

网络出版时间: 2024-12-26 15:42:38 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20241226.1134.008>

积雪草苷对异丙肾上腺素诱导小鼠心肌损伤的保护作用

马子雨^{1,2}, 左芯萌^{1,2}, 王振宇^{1,2}, 王明明^{1,2}, 李翠^{1,2}[¹ 徐州医科大学基础医学院生理学教研室, 徐州 221000;² 基础医学国家级实验教学示范中心(徐州医科大学), 徐州 221000]

摘要 目的 探究积雪草苷(AS)对异丙肾上腺素(ISO)诱导小鼠心肌损伤的保护作用。方法 将60只雄性C57BL/6小鼠随机分为空白对照(CON)组、模型[ISO 10 mg/(kg·d)]组、AS低剂量[ISO + AS-L, ISO 10 mg/(kg·d) + AS 5 mg/(kg·d)]组、中剂量[ISO + AS-M, ISO 10 mg/(kg·d) + AS 10 mg/(kg·d)]组、高剂量[ISO + AS-H, ISO 10 mg/(kg·d) + AS 20 mg/(kg·d)]组。统计心重比;观察心电图变化;酶联免疫吸附测定试验(ELISA)检测血清中白细胞介素(IL)-1 β 和心肌肌钙蛋白T(cTn-T)含量;Masson染色观察小鼠心肌组织纤维化情况;Western blot检测心肌组织中B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)蛋白表达量比值(Bax/Bcl-2)和半胱天冬酶-3(Caspase-3)、NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)蛋白表达量;实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)检测心房钠尿肽(ANP)、B型利钠肽(BNP)、 β -肌球蛋白重链(β -MHC)、血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-6、I型胶原(COL I)、III型胶原(COL III)mRNA表达水平。结果 相较于CON组,ISO组心重比升高($P < 0.01$),心率降低($P < 0.05$),QT间期有所延长($P < 0.05$),心肌损伤标志物cTn-T、ANP、BNP和 β -MHC表达升高($P < 0.01$);血清中IL-1 β 表达增加($P < 0.01$),心肌组织中TNF- α 和IL-6表达增加($P < 0.001$),NLRP3蛋白表达量升高($P < 0.05$);心肌出现大量胶原纤维蓝染($P < 0.001$),且COL I、COL III mRNA表达水平增加($P < 0.001$),Bax/Bcl-2比值($P < 0.001$)和Caspase-3表达量升高($P < 0.05$)。与ISO组比较,ISO + AS-L和ISO + AS-M组小鼠心重比降低($P < 0.05$),心率升高,QT间期有缩短趋势,cTn-T、ANP、BNP和 β -MHC均降低($P < 0.001$),心肌胶原纤维蓝染减少($P < 0.01$),COL I、COL III mRNA表达水平降低($P < 0.05$);IL-1 β 、TNF- α 表达水平降低($P < 0.01$);NLRP3、Caspase-3蛋白表达量以及Bax/Bcl-2比值均降低($P < 0.05$);ISO + AS-M组IL-6表达水平降低($P < 0.01$);ISO + AS-H组ANP、BNP、TNF- α mRNA表达量表达水平降低($P < 0.001$);心肌纤维化程度有所改善($P < 0.05$);COL I、COL III mRNA表达水平降低($P < 0.05$)。结论 AS通过改善心脏纤维化、抑制心肌细胞凋亡和减轻心肌组织炎症反应对ISO诱导的小鼠心肌损伤具有一定保护作用。

关键词 积雪草苷;异丙肾上腺素;心肌损伤;凋亡;炎症;纤维化;保护作用

中图分类号 R 587.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)01-0059-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.01.008

心血管疾病是世界范围内死亡主要原因之一,其发病率在全球范围内呈上升趋势^[1]。心血管系统受多种神经体液因素的调节,其中交感神经系统过度激活是心血管疾病的重要病理机制;交感神经系统长时间高活化导致的心肌细胞凋亡和炎症反应在心肌损伤发生发展中扮演重要角色^[2]。因此,寻求抑制交感神经刺激导致心肌损伤的药物至关重要。

积雪草苷(asiatikoside, AS)是从中草药积雪草中提取的皂苷,具有抗溃疡、促进伤口愈合、抗炎等

多方面的药理作用^[3]。研究^[4]表明,AS通过激活AMPK/Nrf2通路对糖尿病性心肌病发挥保护作用。但AS是否可以改善交感神经过度激活导致的心肌损伤尚未见报道,有待进一步研究。该研究使用盐酸异丙肾上腺素(isoproterenol hydrochloride, ISO)制备小鼠心肌损伤模型,探究AS对于ISO诱导心肌损伤的保护作用,为心肌损伤的干预治疗提供新的途径和药物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 60只正常雄性C57BL/6 δ 周小鼠,体质量(23 \pm 2)g,清洁级,由徐州医科大学实验动物中心提供,室温(23 \pm 2) $^{\circ}$ C,昼夜明暗各12h日光交替,自由饮用蒸馏水,在独立通风的笼子内饲养动物,为小鼠提供消毒标准饲料和高压水。本实

