

# 基于 Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B 信号通路研究地龙提取物对病理性心肌肥厚大鼠的保护作用

张侍玉<sup>1</sup>, 梁天鸣<sup>2</sup>, 方柳<sup>1</sup>,  
姚倩<sup>3</sup>, 朱家峰<sup>1</sup>, 李倩<sup>1</sup>, 张兰娥<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>潍坊医学院护理学院; <sup>2</sup>潍坊医学院生命科学与技术学院; <sup>3</sup>潍坊医学院临床医学院, 潍坊 261053

**摘要:** 基于 Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B 信号通路, 探讨地龙提取物对病理性心肌肥厚的保护作用及机制。30 只 Wistar 大鼠随机分为假手术组、模型组、地龙低剂量组 (400 mg/kg)、地龙高剂量组 (800 mg/kg) 和卡托普利对照组 (50 mg/kg), 每组 6 只; 采用腹主动脉缩窄术建立病理性心肌肥厚模型, 假手术组除不结扎外, 与模型组相同。地龙各剂量组大鼠按照体重腹腔注射给药, 假手术组和模型组给予等体积生理盐水, 每天 1 次, 连续 3 周。小动物超声观察大鼠心脏射血分数 (ejection fraction, EF) 和短轴缩短率 (short axis shortening rate, FS) 的变化; ELISA 测定大鼠血清 TNF- $\alpha$  含量; HE 染色观察心肌组织病理变化; qRT-PCR 检测心肌肥大基因 (ANP、BNP 和  $\beta$ -MHC) 及促炎因子 (TNF- $\alpha$ 、IL-6) 的表达水平; 免疫印迹法测定 Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B 通路蛋白的表达水平。结果表明, 与模型组相比, 地龙各剂量组和卡托普利组大鼠的 EF、FS 升高, 心脏质量指数 (HW、HW/BW 及 LVW/BW) 降低, 心肌肥大因子和促炎因子水平下调, 且 Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B 信号通路被抑制。综上所述, 地龙通过抑制 Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B 信号通路保护压力负荷诱导的病理性心肌肥厚。

**关键词:** 地龙; 病理性心肌肥厚; 炎症; Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)2-0183-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.2.001

## Study on the protective effect of earthworm extracts on pathological cardiac hypertrophy in rats through Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B signaling pathway

ZHANG Shi-yu<sup>1</sup>, LIANG Tian-ming<sup>2</sup>, FANG Liu<sup>1</sup>, YAO Qian<sup>3</sup>, ZHU Jia-feng<sup>1</sup>, LI Qian<sup>1</sup>, ZHANG Lan-e<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Nursing, Weifang Medical University; <sup>2</sup>School of Life Sciences and Technology, Weifang Medical University;

<sup>3</sup>School of Clinic Medical, Weifang Medical University, Weifang 261053, China

**Abstract:** To explore the beneficial effect and mechanism of earthworm on pathological cardiac hypertrophy in rats through Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B signaling pathway. A total of 30 Wistar rats were randomly divided into sham group, model group, earthworm low and high dose group (400 mg/kg, 800 mg/kg), and captopril control group (50 mg/kg) with six rats in each group. Abdominal aortic coarctation was used to establish pathological myocardial hypertrophy model. Except that the arteries were not ligated in sham group, the other operation steps were same as those in the model group. Earthworm all dose group were given intraperitoneal injection according to body weight, while sham group and model group were given equal volume of normal saline, once a day for three weeks, respectively. Ejection fraction (EF) and short axis shortening rate (FS) were observed by echocardiography. The content of TNF- $\alpha$  in serum was determined by ELISA. H&E staining were used to observe the morphological changes of the heart. The mRNA expression levels of ANP, BNP,  $\beta$ -MHC and TNF- $\alpha$ , IL-6 were detected by qRT-PCR. Western blot was used to detect the expression of Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B pathway related proteins. The results showed that compared with model group, EF, FS were increased in earthworm all dose groups and captopril control group, heart mass index (HW, HW/BW, and LVW/BW) were decreased. The extract of earthworm could significantly reduce the cardiac hyper-

trophy factor and inflammatory factors and activate Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B signaling pathway. In conclusion, the extract of earthworm may play a protective role in myocardial hypertrophy by inhibited Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**Key words:** earthworm; pathological cardiac hypertrophy; inflammation; Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B

病理性心肌肥厚是心脏应对负荷超载等病理性刺激时做出的一种适应性反应<sup>[1]</sup>。当心脏压力超负荷时,心肌细胞无法增殖以支持负荷增加的需求,左心室代偿性肥厚以维持心输出量,而持续的心肌肥厚最终导致心力衰竭甚至猝死<sup>[2]</sup>。药用蚯蚓(lumbricus 或 earthworm),即地龙,钜蚓科动物参环毛蚓或缟蚯蚓的干燥体,含多肽、氨基酸、核苷酸和蛋白质类化合物等活性成分<sup>[3]</sup>,有抗炎、抗纤维化、调节细胞凋亡等多种药理活性<sup>[4,5]</sup>。课题组前期研究发现,地龙可通过降低 Ang II,抑制血管紧张素转化酶活性降低血压<sup>[6]</sup>。然而,地龙对压力负荷诱导的病理性心肌肥厚的作用及机制仍未明确。

蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Akt/mTOR)信号通路在多水平、多靶点参与细胞增殖、分化和凋亡,可通过抗炎和调节能量代谢来影响病理性心肌肥厚发展<sup>[7]</sup>,是药物调控病理性心肌肥厚的重要靶点。此外,活化 B 细胞的核因子(NF- $\kappa$ B)信号是一种重要的核转录因子,可控制细胞增殖、先天和适应性免疫、炎症及细胞凋亡,还参与免疫反应早期和炎症各阶段的生物学过程<sup>[8]</sup>。在心肌肥厚发展中,Akt/mTOR 和 NF- $\kappa$ B 的持续活化会上调炎症因子的表达并促进心脏慢性炎症<sup>[9,10]</sup>。然而,地龙能否通过调控 Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B 信号通路发挥心肌肥厚保护作用,目前尚未见报道。本研究使用地龙提取物干预腹主动脉缩窄术(abdominal aortic coarctation, AAC)诱导的病理性心肌肥厚模型,探究地龙对病理性心肌肥厚的作用及机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

Vevo 3100 LT 超高分辨率超声系统(Visual sonics,加拿大);qRT-PCR 引物钠尿肽(ANP)、脑钠肽(BNP)、 $\beta$ -肌球蛋白重链( $\beta$ -MHC)、白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )均由上海生工生物合成;SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO, 日本);Cycler 480 System PCR 仪(Roche, 瑞士);UV-2501 紫外分光光度计(岛津, 日本);p-NF- $\kappa$ B p65(8242S)、NF- $\kappa$ B p65(3033S)、I $\kappa$ B(9242S)、p-Akt(4060S)、Akt(4691S)、p-mTOR(9411S)和 mTOR(2972S)均购自美国 Cell Signaling

Technology 公司;GAPDH(TA-08, 中杉金桥, 中国);化学发光 Fluor Chem FC3 系统(Protein Simple, 加拿大)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 地龙提取物的制备

干燥地龙匀浆后,60 °C 水浴浸泡 1 h,4 °C 离心取上清液。脱盐和纯化使用 ÄKTA 蛋白分析仪和 Sephadex G-50 Desalting TM(3.2 cm × 50 cm)柱进行凝胶过滤,0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH:7.0)平衡。1 g 地龙提取物相当于 10 g 地龙生药材。具体制备方法见既往报道<sup>[3]</sup>。

#### 1.2.2 动物分组、模型建立与给药方法

30 只雄性 Wistar 大鼠购自济南鹏悦实验动物有限公司,饲养于 SPF 级环境中。随机分为假手术组(S 组)、模型组(M 组)、模型 + 地龙低剂量组(M + L 组)、模型 + 高剂量组(M + H 组)和模型 + 卡托普利组(M + C 组),每组 6 只。采用 AAC 的方法建立病理性心肌肥厚模型。20% 乌拉坦麻醉下切开腹腔,在肾动脉分支上 1 cm 处结扎将 5 号注射器针头与腹主动脉共同结扎,造成腹主动脉环形缩窄,假手术不结扎。AAC 手术后给予 1 周青霉素防治手术切口感染,地龙低剂量组和地龙高剂量组分别给予地龙 400 mg/kg 和 800 mg/kg<sup>[11]</sup>腹腔注射,同时使用卡托普利(50 mg/kg)作为阳性对照药<sup>[3,12]</sup>,假手术组和模型组则给予等体积生理盐水,每天 1 次,连续 21 d。

#### 1.2.3 细胞分组及给药

在 SD 大鼠出生 48 h 内取出心脏,使用 0.1% 胰蛋白酶和 0.03% 胶原酶酶解得到新生大鼠原代心肌细胞<sup>[13]</sup>。除对照组给予完全培养基外,经 50  $\mu$ mol/L 的苯肾上腺素(phenylephrine, PE)<sup>[13]</sup>处理 24 h 的原代心肌细胞,被分为 PE 组、地龙低剂量组(4 mg/mL)、地龙高剂量组(8 mg/mL)和卡托普利组(10  $\mu$ mol/L)。

