

• 实验研究 •

龙胆苦苷调节 SIRT1/AMPK/PGC1 α 信号通路对心力衰竭大鼠的改善作用包美珍¹, 关宏¹, 韩伟¹, 高乐¹, 韩惠^{2*}

1. 内蒙古医科大学附属医院 心血管内科, 内蒙古 呼和浩特 010050

2. 内蒙古医科大学附属医院 呼吸内科, 内蒙古 呼和浩特 010050

摘要:目的 探讨龙胆苦苷对心力衰竭大鼠心脏的改善作用及沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (SIRT1)/腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK)/过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α (PGC1 α) 信号通路的影响。方法 构建心力衰竭模型大鼠并将其分模型组、卡托普利组、龙胆苦苷 (50、100 mg/kg) 组、龙胆苦苷+SIRT1 抑制剂 (EX527) 组, 每组 12 只大鼠。另取 12 只健康大鼠作为对照组。测量各组大鼠心功能, ELISA 试剂盒法检测各组大鼠血清中生长刺激表达基因 2 蛋白 (ST-2)、N 端前脑钠素 (NT-proBNP) 水平以及血清中氧化应激因子[超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)]水平; HE 染色法、Masson 染色法检测心肌组织病理形态以及心肌组织中胶原纤维含量; 透射电镜观察法检测各组大鼠心肌组织中线粒体形态; RT-qPCR 法检测各组大鼠心肌组织中炎症因子表达水平; Western blotting 法检测各组大鼠 SIRT1、AMPK、PGC1 α 、III 型胶原 (Collagen III)、I 型胶原蛋白 (Collagen I) 和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 蛋白含量。结果 与模型组相比, 龙胆苦苷组大鼠心肌组织病理程度和心肌纤维化明显减轻, 线粒体结构得到改善, 心脏左室收缩末期径 (LVDs) 和左室舒张末期径 (LVDd), 血清中 MDA、ST-2 和 NT-proBNP 水平, 心肌组织胶原容积分数、白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-18 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) mRNA 表达水平以及 Collagen III、Collagen I、 α -SMA 蛋白表达量明显降低, 心脏左心室射血分数 (LVEF) 和左室短轴缩短率 (FS)、血清中 SOD 水平以及心肌组织中 SIRT1、p-AMPK/AMPK 和 PGC1 α 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$); 与龙胆苦苷 100 mg/kg 组相比, 龙胆苦苷+EX527 组大鼠心肌组织病理严重, 线粒体肿胀破裂, 心肌纤维化、炎性反应和氧化应激反应加剧、心功能下降, SIRT1、p-AMPK/AMPK 和 PGC1 α 蛋白表达量明显减少 ($P < 0.05$)。结论 龙胆苦苷可能通过激活 SIRT1/AMPK/PGC1 α 信号通路减轻心力衰竭大鼠心肌组织炎性反应和氧化应激损伤, 从而发挥心保护功能。

关键词: 龙胆苦苷; 心力衰竭; 心肌损伤; 心功能; 沉默信息调节因子 2 相关酶 1/腺苷酸活化蛋白激酶/过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2025)02-0253-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.02.001

Improvement effect of gentiopicroside on heart failure rats by regulating SIRT1/AMPK/PGC1 α signaling pathwayBAO Meizhen¹, GUAN Hong¹, HAN Wei¹, GAO Le¹, HAN Hui²

1. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China

2. Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China

Abstract: Objective To investigate the improvement effect of gentiopicroside on the heart of rats with heart failure, and the impact on the SIRT1/AMPK/PGC1 α signaling pathway. **Methods** Heart failure model rats were constructed, and divided into model group, aptopril group, gentiopicroside (50, 100 mg/kg) groups, and gentiopicroside+SIRT1 inhibitor (EX527) group, with 12 rats in each group. Another 12 healthy rats were selected as the control group. The cardiac function of rats in each group was tested. The levels of ST-2 and NT-proBNP in the serum of rats in each group, and the levels of oxidative stress factors (SOD, MDA) in the serum were

收稿日期: 2024-12-18

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金面上基金项目 (NJZZ21033)

