

· 基础研究 ·

罗氟司特对压力超负荷诱导的小鼠心肌重构的影响及其机制

杜高波, 唐其柱*

(武汉大学人民医院心内科, 武汉大学心血管病研究所, 心血管病湖北省重点实验室, 武汉 430060)

【摘要】 目的 探讨罗氟司特(RM)对压力负荷诱导的小鼠心肌重构的作用及机制。**方法** 利用主动脉缩窄术(AB)构建小鼠心肌重构模型,采用随机数表法,将 40 只雄性 C57/B6 小鼠(8~10 周)随机分为假手术组(Sham 组),AB 组,AB+RM(1 mg/kg)组及 AB+RM(3 mg/kg)组,每组 10 只。AB 术后第 2 天给予小鼠 RM 灌胃处理,连续灌胃至术后 6 周。随后行超声心动图检测各组小鼠心脏功能,包括左室射血分数(LVEF)、左室短轴缩短率(LVFS)、左室收缩末期内径(LVESD)及左室舒张末期内径(LVEDD);采用 HE 及天狼猩红染色观察各组心脏组织肥厚及纤维化状况;采用 qPCR 法检测心肌肥厚,纤维化及炎症相关基因的 mRNA 的表达,包括心钠素、脑利钠肽、 β -MHC、结缔组织生长因子、*fibronectin*、*collagen 1*、*collagen 3*、白细胞介素-6(IL-6)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α);采用免疫组织化学染色标记 CD45 及 CD68 检测心肌组织白细胞和巨噬细胞浸润水平;采用蛋白免疫印迹法检测心肌组织中磷酸化的 p38(P-p38)及总 p38(T-p38)的蛋白表达水平。采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析。**结果** 术后 6 周,与 Sham 组相比,AB 组小鼠 LVEF 及 LVFS 水平显著降低,LVESD 及 LVEDD 水平明显升高,心肌肥厚及心肌纤维化水平明显升高,心肌组织中 CD45、CD68、IL-6 及 TNF- α 的蛋白表达水平明显增高($P<0.05$);与 AB 组相比,AB+RM(1 mg/kg)组及 AB+RM(3 mg/kg)组小鼠心功能明显改善,心肌肥厚及纤维化水平明显被抑制,心肌组织炎症水平明显降低($P<0.05$);免疫印迹结果显示,RM(1 及 3 mg/kg)能够明显抑制 AB 诱导的小鼠心肌组织 p38 的磷酸化($P<0.05$)。**结论** 罗氟司特可减轻压力负荷诱导的小鼠心肌肥厚及纤维化,主要通过调节 p38 丝裂原激活的蛋白激酶信号通路及炎症反应发挥上述作用。

【关键词】 罗氟司特;心肌肥厚;心肌纤维化;炎症;p38 丝裂原激活的蛋白激酶

【中图分类号】 R544.1

【文献标志码】 A

【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2020.12.213

Effects of roflumilast on cardiac remodeling induced by pressure overload in mice and its mechanism

DU Gao-Bo, TANG Qi-Zhu*

(Department of Cardiology of People's Hospital of Wuhan University, Cardiovascular Diseases Institute of Wuhan University, Hubei Key Laboratory of Cardiology, Wuhan 430060, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of roflumilast (RM) on cardiac remodeling induced by pressure overload in mice and its mechanism. **Methods** Aortic constriction (AB) was used to construct a mice model of cardiac remodeling. A total of 40 male C57/B6 mice (8-10 weeks) were randomly divided into sham group, AB group, AB + RM (1mg / kg) group, and AB + RM (3 mg/kg) group ($n=10$ each). At d 2 after AB surgery, the mice were given an intragastric administration of RM for 6 weeks. Echocardiography was performed to detect cardiac function in each group, including left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular short axis fraction shortening (LVFS), left ventricular end systolic diameter (LVESD), and left ventricular end diastolic diameter (LVEDD). HE and Picrosirius Red staining were used to observe cardiac hypertrophy and fibrosis, and qPCR was used to detect the mRNA expression levels of cardiac hypertrophy, fibrosis and inflammation-related genes, including *atriopeptin*, *brain natriuretic peptide*, β -MHC, *connective tissue growth factor*, *fibronectin*, *collagen 1*, *collagen 3*, *interleukin-6* (IL-6) and *tumor necrosis factor- α* (TNF- α). Immunohistochemical markers CD45 and CD68 were used to detect leukocyte and macrophage infiltration in cardiac tissue. Western blot was used to detect the protein expression level of phosphorylated p38 (P-p38) and total p38 (T-p38). **Results** At week 6 after AB surgery, compared with the Sham group, LVEF and LVFS in the AB group were significantly reduced, the LVESD and LVEDD were significantly increased, the cardiac hypertrophy and fibrosis were significantly increased, and CD45 and CD68 in cardiac tissue, the expression levels of IL-6 and TNF- α were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the AB group, the cardiac

收稿日期: 2020-01-02; 接受日期: 2020-02-01

基金项目: 国家自然科学基金(81530012;81470516)

通信作者: 唐其柱, E-mail: qztang@whu.edu.cn

function of the AB+RM (1 mg/kg) group and the AB+RM (3 mg/kg) group was significantly improved, cardiac hypertrophy and fibrosis were significantly suppressed, and inflammation was significantly reduced ($P<0.05$). Western blot results showed that RM (1 and 3 mg/kg) could significantly inhibit the p38 of cardiac tissue induced by AB surgery ($P<0.05$). **Conclusion** Roflumilast can reduce overload-induced cardiac hypertrophy and fibrosis in mice mainly through regulating the p38 MAPK signaling pathway and inflammatory response.

