;与 NAC 组比较: △△△ $P < 0.01$;与 Insulin + HUA 组及 NAC + HUA 组比较: &&& $P < 0.01$

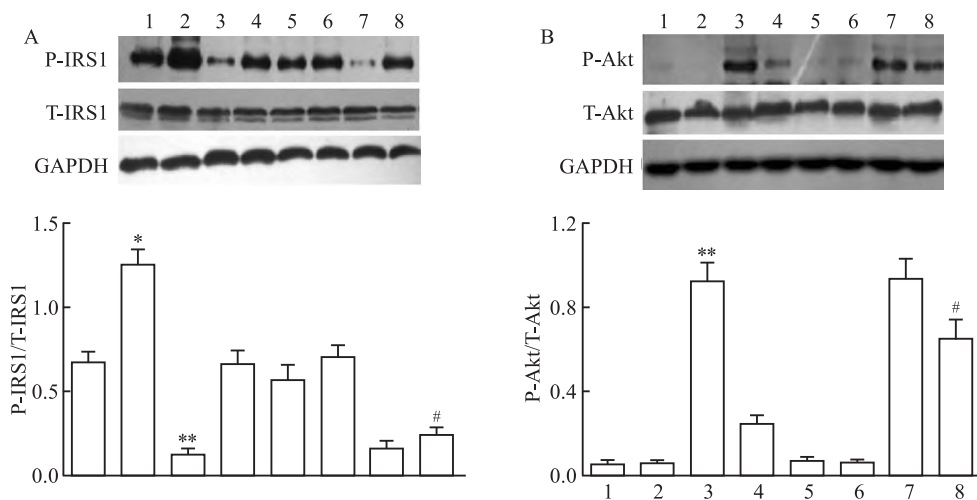


图4 高尿酸对 H9c2 心肌细胞磷酸化 IRS1 (Ser307) 及磷酸化 Akt 的影响

A: 高尿酸对 H9c2 心肌细胞磷酸化 IRS1 (Ser307) 的影响;B: 高尿酸对 H9c2 心肌细胞磷酸化 Akt 的影响;1: Control 组;2: HUA 组;3: Insulin 组;4: HUA + Insulin 组;5: NAC 组;6: NAC + HUA 组;7: NAC + Insulin 组;8: NAC + HUA + Insulin 组;与 Control 组及 HUA + Insulin 组比较: ** $P < 0.01$;与 NAC + HUA 及 HUA + Insulin 组比较: # $P < 0.05$