#### 1.2.4 小动物超声心动图检查

大鼠在 1.5% 异氟烷吸入麻醉下进行心脏超声检测。大鼠心率维持在 350 ~ 450 次/min,使用 Visual sonics Vevo 3100 LT 超高分辨率超声系统进行 B 超、M 型超声检测,检测大鼠心脏射血分数(ejection

fraction, EF) 和短轴缩短率 (short axis shortening rate, FS)<sup>[14]</sup>。

### 1.2.5 心脏质量指数检测

大鼠称量体重 (body weight, BW), 使用二氧化碳安乐死后快速取出心脏。分别测量心脏重量 (heart weight, HW) 和左心室重量 (left ventricular weight, LVW), 计算 HW/BW 及 LVW/BW<sup>[15]</sup>。

### 1.2.6 心脏组织学染色

4% 多聚甲醛固定后的心肌组织流水冲洗, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明后石蜡渗透, 温度保持在 62

℃。将包埋的组织块切为厚度 4  $\mu$ m 的切片, 脱蜡后进行 HE 染色, 观察拍照。

### 1.2.7 qRT-PCR

Trizol 提取心脏组织总 RNA, 使用逆转录试剂盒 (TOYOBO, 日本) 逆转录为 cDNA。采用 SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO, 日本) 和基因引物进行实时定量 PCR (见表 1)。mRNA 表达的相对定量采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算结果, 使用 GAPDH 表达将数据标准化。

表 1 qRT-PCR 扩增引物序列  
Table 1 Primers amplified by qRT-PCR

引物名称 Primer name	上游 Forward	下游 Reverse
ANP	CTGCTAGACCCTGGAGGAGAAG	TCATCGGTCTGCTCGCTCAGG
BNP	ACT CTCCAGAACAATCCACGATGC	CCGGAAGCGCTGTCTTTGAG
$\beta$ -MHC	CCTCGCAATATCAAGGGAAA	TACAGGTGCATCAGTCCSG
TNF- $\alpha$	GCATGATCCGAGATGTGGAACCTGG	CGCCACGAGCAGGAATGAGAAG
IL-6	AGGAGTGGCTAAGGACCAAGACC	TGCCGAGTAGACCTCATAGTACC
GAPDH	GACATGCCGCTGGAGAAAC	AGCCGAGGATGCCCTTTACT

### 1.2.8 ELISA 检测

按 ELISA 试剂盒 (西唐生物技术, 中国) 说明书, 测定大鼠血清 TNF- $\alpha$  蛋白水平。

### 1.2.9 Western blot

RIPA 裂解液提取心脏组织蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。加入 5  $\times$  Loading Buffer 后在 95  $^{\circ}$ C 下 5 min 使蛋白变性。使用 10% SDS-PAGE 分离胶电泳, 随后恒电流转将蛋白转至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶封闭后, 分别敷一抗 (p-Akt、Akt、p-mTOR、mTOR、p-NF- $\kappa$ B p65、NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B、GAPDH) 4  $^{\circ}$ C 下过夜, 二抗室温孵育 2 h 后显色。

### 1.2.10 统计学方法

数据结果以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 采用 Prism 8.0 软件进行统计学分析, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 地龙提取物对 AAC 诱导的大鼠心脏的影响

为了观察地龙提取物对 AAC 诱导的大鼠心脏的影响, 本研究对各组大鼠进行了小动物超声检测, 还评估了心脏质量指数 (HW、HW/BW 及 LVW/BW) 的变化。如图 1 所示, 与假手术组相比, 模型

组大鼠 EF、FS 降低 ( $P < 0.01$ ), 表明模型组大鼠心脏收缩功能显著下降; 同时, HW、HW/BW 及 LVW/BW 显著高于假手术组 ( $P < 0.01$ ), 提示 AAC 诱导的大鼠心脏出现心功能障碍, 说明病理性心肌肥厚模型构建成功。有趣的是, 与模型组比较, 地龙提取物治疗后的 AAC 大鼠的 EF、FS 显著升高 ( $P < 0.05$ ), 而 HW、HW/BW 及 LVW/BW 显著下降 ( $P < 0.05$ ), 并且效果与卡托普利相当。这些数据表明地龙提取物对 AAC 诱导的大鼠心脏功能障碍有显著改善作用。

### 2.2 地龙提取物对 AAC 诱导的大鼠心肌肥厚的影响

为了研究地龙提取物对各组大鼠心脏组织学变化的影响, 本研究通过 HE 染色观察各组大鼠心脏组织形态学, 结果显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌细胞横截面积明显增大 ( $P < 0.001$ ), 单位面积心肌细胞数目减少。与模型组比较, 地龙低剂量组与高剂量组心肌细胞横截面积明显减小 ( $P < 0.05$ ), 单位面积心肌细胞数目增多, 与卡托普利阳性对照组大鼠心肌细胞病理改变结果一致 (见图 2)。为了探究地龙提取物对病理性心肌肥厚基因标志物的影响, 本研究通过 qRT-PCR 检测了肥大基