【Key words】 roflumilast; cardiac hypertrophy; cardiac fibrosis; inflammation; p38MAPK

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81530012, 81470516).

Corresponding author: TANG Qi-Zhu, E-mail: qztang@whu.edu.cn

心肌重构是指在各种病理生理因素刺激下,心脏结构、形态和功能发生的适应性代偿改变的现象,是心力衰竭发生发展过程中的重要病理改变^[1]。心肌重构主要包括结构重构和电重构,以心肌间质纤维化、心肌细胞肥大、心室顺应性降低和心室电传导异常为主要特征,可直接影响心脏功能甚至导致死亡^[2,3]。因此,以心肌重构为靶点防治心力衰竭具有重要意义和前景。罗氟司特(roflumilast, RM)是第 1 个被美国食品和药物管理局批准上市的磷酸二酯酶 4(phosphodiesterase 4, PDF4)抑制剂,主要用于慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)的治疗,具有良好的抗炎特性及器官保护作用^[4]。在细菌诱导的 COPD 小鼠模型中, RM 能够显著抑制肺内白细胞浸润、支气管壁重构及肺气肿^[5]。此外, RM 还能够降低 COPD 患者血清中促炎症细胞因子的水平。最近的一项研究表明, RM 可通过抑制 p38 丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路改善脓毒症肝损伤,提高小鼠生存率^[6]。而在心脏中, p38 MAPK 信号通路及炎症反应的激活是导致心肌重构的重要机制^[7,8]。基于此,我们认为 RM 可能通过调节小鼠心肌中 p38 MAPK 信号及炎症反应改善压力负荷诱导的心肌重构。本研究通过主动脉缩窄术(aortic banding, AB)构建小鼠心肌重构模型,观察 RM 对小鼠心肌重构及心功能的影响,同时探讨了 RM 影响小鼠心肌重构的潜在机制,旨在为今后心肌重构及心力衰竭的药物治疗提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

RM 购自于美国 Sigma 公司,纯度 $\geq 98\%$; CD45 和 CD68 抗体购自于美国 Abcam 公司;总 p38(total-p38, T-p38)、磷酸化的 p38(phosphorylated-p38, P-p38)及 GAPDH 抗体均购自于美国 Cell Signaling Technology 公司;免疫组织化学 DAB 试剂盒购于美国 Gene-tech 公司;羊抗兔 IgG 抗体购自于美国 LICOR 公司。

1.2 实验动物及模型建立

雄性 C57/B6 小鼠(8~10 周),体质量 255~320 g,购自于中国医学科学院实验动物研究所(动物合格证号:11401300036042),饲养于武汉大学心血管病研究所动物中心。采用随机数表法随机将 40 只小鼠随机分为假手术组(Sham 组), AB 组, AB+RM (1 mg/kg) 组及 AB+RM (3 mg/kg) 组,每组 10 只。AB 组, AB+RM (1 mg/kg) 组及 AB+RM (3 mg/kg) 组小鼠均接受 AB 手术处理。超声心动图检测术后 6 周是否成功建立压力负荷诱导的心肌重构模型。AB+RM (1 mg/kg) 组及 AB+RM (3 mg/kg) 组小鼠于 AB 术后 2 d 开始,每天给予 1 及 3 mg/kg 的 RM 灌胃处理,持续 6 周。本研究中所有涉及动物的实验均通过武汉大学动物护理和使用委员会批准。

1.3 AB 组小鼠手术方法

经腹腔注射的方式给予小鼠 3% 异戊巴比妥麻醉,同时经口给予气管插管辅助呼吸。在小鼠胸部 2~3 肋间隙水平方向切开皮肤,仔细分离降主动脉,将 26 号针置于主动脉旁并结扎。结扎后迅速拔出针头,逐层缝合小鼠肌肉及皮肤。

1.4 各组小鼠心脏形态学参数的收集

各组小鼠通过吸入 1.5% 异氟烷麻醉后,剃去心前区毛发,固定于保温平板上,采用 MyLab 30CV 多普勒超声诊断仪(意大利 Biosound Esaote 公司,频率 10 MHz)检测。在靠近乳头肌水平的胸骨旁长轴和胸骨旁短轴上以二维模式成像后,记录一个二维引导的穿过左心室前壁和后壁 M 型超声,随后收集并计算心脏的形态学参数,心率(heart rate, HR)、左室短轴缩短率(left ventricular fraction shortening, LVFS)、左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室收缩末期内径(left ventricular end-systolic diameter, LVESD)及左室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD)。各参数最终取值为 3 个连续心动周期的平均值。

1.5 心肌肥厚与纤维化的形态学检测

通过颈椎脱臼法处死各组小鼠后,获取小鼠心脏,用吸水纸擦干心脏残余液体,并称重(mg),获得心重/体重(heart weight/body weight, HW/BW)值。

同时取出小鼠下肢胫骨并测量其长度 (cm), 计算心重/胫骨长 (heart weight/ tibia length, HW/TL)。随后, 迅速将心脏置于有 10% 甲醛溶液的容器中固定, 随后进行石蜡包埋并制成厚度为 5 μm 的切片。HE 染色评价心肌组织形态结构, 天狼猩红染色评价心肌组织间质及血管周纤维化状况。用 Image-ProPlus 6.0 软件分析计算各组心肌细胞横截面积及心肌组织中胶原百分比。