2024-11-14 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81500177);江苏省自然科学基金(编号:BK20150211);江苏省研究生科研创新计划(编号:KYCX23_2942)

作者简介:马子雨,女,硕士研究生;

李翠,女,副教授,硕士生导师,通信作者, E-mail: cui.li@xzhmu.edu.cn

验经徐州医科大学实验动物使用与管理委员会批准(伦理编号: 202209S077)。实验动物使用许可证号: SYXK(苏) 2021-0038。

1.1.2 药品与仪器 AS(规格: 250 mg; 批号: C15963909) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 盐酸异丙肾上腺素(isoproterenol hydrochloride, ISO)(规格: 25 g; 批号: I5627) 购自Sigma-aldrich 中国公司; ACTIN 抗体(货号: M20011S) 购自上海拜力生物科技有限公司; B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 抗体(货号: WH355496)、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 抗体(货号: A5652) 均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体(货号: 50599)、半胱天冬酶(cysteiny aspartate specific proteinase, Caspase)-3 抗体(货号: 1967-AP)、HRP 标记山羊抗兔(货号: SA00001-2)、HRP 标记山羊抗鼠(货号: SA00001-1) 均购自武汉三鹰生物科技有限公司; 心房钠利尿肽(atrial natriuretic peptide, ANP)、B 型利钠肽(type B natriuretic peptide, BNP)、 β -肌球蛋白重链(β -myosin heavy chain, β -MHC)、血清肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)-6、I 型胶原(Type I collagen, COL I)、III 型胶原(Type III collagen, COL III) 引物序列由上海生工生物工程有限公司合成。聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶制备试剂盒(20325ES62) 购自上海翌圣生物科技有限公司; 超敏 ECL 化学发光试剂盒(货号: P10100) 购自苏州新赛美生物科技有限公司; TRIzol(货号: VR603) 购自徐州微科曼得生物科技有限公司; 心肌肌钙蛋白 T(cardiac troponin T, cTn-T) 试剂盒(货号: JL20611)、IL-1 β (货号: JL18442) 试剂盒均购自上海江莱生物科技有限公司; 冷冻离心机(型号: Tanon-5200) 购自上海天能科技有限公司; 电泳及转膜电源仪(型号: 0001852) 购自美国 Bio-Rad 公司; 凝胶成像系统(型号: 201605026) 购自南京赛飞仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 模型构建与分组 将 60 只小鼠随机分为 5 组, 每组 12 只, 分别为空白对照(CON) 组、模型(ISO) 组、AS 低剂量(ISO + AS-L) 组、中剂量(ISO + AS-M) 组、高剂量(ISO + AS-H) 组, 各组以普通饲料喂养。模型组 ISO 剂量为 10 mg/(kg · d), 溶于

0.9% 氯化钠溶液中, 皮下注射持续 28 d, 建立心肌梗死模型; ISO + AS-L、ISO + AS-M 和 ISO + AS-H 组皮下注射 ISO, 同时腹腔注射 AS, AS 溶于 0.9% 氯化钠溶液中; ISO + AS-L 组剂量为 ISO 10 mg/(kg · d) + AS 5 mg/(kg · d); ISO + AS-M 组剂量为 ISO 10 mg/(kg · d) + AS 10 mg/(kg · d); ISO + AS-H 组剂量为 ISO 10 mg/(kg · d) + AS 20 mg/(kg · d), 持续注射 28 d。

1.2.2 实验方法

1.2.2.1 心脏质量与体质量比率 取材前称重并记录小鼠体质量。使用 1.5% 戊巴比妥钠麻醉后迅速摘取完整的心脏, 提前预冷生理盐水, 于预冷的生理盐水中漂洗血污, 排出心腔内的残血。心脏置于冰盘上剔除多余的组织, 用干净的滤纸吸干表面水分, 电子天平称取心脏质量并记录。计算心重比, 即心脏质量/体质量。

1.2.2.2 检测心电图指标 实验前 30 min 打开电脑及 PowerLab 数据采集分析系统, 将小鼠称重, 用 1.5% 戊巴比妥钠(6 ml/kg) 经腹腔注射麻醉, 仰位固定, 左后肢皮下接正极, 右前肢皮下接负极, 右后肢皮下接参考电极, 接头扎入大鼠四肢时应注意扎入皮下, 不能进入肌肉层, 待波形稳定后记录心电图变化。

1.2.2.3 Masson 染色 小鼠取材后心脏置于正中位置横向切开, 冷 PBS 缓冲液冲洗, 经 4% 多聚甲醛固定 72 h、石蜡包埋、5 μ m 切片, 进行 Masson 染色, 镜下观察心脏纤维化程度。利用 Image J 软件计算各组胶原纤维表达并分析各组心肌组织胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF), CVF = 胶原面积/总面积。

1.2.2.4 酶联免疫吸附测定法(enzyme-linker immuno sorbent assay, ELISA) 各组小鼠经 1.5% 戊巴比妥钠麻醉后, 用镊子快速摘下小鼠眼球取血 1 ml 至 EP 管中, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上层血清, 检测各组小鼠血清 IL-1 β 和 cTn-T 水平。指标检测严格按试剂盒说明书操作。

