DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240761



沙库巴曲 / 缬沙坦对心力衰竭兔心肌细胞的保护作用及机制研究

庄金龙^{1,2},钱涛铭¹,林庚海²,陈 华²,阮发晖²,林惠萍²,刘 莉^{1,3*} 1.黑龙江中医药大学,哈尔滨150040 2.厦门大学附属东南医院心血管内科,漳州363000 3.黑龙江中医药大学附属第一医院心血管病一科,哈尔滨150040

[摘要] 印的 探讨沙库巴曲(Sac)/缬沙坦(Val)对多柔比星(DOX)诱导的心力衰竭兔心肌细胞的保护作 用及机制。**方法** 选取 30 只新西兰兔建立 DOX 诱导的心力衰竭兔模型, 25 只造模成功,将造模成功的实验兔随机 分为模型组(DOX组,9只)、Val干预组(DOX+Val组,8只)、Sac/Val干预组(DOX+Sac/Val组,8只);另 取 8 只新西兰兔作为空白组。DOX+Val 组每次灌胃 Val 混悬液 4.65 mg/kg, DOX+Sac/Val 组每次灌胃 Sac/Val 混悬液 9.3 mg/kg, 空白组及 DOX 组每次灌胃等体积的蒸馏水; 各组均每日灌胃 2 次, 连续 8 周。给药 8 周后, 用超声心动 图检测兔左心室舒张末期内径(LVDD)、左心室收缩末期内径(LVSD)、左心室射血分数(LVEF)、左心室短轴 缩短率(LVFS);计算全心重量指数(HMI)及左心室重量指数(LVMI);通过H-E和马松染色观察心肌组织病 理形态及纤维化情况;通过透射电镜观察心肌细胞超微结构;采用TUNEL检测观察心肌细胞凋亡情况,并计算心肌 细胞凋亡率;采用 ELISA 法检测血清氨基末端脑利尿钠肽前体(NT-proBNP)、超敏肌钙蛋白 I(Hs-cTNI)、血管 紧张素II(Ang II)、醛固酮(ALD)、心房利尿钠肽(ANP)、脑利尿钠肽(BNP)、环磷酸鸟苷(cGMP)、蛋 白激酶G(PKG)水平;采用 qPCR 检测心肌组织利尿钠肽受体A(NPR-A)、cGMP 特异性磷酸二酯酶 5A [PDE5A (cGMP)]、PKG、Bcl-2、Bax、caspase 3 mRNA 的表达;采用蛋白质印迹法检测心肌组织磷酸化 cAMP 反应元件 结合蛋白(p-CREB)、磷酸化 Bcl-2 相关死亡促进因子(p-Bad)、Bcl-2、Bax、caspase 3 蛋白的表达。结果 与 空白组相比, DOX 组兔的 LVDD、LVSD 均增大(均 P<0.01), LVEF、LVFS 均降低(均 P<0.01), HMI、LVMI 均升高(均P<0.01); 心肌细胞凋亡增加, 心肌细胞凋亡率升高(P<0.01); NT-proBNP、Hs-cTNI、Ang II、 ALD、ANP、BNP、cGMP、PKG水平和NPR-A、PDE5A(cGMP)、PKG、p-CREB、Bax、caspase 3 表达均升高 (均*P*<0.01), Bcl-2 表达降低(*P*<0.01), p-Bad 表达差异无统计学意义(*P*>0.05)。与DOX 组相比, DOX+ Sac/Val组和DOX+Val组的LVDD、LVSD均减小(均P<0.01),LVEF、LVFS均升高(均P<0.01),HMI、 LVMI 均降低(均 P<0.01); 心肌细胞凋亡减少, 心肌细胞凋亡率降低(P<0.01); NT-proBNP、Hs-cTNI、Ang II、 ALD、ANP、BNP、cGMP、PKG水平和NPR-A、PDE5A(cGMP)、PKG、Bax、caspase 3 表达均降低(均P<0.01), Bcl-2 表达均升高(均P<0.01); DOX+Sac/Val组的p-CREB、p-Bad表达均升高(均P<0.01),但DOX+Val组 p-CREB、p-Bad 无明显变化(均P>0.05)。与DOX+Val 组相比,DOX+Sac/Val 组上述指标中除 LVEF、LVFS、 *NPR-A*、ANP、BNP、cGMP、PDE5A(cGMP)、PKG、p-CREB、p-Bad、Bcl-2均升高外,其余指标均降低(均P<0.05)。 心肌组织病理学和透射电镜结果显示 Sac/Val 可有效保护心肌细胞、减少细胞凋亡、减轻心肌纤维化, 且该效果明显 优于 Val。结论 Sac/Val 可有效减少心力衰竭免心肌细胞凋亡,改善心脏功能及心肌纤维化,且该效果优于 Val,其 作用机制可能与活化 NPR-A/cGMP/PKG 信号通路和抑制肾素 - 血管紧张素 - 醛固酮系统有关。

[关键词] 沙库巴曲; 缬沙坦; 心力衰竭; 心肌细胞; 细胞凋亡; 心功能

[引用本文] 庄金龙,钱涛铭,林庚海,等.沙库巴曲/缬沙坦对心力衰竭兔心肌细胞的保护作用及机制研究[J].海 军军医大学学报,2025,46(3):360-373.DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240761.

Protective effects and mechanism of sacubitril/valsartan on cardiomyocytes of rabbits with heart failure

ZHUANG Jinlong^{1,2}, QIAN Taoming¹, LIN Genghai², CHEN Hua², RUAN Fahui², LIN Huiping², LIU Li^{1,3*}

1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, Heilongjiang, China

2. Department of Cardiovasology, Southeast Hospital Affiliated to Xiamen University, Zhangzhou 363000, Fujian, China

[收稿日期] 2024-11-10 [接受日期] 2025-01-03

[[]基金项目] 国家自然科学基金(82074346),福建省自然科学基金(2023J011835),漳州市自然科学基金(ZZ2018J14). Supported by National Natural Science Foundation of China (82074346), Natural Science Foundation of Fujian Province (2023J011835), and Natural Science Foundation of Zhangzhou (ZZ2018J14).