1.6 qPCR 检测肥厚、纤维化及炎症相关基因

1.6.1 RNA 的提取 各组取 30 mg 心肌组织剪碎并加入 TRIzol, 充分研磨后离心取上清液, 加入 200 ml 三氯甲烷, 静置 5 min。12 000 g 离心 15 min (4 ℃), 取上清液转移至新的离心管, 加入等体积异丙醇, 静置 10 min。再次 12 000 g 离心 30 min (4 ℃), 得到白色沉淀。75% 乙醇进行漂洗, 继续 7 500 g 离心 5 min (4 ℃)。利用紫外分光光度计检测所获 RNA 的浓度及纯度, 当 $A_{260}/A_{280} = 1.8 \sim 2.0$ 时, 代表该样品达标可用。

1.6.2 AMV 逆转录 取 0.65 ml EP 管, 加入 4.5 μl DEPC 水, 1 μl 引物及 1 μl 模板 RNA。离心并沸水浴后加入 0.5 μl dNTP, 2 μl 5× Buffer 及 1 μl AMV 逆转录酶, 离心后进行逆转录, 获取 cDNA。

1.6.3 实时荧光定量 PCR 将步骤 1.6.2 中获取的 cDNA 加 60 μl DEPC 水稀释后, 配置反应体系。具体如下: (1) SyBr Green 10 μl; (2) DEPC 水: 8 μl; (3) 正向引物及反向引物各 0.5 μl。最终以 GAPDH 作为内参基因进行校正。各待测基因引物详见表 1。

1.7 免疫组织化学法检测 CD45 和 CD68

首先将各组石蜡切片于 60 ℃ 温箱中脱蜡 30 min, 采用柠檬酸盐高压法进行抗原修复; 随后将 3% 双氧水覆盖于心肌组织上孵育 15 min, 8% 羊血清封闭 30 min, 一抗 CD45 和 CD68 (1:200, 磷酸缓冲液稀释) 滴加并完全覆盖于心肌组织孵育, 4 ℃ 过夜。次日, 各组切片复温后滴加二抗 B 液, 室温孵育 30 min, 冲洗后滴加显色剂二氨基联苯胺 (Diaminobenzine, DAB) 工作液, 并在光镜下严格控制显色时间。最后, 苏木素复染各组切片, 梯度乙醇脱水后封片。随机选取 10 张心肌组织不重复的区域观察, 记录视野中白细胞及巨噬细胞数量。

1.8 蛋白免疫印迹法检测

取约 30 g 的心肌组织用剪刀尽量剪碎, 随后加入放射免疫沉淀试验裂解液, 于研磨仪中充分粉碎。进一步超声 (400 W, 5 kHz) 裂解后离心取上清液, 二喹啉甲酸法测定蛋白浓度后, 将各组蛋白液定容至等浓度。将所获蛋白用 12% 十二烷基硫酸钠聚

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 Primers used in qPCR

Primer	Primer sequence (5'→3')	Size
ANP	F: ACCTGCTAGACCACCTGGAG	356
	R: CCTTGGCTGTTATCTTCGGTACCGG	
BNP	F: GCGGTCACTCCTATCCTCTGG	298
	R: GCCATTTCTCCGACTTTTCTC	
β-MHC	F: CCGAGTCCCAGGTCAACAA	192
	R: CTTCACGGGGCACCCTTGGA	
Ctgf	F: TGTGTGATGAGCCCAAGGAC	209
	R: AGTTGGCTCGCATCATAGTTG	
Fibronectin	F: CCGGTGGCTGTCAGTCAGA	467
	R: CCGTTCCCACTGCTGATTTATC	
Collagen 1	F: AGGCTTCAGTGCTTTGGATG	320
	R: CACCAACAGCACCATCGTTA	
Collagen 3	F: CCCAACCAGAGATCCCATT	298
	R: GAAGCACAGGAGCAGTGCTAGA	
IL-6	F: GCCTTCTTGGGACTGATGCT	448
	R: TGTGACTCCAGCTTATCTCTTGG	
TNF-α	F: GCCCTTTGAAGAGGTGAGGT	564
	R: GAATTCCGCCGCCGCTCTC	
GAPDH	F: TTG TGA TGG GTG TGA ACC	366
	R: TTC TGA GTG GCA GTG ATG	

ANP: atriopeptin; BNP: brain natriuretic peptide; Ctgf: connective tissue growth factor; IL-6: interleukin-6; TNF-α: tumor necrosis factor-α; F: forward; R: reverse.