1.2.2.5 蛋白质印迹法(Western blot) 检测心肌组织凋亡和炎症相关蛋白 Bax/Bcl-2 表达量和 Caspase-3、NLRP3 表达量: 从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱取出小鼠心脏, 每组样本称取约 30 mg 心肌组织, 用眼科剪剪碎心肌组织加入 RIPA 强裂解液, -4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 研磨 3 次, 取上清液; BCA 法蛋白定量, 最后于恒温干浴锅煮沸变性。根据分子量大小制备不同浓度的 SDS-PAGE 电泳凝胶, 电泳条件为 80 V、30

min, 后改为 110 V、90 min, 当上样缓冲液距凝胶底部约 1 cm 时终止, 通过湿转法将目标蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上, 转膜 1 h 结束后将膜放入 5% 脱脂牛奶中常温封闭 1 h, 裁剪目的条带, 放入对应 Bax (1:1 500)、Bcl-2 (1:1 500)、Caspase-3 (1:1 500) 和 NLRP3 (1:1 500) 和 ACTIN (1:5 000) 抗体中 4 °C 摇床孵育过夜; TBST 洗脱 3 次 5 min/次, 将目的条带放入山羊抗兔或抗鼠二抗 (1:5 000) 中室温摇床孵育 2 h, TBST 洗脱 3 次 5 min/次, ECL 化学发光液避光检测, 采用 Image J 软件分析蛋白表达量。

1.2.2.6 实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)

ANP、*BNP*、 *β -MHC*、*TNF- α* 、*IL-6* 与 *GAPDH* 的引物设计与合成由上海生工生物工程有限公司完成, 按总核糖核酸(RNA)提取试剂(TRIzol)说明书操作, 提取心肌组织中总 RNA, 使用分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度, 将提取的 mRNA 用反转录试剂盒, 逆转录成与 RNA 互补的单链脱氧核糖核酸(cDNA)。qPCR 反应体系 20 μ l: 2 \times Universal Blue SYBR qPCR Master Mix 10 μ l, 正向引物 0.4 μ l, 反向引物 0.4 μ l, 反转录 cDNA 2 μ l, ddH₂O 7.2 μ l; 反应条件: 95 °C、30 s, 1 个循环; 94 °C、15 s, 60 °C、30 s, 40 个循环。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 表达量。

1.3 统计学处理 数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 在 Graph Pad Prism 9.0 统计软件分析, 组间差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行比较, 两组间比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AS 对 ISO 诱导心肌损伤小鼠生存状态、心重比以及心脏电活动的影响 实验过程中, CON 组没有异常表现; ISO 组在造模期间活动减少, 行动变迟缓; 各组小鼠心重比和心电图变化如图 1 所示, 与 CON 组相比, ISO 组心重比增加($P < 0.01$), 小鼠心率降低($P < 0.05$), QT 间期延长($P < 0.05$)。在 AS 干预后, ISO + AS-L 和 ISO + AS-M 组小鼠心重比降低($P < 0.05$), ISO + AS-L、ISO + AS-M 和 ISO + AS-H 组心率有所升高, QT 间期缩短, 但差异均无统计学意义。以上结果提示 AS 对小鼠心脏具有一定的保护作用。

2.2 AS 降低 ISO 诱导的心肌损伤标志物表达水平 ELISA 检测小鼠心肌损伤标志物 cTn-T 水平, 结果如图 2A 所示, 与 CON 组相比, ISO 组小鼠血清 cTn-T 水平升高($P < 0.01$); 且 qPCR 结果显示, 与 CON 组相比, 心肌损伤标志物 *ANP*、*BNP*、 *β -MHC* 的 mRNA 表达水平均升高($P < 0.001$) (图 2B), 结果提示心肌损伤模型诱导成功。与 ISO 组相比, ISO + AS-L 和 ISO + AS-M 组 cTn-T 水平和 *ANP*、*BNP*、 *β -MHC* 的 mRNA 水平均降低($P < 0.001$); ISO + AS-H 组 *ANP*、*BNP* mRNA 水平均下降($P < 0.001$)。以上结果表明 AS 对 ISO 诱导的心肌损伤具有一定改善作用。