[[]作者简介] 庄金龙,博士生,副主任医师. E-mail: valen333@126.com

^{*}通信作者(Corresponding author). Tel: 0451-82111401, E-mail: liliu429@163.com

3. Department of Cardiovasology (I), The First Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, Heilongjiang, China

[Abstract] Objective To study the protective effects and mechanism of sacubitril (Sac)/valsartan (Val) on cardiomyocytes of rabbits with heart failure induced by doxorubicin (DOX). Methods Thirty New Zealand rabbits were selected to establish DOX-induced heart failure rabbit model. Twenty-five rabbits with successful modeling were randomly assigned to model group (DOX group, n=9), DOX+Val group (n=8), and DOX+Sac/Val group (n=8); and another 8 New Zealand rabbits were selected as blank group. The DOX+Val group was gavaged with 4.65 mg/kg Val suspension each time, the DOX+Sac/Val group was gavaged with 9.3 mg/kg Sac/Val suspension each time, and the blank group and DOX group were gavaged with equal volume of distilled water each time. Each group was gavaged twice a day for 8 weeks. After 8 weeks of administration, echocardiography was used to measure left ventricular end-diastolic diameter (LVDD), left ventricular end-systolic diameter (LVSD), left ventricular ejection fraction (LVEF), and left ventricular fractional shortening (LVFS). The heart mass index (HMI) and left ventricular mass index (LVMI) were calculated. The pathological morphology and myocardial fibrosis of myocardial tissue were observed by hematoxylin-eosin (H-E) and Masson staining. The ultrastructure of cardiomyocytes was observed by transmission electron microscope. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining was used to observe cardiomyocytes apoptosis and apoptosis rate was calculated. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP), high-sensitivity cardiac troponin I (Hs-cTNI), angiotensin II (Ang II), aldosterone (ALD), atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP), and protein kinase G (PKG) in serum. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to detect the expression of natriuretic peptide receptor A (NPR-A), cGMP-specific phosphodiesterase 5A (PDE5A [cGMP]), PKG, B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), and cysteine aspartate protease 3 (caspase 3) mRNA in myocardial tissue. Western blotting was used to detect the expression of phosphorylated cAMP response element-binding protein (p-CREB), phosphorylated Bcl-2 related death promoting factor (p-Bad), Bcl-2, Bax, and caspase 3 proteins in myocardial tissue. **Results** Compared with the blank group, the LVDD and LVSD in the DOX group were increased (both P < 0.01), the LVEF and LVFS were decreased (both $P \le 0.01$) and the HMI and LVMI were increased (both $P \le 0.01$); the apoptosis and apoptosis rate of cardiomyocytes were increased (P<0.01); the levels of NT-proBNP, Hs-cTNI, Ang II, ALD, ANP, BNP, cGMP and PKG and the expression of NPR-A, PDE5A (cGMP), PKG, p-CREB, Bax and caspase 3 were all increased (all $P \le 0.01$), while the expression of Bcl-2 was decreased ($P \le 0.01$), and the expression of p-Bad had no significant difference (P>0.05). Compared with the DOX group, the LVDD and LVSD of the DOX+Sac/Val group and DOX+Val group were decreased (all P<0.01), the LVEF and LVFS were increased (all P<0.01) and the HMI and the LVMI were decreased (all $P \le 0.01$); the apoptosis and apoptosis rate of cardiomyocytes were decreased (all $P \le 0.01$); the levels of NT-proBNP, Hs-cTNI, Ang II, ALD, ANP, BNP, cGMP and PKG and the expression of NPR-A, PDE5A (cGMP), PKG, Bax and caspase 3 were all decreased (all $P \le 0.01$), while the expression of Bcl-2 was increased ($P \le 0.01$); and the expression of p-CREB and p-Bad was increased in the DOX+Sac/Val group (both $P \le 0.01$), but there was no significant difference in the DOX+Val group (both P > 0.05). Compared with the DOX+Val group, the DOX+Sac/Val group showed a decrease in all indicators except for LVEF, LVFS, NPR-A, ANP, BNP, cGMP, PDE5A (cGMP), PKG, p-CREB, p-Bad, and Bcl-2, which were all elevated (all P<0.05). Myocardial pathology and transmission electron microscopy showed that Sac/Val effectively protected cardiomyocytes, reduced cardiomyocytes apoptosis and myocardial fibrosis, and these effects were significantly better than those of Val. Conclusion Sac/Val can effectively reduce cardiomyocytes apoptosis, improve cardiac function and reduce myocardial fibrosis in rabbits with heart failure, and these effects are superior to Val. Its mechanism may be related to activating the NPR-A/cGMP/PKG signaling pathway and inhibiting renin-angiotensin-aldosterone system.

[Key words] sacubitril; valsartan; heart failure; cardiomyocytes; apoptosis; cardiac function

[**Citation**] ZHUANG J, QIAN T, LIN G, et al. Protective effects and mechanism of sacubitril/valsartan on cardiomyocytes of rabbits with heart failure[J]. Acad J Naval Med Univ, 2025, 46(3): 360-373. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/ R.20240761.

心力衰竭(以下简称心衰)是由多种心脏疾病 引发心室舒缩功能障碍所导致的一组复杂临床综合 征,它是各种心血管疾病的危重表现或终末阶段, 是 21 世纪心血管领域的研究壁垒^[1]。近 10 年来, 全球在心衰的基础研究及临床治疗方面均取得了 诸多进步,药物治疗策略已从纠正血流动力学异常 转变为抑制神经内分泌异常激活,器械辅助装置也 延长了部分患者的生存期,但心衰人群的总体再住 院率和死亡率仍居高不下,且终末期治疗费用高、 预后差^[2]。全球心衰患者例数高达 0.38 亿, 欧美 发达国家成人的心衰患病率为 1.0%~2.0%^[3-4]。 中国成年人心衰患病率为1.3%,约有1370万例心 衰患者,其中左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF) <50%的患病率为1%,即以 LVEF 值降低的心衰为主^[5]。因此,目前临床上仍 迫切需要寻找更多的心衰治疗新靶点。基础研究 表明,神经内分泌介导的心肌重塑是心衰发生、发 展的主要病理机制, 而心肌细胞凋亡是其重要的病 理基础,除肾素-血管紧张素-醛固酮系统(reninangiotensin-aldosterone system, RAAS)和交感神 经系统激活外,利尿钠肽系统(natriuretic peptide system, NPS)的相对不足也是导致心衰进展的病 理因素^[2]。一直以来,干预心肌细胞凋亡是防治心 衰的重要靶点和关键策略,因此,探究心肌细胞凋 亡的分子调控机制具有重要的临床转化意义。