丙烯酰胺凝胶 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel, SDS-PAGE) 电泳分离, 随后转入聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 加入磷酸缓冲液稀释的 P-p38 (1:500), T-p38 (1:5000) 及 GAPDH (1:1000) 抗体, 4 ℃ 孵育过夜, 次日将 PVDF 膜置于羊抗兔二抗中避光孵育 60 min, 利用 Odyssey 扫描仪 (美国 LI-COR) 对各组蛋白条带扫描并定量, 最终以 GAPDH 作为内参蛋白进行校正。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据处理。所有计量资料用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。各组间比较用 One-way ANOVA 分析, 2 组间比较采用 *t* 检验。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组小鼠心功能的比较

超声心动图数据显示 (图 1A), 与 Sham 组相比, AB 组小鼠心室壁厚度明显增加; 与 AB 组相比, AB+RM (1 mg/kg) 组及 AB+RM (3 mg/kg) 组小鼠心室壁厚度明显减少; 进一步分析发现, 4 组小鼠 HR 无明显差异 (*P* > 0.05), 表明心功能各指标具有可比性 (图 1B)。与 Sham 组相比, AB 组小鼠 EF 和 FS 百分数均显著降低 (均 *P* < 0.05), 而 LVESD 及

LVEDD 则显著升高 (均 $P<0.05$), 表明 AB 手术成功诱导了小鼠心功能不全; 与 AB 组小鼠相比, AB+RM (1 mg/kg) 组及 AB+RM (3 mg/kg) 组小鼠 EF 及 FS 显著升高 (均 $P<0.05$), 而 LVESD 及 LVEDD 则显著降低 (均 $P<0.05$), 提示 RM 能够改善 AB 诱导的小鼠心功能不全 (图 1C~F)。

2.2 4 组小鼠心肌肥厚相关指标的比较

HE 染色结果显示, 与 Sham 组相比, AB 组小鼠心脏大体横截面积及心肌细胞横截面积均明显增加, HW/BW 及 HW/TL 值明显上升 (均 $P<0.05$); 与 AB 组相比, AB+RM (1 mg/kg) 组及 AB+RM (3 mg/kg) 组小鼠心脏大体横截面积及心肌细胞横截面积显著降低, 同时 HW/BW 及 HW/TL 值也明显下降 (均 $P<0.05$; 图 2A~D)。进一步, 我们分析了 4 组小鼠心肌肥厚相关标志基因 [心钠素 (atriopeptin, ANP)、脑利钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP) 及 β -MHC] 的 mRNA 表达水平, 结果显示 1 和 3 mg/kg 的 RM 干预能够显著抑制 AB 诱导的小鼠心肌 ANP、BNP 及 β -MHC 的 mRNA 表达上调 (均 $P<0.05$; 图 2E~G)。

2.3 4 组小鼠心肌纤维化相关指标的比较

天狼猩红染色结果显示, 与 Sham 组相比, AB 组小鼠心肌间质及血管周胶原沉积明显增加; 与 AB

组相比, AB+RM (1 mg/kg) 组及 AB+RM (3 mg/kg) 组小鼠心肌血管周及间质中胶原沉积明显降低 (均 $P<0.05$; 图 3A~C); 同时, 我们分析了心肌纤维化相关标志基因 (Ctgf、fibronectin、collagen 1 和 collagen 3) 的 mRNA 表达水平, 结果显示, 与 AB 组相比, AB+RM (1 mg/kg) 组及 AB+RM (3 mg/kg) 组小鼠心肌组织中 Ctgf、fibronectin、collagen 1 和 collagen 3 的 mRNA 表达水平明显降低 (均 $P<0.05$; 图 3D~G)。

2.4 4 组小鼠心肌组织炎症反应及 p38 MAPK 的激活状态

免疫组织化学染色结果提示, 与 Sham 组相比, AB 组小鼠心肌组织中 CD45 及 CD68 阳性细胞数目明显增多, 同时增加促炎症细胞因子白细胞介素 (interleukin-6, IL-6) 及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的表达, 表明 AB 能够通过促进心肌组织中白细胞及巨噬细胞浸润, 激活心肌炎症反应 (均 $P<0.05$); 而不同剂量 RM 干预后均能降低心肌组织中炎症细胞数目, 抑制相关促炎症细胞因子释放 (均 $P<0.05$; 图 4A~E)。免疫印迹结果揭示, 与 AB 组相比, AB+RM (1 mg/kg) 组及 AB+RM (3 mg/kg) 组小鼠心肌组织中 p38 蛋白磷酸化水平明显被抑制 (均 $P<0.05$; 图 4F, G)。