作者简介: 包美珍, 女, 副主任医师, 硕士, 研究方向为心血管系统疾病的诊断及治疗。E-mail: meizhen@163.com

*通信作者: 韩惠, 女, 副主任医师, 硕士, 研究方向为肺源性心脏病、肺癌的诊断及治疗。E-mail: 864597956@qq.com

detected by ELISA kit method. The pathological morphology of myocardial tissue and the collagen fiber content in myocardial tissue were detected using HE staining and Masson staining methods. The mitochondrial morphology in the myocardial tissue of rats were observed by transmission electron microscopy. The levels of inflammatory factors in the myocardial tissue of rats in each group were detected by RT-qPCR method. The protein contents of SIRT1, AMPK, PGC1 α , Collagen III, Collagen I, and α -SMA of rats in each group were detected by Western blotting. **Results** Compared with model group, the tissue damage status and myocardial fibrosis in rats in the gentiopicroside group were significantly reduced, the mitochondrial structure was improved, the heart LVDs and LVDd indicators, serum MDA, ST-2, and NT-proBNP levels, myocardial tissue collagen volume fraction, *IL-1 β* , *IL-18*, and *TNF- α* mRNA expression levels, collagen III, collagen I and α -SMA protein expression levels were significantly lower, the heart LVEF and FS indicators, serum SOD level, and the SIRT1, p-AMPK/AMPK, and PGC1 α protein expression levels in myocardial tissue were significantly higher ($P < 0.05$). Compared with gentiopicroside 100 mg/kg group, the gentiopicroside+EX527 group showed severe damage, mitochondrial swelling and rupture, the myocardial fibrosis, inflammatory response, and oxidative stress response were exacerbated, the cardiac function decreased, the expression levels of SIRT1, p-AMPK/AMPK, and PGC1 α proteins were significantly lower ($P < 0.05$). **Conclusion** Gentiopicroside may alleviate myocardial inflammatory response and oxidative stress injury in heart failure rats by activating the SIRT1/AMPK/PGC1 α signaling pathway, thereby exerting cardiac protective function.

Key words: gentiopicroside; heart failure; myocardial injury; heart function; SIRT1/AMPK/PGC1 α signaling pathway

心力衰竭是一种心脏功能衰退、心脏泵血不足不能满足全身基础代谢需要的心血管疾病^[1]。当病情加剧时,可能出现气促胸闷、双下肢水肿、身体麻痹等症状。此病诱因包括心肌梗死、心肌病、心肌炎等多种因素,在老年人群中高发,5年死亡率超过50%。目前尽管在药物治疗、设备辅助治疗和移植方面取得了进展,但仍有相当数量的患者会发展为终末期心力衰竭。因此,寻找改善心力衰竭患者预后和长期生存的新方法至关重要。随着中医学的发展以及研究人员对中药材的深入研究,越来越多的成果显示中医在治疗疾病方面具有多渠道、多层次、多靶点的特点。龙胆苦苷是一种天然的环烯醚萜苷,从草药龙胆中分离得到,具有抗炎、抗肝毒性和抗氧化活性等广泛药理活性^[2-3]。既往研究显示龙胆苦苷通过调控核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) / 核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (NLRP3) 炎性通路减轻心肌细胞的炎症反应和氧化应激,改善心肌梗死大鼠的心肌损伤^[4]。这表明龙胆苦苷可靶向调控机体内复杂信号通路改善相关疾病,或成为治疗急性心肌梗死的潜在药物。

沉默调节蛋白 1 (SIRT1) / 腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) / 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α (PGC1 α) 信号通路在调节脂代谢、氧化应激等方面发挥重要作用。已有研究表明,通过激活 SIRT1/AMPK/PGC-1 α 信号通路可通过增强心肌抗氧化能力、保护线粒体功能来改善心力衰竭大鼠的心功能^[5]。这提示 SIRT1/AMPK/PGC1 α 信号通路可能介导心力衰竭的发生和发展。基于此,本研究

通过构建心力衰竭模型,探究龙胆苦苷对心力衰竭大鼠心肌损伤的影响,以及能否通过调控 SIRT1/AMPK/PGC1 α 信号通路来实现。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选择鼠龄 7 周、体质量 200~220 g 的 SPF 级雄性 SD 大鼠[内蒙古医科大学实验动物中心,许可证号 SCXK(蒙)2020-0001]。所有大鼠均单独饲养在 25 °C、60%湿度下的光暗(12 h/12 h)循环中,进行 7 d 的适应性饲养。本实验经内蒙古医科大学附属医院动物伦理委员会批准(审批号 KY2023067)。

1.2 药品与试剂

龙胆苦苷(质量分数 $\geq 98\%$)购自上海经科化学科技有限公司; SIRT1 抑制剂 EX527 (XY-Bioscience 公司,货号 0281); 苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(Bioesn 公司,货号 BES22228KB); 反转录试剂盒(Yeasen 公司,货号 11148ES10); Masson 染色试剂盒(武汉佰瑞得生物技术有限公司,货号 60532ES58,); 生长刺激表达基因 2 蛋白(ST-2,货号 YLK-E2270D)、大鼠 N 端前脑钠素(NT-proBNP,货号 YLK-E3442D)试剂盒购自优利科(上海)生命科学有限公司; 超氧化物歧化酶(SOD,货号 BC0175)、丙二醛(MDA,货号 BC0025)试剂盒均购自 Solarbio 公司; SIRT1 (ab110304)、p-AMPK (ab133448)、AMPK(ab32047)、PGC1 α (ab176328)、III 型胶原(Collagen III,货号 ab184993)、I 型胶原蛋白(Collagen I,货号 ab316222)、 α -平滑肌肌