2.3 AS 改善 ISO 诱导的心肌纤维化 Masson 染色结果如图 3A 所示, CON 组小鼠心肌结构完整, 心肌纤维排列整齐, 仅有极少量的胶原纤维沉积; 而 ISO 组小鼠可见出现大量胶原纤维蓝染, 浸润于心

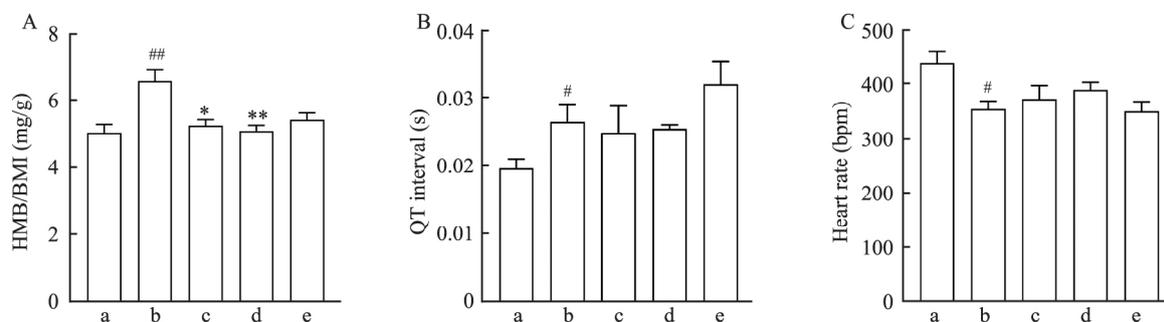


图 1 各组小鼠心重比、心率和 QT 间期变化

Fig. 1 Changes in heart mass ratio, heart rate, and QT interval in each group of mice

A: Heart to body mass ratio of mice in each group ($n = 10$); B: Changes in QT interval on electrocardiogram; C: Electrocardiogram detection of heart rate changes in mice; a: CON group; b: ISO group; c: ISO + AS-L group; d: ISO + AS-M group; e: ISO + AS-H group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ vs CON group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs ISO group.

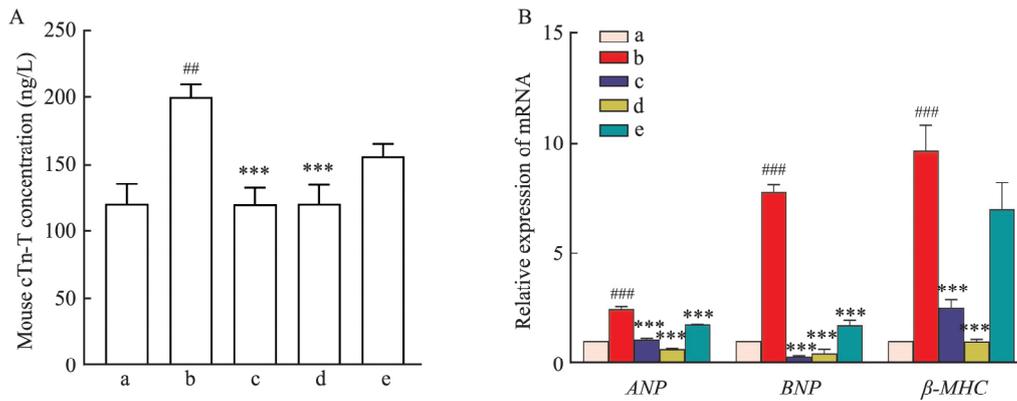


图2 各组小鼠心肌损伤标志物 cTn-T、ANP、BNP、β-MHC 水平变化

Fig. 2 Changes in levels of cardiac injury markers cTn-T, ANP, BNP, and β-MHC in mice of each group

A: Detection of myocardial injury marker cTn-T using ELISA; B: Detection of ANP, BNP and β-MHC levels using qPCR (n = 10); a: CON group; b: ISO group; c: ISO + AS-L group; d: ISO + AS-M group; e: ISO + AS-H group; ## P < 0.01, ### P < 0.001 vs CON group; *** P < 0.001 vs ISO group.

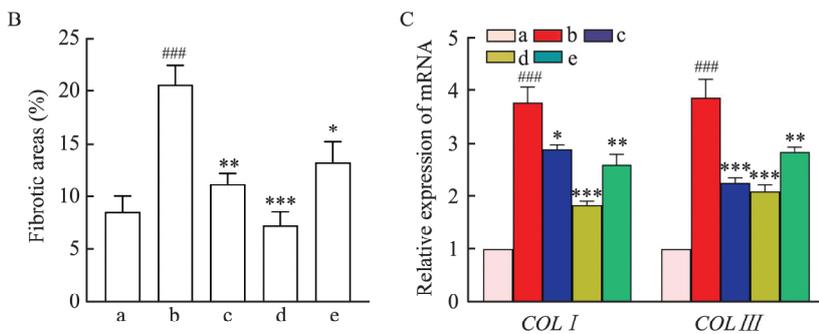
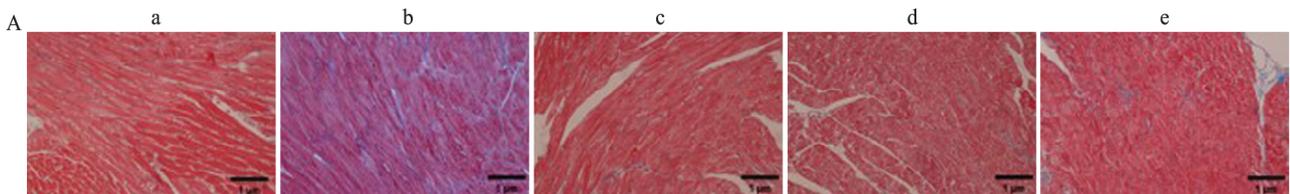


图3 检测各组小鼠心肌纤维化程度及 COL I、COL III mRNA 表达水平

Fig. 3 Detection of the degree of myocardial fibrosis and the mRNA expression levels of COL I and COL III

A: Masson staining showed the degree of myocardial fibrosis. Red represented myocardial tissue, blue represented collagen fibers; B: Collagen fiber area statistics; C: Detection of COL I and COL III expression levels using qPCR (n = 3); a: CON group; b: ISO group; c: ISO + AS-L group; d: ISO + AS-M group; e: ISO + AS-H group; ### P < 0.001 vs CON group; * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs ISO group.