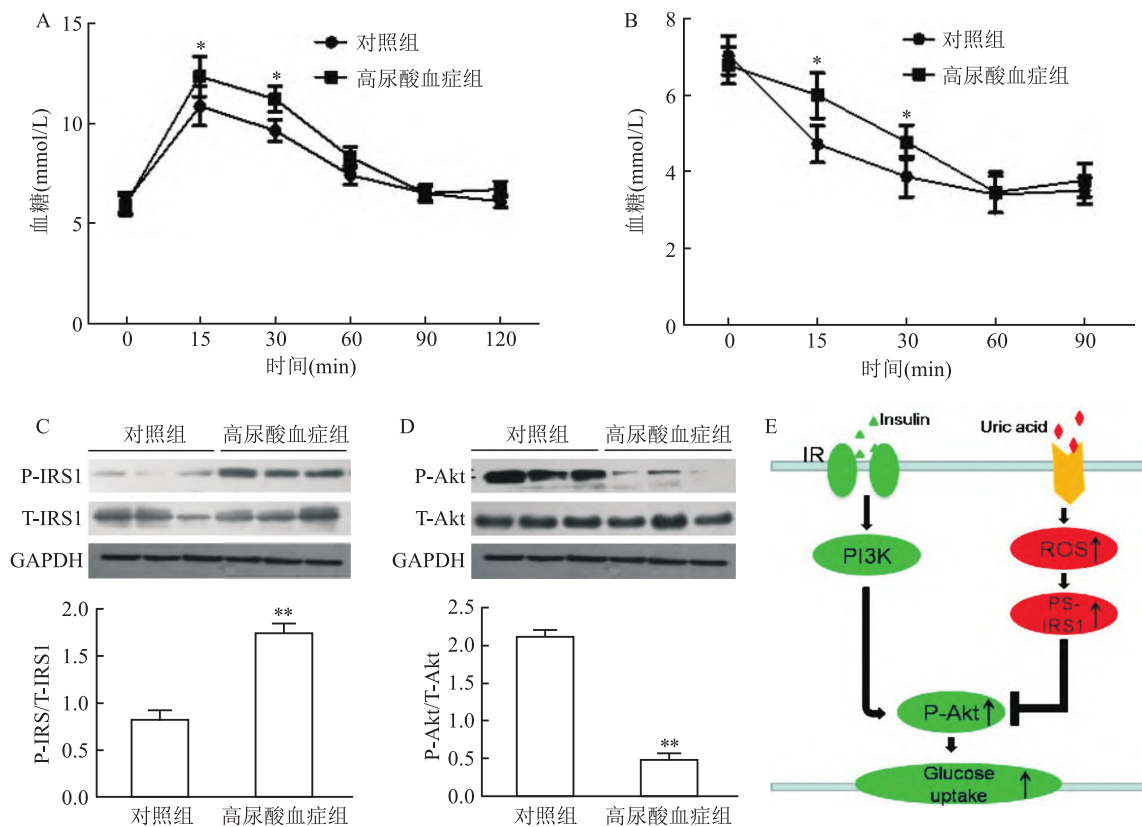


图5 高尿酸血症诱导小鼠心肌组织胰岛素抵抗及示意图

A:急性高尿酸血症小鼠模型的葡萄糖耐量试验;B:急性高尿酸血症小鼠模型的胰岛素耐量试验;C:高尿酸血症对心肌组织 IRS1 (Ser307) 磷酸化的影响;D:高尿酸血症对心肌组织 Akt (D) 磷酸化的影响;E:心肌细胞中高尿酸介导的胰岛素抵抗的示意图;与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

抑制 Akt (Ser 437) 磷酸化,从而导致心肌细胞胰岛素抵抗(图 5E)。

3 讨论

本研究讨论了高尿酸诱导对心肌细胞胰岛素抵抗及葡萄糖摄取的影响。高尿酸血症与许多心血管疾病密切相关^[1],如心力衰竭、高血压和冠状动脉疾病,但缺乏解释这种关联的病理机制。体外高尿酸增加胰腺 β 细胞、脂肪细胞和系膜细胞的氧化应激^[7-8],而研究表明氧化应激是许多细胞类型(包括心肌细胞)中胰岛素抵抗的主要介质^[10-11]。此外,胰岛素抵抗是心力衰竭患者死亡的危险因素,心肌氧化应激通常伴有胰岛素抵抗^[12-13]。高尿酸可以加重胰岛素抵抗,这在课题组前期的研究^[5]中得到证实:证明高尿酸可以通过氧化应激直接诱导心肌细胞胰岛素抵抗。本研究结果为高尿酸作为心血管疾病的独立危险因素提供了新的证据,为高尿酸如何抑制心肌细胞葡萄糖代谢及高尿酸相关心血管疾病提供新的解释。

研究^[14]表明细胞内胰岛素信号通路通过调节细胞葡萄糖代谢来调节细胞代谢、生长和存活,心脏生长和代谢是通过复杂的细胞外和细胞内信号整合来协调。高尿酸明显抑制了心肌细胞中胰岛素诱导的葡萄糖摄取,导致胰岛素抵抗,但高尿酸是通过何种机制诱导心肌细胞胰岛素抵抗并抑制了心肌细胞对葡萄糖的摄取,仍不得而知。

已有研究^[15]表明骨骼肌中 H_2O_2 诱导的氧化应激与胰岛素抵抗有关,本研究发现高尿酸直接增加了心肌细胞内活性氧水平,提示高尿酸诱导了心肌细胞氧化应激。此外,课题组检测了抗氧化剂 NAC 在高尿酸抑制胰岛素刺激下心肌细胞葡萄糖摄取的影响,结果发现在心肌细胞中,抗氧化剂 NAC 明显逆转了心肌细胞中高尿酸抑制胰岛素刺激的 2-NB-DG 摄取,结果表明高尿酸通过氧化应激诱导的胰岛素抵抗从而抑制了心肌细胞对葡萄糖的摄取,这与新近一项研究^[16]相符,该研究显示氧化应激可诱导心肌细胞胰岛素抵抗进而增加 H9c2 心肌细胞凋亡。

本研究讨论了高尿酸诱导心肌细胞胰岛素抵抗的机制,高尿酸通过降低葡萄糖摄取来改变心肌细胞能量代谢,高尿酸诱导的心肌细胞胰岛素抵抗可能导致心脏功能障碍,为高尿酸血症相关代谢性心血管疾病的提供了新的证据。然而,本研究仅从体外细胞实验证实了高尿酸通过氧化应激诱导的胰岛素抵抗从而抑制了心肌细胞对葡萄糖的摄取,但人高尿酸血症是一种慢性过程,需要进一步在动物模型上研究高尿酸血症和胰岛素抵抗的关系。