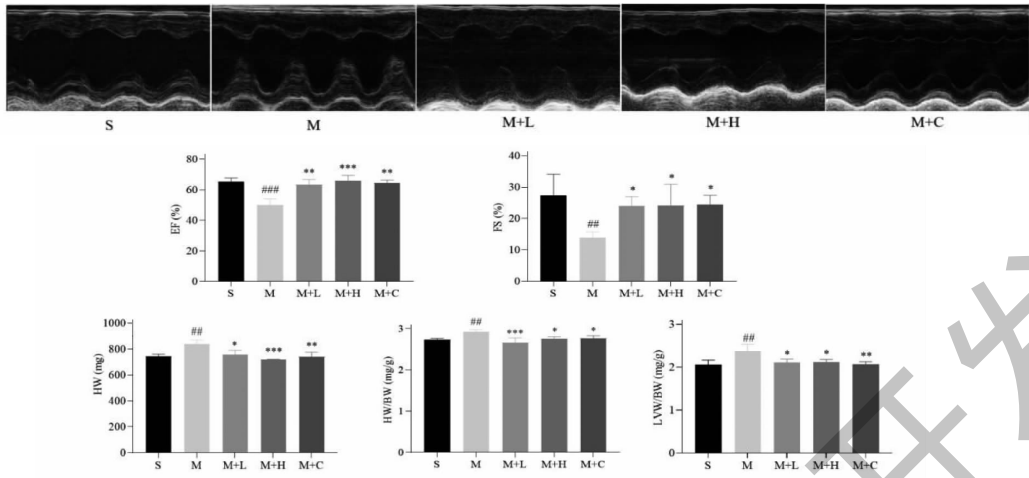


图1 地龙处理对病理性心肌肥厚大鼠心脏超声指标及心脏质量指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Effects of earthworm treatment on echocardiographic indicators and heart mass index in rats with pathological cardiac hypertrophy ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注: S:假手术组; M:模型组; M+L:模型+地龙低剂量组; M+H:模型+地龙高剂量组; M+C:模型+卡托普利组。与假手术组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ ; 与模型组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , 下同。Note: S: Sham group; M: Model group; M+L: Model + earthworm low-dose group; M+H: Model + earthworm high-dose group; M+C: Model + Captopril group. #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  vs sham group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs model group, the same below.

因标志物 ANP、BNP 及  $\beta$ -MHC 的 mRNA 表达水平。由图 3 显示, 与假手术组相比, 模型组大鼠心脏组织中的 ANP、BNP 及  $\beta$ -MHC mRNA 水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 地龙治疗可显著降低

ANP、BNP 和  $\beta$ -MHC mRNA 表达水平 ( $P < 0.05$ ), 地龙低剂量组的治疗效果优于卡托普利。以上说明地龙提取物可以抑制 AAC 诱导的病理性心肌肥厚。

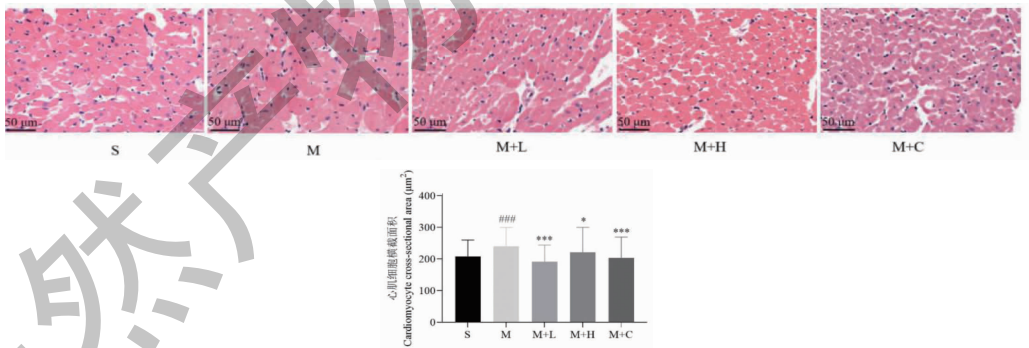


图2 各组大鼠心脏组织 HE 染色

Fig. 2 The representative images of HE staining in each group

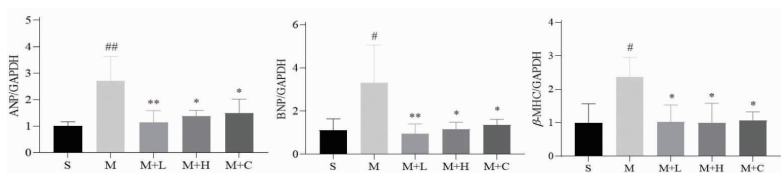


图3 地龙处理对病理性心肌肥厚大鼠 ANP、BNP 及  $\beta$ -MHC 基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 3 Effects of earthworm treatment on expression of mRNA ANP, BNP, and  $\beta$ -MHC in rats with pathological cardiac hypertrophy ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