肌细胞间隙及血管周围,提示发生了心肌纤维化。与 ISO 组相比,ISO + AS-L、ISO + AS-M 和 ISO + AS-H 组,心肌胶原纤维蓝染均明显减少(图 3B),并下调 COL I、COL III mRNA 表达水平(P < 0.05)(图 3C)。综上,AS 可缓解心肌纤维化,改善 ISO 诱导小鼠心肌损伤,减轻心肌纤维化程度。

2.4 AS 抑制 ISO 诱导的心肌组织炎症反应

Western blot 检测 NLRP3 蛋白表达水平(图 4A、B)。ELISA 检测血清中 IL-1β 水平(图 4C),qPCR 检测 TNF-α、IL-6 mRNA 的表达量(图 4D)。与 CON 相比,ISO 组小鼠心肌组织 NLRP3 蛋白表达量及血清中 IL-1β 和心肌组织中 TNF-α、IL-6 mRNA 表达水平均升高(P < 0.01)。与 ISO 相比,ISO + AS-L 组

NLRP3 蛋白表达量、IL-1β 及 TNF-α mRNA 表达水平降低(P < 0.01); ISO + AS-M 组 NLRP3 蛋白表达量、IL-1β 及 TNF-α、IL-6 mRNA 表达水平均下降(P < 0.01); ISO + AS-H 组 TNF-α mRNA 表达水平下调(P < 0.01)。以上结果显示,AS 在 ISO 诱导的心肌损伤中具有较好的抗炎作用。

2.5 AS 抑制 ISO 诱导的心肌组织凋亡

检测 Caspase-3 蛋白表达水平和 Bax/Bcl-2 蛋白比值表达水平,如图 5 所示,相较于 CON 组,ISO 组 Caspase-3 蛋白表达水平,Bax/Bcl-2 的比值均升高(P < 0.05)。ISO + AS-L 和 ISO + AS-M 组小鼠心肌组织 Caspase-3 蛋白表达水平和 Bax/Bcl-2 的比值均降低(P < 0.05)(图 5B)。以上结果表明:AS 具有抗凋

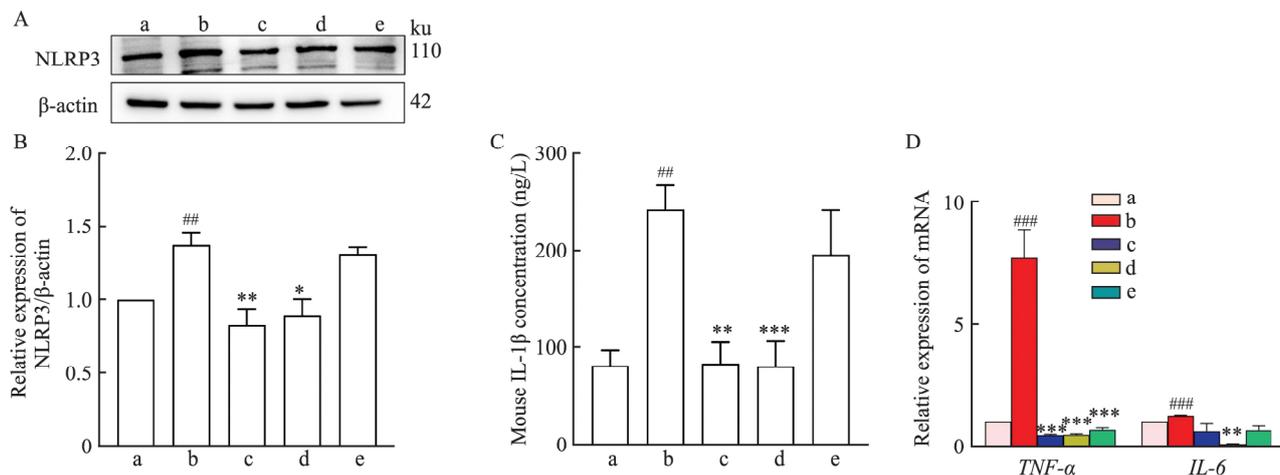


图4 检测各组小鼠心肌组织炎症小体 NLRP3 和炎症因子 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 表达水平

Fig. 4 Detect the expression levels of inflammatory body NLRP3 and inflammatory factors IL-1β, TNF-α and IL-6 in myocardial tissue

A: Protein band; B: Detection of the expression of NLRP3 protein using Western blot; C: Detection of serum IL-1β levels using ELISA; D: Detection of the expression levels of TNF-α and IL-6 mRNA using qPCR (n = 3); a: CON group; b: ISO group; c: ISO + AS-L group; d: ISO + AS-M group; e: ISO + AS-H group; ##P < 0.01, ###P < 0.001 vs CON group; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs ISO group.

