速效救心丸经 ALKBH5/m^{6}A 调控自噬减轻缺氧/复氧心肌细胞损伤

王可妍[1,2]， 高俊杰[1,2]， 林文勇[1,2]， 王 丹[1,2]， 张春伶[1,2]， 牛振超[1,2]， 李益萍[1,2*]，
王肖龙[1,2*]
（1. 上海中医药大学附属曙光医院，国家中医心血管病临床医学研究中心分中心，上海 201203；2. 上海中医药大学附属曙光医院心血管病研究所，上海 201203）

摘要：目的 探讨速效救心丸对缺氧/复氧心肌细胞的保护作用及可能机制。**方法** 将 H9c2 细胞随机分为 5 组，分别为常氧组、缺氧/复氧组、速效+缺氧/复氧组、川芎嗪+缺氧/复氧组、冰片+缺氧/复氧组。通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测 RNA 去甲基化酶 ALKBH5 mRNA 和蛋白的表达。为进一步研究，将 H9c2 细胞分为空白转染+常氧组、空白转染+缺氧/复氧组、空白转染+速效+缺氧/复氧组、空白转染+川芎嗪+缺氧/复氧组、空白转染+冰片+缺氧/复氧组、ALKBH5 过表达+缺氧/复氧组、ALKBH5 过表达+速效+缺氧/复氧组、ALKBH5 过表达+川芎嗪+缺氧/复氧组、ALKBH5 过表达+冰片+缺氧/复氧组。通过化学发光法检测细胞活力，比色法检测 N^6-腺嘌呤（m^{6}A）甲基化水平，RT-qPCR 检测自噬相关基因的表达。**结果** 与模型组比较，速效救心丸及其有效成分川芎嗪、冰片预处理与 ALKBH5 过表达可以增加缺氧/复氧后心肌细胞去甲基化酶 ALKBH5 mRNA 和蛋白的表达，降低 m^{6}A 甲基化水平，抑制 GSK3β、Beclin-1、Atg5 的表达，增加 mTOR 的表达（P<0.01）。**结论** 速效救心丸可以有效减轻缺氧/复氧心肌损伤，其机制可能是通过 ALKBH5/m^{6}A 途径抑制过度自噬。

关键词：速效救心丸；ALKBH5；m^{6}A；自噬；心肌细胞；缺氧/复氧
中图分类号：R285.5 **文献标志码**：B **文章编号**：1001-1528（2022）03-0918-05
doi：10.3969/j.issn.1001-1528.2022.03.042

急性心肌梗死是发病率和死亡率很高的主要心血管疾病之一，其干预的最佳治疗手段是再灌注治疗。然而，在再灌注过程中会导致额外的心肌损伤，即心肌缺血再灌注损伤（myocardial ischemia/reperfusion injury，MIRI）[1-3]。治疗 MIRI 的方法主要有机械性物理疗法（低温疗法、远隔缺血后适应等）及药物治疗（心房利钠肽、环孢霉素 A 等），然而临床试验并未证实其确切疗效[4-6]。因此，MIRI 成为研究的热点和难点。

MIRI 发病机制复杂，自噬在其病理过程中发挥重要作用[7]。N^6-腺嘌呤（N^6-methyladenosine，m^{6}A）甲基化是 RNA 重要的表观遗传学修饰，m^{6}A 甲基化水平主要由甲基化酶如甲基化酶 3（methyltransferase-like 3，METTL3）和去甲基化酶如 ALKBHB 同源蛋白 5（alkylation repair homolog protein 5，ALKBH5）调控[8]。Song 等[9]研究发现缺氧/复氧后 METTL3 表达上调，m^{6}A 甲基化水平增加，进而损害自噬通量，促进心肌细胞凋亡，提示 m^{6}A 甲基化修饰可能通过影响自噬从而参与 MIRI 的病理过程。

速效救心丸主要由川芎嗪、冰片组成。临床发现其可显著改善心肌梗死及心绞痛等症状[10-12]。本课题组预实验研究发现速效救心丸可以减少大鼠心肌梗死面积，改善心功能，从而减轻缺血再灌注损伤，并与自噬机制有关。本研究通过缺氧/复氧心肌细胞模型，从表观遗传学与自噬角度深入探讨速效救心丸对 MIRI 的保护作用，为其临床运用提供更加充分的理论依据。

