

尚小森,杨依纯,侯佳楠,等. GDF-15 通过激活 NO-cGMP-PKG 信号通路促进大鼠急性心肌梗死侧枝循环改善心功能的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(5): 60-70.

Shang XS, Yang YC, Hou JN, et al. GDF-15 promotes collateral circulation and improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction by activating the NO/cGMP/PKG signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(5): 60-70.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.05.006

GDF-15 通过激活 NO-cGMP-PKG 信号通路促进大鼠急性心肌梗死侧枝循环改善心功能的研究

尚小森¹, 杨依纯^{2,3}, 侯佳楠^{2,3}, 樊林花^{2,3}, 陈小平¹, 卫兵艳^{2,3*}, 陈朝阳^{2,3*}

(1. 太原市中心医院心内科, 太原 030009; 2. 山西医科大学实验动物中心, 太原 030001;

3. 实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室, 太原 030001)

【摘要】 目的 探讨生长分化因子-15(GDF-15)通过激活一氧化氮(NO)-环磷酸鸟苷(cGMP)-蛋白激酶 G(PKG)信号通路对急性心肌梗死(AMI)大鼠侧枝循环及心功能的影响。**方法** 通过结扎冠状动脉左前降支,构建 AMI 大鼠模型,造模成功后,随机分成假手术组、模型组、GDF-15 组,每组 12 只,GDF-15 组腹腔注射 GDF-15 重组蛋白,其余 2 组注射等量生理盐水,每周 2 次,连续 8 周。超声心动图检测大鼠心功能;HE 染色观察大鼠心肌组织病理损伤;CD31 免疫组化染色观察大鼠侧枝循环的情况;qPCR 检测血管内皮生长因子(VEGF)mRNA 表达;取模型组和 GDF-15 组大鼠心脏组织进行转录组学测序,筛选差异表达基因(DEGs),通过京都基因和基因组百科全书(KEGG)对差异表达基因进行通路富集分析。试剂盒检测 NO、活性氧(ROS)、cGMP 表达水平;Western blot 检测 VEGF、eNOS 单体、p-eNOS^{ser1177} 单体、eNOS 二聚体及 PKG 蛋白表达。**结果** 与假手术组相比,模型组左室收缩末期内径(LVEDs)、左室舒张末期内径(LVEDd)增加($P<0.001$),左室射血分数(LVEF)、短轴缩短率(FS)降低($P<0.001$),心肌细胞坏死严重,梗死区血管密度降低($P<0.05$),但 VEGF mRNA 和蛋白水平没有变化($P>0.05$),NO、eNOS 二聚体、cGMP 水平及 PKG 蛋白表达水平降低($P<0.05$),ROS、eNOS 单体及 p-eNOS^{ser1177} 单体的表达水平增高($P<0.05$);与模型组相比,GDF-15 组 LVEDs、LVEDd 降低($P<0.05$),LVEF、FS 升高($P<0.01$),心肌细胞坏死得到缓解,梗死区血管密度明显增加($P<0.0001$),VEGF mRNA 水平增高($P<0.0001$),转录组学测序结果显示,共鉴定到 324 个 DEGs,其中 230 个上调,94 个下调。KEGG 富集分析 T20 通路中 cGMP-PKG 信号通路差异最显著。VEGF、NO、eNOS 二聚体、cGMP 水平及 PKG 蛋白水平增高($P<0.05$),ROS、eNOS 单体及 p-eNOS^{ser1177} 单体的表达水平降低($P<0.05$)。**结论** GDF-15 可通过抑制 eNOS 解偶联并激活 NO-cGMP-PKG 通路,促进缺血心肌侧枝循环、改善心功能。

【关键词】 生长分化因子-15;急性心肌梗死;侧枝循环;NO-cGMP-PKG 信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 05-0060-11

【基金项目】 太原市科技项目(202264);山西省科技厅中央引导地方科技发展资金项目(YDZJSX2022B009);山西省基础研究计划项目青年科学研究项目(202403021212288)。

【作者简介】 尚小森(1988—),女,在读博士研究生,主治医师,研究方向:冠心病的基础与临床研究。E-mail:80130080@qq.com

【通信作者】 卫兵艳(1984—),女,在读博士研究生,高级实验师,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail:wbyan2009@126.com

陈朝阳(1972—),男,硕士,教授,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail:ccytcn@163.com

* 共同通信作者

GDF-15 promotes collateral circulation and improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction by activating the NO/cGMP/PKG signaling pathway

SHANG Xiaosen¹, YANG Yichun^{2,3}, HOU Jianan^{2,3}, FAN Linhua^{2,3}, CHEN Xiaoping¹,
WEI Bingyan^{2,3*}, CHEN Zhaoyang^{2,3*}

(1. Department of Cardiology of Taiyuan Central Hospital, Taiyuan 030009, China.

2. Center for Laboratory Animals, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001.

3. Shanxi Key Laboratory of Experimental Animals and Animal Models of Human Disease, Taiyuan 030001)

【Abstract】 Objective To observe the effects of growth differentiation factor-15 (GDF-15) on collateral circulation and cardiac function in rats with acute myocardial infarction (AMI) in relation to the nitric oxide (NO)/cyclic guanosine monophosphate (cGMP)/protein kinase G (PKG) signaling pathway. **Methods** An AMI rat model was constructed by ligating the left anterior descending coronary artery. After modeling, the rats were divided randomly into Sham, Model, and GDF-15 groups ($n = 12$ rats per group). Rats in the GDF-15 group were injected intraperitoneally with recombinant GDF-15 protein, and the other two groups were injected with the same amount of normal saline twice a week for 8 consecutive weeks. Cardiac function was detected by echocardiography. Pathological damage to rat myocardial tissue was detected by hematoxylin and eosin staining and the collateral circulation was observed by CD31 immunohistochemical staining. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression was detected by quantitative polymerase chain reaction. Transcriptomic sequencing of heart tissues in the model and GDF-15 groups was performed and differentially expressed genes (DEGs) were screened. Pathway enrichment analysis of the DEGs was carried out according to the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Nitric oxide (NO), reactive oxygen species (ROS), and cGMP were detected using kits, and VEGF, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) monomer, p-eNOS^{ser1177} monomer, eNOS dimer, and PKG protein were detected by Western blot. **Results** Left ventricular end-systolic diameter (LVEDs) and left ventricular end-diastolic diameter (LVEDd) were increased ($P < 0.001$), and left ventricular ejection fraction (LVEF) and the short-axis shortening rate (FS) were decreased in the Model group compared with the Sham group ($P < 0.001$). Myocardial cell necrosis was more severe, vascular density in the infarcted area was decreased ($P < 0.05$), but VEGF mRNA and protein levels were no change ($P > 0.05$), and levels of NO, eNOS dimer, cGMP, and PKG protein were decreased ($P < 0.05$), and expression levels of ROS, eNOS monomer, and p-eNOS^{ser1177} monomer were increased ($P < 0.05$). LVEDs and LVEDd decreased ($P < 0.05$), LVEF and FS increased ($P < 0.01$), myocardial cell necrosis was relieved, vascular density in the infarcted area increased significantly ($P < 0.0001$), and VEGF mRNA levels increased ($P < 0.0001$), compared with the Model group. Transcriptomic sequencing identified 324 DEGs, including 230 up-regulated and 94 down-regulated genes. According to KEGG enrichment analysis, the cGMP-PKG signaling pathway showed the most significant difference in the T20 pathway. VEGF, NO, eNOS dimer, cGMP, and PKG protein levels were all increased ($P < 0.05$), while ROS, eNOS monomer, and p-eNOS^{ser1177} monomer were decreased in the GDF-15 group ($P < 0.05$). **Conclusions** GDF-15 can promote collateral circulation in ischemic myocardium and improve cardiac function by inhibiting eNOS decoupling and activating the NO/cGMP/PKG pathway.