参考文献

- [1] Kleber M E, Delgado G, Grammer T B, et al. Uric acid and cardiovascular events: A mendelian randomization study[J]. J Am Soc Nephrol, 2015, 26(11): 2831–8.
- [2] Paolisso G, Tagliamonte M R, Rizzo M R, et al. Prognostic importance of insulin mediated glucose uptake in aged patients with congestive heart failure secondary to mitral and/or aortic valve disease[J]. Am J Cardiol, 1999, 83: 1338–44.
- [3] Doehner W, Rauchhaus M, Ponikowski P, et al. Impaired insulin sensitivity as an independent risk factor for mortality in patients with stable chronic heart failure[J]. J Am Coll Cardiol, 2005, 46: 1019–26.
- [4] Yang L, Chang B, Guo Y, et al. The role of oxidative stress-mediated apoptosis in the pathogenesis of uric acid nephropathy[J]. Ren Fail, 2019, 41(1): 616–22.
- [5] Zhang Y N, Yamamoto T, Hisatome I, et al. Uric acid induces oxidative stress and growth inhibition by activating adenosine monophosphate-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase signal pathways in pancreatic β cells[J]. Mol Cell Endocrinol, 2013, 375: 89–96.
- [6] 贺磊, 杨怡, 田玥, 等. 高尿酸通过激活钙蛋白酶加重缺血/缺氧条件下小鼠心肌细胞凋亡[J]. 临床心血管病杂志, 2017, 33(10): 1004–8.
- [7] Li L, Yao Y, Zhao J, et al. Dehydroepiandrosterone protects against hepatic glycolipid metabolic disorder and insulin resistance induced by high fat via activation of AMPK-PGC-1 α -NRF-1 and IRS1-AKT-GLUT2 signaling pathways[J]. Int J Obes (Lond), 2020, 44(5): 1075–86.
- [8] Zhang J X, Zhang Y P, Wu Q N, et al. Uric acid induces oxidative stress via an activation of the renin-angiotensin system in 3T3-L1 adipocytes[J]. Endocrine, 2015, 48: 135–42.
- [9] Zhuang Y, Feng Q, Ding G, et al. Activation of ERK1/2 by NADPH oxidase-originated reactive oxygen species mediates uric acid-induced mesangial cell proliferation[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 307: F396–406.
- [10] Dziegielewska-Gesiak S, Stoltny D, Brozek A, et al. Are insulin-resistance and oxidative stress cause or consequence of aging[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2020, 245(14): 1260–7.
- [11] Chang C C, Li H H, Tsou S H, et al. The pluripotency factor nanog protects against neuronal amyloid β -induced toxicity and oxidative stress through insulin sensitivity restoration[J]. Cells, 2020, 9(6): E1339.
- [12] 胡景春, 唐虹, 薛威, 等. 牡荆素调节自噬与自噬流介导缺氧复氧大鼠原代心肌细胞的保护作用[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(8): 1174–9.
- [13] Echeverría L E, Rojas L Z, López L A, et al. Myocardial involvement in chagas disease and insulin resistance: A non-metabolic model of cardiomyopathy[J]. Glob Heart, 2020, 15(1): 36.
- [14] Matsui T, Rosenzweig A. Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt[J]. J Mol Cell Cardiol, 2005, 38: 63–71.
- [15] Santos F R, Diamond-Stanic M K, Prasannarong M, et al. Contribution of the serine kinase c-Jun N-terminal kinase (JNK) to oxidant-induced insulin resistance in isolated rat skeletal muscle[J]. Arch Physiol Biochem, 2012, 118: 231–6.
- [16] Olgar Y, Tuncay E, Billur D, et al. Ticagrelor reverses the mitochondrial dysfunction through preventing accumulated autophagosomes-dependent apoptosis and ER stress in insulin-resistant H9c2 myocytes[J]. Mol Cell Biochem, 2020, 469(1/2): 97–107.

High uric acid evokes insulin resistance *via* oxidative stress in cardiomyocytes

Chen Yingqun, Zhang Weixing, Li Zhi

(Dept of Intensive Care Unit, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518035)

Abstract Objective To investigate the effect of HUA on insulin resistance in cardiomyocytes and hyperuricemic mouse model. **Methods** We exposed primary cardiomyocytes and a rat cardiomyocyte cell line H9c2 cardiomyocytes to HUA, then quantified glucose uptake with a fluorescent glucose analog, 2-NBDG, after insulin challenge and detected reactive oxygen species (ROS) production. Western blot analysis was used to examine the levels of phosphorylated insulin receptor substrate 1 (IRS1, Ser307) and phospho-Akt (Ser473). We monitored the impact of HUA on insulin resistance, insulin signaling, phospho-IRS1 (Ser307) and phospho-Akt levels in myocardial tissue of an acute hyperuricemic mouse model established by potassium oxonate treatment. **Results** HUA inhibited insu-