1 材料

1.1 细胞 大鼠心肌细胞 H9c2 细胞购自上海诺百生物科技有限公司。

1.2 试剂与药物 速效救心丸（天津中新药业集团股份有限公司，批号 617135），其浓度的选择基于前期基础研究，分别用无水乙醇将速效救心丸及其有效成分川芎嗪、冰片稀释溶解至 50、100、25 mg/mL，与细胞共培养时使其给药终质量浓度为 50、100、25 μg/mL。BCA 蛋白浓度检测试剂盒、SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒、蛋白 Marker、CellTiter-Lumi™ Steady 发光法细胞活力检测试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司，批号 0701018181104、P0012AC、061418181119、C0069S）；DMEM 高糖培养基

收稿日期：2021-08-26
基金项目：国家自然科学基金项目（81573647，82074222）；上海市科委引导类项目（19401934300）；上海市卫健委中医药事业发展三年行动计划项目［ZY（2018-2020）-CCCX-2003-07］；上海市中医临床重点实验室项目（14DZ2273200）；上海市临床重点专科项目（shslczdzk05301）
作者简介：王可妍（1996—），女，硕士生，研究方向为中西医结合防治心血管病。Tel：19821257069，E-mail：2952099300@qq.com
*通信作者：李益萍（1990—），女，博士生，研究方向为中西医结合防治心血管病。Tel：13916223612，E-mail：769973206@qq.com
王肖龙（1965—），男，教授，研究方向为中西医结合防治心血管病。Tel：13501991450，E-mail：wxlqy0214@163.com

（美国 Corning 公司，批号 32320006）；PBS（上海昱都生物科技有限公司，批号 AF29526788）；0.25% Trypsin-EDTA［赛默飞世尔科技（中国）有限公司，批号 193154］；SYBR RT-qPCR Master Mix、RNA 抽取试剂盒（南京诺唯赞生物科技有限公司，批号 Q341-02、7E552A1）；GoScript™ Reverse Transscription（美国 Promega 公司，批号 0000389033）；ALKBH5（英国 Abcam 公司，批号 ab195377）；GAPDH（美国 Proteintech 公司，批号 051201）；二抗（合肥白鲨生物科技有限公司，批号 69110200）；EpiQuik m^6A RNA 甲基化定量检测试剂盒（美国 Epigentek 公司，批号 P-9005）。

1.3 仪器 超净工作台（珠海市再鑫仪器有限公司）；Forma311 型 CO_2 细胞培养箱、StepOnePlus Real-Time PCR 仪（美国 Thermo 公司）；SDS-PAGE 电泳仪、湿转转膜仪（美国 Bio-Rad 公司）；5430R 型高速冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司）。

2 方法

2.1 缺氧/复氧模型的建立及复氧时间的确定 H9c2 细胞培养在含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 中，5% CO_2 培养箱中传代培养至第 3 代后建立缺氧/复氧模型。更换培养基为低糖无血清的 DMEM，在缺氧条件下（1% O_2、94% N_2、5% CO_2）培养 2 h 后再复氧（95% 空气，5% CO_2），分别复氧 0、2、4、6 h。

2.2 化学发光法检测细胞活力 通过 CellTiter-Lumi™ Steady 发光法细胞活力检测试剂盒检测不同复氧时间组的 ATP 水平来确定最佳复氧时间。使用满足化学发光检测条件的 96 孔板，之后进行细胞铺板，5% CO_2，37 ℃，过夜培养。室温平衡 10 min，向每孔中加入发光法检测试剂，室温振荡 2 min，室温孵育 10 min，使发光信号趋于稳定。使用具有检测化学发光功能的多功能酶标仪进行检测。

2.3 实验分组 H9c2 细胞铺板密度在 30%～40% 之间，随机分为常氧组、缺复/复氧组、速效+缺氧/复氧组、川芎嗪+缺氧/复氧组、冰片+缺氧/复氧组，药物预处理 1 h 之后进行缺氧/复氧处理，待到规定时间后收集细胞 mRNA 和蛋白。

2.4 Western blot 检测 ALKBH5 的表达 提取各组细胞蛋白，BCA 试剂盒蛋白定量后变性，上样、电泳、转膜，脱脂奶粉封闭，加入 ALKBH5 一抗（1∶2 000），4 ℃过夜孵育，洗膜后加入二抗（1∶10 000），室温孵育 2 h，洗膜，显影。

