

GATA1/ β 2AR 信号通路在栀子苷调控巨噬细胞极化改善冠心病大鼠心肌损伤中的作用

谈 旭¹, 张永静², 杨 宁³

1. 河南省濮阳医学高等专科学校 中医学院, 河南 濮阳 457000

2. 濮阳医学高等专科学校 康复学院, 河南 濮阳 457000

3. 濮阳市油田总医院 心内科, 河南 濮阳 457000

摘要: **目的** 探讨栀子苷对冠心病模型大鼠巨噬细胞极化及 GATA 结合蛋白 1 (GATA1)/ β 2 肾上腺素受体 (β 2AR) 信号通路的影响。**方法** 采用结扎左心室回旋分支末端的方法制备冠心病模型, 模型大鼠分为模型组, 栀子苷低、高剂量 (25、100 mg·kg⁻¹) 组, 栀子苷 (100 mg·kg⁻¹) + 克伦特罗 (β 2AR 激动剂, 0.5 mg·kg⁻¹) 组, 另设置假手术组, 操作相同但不结扎。造模成功 1 周后开始给药, 每天 1 次, 栀子苷 ig 给药, 克伦特罗 ip 给药, 假手术组和模型组均 ig 等量的 0.9% 氯化钠溶液, 连续给药 3 周。超声心动图进行大鼠心功能检测; ELISA 检测血清 N 端 B 型利钠肽原 (NT-proBNP)、白细胞介素 (IL)-6、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、IL-10 及精氨酸酶-1 (Arg-1) 水平; 流式细胞术检测心脏巨噬细胞相对含量及 M1/M2 极化状态; 免疫组化法进行心肌组织内皮型一氧化氮合酶 (eNOS)、内皮素 1 (ET-1) 蛋白表达水平检测; 采用 Masson 和 TTC 染色分别评估大鼠心肌病理形态学变化及心肌梗死情况; TUNEL 染色检测心肌细胞凋亡情况; Western blotting 法检测心肌组织 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、B 细胞淋巴瘤-2 蛋白 (Bcl-2)、裂解型半胱天冬酶-3 (cleaved Caspase-3)、GATA1、 β 2AR 蛋白表达水平。**结果** 模型组心肌组织相较于假手术组呈大量蓝色胶原纤维沉积, 左室舒张末期容积 (LVEDV)、左室收缩末期容积 (LVESV)、血清 NT-proBNP、TNF- α 、IL-6 含量、心脏组织中巨噬细胞数量、M1-F4/80⁺CD86⁺ 值 (M1 型巨噬细胞占比)、ET-1、心肌梗死率、细胞凋亡率、Bax、cleaved Caspase-3、 β 2AR 表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 而左室射血分数 (LVEF)、左室缩短分数 (LVFS)、M2-F4/80⁺CD163⁺ 值 (M2 型巨噬细胞占比)、eNOS、GATA1、Bcl-2 表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 栀子苷低、高剂量给药可显著逆转模型组上述指标的变化趋势 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且显著升高 IL-10、Arg-1 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01); 给予克伦特罗则明显抵消高剂量栀子苷对模型组大鼠上述指标的改善作用 ($P < 0.05$)。**结论** 冠心病模型大鼠存在 M1/M2 型巨噬细胞极化失衡, 以 M1 型巨噬细胞为主; 栀子苷可通过调控 GATA1/ β 2AR 信号轴, 促进巨噬细胞向 M2 极化, 抑制 M1 型巨噬细胞活化, 改善冠心病大鼠心肌损伤。

关键词: 冠心病; 栀子苷; GATA 结合蛋白 1 (GATA1)/ β 2 肾上腺素受体 (β 2AR) 信号通路; 巨噬细胞极化; 炎症; 心肌损伤

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)07-1788-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.07.009

Effect of GATA1/ β 2AR signaling in geniposide improving myocardial injury in rats with coronary heart disease by regulating macrophage polarization

TAN Xu¹, ZHANG Yongjing², YANG Ning³

1. College of Traditional Chinese Medicine, Henan Puyang Medical College, Puyang 457000, China

2. College of Rehabilitation, Puyang Medical College, Puyang 457000, China

3. Department of Cardiology, Puyang Oilfield General Hospital, Puyang 457000, China

Abstract: Objective The effects of geniposide on macrophage polarization and the GATA binding protein 1 (GATA1)/ β 2 adrenergic receptor (β 2AR) signaling pathway in a rat model of coronary heart disease were investigated. **Methods** A rat model of coronary heart disease was established by ligating the end of the left circumflex branch of the left ventricle. The successfully modeled rats were divided into the model group, low-dose (25 mg·kg⁻¹) and high-dose (100 mg·kg⁻¹) geniposide groups, and the high-dose geniposide

收稿日期: 2024-11-03

基金项目: 河南省医学科技攻关项目计划 (20203A519)

作者简介: 谈 旭, 研究方向为中医学。E-mail: xqh5414@163.com

(100 mg·kg⁻¹) + clenbuterol (β 2AR agonist, 0.5 mg·kg⁻¹) group. A sham operation group was also set up, with the same operation but without ligation. Drug administration began one week after successful modeling, once a day. Geniposide was ig administered, and clenbuterol was ip administered. The sham operation group and the model group were ig given the same volume of 0.9% sodium chloride solution. The treatment lasted for three weeks. Echocardiography was used to detect cardiac function in rats; ELISA was used to detect the levels of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP), interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-10, and arginase-1 (Arg-1) in serum; flow cytometry was used to detect the relative content of cardiac macrophages and M1/M2 polarization status; immunohistochemistry was used to detect the expression levels of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and endothelin-1 (ET-1) in myocardial tissue; Masson and TTC staining were used to evaluate the pathological morphology of myocardial tissue and myocardial infarction in rats; TUNEL staining was used to detect myocardial cell apoptosis; Western blotting was used to detect the expression levels of Bcl-2 associated X protein (Bax), B-cell lymphoma-2 protein (Bcl-2), cleaved caspase-3, GATA1, and β 2AR in myocardial tissue. **Results** Compared with the sham operation group, the myocardial tissue of the model group showed a large amount of blue collagen fiber deposition. The left ventricular end-diastolic volume (LVEDV), left ventricular end-systolic volume (LVESV), serum NT-proBNP, TNF- α , IL-6 content, the number of macrophages in cardiac tissue, M1-F4/80⁺CD86⁺ value (proportion of M1-type macrophages), ET-1, myocardial infarction rate, apoptosis rate, Bax, cleaved Caspase-3, and β 2AR expression levels were significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), while the left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular fractional shortening (LVFS), M2-F4/80⁺CD163⁺ value (proportion of M2-type macrophages), eNOS, GATA1, and Bcl-2 expression levels were significantly decreased ($P < 0.01$). Low-dose and high-dose geniposide administration could significantly reverse the changes in the above indicators in the model group ($P < 0.05, 0.01$), and significantly increase the levels of IL-10 and Arg-1 ($P < 0.05, 0.01$). Administration of clenbuterol significantly canceled the improvement effect of high-dose geniposide on the above indicators in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** In the rat model of coronary heart disease, there is polarization imbalance of M1/M2 type macrophages, with M1 type macrophages being dominant. Gardenia glycoside can promote the polarization of macrophages towards M2 and inhibit the activation of M1-type macrophages by regulating the GATA1/ β 2AR signaling axis, thereby improving myocardial injury in rats with coronary heart disease.