【Keywords】 GDF-15; acute myocardial infarction; collateral circulation; NO-cGMP-PKG signaling pathway

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是一种严重的心血管疾病, 其定义为冠状动脉突然阻塞导致心肌缺血坏死^[1]。这种疾病具

有极高的临床危害性, 可导致心力衰竭、心律失常甚至猝死等^[2]。目前, 对于 AMI 的治疗方法主要包括药物治疗、介入治疗和外科手术治疗等,

但这些方法都存在一定的局限性^[3]。因此,深入探索 AMI 的发病机制,寻找新的治疗靶点和手段显得尤为重要。生长分化因子-15 (growth differentiation factor 15, GDF-15) 是一种多功能的细胞因子,属于转化生长因子- β (transforming growth factor, TGF- β) 超家族成员^[4]。它在多种生理和病理过程中发挥着重要功能^[5]。研究表明, GDF-15 可以通过调节细胞增殖、分化和凋亡等过程,参与心血管系统的发育和稳态维持^[6]。此外, GDF-15 还可以通过与其他信号通路相互作用,发挥其生物学功能。例如, GDF-15 可以通过激活 ERK1/2 和 Akt 信号通路,促进血管平滑肌细胞的增殖和迁移^[7];另外, GDF-15 还可以通过抑制 TGF- β /Smad 信号通路,减少心肌纤维化的发生^[8]。

为了探索 GDF-15 在 AMI 中的作用机制,我们对模型组和 GDF-15 组大鼠的心肌组织进行了转录组学分析,发现 cGMP-PKG 信号通路差异最为显著。NO-cGMP-PKG 信号通路是一条重要的细胞内信号转导通路,它在心血管系统中发挥着多种重要的生理功能^[9]。研究表明, NO-cGMP-PKG 信号通路可以通过调节血管平滑肌的舒张和收缩,参与血压的调节^[10];同时, NO-cGMP-PKG 信号通路能够通过抑制血小板的聚集和血栓的形成,参与心血管系统的抗血栓作用^[11]。此外, NO-cGMP-PKG 信号通路还可以通过调节心肌细胞的钙稳态,参与心血管系统的正性肌力作用^[12]。值得注意的是,生理条件下产生 NO 的内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 二聚体在缺氧、炎症及氧化应激刺激下变成单体,从而产生更多的超氧阴离子,使 NO 的生成减少,进而影响 cGMP 及 PKG 活性,使血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达降低^[13]。本研究旨在初步探索 GDF-15 对 AMI 侧枝循环形成及心功能的作用及该作用是否通过介导 NO-cGMP-PKG 信号通路来实现。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 8~10 周龄雄性 SD 大鼠 36 只,体重 (250 $\pm$ 30) g,购自山西医科大学实验动物中心

[SCXK(晋)2024-0004],饲养于山西医科大学实验动物中心屏障环境[SYXK(晋)2024-0007],动物实验过程严格按照 3R 原则给予人道关怀,遵守国际实验动物伦理学要求,经过山西医药大学实验动物伦理委员会批准(SYDL2023019)。

1.2 主要试剂与仪器

Recombinant Rat GDF15 Protein (CP081395) 购自浦斯瑞(上海)生物医药有限公司; NO (S0021S) 和 ROS (S0033S) 检测试剂购自上海碧云天生物技术有限公司; CD31 抗体 (BA2966)、 VEGF 抗体 (BA0407) 和 PKG (A01708-3) 购自武汉博士德生物有限公司; qPCR 套装 (9109-092-830) 购自宝生物工程(大连)有限公司; VEGF 及内参 GAPDH 引物由华大基因科技有限公司合成; cGMP (S14668) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测试剂盒购自武汉赛洛菲生物科技有限公司; Total Protein Extraction Kit for Animal Tissues (PK10021)、eNOS 抗体 (27120-1-AP)、p-eNOS 抗体 (28939-1-AP) 和 β -actin 抗体 (HRP-66009) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

Vevo 770 小动物多普勒超声仪 (加拿大 Visual sonic 公司); BX51 显微镜 (日本 Olympus 公司); Quant Studio 5 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); Bio-Rad 1658028 垂直电泳系统 (美国 Bio-Rad 公司) 等。

1.3 实验方法

1.3.1 AMI 模型构建及分组

36 只 SD 大鼠随机分为假手术 (Sham) 组、AMI 模型 (Model) 组和 GDF-15 组,每组 12 只 (其中随机选 6 只用来做病理,剩余 6 只取材液氮速冻后,储存于-80℃冰箱)。使用结扎大鼠冠状动脉左前降支的方法,建立 AMI 模型。具体方法参照文献^[14]。

1.3.2 GDF-15 体内给药

根据计算公式:动物 A 剂量/(mg/kg)=动物 B 剂量/(mg/kg) $\times$ 动物 B 的 Km/动物 A 的 Km,结合大鼠的 Km 系数为 6,小鼠的 Km 系数为 3,参考先前文献中报道的小鼠 GDF-15 给药剂量为 100 ng/kg^[15],计算得大鼠的 GDF-15 腹腔注射剂量为 50 ng/kg。每周 2 次,连续 8 周。假手术组和模型组给予等剂量生理盐水,均采用腹腔注射给药。

1.3.3 各组大鼠心功能的检测

使用 Vevo 770 超声仪,在造模前及取材前分别检测大鼠心功能。主要指标有左心室舒张末期内径(left ventricular dimensions at end-diastole, LVEDd)、左室收缩末期内径(left ventricular dimensions at end-systole, LVEDs)、射血分数(ejection fraction, EF)、短轴缩短率(fractional shortening, FS)。

1.3.4 各组大鼠取材及标本处理

各组大鼠心功能检测结束后,随机从每组中挑选 6 只,5%异氟烷麻醉,开胸,磷酸缓冲盐溶液冲洗心脏组织后,液氮速冻,保存于-80℃冰箱。其余 6 只麻醉开胸,剪开右心耳,磷酸缓冲盐溶液灌洗后,用 10 mL 10% KCl 使心脏组织停搏在舒张期,取下心脏组织甲醛灌注固定、脱水、石蜡包埋。制备 5 μm 切片,按照各染色试剂盒说明书分别进行 HE 染色和 CD31 免疫组织化学染色。