2.5 Human ALKBH5 过表达慢病毒制备 根据 ALKBH5（NM_ 017758.3）基因信息，针对 CDS 区进行基因合成，并将其构建入慢病毒表达载体骨架 PDS085_ pL-MCS（用 NheI 和 AscI 酶切）中，即获得慢病毒表达载体 pl-CMV-ALKBH5。

2.6 转染实验分组 H9c2 细胞铺板密度在 30%～40% 之间，随机分为空白转染+常氧组、空白转染+缺氧/复氧组、空白转染+速效预处理+缺氧/复氧组、空白转染+川芎嗪+缺氧/复氧组、空白转染+冰片+缺氧/复氧组、ALKBH5 过表达+缺氧/复氧组、ALKBH5 过表达染+速效+缺氧/复氧组、ALKBH5 过表达+川芎嗪+缺氧/复氧组、ALKBH5 过表达+冰片+缺氧/复氧组。

2.7 慢病毒转染细胞 从培养箱中取出细胞，吸去旧培养基，将含病毒的培养液小心加入各孔中，放于 CO_2 培养箱孵育 4～6 h，吸去含病毒的培养液，PBS 清洗细胞 2～3 次，最后加入适量培养液，过夜后观察细胞状态。

2.8 RT-qPCR 检测相关基因的表达 采用 RT-qPCR 法对相关基因表达进行定量分析。用 TRIzol 试剂提取心肌细胞总 RNA，逆转录获取 cDNA，SYBR Green PCR Master Mix Kit 用于量化 RNA 水平，以 *β-actin* 作为内参，引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物	序列
ALKBH5	正向 5′-GACCTGCGTGAGAAGCTCAA-3′
	反向 5′-TGGTACTTCCGTTTGGTGGTC-3′
GSK3β	正向 5′-TGGACAGACCAATAACGCCG-3′
	反向 5′-GTGACCAGTGTTGCTGAGTG-3′
mTOR	正向 5′-AATCGTGGTGGCTCTTGGAG-3′
	反向 5′-GGAGGCAACAACAAGTGCAG-3′
Atg5	正向 5′-ACGTGTGGTTTGGACGGATT-3
	反向 5′-TGTTCCAAGGCAGAGCTGAG-3′
Beclin1	正向 5′-CCCAGCCAGGATGATGTCTAC-3′
	反向 5′-AGTCTCCGGCTGAGGTTCTC-3′
LC3B	正向 5′-CCCAGCCAGGATGATGTCTAC-3′
	反向 5′-CCCAGCCAGGATGATGTCTAC-3′
P62	正向 5′-CTGAGAAGGACTCGCTCGAC-3′
	反向 5′-TCAGTACCCGCTCTTTCAGC-3′
β-actin	正向 5′-ACACCCCAGCCATGTACGT-3′
	反向 5′-ATGGGCACAGTGTGGGTGA-3′

2.9 比色法检测 m^6A 甲基化水平 提取样品 RNA，每次反应的总 RNA 量可为 100～300 ng，每个反应的最佳量为 200 ng。制备缓冲液与溶液，与 RNA 结合，捕获 m^6A RNA，使用酶标仪检测信号，计算 m^6A 的水平。

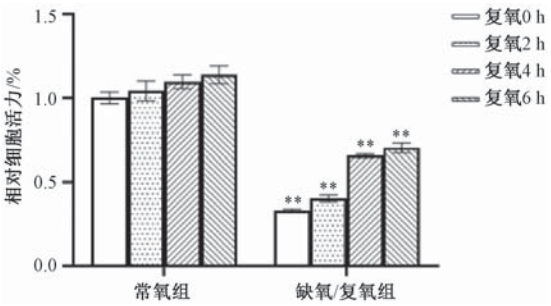
2.10 统计学分析 通过 SPSS 25.0 软件进行处理，符合正态性及方差齐性，组间比较采用单因素方差分析；不符合正态性和（或）方差齐性，组间比较使用非参数检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 H9c2 细胞不同复氧时间对细胞活力的影响 如图 1 所示，不同复氧时间组的细胞活力均低于常氧培养细胞（$P<0.01$）；其中复氧 4 h 可以较好的恢复细胞活力。因此后续缺氧/复氧模型均采取缺氧 2 h，复氧 4 h。