动蛋白 (α -SMA, 货号 ab5694) 抗体均购自 Abcam 公司。

1.3 模型制备、分组及给药

大鼠适应性喂养 7 d 后, 参考相关文献报道以及预实验建立大鼠心力衰竭模型^[6]。大鼠 ip 戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉后, 将其固定于仰卧位。胸部剃毛、皮肤消毒后, 行左 3~4 肋间隙开胸显露心脏。在左心耳和肺锥体以下 2 mm 处用缝合针结扎左冠状动脉。分层缝合胸壁, 将大鼠放在保温仓中直到其恢复自主呼吸并醒来后再放回笼子。另取 12 只大鼠作为对照组只暴露心脏、不结扎。每只大鼠连续 3 d ip 青霉素以防止感染。当结扎处下端心肌组织缺血、变白, II 导联心电图 ST 段明显升高, 说明操作成功。常规喂养 1 周后, 将饲料减半, 强迫大鼠每天游泳 1 次, 当超声心动图检测大鼠的左心室射血分数 (LVEF) < 60%, 视为心力衰竭大鼠模型构建成功。

造模成功后, 将模型大鼠随机分为模型组、卡托普利组、龙胆苦苣 (50、100 mg/kg) 组、龙胆苦苣 + SIRT1 抑制剂组 (EX527) 组, 每组 12 只大鼠。给药剂量换算参考相关文献报道, 其中卡托普利组大鼠给予 ig 2.28 mg/kg 卡托普利^[7]; 龙胆苦苣 (50、100 mg/kg) 组大鼠分别 ig 50、100 mg/kg 龙胆苦苣^[4], 1 次/d, 连续 6 周。龙胆苦苣 + EX527 组大鼠在 ig 100 mg/kg 龙胆苦苣后尾 iv 5 mg/kg EX527^[8]。对照组和模型组大鼠 ig 等量的生理盐水, 其他处理方式同药物组。

1.4 超声心动图测定大鼠心功能

使用超声成像系统对大鼠进行心功能检测 (探头频率: 35 Hz, 穿透深度: 10~15 mm)。包括大鼠左室舒张末期内径 (LVDd)、左室收缩末期内径 (LVDs)、左室射血分数 (LVEF)、左室短轴缩短率 (FS)。

1.5 血清氧化应激因子和 ST-2、NT proBNP 含量检测

超声心动图测定大鼠心功能后, 对各组大鼠进行腹主动脉采血, 离心 (3 000 r/min、10 min) 取上清, 按照试剂盒的说明检测 SOD、MDA、ST-2 和 NT-proBNP 含量。

1.6 心肌组织 HE 和 Masson 染色

各组取 6 只大鼠, 安乐死后取心肌组织经 4% 多聚甲醛固定、脱水、石蜡包埋、切片 (5 μ m)、HE 染色、封片等步骤后, 于光镜下观察。

石蜡切片经脱蜡、洗涤、苏木精染色液和 Masson 混合溶液染色, 然后在 2% 冰醋酸水溶液中浸泡清洗, 用 1% 磷钼酸水溶液分化、苯胺蓝染色, 中性胶封闭切片, 用显微镜观察。

1.7 心肌组织线粒体形态检测

各组取剩余 6 只大鼠安乐死后, 取一部分新鲜心脏组织 (约 4 mm³) 于 2.5% 戊二醛 Gulta 电镜液中固定、PBS 洗涤、锇酸再固定、梯度乙醇脱水; 经包埋、切片、3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色后电镜下观察线粒体微结构。

1.8 RT-qPCR 检测心脏组织白细胞介素 (IL) -1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和 IL-18 mRNA 表达水平

取 1.7 项下其余部分心脏组织使用 TRIzol 法提取总 RNA, 然后进行反转录和 qPCR 反应。通过熔解曲线图确认引物是否特异。使用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法分别计算基因的相对表达量, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称	引物序列
IL-1 β	正向: 5'-GTGGCAGCTACCTATGTCTTGC-3'
	反向: 5'-CCACTTGTGGCTTATGTTCTGT-3'
IL-18	正向: 5'-CGACCGAACAGCCAACGAAT-3'
	反向: 5'-GGGTCACAGCCAGTCCTCTT-3'
TNF- α	正向: 5'-CACCACGCTCTTCTGTCTACTG-3'
	反向: 5'-GCTACGGGCTTGTCACTCG-3'
β -actin	正向: 5'-TGGCTCTAACAGTCCGCCTAG-3'
	反向: 5'-AGTGCGACGTGGACATCCG-3'

