

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*

毛治尉¹ 张 涛¹ 武永新¹ 孙漾丽^{2,3}

摘要

目的:探究灯盏花素(BVP)联合有氧运动(AE)对冠心病大鼠心功能障碍的改善作用以及对 AMPK/SIRT1/PGC1 α 信号通路的调节作用。

方法:将 105 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、阳性组、BVP 组、AE 组、BVP+AE 组、BVP+AE+AMPK 抑制剂组(BVP+AE+BML-275 组)。检测各组大鼠的心功能指标;检测各组大鼠的血脂水平;ELISA 检测大鼠心肌组织炎症因子-C 反应蛋白(CRP)、白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的含量;HE 染色法观察心肌组织形态学特征;TUNEL 法检测大鼠心肌细胞的凋亡情况;Western Blot 检测大鼠心肌组织中 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 通路相关蛋白的表达。

结果:与对照组相比,模型组大鼠心功能指标 LVEDV、LVESV、血脂指标 TG、TC、LDL-C、CRP、IL-6、TNF- α 的含量及细胞凋亡率升高,SV、LVEF、HDL-C 含量以及 p-AMPK、SIRT1 和 PGC-1 α 蛋白水平均降低($P<0.05$);与模型组相比,BVP 组和 AE 组大鼠心功能指标 LVEDV、LVESV、血脂指标 TG、TC、LDL-C、CRP、IL-6、TNF- α 的含量及细胞凋亡率降低,SV、LVEF、HDL-C 含量以及 p-AMPK、SIRT1 和 PGC-1 α 蛋白水平均升高($P<0.05$);与 BVP 组和 AE 组相比,阳性组和 BVP+AE 组大鼠的心功能指标 LVEDV、LVESV、血脂指标 TG、TC、LDL-C、CRP、IL-6、TNF- α 的含量及细胞凋亡率降低,SV、LVEF、HDL-C 含量以及 p-AMPK、SIRT1 和 PGC-1 α 蛋白水平均升高($P<0.05$);AMPK 抑制剂能够逆转 BVP+AE 联合对冠心病大鼠心脏损伤的缓解作用($P<0.05$)。

结论:BVP 联合 AE 能够通过激活 AMPK/SIRT1/PGC1 α 信号通路来改善冠心病大鼠心功能障碍。

关键词 灯盏花素;有氧运动;AMPK/SIRT1/PGC1 α 信号通路;冠心病

中图分类号:R541.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2023)-09-1185-07

Exploring the improvement effect of breviscapine combined with aerobic exercise on cardiac dysfunction in rats with coronary heart disease and underlying mechanism based on AMPK/SIRT1/PGC1 α signal pathway/MAO Zhiwei, ZHANG Tao, WU Yongxin, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2023,38(9): 1185—1191

Abstract

Objective: To investigate the improvement effect of breviscapine (BVP) combined with aerobic exercise (AE) on cardiac dysfunction in rats with coronary heart disease and its regulatory effect on AMPK/SIRT1/PGC1 α signaling pathway.

Method: A total of 105 SD rats were randomly divided into control group, model group, positive group, BVP group, AE group, BVP+AE group, BVP+AE+AMPK inhibitor group (BVP+AE+BML-275 group). The indexes of cardiac function were measured and the level of blood lipid of rats were detected. The contents of

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2023.09.002

*基金项目:河南省高等学校重点科研计划项目(20A320070)

1 郑州大学附属郑州中心医院心血管内科,河南省郑州市,450001; 2 郑州大学附属郑州中心医院全科医学科; 3 通讯作者

第一作者简介:毛治尉,男,硕士,副主任医师; 收稿日期:2022-12-21

inflammatory factor C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in myocardium of rats were detected by ELISA and the morphological characteristics of myocardium were observed by HE staining. The TUNEL method was used to detect the apoptosis of cardiomyocytes; and Western blot was used to detect the expression of AMPK/SIRT1/PGC-1 α pathway related proteins in rat myocardium.