亡以改善 ISO 诱导的心肌损伤作用。

3 讨论

心血管疾病是全球主要致死原因之一,给社会带来巨大的经济负担^[5]。心肌损伤是心血管疾病最严重的病理后果,也是其高病死率的重要原因^[2]。儿茶酚胺类药物 ISO 作为一种合成的非选择性 β 肾上腺素受体激动剂,诱导的小鼠心肌损伤是评价药物的经典模型之一^[6]。ISO 可使交感神经过度兴奋,增加心脏负荷和外周阻力,导致心脏供血不足,使心肌发生不可逆性损伤^[7]。本研究揭示 AS 通过抗凋亡和抗炎作用改善 ISO 诱导的心肌损伤。初步观察记录发现,模型组小鼠行动缓慢,心重比降低,QT 段延长,且心率降低。而 AS 干预治疗后,心重比降低,QT 段缩短,心率升高,提示 AS 对 ISO 诱导的心肌损伤具有一定保护作用。

cTn-T 是心肌细胞内特异性蛋白,在心肌损伤状态下,迅速进入血液循环,高特异性地反映心肌损伤程度^[8];此外 ANP、BNP、β-MHC 也可反应心肌损伤情况^[5]。本研究结果显示,AS 低、中剂量组显著降低 cTn-T 水平和 ANP、BNP、β-MHC mRNA 表达水平,表明其可改善 ISO 诱导的心肌损伤,而高剂量组四项表达水平有降低趋势。

心肌纤维化是心肌损伤后心脏重塑过程中的一个重要促成因素,会减弱心肌顺应性并导致心肌功能障碍^[9]。Masson 染色用于评价心肌组织纤维化,结果显示,在 AS 干预后,小鼠心肌组织胶原纤维蓝染减少,心肌组织排列杂乱情况有所改善,且

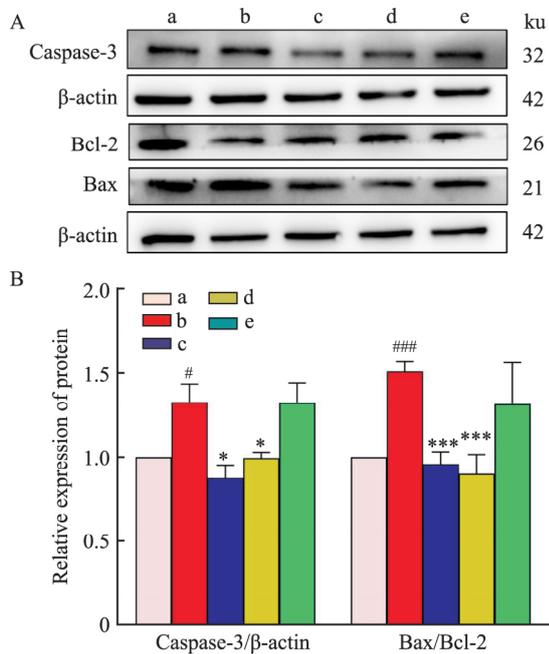


图5 各组小鼠心肌组织凋亡蛋白 Caspase-3 蛋白表达水平和 Bax/Bcl-2 蛋白比值表达水平

Fig. 5 The ratio of Caspase-3 protein expression levels and Bax/Bcl-2 protein expression levels in myocardial tissue of mice in each group

A: Protein band; B: The expression levels of myocardial apoptosis proteins Caspase-3 and Bax/Bcl-2 (n = 3); a: CON group; b: ISO group; c: ISO + AS-L group; d: ISO + AS-M group; e: ISO + AS-H group; #P < 0.05, ###P < 0.001 vs CON group; *P < 0.05, ***P < 0.001 vs ISO group.

COL I、*COL III* mRNA 表达水平降低,表明 AS 可改善 ISO 诱导的小鼠心肌纤维化。

在心肌损伤中常伴随炎症的发生,持续性的炎症细胞浸润则引起心肌细胞纤维化和心肌损伤^[10]。心脏在受到损伤过程中,炎症因子起着重要作用。NLRP3 炎症小体是目前最受关注以及研究最多的炎症小体^[11]。已有研究^[12]表明 AS 通过靶向 NLRP3 炎症小体激活发挥神经保护作用。

AS 通过减轻炎症和增强突触功能减轻阿尔茨海默病的病理^[13]。本实验表明 AS 低、中剂量组可降低 NLRP3 蛋白表达量及血清中 IL-1 β 水平和组织中 *TNF- α* 和 *IL-6* mRNA 表达水平,通过调节炎症反应对小鼠 ISO 诱导的心肌损伤起到保护作用。高剂量组 NLRP3 蛋白表达量、IL-1 β 水平和 *IL-6* mRNA 的表达量均有降低趋势。