近10年来,全球在心衰治疗方面不断推出 新型药物,如沙库巴曲(sacubitril, Sac)/缬 沙坦(valsartan, Val)、达格列净、可溶性鸟 苷酸环化酶等,其中Sac/Val的临床获益最大, 循证医学证据最丰富。Sac/Val 是一种具有双重 抑制作用的新型钠盐晶体复合物,由脑啡肽酶 (neprilysin, NEP)抑制剂 Sac 和血管紧张素 Ⅱ 1 型 受 体 (angiotensin Ⅱ type 1 receptor, AT-1 受体)拮抗剂Val以摩尔比1:1结合而成。 Sac/Val 既可以通过 Val 高选择性拮抗 AT-1 受体 抑制 RAAS的活性,又能通过 Sac 抑制 NEP 活 性,减少NPS、缓激肽等血管活性物质的降解, 增加内源性NPS水平,促进利尿排钠,舒张血 管,降低RAAS及交感神经系统活性,减轻心肌 纤维化, 逆转心室重构, 从而改善心功能^[67]。 因此, Sac/Val已被欧美及中国心衰指南推荐为急 慢性心衰的优选治疗药物^[2,8-9],且列为 IA类证 据推荐使用。目前 Sac/Val 的临床循证医学证据丰 富,但其协同保护心肌、逆转心肌重塑的分子调控 机制研究甚少。尽管现有研究已表明 Sac/Val 具有 抑制心肌细胞凋亡、逆转心肌重塑、改善心功能的 作用^[10-11],但其调控心肌细胞凋亡的分子机制仍不 清楚。本研究利用多柔比星(doxorubicin, DOX) 构建心衰兔模型,观察 Sac/Val 对心衰兔的心脏功 能、心肌细胞凋亡及纤维化、NPS 及 RAAS 的影响, 并探究 Sac/Val 保护心肌的作用是否与活化利尿钠 肽受体(natriuretic peptide receptor, NPR)-A/环磷 酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)/ 蛋白激酶G(protein kinase G, PKG)信号通路和 抑制 RAAS 有关,旨在为 Sac/Val 临床治疗心衰提 供更多分子层面的基础研究依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物与药物 38 只 8~10 周龄清洁级雄 性新西兰兔,体重(2.5±0.5)kg,购自上海市松 江区车墩实验动物良种场有限公司,实验动物生产 许可证号: SCXK (沪) 2017-0003。本实验方案获 得厦门大学附属东南医院伦理委员会审批(编号: DWLL202308)。Sac/Val、Val购自北京诺华制药股 份有限公司, DOX 购自浙江海正药业股份有限公司。 1.2 试剂与仪器 苏木精和伊红染色液(北京益 利精细化学品有限公司), TUNEL 检测试剂盒(上 海碧云天生物技术有限公司),兔氨基末端脑利尿 钠肽前体 (N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP)、兔血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ) ELISA 检测试剂盒(武汉科鹿生物科技 有限公司), 免高敏心肌肌钙蛋白I(high-sensitivity cardiac troponin I, Hs-cTNI) ELISA 检测试剂盒 (美国 Life Diagnostics 公司),马松三色染色液、 兔醛固酮(aldosterone, ALD)、兔心房利尿钠肽 (atrial natriuretic peptide, ANP)、兔脑利尿钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP)、兔 cGMP、兔 PKG 等 ELISA 检测试剂盒(上海通蔚实业有限公 司),两步法荧光定量PCR试剂盒、TRIzol试剂 盒、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(上海诺伦生物医 药技术有限公司), PCR 引物、ECL 超敏发光液(上 海艾博思生物科技有限公司), PVDF转移膜(美 国 Millipore 公司), HRP 标记的山羊抗兔 IgG(美 国 Jackson 公司),磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋 白 (phosphorylated cAMP response element-binding protein, p-CREB)、磷酸化Bcl-2相关死亡促进 因子 (phosphorylated Bcl-2 related death promoting factor, p-Bad)、Bcl-2、Bax、caspase 3 等抗体(美 国 Cell Signaling Technology 公司)。iU22 型心脏 彩色多普勒超声仪(荷兰 Philips 公司, 探头频率 8 MHz), ST5020 多功能染色封片一体机、RM2245 切片机、DW4-B型生物显微镜(德国Leica公司),

JEM-1220型透射电镜(日本 Hitachi 公司), Eclipse C1 倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司), Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪(美国 Agilent 公司), DY-B1 脱色摇床(上海青浦沪西仪器厂), VE-180 垂直电 泳槽(上海天能科技有限公司), PowerPac[™] HC 电泳仪、170-3940型半干转印槽、XR+凝胶成像分 析系统(美国 Bio-Rad 公司), Gel-Pro Analyzer 分 析软件(美国 Media Cybernetics 公司)。

1.3 方法

1.3.1 心衰动物模型的建立 参考既往研究^[12],

38 只清洁级雄性新西兰兔适应性喂养1周后,采 用随机数字表法选取30只进行DOX诱导心衰造 模,每次用配制好的1.0 mg/mLDOX 溶液以1.25 mg/kg的剂量进行耳缘静脉注射,余下8只为空白 组,予等量的生理盐水进行耳缘静脉注射;两组均 每周注射2次,连续6周。造模组兔大部分表现为 精神萎靡、少动、进食少、脱毛等,其中6只出现 DOX 注射侧耳内化脓、破溃(中耳炎可能),均 采取局部消毒、排脓处理。造模6周后用超声心动 图评估心功能并检测 NT-proBNP 水平,以LVEF< 45%、NT-proBNP 水平显著升高判断心衰兔模型 成功建立,最终成功制备心衰模型兔25 只,死亡 4 只,未成模1只。

1.3.2 实验分组及干预 将25只心衰模型兔随机 分为3组:模型组(DOX组,9只)、Val干预组 (DOX+Val组,8只)、Sac/Val干预组(DOX+ Sac/Val组,8只);参照文献方法^[13]并根据人与动 物间体表面积折算得出兔的等效剂量,DOX+Val组 每次灌胃Val混悬液4.65 mg/kg,DOX+Sac/Val组每 次灌胃Sac/Val混悬液9.3 mg/kg,空白组及DOX 组每次灌胃等体积的蒸馏水,各组均每日灌胃 2次,连续8周;在药物干预过程中,DOX组死亡 3只,DOX+Val组和DOX+Sac/Val组各死亡1只。 为了实验数据统一和利于统计分析,故最终空白 组、DOX+Val组和DOX+Sac/Val组各随机选取 6只实验兔。

1.3.3 超声心动图检查 药物干预 8 周后,实验兔 禁食不禁水 12 h,称重后经耳缘静脉注射 20% 乌 拉坦(5 mg/kg)麻醉,仰卧位固定,胸前脱毛,用 8 MHz 高频探头置于左胸骨旁,显示左心室长 轴切面,获得 M 型超声心动图,测定左心室舒张 末期内径(left ventricular end-diastolic diameter,

LVDD)和左心室收缩末期内径(left ventricular end-systolic diameter, LVSD),应用Teichholtz公 式计算LVEF和左心室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS)。连续记录3个心动 周期的数据,取其平均值。

1.3.4 标本采集、心脏重量指数测定和组织病理学 观察 待实验兔心脏功能评估完成后,予腹主动脉 采血 20 mL,静置、离心,取血清,置于-20 ℃冰 箱保存,以备后续 ELISA 检测相关指标。采血后立 即处死兔,快速剪开胸腔并取出心脏,用冰盐水冲 洗后于冰上剪除心包膜、血管等组织,滤纸拭干后 称量全心重量,剪除左心房及右心后称量左心室重 量(left ventricular mass, LVM),分别计算全心 重量指数(heart mass index, HMI; HMI=全心重 量/体重)和左心室重量指数(left ventricular mass index, LVMI; LVMI=左心室重量/体重)。

