·基础研究·

沙库巴曲缬沙坦对缺氧心肌细胞线粒体动力系统和细胞凋亡的影响

沈建[1,2],张昕[1],焦阳[1],宿永康[1],李影[1],周伯宁[1],沈明志[3],付振虹[1*]
([1]解放军医学院,北京 100853; [2]通州离职干部休养所门诊部,北京 101149; [3]中国人民解放军总医院海南医院心血管内科,海南 三亚 572013)

【摘 要】 目的 验证沙库巴曲缬沙坦(S/V)能否通过调节线粒体动力系统改善缺氧大鼠胚胎心肌细胞(H9c2)凋亡水平,发挥心脏保护作用。**方法** 培养H9c2心肌细胞,建立糖氧剥夺模型(OGD),将细胞分为对照组、造模组、药物组。对照组正常培养心肌细胞,造模组采用OGD建模,药物组采用OGD建模后加用S/V 20 μmol/L干预处理,每组重复5遍。采用流式细胞术检测细胞凋亡及活性氧(ROS),JC-1检测线粒体膜电位,蛋白质免疫印迹法(WB)检测线粒体融合蛋白1(Mfn1)、线粒体融合蛋白2(Mfn2)、动力相关蛋白1(Drp1)、线粒体分裂蛋白1(Fis1)、细胞色素C(CytC)、B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bcl-2关联X蛋白(Bax)及含半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶3(Caspase-3)表达情况。采用GraphPad Prism 8统计软件进行数据分析,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验。**结果** H9c2心肌细胞建立OGD模型,经S/V处理后,光镜下心肌细胞形态学明显改善;流式细胞技术分析结果显示S/V明显降低细胞内ROS水平,抑制心肌细胞凋亡($P<0.05$);荧光显微镜分析结果显示S/V明显改善线粒体膜电位水平($P<0.05$);WB结果显示S/V可明显提升Mfn2、Mfn1、Bcl2蛋白表达水平,降低Drp1、Fis1、CytC、Bax及Caspase-3蛋白表达水平($P<0.05$)。**结论** S/V可能通过促进线粒体融合、抑制线粒体分裂调节线粒体稳态,减少ROS生成,减轻心肌细胞凋亡。

【关键词】 心肌细胞;糖氧剥夺模型;沙库巴曲缬沙坦;线粒体损伤
【中图分类号】 R541.4 **【文献标志码】** A **【DOI】** 10.11915/j.issn.1671-5403.2024.03.046

Effects of sacubitril valsartan on mitochondrial dynamics and cell apoptosis in hypoxic cardiomyocytes

Shen Jian[1,2], Zhang Xin[1], Jiao Yang[1], Su Yongkang[1], Li Ying[1], Zhou Boning[1], Shen Mingzhi[3], Fu Zhenhong[1*]
([1]Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China; [2]Outpatient Department, Tongzhou Retired Cadres Sanatorium, Beijing 101149, China; [3]Department of Cardiology, Hainan Hospital of Chinese PLA General Hospital, Sanya 572013, Hainan Province, China)

【Abstract】 Objective To verify whether sacubitril valsartan(S/V) can ameliorate the apoptosis level of hypoxic H9c2 cardiomyocytes by regulating mitochondrial dynamic system, and exert cardioprotective effects. **Methods** H9c2 cardiomyocytes were cultured and established a glucose oxygen deprivation model (OGD). The cells were divided into three groups: control group(CON), model group(OGD), S/V group(S/V). Apoptosis and reactive oxygen species (ROS) were detected by flow cytometry, mitochondrial membrane potential was detected by JC-1, and mitochondrial fusion protein 1(Mfn1), mitochondrial fusion protein 2 (Mfn2), dynamin related protein 1 (Drp1), mitochondrial fission protein 1(FIS1), cytochrome c (CytC), B-cell lymphoma 2(Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax) and cysteinyl aspartate specific proteinase (Caspase-3) expression were detected by Western blotting (WB). GraphPad Prism 8 statistics was used for data analysis, multiple groups comparisons were conducted using one-way analysis of variance, and LSD-*t* test was performed for pairwise multiple comparisons. **Results** H9c2 cardiomyocytes were used to establish OGD cell model, and the morphology of cardiomyocytes was signifcantly improved by S/V treatment under light microscope. Flow cytometry analysis showed that S/V significantly reduced the level of intracellular ROS and inhibited cardiomyocyte apoptosis ($P<0.05$). Fluorescence microscope analysis showed that S/V significantly improved the level of mitochondrial membrane potential($P<0.05$); WB showed S/V significantly increase the protein expression levels of Mfn2, mfn1 and Bcl-2, and reduce the protein expression levels of Drp1, FIS1, CytcC, Bax and Caspase-3 ($P<0.05$). **Conclusion** S/V may regulate mitochondrial homeostasis, reduce ROS production and cardiomyocyte apoptosis by promoting mitochondrial fusion and inhibiting mitochondrial division.