3.2 速效救心丸预处理对细胞状态的影响 如图 2 所示，常氧组细胞生长状态良好，死亡细胞较少；与常氧组比较，缺氧/复氧组细胞死亡增加（$P<0.01$）；速效救心丸、川芎嗪及冰片预处理可减少缺氧/复氧后心肌细胞的死亡，促进增殖（$P<0.01$）。

3.3 速效救心丸预处理对缺氧/复氧心肌细胞 ALKBH5 表



注：与同一复氧时间常氧组比较，** P<0.01。

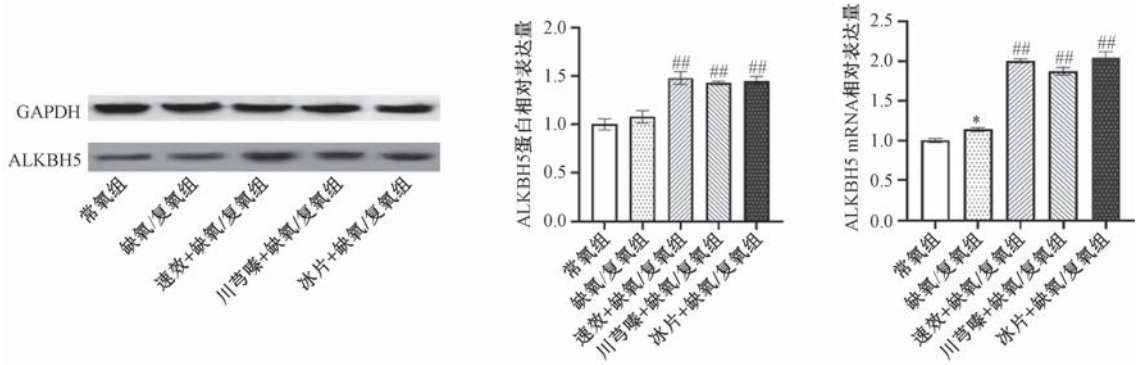
图 1　不同复氧时间心肌细胞活力

达的影响　如图 3 所示，与常氧组比较，缺氧/复氧组细胞去甲基化酶 ALKBH5 的 mRNA 和蛋白表达升高，其中 mRNA 表达差异有统计学意义（P<0.05），蛋白表达差异无统计学意义（P>0.05）；与缺氧/复氧组比较，速效救心丸及其有效成分川芎嗪、冰片预处理均可增加缺氧/复氧后心肌细胞 ALKBH5 mRNA 和蛋白表达（P<0.01）。

3.4　速效救心丸预处理及 ALKBH5 过表达对缺氧/复氧心肌细胞 m^6A 甲基化水平的影响　如图 4 所示，与缺氧/复氧组比较，速效救心丸及其有效成分川芎嗪、冰片预处理可降低 m^6A 水平（P<0.01），ALKBH5 过表达处理后也可

注：与常氧组比较，** P<0.01；与缺氧/复氧组比较，## P<0.01。

图 2　速效救心丸对缺氧/复氧后心肌细胞的影响



注：与常氧组比较，* P<0.05；与缺氧/复氧组比较，## P<0.01。

图 3　速效救心丸对 ALKBH5 表达的影响

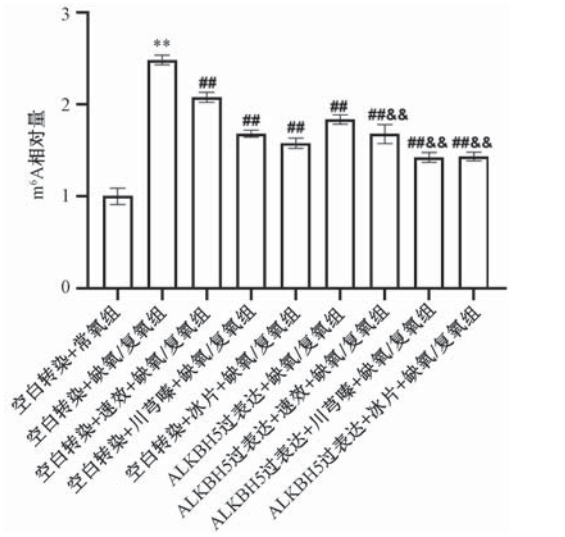
下调 m^6A 水平（P<0.01）。

3.5　速效救心丸预处理及 ALKBH5 过表达对缺氧/复氧心肌细胞活力的影响　如图 5 所示，与缺氧/复氧组比较，速效救心丸及其有效成分川芎嗪、冰片预处理可提高缺氧/复氧后心肌细胞的活力（P<0.01）；与缺氧/复氧组比较，ALKBH5 过表达处理也可增加心肌细胞活力（P<0.01）。