取兔左心室心肌组织,用4%多聚甲醛溶液固定,经脱水、浸蜡、包埋、切片后,行常规H-E和马松染色、封片,每个标本取5张切片,在光学显微镜下观察心肌组织形态及纤维化情况并采集图像。

1.3.5 透射电镜观察 取兔左心室心肌组织,用 2.5%戊二醛溶液固定,PBS漂洗3次,经1%锇酸 固定、梯度乙醇脱水、环氧树脂包埋、超薄切片 后,每个标本取5张切片,在透射电镜下观察心肌 细胞超微结构并采集图像。

1.3.6 TUNEL 检测观察 取 1.3.4 项制作的兔左 心室心肌组织石蜡切片,常规脱蜡至水后,用蛋白 酶 K 工 作液 37 ℃ 孵育 30 min, PBS 洗涤 5 min× 3 次,加入破膜工作液常温下孵育 25 min, PBS 洗涤 5 min×3 次;参照 TUNEL 检测试剂盒说明书加入 适量染色液,37 ℃ 孵育 3~4 h, PBS 洗涤 5 min× 3 次,加入 DAPI 染液,避光室温孵育 10 min, PBS 洗涤 5 min×3 次,甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片;在 Eclipse C1 倒置荧光显微镜下观察并采集图像,用 ImageJ 软件进行图片分析,计算心肌细胞凋亡率:心肌细胞凋亡率(%)=TUNEL 染色阳性细胞核数 量/全部细胞核数量×100%。

1.3.7 ELISA 检测 取 1.3.4 项采集的兔血清, 严格按 照兔 ELISA 检测试剂盒说明书分别检测 NT-proBNP、 Hs-cTNI、Ang Ⅱ、ALD、ANP、BNP、cGMP、PKG 水平。

1.3.8 qPCR 检测 取兔左心室心肌组织 100 mg,

加入TRIzol裂解液研磨、匀浆,提取总RNA,测 定 RNA 浓度、纯度,反转录合成 cDNA,按照两步 法荧光定量 PCR (SYBR Green) 试剂盒说明书. 用荧光定量 PCR 仪进行扩增。引物序列: NPR-A 正向引物 5'-TCTGAACTACAACGGAACTT-3', 反向引物 5'-AGACGATGAGAATGCTGAG-3'; cGMP 特 异 性 磷 酸 二 酯 酶 5A [cGMP-specific phosphodiesterase 5A, PDE5A (cGMP)]正向引物 5'-AAGCAGGCAAGATTCAGAACAAG-3',反向引 物 5'-CTGGGCTGTTTAGAACCATCAA-3'; PKG 正 向 引 物 5'-GGCTGTCAGAGAAGGAGGA-GGAA-3',反向引物 5'-TGTCGCAGGTCGTGGA-AGGA-3'; Bcl-2 正向引物 5'-GTGCGGCCTCTGT-CAGACTTCT-3',反向引物 5'-CCGAGGGTGATG-CAAGCTCCTA-3'; Bax 正向引物 5'-TTATGGGCT-GGACGCTGGACTT-3',反向引物 5'-AGATGGTG-AGTGAGGCGGTGAG-3'; caspase 3 正向引物 5'-GCCAGAAAATACCGGTTGAA-3',反向引物5'-GTGGCATCAAGGGAATAGGA-3'; β-肌动蛋白 (β-actin) 正向引物 5'-AGCACCATGAAGATCA-AGAT-3',反向引物5'-CCGACTCGTCATACTC-CT-3'。以 β -actin 为内参, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 NPR-A、 PDE5A (cGMP) , PKG, Bcl-2, Bax, caspase 3 mRNA 的相对表达量。

1.3.9 蛋白质印迹法检测 取兔左心室心肌组 织 150 mg,加入预冷的 RIPA 裂解液,匀浆、裂解、离心,提取组织总蛋白;每孔上样 25 μg 进行 SDS-PAGE,电泳分离后,将蛋白质转移至 PVDF 膜、封闭;加入 p-CREB、 p-Bad、Bcl-2、

Bax、caspase 3 抗体(稀释比例均为1:1000), 以 β-actin 作为内参照,4℃孵育过夜,TBST洗 涤 10 min×3次;加入HRP标记的二抗(稀释比 例为1:1000),37℃孵育 90 min,TBST洗涤 10 min×3次;用ECL超敏发光液处理后,暗室内曝 光、显影、固定,用XR+凝胶成像分析系统拍照。 用Gel-Pro Analyzer软件进行分析,计算 p-CREB、 p-Bad、Bcl-2、Bax、caspase 3 蛋白条带灰度值与β-actin 蛋白条带灰度值的比值,作为其相对表达量。 1.4 统计学处理 应用 SPSS 28.0 软件进行统计学 分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较用单因素 方差分析,两两比较采用最小显著性差异法。检验 水准(α)为 0.05。

2 结 果

2.1 各组兔心脏重量指数 与空白组相比, DOX 组兔的 HMI、LVMI 均升高(均P<0.01);与DOX 组相比, DOX+Sac/Val组和DOX+Val组兔的 HMI、LVMI 均降低(均P<0.01),其中DOX+Sac/Val组兔的上述指标又低于DOX+Val组(均P<0.01)。见图1。</p>

2.2 各组免超声心电图检查结果 与空白组相比, DOX组兔的LVDD、LVSD均增大(均P<0.01), LVEF、LVFS均降低(均P<0.01);与DOX组相比, DOX+Sac/Val组和DOX+Val组兔的LVDD、LVSD 均减小(均P<0.01),LVEF、LVFS均升高(均P<0.01);DOX+Sac/Val组兔的上述指标较DOX+ Val组差异均有统计学意义(P<0.01或P<0.05)。见图 2。





**P < 0.01. n = 6, $\bar{x} \pm s$. HMI: Heart mass index; LVMI: Left ventricular mass index; DOX: Doxorubicin; Val: Valsartan; Sac: Sacubitril.



Fig 2 Echocardiography results of rabbits in each group

A: Changes of echocardiography; B-E: Changes of specific parameters of echocardiography. ${}^{*}P < 0.05$, ${}^{**}P < 0.01$. n=6, $\bar{x} \pm s$. DOX: Doxorubicin; Val: Valsartan; Sac: Sacubitril; LVDD: Left ventricular end-diastolic diameter; LVSD: Left ventricular end-systolic diameter; LVEF: Left ventricular ejection fraction; LVFS: Left ventricular fractional shortening.