收稿日期: 2023-09-22; **接受日期**: 2023-10-31
基金项目: 海南省重点研发项目(ZDYF2023SHFZ145)
通信作者: 付振虹, E-mail: fuzhenh@126.com

【Key words】 cardiomyocytes; oxygen glucose deprivation model; Sacubitril valsartan; mitochondrial damage
This work was supported by Hainan Provincial Key Research and Development Project (ZDYF2023SHFZ145).
Corresponding author: *Fu Zhenhong*, *E-mail*: *fuzhenh@126.com*

《中国心血管疾病与健康报告 2022》显示我国冠心病患者 1 139 万[1]。急性心肌梗死预后不佳，早期介入及溶栓等再灌注治疗可明显提升生存率，但心肌梗死后远期心血管事件高发[2]。急性心肌梗死后心肌细胞严重缺血、缺氧，能量代谢障碍，线粒体质量控制系统破坏，加重心肌损伤[3,4]。沙库巴曲缬沙坦（sacubitril/valsartan，S/V）是首个血管紧张素受体脑啡肽酶抑制剂，研究显示其在细胞及动物水平可能通过抑制炎症反应，减轻线粒体损伤，抑制纤维化等途径发挥心脏保护作用[5,6]，但其对心肌细胞直接保护作用和早期应用后对线粒体动力学系统调控作用未有报道。本研究通过构建 H9c2 心肌细胞糖氧剥夺模型，探究 S/V 调节线粒体动力系统减少心肌细胞损伤的潜在机制，旨在为急性心肌梗死早期药物保护策略提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

S/V 购自 MCE 公司；活性氧（reactive oxygen species，ROS）检测试剂盒购自碧云天公司；Annexin V/PI 双染细胞凋亡试剂盒，线粒体膜电位检测试剂盒购自贝博公司；B 细胞淋巴瘤-2 蛋白（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）抗体、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3（cysteinyl aspartate specific proteinase，Caspase-3）抗体、Bcl-2 关联 X 蛋白（Bcl2-associated X，Bax）抗体、线粒体融合蛋白 1（mitofusin 1，Mfn1）抗体、线粒体融合蛋白 2（mitofusin 2，Mfn2）抗体、动力相关蛋白 1（dynamin-related protein 1，Drp1）抗体、线粒体分裂蛋白 1（fission 1，Fis1）抗体、细胞色素 C（cytochrome C，CytC）抗体和二抗购自武汉三鹰技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 H9c2 心肌细胞培养、糖氧剥夺模型建立及实验分组 完全培养基由杜尔贝科改良培养基加入 10%胎牛血清、100 U/ml 链霉素和青霉素配制。H9c2 心肌细胞在恒温培养箱（37℃，5%CO_2）完全培养基培养。糖氧剥夺模型由 H9c2 心肌细胞培养至细胞融合度达到 80%～90%，将完全培养基替换为等体积磷酸盐缓冲液（phosphate buffer solution，PBS），缺氧孵箱（94%N_2，5%CO_2，1%O_2）孵育 4 h。根据实验目的分对照组、造模组、药物组。对照组正常培养心肌细胞，造模组采用糖氧剥夺模型（glucose oxygen deprivation，OGD）建模，药物组采用 OGD 建模后加用 S/V20 mol/L 干预处理，每组重复 5 遍。