Key words: coronary heart disease; geniposide; GATA-binding protein 1 (GATA1)/ β 2-adrenergic receptor (β 2AR) signaling pathway; macrophage polarization; inflammation; myocardial injury

冠心病主要由冠状动脉粥样硬化引起, 导致血管收缩、阻塞或痉挛, 诱导血栓形成, 最终阻碍冠状动脉血流。在晚期, 冠心病可进展为心肌梗死、卒中及其他有害的心血管疾病, 在老年人中发病率和死亡率较高, 但最近几年其发病年龄逐渐减小^[1]。冠心病中的巨噬细胞以 M1 型为主, 通过分泌促炎因子参与心肌炎症反应^[2]; 冠心病症状修复期时, 巨噬细胞以 M2 型为主, 通过分泌相关抗炎因子, 参与组织修复及炎症消退过程^[3]。因此, M1/M2 型巨噬细胞极化状态贯穿冠心病发展整个过程, 影响疾病的进展和预后, 两者比例失衡可能导致无法控制的炎症反应, 最终导致心肌损伤。研究发现, GATA 结合蛋白 1 (GATA1) / β 2 肾上腺素受体 (β 2AR) 信号轴参与心肌损伤的发生发展, 而且其对免疫系统的激活在心肌细胞和免疫细胞中起着重要作用^[4]。研究表明, 多种药物通过 GATA1/ β 2AR 信号轴调控巨噬细胞极化^[5], 推测 GATA1/ β 2AR 信号轴通过介导巨噬细胞极化参与冠心病的发生发展。

栀子苷是一种从栀子中提取的环烯醚萜苷, 具

有抗炎和免疫调节作用。据报道, 栀子苷可以通过影响 GATA1/ β 2AR 信号轴活性减少心力衰竭小鼠心肌纤维化, 改善心功能^[6]。但栀子苷是否可以通过调控 GATA1/ β 2AR 信号轴影响冠心病大鼠巨噬细胞极化还有待进一步研究。本研究拟探究栀子苷对冠心病大鼠巨噬细胞极化及 GATA1/ β 2AR 信号轴的影响, 以期对冠心病的治疗提供新途径。

1 材料

1.1 实验动物

12 周龄 SPF 级雄性大鼠, 体质量 (200 $\pm$ 10) g, 由河南省濮阳医学高等专科学校实验动物中心提供, 实验动物使用许可证号为 SYXK (豫) 2022-0023。动物饲养于恒温室内, 环境温度为 18~22 $^{\circ}\text{C}$, 光照周期为 12 h/12 h, 环境湿度为 40%~70%, 可自由进食和饮水。本动物实验已获得河南省濮阳医学高等专科学校动物伦理委员会批准, 批准文号为 PYYZL-2024-KY-005。

1.2 药物及主要试剂

栀子苷购自南京天润生物科技有限公司, 质量分数 $\geq$ 98%, 批号 TR20240415; 克伦特罗购自南京

建成生物科技有限公司, 质量分数 $\geq 98\%$, 批号 JC20240321; 戊巴比妥钠购于北京北实纵横科技有限公司; TUNEL 染色试剂盒、白细胞介素 (IL) -17 ELISA 试剂盒均购于碧云天生物公司; N 端 B 型利钠肽原 (NT-proBNP)、IL-6、肿瘤坏死因子 (TNF) - α 、IL-10 及精氨酸酶-1 (Arg-1) ELISA 试剂盒均购于北京百奥莱博公司; Masson 染色试剂盒、TTC 染色液购于北京普利莱公司; RIPA 裂解液购于北京金克隆生物公司; 内皮素-1 (ET-1) 和内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 抗体购于圣克鲁斯生物公司; B 细胞淋巴瘤-2 蛋白 (Bcl-2)、裂解型半胱天冬酶-3 (cleaved Caspase-3)、GATA1、 $\beta 2AR$ 抗体购于 Abcam 公司; Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 抗体购于 CST 公司。

1.3 主要仪器

KR-S80 型医用多普勒超声仪购于江苏新玛医疗器械有限公司; KLA ZETA-20 型光学显微镜购于北京中海远创材料科技有限公司; HD-X96L 型多功能酶标仪购于河南领秀仪器有限公司; Aurora 型全光谱流式细胞仪购于青岛佳鼎分析仪器有限公司; LSM 510 型激光共聚焦显微镜购于蔡司公司。

2 方法

2.1 冠心病模型的建立

所有实验大鼠自由饮食和饮水, 适应性喂养 1 周后, ip 0.3% 戊巴比妥钠 ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 进行麻醉, 并使用呼吸机进行心电图监测。一旦呼吸稳定, 手术打开胸部暴露心脏, 并进行结扎左心室回旋分支末端。观察到结扎部位下方的心肌组织呈灰白色, ST 段明显抬高, 表明冠心病建模成功^[7]; 随后缝合伤口, 置于笼中饲养, 连续 3 d ip 给予青霉素钠注射 ($5 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$) 以预防感染。假手术组操作相同但是不结扎。

2.2 动物分组及给药

随机将造模成功的大鼠分为模型组, 缬苄低、高剂量 (ig 25、 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组及缬苄 ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) + 克伦特罗 ($\beta 2AR$ 激动剂, ip $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组, 每组 15 只, 另设置假手术组, 药物的给药剂量均参考相关研究报道设置^[8-9]。造模成功 1 周后给予相应药物, 每天 1 次, 假手术组和模型组均 ig 等量的 0.9% 氯化钠溶液, 连续给药 3 周。

2.3 心功能检测

采用彩色多普勒超声诊断仪对所有的大鼠进

行心功能检测, 记录大鼠 3 个心动周期的左室射血分数 (LVEF)、左室缩短分数 (LVFS)、左室舒张末期容积 (LVEDV)、左室收缩末期容积 (LVESV)。