1.3.5 qPCR 检测心肌组织 VEGF mRNA 水平表达

根据 qPCR 套装试剂盒使用说明书进行荧光定量 PCR,引物序列:VEGF 上游引物(5'-3'): CTACCTCCACCATGCCAAGT,下游引物(5'-3'): CTACCTCCACCATGCCAAGT。GAPDH:上游引物(5'-3'): GGTGTCTCTCTGCGACTTCA,下游引物(5'-3'): TGGTCCAGGGTTTCTT ACTCC。扩增结束后,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 VEGF 基因的 mRNA 相对于内参 GAPDH 的表达量。

1.3.6 转录组学测序

取模型组和 GDF-15 大鼠心脏组织,液氮快速冷冻后,进行转录组学测序(上海中科新生命技术公司)。根据 $\log_2$ 差异倍数>1.0 和 $P\text{-adj}<0.05$,鉴定出显著的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。然后进行京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析,以确定受 GDF-15 影响最大的信号通路。

1.3.7 试剂盒检测心肌组织中 NO 和 ROS 的含量

按照 NO 和 ROS 检测试剂盒使用说明分别检测心肌组织中 NO 和 ROS 的含量。

1.3.8 ELISA 检测血清中 cGMP 的含量

异氟烷麻醉大鼠后,腹主动脉采血,室温静

置 30 min,3000 r/min 离心 20 min,取上清,按照 cGMP 的 ELISA 试剂盒说明书检测血清中 cGMP 的含量。

1.3.9 Western blot 检测各组大鼠心肌组织 VEGF、eNOS 单体、p-eNOS^{ser1177} 单体、eNOS 二聚体及 PKG 蛋白水平表达

使用 Total Protein Extraction Kit for Animal Tissues 提取心肌组织蛋白,BCA 法测蛋白浓度。10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,转至 NC 膜。牛血清白蛋白封闭 2 h,加入按比例稀释的一抗(VEGF(1:500)、eNOS(1:500)、p-eNOS(1:1000)、PKG(1:2000)及 β -actin(1:5000)),4℃摇床过夜,TBST 洗 3 次,每次 5 min,加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 二抗(1:5000),室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次;最后,使用 3-氨基-9-乙基咔唑显色试剂盒进行显色。使用 Image J 15.4 分析蛋白条带灰度值,分别用 VEGF、eNOS、p-eNOS 及 PKG 与 β -actin 灰度比值计算各自的相对表达量。

1.4 统计学方法

研究过程中使用 SPSS 26.0 软件进行数据分析,使用 GraphPad Prism 10.0 制作相关图表。计量资料以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)分析,组间多重比较采用 LSD- t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心功能检测指标的变化

超声结果如图 1 所示,与假手术组比较,模型组 LVEDs、LVEDd 水平升高($P<0.001$),EF、FS 水平降低($P<0.001$);与模型组比较,GDF-15 组 LVEDs、LVEDd 水平降低($P<0.05$),LVEF、FS 水平升高($P<0.01$)。

2.2 各组大鼠心肌组织 HE 染色结果

心肌组织 HE 染色结果如图 2 所示,与假手术组比较,模型组出现心肌细胞坏死,肌纤维出现波浪状松解而排列紊乱,梗死面积明显增大($P<0.0001$);与模型组比较,GDF-15 组心肌细胞坏死减轻,肌纤维排列紊乱减轻,梗死面积明显缩小,差异有统计学意义($P<0.05$)。