1.2.2 细胞凋亡检测 采用 AnnexinV/PI 双染法通过流式细胞技术进行心肌细胞凋亡检测。心肌细胞培养后建模。胰酶消化后离心，弃上清，预冷 PBS 洗涤 2 次，加入 400 μl Annexin V-FITC 染色液避光孵育 15 min，加入 5 μl PI 染色液避光孵育 5 min，流式细胞仪检测。

1.2.3 ROS 检测 通过流式细胞技术进行 ROS 检测，平均荧光强度反应心肌细胞 ROS 水平。采用 ROS 检测试剂盒检测细胞内 ROS 含量。心肌细胞培养后建模。去除培养液，加入 1 ml 2′，7′-二氯二氢荧光素二乙酸酯（2，7-dichlorodihydrofluorescein diacetate，DCFH-DA）稀释液孵育 20 min。洗涤细胞 3 次，去除未进入细胞内 DCFH-DA。使用流式细胞仪进行检测。

1.2.4 线粒体膜电位检测 通过荧光显微镜检测各组红色荧光强度与绿色荧光强度比值反应心肌细胞线粒体膜电位水平。心肌细胞培养后建模。PBS 洗涤 1 次，每孔加入 400 μl JC-1 检测工作液孵育 20 min。PBS 洗涤 3 次进行荧光检测。

1.2.5 蛋白质免疫印迹 通过蛋白质免疫印迹（Western blotting，WB）测定心肌细胞线粒体相关蛋白表达水平。提取细胞蛋白，采用 BCA 法测量蛋白浓度，凝胶电泳后转膜，5%牛奶封闭 2 h，4℃孵育一抗过夜，室温与抗兔二抗孵育 2 h。采用超敏化学发光试剂盒曝光分析。采用 Image J 软件分析蛋白相对表达量。一抗稀释比分别为 Mfn2（1∶1 000）、Mfn1（1∶1000）、Drp1（1∶1000）、Fis1（1∶1000）、CytC（1∶1000）、Bcl-2（1∶1000）、Bax（1∶1000）、Caspase3（1∶1000）、β-actin（1∶1000）。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8 统计软件进行数据分析。所有数据至少独立重复 3 次。符合正态分布计量资料用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析检验，两两比较采用 LSD-t 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 糖氧剥夺模型建立及细胞形态学影响

缺氧孵箱孵育 4 h 建模。光镜下观察对照组心肌细胞形态良好，细胞质饱满，细胞膜无皱缩，无凋

亡小体形成;造模组心肌细胞形状不规则,细胞核皱缩明显,可见大量坏死及凋亡小体;药物组心肌细胞形态及活细胞数量较造模组有所增加,凋亡小体较造模组明显减少(图 1A)。

2.2 S/V 处理对心肌细胞线粒体影响

与对照组(12.37±0.14)相比,造模组红色荧光强度/绿色荧光强度比值(0.89±0.01)明显降低,提示膜电位明显降低(P<0.05);与造模组相比,药物组红色荧光强度/绿色荧光强度比值(3.43±0.01)明显升高,提示膜电位较造模组显著升高(P<0.05;图 2,图 3A)。与对照组相比,造模组线粒体融合相关蛋白 Mfn2、Mfn1 表达明显降低,线粒体分裂相关蛋白 Drp1、Fis1 表达明显升高,细胞质 CytC 表达明显升高(P<0.05);与造模组相比,药物组线粒体融合相关蛋白 Mfn2、Mfn1 表达明显升高,线粒体分裂相关蛋白 Drp1、Fis1 表达明显下降,细胞质 CytC 表达明显下降(P<0.05;图 4)。

2.3 S/V 处理对心肌细胞 ROS 影响

与对照组(5 506.0±128.1)相比,造模组平均荧光强度(12 659.0±144.6)提示细胞内 ROS 水平显著升高(P<0.05);与造模组相比,药物组平均荧光强度(6 400.0±284.0)提示细胞内 ROS 水平显著降低(P<0.05;图 1B,图 3B)。

2.4 S/V 处理对心肌细胞凋亡影响

与对照组[(5.79±0.20)%]相比,造模组心肌细胞凋亡率[(44.80±0.80)%]显著增加(P<0.05);与造模组相比,药物组心肌细胞凋亡率[(24.53±0.49)%]明显降低(P<0.05;图 1C,图 3C)。与对照组相比,造模组凋亡药物相关蛋白 Bcl2 表达明显降低,Bax 及 Caspase3 表达明显升高(P<0.05);与造模组相比,药物组处理组后,Bcl2 表达明显升高,Bax 及 Caspase3 表达明显下降(P<0.05;图 3D~G)。