1.9 Western blotting 检测 SIRT1、p-AMPK、AMPK、PGC1 α 、Collagen III、Collagen I、 α -SMA 蛋白表达

取 1.7 项下另外部分心脏组织加入预冷的蛋白裂解液充分反应, 提取并定量总蛋白。蛋白经变性处理后电泳分离, 然后将其转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后与 SIRT1、p-AMPK、AMPK、PGC1 α 、Collagen III、Collagen I、 α -SMA 蛋白一抗孵育过夜。次日取膜用 TBST 洗涤, 室温下与二抗孵育 2 h, 再次用 TBST 洗涤后于凝胶成像系统进行分析。

1.10 统计学分析

所有数据处理和分析均使用 SPSS (24.0 版) 程序进行。计量资料符合正态分布并以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验进行。

2 结果

2.1 各组大鼠心功能比较

与对照组比较, 模型组 LVDs 和 LVDd 明显升高、LVEF 和 FS 明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 龙胆苦苣组大鼠 LVDs 和 LVDd 显著降低、LVEF 和 FS 显著升高 ($P < 0.05$); 相较于龙胆苦苣 100 mg/kg 组, 龙胆苦苣+EX527 组大鼠 LVDs、LVDd 显著升高, LVEF、FS 显著下降 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.2 各组大鼠氧化应激和 ST-2、NT-proBNP 含量比较

与对照组比较, 模型组大鼠 MDA、ST-2 和 NT-proBNP 水平显著升高、SOD 水平明显降低 ($P <$

0.05); 与模型组比较, 龙胆苦苣组大鼠 SOD 水平明显升高, MDA、ST-2、NT-proBNP 水平显著下降 ($P < 0.05$); 相较于龙胆苦苣 100 mg/kg 组, 龙胆苦苣+EX527 组 SOD 水平明显降低, MDA、ST-2、NT-proBNP 水平显著升高 ($P < 0.05$), 见表 3。

2.3 各组大鼠 HE 染色比较

如图 1 所示, 对照组大鼠心肌细胞有序排列、染色均匀; 模型组大鼠心肌组织结构整体破坏, 细胞破裂、排列杂乱并伴有炎性细胞浸润; 龙胆苦苣组大鼠心肌组织整体结构趋于完整、细胞核破坏程度及炎性细胞浸润现象大大减轻; 龙胆苦苣+EX527 组大鼠心肌组织损伤严重。

表 2 各组大鼠心功能对比 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Comparison of cardiac function in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	LVDs/mm	LVDd/mm	LVEF/%	FS/%
对照	—	3.48±0.25	6.54±0.58	81.76±8.04	49.65±4.73
模型	—	5.67±0.49*	8.75±0.67*	52.81±4.63*	21.34±1.75*
卡托普利	2.28	3.83±0.41 [#]	6.87±0.50 [#]	77.18±8.01 [#]	41.58±3.69 [#]
龙胆苦苣	50	4.82±0.37 [#]	8.02±0.61 [#]	63.22±4.89 [#]	29.34±2.07 [#]
	100	3.71±0.26 [#]	6.93±0.52 [#]	76.43±6.95 [#]	40.27±6.20 [#]
龙胆苦苣+EX527	100+5	5.14±0.57 [▲]	8.06±0.75 [▲]	62.12±8.03 [▲]	31.70±5.08 [▲]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与龙胆苦苣 100 mg·kg⁻¹ 组比较: [▲] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs gentiopicroside 100 mg·kg⁻¹。

表 3 各组大鼠 SOD、MDA、ST-2 和 NT-proBNP 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Comparison of SOD, MDA, ST-2 and NT-proBNP levels in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	NT-proBNP/(μg·L ⁻¹)	ST-2/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	253.48±21.30	3.54±0.28	31.76±5.04	99.65±11.73
模型	—	115.67±9.25*	7.75±0.67*	152.81±18.20*	281.34±26.01*
卡托普利	2.28	211.54±22.08 [#]	4.87±0.50 [#]	71.50±10.09 [#]	141.58±13.09 [#]
龙胆苦苣	50	164.82±14.33 [#]	6.12±0.55 [#]	113.20±16.25 [#]	209.18±23.07 [#]
	100	201.71±18.45 [#]	4.43±0.75 [#]	66.43±9.58 [#]	154.27±18.21 [#]
龙胆苦苣+EX527	100+5	175.14±15.27 [▲]	6.36±0.81 [▲]	122.25±16.07 [▲]	231.70±20.10 [▲]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与龙胆苦苣 100 mg·kg⁻¹ 组比较: [▲] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs gentiopicroside 100 mg·kg⁻¹。