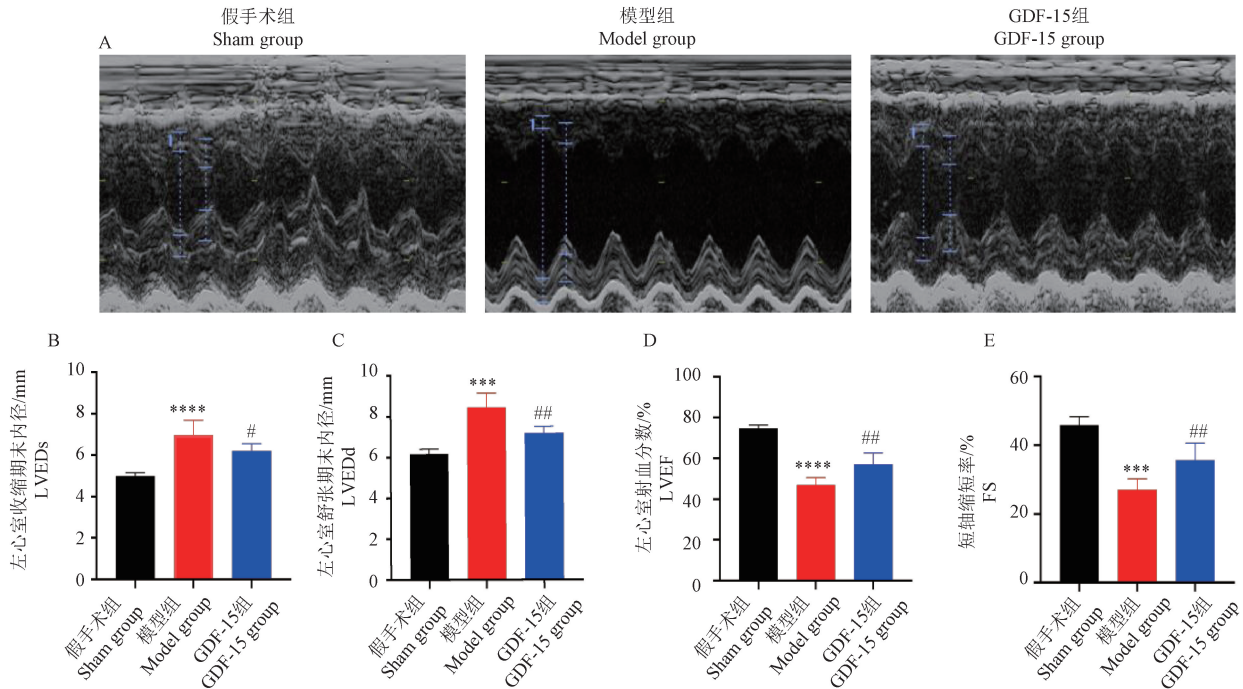
2.3 各组大鼠心肌组织血管密度

心肌组织 CD31 免疫组化结果如图 3 所示,与假手术组比较,模型组心肌组织梗死区域血管密度降低($P<0.05$);与模型组比较,GDF-15 组梗死区

血管密度增加,差异有统计学意义($P<0.0001$)。

2.4 各组大鼠心肌组织中 VEGF mRNA 和蛋白的相对表达水平

从图 4A 中可以看出,和假手术组相比,模型

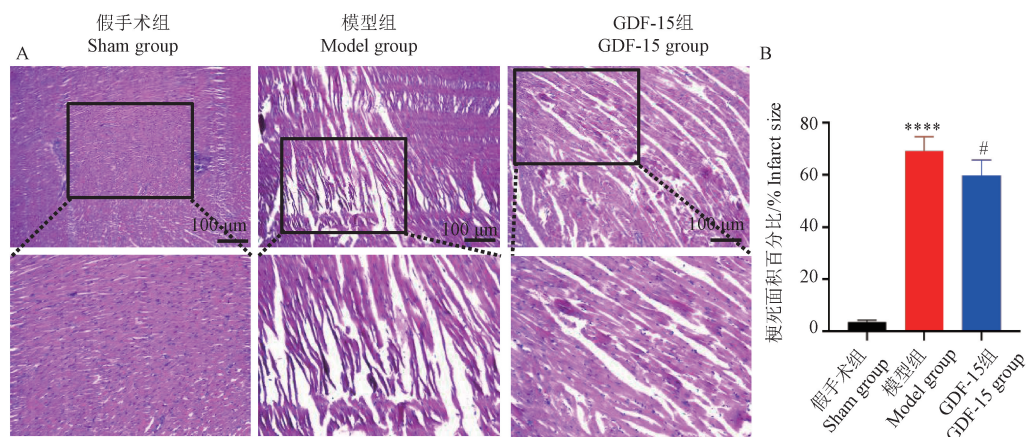


注:A:各组大鼠超声心动图代表图像;B:左室收缩末期内径;C:左室舒张末期内径;D:左室射血分数;E:短轴缩短率。与假手术组相比,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$;与模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

图1 GDF-15 对 AMI 大鼠心功能的影响

Note. A, Representative images of echocardiography in each group of rats. B, LVEDs. C, LVEDd. D, LVEF. E, FS. Compared with the Sham group, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$. Compared with the Model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 1 Effect of GDF-15 on cardiac function in rats with AMI



注:A:各组大鼠心肌组织 HE 染色代表图像;B:梗死面积百分比。与假手术组相比,**** $P<0.0001$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

图2 各组大鼠心肌组织 HE 染色结果

Note. A, Representative images of HE staining in myocardial tissue of rats in each group. B, Infarct size. Compared with the Sham group, **** $P<0.0001$. Compared with the Model group, # $P<0.05$.

Figure 2 HE staining results of myocardial tissue in each group

组大鼠心肌组织中 VEGF mRNA 表达没有差异 ($P>0.05$), 而与模型组相比, GDF-15 组 VEGF mRNA 表达明显升高 ($P<0.0001$)。Western blot 结果显示与 qPCR 结果一致 (图 4B)。

2.5 心肌组织转录组学测序

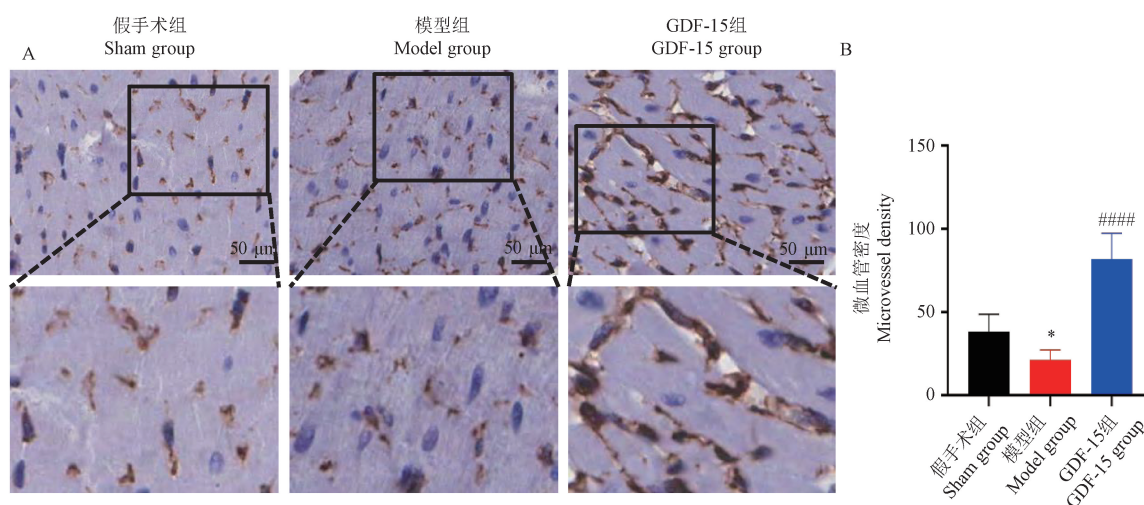
将 $\log_2$ 差异倍数 >1.0 和 $P\text{-adj}<0.05$ 作为界定 DEGs 的标准, 将 GDF-15 组与模型组进行比较, 从图 5 可以看出共筛选出 324 个 DEGs, 其中有 94 个下调, 230 个上调。KEGG 结果显示 cGMP-PKG 信号通路出现最显著上调。

2.6 各组大鼠心肌组织中 NO 和 ROS 含量

与假手术组相比, 模型组大鼠心肌组织中 NO 水平降低 ($P<0.001$), ROS 水平升高 ($P<0.001$); 与模型组相比, GDF-15 组大鼠心肌组织中 NO 水平升高 ($P<0.05$), ROS 水平降低 ($P<0.0001$), 结果见图 6。

2.7 GDF-15 对 NO-cGMP-PKG 信号通路和 eNOS 解偶联的影响

结果见图 7。与假手术组相比, 模型组大鼠心肌组织中 eNOS 单体及 p-eNOS^{ser1177} 单体表达

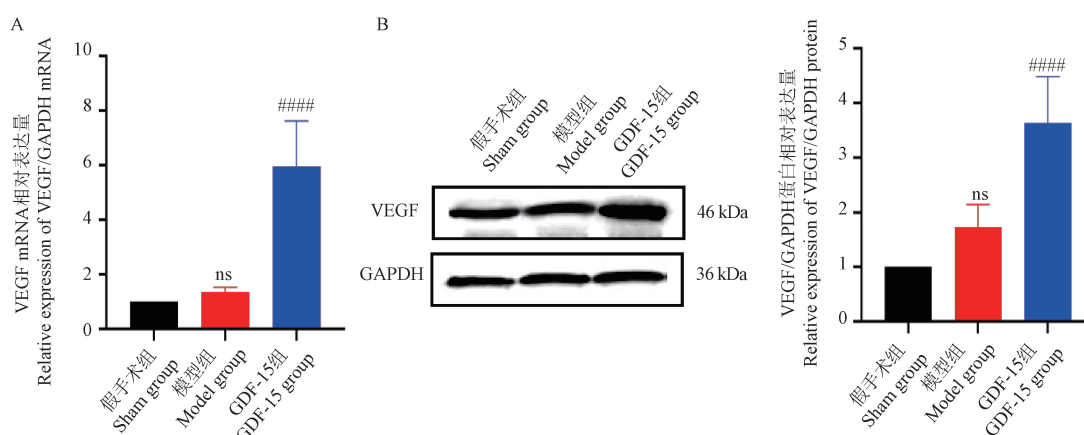


注: A: 各组大鼠心肌组织 CD31 免疫组化代表图像; B: 微血管密度。与假手术组相比, $*P<0.05$; 与模型组相比, $####P<0.0001$ 。

图 3 各组大鼠心肌组织微血管密度检测结果

Note. A, Representative images of CD31 immunohistochemistry in myocardial tissue of rats in each group. B, Microvascular density. Compared with the Sham group, $*P<0.05$. Compared with the Model group, $####P<0.0001$.