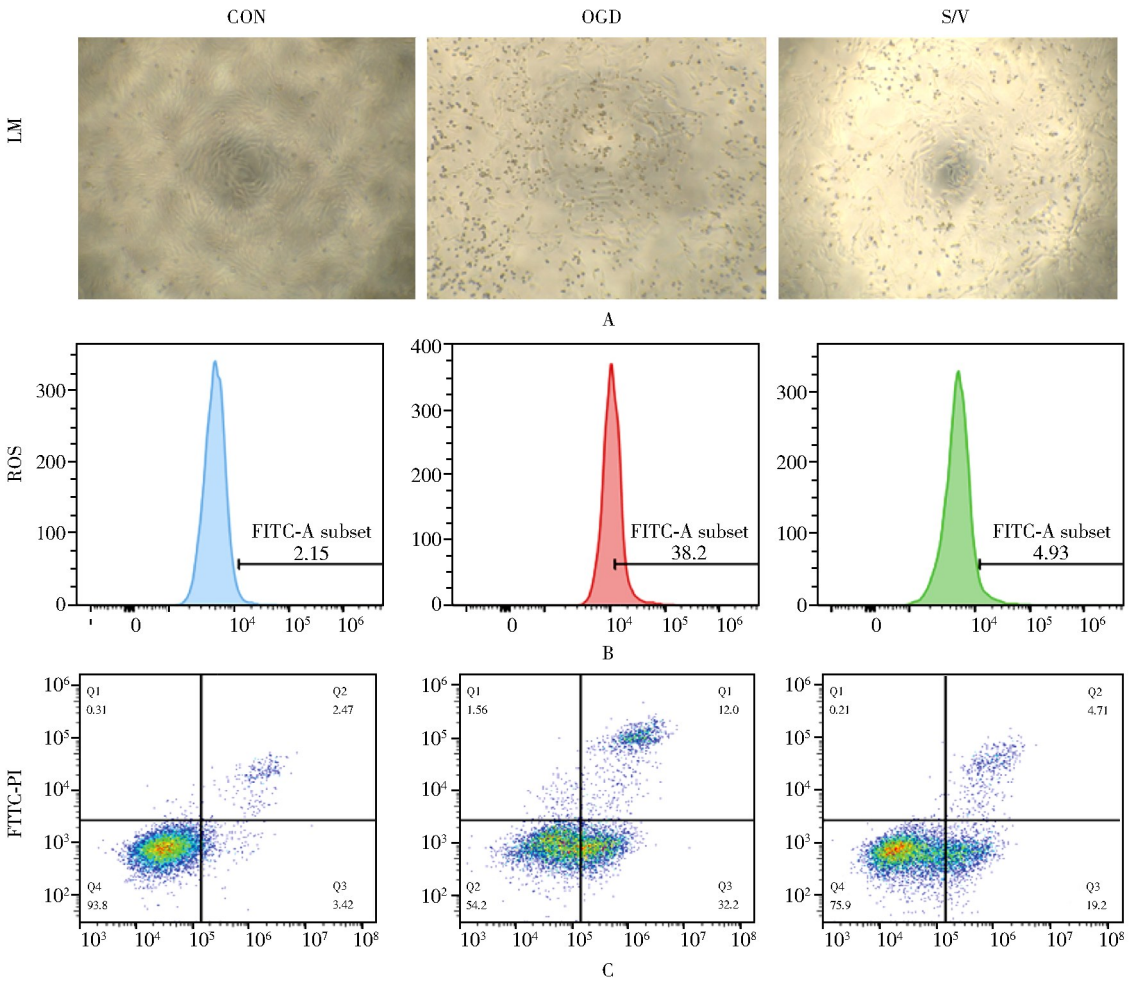


图 1 心肌细胞形态学,活性氧及细胞凋亡变化

Figure 1 Changes of cardiomyocytes morphology, ROS and apoptosis

A: morphology under light microscope; B: ROS by flow cytometry; C: FITC-PI by flow cytometry. LM: light microscope; ROS: reactive oxygen species; CON: control group; OGD: oxygen glucose deprivation group; S/V: sacubitril valsartan group.