2.4 ELISA 法检测大鼠血清 NT-proBNP、IL-6、TNF- α 、IL-10、Arg-1 水平

大鼠 ip 戊巴比妥钠 ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 麻醉后, 腹主动脉取血, $1000 \times g$ 离心 10 min 后得到血清。按照 NT-proBNP、IL-6、TNF- α 、IL-10、Arg-1 ELISA 试剂盒说明操作, 酶标仪检测各组大鼠血清中 NT-proBNP、IL-6、TNF- α 、IL-10、Arg-1 水平。

2.5 流式细胞术检测大鼠心肌巨噬细胞 M1、M2 型占比

大鼠麻醉后取心脏, 冷冻保存新鲜心脏, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗血液, 切片后移入 15 mL 离心管中, 离心管中含有心脏消化液 (含 RPMI-1640 培养基、质量浓度为 $1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 II 型胶原酶、质量浓度为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的脱氧核糖核酸酶 I)。37 °C 低温孵育 1 h, 每隔 15 min 间歇搅拌 1 次。消化液通过 70 μm 细胞滤过器获得单细胞悬浮液, 然后进行裂解和再悬浮。将悬浮液在 4 °C、 $400 \times g$ 下离心 5 min, 丢弃上清。加入 100 μL DBPS 重悬, 分装。然后将 CD45、F4/80、CD11b、CD86 和 CD163 抗体加入各管, 体积为 1 μL , 在 4 °C 光照下孵育 30 min。随后加入 1 mL PBS (含 1% 血清), 洗涤离心 1~2 次, 弃上清。随后加入 1 mL 固定/破碎的 A 膜溶液, 在 4 °C 下避光孵育 40 min。每管加入 2 mL 1 $\times$ C 溶液, 在 $400 \times g$ 室温下离心 5 min, 丢弃上清。将含有 1% 血清的 200 μL PBS 悬液注入细胞, 进行流式细胞术检测, 使用 Flowjo 软件分析流式细胞数据。

2.6 大鼠心肌组织病理形态观察

将心肌组织置于 4% 多聚甲醛固定 24 h, 乙醇脱水、石蜡包埋后心肌组织切片, 脱蜡、复水后用 Masson 染色, 然后脱水、封片, 光学显微镜下观察各组大鼠的心肌组织病理形态特征。

2.7 大鼠心肌梗死情况观察

将心脏冷冻切片, 浸泡在 TTC 溶液中, 在 37 °C 下孵育 15 min。用 4% 多聚甲醛固定组织 12 h, 在光学显微镜下进行观察和成像。使用 Image ProPlus 6.0 软件对心肌梗死大小进行量化, 计算心肌梗死率。

心肌梗死率 = 梗死体积 / 总体积

2.8 TUNEL 染色检测细胞凋亡

取“2.6”项中心肌组织切片, 按照 TUNEL 试

剂盒说明,应用 TUNEL 染料溶液,在无光条件下孵育 1 h,在避光条件下用 DAPI 染色细胞核 10 min。封片剂密封组织切片,使用荧光显微镜检查。通过绿色荧光来区分凋亡细胞,通过计算 TUNEL 阳性细胞占细胞总数的百分比来确定凋亡率。

2.9 免疫组化检测 eNOS、ET-1

取心肌组织的石蜡切片,脱蜡复水,加 eNOS、ET-1 一抗在 4 ℃下孵育过夜,然后与二抗在室温下孵育 30 min。随后,样品用 PBS 冲洗,进行 DAB 显色,苏木精染色成核,然后冲洗、脱水、清除和密封;Image J 软件分析吸光度(A)值。

2.10 Western blotting 实验

取大鼠的心肌组织,裂解液裂解并提取总蛋白。随后电泳分离,转膜,脱脂奶粉封闭,加入相关一抗后 4 ℃孵育过夜。次日 TBST 洗涤 3 次,加入相关二抗室温孵育 1 h。再次用 TBST 洗涤 3 次,

凝胶电泳仪拍照并分析灰度值。

2.11 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9 进行统计分析,实验数据均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析进行多组间样本均数比较,用 LSD-*t* 检验进行组间两两比较。

3 结果

3.1 槲子苷对冠心病模型大鼠心功能的影响

与假手术组比较,模型组 LVEF、LVFS 明显下降($P<0.01$),LVEDV、LVESV 明显增大($P<0.01$);与模型组比较,槲子苷低、高剂量给药后 LVEF、LVFS 明显升高($P<0.05$ 、 0.01),LVEDV、LVESV 明显减小($P<0.05$ 、 0.01);与槲子苷高剂量组比较,给予克伦特罗明显抵消其对冠心病大鼠心功能指标的改善作用($P<0.05$)。结果见图 1 和表 1。

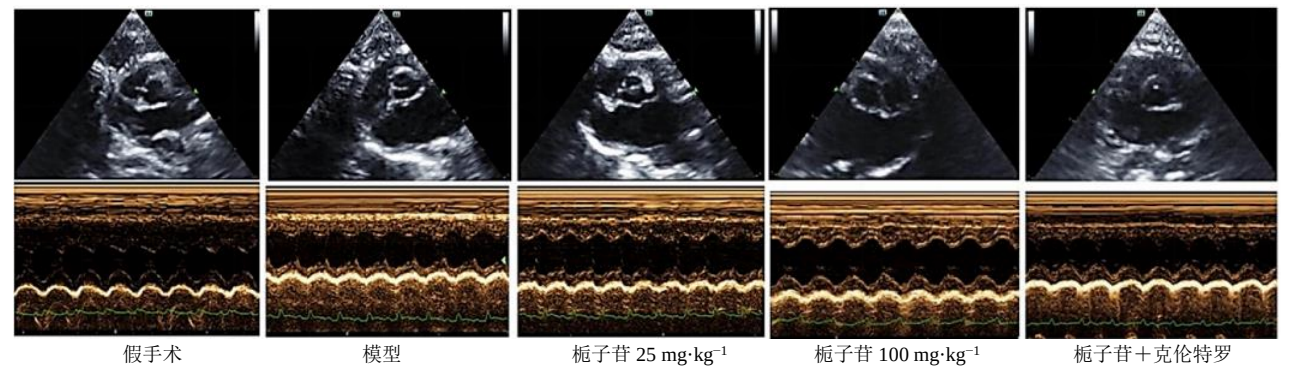


图 1 各组大鼠的超声心动图

Fig. 1 Echocardiographic images of rats in each group

表 1 槲子苷对冠心病模型大鼠心功能的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of geniposide on cardiac function in coronary heart disease rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	LVEF/%	LVFS/%	LVEDV/mL	LVESV/mL
假手术	—	85.08±7.74	53.62±9.96	4.66±0.32	0.62±0.15
模型	—	58.68±10.65**	37.15±7.76**	8.00±1.99**	1.44±0.30**
槲子苷	25	73.45±12.39 [#]	44.68±6.05 [#]	5.86±1.01 [#]	1.02±0.27 [#]
	100	81.54±9.38 ^{##}	50.28±4.12 ^{##}	5.25±0.33 ^{##}	0.77±0.25 ^{##}
槲子苷+克伦特罗	100+0.5	65.57±10.49 [△]	40.03±8.54 [△]	7.22±1.86 [△]	1.32±0.26 [△]

与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$; 与槲子苷高剂量组比较: [△] $P<0.05$ 。

^{**} $P<0.01$ vs sham-operated group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs high-dose group of geniposide.