### 2.3 地龙提取物对 AAC 诱导的心肌炎症的影响

为了证明地龙提取物在 AAC 诱导的心肌炎症反应中发挥重要作用,我们研究了促炎因子在各组大鼠心脏中的表达。如图 4 所示,与假手术组相比,模型组大鼠炎症相关基因 TNF- $\alpha$ 、IL-6 表达水平和血清 TNF- $\alpha$  含量显著升高 ( $P < 0.05$ ),而地龙各剂

量治疗组 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的基因表达和血清 TNF- $\alpha$  含量显著下降 ( $P < 0.05$ ),值得注意的是,地龙提取物呈现与卡托普利相当的治疗效果,这表明地龙提取物的抗心肌肥厚作用与其抑制心脏促炎因子表达密切相关。

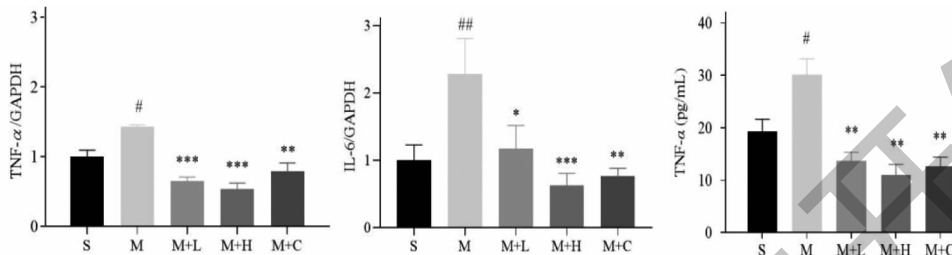


图 4 地龙处理对病理性心肌肥厚大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA 和血清 TNF- $\alpha$  蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 4 Effects of earthworm treatment on TNF- $\alpha$ , IL-6 mRNA and TNF- $\alpha$  protein expression in rats with pathological cardiac hypertrophy ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

### 2.4 地龙提取物对 Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B 信号通路蛋白表达的影响

为了检验地龙提取物是否通过 Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B 信号通路改善病理性心肌肥厚,本研究通过 Western blot 检测了大鼠心脏和原代心肌细胞 Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白的表达变化。与假手术组相比,模型组大鼠心脏组织中 p-Akt、p-mTOR 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比,地龙各剂量组和卡托普利组大鼠心脏组织中 p-Akt、p-mTOR 蛋白表达水平显著下调 ( $P < 0.05$ ) (见图 5)。此外,与假手术组相比,模型组大鼠心脏组

织中 p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平上调 ( $P < 0.001$ ), I $\kappa$ B 蛋白水平下降 ( $P < 0.001$ )。与模型组相比,地龙各剂量组和卡托普利组心脏组织中 p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.001$ ), I $\kappa$ B 蛋白上升至对照水平 ( $P < 0.01$ ) (见图 6)。另外,PE 诱导的原代心肌细胞肥大模型中,地龙提取物对 Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白表达的影响与 AAC 诱导的大鼠实验结果一致 (见图 7 和图 8)。以上结果表明,地龙提取物可能通过 Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B 通路的抑制而改善大鼠病理性心肌肥厚。

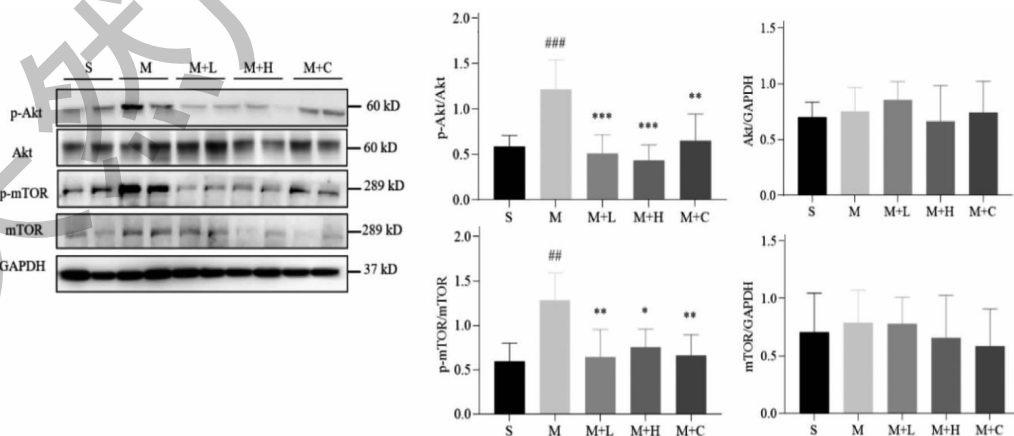


图 5 地龙处理对病理性心肌肥厚大鼠心脏组织中 Akt、mTOR 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 5 Effects of earthworm treatment on expression of Akt and mTOR proteins in heart tissues of rats with pathological cardiac hypertrophy ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