3.6　速效救心丸预处理及 ALKBH5 过表达对缺氧/复氧心肌细胞自噬的影响　如图 6 所示，与常氧组比较，缺氧/复氧组心肌细胞 *GSK3β*、*Atg*5、*Beclin*1、*P*62 mRNA 表达均升高（P<0.01），*mTOR* mRNA 表达降低（P<0.01）；与缺氧/复氧组比较，速效救心丸及其有效成分川芎嗪、冰片预处理可抑制 *GSK3β*、*Atg*5、*Beclin*-1、*P*62 mRNA 表达（P<0.01），促进 *mTOR* mRNA 表达（P<0.01）；与缺氧/复氧组比较，ALKBH5 过表达也可抑制 *GSK3β*、*Atg*5、*Beclin*-1、*P*62 mRNA 表达，促进 *mTOR* mRNA 表达（P<0.01）。

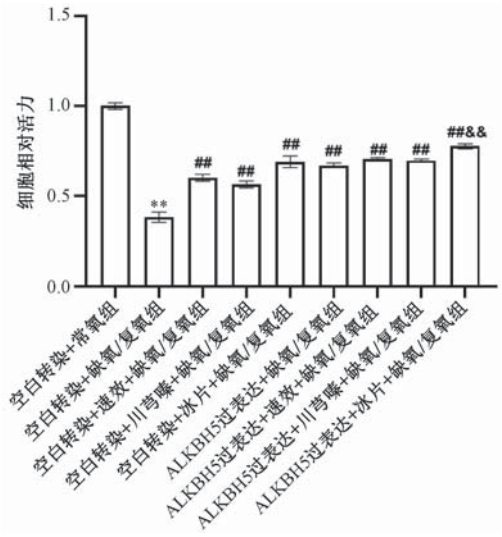
4　讨论

在心肌缺血再灌注过程中，自噬被明显激活，超过一定水平时会导致细胞功能障碍，从而发生自噬性细胞死亡[13-14]，因此，抑制过度自噬可能成为治疗 MIRI 的一个有效靶点。参与自噬调控的经典信号通路之一是 GSK3β/mTOR 通路，一些关键蛋白可直接或间接反映自噬过程[15-16]。Beclin 1 是自噬起始阶段的关键调控分子，调控早期自噬小体的形成。微管相关蛋白轻链 3 蛋白（microtubulerassociated protein light chain 3 protein，LC3）是 Beclin1 蛋白的关键下游因子，是检测自噬发生的标志性蛋白。Atg5 也参与自噬体的形成[17-20]。P62 的主要功能是将



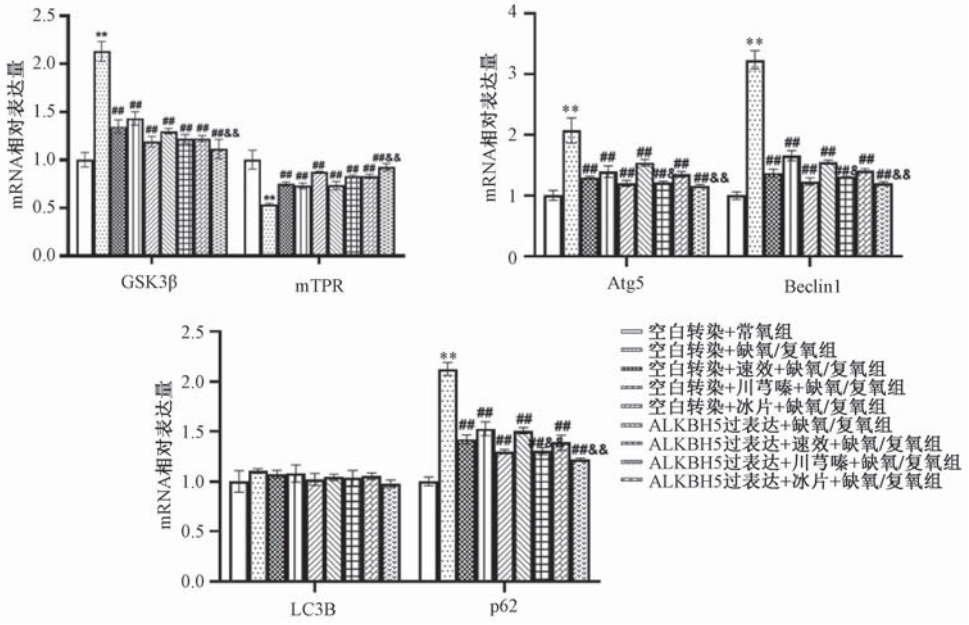
注：与空白转染+常氧组比较，** $P<0.01$；与空白转染+缺氧/复氧组比较，## $P<0.01$；与 ALKBH5 过表达+缺氧/复氧组比较，&& $P<0.01$。