3.2 槲子苷对冠心病模型大鼠血清 NT-proBNP、IL-6、TNF-α、IL-10、Arg-1 水平的影响

与假手术组比较,模型组大鼠血清 NT-proBNP、IL-6、TNF-α 水平明显上调($P<0.05$ 、 0.01),IL-10、Arg-1 水平无明显变化;与模型组

比较,槲子苷低、高剂量给药后显著降低 NT-proBNP、IL-6、TNF-α 水平,提高 IL-10、Arg-1 水平($P<0.05$ 、 0.01);克伦特罗应用后明显抵消槲子苷对冠心病大鼠上述指标的改善作用($P<0.05$)。结果见表 2。

表 2 栀子苷对冠心病大鼠 NT-proBNP、IL-6、TNF- α 、IL-10 及 Arg-1 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Effect of geniposide on serum levels of NT-proBNP, IL-6, TNF- α , IL-10, and Arg-1 in coronary heart disease rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	NT-proBNP/ (pg·mL ⁻¹)	IL-6/ (pg·mL ⁻¹)	TNF- α / (pg·mL ⁻¹)	IL-10/ (pg·mL ⁻¹)	Arg-1/ (pg·mL ⁻¹)
假手术	—	544.55 $\pm$ 42.96	60.16 $\pm$ 8.92	271.57 $\pm$ 28.50	184.38 $\pm$ 21.83	22.96 $\pm$ 3.10
模型	—	756.31 $\pm$ 70.27**	95.27 $\pm$ 14.72*	420.43 $\pm$ 91.58**	181.48 $\pm$ 29.04	22.59 $\pm$ 1.84
栀子苷	25	656.69 $\pm$ 78.91 [#]	75.02 $\pm$ 16.99 [#]	334.27 $\pm$ 75.60 [#]	247.50 $\pm$ 49.97 [#]	36.81 $\pm$ 11.35 [#]
	100	568.58 $\pm$ 47.57 ^{##}	64.41 $\pm$ 5.26 ^{##}	300.54 $\pm$ 24.83 ^{##}	299.06 $\pm$ 45.20 ^{##}	45.37 $\pm$ 8.72 ^{##}
栀子苷+克伦特罗	100+0.5	672.40 $\pm$ 100.67 Δ	84.82 $\pm$ 19.75 Δ	377.75 $\pm$ 83.90 Δ	219.49 $\pm$ 64.85 Δ	30.95 $\pm$ 6.11 Δ

与假手术组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$; 与栀子苷高剂量组比较: Δ $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs sham-operated group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group; Δ $P<0.05$ vs high-dose group of geniposide.

3.3 栀子苷对冠心病大鼠心肌巨噬细胞表型极化的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠心脏组织中 F4/80⁺CD11b⁺ (用于前期门控筛选) 巨噬细胞总量显著升高 ($P<0.01$), M1 型巨噬细胞 (F4/80⁺CD86⁺) 比例显著增加 ($P<0.01$), M2 型巨噬细胞

(F4/80⁺CD163⁺) 比例显著下降 ($P<0.01$); 与模型组相比, 栀子苷低剂量组 F4/80⁺CD11b⁺ 及 M1 型比例均下降、M2 型上调 ($P<0.05$); 高剂量干预进一步增强该趋势 ($P<0.01$); 联合克伦特罗干预后, F4/80⁺CD11b⁺ 及 M1 型比例再次升高, M2 型比例下降 ($P<0.05$)。结果见图 2、表 3。

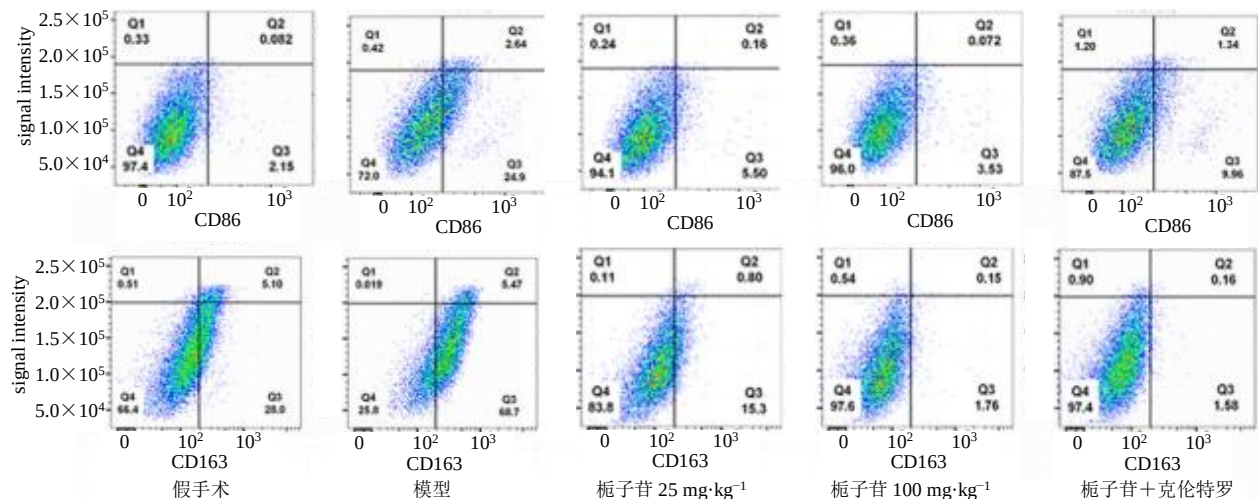


图 2 各组大鼠巨噬细胞 M1、M2 表型细胞流式细胞图

Fig. 2 Flow cytometry of macrophages M1 and M2 phenotype cells in each group of rats