2.3 各组兔血清 NT-proBNP、Hs-cTNI 水平 ELISA 检测结果(图3)显示,与空白组相比,DOX组 兔血清 NT-proBNP、Hs-cTNI 水平均升高(均P<0.01);与DOX组相比,DOX+Sac/Val组和DOX+ Val组兔血清 NT-proBNP、Hs-cTNI 水平均降低(均 P<0.01),其中DOX+Sac/Val组兔的上述指标又 均低于DOX+Val组(均P<0.01)。

2.4 各组兔心肌组织病理形态改变 H-E染色结 果(图4)显示,空白组兔心肌细胞排列整齐,结 构清楚,未见变性、坏死,间质无水肿。DOX组兔 心肌细胞排列紊乱,部分坏死,细胞核丢失,肌纤 维断裂,间质水肿。DOX+Val组兔心肌细胞排列 稍紊乱,肥大、分离,肌纤维部分断裂,细胞核部 分丢失,间质稍水肿。DOX+Sac/Val组兔心肌细 胞排列相对较齐,结构尚清楚,肌纤维稍紊乱,间 质无水肿。

马松染色结果(图5)显示,空白组兔心肌组织 排列整齐,见少量条索状蓝色胶原纤维。DOX组兔 心肌组织排列紊乱,纤维化明显,可见大量片状蓝色 胶原纤维增生。DOX+Val组兔心肌组织排列稍紊 乱,纤维化较DOX组减轻,可见较多小片状蓝色胶 原纤维增生。DOX+Sac/Val组兔心肌组织排列较齐, 纤维化较DOX组明显减轻,可见散在小灶状或条索 状蓝色胶原纤维增生。



图 3 各组兔血清 NT-proBNP、Hs-cTNI 水平比较

Fig 3 Comparison of serum NT-proBNP and Hs-cTNI levels of rabbits in each group

**P < 0.01. n = 6, $\bar{x} \pm s$. NT-proBNP: N-terminal brain natriuretic peptide; Hs-cTNI: High-sensitivity cardiac troponin I; DOX: Doxorubicin; Val: Valsartan; Sac: Sacubitril.



图 4 各组兔心肌组织病理形态观察(H-E 染色, 400×)

Fig 4Pathological morphology of myocardial tissue of rabbits in each group (H-E staining, 400×)H-E: Hematoxylin-eosin; DOX: Doxorubicin; Val: Valsartan; Sac: Sacubitril.





2.5 各组兔心肌细胞超微结构 透射电镜检查结 果(图6)显示,空白组兔心肌细胞线粒体排列 整齐,结构完整,内嵴清晰,肌纤维明暗带清楚; DOX组兔心肌细胞线粒体排列紊乱、肿胀,结构 不完整、部分溶解,内嵴严重溶解、断裂,肌纤维 严重溶解,明暗带不清; DOX+Val组兔心肌细胞 线粒体排列稍紊乱,部分内嵴溶解,肌纤维部分溶 解,明暗带清楚;DOX+Sac/Val组兔心肌细胞线 粒体排列较齐,无明显肿胀,结构尚完整,大部分 内嵴清晰、极少溶解,肌纤维稍溶解,明暗带清楚。 2.6 各组兔心肌细胞凋亡情况 TUNEL检测结果 (图7)显示,与空白组相比,DOX组兔心肌细胞 凋亡率升高(P<0.01);与DOX组相比,DOX+Sac/Val组和DOX+Val组兔心肌细胞凋亡率均降

低(均*P*<0.01),其中DOX+Sac/Val组兔心肌 细胞凋亡率低于DOX+Val组(*P*<0.01)。





Fig 6 Ultrastructure of cardiomyocytes of rabbits in each group (transmission electron microscope, 11 500×) DOX: Doxorubicin; Val: Valsartan; Sac: Sacubitril.





Fig 7 Apoptosis status of cardiomyocytes of rabbits in each group

A: TUNEL images; B: The cardiomyocytes apoptosis rate. ${}^{**}P < 0.01$. n=6, $\bar{x} \pm s$. DOX: Doxorubicin; Val: Valsartan; Sac: Sacubitril; TUNEL: Terminal dexynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

2.7 各组兔血清Ang II、ALD、ANP、BNP、 cGMP、PKG水平比较 ELISA 检测结果(图8)显示,与空白组相比,DOX组兔血清Ang II、ALD、 ANP、BNP、cGMP、PKG水平均升高(均P<0.01); 与DOX组相比,DOX+Sac/Val组和DOX+Val组兔 血清Ang II、ALD、ANP、BNP、cGMP、PKG水平 均降低(均P<0.01);DOX+Sac/Val组兔血清 Ang II、ALD水平较DOX+Val组均降低(均P<0.01),而ANP、BNP、cGMP、PKG水平均升高(均P<0.01)。

2.8 各组兔心肌组织 NPR-A、PDE5A (cGMP)、 PKG、Bcl-2、Bax、caspase 3 mRNA 的表达 gPCR 检测结果(图 9)显示,与空白组相比,DOX组 兔心肌组织*NPR-A、PDE5A*(*cGMP*)、*PKG*、 *Bax、caspase 3* mRNA表达均升高(均P<0.01), *Bcl-2* mRNA表达降低(P<0.01);与DOX组相 比,DOX+Sac/Val组和DOX+Val组兔心肌组织 *NPR-A、PDE5A*(*cGMP*)、*PKG、Bax、caspase 3* mRNA表达均降低(均P<0.01),*Bcl-2* mRNA 表达均升高(均P<0.01);DOX+Sac/Val组兔 心肌组织*Bax、caspase 3* mRNA表达较DOX+ Val组均降低(均P<0.01),而*NPR-A、PDE5A*(*cGMP*)、*PKG、Bcl-2* mRNA 表达均升高(均P<0.01), m*NPR-A、PDE5A*(*cGMP*)、*PKG、Bcl-2* mRNA表达均升高(均P<0.01),



图 8 各组兔血清 AngⅡ、ALD、ANP、BNP、cGMP、PKG 水平比较

Fig 8 Comparison of serum Ang II, ALD, ANP, BNP, cGMP, and PKG levels of rabbits in each group

**P < 0.01. n=6, $\bar{x} \pm s$. Ang II : Angiotensin II ; ALD: Aldosterone; ANP: Atrial natriuretic peptide; BNP: Brain natriuretic peptide; cGMP: Cyclic guanosine monophosphate; PKG: Protein kinase G; DOX: Doxorubicin; Val: Valsartan; Sac: Sacubitril.