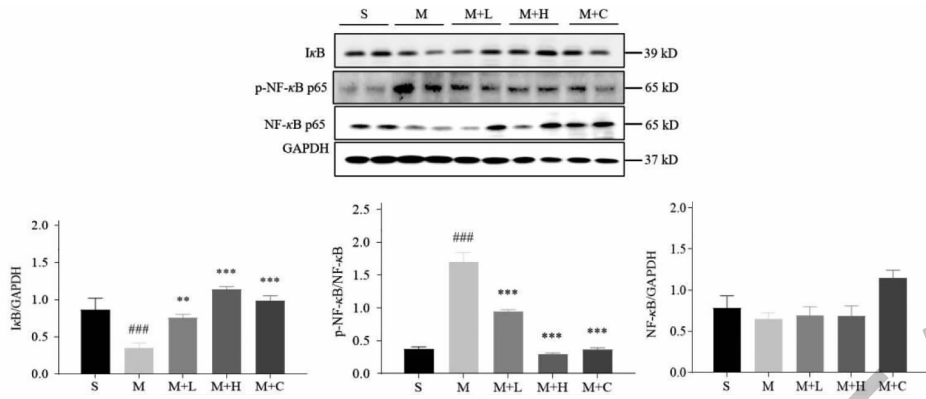


图6 地龙处理对病理性心肌肥大大鼠心脏组织中 NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Fig. 6 Effects of earthworm treatment on expression of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins in heart tissues of rats with pathological cardiac hypertrophy ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

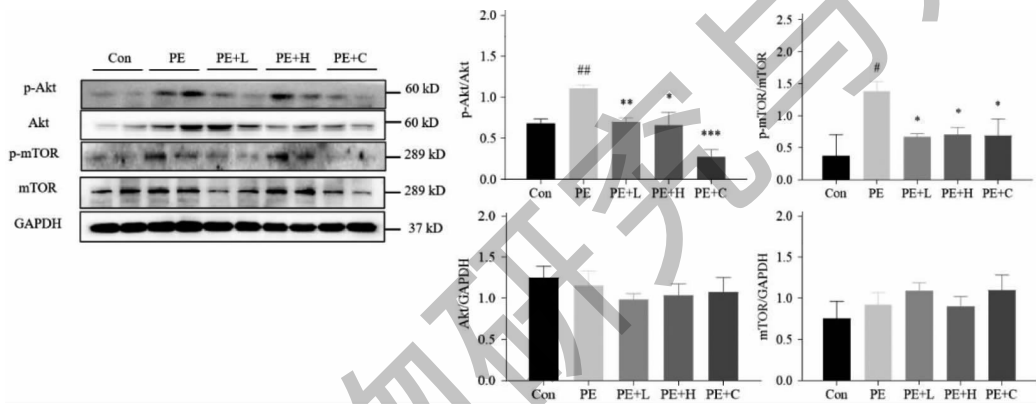


图7 地龙处理对原代心肌细胞 Akt、mTOR 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Fig. 7 Effects of earthworm treatment on expression of Akt and mTOR proteins in primary cardiomyocytes ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

注: Con: 对照组; PE: PE 模型组; PE+L: PE 模型+地龙低剂量组; PE+H: PE 模型+地龙高剂量组; PE+C: PE 模型+卡托普利组。与对照组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ ; 与 PE 组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , 下同。Note: Con: Control group; PE: PE model group; PE+L: PE model + earthworm low-dose group; PE+H: PE model + earthworm high-dose group; PE+C: PE model + Captopril group. #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  vs control group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs PE model group, the same below.

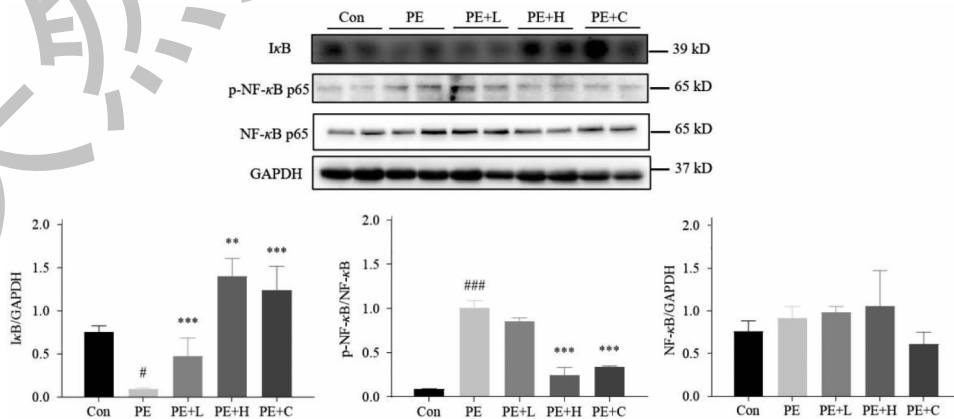


图8 地龙处理对原代心肌细胞 NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Fig. 8 Effects of earthworm treatment on expression of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins in primary cardiomyocytes ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