表 3 栀子苷对冠心病模型大鼠心肌巨噬细胞 M1/M2 表型标志分子表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 Effect of geniposide on expression of M1/M2 phenotype markers in myocardial macrophages of coronary heart disease model rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	F4/80 ⁺ CD11b ⁺ /%	F4/80 ⁺ CD86 ⁺ /%	F4/80 ⁺ CD163 ⁺ /%
假手术	—	12.80 $\pm$ 2.15	50.09 $\pm$ 3.38	27.77 $\pm$ 1.81
模型	—	25.99 $\pm$ 6.10**	69.65 $\pm$ 10.45**	18.00 $\pm$ 3.38**
栀子苷	25	19.03 $\pm$ 3.10 [#]	60.24 $\pm$ 5.63 [#]	22.44 $\pm$ 1.64 [#]
	100	16.53 $\pm$ 2.43 ^{##}	50.85 $\pm$ 2.26 ^{##}	24.49 $\pm$ 3.15 ^{##}
栀子苷+克伦特罗	100+0.5	21.79 $\pm$ 4.94 Δ	64.61 $\pm$ 11.45 Δ	18.01 $\pm$ 2.65 Δ

与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$; 与栀子苷高剂量组比较: Δ $P<0.05$ 。

** $P<0.01$ vs sham-operated group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group; Δ $P<0.05$ vs high-dose group of geniposide.

3.4 槲子苷对冠心病大鼠内皮功能的影响

与假手术组比较, 模型组 eNOS 水平显著下降 ($P<0.01$), ET-1 水平显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 槲子苷低、高剂量组 eNOS 水平显著升高

($P<0.05$ 、 0.01), ET-1 水平显著下降 ($P<0.05$ 、 0.01); 克伦特罗应用后明显抵消槲子苷对冠心病大鼠内皮功能的改善作用 ($P<0.05$)。结果见图 3、表 4。

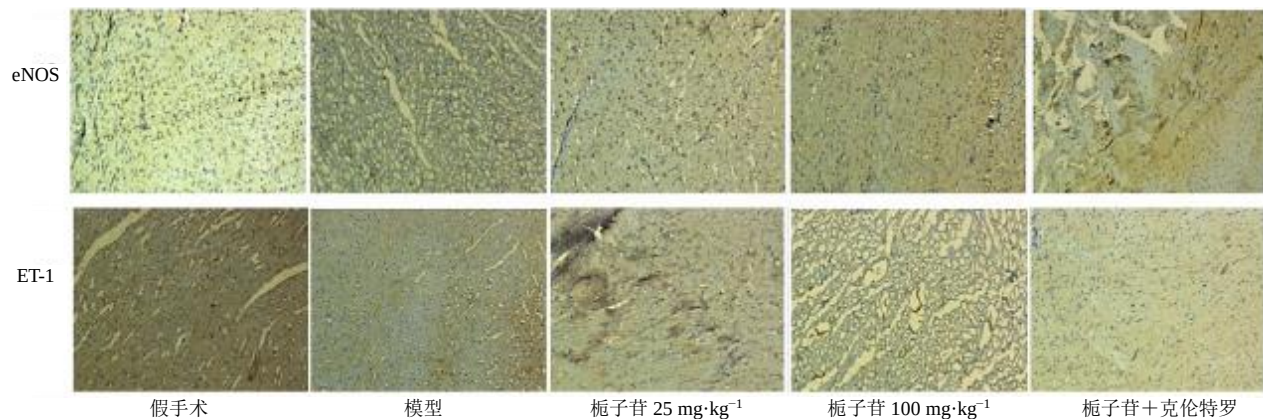


图 3 免疫组化法观察大鼠心肌细胞 eNOS、ET-1 表达 (×200)

Fig. 3 Immunohistochemical staining of eNOS and ET-1 expression in rat cardiomyocytes (×200)

表 4 槲子苷对冠心病大鼠内皮功能的影响 ($\bar{X} \pm s$, $n=6$)

Table 4 Effect of geniposide on endothelial function in coronary heart disease rats ($\bar{X} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	A 值	
		eNOS	ET-1
假手术	—	0.80±0.06	0.28±0.03
模型	—	0.51±0.11**	0.45±0.09**
槲子苷	25	0.65±0.09 [#]	0.36±0.08 [#]
	100	0.79±0.09 ^{##}	0.28±0.06 ^{##}
槲子苷+ 克伦特罗	100+0.5	0.60±0.19 [△]	0.43±0.07 [△]

与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$;
与槲子苷高剂量组比较: [△] $P<0.05$ 。

** $P<0.01$ vs sham-operated group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs 5 high-dose group of geniposide.

3.5 槲子苷对冠心病大鼠心肌组织的影响

假手术组心肌染色后未见蓝色胶原纤维; 而模型组的心肌中, 蓝色胶原纤维有明显的蓄积; 槲子苷低、高剂量组心肌中蓝色胶原纤维的存在随着剂量的增加而逐渐减少; 槲子苷+克伦特罗组心肌组织较槲子苷高剂量组蓝色胶原纤维增多。结果见图 4。

3.6 槲子苷对冠心病大鼠心肌梗死的影响

模型组大鼠心肌梗死率较假手术组显著增加 ($P<0.001$); 槲子苷低、高剂量组心肌梗死率较模型组显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01); 给予克伦特罗则明显抵消槲子苷对冠心病大鼠心肌梗死率的改善作用 ($P<0.05$)。结果见图 5、表 5。

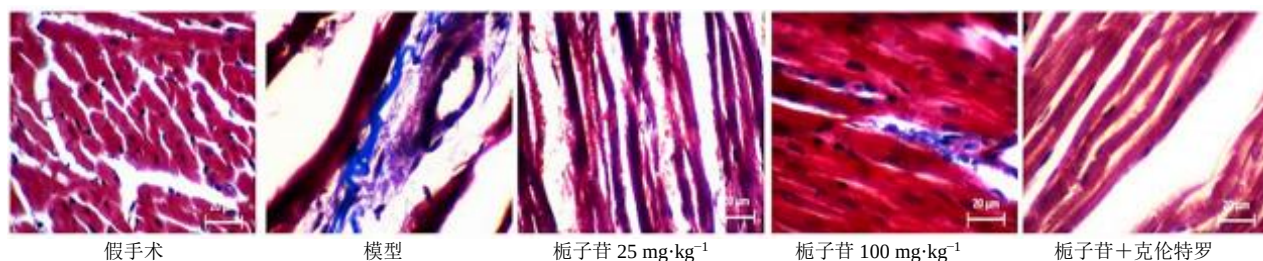


图 4 Masson 染色观察各组大鼠心肌病理状况 (×200)

Fig. 4 Masson staining showing myocardial histopathological changes in each group of rats (×200)

3.7 槲子苷对冠心病大鼠心肌细胞凋亡的影响

模型组心肌细胞凋亡率和 Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平较假手术组显著升高, 而

Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, 槲子苷低、高剂量组心肌细胞凋亡率和 Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著降低