丹红注射液对急性心肌梗死大鼠的治疗性血管新生作用研究

卫 国,王慧芳,刘 娟,刘迎宾,王艳华,殷 英

摘要 目的 明确丹红注射液对急性心肌梗死(AMI)大鼠的治疗性血管新生作用。方法 40只大鼠随机分为假手术组、模型组、丹红注射液低(0.5 ml/kg)、中(1.0 ml/kg)、高(2.0 ml/kg)剂量组,每组8只。复制大鼠AMI模型,尾静脉注射法给药,连续给药7 d。超声心动图法测定大鼠左心室射血分数(LVEF)和左室短轴缩短率(LVFS),酶联免疫法检测大鼠血浆T型肌钙蛋白(TN-T)和脑钠肽(BNP)水平,HE染色法评价大鼠心肌损伤程度,免疫组化法测定大鼠心肌梗死边缘区CD34阳性微血管密度(MVD),免疫印迹法测定大鼠心肌梗死边缘区血管假性血友病因子(vWF)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和血管内皮生长因子-A(VEGF-A)表达。结果 与假手术组比较,模型组大鼠LVEF、LVFS值下降($P < 0.01$),TN-T和BNP水平升高($P < 0.01$),心肌梗死边缘区 α -SMA($P < 0.05$)、CD34、vWF、VEGF-A表达上调($P < 0.01$);与模型组比较,中、高剂量组LVEF、LVFS值上升,CD34、vWF表达增加($P < 0.05$, $P < 0.01$),低、中、高剂量组TN-T和BNP水平下降, α -SMA、VEGF-A表达进一步增加($P < 0.05$, $P < 0.01$);HE染色显示心肌组织病理损伤减轻。结论 丹红注射液对AMI大鼠具有治疗性血管新生作用。

关键词 丹红注射液;急性心肌梗死;治疗性血管新生

中图分类号 R 256.2;R 285.5;R 972

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)03-0424-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.03.016

2021-10-09 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81403135)

作者单位:空军军医大学第一附属医院药剂科,西安 710032

作者简介:卫 国,男,主管药师;

殷 英,女,主管药师,责任作者, E-mail: yinying0736@126.com

近年来,通过给予药物或血管新生调节因子等外源性干预措施促进血管新生即治疗性血管新生,逐渐成为冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary artery heart disease, CAHD)治疗的重点关注领域^[1]。中药因其多靶点、多机制、安全性高等优势,在CAHD治疗性血管新生疗法中愈来愈受到关注^[2]。丹红注射液(danhong injection, DHI)是由丹参和红花两味传统中药按一定比例配伍制成的中药注射剂,具有通脉生络,去瘀生新的功效,能有效治疗血脉痹阻所致的“胸痹”或者“真心痛”。但目前DHI对缺血心肌的保护作用与其“生新”功能的相关性研究较少,该研究主要考察DHI对急性心肌梗死(acute myocardium infarction, AMI)大鼠缺血心肌的保护作用和对冠状动脉血管新生的促进作用,从而明确DHI对AMI损伤是否具有治疗性血管新生作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性SD大鼠40只,SPF级,体质量250~280 g,由空军军医大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK-(军)2012-0007。

1.1.2 仪器与设备 HX-100E小动物呼吸机(成都泰盟科技公司);BL-420S系列生物机能实验系统(成都泰盟科技公司);IX71+DP72型倒置显微镜(日本奥林巴斯公司);Vevo 770型小动物超声波影像诊断仪(加拿大visualsonics公司);LMT260-XY图像采集系统(德国Leica公司);CHEMIDOC凝胶

lin-induced glucose uptake in H9c2 cardiomyocytes. It increased ROS production, pretreatment with N-acetyl-L-cysteine (NAC), a ROS scavenger, reversed HUA-inhibited glucose uptake induced by insulin. HUA exposure directly increased the phospho-IRS1 (Ser307) response to insulin and inhibited that of phospho-Akt in H9C2 cardiomyocytes, which was blocked by NAC. Furthermore, the acute hyperuricemic mice model showed impaired glucose tolerance and insulin tolerance accompanied by increased phospho-IRS1 (Ser307) and inhibited phospho-Akt response to insulin in myocardial tissues. **Conclusion** HUA inhibits insulin signaling and induces insulin resistance in cardiomyocytes *in vitro* and *in vivo*, which is a novel potential mechanism of hyperuricemic-related cardiovascular disease.

Key words high uric acid; cardiomyocytes; insulin resistance; glucose uptake