图 4 速效救心丸与 ALKBH5 过表达对心肌细胞 m⁶A 甲基化水平的影响



注：与空白转染+常氧组比较，** $P<0.01$；与空白转染+缺氧/复氧组比较，## $P<0.01$；与 ALKBH5 过表达+缺氧/复氧组比较，&& $P<0.01$。

图 5 速效救心丸与 ALKBH5 过表达对心肌细胞活力的影响



注：与空白转染+常氧组比较，** $P<0.01$；与空白转染+缺氧/复氧组比较，## $P<0.01$；与 ALKBH5 过表达+缺氧/复氧组比较，&& $P<0.01$。

图 6 速效救心丸与 ALKBH5 过表达对心肌细胞自噬的影响

被降解的细胞器运输至成熟的自噬体[21]。随着对表观遗传学的深入研究发现，m⁶A 修饰与自噬密切相关。

本课题组发现，速效救心丸及其有效成分川芎嗪、冰片可有效改善缺氧/复氧心肌细胞损伤；缺氧/复氧后心肌细胞去甲基化酶 ALKBH5 mRNA 表达略增加，蛋白表达差异无统计学意义；而速效救心丸及其有效成分川芎嗪、冰片预处理可增加去甲基化酶 ALKBH5 的表达，下调 m⁶A 甲基化水平；抑制 *GSK3β*、*Beclin*-1、*Atg*5、*P*62 的表达，增加 *mTOR* 的表达。采用慢病毒转染技术使去甲基化酶 ALKBH5 过表达，ALKBH5 过表达后缺氧/复氧心肌细胞 m⁶A 甲基化水平下降、细胞活力增加，*GSK3β*、*Beclin*-1、*Atg*5、*P*62 的表达下降，*mTOR* 的表达增加，表明速效救心丸可能通过 ALKBH5/m⁶A 途径抑制过度自噬从而减轻缺氧/复氧心肌细胞损伤。此外，本课题组发现速效救心丸拮抗缺血再灌注损伤的作用优于单体川芎，弱于单体冰片，提示速效救心丸减缓缺血再灌注损伤主要是通过冰片发挥作用，其用量较少，且在药物服用安全范围内，故对人体无害。

然而，本实验并未在蛋白层次上探索自噬相关指标的

变化，其中 LC3 相对 mRNA 表达结果无统计学意义，故在以后的研究中应通过 Western blot 等技术来深入对自噬通路的研究。另外，应增加干扰 ALKBH5 表达后对缺氧/复氧心肌细胞的影响，以期为速效救心丸治疗 MIRI 提供更加充足的证据。MIRI 目前尚无有效的治疗方法，但研究发现我国传统中药，如五参顺脉胶囊、三七总皂苷等通过抑制过度自噬减轻缺血再灌注损伤[22-25]，未来需要更多相关研究来推动我国传统中医药卫生事业的发展。