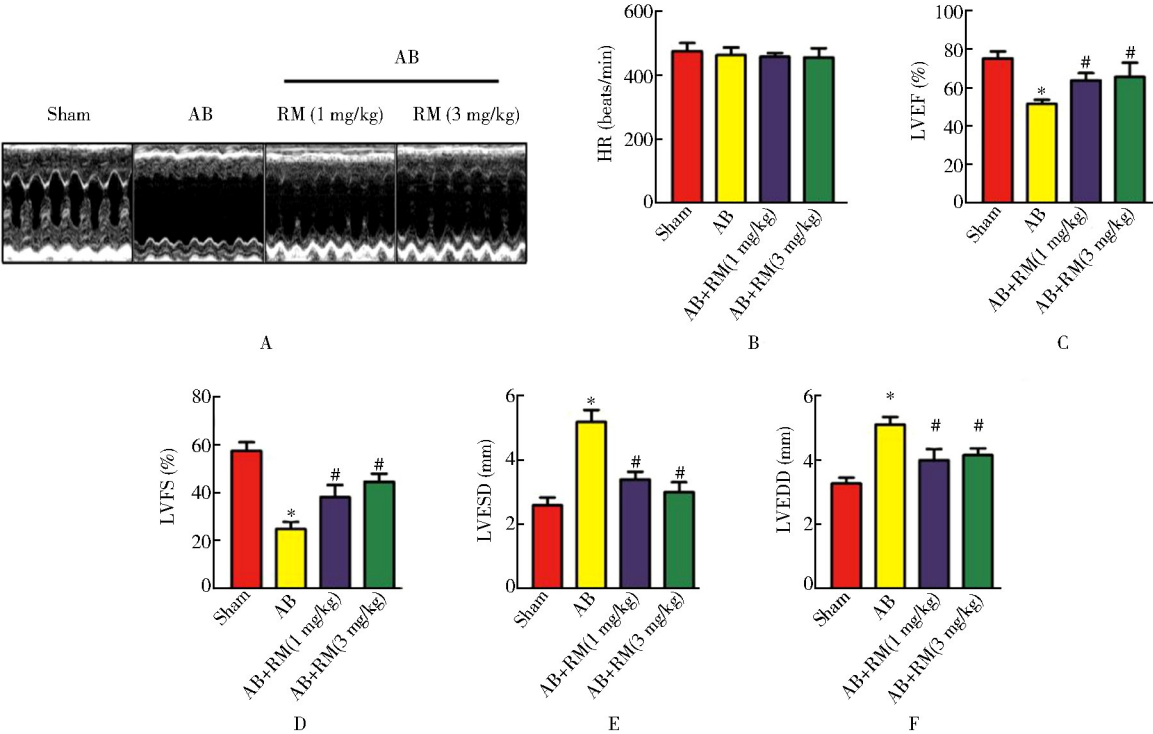


图 1 各组小鼠心功能状况

Figure 1 Heart function of mice among four groups

AB; aortic banding; RM; roflumilast; HR; heart rate; LVEF; left ventricular ejection fraction; LVFS; left ventricular fraction shortening; LVESD; left ventricular end-systolic diameter; LVEDD; left ventricular end-diastolic diameter. Compared with sham group, * $P<0.05$; compared with AB group, # $P<0.05$.

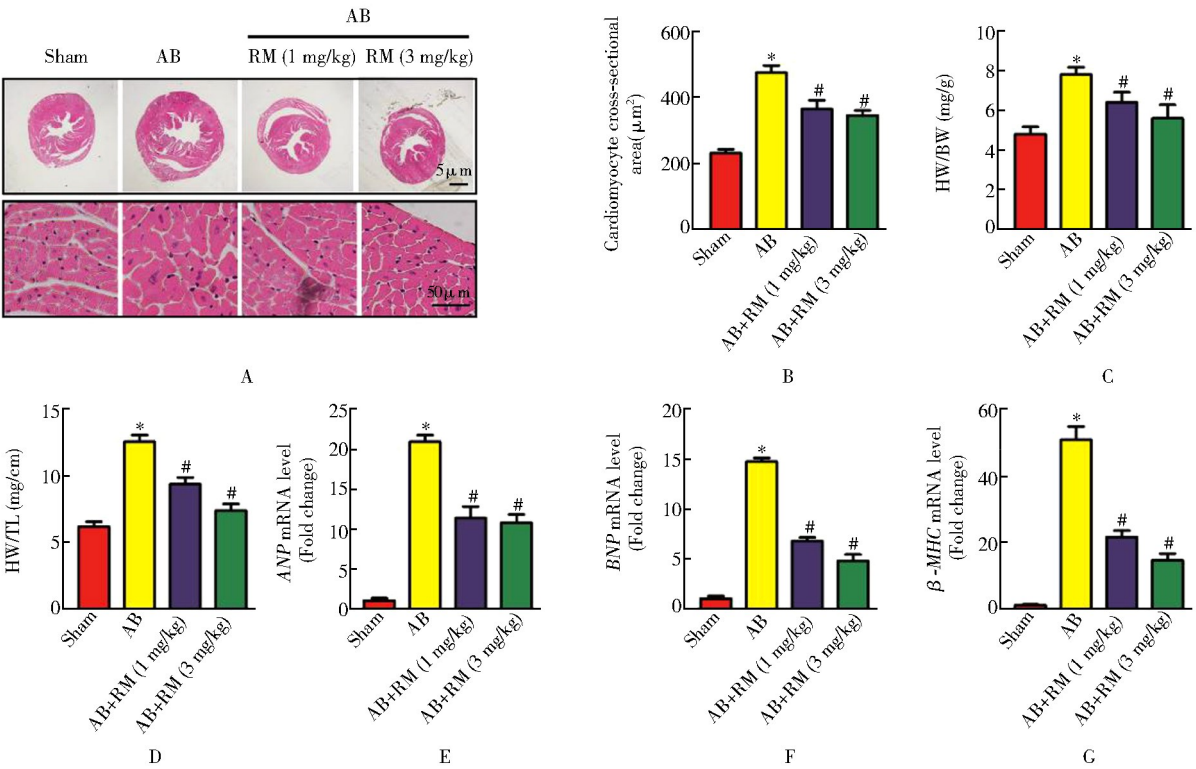


图 2 4 组小鼠心肌肥厚相关指标的比较

Figure 2 Comparison of hypertrophic markers of mice among four groups

AB; aortic banding; RM; roflumilast; HW; heart weight; BW; body weight; TL; tibia length; ANP; atriopeptin; BNP; brain natriuretic peptide. Compared with sham group, * $P < 0.05$; compared with AB group, # $P < 0.05$.