Result: Compared with the control group, the LVEDV, LVESV, contents of TG, TC, LDL-C, CRP, IL-6, TNF- α , and the rate of apoptosis in the model group were higher, while the SV, LVEF, content of HDL-C, and the levels of p-AMPK, SIRT1 and PGC-1 α protein were lower ($P<0.05$). When compared with the model group, the LVEDV, LVESV, contents of TG, TC, LDL-C, CRP, IL-6, TNF- α , and the rate of apoptosis in BVP group and AE group were lower, while the SV, LVEF, content of HDL-C, and the levels of p-AMPK, SIRT1 and PGC-1 α protein were higher ($P<0.05$). When compared with the BVP group and AE group, the LVEDV, LVESV, contents of TG, TC, LDL-C, CRP, IL-6, TNF- α , and the rate of apoptosis in the positive group and BVP+AE group were lower, while the SV, LVEF, content of HDL-C, and the levels of p-AMPK, SIRT1 and PGC-1 α protein were higher ($P<0.05$). The AMPK inhibitor could reverse the relieving effect of BVP+AE combination on cardiac injury in rats with coronary heart disease ($P<0.05$).

Conclusion: BVP combined with AE can improve the cardiac dysfunction in rats with coronary heart disease by activating AMPK/SIRT1/PGC1 α signal pathway.

Author's address Zhengzhou Center Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou, 450001

Key word breviscapine; aerobic exercise; AMPK/SIRT1/PGC1 α signal pathway; coronary heart disease

冠心病(coronary heart disease, CHD)是常见的心血管疾病之一,患病率和病死率逐年上升,严重危害人们的健康。CHD的发展是一个长期的过程,某些危险因素会加重冠状动脉痉挛或动脉粥样硬化,从而导致心肌细胞发生缺血缺氧,心脏功能或结构发生病理改变^[1-2]。因此,寻找对冠心病有效的治疗方法对人们的健康非常重要。灯盏花素(breviscapine, BVP)主要从中药灯盏花中提取,有广泛的药理活性,安全性高且副作用小,具有舒张血管、抗炎、抗血栓形成、心肌保护等多种心血管药理作用。有研究发现BVP与西药联合可治疗CHD、心肌梗死、高血压,以及慢性心力衰竭等心血管疾病^[3-4]。同时,有氧运动(aerobic exercise, AE)已被作为改善冠心病患者预后的有效措施,且与药物治疗相结合能够更好地降低血脂水平并降低CHD的发病风险^[5]。已知AMP依赖的蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是调节生物能代谢的关键分子,可以监控线粒体功能和细胞能量状态。同时,它调节沉默信息调节因子1(Sirtuin 1, SIRT1)的活性,增加细胞内NAD⁺,从而激活NAD⁺依赖性SIRT1发挥生物效应,进一步调节过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子1 α (peroxi-

some proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α , PGC-1 α)的活性。有研究显示AMPK/SIRT1/PGC1 α 通路被激活后能够减轻烧伤引起的心脏功能障碍,但在CHD引起的心脏损伤中研究较少^[6]。据研究证明,游泳等运动训练可以通过激活AMPK/SIRT1/PGC1 α 通路,防止细胞凋亡及炎症反应,且能够与青稞麸皮油联合改善高脂饮食大鼠动脉硬化脂代谢^[7-8]。但其与BVP的联合作用还未了解。因此,基于上述研究背景,本研究旨在探讨BVP联合AE是否可以通过调节AMPK/SIRT1/PGC1 α 信号通路来改善CHD大鼠心功能障碍。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD雄性大鼠105只, SPF级, 8周龄200—220g, 购自于江苏华创信诺医药科技有限公司, 许可证号: SYXK(苏)2020-0041。饲养温度25℃左右, 湿度60%左右, 实验经郑州大学附属郑州中心医院动物伦理委员会审核批准。