各组免心肌组织p-CREB、p-Bad、Bcl-2、 2.9 Bax、caspase 3 蛋白的表达 蛋白质印迹法检测结 果(图 10)显示,与空白组相比,DOX组兔心肌 组织 p-CREB、Bax、caspase 3 蛋白表达均升高(均 P<0.01), Bcl-2蛋白表达降低(P<0.01), p-Bad 蛋白表达差异无统计学意义(P>0.05);与DOX 组相比, DOX+Sac/Val组和DOX+Val组兔心肌 组织Bax、caspase 3 蛋白表达均降低(均P < 0.01), Bcl-2 蛋白表达均升高(均*P*<0.01), DOX+ Sac/Val 组兔心肌组织 p-CREB、p-Bad 蛋白表达均 升高(均P < 0.01),而DOX+Val组兔心肌组织 p-CREB、p-Bad蛋白表达差异无统计学意义(均 P>0.05); 与DOX+Val组相比, DOX+Sac/Val 组兔心肌组织 Bax、caspase 3 蛋白表达均降低(均 P<0.01),而p-CREB、p-Bad、Bcl-2蛋白表达均 升高(均P<0.01)。

3 讨 论

心衰的发生、发展机制一直是全球心血管领域 的研究热点与难点。目前研究认为,以神经内分泌 系统异常激活介导的心肌重塑是心衰的主要病理生 理机制,而心肌细胞凋亡是其重要的病理基础,是 心肌细胞丢失的主要原因,也是心功能走向失代偿 的关键环节^[2]。凋亡的心肌细胞被大量心肌成纤 维细胞及胶原纤维所取代,引起心肌重塑,最终导 致心衰,是多种心血管疾病的共同病理改变^[14]。 探究心肌细胞凋亡的分子调控机制有助于发现关键 的靶点并研发干预靶点的有效药物,从而抑制心肌 细胞凋亡,为临床改善心功能、延缓心衰进展的治 疗提供新方法。



图 9 qPCR 检测各组兔心肌组织 NPR-A、PDE5A (cGMP)、PKG、Bcl-2、Bax、caspase 3 mRNA 的表达 Fig 9 Expression of NPR-A, PDE5A (cGMP), PKG, Bcl-2, Bax and caspase 3 mRNA in myocardial tissue of rabbits in each group detected by qPCR

**P < 0.01. n=6, $\bar{x} \pm s$. qPCR: Quantitative polymerase chain reaction; NPR-A: Natriuretic peptide receptor A; PDE5A (cGMP): cGMP-specific phosphodiesterase 5A; PKG: Protein kinase G; Bcl-2: B-cell lymphoma 2; Bax: Bcl-2 associated X protein; caspase 3: Cysteine aspartate protease 3; DOX: Doxorubicin; Val: Valsartan; Sac: Sacubitril.

NT-proBNP是目前各国心衰防治指南推荐的 重要生物学标志物,为心衰的诊断、病情及临床 疗效评估提供了重要的实验室依据,其升高程度 与心衰的严重程度呈正相关^[15]。Hs-cTnI是特异 性的心肌肌钙蛋白,可作为心衰患者的病因诊断 和预后评估指标,与心衰病情显著相关,其动态 变化是心衰患者预后不良的重要体现^[16]。本研究 对实验兔进行了心肌组织H-E染色、马松染色及 TUNEL检测,观察心肌组织病理形态、纤维化程 度及心肌细胞凋亡情况,通过超声心动图检测心脏 功能(LVEF、LVFS),并检测 NT-proBNP、HscTnI、NPS、RAAS水平及凋亡相关基因和蛋白的 表达情况。结果显示,与空白组相比,DOX 组兔 的血清 NT-proBNP、Hs-cTnI 水平及心肌细胞凋亡 率明显升高,LVEF、LVFS 却明显降低,提示心衰 病程中存在显著的心肌细胞凋亡,引起心肌细胞大 量丢失,加重心肌纤维化,导致心肌重塑,最终引 起心脏功能显著下降及心肌损伤,这一结果符合心 衰的病理生理改变。与DOX 组相比,经 Val 和 Sac/ Val (含有同等剂量 Val)干预后心衰兔的心肌细胞 凋亡率明显降低,且血清 NT-proBNP、Hs-cTnI 水 平也明显下降,而LVEF、LVFS 却明显升高,其中 DOX+Sac/Val 组效果更显著,提示心衰时心肌细 胞凋亡程度与心功能存在负相关关系,Sac/Val 可 有效抑制心衰兔的心肌细胞凋亡、减少心肌细胞丢 失,进而减轻心肌纤维化,改善心脏功能,这与相 关研究^[17-18]结果大致相符。



图 10 蛋白质印迹法检测各组兔心肌组织 p-CREB、p-Bad、Bcl-2、Bax、caspase 3 蛋白的表达 Fig 10 Expression of p-CREB, p-Bad, Bcl-2, Bax, and caspase 3 proteins in myocardial tissue of rabbits in each group detected by Western blotting

^{**}P < 0.01. n=6, $\bar{x} \pm s$. p-CREB: Phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein; p-Bad: Phosphorylated Bcl-2 related death promoting factor; Bcl-2: B-cell lymphoma 2; Bax: Bcl-2 associated X protein; caspase 3: Cysteine aspartate protease 3; DOX: Doxorubicin; Val: Valsartan; Sac: Sacubitril.

既往研究表明, RAAS 的激活在心衰的心肌重 塑中发挥着关键作用, RAAS 激活后使 Ang I 转化 为 Ang II 并激活 ALD^[19-20]。Ang II 是目前公认诱导 心肌细胞凋亡的主要效应物质,其主要机制如下: (1) Ang II 可直接作用于 AT-1 受体,激活钙调蛋白 依赖性蛋白激酶, 促发心肌细胞凋亡; (2) Ang II 可通过刺激血管平滑肌细胞分泌血小板源性生长因 子、碱性成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子 和内皮素等,进而影响凋亡相关基因如同型半胱氨 酸诱导基因 2、p21、p27、p38、p53等的表达而促 进心肌细胞凋亡; (3) Ang II 与 AT-1 受体相结合 后还促使线粒体 Bax 的表达增多, Bcl-2 表达减少 且功能下降, Bax/Bcl-2 比值增高, 促进心肌细胞凋 亡^[21]。ALD 引起心肌重塑的一个重要机制也是诱 发心肌细胞凋亡。研究表明,ALD 可诱导心肌细胞 Ca²⁺内流增加,激活钙蛋白酶,进而活化 Bid,引起细胞色素 C 从线粒体释放,从而诱导 caspase 3 活化,最终导致心肌细胞凋亡^[22];ALD 还可上调 心肌氧化应激水平,过多活性氧可上调 Bax 表达,下调 Bcl-2 表达,促进线粒体通路介导的心肌细胞 凋亡^[23-24]。本研究结果显示,DOX 组兔 Ang II、ALD 水平和 Bax、caspase 3 的表达均较空白组明显 升高,Bcl-2 的表达明显降低,其心肌细胞凋亡也 明显加重,提示心衰进程中存在 RAAS 的激活,促进 Ang II、ALD 分泌增多,诱导心肌细胞凋亡;而 经 Val 和 Sac/Val 干预的心衰兔的 Ang II、ALD 水平和 Bax、caspase 3 的表达均较 DOX 组明显降低,Bcl-2 的表达明显升高,心肌细胞凋亡也明显减少,