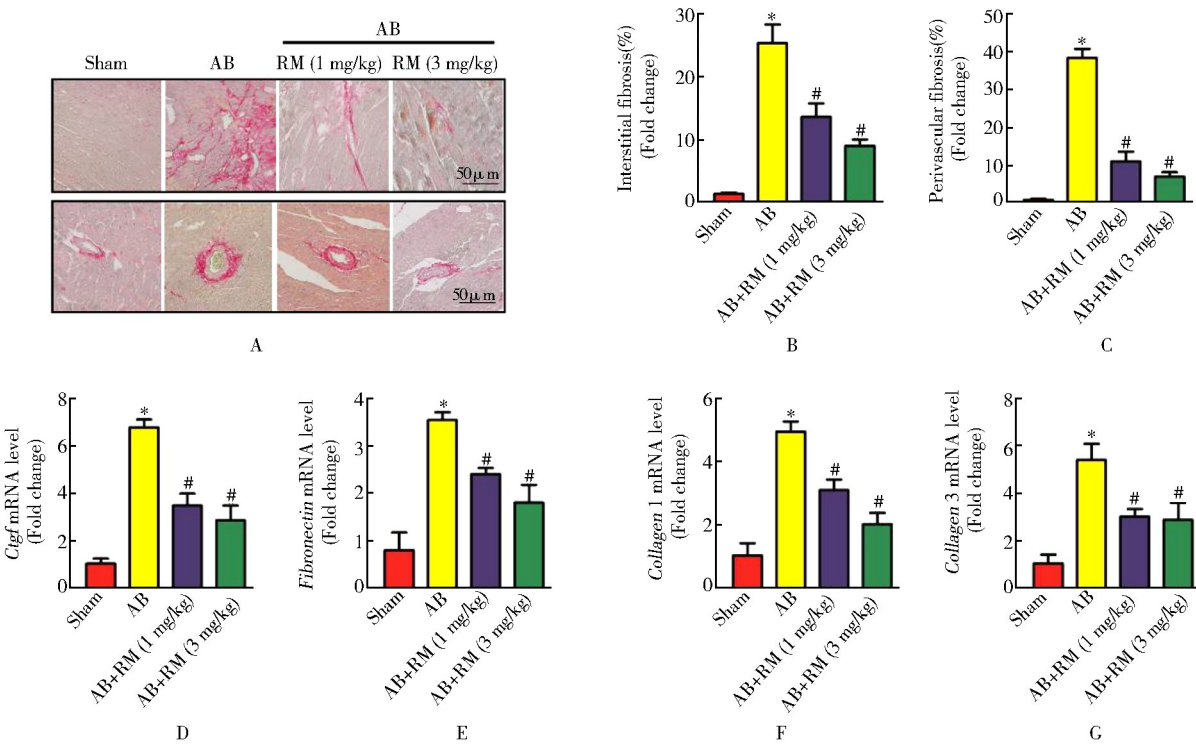


图 3 4 组小鼠心肌纤维化相关指标的比较

Figure 3 Comparison of fibrotic markers of mice among four groups

AB; aortic banding; RM; roflumilast; Ctgf; connective tissue growth factor. Compared with sham group, * $P < 0.05$; compared with AB group, # $P < 0.05$.