### 3 讨论与结论

地龙以其天然的抗炎、抗纤维化、调节凋亡等特性,在治疗高血压、糖尿病等方面发挥了显著作用<sup>[4,5]</sup>。病理性心肌肥厚是心血管系统疾病发生发展的高危因素,是多种心血管疾病的共同病理过程<sup>[16]</sup>;持续的病理性心肌肥厚触发严重的心肌重构,导致心衰、猝死等<sup>[17]</sup>。近年来,大量研究表明,中药提取物在心血管系统疾病发生发展中具有明显的保护作用<sup>[18,19]</sup>。课题组在既往研究中发现地龙可能通过降低 Ang II,抑制血管紧张素转化酶活性来降血压<sup>[3,6]</sup>。本研究进一步探究了地龙提取物在 AAC 诱导的病理性心肌肥厚模型中的作用及其作用机制。因此,本研究采用经典的 AAC 方法建立病理性心肌肥厚模型,并以卡托普利为阳性对照<sup>[3,12]</sup>。

病理性心肌肥厚主要表现为心肌细胞肥大、胚胎基因表达上调及炎症反应增强<sup>[10,20]</sup>。与既往研究报道一致<sup>[7]</sup>,本研究结果显示 AAC 模型组大鼠心脏功能受损,EF 和 FS 值降低,大鼠心脏质量指数 HW、HW/BW 和 LVW/BW 明显提高。进一步,组织病理学染色结果发现,AAC 导致心肌细胞横截面积增大,心肌肥厚相关基因 ANP、BNP、 $\beta$ -MHC 表达显著升高。这说明 AAC 成功诱导了大鼠的病理性心肌肥厚。有趣的是,本研究发现,地龙提取物治疗后大鼠的心脏收缩功能得到明显改善,AAC 诱发的心脏质量指数增高和组织形态学改变被显著抑制,心肌肥厚标志物也恢复至正常水平,且地龙低剂量的治疗效果优于卡托普利,表明地龙提取物可以抑制 AAC 诱导的病理性心肌肥厚。此外,炎症也参与病理性心肌肥厚的发生发展过程,促炎因子 IL-6、TNF- $\alpha$  在心肌炎症反应中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。在本研究中,AAC 诱发了心肌炎症反应,IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平显著增高,而地龙提取物治疗几乎可以将炎症因子的表达恢复至正常水平,且治疗效果与卡托普利相当,提示地龙提取物可以抑制炎症反应从而改善 AAC 诱导的心肌肥厚。

大量研究发现,Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B 信号通路在病理性心肌肥厚的发生发展中发挥重要作用<sup>[16]</sup>,心肌细胞特异性 Akt、mTOR 过表达可能导致心肌肥厚<sup>[21]</sup>。NF- $\kappa$ B 在病理性心肌肥厚中,受多种因素的刺激,可激活 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等各种炎症因子<sup>[22,23]</sup>。本研究结果显示,AAC 大鼠心肌肥厚程度明显增加,心肌炎症反应明显增加。然而,在 Akt/mTOR 信号通路中,地龙治疗组 p-Akt 和 p-mTOR 蛋白的表达明显低于模型组。在 NF- $\kappa$ B 信号通路中,p-NF-

$\kappa$ B p65 的表达量降低,但 I $\kappa$ B 的表达量显著增加。因此,Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B 信号通路可能在地龙治疗病理性心肌肥厚过程中被抑制。另外,地龙提取物还可以抑制 PE 诱导的肥大心肌细胞中 Akt、mTOR 和 NF- $\kappa$ B p65 的磷酸化蛋白表达的升高。由此可见,地龙提取物可能通过抑制 Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B 信号通路在病理性心肌肥厚中发挥保护作用,但具体的级联反应及靶点有待进一步研究。

综上所述,本研究首次发现地龙对压力负荷诱导的病理性心肌肥厚有一定的保护作用,其机制可能与抑制 AAC 诱导的心肌肥大和心肌炎症有关,并通过 Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B 信号通路发挥作用。本研究为地龙的进一步临床应用提供了实验依据,也为病理性心肌肥厚和心衰的防治提供了新的思路。然而,地龙抑制病理性心肌肥厚有效成分的一级结构尚未阐明,有待进一步研究。本课题将进一步探究地龙防治心衰的有效成分及其作用机制。