Figure 3 Results of myocardial microvascular density in each group



注: A: VEGF mRNA 的表达; B: VEGF 蛋白表达。与模型组相比, $####P<0.0001$ 。

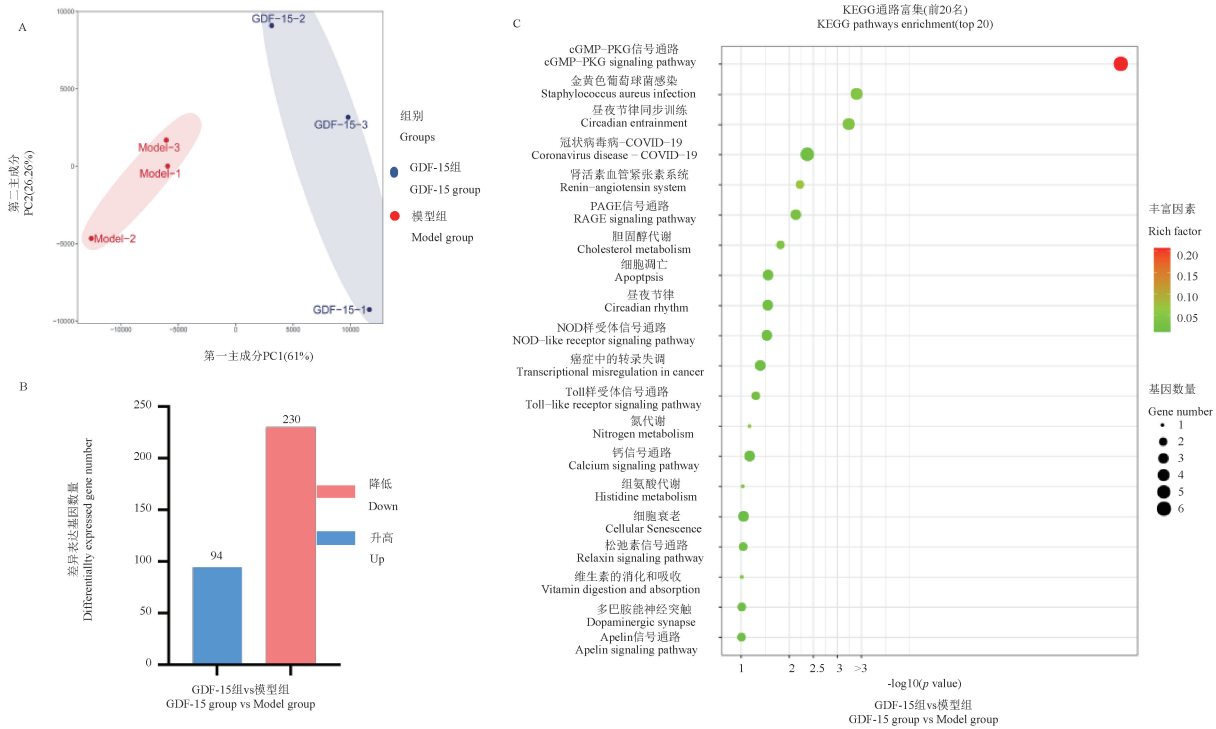
图 4 各组大鼠心肌组织中 VEGF mRNA 和蛋白的相对表达水平

Note. A, Expression of VEGF mRNA. B, Expression of VEGF protein. Compared with the Model group, $####P<0.0001$.

Figure 4 Relative expression levels of VEGF mRNA and protein in myocardium of rats in each group

升高($P < 0.01$), eNOS 二聚体及 PKG 蛋白表达降低($P < 0.05$), 血浆中 cGMP 含量降低($P < 0.0001$)。与模型组相比, GDF-15 组大鼠心肌组

织中 eNOS 单体及 p-eNOS^{ser1177} 单体表达降低($P < 0.01$), eNOS 二聚体及 PKG 蛋白表达水平升高($P < 0.0001$), 血浆中 cGMP 含量升高($P < 0.0001$)。

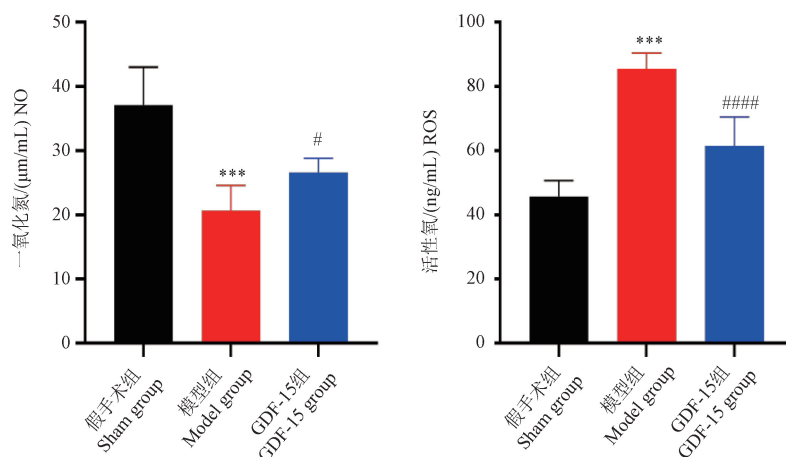


注: A: 模型组和 GDF-15 组主成分分析结果; B: 模型组和 GDF-15 组差异表达基因结果; C: 京都基因和 KEGG 富集分析模型组与 GDF-15 组的差异表达基因。

图 5 模型组和 GDF-15 组心肌组织转录组学测序结果

Note. A, Principal component analysis results of Model group and GDF-15 group. B, Results of DEGs between the Model group and the GDF-15 group. C, KEGG enrichment analysis of DEGs in the Model group and GDF-15 group.