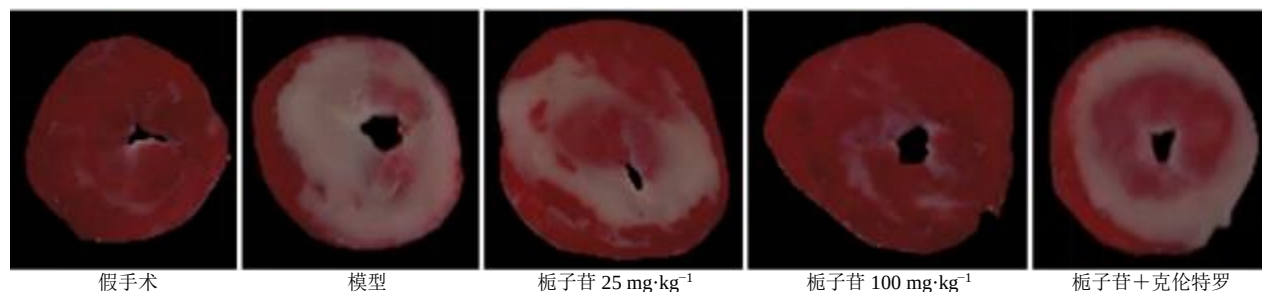


图 5 TTC 染色观察各组大鼠心肌梗死状况

Fig. 5 TTC staining showing myocardial infarction in each group of rats

表 5 栀子苷对冠心病大鼠心肌梗死率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 5 Effect of geniposide on myocardial infarction in coronary heart disease rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	心肌梗死率/%
假手术	—	4.99±0.50
模型	—	24.95±4.38***
栀子苷	25	18.06±3.61 [#]
	100	12.62±4.92 ^{##}
栀子苷+克伦特罗	100+0.5	20.82±4.78 [△]

与假手术组比较: *** $P<0.001$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$; 与栀子苷高剂量组比较: [△] $P<0.05$ 。

*** $P<0.001$ vs sham-operated group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs 5 high-dose group of geniposide.

($P<0.05$ 、0.01), Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$ 、0.01); 克伦特罗则明显抵消栀子苷对冠心病大鼠心肌细胞凋亡的改善作用 ($P<0.05$)。结果见图 6、7 和表 6。

3.8 栀子苷对冠心病大鼠心肌细胞 GATA1/β2AR 信号轴的影响

与假手术组比较, 模型组心肌细胞 GATA1 蛋白表达显著降低, 而 β2AR 蛋白表达明显升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 栀子苷低、高剂量组 GATA1 蛋白表达显著升高, β2AR 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$ 、0.01); 给予克伦特罗可显著抵消栀子苷对冠心病大鼠心肌细胞 GATA1/β2AR 信号轴蛋白水平的逆转作用 ($P<0.05$)。结果见图 8、表 7。

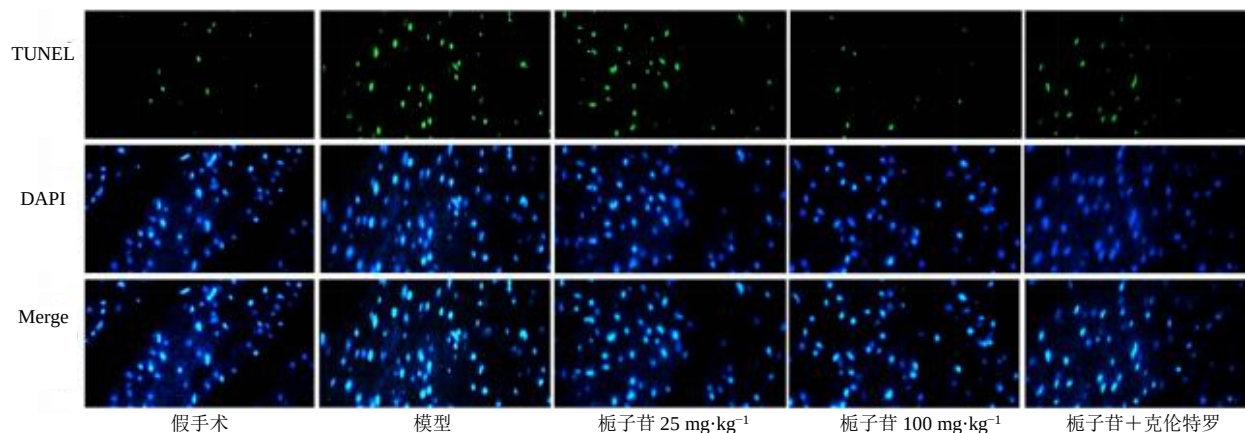


图 6 各组大鼠心肌细胞凋亡情况 (×40)

Fig. 6 Apoptosis of myocardial cells of rats in each group (×40)

4 讨论

冠心病又称为缺血性心脏病, 心肌缺血会对心肌组织、心肌活动代谢及心脏功能等造成严重损伤。LVEF、LVFS、LVEDV、LVESV 与心脏的收缩、舒张功能相关。另外, 内皮功能在冠心病的发生发展中发挥着至关重要的作用, eNOS、ET-1 是检测

内皮功能常用的因子^[10]。eNOS 是心血管系统中的一种重要酶, 广泛分布在心脏、血管内皮细胞等部位, 调节各种生理功能。ET-1 是一种由血管内皮细胞产生的血管收缩肽, 通过血管的收缩来调节血管张力^[11]。研究发现, 在检测冠心病大鼠的血管内皮功能相关指标时, 发现 eNOS 的水平下降, ET-1 的

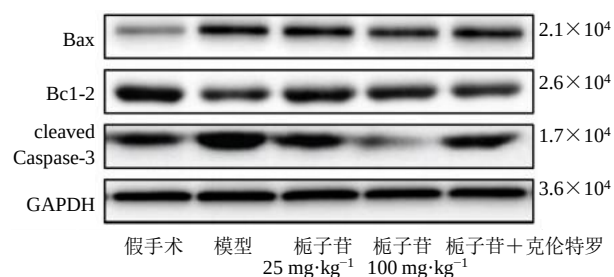


图 7 Western blotting 检测 Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平

Fig. 7 Western blotting analysis of Bax, Bcl-2, and cleaved Caspase-3 protein expression levels

表 6 栀子苷对冠心病大鼠心肌细胞凋亡及相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Effect of geniposide on myocardial cell apoptosis and related proteins in coronary heart disease rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	细胞凋亡率/%	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	cleaved Caspase-3/GAPDH
假手术	—	3.03±0.27	1.00±0.07	1.00±0.10	1.00±0.13
模型	—	37.68±6.73***	1.36±0.21**	0.61±0.15**	1.39±0.29**
栀子苷	25	29.28±4.01 [#]	1.15±0.09 [#]	0.75±0.14 [#]	1.12±0.06 [#]
	100	24.14±4.90 ^{##}	1.03±0.09 ^{###}	0.82±0.17 ^{###}	1.01±0.14 ^{###}
栀子苷+克伦特罗	100+0.5	31.95±7.29 [△]	1.29±0.20 [△]	0.66±0.14 [△]	1.33±0.32 [△]

与假手术组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$; 与栀子苷高剂量组比较: [△] $P<0.05$ 。
** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs sham-operated group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs high-dose group of geniposide.