1.2 主要试剂

灯盏花素(长春天诚药业有限公司, 国药准字Z22024355); 辛伐他汀(江苏亚邦爱普森药业有限公司, 国药准字H20094087); BML-275(美国 Med

Chem Express 公司);C反应蛋白(CRP)、白细胞介素6(IL-6)ELISA检测试剂盒(武汉伊艾博科技股份有限公司);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司);TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司);AMPK、p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 兔单克隆抗体(英国Abcam公司);山羊抗兔IgG二抗(武汉菲恩生物科技有限公司)

1.3 CHD大鼠模型制备

参照文献^[8]方法建立CHD大鼠模型,先将大鼠喂食6周高脂肪饮食(丙基硫氧嘧啶0.2%、牛磺胆酸钠0.5%、胆固醇2%、猪油10%、基础饲料87.3%),然后再连续3天注射5mg/kg的盐酸异丙肾上腺素,每天1次。结束后,用1%戊巴比妥钠(40mg/kg)麻醉大鼠,心电图观察ST段变化,当ST段抬高 ≥ 0.1 mV表明CHD大鼠模型成功。对照组饲喂6周常规饲料。

1.4 大鼠分组与给药

将大鼠随机分为对照组、模型组、阳性组、BVP组、AE组、BVP+AE组、BVP+AE+AMPK抑制剂组(BVP+AE+BML-275组),每组15只。除对照组外,其余组均在模型建立成功的基础上给予治疗,阳性组大鼠灌胃给予14mg/kg的辛伐他汀^[9];BVP组大鼠灌胃给予40mg/kg的BVP^[3];AE组大鼠先进行3天的跑台运动训练,速度为10m/min,时间15min,第4天开始跑台设置为15m/min,时间20min,共持续运动4周^[10];BVP+AE组在给予40mg/kg BVP的同时进行跑台运动;BVP+AE+BML-275组同时给予40mg/kg BVP、0.25mg/kg BML-275^[11]以及跑台运动;对照组和模型组均灌胃给予相同体积的生理盐水,每天1次,持续4周。

1.5 检测各组大鼠的心功能指标

实验结束后,用彩色多普勒超声诊断仪测量各组大鼠的左室舒张末期容积(LVEDV),左室收缩末期容积(LVESV),每搏量(SV),左室射血分数(LVEF),每只大鼠均进行3次观察,记录平均值。

1.6 检测各组大鼠的血脂水平

使用全自动生化分析仪测定大鼠血清中三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的含量。

1.7 ELISA检测大鼠心肌组织炎症因子CRP、IL-6、

TNF- α 的含量

将大鼠麻醉处死后,解剖大鼠并取出心肌组织用PBS清洗,然后在每组中随机选取5个大鼠心肌组织称重,按比例加入PBS研磨组织,4℃,2000×g离心10min,收集上清,再从余下的心肌组织中每组随机选取5个置于4%多聚甲醛溶液固定,其余组织均单独分装标记后冻存于-80℃。随后将收集的上清按照ELISA试剂盒的操作步骤检测大鼠心肌组织中炎症因子CRP、IL-6、TNF- α 的含量。

1.8 HE染色法观察心肌组织形态学特征

取1.7中固定24h后的心肌组织,进行常规石蜡包埋并切片,接着用二甲苯和乙醇进行脱蜡水化,再用HE进行染色。最后用显微镜观察大鼠心肌组织的病理变化。

1.9 TUNEL法检测大鼠心肌细胞的凋亡情况

取1.7中的石蜡切片脱蜡,然后将组织切片在蛋白酶K稀释液中孵育30min。再将切片放入50 μ l的TUNEL工作液中,37℃避光孵育1h,然后DAPI避光复染15min,最后用PBS清洗并封片。在荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。