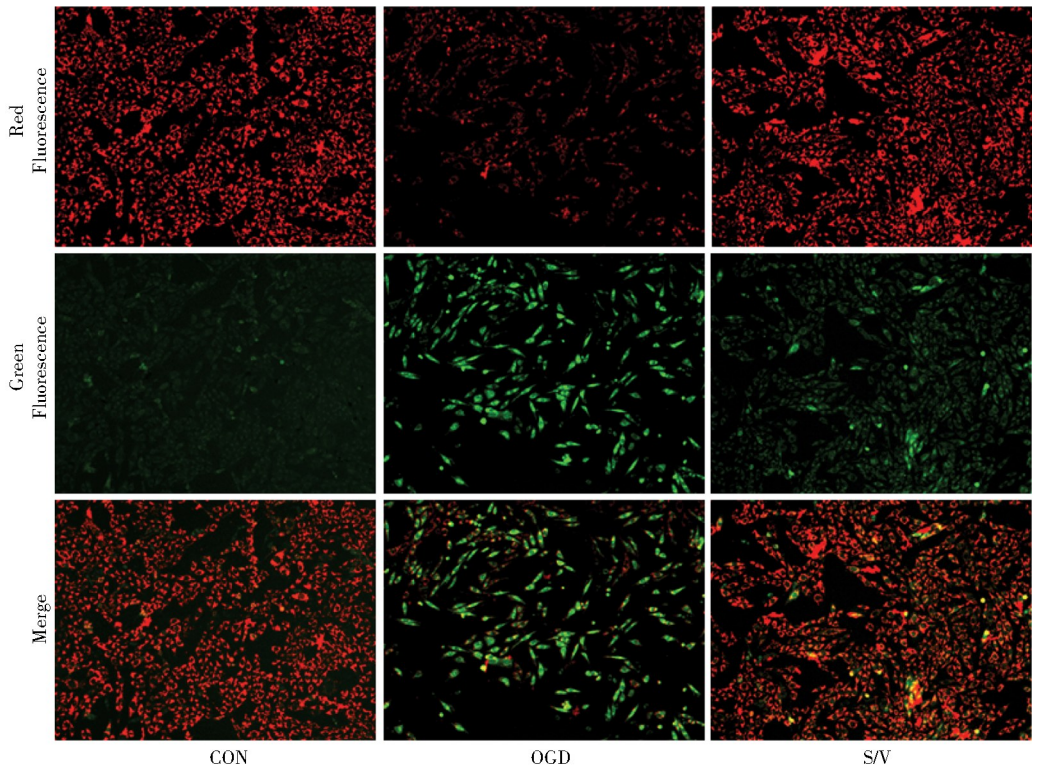


图 2 心肌细胞线粒体膜电位变化

Figure 2 Changes of mitochondrial membrane potential in cardiomyocytes

CON: control group; OGD: oxygen glucose deprivation group; S/V: sacubitril valsartan group.