心肌损伤往往伴随着凋亡的发生^[14],常见凋亡蛋白有: Bax,是一种促凋亡蛋白; Bcl-2,是一种抗凋亡蛋白; Caspase-3,是凋亡的-executioner。当 Bax 过表达时, Bax/Bcl-2 的同源二聚体数量激增,体内释放 Cyt-c 激活 Caspase-3 后触发 Caspase 的级联反应,而 Bcl-2 过表达时可阻断 Cyt-c 的释放,抑制凋亡的发生^[15]。因此抑制心肌细胞凋亡可减轻心肌损伤。既往研究^[3,16]表明 AS 可激活 PI3K-AKT-GSK3 β 通路减轻细胞凋亡和氧化应激,防止心肌缺血/再灌注损伤。本研究结果显示,AS 可以降低心肌组织 Bax/Bcl-2 比值和 Caspase-3 蛋白表达量,且低、中剂量组 Bax/Bcl-2 比值和 Caspase-3 蛋白表达量降低效果显著,高剂量组虽有降低趋势,但在改善心肌损伤过程中作用效果不显著。该结果表明 AS 在 ISO 诱导心肌损伤中具有抗凋亡作用。

本实验初步探讨 AS 可抗纤维化、抗炎和抗凋亡,改善 ISO 诱导的心肌损伤,且低剂量和中剂量组对 ISO 诱导心肌损伤具有明显改善作用,高剂量组效果不佳,其机制可能涉及到多种,包括代谢与排泄的变化、受体相互作用、毒性效应以及药代动力学和药效学之间的复杂关系等。后续可进一步探究 AS 对心肌保护的具体机制。

参考文献

- [1] Guo Z, Wu Q, Wang X, et al. Effects of message framing and risk perception on health communication for optimum cardiovascular disease primary prevention: a protocol for a multicenter randomized controlled study [J]. *Front Public Health*, 2024, 12: 1308745. doi: 10.3389/fpubh.2024.1308745.
- [2] Li A L, Lian L, Chen X N, et al. The role of mitochondria in my-

- ocardial damage caused by energy metabolism disorders: from mechanisms to therapeutics [J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 208: 236–51. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.08.009.
- [3] Zeng X, Yu J, Liu P, et al. Asiaticoside alleviates cardiomyocyte apoptosis and oxidative stress in myocardial ischemia/reperfusion injury via activating the PI3K-AKT-GSK3 β pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(2): 69. doi: 10.21037/atm-21-6667.
- [4] Xu C, Xia L, Xu D, et al. Cardioprotective effects of asiaticoside against diabetic cardiomyopathy: activation of the AMPK/Nrf2 pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(2): e18055. doi: 10.1111/jcmm.18055.
- [5] Duan Z, Huang Z, Lei W, et al. Bone morphogenetic protein 9 protects against myocardial infarction by improving lymphatic drainage function and triggering DECR1-mediated mitochondrial bioenergetics [J]. *Circulation*. 2024. doi: 10.1161/circulationaha.123.065935.
- [6] Chen C, Hou J, Tanner J J, et al. Bioinformatics methods for mass spectrometry-based proteomics data analysis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8): E2873. doi: 10.3390/ijms21082873.
- [7] 李明聪, 廖菲, 吴儒杰, 等. 慢性心力衰竭动物及细胞模型的研究进展 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2020, 18(16): 141–5. doi: 10.3969/j.issn.1672-2779.2020.16.059.
- [7] Li M C, Liao F, Wu R J, et al. Research progress of animal and cell models with chronic heart failure [J]. *Chin Med Mod Distance Educ China*, 2020, 18(16): 141–5. doi: 10.3969/j.issn.1672-2779.2020.16.059.
- [8] Dalimunthe A, Satria D, Sitorus P, et al. Cardioprotective effect of hydroalcohol extract of andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) fruits on doxorubicin-induced rats [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2024, 17(3): 359. doi: 10.3390/ph17030359.
- [9] 刘军格, 江正发, 焦东生, 等. SFRP5 通过抑制 Wnt5a/JNK 通路减轻缺血性心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡和心肌纤维化 [J]. *心脏杂志*, 2024, 36(4): 379–86. doi: 10.12125/j.chj.202307063.
- [9] Liu J G, Jiang Z F, Jiao D S, et al. SFRP5 reduces cardiomyocyte apoptosis and myocardial fibrosis in rats with ischemic heart failure by inhibiting Wnt5a/JNK pathway [J]. *Chin Heart J*, 2024, 36(4): 379–86. doi: 10.12125/j.chj.202307063.
- [10] Deng K Q, Zhao G N, Wang Z, et al. Targeting transmembrane BAX inhibitor motif containing 1 alleviates pathological cardiac hypertrophy [J]. *Circulation*, 2018, 137(14): 1486–504. doi: 10.1161/circulationaha.117.031659.
- [11] Xiao H, Li H, Wang J J, et al. IL-18 cleavage triggers cardiac inflammation and fibrosis upon β -adrenergic insult [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(1): 60–9. doi: 10.1093/eurheartj/ehx261.
- [12] He Z, Hu Y, Zhang Y, et al. Asiaticoside exerts neuroprotection through targeting NLRP3 inflammasome activation [J]. *Phytomedicine*, 2024, 127: 155494. doi: 10.1016/j.phymed.2024.155494.
- [13] Liu S, Chen L, Li J, et al. Asiaticoside mitigates Alzheimer's disease pathology by attenuating inflammation and enhancing synaptic function [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(15): 11976. doi: 10.3390/ijms24151976.
- [14] Wang L, Ma J, Chen C, et al. Isoquercitrin alleviates pirarubicin-induced cardiotoxicity *in vivo* and *in vitro* by inhibiting apoptosis through Phlpp1/AKT/Bcl-2 signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1315001. doi: 10.3389/fphar.2024.1315001.