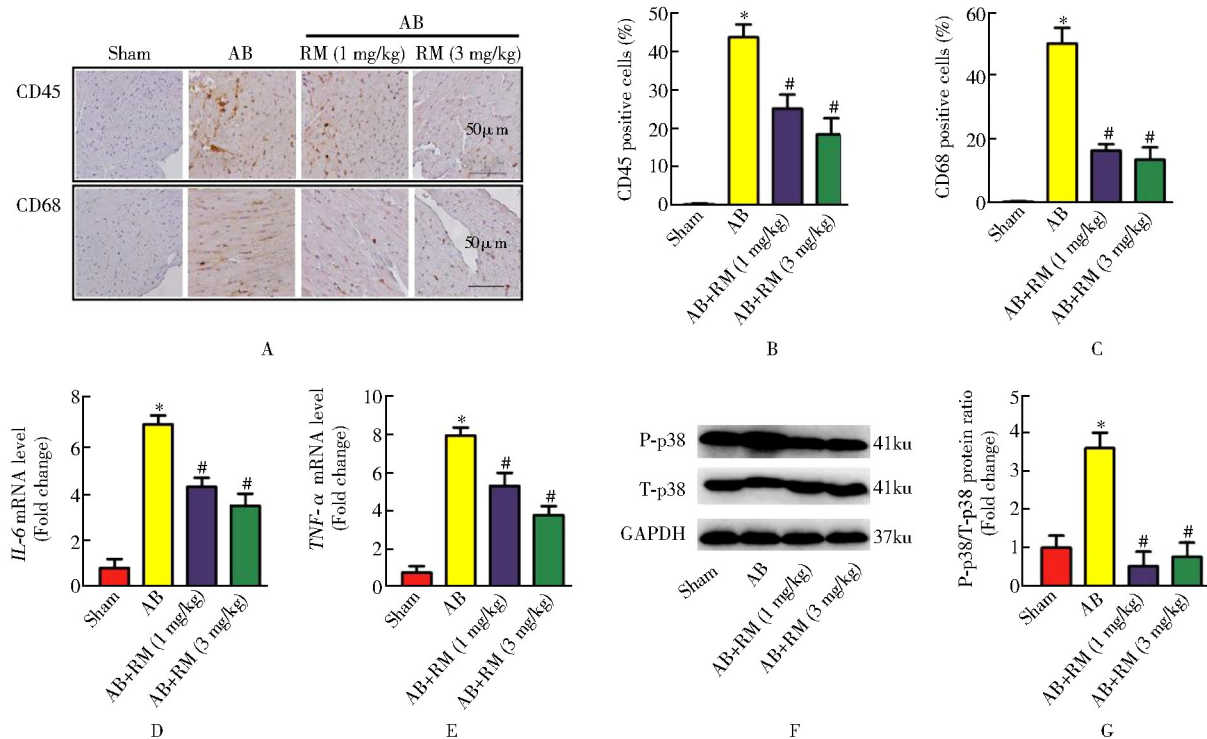


图 4 4 组小鼠炎症反应及 p38 MAPK 信号的激活状况

Figure 4 Inflammatory response and activation of p38 MAPK signaling pathway of mice among four groups

AB: aortic banding; RM: roflumilast; IL-6:interleukin-6;TNF-α:tumor necrosis factor-α; P-p38; phosphorylated-p38; T-p38: total-p38. Compared with sham group, * $P<0.05$; compared with AB group, # $P<0.05$.

3 讨论

心肌重构是心脏应对各种内源性 & 外源性损伤时的一种适应性反应。一方面,长期压力负荷刺激下,白细胞向心脏浸润,与巨噬细胞、T 淋巴细胞和心脏成纤维细胞相互作用,导致心肌组织中促炎和抗炎因子的平衡失调,同时促进心脏成纤维细胞向肌成纤维细胞转化,分泌大量细胞外基质,最终导致心肌胶原沉积和心脏纤维化^[9];另一方面,p38 MAPK 信号通路作为关键的胞内信号转导交汇点,可介导多条信号通路导致心肌细胞肥大^[10]。因此,抑制心肌组织炎症激活,阻断 p38 MAPK 信号通路对于干预心肌重构、治疗心力衰竭具有重要意义。本研究发现新型抗 COPD 药物能够显著抑制压力负荷诱导的小鼠心肌肥厚 & 纤维化,可能与 RM 对心脏炎症激活的抑制剂 p38 磷酸化激活有关。

左心室功能障碍和心力衰竭与促炎细胞因子、T 细胞、白细胞及巨噬细胞浸润密切相关。大量促炎细胞因子的累积不仅会导致心脏各类细胞死亡、阻断 β-肾上腺素信号、胚胎基因的激活、内皮细胞功能紊乱及胶原沉积,还能够通过激活下游的 p38 MAPK 信

号通路、细胞外信号调节激酶及核因子-κb 信号促进心肌肥厚。同时,炎症急性期促炎细胞因子基因表达的增加可进一步通过自分泌和旁分泌的方式引起“继发性炎症反应”^[11,12]。临床研究表明,心力衰竭患者外周血中促炎细胞因子水平与心力衰竭严重程度呈正相关^[13]。动物实验表明,心脏特异性过表达 TNF-α 能诱导小鼠发生自发性扩张型心肌病及心肌纤维化^[14]。此外,心脏特异性过表达 IL-1β 能导致小鼠发生射血分数保留的心肌肥厚^[15]。此外,抗炎细胞因子 IL-10 能够通过抑制 STAT3 依赖的核因子-κb 信号明显逆转压力负荷诱导的小鼠心肌重构^[16]。上述研究提示抑制心肌炎症激活是预防心肌重构的重要靶点。

p38 MAPK 隶属于 MAPK 家族,与多种心血管疾病(高血压、心肌梗死及心力衰竭等)的发生发展密切相关,可被缺血缺氧、紫外线、高糖、高渗、脂多糖、氧化应激及炎症等多种损伤相关刺激激活。心肌细胞在受到上述刺激后,会产生大量活性氧自由基,通过进一步激活 p38 MAPK 在内的相关促肥厚信号通路,诱导心肌细胞 c-fos 大量转录,最终导致心肌细胞体积增大^[7]。同时,p38 MAPK 信号亦可调节心脏成

纤维细胞,影响心肌纤维化。体内实验表明 p38 MAPK 特异性抑制剂 PH797804 能够明显提高缺氧或肺动脉缩窄所诱导的小鼠右心室重构,改善心功能。体外实验进一步揭示 PH797804 可抑制 TGF- β 诱导的心脏成纤维细胞胶原合成及应力纤维形成,其机制可能与 p38 MAPK 对 Smad2/3 磷酸化及心肌素蛋白核转位的调节有关^[17]。

RM 作为新型抗 COPD 的选择性 PDF4 抑制剂,在改善 COPD 患者肺功能及减少急性加重频率方面取得了良好效果。最近的研究表明,RM 还能通过抑制炎症及 p38 信号通路改善脓毒症诱导的小鼠肝损伤^[6]。此外,RM 可通过下调 iNOS,上调 cAMP 减轻溃疡性结肠炎大鼠的炎症反应^[18]。本研究发现 RM 可显著改善压力负荷诱导的小鼠心功能不全,减轻心肌肥厚及纤维化。进一步实验发现,RM 的抗心肌重构作用可能与对炎症反应及 p38 磷酸化的抑制有关。研究已证实,p38 MAPK 亦是介导心肌细胞炎症和凋亡的重要原因之一^[19],因此本研究中 RM 抑制心脏炎症是否依赖于其对 p38 MAPK 信号通路的阻断还需要进一步的实验来阐明。