1.10 Western Blot检测大鼠心肌组织中AMPK/SIRT1/PGC-1 α 通路相关蛋白表达

取1.7中保存的心肌组织,加入RIPA裂解液研磨提取总蛋白,然后用10% SDS-PAGE分离蛋白并转至PVDF膜。结束后,将PVDF膜放入5%的脱脂牛奶中孵育2h,然后与一抗稀释液(AMPK、p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 比例为1:10000)在4℃孵育过夜,再与羊抗兔IgG二抗稀释液(1:1000)在室温下孵育2h,最后用ECL显色试剂显色。以GAPDH为内参,在凝胶成像仪中成像并用Image J软件分析蛋白灰度值。

1.11 统计学分析

用GraphPad Prism 8.0统计软件对实验数据进行分析,数据表示为均值 $\pm$ 标准差,多组比较采用单因素ANOVA,两两多重比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 BVP联合AE对大鼠心功能指标的影响

与对照组相比,模型组大鼠心功能指标LVEDV、LVESV升高,SV、LVEF降低($P<0.05$);与

模型组相比,BVP组、AE组大鼠的LVEDV、LVESV降低,SV、LVEF升高($P<0.05$);与BVP组和AE组相比,BVP+AE组大鼠的LVEDV、LVESV降低,SV、LVEF升高($P<0.05$),且与阳性组无显著差异($P>0.05$);与BVP+AE组相比,BVP+AE+BML-275组大鼠的LVEDV、LVESV升高,SV、LVEF降低($P<0.05$),见表1。

2.2 BVP联合AE对大鼠血脂水平的影响

与对照组相比,模型组大鼠血清中TG、TC、LDL-C含量升高,HDL-C含量降低($P<0.05$);与模型组相比,BVP组、AE组大鼠血清中TG、TC、LDL-C含量降低,HDL-C含量升高($P<0.05$);与BVP组和AE组相比,BVP+AE组大鼠血清中TG、TC、LDL-C含量降低,HDL-C含量升高($P<0.05$),且与阳性组无显著差异($P>0.05$);与BVP+AE组相比,BVP+AE+BML-275组大鼠血清中TG、TC、LDL-C含量升高,HDL-C含量降低($P<0.05$),见表2。

2.3 BVP联合AE对大鼠心肌组织中炎症因子含量的影响

与对照组相比,模型组大鼠心肌组织中CRP、IL-6、TNF- α 含量升高($P<0.05$);与模型组相比,BVP组、AE组大鼠心肌组织中CRP、IL-6、TNF- α 含量降低($P<0.05$);与BVP组和AE组相比,BVP+AE组大鼠心肌组织中CRP、IL-6、TNF- α 含量降低($P<0.05$),且与阳性组无显著差异($P>0.05$);与BVP+AE组相比,BVP+AE+BML-275组大鼠心肌组织中CRP、IL-6、TNF- α 含量升高($P<0.05$),见表3。

2.4 BVP联合AE对大鼠心肌组织病理形态的影响

对照组心肌纤维着色均匀,心肌细胞排列整齐,未见明显异常;模型组心肌纤维大量坏死,并伴有纤维水肿,细胞排列紊乱;BVP组和AE组心肌纤维坏死及水肿程度较模型组减轻,且细胞排列较为整齐;阳性组和BVP+AE组的心肌损伤程度较BVP组和AE组减轻,细胞排列整齐;而BVP+AE+BML-275组心肌纤维坏死和水肿程度较BVP+AE组加重。见图1。

2.5 BVP联合AE对大鼠心肌细胞凋亡的影响

与对照组相比,模型组大鼠心肌细胞凋亡率升高($P<0.05$);与模型组相比,BVP组、AE组大鼠心肌细胞凋亡率降低($P<0.05$);与BVP组和AE组相比,BVP+AE组大鼠心肌细胞凋亡率降低($P<0.05$),且