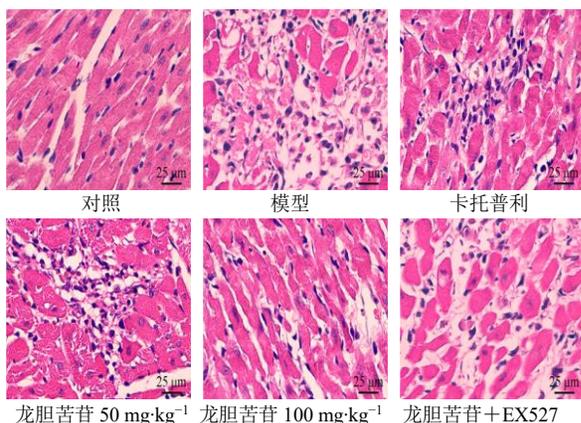


图 1 心肌组织 HE 染色 (×400)

Fig. 1 Myocardial tissue was stained with HE (×400)

如图 2、表 4 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠心肌组织间质纤维化、胶原容积分数升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 龙胆苦苣组大鼠心肌组织间质纤维化减轻、胶原容积分数减小 ($P < 0.05$); 相较于龙胆苦苣 100 mg/kg 组, 龙胆苦苣+EX527 组大鼠心肌组织间质纤维化现象加重、胶原容积分数升高 ($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠线粒体形态比较

如图 3 所示, 对照组线粒体完整, 嵴结构正常、清晰, 未见肿胀或空泡。模型组线粒体内嵴排列无序, 膜结构损伤, 线粒体变性出现肿胀或空泡; 龙胆苦苣组线粒体相对完整, 嵴结构正常、清晰, 少

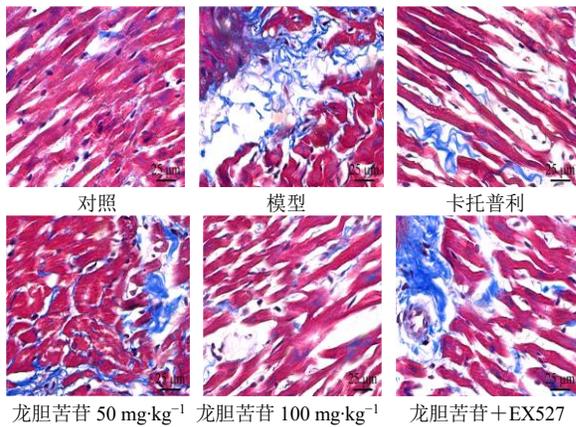


图 2 心肌组织 Masson 染色 (×400)

Fig. 2 Masson staining of myocardial tissue (×400)

表 4 心肌组织胶原容积分数对比 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 4 Comparison of collagen volume fraction in myocardial tissue ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	胶原容积分数/%
对照	—	4.40 ± 0.35
模型	—	29.31 ± 3.70*
卡托普利	2.28	12.25 ± 1.58 [#]
龙胆苦苣	50	23.14 ± 5.04 [#]
	100	15.47 ± 2.50 [#]
龙胆苦苣 + EX527	100 + 5	24.33 ± 4.46 [▲]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与龙胆苦苣 100 mg·kg⁻¹ 组比较: [▲] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs gentiopicroside 100 mg·kg⁻¹。

表 5 各组大鼠炎症因子 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 5 Comparison of mRNA expression levels of inflammatory factors in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量		
		<i>IL-1β</i>	<i>IL-18</i>	<i>TNF-α</i>
对照	—	0.27 ± 0.04	0.19 ± 0.03	0.39 ± 0.05
模型	—	0.73 ± 0.05*	0.66 ± 0.08*	0.70 ± 0.06*
卡托普利	2.28	0.45 ± 0.06 [#]	0.37 ± 0.02 [#]	0.43 ± 0.04 [#]
龙胆苦苣	50	0.61 ± 0.08 [#]	0.42 ± 0.05 [#]	0.56 ± 0.07 [#]
	100	0.42 ± 0.05 [#]	0.33 ± 0.05 [#]	0.44 ± 0.03 [#]
龙胆苦苣 + EX527 组	100 + 5	0.65 ± 0.04 [▲]	0.47 ± 0.05 [▲]	0.61 ± 0.04 [▲]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与龙胆苦苣 100 mg·kg⁻¹ 组比较: [▲] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs gentiopicroside 100 mg·kg⁻¹。

鼠心肌组织中 SIRT1、p-AMPK/AMPK、PGC1α 蛋白表达量明显减少, Collagen III、Collagen I、α-SMA 蛋白表达量增加 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 龙胆苦苣组大鼠心肌组织中通路蛋白表达量明显增多, Collagen III、Collagen I、α-SMA 蛋白表达量显著下降 ($P < 0.05$); 相较于龙胆苦苣 100 mg/kg 组, 龙