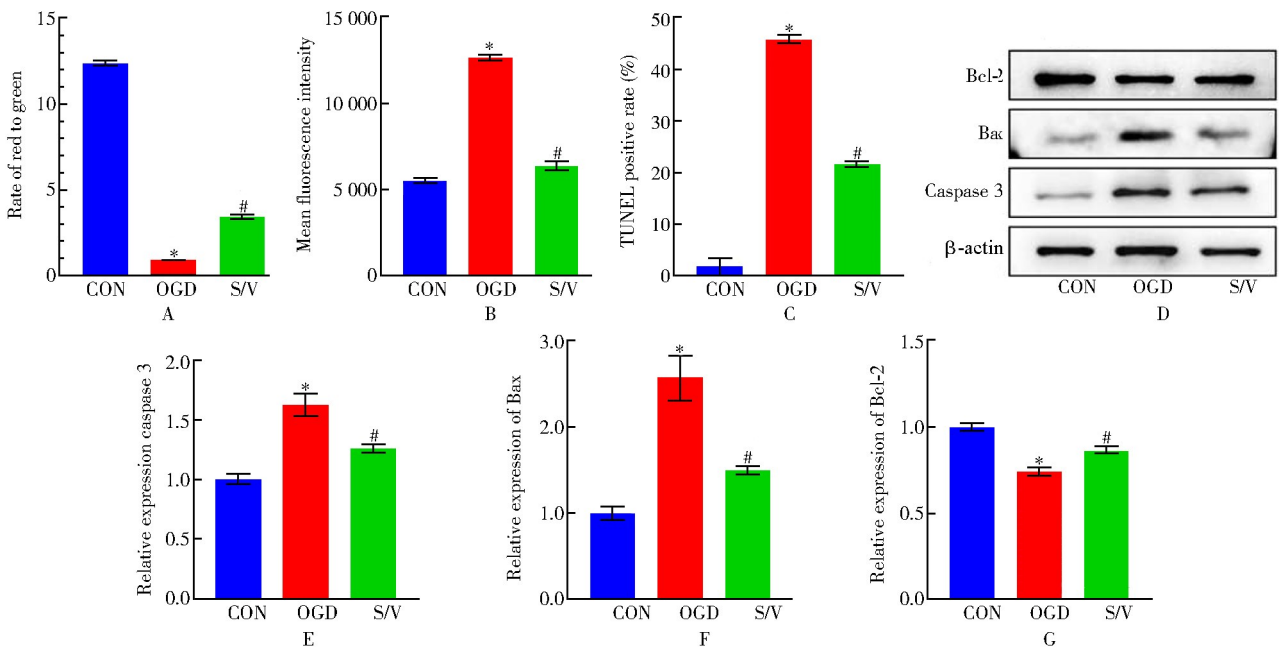


图 3 心肌细胞线粒体膜电位、ROS、细胞凋亡及凋亡蛋白表达量变化

Figure 3 Changes of mitochondrial membrane potential, ROS, apoptosis protein expression in cardiomyocytes

A: quantitative analysis of mitochondrial membrane potential; B: quantitative analysis of ROS levels; C: quantitative analysis of TUNEL positive rate; D: expression of Bcl-2, Bax, Caspase3 deceted by Western blotting; E, F, G: quantitative analysis of Bcl-2, Bax, Caspase3 expression. ROS: reactive oxygen species; CON: control group; OGD: oxygen glucose deprivation group; S/V: sacubitril valsartan group. Compared with control group, $^{*}P<0.05$; compared with OGD group, $^{\#}P<0.05$.