其中 DOX+Sac/Val 组的效果更显著。上述结果提示 Val 通过阻断 AT-1 受体降低 Ang II、ALD 水平,进而降低 Bax、caspase 3 的表达,上调 Bcl-2 的表达,从而减少心肌细胞凋亡,与既往研究^[25-26]结果相似。至于 DOX+Sac/Val 组减少心肌细胞凋亡的效果明显优于 DOX+Val 组,与其含有的另一成分Sac 通过抑制 NEP 活性减少 NPS 降解、升高内源性NPS 浓度有关。

NPS 是神经内分泌系统的另一重要成员,主要 包括 ANP、BNP、C 型利尿钠肽(C-type natriuretic peptide, CNP)和3种对应受体NPR-A、NPR-B 和NPR-C, ANP、BNP主要由心房和心室的心肌 细胞分泌, CNP 主要由血管内皮细胞分泌, 循环中 的 CNP 浓度非常低^[27]。研究发现, ANP、BNP 均 可有效结合 NPR-A 催化鸟苷三磷酸形成 cGMP, 而 cGMP 是细胞内重要的第二信使,其信号转导 的主要介质是 PKG, PKG 可使下游多种细胞内蛋 白质磷酸化而发挥多种心血管保护作用^[28]。NPS 主要是被 NEP 降解, NEP 抑制剂通过抑制 NEP 减 少对 NPS 的降解从而增加内源性 NPS 浓度, 升高 的 ANP、BNP 与 NPR-A 有效结合后通过鸟苷酸环 化酶促进cGMP的生成,进一步激活cGMP/PKG 通路; cGMP/PKG 信号通路广泛存在于心肌细胞 内,其参与心衰的重要机制之一是抑制心肌细胞凋 亡,细胞内PKG升高后可进一步磷酸化CREB和 Bad, p-CREB 使抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达增加, 而 p-Bad 降低细胞色素 C 的释放, 最终两者一起降低 caspase 3 的表达从而抑制心肌细胞凋亡^[29]。本研 究结果显示, DOX组兔的ANP、BNP、cGMP、 PKG水平及NPR-A、PDE5A(cGMP)、PKG、p-CREB 的表达均较空白组升高,这与心衰时左心负荷增加 导致左心房和左心室心肌细胞分泌的 ANP、BNP 增多有关,但其Bax、caspase 3 的表达和心肌细胞 凋亡程度非但没有降低却反而明显升高, Bcl-2 的 表达明显降低,这可能与心衰时 NPS 病理性升高 的程度远远不足以抵抗 RAAS 的激活有关;而经 Val 干预的心衰兔虽然 p-CREB、p-Bad 的表达与 DOX组比较无明显差异,但Bax、caspase 3 的表 达和心肌细胞凋亡程度却有明显降低, Bcl-2 的表 达也明显升高,这可能与 Val 通过阻断 AT-1 受体降 低Ang II及ALD水平起到抑制 RASS 激活,进而 下调Bax、caspase 3 的表达,上调Bcl-2 的表达,

从而减轻心肌细胞凋亡、改善心功能有关,而心 功能的改善又反馈性降低心衰兔的ANP、BNP、 cGMP、PKG水平及NPR-A、PDE5A(cGMP)、 PKG的表达;经Sac/Val干预后心衰兔的p-CREB、 p-Bad、Bcl-2的表达均较DOX组明显升高,Bax、 caspase 3的表达和心肌细胞凋亡程度均明显降低, 该效果明显优于DOX+Val组,而ANP、BNP、 cGMP、PKG水平及NPR-A、PDE5A(cGMP)、 PKG的表达均较DOX+Val组明显升高,其原因 可能是Sac/Val中另一成分Sac可抑制NEP活性, 减少NPS降解、升高血清ANP和BNP浓度,而 ANP、BNP与NPR-A结合后激活 cGMP/PKG通路, 进而抑制线粒体凋亡通路、减少心肌细胞凋亡,这 一结果与相关文献报道^[30-31]相似。

综上所述,本研究通过构建 DOX 诱导的心衰 兔模型,观察了 Sac/Val 对心衰兔的心脏功能、心 肌细胞凋亡、RAAS、NPS 及 NPR-A/cGMP/PKG 通路的影响,结果提示 Sac/Val 中 Sac 和 Val 这 2 种 成分协同作用,在阻断 RAAS 的同时上调 NPS,从 而双重抑制心肌细胞凋亡: Sac 可通过抑制 NEP 活 性减少 NPS 的降解,而增多的内源性 ANP、BNP 进一步激活 NPR-A/cGMP/PKG 信号通路,上调 p-CREB、p-Bad 的表达,从而降低 Bax、caspase 3 的表达,上调 Bcl-2 的表达; Val 可通过高选择性 阻断 AT-1 受体,抑制 Ang II 生成及 Ang II 依赖性 ALD 的释放,从而降低 Bax、caspase 3 的表达,上 调 Bcl-2 的表达。Sac 和 Val 两者协同抑制线粒体 凋亡通路的表达,减少心肌细胞凋亡,从而减轻心 肌纤维化,最终逆转心肌重塑、改善心脏功能。

本研究存在一定的局限性: (1)未进一步行 NPR-A/cGMP/PKG分子通路抑制剂的干预; (2)心 肌重塑是一个复杂的过程,未进一步探讨心肌纤维 化的相关机制; (3)采用 DOX 建模,未在 DOX 导致心脏毒性的常见机制——氧化应激方面做相关 探讨。未来课题组拟进一步完善分子通路抑制剂的 干预及纤维化机制研究, 拟从氧化应激方面进一步 探究 Sac/Val 与心肌细胞凋亡的相关性。

[参 考 文 献]

[1] AMBROSY A P, FONAROW G C, BUTLER J, et al. The global health and economic burden of hospitalizations for heart failure: lessons learned from hospitalized heart failure registries[J]. J Am Coll Cardiol, 2014, 63(12):

1123-1133. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.11.053.