### 参考文献

- 1 Yang D, Liu HQ, Liu FY, et al. Mitochondria in pathological cardiac hypertrophy research and therapy[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 822969.
- 2 Xu CN, Kong LH, Ding P, et al. Melatonin ameliorates pressure overload-induced cardiac hypertrophy by attenuating Atg5-dependent autophagy and activating the Akt/mTOR pathway[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(10): 165848.
- 3 Zhang LE, Kang B, Li CD, et al. The component analysis and impact of the angiotensin-converting enzyme activity of earthworm peptide[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25: 1740-1742.
- 4 Shang Y, Qi LN, Jin H, et al. Research development of *Pheretima* on chemical composition and pharmacological activity[J]. *Drug Eval Res* (药物评价研究), 2022, 45: 989-996.
- 5 Huang PC, Shibu MA, Kuo CH, et al. *Pheretima aspergillum* extract attenuates high-KCl-induced mitochondrial injury and pro-fibrotic events in cardiomyoblast cells[J]. *Environ Toxicol*, 2019, 34: 921-927.
- 6 Zhang LE, Kang B, Li CD, et al. Antihypertensive action of lumbricus heat-resistant protein in rats[J]. *J Pract Med* (实用医学杂志), 2008, 24: 1886-1887.
- 7 Cui Y, Wang Y, Liu G. Epigallocatechin gallate (EGCG) attenuates myocardial hypertrophy and fibrosis induced by transverse aortic constriction via inhibiting the Akt/mTOR pathway[J]. *Pharm Biol*, 2021, 59: 1305-1313.
- 8 Tabibzadeh S. Signaling pathways and effectors of aging[J].

- Front Biosci(Landmark Ed),2021,26:50-96.
- 9 Xu JJ, Li RJ, Zhang ZH, et al. Loganin inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy through the JAK2/STAT3 and NF- $\kappa$ B signaling pathways [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:678886.
  - 10 Chen YS, Pan RY, Zhang JJ, et al. Pinoselin diglucoside (PDG) attenuates cardiac hypertrophy via AKT/mTOR/NF- $\kappa$ B signaling in pressure overload-induced rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 272:113920.
  - 11 Li CD, Mao SM, Kang B, et al. Effects of the antihypertensive protein from earthworm on bloodpressure and the level of angiotensin II in spontaneously hypertension rats [J]. *China Prac Med(中国实用医药)*, 2008, 3:1-3.
  - 12 Sato T, Kadowaki A, Suzuki T, et al. Loss of apelin augments angiotensin II-induced cardiac dysfunction and pathological remodeling [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20:239.
  - 13 Li PL, Liu H, Chen GP, et al. STEAP3 (six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3) inhibits pathological cardiac hypertrophy [J]. *Hypertension*, 2020, 76:1219-1230.
  - 14 Wang JH, Hao D, Zeng LF, et al. Neuropeptide Y mediates cardiac hypertrophy through microRNA-216b/FoxO4 signaling pathway [J]. *Int J Med Sci*, 2021, 18:18-28.
  - 15 Ba L, Gao J, Chen Y, et al. Allicin attenuates pathological cardiac hypertrophy by inhibiting autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK/mTOR signaling pathways [J]. *Phytomedicine*, 2019, 58:152765.
  - 16 Xie WJ, Hou G, Wang L, et al. Astaxanthin suppresses lipopolysaccharide-induced myocardial injury by regulating MAPK and PI3K/AKT/mTOR/GSK3 $\beta$  signaling [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22:3338-3346.
  - 17 Winkle AJ, Nassal DM, Shaheen R, et al. Emerging therapeutic targets for cardiac hypertrophy [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2022, 26:29-40.
  - 18 Chen YM, Wang L, Huang SX, et al. Lutein attenuates angiotensin II-induced cardiac remodeling by inhibiting AP-1/IL-11 signaling [J]. *Redox Biol*, 2021, 44:102020.
  - 19 Niu YL, Cao JM, Wang Z, et al. Protective effect of curcumin on exercise-induced myocardial fibrosis of rats [J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2021, 33:921-927.
  - 20 Agostinucci K, Manfredi TG, Cosmas AC, et al. Comparison of ANP and BNP granular density in atria of rats after physiological and pathological hypertrophy [J]. *Toxicol Pathol*, 2022, 50:497-506.
  - 21 Magaye RR, Savira F, Hua Y, et al. Attenuating PI3K/Akt-mTOR pathway reduces dihydrosphingosine 1 phosphate mediated collagen synthesis and hypertrophy in primary cardiac cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2021, 134:105952.
  - 22 Tao YR, Pu SY, Zhang DM. Research progress on the role of NF- $\kappa$ B in the pathogenesis and development of pathological cardiac hypertrophy [J]. *Progress Physiol Sci(生理科学进展)*, 2019, 50:333-338.
  - 23 Chen TL, Zhang XD, Zhu GL, et al. Quercetin inhibits TNF- $\alpha$  induced HUVECs apoptosis and inflammation via downregulating NF- $\kappa$ B and AP-1 signaling pathway *in vitro* [J]. *Medicine(Baltimore)*, 2020, 99:e22241.