综上,RM 可通过抑制心肌组织炎症细胞浸润及 p39 MAPK 信号激活改善压力负荷诱导的心肌重构,但仍需要进一步研究探讨其具体分子靶点。

【参考文献】

- [1] Wu QQ, Xiao Y, Yuan Y, *et al.* Mechanisms contributing to cardiac remodeling[J]. Clin Sci (Lond), 2017, 131(18):2319-2345. DOI: 10.1042/CS20171167.
- [2] Rosca MG, Tandler B, Hoppel CL. Mitochondria in cardiac hypertrophy and heart failure[J]. J Mol Cell Cardiol, 2013, 55: 31-41. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2012.09.002.
- [3] Gregory BL. Heart failure: macrophages promote cardiac fibrosis and diastolic dysfunction[J]. Nat Rev Cardiol, 15(4):196-197. DOI: 10.1038/nrcardio.2018.19.
- [4] Kawamatawong T. Roles of roflumilast, a selective phosphodiesterase 4 inhibitor, in airway diseases[J]. J Thorac Dis, 2017, 9(4): 1144-1154. DOI: 10.21037/jtd.2017.03.116.
- [5] Yan K, Gao L, Cui Y, *et al.* The cyclic AMP signaling pathway: exploring targets for successful drug discovery[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(5):3715-3723. DOI: 10.3892/mmr.2016.5005.
- [6] Feng H, Chen J, Wang H, *et al.* Roflumilast reverses polymicrobial sepsis-induced liver damage by inhibiting inflammation in mice[J]. Lab Invest, 2017, 97(9):1008-1019. DOI: 10.1038/labinvest.2017.59.
- [7] Liang QR, Molkentin JD. Redefining the roles of p38 and JNK signaling in cardiac hypertrophy: dichotomy between cultured myocytes and animal models[J]. J Mol Cell Cardiol, 2003, 35(12):1385-1394. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2003.10.001.
- [8] Denise HK, Ulf L, Helmut D. Molecular mechanisms in heart failure: focus on cardiac hypertrophy, inflammation, angiogenesis, and apoptosis[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 48(6):A56-A66. DOI:10.1016/j.jacc.2006.07.007.
- [9] Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy[J]. Circ Res, 2002, 91(12):1103-1113. DOI: 10.1161/01.RES.0000046452.67724.B8.
- [10] Bageghni S, Hemmings K, Zava N, *et al.* Cardiac fibroblast-specific p38 α MAP kinase promotes cardiac hypertrophy via a putative paracrine interleukin-6 signaling mechanism[J]. FASEB J, 2018, 32(9):4941-4954. DOI: 10.1096/fj.201701455RR.
- [11] Qi GM, Jia LX, Li YL, *et al.* Adiponectin suppresses angiotensin II-induced inflammation and cardiac fibrosis through activation of macrophage autophagy[J]. Endocrinology, 2014, 155(6):2254-2265.
- [12] Zhao CH, Ma X, Guo HY, *et al.* RIP2 deficiency attenuates cardiac hypertrophy, inflammation and fibrosis in pressure overload induced mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 493(2):1151-1158. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.07.035.
- [13] Haugen E, Chen J, Wikstr MJ, *et al.* Parallel gene expressions of IL-6 and BNP during cardiac hypertrophy complicated with diastolic dysfunction in spontaneously hypertensive rats[J]. Int J Cardiol, 2007, 115(1):20-28. DOI: 10.1016/j.ijcard.2006.01.031.
- [14] Sun M, Chen M, Dawood F, *et al.* Tumor necrosis factor- α mediates cardiac remodeling and ventricular dysfunction after pressure overload state[J]. Circulation, 2007, 115(11):1398-1407. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.643585.
- [15] Honsho S, Nishikawa S, Amano K, *et al.* Pressure-mediated hypertrophy and mechanical stretch induces IL-1 release and subsequent IGF-1 generation to maintain compensative hypertrophy by affecting Akt and JNK pathways[J]. Circ Res, 2009, 105(11):1149-1158. DOI: 10.1161/circresaha.109.208199.
- [16] Verma SK, Garikipati VNS, Krishnamurthy P, *et al.* Interleukin-10 inhibits bone marrow fibroblast progenitor cell-mediated cardiac fibrosis in pressure-overloaded myocardium[J]. Circulation, 2017, 136(10):940-953.
- [17] Honsho S, Nishikawa S, Amano K, *et al.* Pressure-mediated hypertrophy and mechanical stretch induces IL-1 release and subsequent IGF-1 generation to maintain compensative hypertrophy by affecting Akt and JNK pathways[J]. Circ Res, 105(11):1149-1158. DOI: 10.1161/circresaha.109.208199.
- [18] Elashmawy NE, Khedr NF, Elbahrawy HA, *et al.* Roflumilast, type 4 phosphodiesterase inhibitor, attenuates inflammation in rats with ulcerative colitis via down-regulation of iNOS and elevation of cAMP[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 56:36-42. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.01.004.
- [19] Zuo G, Ren X, Qian X, *et al.* Inhibition of JNK and p38 MAPK-mediated inflammation and apoptosis by ivabradine improves cardiac function in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy[J]. J Cell Physiol, 2018, 234(2):1925-1936. DOI: 10.1002/jcp.27070.