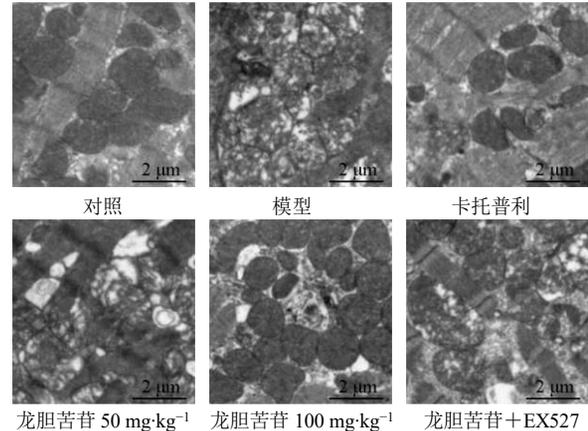


图 3 透射电镜图 (×8 000)

Fig. 3 Transmission electron microscope image (×8 000)

量可见肿胀或空泡。龙胆苦苣 + EX527 组线粒体肿胀、破裂或空泡, 嵴排列无序, 线粒体变性。

2.5 各组大鼠心肌组织中炎症因子 mRNA 表达水平比较

与对照组比较, 模型组大鼠心肌组织中炎症因子 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 龙胆苦苣组大鼠炎症因子 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 相较于龙胆苦苣 100 mg/kg 组, 龙胆苦苣 + EX527 组大鼠炎症因子 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 见表 5。

2.6 各组大鼠 SIRT1、p-AMPK、AMPK、PGC1α、Collagen III、Collagen I、α-SMA 蛋白表达

如图 4、表 6 所示, 与对照组相比, 模型组大

胆苦苣 + EX527 组大鼠心肌组织中信号通路蛋白表达量显著降低, Collagen III、Collagen I、α-SMA 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$)。

3 讨论

心力衰竭是一种复杂的临床综合征和终末期心血管疾病。近年来较高的发病率和死亡率不仅对

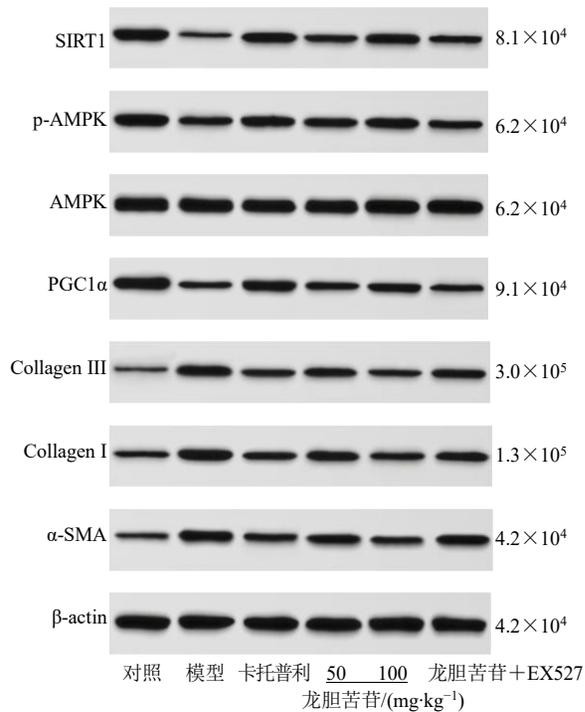


图 4 各组大鼠 SIRT1、p-AMPK、AMPK、PGC1α、Collagen III、Collagen I 和 α-SMA 蛋白表达量
Fig. 4 Protein expressions of SIRT1, p-AMPK, AMPK, PGC1α, Collagen III, Collagen I and α-SMA in each group

表 6 各组大鼠 SIRT1、p-AMPK、AMPK、PGC1α、Collagen III、Collagen I 和 α-SMA 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 6 Comparison of SIRT1, p-AMPK, AMPK, PGC1α, Collagen III, Collagen I, and α-SMA protein expression levels in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量					
		SIRT1	p-AMPK/AMPK	PGC1α	Collagen III	Collagen I	α-SMA
对照	—	0.92 ± 0.07	0.91 ± 0.07	0.95 ± 0.04	0.19 ± 0.02	0.37 ± 0.03	0.22 ± 0.03
模型	—	0.25 ± 0.03*	0.47 ± 0.04*	0.38 ± 0.05*	0.76 ± 0.07*	0.91 ± 0.09*	0.87 ± 0.50*
卡托普利	2.28	0.75 ± 0.04#	0.88 ± 0.05#	0.85 ± 0.05#	0.48 ± 0.02#	0.60 ± 0.03#	0.41 ± 0.05#
龙胆苦苷	50	0.50 ± 0.07#	0.61 ± 0.08#	0.52 ± 0.06#	0.62 ± 0.04#	0.73 ± 0.05#	0.68 ± 0.06#
	100	0.72 ± 0.06#	0.83 ± 0.05#	0.77 ± 0.06#	0.43 ± 0.05#	0.58 ± 0.07#	0.35 ± 0.06#
龙胆苦苷+EX527	100+5	0.46 ± 0.06▲	0.54 ± 0.05▲	0.41 ± 0.03▲	0.68 ± 0.07▲	0.75 ± 0.05▲	0.73 ± 0.06▲

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与龙胆苦苷 100 mg·kg⁻¹ 组比较: ▲ $P < 0.05$ 。
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ vs gentiopicroside 100 mg·kg⁻¹.