参考文献：

[1] Ibáñez B, Heusch G, Ovize M, *et al*. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 65(14): 1454-1471.
[2] Liu N B, Wu M, Chen C, *et al*. Novel molecular targets participating in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection[J]. *Cardiol Res Pract*, 2019, 19: 6935147.
[3] Fr öhlich G M, Meier P, White S K, *et al*. Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI[J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(23): 1714-1722.
[4] Davidson S M, Ferdinandy P, Andreadou I, *et al*. Multitarget strategies to reduce myocardial ischemia/reperfusion injury: JACC review topic of the week[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73(1): 89-99.
[5] Binder A, Ali A, Chawla R, *et al*. Myocardial protection from ischemia-reperfusion injury post coronary revascularization[J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2015, 13(9): 1045-1057.
[6] Heusch G. Cardioprotection research must leave its comfort zone[J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(36): 3393-3395.
[7] Turer A T, Hill J A. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy[J]. *Am J Cardiol*, 2010, 106(3): 360-368.
[8] Meyer K D, Jaffrey S R. Rethinking m^6A readers, writers, and erasers[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2017; 33: 319-342.
[9] Song H, Feng X, Zhang H, *et al*. METTL3 and ALKBH5 oppositely regulate m^6A modification of *TFEB* mRNA, which dictates the fate of hypoxia/reoxygenation-treated cardiomyocytes[J]. *Autophagy*, 2019, 15(8): 1419-1437.
[10] 张学斌，肖 巍. 速效救心丸治疗稳定型心绞痛的药物经济学评价[J]. 中国药物经济学，2021，16(7)：44-49；56.
[11] 郑瑞红. 3 种抗冠心病药物治疗稳定型心绞痛的临床观察[J]. 北方药学，2020，17(7)：56-57.
[12] 林 泉，徐凤芹，马晓娟，等. 速效救心丸治疗急性冠状动脉综合征疗效和安全性的系统评价[J]. 天津中医药，2021，38(5)：608-615.
[13] Wang X, Guo Z, Ding Z, *et al*. Inflammation, autophagy, and apoptosis after myocardial infarction[J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(9): e008024.
[14] Aghaei M, Motallebnezhad M, Ghorghanlu S, *et al*. Targeting autophagy in cardiac ischemia/reperfusion injury: a novel therapeutic strategy[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 16768-16778.
[15] Tao Z, Liu L, Zheng L D, *et al*. Autophagy in adipocyte differentiation[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1854: 45-53.
[16] Valente G, Morani F, Nicotra G, *et al*. Expression and clinical significance of the autophagy proteins Beclin 1 and LC3 in ovarian cancer[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 462658.
[17] 陆麒瑾，李佳钰，蔡义思，等. 当归拈痛汤对风湿热痹型佐剂性关节炎大鼠自噬蛋白 LC3，Beclin 1，p62 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28(1)：41-49.
[18] Chang S J, Ou-Yang F, Tu H P, *et al*. Decreased expression of autophagy protein LC3 and stemness (CD44 +/CD24-/low) indicate poor prognosis in triple-negative breast cancer[J]. *Hum Pathol*. 2016, 48: 48-55.
[19] 谢 昆，李密杰，蒋成砚，等. 自噬相关蛋白 ATG5/BECLIN-1 调控细胞自噬和凋亡的分子机理研究进展[J]. 中国人兽共患病学报，2018，34(3)：272-275；285.
[20] 彭 霞，黄政德，成细华，等. 加味丹参饮预处理调控自噬相关基因 Beclin-1 和 ATG5 表达抗大鼠心肌缺血再灌注损伤[J]. 湖南中医药大学学报，2016，36(7)：20-24.
[21] 徐云云. 自噬标记蛋白（Beclin1、LC3、p62、mTOR）在恶性肺结节中的表达及临床意义[D]. 兰州：西北民族大学，2021.
[22] 索红亮，孙治霞，曾垂义，等. 五参顺脉胶囊通过自噬改善心肌缺血再灌注损伤[J]. 中国比较医学杂志，2021，31(7)：37-43.
[23] 王 飘，郑 晴，胡 婷，等. 三七总皂苷抗大鼠缺血再灌注损伤作用及对心肌自噬水平的影响[J]. 中国中医基础医学杂志，2021，27(8)：1249-1252；1285.
[24] 崔健昆，耿乃志，孟凡吉，等. 去甲氧基姜黄素通过 PI3K-Akt-mTOR 信号通路调控细胞自噬对心肌缺血再灌注损伤大鼠的保护作用研究[J]. 中医药学报，2020，48(8)：19-24.
[25] 孙大伟，索艳荣，冯丽莎，等. 基于自噬基因 Beclin-1 与 LC3 探讨丹参素对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌 ATP5G1 的影响[J]. 中华中医药杂志，2019，34(6)：2421-2425.