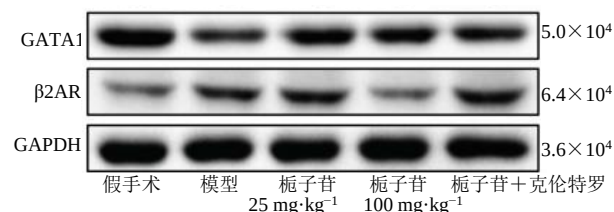


图 8 Western blotting 检测 GATA1、β2AR 蛋白表达水平

Fig. 8 Western blotting analysis of GATA1 and β2AR protein expression levels

炎症反应伴随着冠心病发展的全过程, 心肌组织的慢性炎症反应是其主要的病理表现^[14]。心肌中单核/巨噬细胞、淋巴细胞等免疫细胞浸润参与心肌炎症的改变, 促炎介质的增加与心肌功能障碍和心衰综合征的发生密切相关^[15]。巨噬细胞是炎症反应的主要载体, 在维持心脏稳态、调节炎症反应等方面至关重要^[16]。健康心脏中, 巨噬细胞占总细胞数的 1%~5%, 但心肌损伤后, 其数量显著增加^[17]。心脏受损时, 巨噬细胞响应于炎症、趋化因子的作用募集至心脏, 根据局部微环境的变化而发生相应的表型及功能变化 (M1、M2 型)。例如, 当暴露于 γ 干扰素、脂多糖及其他刺激条件时, 巨噬细胞会

水平上升, 影响两者的水平可以改善大鼠的血管内皮^[12]。本研究结果显示, 冠心病模型大鼠的心肌细胞大量坏死, 纤维组织增生, 炎症细胞浸润及组织水肿明显, LVEF、LVFS 明显下降, eNOS 水平下调, LVEDV、LVESV 明显增大, ET-1 水平上调, 说明大鼠造模成功。栀子苷具有有效的抗纤维化、心脏保护、抗炎等作用^[13]。本研究结果显示, 栀子苷可以明显抑制心肌细胞坏死, 减轻炎症细胞的浸润程度, 改善组织水肿症状, 升高 LVEF、LVFS, 提高 eNOS 水平, 减小 LVEDV、LVESV, 降低 ET-1 水平。

表 7 栀子苷对冠心病大鼠心肌细胞 GATA1、β2AR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 7 Effect of geniposide on GATA1 and β2AR protein expression in myocardial cells of coronary heart disease rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	GATA1/GAPDH	β2AR/GAPDH
假手术	—	1.00±0.09	1.00±0.13
模型	—	0.59±0.13**	1.54±0.32**
栀子苷	25	0.80±0.26 [#]	1.19±0.18 [#]
	100	0.97±0.27 ^{##}	1.05±0.12 ^{##}
栀子苷+克伦特罗	100+0.5	0.73±0.12 [△]	1.24±0.14 [△]

与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$; 与栀子苷高剂量组比较: [△] $P<0.05$ 。
** $P<0.01$ vs sham-operated group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs high-dose group of geniposide.

向 M1 表型转化, 其特征是 CD32、CD86 等标记物的高表达。这种极化导致 IL-6、iNOS、TNF-α 等促炎因子的分泌, 从而放大炎症反应, 加重心脏损伤^[18]。在 IL-4、IL-10 等因素的影响下, 巨噬细胞极化为

M2 型,同时高表达 CD206、CD163 等标志物,通过大量分泌抗炎因子 Arg-1、IL-10、CD163,促进组织修复^[19]。研究表明,M1、M2 比例失衡与冠心病的发生发展密切相关。如在冠心病发生时,M1 型向 M2 型极化是心肌修复的开始,而转化失败可导致促炎 M1 型的持续活化,从而导致冠状动脉病变的发生^[20]。故调控 M1、M2 之间的平衡或促进 M1 向 M2 转化可成为防治冠心病的新靶点^[21]。本研究结果显示,模型组血清中 TNF- α 和 IL-6 水平较假手术组显著升高,同时 IL-10、Arg-1 水平无明显变化,F4/80⁺CD86⁺表达明显升高,F4/80⁺CD163⁺表达降低,提示冠心病大鼠存在严重的炎症反应,免疫功能紊乱,促炎与抑炎失衡,M1 巨噬细胞数量增加。经药物干预后,低、高剂量栀子苷组小鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 的浓度均有所下降,Arg-1、IL-10 含量增加,M1 型巨噬细胞受到抑制,以 M2 型为主。通过上述结果可知,冠心病大鼠巨噬细胞以 M1 型为主;栀子苷可通过抑制巨噬细胞 M1 极化,促进巨噬细胞向 M2 转化,减轻炎症反应,延缓冠心病病程。

细胞凋亡是由多个基因复杂相互作用自主调控的程序性细胞死亡过程,可以维持内环境稳定。其中 Bax 蛋白是促凋亡蛋白,促进细胞凋亡,Bcl-2 抑制细胞凋亡,Caspase-3 是凋亡执行因子^[22]。心肌细胞凋亡参与冠心病的发生、发展,并在其中发挥不可或缺的作用,抑制心肌细胞凋亡可以有效改善冠心病病症。本研究结果显示,栀子苷可以降低心肌细胞凋亡率,降低 Bax、Caspase-3 蛋白表达,促进 Bcl-2 蛋白表达。

GATA1/ β 2AR 信号轴是巨噬细胞发育、激活和分化的关键调节因子,在心血管疾病中起着重要的作用。其中 GATA1 是被最早发现的 GATA 家族成员,由核心碱基序列为 GATA 的基因启动子中的一段保守序列所转录,其表达异常会影响巨噬细胞细胞分化、成熟过程,从而影响血小板生成^[23]。 β 2AR 作为 G 蛋白耦联受体(GPCR)家族成员之一,参与细胞的收缩、黏附、凋亡等多种功能^[24]。据报道, β -抑制蛋白 2(β -arrestin2)参与巨噬细胞极化,抑制 GATA3/ β 2AR 信号轴,通过调节 IL-4 分泌影响 M1/M2 表型的失衡^[25]。克伦特罗是一种 β 2AR 激动剂,在血管损伤反应和动脉粥样硬化中,可以调节急性血栓形成和血小板功能,加重纤维化^[26]。本研究结果显示,GATA1 和 β 2AR 蛋白表达在冠心病大