与阳性组无显著差异($P>0.05$);与BVP+AE组相比,BVP+AE+BML-275组大鼠心肌细胞凋亡率升高($P<0.05$),见图2和表4。

2.6 BVP联合AE对大鼠心肌组织中AMPK/SIRT1/PGC-1 α 通路相关蛋白的影响

与对照组相比,模型组大鼠心肌组织中p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达降低($P<0.05$);与模型组相比,BVP组、AE组大鼠心肌组织中p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达升高($P<0.05$);与BVP组和AE组相比,BVP+AE组大鼠心肌组织中p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达升高($P<0.05$),

表1 各组大鼠心功能指标的检测结果 ($n=15, \bar{x} \pm s$)

组别	LVEDV(ml)	LVESV(ml)	SV(ml)	LVEF(%)
对照组	3.36 $\pm$ 0.34	1.23 $\pm$ 0.11	3.32 $\pm$ 0.29	1.02 $\pm$ 0.08
模型组	6.59 $\pm$ 0.72 ^①	4.57 $\pm$ 0.37 ^①	1.13 $\pm$ 0.12 ^①	0.25 $\pm$ 0.02 ^①
阳性组	3.41 $\pm$ 0.32 ^②	1.32 $\pm$ 0.12 ^②	3.29 $\pm$ 0.31 ^②	0.97 $\pm$ 0.06 ^②
BVP组	4.72 $\pm$ 0.38 ^{①②③}	2.66 $\pm$ 0.24 ^{①②③}	2.86 $\pm$ 0.27 ^{①②③}	0.73 $\pm$ 0.05 ^{①②③}
AE组	5.43 $\pm$ 0.46 ^{①②③}	3.02 $\pm$ 0.29 ^{①②③}	2.35 $\pm$ 0.24 ^{①②③}	0.56 $\pm$ 0.04 ^{①②③}
BVP+AE组	3.54 $\pm$ 0.37 ^{②④⑤}	1.36 $\pm$ 0.13 ^{②④⑤}	3.28 $\pm$ 0.27 ^{②④⑤}	0.98 $\pm$ 0.07 ^{②④⑤}
BVP+AE+BML-275组	6.07 $\pm$ 0.58 ^{①②⑥}	4.18 $\pm$ 0.32 ^{①②⑥}	1.53 $\pm$ 0.16 ^{①②⑥}	0.39 $\pm$ 0.03 ^{①②⑥}

注:与对照组比较,① $P<0.05$;与模型组比较,② $P<0.05$;与阳性组比较,③ $P<0.05$;与BVP组比较,④ $P<0.05$;与AE组比较,⑤ $P<0.05$;与BVP+AE组比较,⑥ $P<0.05$ 。

表2 各组大鼠的血脂水平 ($n=15, \bar{x} \pm s, \text{mmol/L}$)

组别	TG	TC	HDL-C	LDL-C
对照组	0.87 $\pm$ 0.07	1.29 $\pm$ 0.11	1.49 $\pm$ 0.09	0.53 $\pm$ 0.04
模型组	2.10 $\pm$ 0.16 ^①	2.88 $\pm$ 0.24 ^①	0.48 $\pm$ 0.05 ^①	1.72 $\pm$ 0.12 ^①
阳性组	0.92 $\pm$ 0.07 ^②	1.32 $\pm$ 0.12 ^②	1.46 $\pm$ 0.11 ^②	0.58 $\pm$ 0.05 ^②
BVP组	1.23 $\pm$ 0.09 ^{①②③}	1.67 $\pm$ 0.14 ^{①②③}	1.17 $\pm$ 0.08 ^{①②③}	0.81 $\pm$ 0.06 ^{①②③}
AE组	1.45 $\pm$ 0.12 ^{①②③}	1.96 $\pm$ 0.13 ^{①②③}	0.87 $\pm$ 0.06 ^{①②③}	1.04 $\pm$ 0.08 ^{①②③}
BVP+AE组	0.94 $\pm$ 0.08 ^{②④⑤}	1.34 $\pm$ 0.10 ^{②④⑤}	1.45 $\pm$ 0.12 ^{②④⑤}	0.60 $\pm$ 0.05 ^{②④⑤}
BVP+AE+BML-275组	1.86 $\pm$ 0.13 ^{①②⑥}	2.43 $\pm$ 0.21 ^{①②⑥}	0.61 $\pm$ 0.04 ^{①②⑥}	1.45 $\pm$ 0.13 ^{①②⑥}