Figure 5 Transcriptomic sequencing results of myocardial tissue in the Model group and GDF-15 group

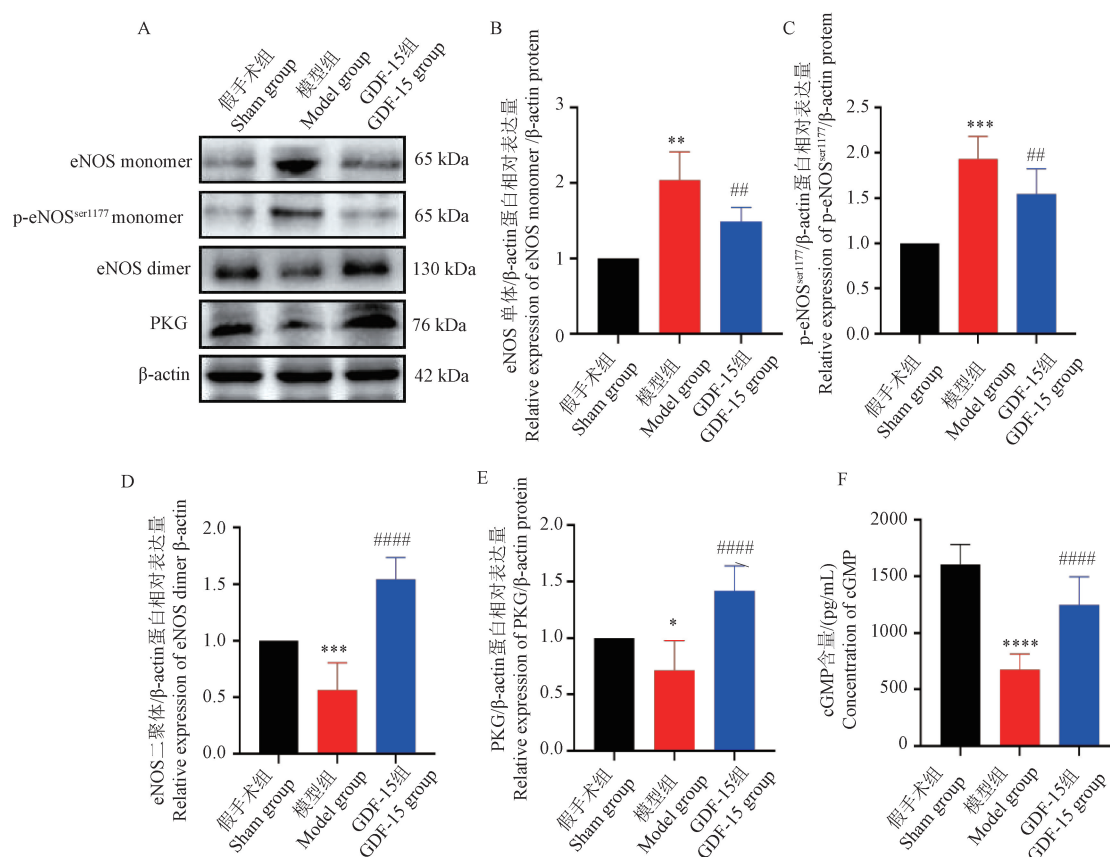


注: A: 一氧化氮含量; B: 活性氧含量。与假手术组相比, *** $P < 0.001$; 与模型组相比, # $P < 0.05$, #### $P < 0.0001$ 。

图 6 各组大鼠心肌组织中 NO 和 ROS 含量

Note. A, NO content. B, ROS content. Compared with the Sham group, *** $P < 0.001$. Compared with the Model group, # $P < 0.05$, #### $P < 0.0001$.

Figure 6 Contents of NO and ROS in myocardial tissue of rats in each group



注:A:Western blot 结果;B:eNOS 单体相对表达量;C:p-eNOS^{ser1177} 单体相对表达量;D:eNOS 二聚体相对表达量;E:PKG 蛋白相对表达量;F:血浆 cGMP 含量。与假手术组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$;与模型组相比, ## $P < 0.01$, #### $P < 0.0001$ 。

图 7 GDF-15 对 NO-cGMP-PKG 信号通路和 eNOS 解偶联的影响

Note. A, Western blot results. B, Relative expression of eNOS monomer. C, Relative expression of p-eNOS^{ser1177}. D, Relative expression of eNOS dimer. E, Relative expression of PKG protein. F, Plasma cGMP content. Compared with the Sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. Compared with the Model group, ## $P < 0.01$, #### $P < 0.0001$.

Figure 7 Effect of GDF-15 on NO-cGMP-PKG signaling pathway and eNOS decoupling

3 讨论

AMI 及其相关并发症依旧是致使全球死亡率上升与医疗费用增加的主要缘由^[16]。AMI 被广泛视作冠状动脉疾病的典型表征,其特点为冠状动脉闭塞后,由于长时间缺血引起心肌缺血缺氧进而导致心肌细胞凋亡^[17]。因此,有效激活血管生成,促进侧枝循环的建立是改善梗死区域心肌细胞坏死凋亡的关键机制^[18]。

GDF-15 作为 TGF- β 超家族成员中的一种应激蛋白,与 TGF- β 1 拥有共同结构域,主要调节器官生长分化及组织修复,发挥抗炎、抑制细胞生长的作用^[19]。最近的研究发现,GDF-15 有助于预防心血管疾病,在心力衰竭和梗死期间,GDF-

15 与炎症和心脏纤维化之间存在关联,并且 GDF-15 可能通过调节代谢活性和抑制细胞的氧化、炎症、凋亡和纤维化来预防心血管疾病,显著改善心肌缺血引起的慢性心力衰竭的心功能,缓解心室重构^[14]。此外,GDF-15 过表达的工程外泌体也能够明显增强心肌损伤后的心脏修复^[20]。本研究旨在进一步探讨 GDF-15 对微血管生成的治疗潜力以及 GDF-15 在 AMI 治疗中的分子机制。

本研究通过结扎左前降支构建大鼠 AMI 模型,观察到模型组大鼠 LVEDs、LVEDd 升高,LVEF、FS 降低。这些生理指标的改变反映了心肌梗死对心脏整体结构和功能的显著影响。LVEDs 和 LVEDd 的升高意味着心室在舒张末期

容纳更多血液,这可能是由于心肌梗死导致心肌收缩力下降,心脏不能有效地将血液泵出,而造成血液在心室的淤积。而 LVEF 和 FS 的降低则直接体现了心肌梗死区域心肌细胞失去收缩功能后,整个心脏泵血能力的减弱。HE 染色出现心肌细胞坏死明显,这进一步从组织学层面证实了 AMI 大鼠模型构建成功,心肌细胞坏死是 AMI 的典型病理特征,会引发一系列的级联反应,包括炎症反应、细胞因子释放等^[21],这些可能都与后续的心功能变化以及本研究中所关注 GDF-15 的作用密切相关。GDF-15 在 AMI 病例中具有重要的保护作用^[22],BOUWENS 等^[23]研究发现 GDF-15 能够抑制 caspase-3 等凋亡相关蛋白酶的活性,从而保护心肌细胞免受过度凋亡的损害。在本研究中,证实 GDF-15 与大鼠 AMI 模型中的侧枝循环建立及心功能改善有关。CD31 是一种内皮细胞标记物,其表达增加表明内皮细胞的增殖和迁移活跃,这是血管新生的关键环节。VEGF 作为一种强效的促血管生成因子,在侧枝循环建立过程中起着至关重要的作用。我们通过检测 CD31 和 VEGF 的 mRNA 及蛋白的表达,发现 GDF-15 能明显促进 CD31 和 VEGF 的 mRNA 及蛋白的表达,表明 GDF-15 能够促进梗死区域的血管生成。同时,GDF-15 能够改善 AMI 大鼠心功能,超声心动图参数显示 GDF-15 降低了 LVEDs、LVEDd,提高了 LVEF、FS 参数,与先前 GDF-15 在心功能不全治疗中的积极作用的研究一致^[14]。