- MCDONAGH T A, METRA M, ADAMO M, et al. 2021
 ESC guidelines for the diagnosis and treatment of years acute and chronic heart failure[J]. Eur Heart J, 2021, 42(36): 3599-3726. DOI: 10.1093/eurheartj/ehab368.
- [3] GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. Lancet, 2018, 392(10159): 1789-1858. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32279-7.
- [4] VIRANI S S, ALONSO A, BENJAMIN E J, et al. Heart disease and stroke statistics-2020 update: a report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2020, 141(9): e139-e596. DOI: 10.1161/ CIR.000000000000757.
- [5] HAO G, WANG X, CHEN Z, et al. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in China: the China Hypertension Survey, 2012-2015[J]. Eur J Heart Fail, 2019, 21(11): 1329-1337. DOI: 10.1002/ejhf.1629.
- [6] VOLPE M, BAUERSACHS J, BAYÉS-GENÍS A, et al. Sacubitril/valsartan for the management of heart failure: a perspective viewpoint on current evidence[J]. Int J Cardiol, 2021, 327: 138-145. DOI: 10.1016/j.ijcard. 2020.11.071.
- BOZKURT B, NAIR A P, MISRA A, et al. Neprilysin inhibitors in heart failure: the science, mechanism of action, clinical studies, and unanswered questions[J].
 JACC Basic Transl Sci, 2022, 8(1): 88-105. DOI: 10.1016/j.jacbts.2022.05.010.Cardiology.
- [8] HEIDENREICH P A, BOZKURT B, AGUILAR
 D, et al. 2022 AHA/ACC/HFSA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on clinical practice guidelines[J].
 Circulation, 2022, 145(18): e895-e1032. DOI: 10.1161/CIR.00000000001063.
- [9] 中华医学会心血管病学分会,中国医师协会心血管 内科医师分会,中国医师协会心力衰竭专业委员会,
 等.中国心力衰竭诊断和治疗指南 2024[J]. 中华心血 管病杂志,2024,52(3):235-275.DOI: 10. 3760/cma. j.cn112148-20231101-00405.
- BURKE R M, LIGHTHOUSE J K, MICKELSEN D M, et al. Sacubitril/valsartan decreases cardiac fibrosis in left ventricle pressure overload by restoring PKG signaling in cardiac fibroblasts[J]. Circ Heart Fail, 2019, 12(4): e005565. DOI: 10.1161/ CIRCHEARTFAILURE.118.005565.
- [11] VON LUEDER T G, WANG B H, KOMPA A R, et al. Angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696

attenuates cardiac remodeling and dysfunction after myocardial infarction by reducing cardiac fibrosis and hypertrophy[J]. Circ Heart Fail, 2015, 8(1): 71-78. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001785.

- [12] CHEN X, CAI H, CHEN Q, et al. Effects of Wenyangzhenshuai granule on ERK1/2 and ERK5 activity in the myocardial tissue in a rabbit model of adriamycin-induced chronic heart failure[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11): 20732-20741.
- TORRADO J, CAIN C, MAURO A G, et al. Sacubitril/ valsartan averts adverse post-infarction ventricular remodeling and preserves systolic function in rabbits[J].
 J Am Coll Cardiol, 2018, 72(19): 2342-2356. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.07.102.
- [14] STRATTON M S, MCKINSEY T A. Epigenetic regulation of cardiac fibrosis[J]. J Mol Cell Cardiol, 2016, 92: 206-213. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2016.02.011
- [15] BOOTH R A, HILL S A, DON-WAUCHOPE A, et al. Performance of BNP and NT-proBNP for diagnosis of heart failure in primary care patients: a systematic review[J]. Heart Fail Rev, 2014, 19(4): 439-451. DOI: 10.1007/s10741-014-9445-8.
- [16] DE BOER R A, PINTO Y M, VAN VELDHUISEN D J. The imbalance between oxygen demand and supply as a potential mechanism in the pathophysiology of heart failure: the role of microvascular growth and abnormalities[J]. Microcirculation, 2003, 10(2): 113-126. DOI: 10.1038/sj.mn.7800188.
- [17] GE Q, ZHAO L, REN X M, et al. LCZ696, an angiotensin receptor-neprilysin inhibitor, ameliorates diabetic cardiomyopathy by inhibiting inflammation, oxidative stress and apoptosis[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2019, 244(12): 1028-1039. DOI: 10.1177/1535370219861283.
- KIM B S, PARK I H, LEE H, et al. Sacubitril/valsartan reduces endoplasmic reticulum stress in a rat model of doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. Arch Toxicol, 2022, 96 (4): 1065-1074. DOI: 10.1007/s00204-022-03241-1.
- [19] BARAUNA V G, MAGALHAES F C, KRIEGER J E, et al. AT1 receptor participates in the cardiac hypertrophy induced by resistance training in rats[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008, 295(2): R381-R387. DOI: 10.1152/ajpregu.00933.2007.
- [20] 国家卫生计生委合理用药专家委员会,中国药师协会. 心力衰竭合理用药指南(第2版)[J].中国医学前 沿杂志(电子版),2019,11(7):1-78. DOI: 10.12037/ YXQY.2019.07-01.
- [21] RE R N. Role of intracellular angiotensin II [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2018, 314(4): H766-H771. DOI: 10.1152/ajpheart.00632.2017.
- [22] PARRA V, MORAGA F, KUZMICIC J, et al. Calcium and mitochondrial metabolism in ceramide-induced

cardiomyocyte death[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1832(8): 1334-1344. DOI: 10.1016/j.bbadis. 2013.04.009.

- [23] DIKALOVA A E, PANDEY A, XIAO L, et al. Mitochondrial deacetylase Sirt3 reduces vascular dysfunction and hypertension while Sirt3 depletion in essential hypertension is linked to vascular inflammation and oxidative stress[J]. Circ Res, 2020, 126(4): 439-452. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315767.
- YAN F, ZHU H, HE Y, et al. Combination of tolvaptan and valsartan improves cardiac and renal functions in doxorubicin-induced heart failure in mice[J]. Eur J Histochem, 2022, 66(4): 3563. DOI: 10.4081/ ejh.2022.3563.
- [25] 郑博宇,俸艳英,阳志军.缬沙坦对阿霉素所致心肌损伤保护作用的相关机制研究[J].广西医科大学学报,2019,36(4):533-537.DOI: 10.16190/i.cnki.45-1211/r.2019.04.009.
- [26] SAKR H F, ABBAS A M, ELSAMANOUDY A Z. Effect of valsartan on cardiac senescence and apoptosis in a rat model of cardiotoxicity[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2016, 94(6): 588-598. DOI: 10.1139/cjpp-2015-0461.
- [27] TSUTSUI H, ALBERT N M, COATS A J S, et al.

Natriuretic peptides: role in the diagnosis and management of heart failure: a scientific statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Heart Failure Society of America and Japanese Heart Failure Society[J]. Eur J Heart Fail, 2023, 25(5): 616-631. DOI: 10.1002/ejhf.2848.

- [28] NUMATA G, TAKIMOTO E. Cyclic GMP and PKG signaling in heart failure[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 792798. DOI: 10.3389/fphar.2022.792798.
- [29] SARZANI R, ALLEVI M, DI PENTIMA C, et al. Role of cardiac natriuretic peptides in heart structure and function[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(22): 14415. DOI: 10.3390/ijms232214415.
- [30] HU F, YAN S, LIN L, et al. Sacubitril/valsartan attenuated myocardial inflammation, fibrosis, apoptosis and promoted autophagy in doxorubicin-induced cardiotoxicity mice via regulating the AMPKα-mTORC1 signaling pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2025, 480(3): 1891-1908. DOI: 10.1007/s11010-024-05117-7.
- [31] MIYOSHI T, NAKAMURA K, AMIOKA N, et al. LCZ696 ameliorates doxorubicin-induced cardiomyocyte toxicity in rats[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 4930. DOI: 10.1038/s41598-022-09094-z.

[本文编辑] 商素芳