- [15] 王锦妮,汪靓婧,王美茜,等. 汉黄芩素对脂多糖诱导的急性肾损伤小鼠的保护作用[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(8): 1411–6. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.018.
- [15] Wang J N, Wang J J, Wang M X, et al. Protective effect of wogonin on lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in mice [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(8): 1411–6. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.018.
- [16] 吴江立,贾玉涛,代成,等. 归脾汤对慢性心肌缺血大鼠氧化应激和凋亡作用的研究[J]. 河北中医药学报, 2024, 39(1): 1–3, 13. doi: 10.16370/j.cnki.13-1214/r.2024.01.003.
- [16] Wu J L, Jia Y T, Dai C, et al. Effects of Guipi Tang on oxidative stress and apoptosis in chronic myocardial ischemia rats [J]. *J Hebei Tradit Chin Med Pharmacol*, 2024, 39(1): 1–3, 13. doi: 10.16370/j.cnki.13-1214/r.2024.01.003.

Protective effect of asiaticoside on isoproterenol induced myocardial injury in mice

Ma Ziyu^{1 2}, Zuo Xinmeng^{1 2}, Wang Zhenyu^{1 2}, Wang Mingming^{1 2}, Li Cui^{1 2}

(¹Dept of Physiology, School of Basic Medicine, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000; ²National Experimental Teaching Demonstration Center for Basic Medicine Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000)

Abstract Objective To study the protective effect of asiaticoside (AS) on Isoproterenol Hydrochloride (ISO)–induced myocardial injury in mice. **Methods** Sixty male C57BL/6 mice were randomly divided into blank control (CON) group, model group [ISO, ISO 10/(kg·d)], Low dose group [ISO + AS-L, ISO 10 mg/(kg·d) + AS 5 mg/(kg·d)], Medium dose group [ISO + AS-M, ISO 10 mg/(kg·d) + AS 10 mg/(kg·d)], High dose group [ISO + AS-H, ISO 10 mg/(kg·d) + AS 20 mg/(kg·d)]. Heart mass ratio was counted; changes were observed in electrocardiogram; Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of interleukin (IL)-1 β and cardiac troponin T (cTn-T) in serum; Masson staining was used to observe the fibrosis of mouse myocardial tissue; Western blot was used to detect the ratio of Bax and Bcl-2 protein expression levels (Bax/Bcl-2) and the expression levels of Caspase-3 and NLRP3 proteins in myocardial tissue; real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to detect the mRNA expression levels of ANP, BNP, β -MHC, TNF- α , IL-6, Type I collagen (COL I), and Type III collagen (COL III). **Results** Compared with the CON group, the ISO group had an elevated heart-to-mass ratio ($P < 0.01$), a lower heart rate ($P < 0.05$), a prolonged QT interval ($P < 0.05$), elevated expression of myocardial injury markers cTn-T, ANP, BNP, and β -MHC ($P < 0.01$); increased expression of IL-1 β in the serum ($P < 0.01$), increased expression of TNF- α in the cardiac tissue and increased IL-6 expression ($P < 0.001$), and NLRP3 protein expression was elevated ($P < 0.05$); myocardium showed a large number of collagen fibers bluish staining ($P < 0.001$), COL I, COL III mRNA expression levels increased ($P < 0.001$), and Bax/Bcl-2 ratio ($P < 0.001$) and Caspase-3 expression were significantly elevated ($P < 0.05$). Compared with ISO group, heart-to-mass ratio of mice in ISO + AS-L and ISO + AS-M groups decreased ($P < 0.05$), heart rate increased, QT interval was shortened, cTn-T, ANP, BNP and β -MHC decreased ($P < 0.001$), myocardial collagen fiber blue-staining decreased ($P < 0.01$). The mRNA expression levels of COL I and COL III decreased ($P < 0.05$). The expression levels of IL-1 β and TNF- α decreased ($P < 0.01$). NLRP3, Caspase-3 protein expression and Bax/Bcl-2 ratio decreased ($P < 0.05$). The expression level of IL-6 in ISO + AS-M group decreased ($P < 0.01$). The expression levels of ANP, BNP, and TNF- α mRNA expression were reduced in the ISO + AS-H group ($P < 0.001$); the degree of myocardial fibrosis was improved ($P < 0.05$), and the expression levels of COL I and COL III mRNA were reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** AS has a protective effect against ISO-induced myocardial injury in mice by ameliorating cardiac fibrosis, inhibiting cardiomyocyte apoptosis and attenuating myocardial tissue inflammatory response.

Key words asiaticoside; isoproterenol; myocardial injury; apoptosis; inflammation; fibrosis; protective function
Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 81500177); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20150211); Graduate Student Research Innovation Project of Jiangsu Province (No. KYCX23_2942)

Corresponding author Li Cui, E-mail: cui.li@xzhmu.edu.cn