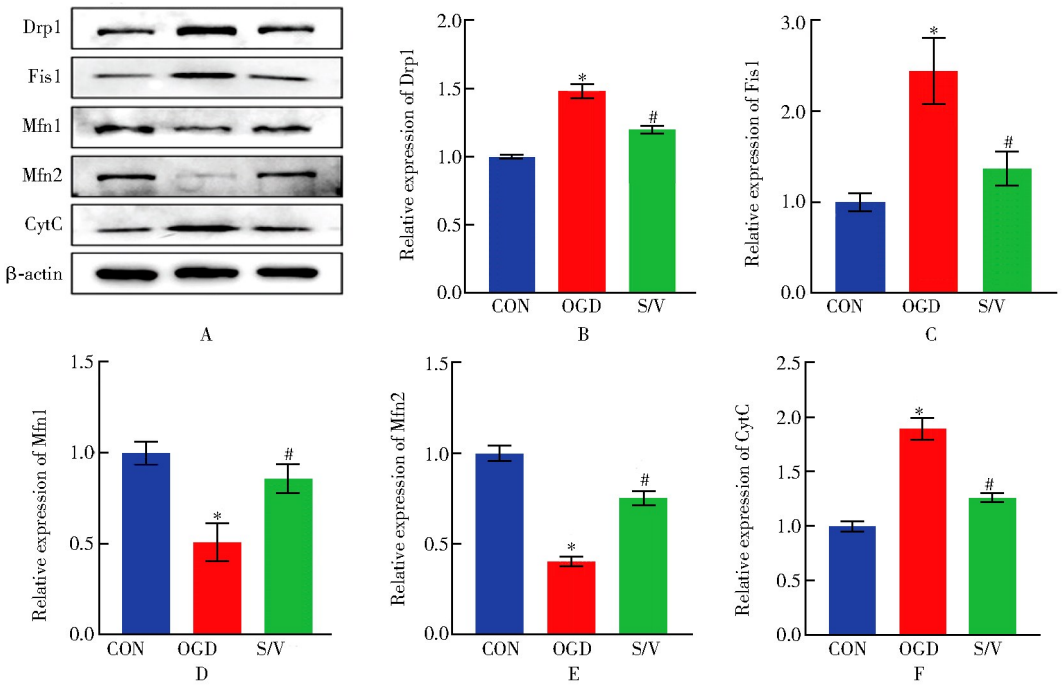


图4 心肌细胞线粒体相关蛋白表达量变化

Figure 4 Relative expression of mitochondrial related proteins in cardiomyocytes

A: expression of Drp1, Fis1, Mfn1, Mfn2, CytC deceted by Western blotting; B, C, D, E, F: quantitative analysis of Drp1, Fis1, Mfn1, Mfn2, CytC expression. CON: control group; OGD: oxygen glucose deprivation group; S/V: sacubitril valsartan group. Compared with control group, $^{*}P<0.05$; compared with OGD group, $^{\#}P<0.05$.

3 讨 论

急性心肌梗死是冠心病中致残和致死率最高的疾病,尽管急诊开通梗死相关血管可极大提高患者存活率,但资料显示2002-2020年AMI死亡率总体仍呈上升态势。AMI后坏死心肌无法再生,主要不良心血管事件发生率高[1,7]。本研究以大鼠H9c2心肌细胞为研究对象,首次证实S/V可以通过调节线粒体动力学系统,维持线粒体稳态及能量代谢,降低ROS,抑制心肌细胞凋亡,发挥直接的缺氧心肌细胞保护作用。

S/V是首个临床应用的血管紧张素受体脑啡肽酶抑制剂类药物。临床研究显示,在射血分数减少慢性心力衰竭患者中,S/V较依那普利显著降低心血管死亡和心力衰竭住院风险[8,9];在射血分数保留慢性心力衰竭患者中,与缬沙坦相比,S/V可进一步降低主要复合终点事件风险,降低氨基末端脑利钠肽前体水平,减小左心房容积,改善纽约心功能分级,存在临床获益[10];在急性心力衰竭患者中,S/V相比依那普利,严重复合终点事件发生风险降低46%,早期服用沙库巴曲缬沙坦治疗较血管紧张素转换酶抑制剂类制剂可能受益更大[11];在急性心肌梗死患者中,与雷米普利相比,S/V治疗组的主要终点事件发生率降低10%,总体事件发生率减低,具有良好的安全性和耐受性[12]。

在基础研究中,细胞和动物水平提示,S/V可以通过抑制炎症反应、减少胶原纤维沉积进而改善心肌纤维化,减少心肌梗死或缺血再灌注损伤对心脏损害[13,14],提示S/V对急性心肌梗死微环境具有潜在保护作用。线粒体在提供能量代谢、减少氧化应激、改善凋亡等方面发挥重要作用,心肌梗死状态下预防线粒体功能障碍是心脏保护的重要治疗策略[3,4]。Yeh等[14]提示S/V可能通过调节氧化应激和线粒体功能完整性保护大鼠心肌细胞和心功能状态,Xia等[15]提示S/V通过减轻Drp1介导线粒体功能障碍改善扩张型心肌病小鼠心功能。然而,S/V对心肌梗死后心肌细胞的直接作用研究未见报道。本研究聚焦于S/V对心肌细胞线粒体动力系统调节,探讨其对心肌细胞凋亡影响。通过构建糖氧剥夺心肌细胞模型模拟心肌梗死微环境状态,探究S/V对心肌细胞线粒体动力学的影响及可能机制,结果提示S/V可能通过抑制线粒体分裂蛋白Drp1、Fis1表达提升线粒体融合Mfn1、Mfn2表达水平,改善线粒体动力学平衡,提升线粒体膜电位

水平,抑制 ROS 产生,进而减少线粒体内 CytC 释放,抑制心肌细胞凋亡通路激活。这一研究结果提示维持线粒体动力系统稳定,抑制线粒体过度分裂,促进线粒体融合可能抑制缺血缺氧环境下心肌细胞凋亡。

综上,本研究结果显示,S/V 可在细胞水平通过调节线粒体动力学状态,达到改善心肌凋亡的作用,但对其具体分子机制缺乏深入研究,且未进行动物水平的实验验证,后续我们将对其进行进一步实验研究和补充。

【参考文献】

[1] 马丽媛, 王增武, 樊静, 等.《中国心血管健康与疾病报告 2022》要点解读[J]. 中国全科医学, 2023, 26(32): 3975-3994. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0408.