炎症因子在心肌重塑的发生和进展中起着至关重要的作用。氧化应激可诱导心脏成纤维细胞转变为促纤维化表型,从而导致心脏纤维化^[17];同时心脏纤维化也由多种炎症细胞因子介导的,如 TNF-α 和 IL-1β,它们作为促纤维化调节因子,调节成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化,而心肌纤维化是心力衰竭的必然过程^[18]。本研究结果显示心力衰竭大鼠

患者带来重大身心影响,也造成严重的公共卫生负担。近年来,由于中医药学的蓬勃发展,中药治疗为多种疾病提供了新的选择。中药具有多位点协同作用的特点,可发挥抗氧化应激和抗炎、改善心室重构、减少心肌纤维化、促进血管生成等广泛药理作用^[9-10]。龙胆苦苷是提取于龙胆科植物条叶龙胆干燥根及根茎的活性成分,相关研究显示,龙胆苦苷能够通过调控磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路减轻心肌组织的氧化应激反应和细胞凋亡,体现出龙胆苦苷对心肌细胞的改善作用^[11];还可通过调节腺苷酸活化蛋白激酶 α1 (AMPKα1)/核转录因子红系 2 相关因子 2 (Nrf2) 通路,改善缺氧缺血性脑损伤大鼠的心肌损伤、保护线粒体功能^[12]。

心脏纤维化是心力衰竭疾病进展的主要驱动因素,过度纤维化导致心脏扩张和心功能障碍^[13]。NTpro-BNP 是公认的心力衰竭标志物,ST-2 是反映心功能和预测心力衰竭患者预后的生物标志物,其在血浆中的水平是心肌纤维化重要预测因子^[14-15]。线粒体是细胞中产生能量的关键细胞器。心肌的正常能量代谢是维持心脏功能的基础,而线粒体产生的代谢紊乱则与心肌缺血密切相关^[16]。氧化应激和

LVDs 和 LVDd 明显升高、LVEF 和 FS 明显降低,提示心力衰竭模型构建成功。此外通过指标检测发现心力衰竭大鼠心肌组织病理损伤程度和心肌纤维化严重,线粒体结构紊乱、血清中 MDA、ST-2 和 NT-proBNP 水平、炎症因子表达水平以及 Collagen III、Collagen I、α-SMA 蛋白表达量显著升高。以上指标的明显变化可能说明心力衰竭大鼠存在氧化

应激和炎性反应, 给线粒体造成损伤和功能障碍, 进而破坏了心肌细胞, 导致心室重构和心功能下降。而经龙胆苦苷干预防治后, 上述指标均得到明显改善, 这表明龙胆苦苷可抑制心力衰竭大鼠氧化应激和炎症反应, 减轻心肌纤维化和线粒体损伤, 从而改善心肌组织损伤、增强心功能。

SIRT1 可以使多种蛋白质去乙酰化, 在氧化应激反应中起重要作用。SIRT1 的活化可以激活下游因子 PGC-1 α , 进而抑制氧化应激反应; 此外 PGC-1 α 也是调节线粒体生物合成的关键因子。AMPK 是机体能量保持平衡所必需的一类酶, 通过 PGC-1 α 改善线粒体功能障碍。综上认为 SIRT1/AMPK/PGC-1 α 信号通路在介导机体代谢和氧化应激反应等多种机体反应中扮演重要角色^[19-20]。既往研究表明, 灯盏花素能在一定程度上通过激活 SIRT1/AMPK/PGC-1 α 信号通路减轻冠心病大鼠心肌细胞凋亡, 增强心功能^[21]。本研究发现心力衰竭大鼠心肌组织中该信号通路相关蛋白表达量明显下调, 说明该信号通路活性降低。而经龙胆苦苷 ig 治疗后, 该通路相关蛋白表达量明显增加。故推测龙胆苦苷通过增强 SIRT1/AMPK/PGC-1 α 通路活性进而抑制心力衰竭大鼠氧化应激和炎症损伤、增强线粒体功能。为了验证该推测, 本研究在 ig 高剂量龙胆苦苷的基础上加入该通路抑制剂 EX527, 发现通路相关蛋白的表达量再次降低, 氧化应激和炎症反应增强、线粒体损伤。说明 EX527 可以减弱龙胆苦苷对 SIRT1/AMPK/PGC-1 α 通路的正向激活作用, 实现对心力衰竭大鼠心肌损伤及心功能的修复和改善。