为了进一步研究 GDF-15 改善心功能作用背后的潜在机制,通过 RNA-seq 对模型组和 GDF-15 组心脏组织进行转录组学分析。主成分分析(principal component analysis,PCA)显示,2 组之间的基因表达高度相似,与模型组相比,GDF-15 组有 324 个 DEGs(230 个上调,94 个下调),说明 GDF-15 参与上调和下调许多推定基因的表达。KEGG 富集分析进一步显示这些 DEGs 最显著富集的途径是 cGMP-PKG 信号通路,这为理解 GDF-15 改善心功能找到了一个关键的切入点。在正常生理状态下,NO 作为一种来自血管内皮的旁分泌松弛剂,通过与鸟苷酸环化酶结合促进 cGMP 的生成,进而激活 PKG,维持微血管正常张力和局部血流稳定,对心肌细胞的正常功能至关

重要^[24]。已有研究证实 NO-cGMP-PKG 信号通路在一定程度上参与心肌梗死后适应保护作用^[25]。然而,在 AMI 发生时,情况发生了急剧变化。缺氧作为主要的致病因素开始起作用,刺激微血管内皮细胞大量产生 ROS。ROS 过量产生是一把双刃剑,一方面,ROS 直接攻击 eNOS 二聚体,促使其解聚变成单体。这种结构变化导致 eNOS 的功能受损,原本能催化 L-精氨酸(L-Arg)生成 NO 的能力下降,从而使 NO 产生减少。另一方面,随着 NO 产生的减少,依赖于 NO 的 cGMP 合成也相应减少,进一步使得相邻心肌细胞内 PKG 的活性降低。PKG 活性降低会影响心肌细胞的多种生理功能,如阻止正常的肌丝滑行过程,最终导致心肌收缩力下降^[26]。同时,PKG 活性降低还可影响心肌细胞的离子通道功能,干扰细胞内的钙稳态,这些变化共同加重了 AMI 的发展过程^[27]。

eNOS 即内皮型一氧化氮合酶,其主要功能是催化 L-Arg 生成 NO。eNOS 以单体和二聚体的形式存在。二聚体形式是 eNOS 具有催化活性产生 NO 的活性形式,而单体形式的 eNOS 活性相对较低或者无活性^[28]。磷酸化在 eNOS 的活性调控中起到关键作用,特别是丝氨酸 1177(ser1177)位点的磷酸化。当 eNOS 在 ser1177 位点被磷酸化形成 p-eNOS^{ser1177} 时,通常会增强 eNOS 的活性^[29]。在正常生理状态下,针对 eNOS 单体而言,促进 eNOS 发生磷酸化反应,提高 p-eNOS^{ser1177} 的水平,有助于单体向二聚体转化。这一过程会让更多的 eNOS 以二聚体形式存在,从而使 eNOS 能够有效地催化生成 NO。然而,在某些病理状态时,如果这个磷酸化进程受到干扰,eNOS 单体的数量就会增加,使其处于活性较低甚至毫无活性的状态,进而影响 NO 的生成。从细胞信号传导的视角来看,多个细胞内的信号通路都能够调节 eNOS 的磷酸化状态,其中就包括 PI3K-Akt 等信号通路。这些通路一旦被激活,便会导致 Akt 蛋白被活化,随后 Akt 蛋白可使 eNOS 的 ser1177 位点发生磷酸化,提高 p-eNOS^{ser1177} 所占的比例,推动 eNOS 二聚体化并增强其活性,从而实现心血管功能的调节^[30]。

在本研究中,观察到 AMI 大鼠心肌组织中 ROS、eNOS 单体及其磷酸化水平显著增加,NO-

cGMP-PKG 通路受到明显抑制,具体表现为心肌组织中 NO 含量减少、血浆中 cGMP 水平降低以及 PKG 蛋白表达下调。而 GDF-15 干预后,展现出全面的补救作用。首先,GDF-15 抑制了 eNOS 二聚体的解聚,使 eNOS 单体及单体磷酸化水平显著降低的同时,提高了 eNOS 二聚体的表达水平。这一变化直接导致 NO 生成得以恢复,因为只有 eNOS 二聚体处于正常状态才能有效合成 NO。其次,随着 NO 的增加,cGMP 的合成也随之增加,这是由于 NO 对鸟苷酸环化酶的激活作用得到恢复。最后,cGMP 水平的回升进一步促进了 PKG 蛋白的表达上调,从而恢复了 PKG 的活性。PKG 活性的恢复对于改善心肌细胞的收缩功能有着重要意义,它可以重新调整心肌细胞内的钙离子转运,使心肌细胞能够正常地进行收缩和舒张^[31],从根本上缓解 AMI 所造成的心功能损害。而且,PKG 的激活还可能通过影响其他信号分子或细胞内的代谢途径^[9],进一步促进心脏组织的整体修复和功能恢复。

综上所述,基于 AMI 的大鼠模型,本研究表明,GDF-15 通过促进血管生成和激活 NO-cGMP-PKG 通路抑制 eNOS 单体解偶联来改善 AMI 的心功能,这为理解 AMI 的机制提供了新的见解,也为深入理解 AMI 的发病机制提供新的理论依据,同时也为开发新的治疗靶点和手段提供重要的实验依据。本研究虽然在一定程度上揭示了 GDF-15 在大鼠 AMI 模型中的作用及机制,但仍存在局限性。在探讨 GDF-15 激活 NO-cGMP-PKG 通路的机制时,虽然心肌组织上进行了验证,但仍缺乏直接的实验证据。需要进一步通过细胞实验,使用基因编辑技术构建特异性表达或缺失 GDF-15 的细胞系,或使用信号通路特异性抑制剂或激活剂来明确 GDF-15 与 NO-cGMP-PKG 信号通路之间的确切联系。另外,本研究仅从 mRNA 和蛋白表达水平来评估 GDF-15、CD31 和 VEGF 的变化,未能深入探究其在细胞水平的调控机制,这也是未来研究需要改进的方向。除此之外,还需开展更多的临床研究以便更全面地把握 GDF-15 的治疗效果及其具体机制。

参考文献:

[1] DAMLUJI A A, VAN DIEPEN S, KATZ J N, et al.

Mechanical complications of acute myocardial infarction; a scientific statement from the American heart association [J].

Circulation, 2021, 144(2): e16-e35.