鼠中分别降低和升高,栀子苷则可以逆转上述蛋白表达趋势,从而抑制巨噬细胞向 M1 型极化、促进向 M2 转化。克伦特罗可以逆转栀子苷对冠心病大鼠心肌损伤的保护作用,说明栀子苷可以通过调节 GATA1/ β 2AR 信号轴抑制巨噬细胞向 M1 型极化、促进向 M2 转化,改善冠心病大鼠心肌损伤。

本研究结果表明,栀子苷通过调节 GATA1/ β 2AR 信号轴抑制巨噬细胞向 M1 型极化、促进向 M2 转化,改善冠心病大鼠心肌损伤。本研究还有不足之处,栀子苷调控 GATA1/ β 2AR 信号轴的作用机制还有待进一步验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Cleven L, Krell-Roesch J, Nigg C R, et al. The association between physical activity with incident obesity, coronary heart disease, diabetes and hypertension in adults: A systematic review of longitudinal studies published after 2012 [J]. BMC Public Health, 2020, 20(1): 726.
- [2] Liu S J, Chen J, Shi J, et al. M1-like macrophage-derived exosomes suppress angiogenesis and exacerbate cardiac dysfunction in a myocardial infarction microenvironment [J]. Basic Res Cardiol, 2020, 115(2): 22.
- [3] Hu H, Wu J W, Cao C, et al. Exosomes derived from regulatory T cells ameliorate acute myocardial infarction by promoting macrophage M2 polarization [J]. IUBMB Life, 2020, 72(11): 2409-2419.
- [4] Li W Q, Shenkar R, Detter M R, et al. Propranolol inhibits cavernous vascular malformations by β 1 adrenergic receptor antagonism in animal models [J]. J Clin Invest, 2021, 131(3): e144893.
- [5] Ruiz-Manzano R A, De Lourdes Ochoa-Mercado T, Segovia-Mendoza M, et al. Neuroimmunoendocrine interactions in tumorigenesis and breast cancer [M]. Tumor Progression and Metastasis, IntechOpen, 2019.
- [6] Dorn G W, Molkentin J D. Manipulating cardiac contractility in heart failure: Data from mice and men [J]. Circulation, 2004, 109(2): 150-158.
- [7] Tu S, Xiao F, Min X Y, et al. Catechin attenuates coronary heart disease in a rat model by inhibiting inflammation [J]. Cardiovasc Toxicol, 2018, 18(5): 393-399.
- [8] Tian J Z, Yi Y, Zhao Y, et al. Oral chronic toxicity study of geniposide in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 213: 166-175.
- [9] Zhang Q F, Xiang J Z, Wang X B, et al. Beta(2)-adrenoceptor agonist clenbuterol reduces infarct size and myocardial apoptosis after myocardial

- ischaemia/reperfusion in anaesthetized rats [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 160(6): 1561-1572.
- [10] Madden Brewster L, Garcia V P, Levy M V, et al. Endothelin-1-induced endothelial microvesicles impair endothelial cell function [J]. *J Appl Physiol*, 2020, 128(6): 1497-1505.
- [11] Nakamura-Utsunomiya A, Tsumura M, Okada S, et al. Downregulation of endothelial nitric oxide synthase (ENOS) and endothelin-1 (ET-1) in a co-culture system with human stimulated X-linked CGD neutrophils [J]. *PLoS One*, 2020, 15(4): e0230665.
- [12] Li J M, Lu W, Ye J, et al. Association between expression of AMPK pathway and adiponectin, leptin, and vascular endothelial function in rats with coronary heart disease [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(2): 905-914.
- [13] Li X, Li L, Lei W, et al. Traditional Chinese medicine as a therapeutic option for cardiac fibrosis: Pharmacology and mechanisms [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 142: 111979.
- [14] Henein M Y, Vancheri S, Longo G, et al. The role of inflammation in cardiovascular disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 12906.
- [15] Herrero-Cervera A, Soehnlein O, Kenne E. Neutrophils in chronic inflammatory diseases [J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(2): 177-191.
- [16] Lafuse W P, Wozniak D J, Rajaram M V S. Role of cardiac macrophages on cardiac inflammation, fibrosis and tissue repair [J]. *Cells*, 2020, 10(1): 51.
- [17] Duncan S E, Gao S, Sarhene M, et al. Macrophage activities in myocardial infarction and heart failure [J]. *Cardiol Res Pract*, 2020, 2020: 4375127.
- [18] Kim Y, Nurakhayev S, Nurkesh A, et al. Macrophage polarization in cardiac tissue repair following myocardial infarction [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2715.
- [19] Yan W H, Li T H, Yin T Y, et al. M2 macrophage-derived exosomes promote the c-KIT phenotype of vascular smooth muscle cells during vascular tissue repair after intravascular stent implantation [J]. *Theranostics*, 2020, 10(23): 10712-10728.
- [20] Nasser M I, Zhu S J, Huang H L, et al. Macrophages: First guards in the prevention of cardiovascular diseases [J]. *Life Sci*, 2020, 250: 117559.
- [21] Mohd Idrus F N, Ahmad N S, Hoe C H, et al. Differential polarization and the expression of efferocytosis receptor MerTK on M1 and M2 macrophages isolated from coronary artery disease patients [J]. *BMC Immunol*, 2021, 22(1): 21.
- [22] Qian S N, Wei Z, Yang W T, et al. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 985363.
- [23] Lu X, Ma W, Gao J, et al. Exosomal miR-301a-3p of airway epithelial cells regulates macrophage polarization and promotes lung injury via the GATA1 pathway in acute respiratory distress syndrome [J]. 2023.
- [24] Xu R, Feng S, Ao Z, et al. Long-acting $\beta 2$ adrenergic receptor agonist ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesion by regulating keratinocyte proliferation and apoptosis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 865715.
- [25] Cheng H J, Guo P P, Su T T, et al. G protein-coupled receptor kinase type 2 and β -arrestin2: Key players in immune cell functions and inflammation [J]. *Cell Signal*, 2022, 95: 110337.
- [26] Freire B M, De Melo F M, Basso A S J I A. Adrenergic signaling regulation of macrophage function: do we understand it yet ? [J]. 2022, 2(1): Itac010.

[责任编辑 兰新新]