[2] Piróth Z, Boxma-de Klerk BM, Omerovic E, *et al*. The natural history of nonculprit lesions in STEMI: an FFR substudy of the compare-acute trial[J]. JACC Cardiovasc Interv, 2020, 13(8): 954-961. DOI: 10.1016/j.jcin.2020.02.015.

[3] Ramachandra CJA, Hernandez-Resendiz S, Crespo-Avilan GE, *et al*. Mitochondria in acute myocardial infarction and cardioprotection[J]. EBioMedicine, 2020, 57: 102884. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102884.

[4] Wang J, Toan S, Zhou H. New insights into the role of mitochondria in cardiac microvascular ischemia/reperfusion injury[J]. Angiogenesis, 2020, 23(3): 299-314. DOI: 10.1007/s10456-020-09720-2.

[5] Kompa AR, Lu J, Weller TJ, *et al*. Angiotensin receptor neprilysin inhibition provides superior cardioprotection compared to angiotensin converting enzyme inhibition after experimental myocardial infarction[J]. Int J Cardiol, 2018, 258: 192-198. DOI: 10.1016/j.ijcard.2018.01.077.

[6] Xia Y, Chen Z, 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. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2017.06.003.

[7] Dagenais GR, Leong DP, Rangarajan S, *et al*. Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study[J]. Lancet, 2020, 395(10226): 785-794. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)32007-0.

[8] Docherty KF, Vaduganathan M, Solomon SD, *et al*. Sacubitril/valsartan: neprilysin inhibition 5 years after PARADIGM-HF[J]. JACC Heart Fail, 2020, 8(10): 800-810. DOI: 10.1016/j.jchf.2020.06.020.

[9] Rahhal A, Kasem M, Orabi B, *et al*. Effectiveness of sacubitril/valsartan in heart failure with reduced ejection fraction using real-world data: an updated systematic review and meta-analysis[J]. Curr Probl Cardiol, 2023, 48(1): 101412. DOI: 10.1016/j.cpcardiol.2022.101412.

[10] Biering-Sørensen T, Lassen MCH, Shah A, *et al*. The effect of sacubitril/valsartan on left ventricular myocardial deformation in heart failure with preserved ejection fraction (PARAMOUNT trial)[J]. J Card Fail, 2023, 29(6): 968-973. DOI: 10.1016/j.cardfail.2023.03.019.

[11] Berg DD, Braunwald E, DeVore AD, *et al*. Efficacy and safety of sacubitril/valsartan by dose level achieved in the PIONEER-HF trial[J]. JACC Heart Fail, 2020, 8(10): 834-843. DOI: 10.1016/j.jchf.2020.06.008.

[12] Pfeffer MA, Claggett B, Lewis EF, *et al*. Angiotensin receptor-neprilysin inhibition in acute myocardial infarction[J]. N Engl J Med, 2021, 385(20): 1845-1855. DOI: 10.1056/NEJMoa2104508.

[13] Imran M, Hassan MQ, Akhtar MS, *et al*. Sacubitril and valsartan protect from experimental myocardial infarction by ameliorating oxidative damage in Wistar rats[J]. Clin Exp Hypertens, 2019, 41(1): 62-69. DOI: 10.1080/10641963.2018.1441862.

[14] Yeh JN, Yue Y, Chu YC, *et al*. Entresto protected the cardiomyocytes and preserved heart function in cardiorenal syndrome rat fed with high-protein diet through regulating the oxidative stress and Mfn2-mediated mitochondrial functional integrity[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 144: 112244. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112244.

[15] Xia Y, Chen Z, 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. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2017.06.003.

(编辑: 温玲玲)