[2] KRITTANAWONG C, KHAWAJA M, TAMIS-HOLLAND J E, et al. Acute myocardial infarction: etiologies and mimickers in young patients [J]. J Am Heart Assoc, 2023, 12(18): e029971.

[3] SAITO Y, OYAMA K, TSUJITA K, et al. Treatment strategies of acute myocardial infarction: updates on revascularization, pharmacological therapy, and beyond [J]. J Cardiol, 2023, 81(2): 168-178.

[4] SIDDIQUI J A, POTHURAJU R, KHAN P, et al. Pathophysiological role of growth differentiation factor 15 (GDF15) in obesity, cancer, and Cachexia [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2022, 64: 71-83.

[5] EDDY A C, TRASK A J. Growth differentiation factor-15 and its role in diabetes and cardiovascular disease [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2021, 57: 11-18.

[6] WANG D, DAY E A, TOWNSEND L K, et al. GDF15: emerging biology and therapeutic applications for obesity and cardiometabolic disease [J]. Nat Rev Endocrinol, 2021, 17(10): 592-607.

[7] XIE B, TANG W, WEN S, et al. GDF-15 inhibits ADP-induced human platelet aggregation through the GFRAL/RET signaling complex [J]. Biomolecules, 2023, 14(1): 38.

[8] HUMERES C, SHINDE A V, TULETA I, et al. Fibroblast Smad7 induction protects the remodeling pressure-overloaded heart [J]. Circ Res, 2024, 135(3): 453-469.

[9] CAI Z, WU C, XU Y, et al. The NO-cGMP-PKG axis in HFpEF: from pathological mechanisms to potential therapies [J]. Aging Dis, 2023, 14(1): 46-62.

[10] HUANG Y, ZHANG K, LIU M, et al. An herbal preparation ameliorates heart failure with preserved ejection fraction by alleviating microvascular endothelial inflammation and activating NO-cGMP-PKG pathway [J]. Phytomedicine, 2021, 91: 153633.

[11] DEGJONI A, CAMPOLO F, STEFANINI L, et al. The NO/cGMP/PKG pathway in platelets; the therapeutic potential of PDE5 inhibitors in platelet disorders [J]. J Thromb Haemost, 2022, 20(11): 2465-2474.

[12] KIM S M, YUEN T, IQBAL J, et al. The NO-cGMP-PKG pathway in skeletal remodeling [J]. Ann N Y Acad Sci, 2021, 1487(1): 21-30.

[13] YANG H Y, LIU M L, LUO P, et al. Network pharmacology provides a systematic approach to understanding the treatment of ischemic heart diseases with traditional Chinese medicine [J]. Phytomedicine, 2022, 104: 154268.

[14] WEI B Y, HOU J N, YAN C P, et al. Shexiang Baoxin Pill

- treats acute myocardial infarction by promoting angiogenesis *via* GDF15-TRPV4 signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165: 115186.
- [15] 周继明. 生长分化因子 15 在急性心肌梗死中的功能及分子机制研究 [D]. 西安: 中国人民解放军空军军医大学, 2018.
- ZHOU J M. Function and molecular mechanism of growth differentiation factor 15 in acute myocardial infarction [D]. Xi'an: PLA Air Force Medical University, 2018.
- [16] AKHTAR K H, KHAN M S, BARON S J, et al. The spectrum of post-myocardial infarction care: From acute ischemia to heart failure [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2024, 82: 15–25.
- [17] RALLIDIS L S, XENOIANNIS I, BRILAKIS E S, et al. Causes, angiographic characteristics, and management of premature myocardial infarction: JACC state-of-the-art review [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2022, 79 (24): 2431–2449.
- [18] XIONG Y Y, GONG Z T, TANG R J, et al. The pivotal roles of exosomes derived from endogenous immune cells and exogenous stem cells in myocardial repair after acute myocardial infarction [J]. *Theranostics*, 2021, 11 (3): 1046–1058.
- [19] MYRMEL G M S, STEIRO O T, TJORA H L, et al. Growth differentiation factor 15: a prognostic marker in patients with acute chest pain without acute myocardial infarction [J]. *Clin Chem*, 2023, 69(6): 649–660.
- [20] ZOU A, XIAO T, CHI B, et al. Engineered exosomes with growth differentiation factor-15 overexpression enhance cardiac repair after myocardial injury [J]. *Int J Nanomedicine*, 2024, 19: 3295–3314.
- [21] PAOLISSO P, FOÀ A, BERGAMASCHI L, et al. Hyperglycemia, inflammatory response and infarct size in obstructive acute myocardial infarction and MINOCA [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2021, 20(1): 33.
- [22] LIU S, CHEN X, WANG H, et al. Association of GDF-15 and syntax score in patient with acute myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Ther*, 2019, 2019: 9820210.
- [23] BOUWENS E, BRANKOVIC M, MOUTHAAAN H, et al. Temporal patterns of 14 blood biomarker candidates of cardiac remodeling in relation to prognosis of patients with chronic heart failure-the bio-SH i FT study [J]. *J Am Heart Assoc*, 2019, 8(4): e009555.
- [24] MONMA Y, SHINDO T, EGUCHI K, et al. Low-intensity pulsed ultrasound ameliorates cardiac diastolic dysfunction in mice: a possible novel therapy for heart failure with preserved left ventricular ejection fraction [J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(5): 1325–1338.
- [25] QIN L, ZANG M, XU Y, et al. Chlorogenic acid alleviates hyperglycemia-induced cardiac fibrosis through activation of the NO/cGMP/PKG pathway in cardiac fibroblasts [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2021, 65(2): e2000810.
- [26] KOLIJN D, PABEL S, TIAN Y, et al. Empagliflozin improves endothelial and cardiomyocyte function in human heart failure with preserved ejection fraction *via* reduced pro-inflammatory-oxidative pathways and protein kinase G α oxidation [J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(2): 495–507.
- [27] ZHANG N, FENG B, MA X, et al. Dapagliflozin improves left ventricular remodeling and aorta sympathetic tone in a pig model of heart failure with preserved ejection fraction [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2019, 18(1): 107.
- [28] JANASZAK-JASIECKA A, PŁOSKA A, WIERONSKA J M, et al. Endothelial dysfunction due to *ENOS uncoupling*: molecular mechanisms as potential therapeutic targets [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2023, 28(1): 21.
- [29] SANZ-GÓMEZ M, ALEDAVOOD E, BEROIZ-SALAVERRI M, et al. Novel indolic AMPK modulators induce vasodilatation through activation of the AMPK-*ENOS*-NO pathway [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 4225.
- [30] YAO L, LIANG X, LIU Y, et al. Non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist finerenone ameliorates mitochondrial dysfunction *via* PI3K/Akt/*ENOS* signaling pathway in diabetic tubulopathy [J]. *Redox Biol*, 2023, 68: 102946.
- [31] INSERTE J, GARCIA-DORADO D. The cGMP/PKG pathway as a common mediator of cardioprotection: translatability and mechanism [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(8): 1996–2009.

[收稿日期]2024-10-30