综上所述, 龙胆苦苷可能通过激活 SIRT1/AMPK/PGC-1 α 信号通路, 抑制氧化应激、炎症反应和心肌纤维化、保护线粒体功能, 进而改善心力衰竭大鼠心肌组织病损和心功能。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hung M J, Yeh C T, Kounis N G, *et al.* Coronary artery spasm-related heart failure syndrome: Literature review [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(8): 7530.
- [2] 李生浩, 李俊义, 武昆利, 等. 龙胆苦苷的药理作用及分子机制研究进展 [J]. 昆明医科大学学报, 2020, 41(1): 158-162.
- [3] 胡志良, 池豪, 丁水印. 龙胆苦苷对脂多糖诱导血管内皮细胞损伤的作用及机制 [J]. 中草药, 2021, 52(10): 3002-3008.
- [4] Li F, Zhu H X, Chang Z J, *et al.* Gentiopicroside alleviates acute myocardial infarction injury in rats by disrupting Nrf2/NLRP3 signaling [J]. *Exp Biol Med*, 2023, 248(14): 1254-1266.
- [5] Yu S Y, Qian H, Tian D W, *et al.* Linggui Zhugan Decoction activates the SIRT1-AMPK-PGC1 α signaling pathway to improve mitochondrial and oxidative damage in rats with chronic heart failure caused by myocardial infarction [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1074837.
- [6] Yang M M, Wu H Y, Qian H, *et al.* Linggui Zhugan decoction delays ventricular remodeling in rats with chronic heart failure after myocardial infarction through the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2023, 120: 155026.
- [7] 任涵, 王舒舒, 赵婉竹, 等. 基于生物信息学和动物实验探讨苓桂术甘汤通过 HIF-1 α /HO-1 信号通路改善心肌梗死后慢性心力衰竭的作用 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(23): 6407-6416.
- [8] 胡滨, 王大斌, 郭茂. 川穹嗪调节 SIRT1/AMPK/PGC1 α 信号通路对偏头痛大鼠镇痛作用及神经元损伤的影响 [J]. 天津医药, 2023, 51(4): 382-387.
- [9] 鞠春晓, 李逸雯, 赵俊男, 等. 中药治疗慢性心力衰竭用药规律及可能机制的研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(9): 1307-1316.
- [10] 吴俊鹏, 张艳, 张伟. 补肾活血组方对慢性心力衰竭大鼠 Wnt5a/CaMK II 信号通路调控及心肌重构的影响 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(4): 774-777.
- [11] 解娜. 龙胆苦苷对过氧化氢诱导的心肌细胞损伤的保护作用及对 PI3K/AKT 信号通路的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(7): 1727-1730.
- [12] 陈金良, 张青, 吴亮, 等. 龙胆苦苷上调 AMPK α 1、Nrf2 对缺氧缺血性脑损伤大鼠心肌损伤和线粒体功能的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2020, 37(12): 2394-2400.
- [13] Zhong S, Guo H L, Wang H, *et al.* Apelin-13 alleviated cardiac fibrosis via inhibiting the PI3K/Akt pathway to attenuate oxidative stress in rats with myocardial infarction-induced heart failure [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(4): BSR20200040.
- [14] Castiglione V, Aimò A, Vergaro G, *et al.* Biomarkers for the diagnosis and management of heart failure [J]. *Heart Fail Rev*, 2022, 27(2): 625-643.
- [15] Ataklte F, Vasan R S. Heart failure risk estimation based on novel biomarkers [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2021, 21(7): 655-672.
- [16] Hinton A Jr, Claypool S M, Neikirk K, *et al.* Mitochondrial structure and function in human heart failure [J]. *Circ Res*, 2024, 135(2): 372-396.

- [17] Song X M, Zhao M N, Li G Z, *et al.* Atorvastatin ameliorated myocardial fibrosis in db/db mice by inhibiting oxidative stress and modulating macrophage polarization [J]. *World J Diabetes*, 2023, 14(12): 1849-1861.
- [18] Shen S C, Zhang M, Wang X H, *et al.* Single-cell RNA sequencing reveals S100a9^{hi} macrophages promote the transition from acute inflammation to fibrotic remodeling after myocardial ischemia-reperfusion [J]. *Theranostics*, 2024, 14(3): 1241-1259.
- [19] Cui Y K, Hong Y X, Wu W Y, *et al.* Acacetin ameliorates cardiac hypertrophy by activating Sirt1/AMPK/PGC-1 α pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 920: 174858.
- [20] Liu Z L, Zhang H, Wang H L, *et al.* Magnolol alleviates IL-1 β -induced dysfunction of chondrocytes through repression of SIRT1/AMPK/PGC-1 α signaling pathway [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2020, 40(3): 145-151.
- [21] 毛治尉, 张涛, 武永新, 等. 基于 AMPK/SIRT1/PGC1 α 信号通路探究灯盏花素联合有氧运动对冠心病大鼠心功能障碍的改善作用及机制研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2023, 38(9): 1185-1191.

[责任编辑 高源]