注:与对照组比较,① $P<0.05$;与模型组比较,② $P<0.05$;与阳性组比较,③ $P<0.05$;与BVP组比较,④ $P<0.05$;与AE组比较,⑤ $P<0.05$;与BVP+AE组比较,⑥ $P<0.05$ 。

表3 各组大鼠心肌组织中炎症因子的含量($n=15, \bar{x} \pm s, \text{pg/ml}$)

组别	CRP	IL-6	TNF- α
对照组	35.18 $\pm$ 2.27	68.25 $\pm$ 3.12	17.45 $\pm$ 1.16
模型组	126.37 $\pm$ 4.56 ^①	187.64 $\pm$ 5.32 ^①	52.73 $\pm$ 2.38 ^①
阳性组	36.71 $\pm$ 2.35 ^②	70.11 $\pm$ 3.15 ^②	18.21 $\pm$ 1.15 ^②
BVP组	53.62 $\pm$ 2.84 ^{①②③}	91.37 $\pm$ 3.86 ^{①②③}	26.89 $\pm$ 1.53 ^{①②③}
AE组	72.91 $\pm$ 3.10 ^{①②③}	107.61 $\pm$ 4.67 ^{①②③}	38.62 $\pm$ 1.76 ^{①②③}
BVP+AE组	36.59 $\pm$ 2.31 ^{②④⑤}	71.32 $\pm$ 3.63 ^{②④⑤}	18.74 $\pm$ 1.24 ^{②④⑤}
BVP+AE+BML-275组	108.65 $\pm$ 3.64 ^{①②⑥}	163.27 $\pm$ 5.18 ^{①②⑥}	46.68 $\pm$ 2.21 ^{①②⑥}

注:与对照组比较,① $P<0.05$;与模型组比较,② $P<0.05$;与阳性组比较,③ $P<0.05$;与BVP组比较,④ $P<0.05$;与AE组比较,⑤ $P<0.05$;与BVP+AE组比较,⑥ $P<0.05$ 。

且与阳性组无显著差异($P>0.05$);与BVP+AE组相比,BVP+AE+BML-275组大鼠心肌组织中p-

AMPK、SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达降低($P<0.05$),见图3和表5。

表4 各组大鼠心肌细胞的凋亡率 (n=15, $\bar{x}\pm s$)	
组别	凋亡率(%)
对照组	0
模型组	52.19 $\pm$ 2.34 ^①
阳性组	16.87 $\pm$ 1.26 ^{①②}
BVP组	25.38 $\pm$ 1.35 ^{①②③}
AE组	31.72 $\pm$ 1.37 ^{①②③}
BVP+AE组	17.26 $\pm$ 1.29 ^{①②④⑤}
BVP+AE+BML-275组	43.91 $\pm$ 1.84 ^{①②⑥}

注:与对照组比较,① $P<0.05$;与模型组比较,② $P<0.05$;与阳性组比较,③ $P<0.05$;与BVP组比较,④ $P<0.05$;与AE组比较,⑤ $P<0.05$;与BVP+AE组比较,⑥ $P<0.05$ 。

表5 各组大鼠心肌组织中AMPK/SIRT1/PGC-1 α 通路相关蛋白的表达 (n=15, $\bar{x}\pm s$)			
组别	p-AMPK/AMPK	SIRT1/GAPDH	PGC-1 α /GAPDH
对照组	1.12 $\pm$ 0.08	0.98 $\pm$ 0.07	1.06 $\pm$ 0.08
模型组	0.21 $\pm$ 0.02 ^①	0.18 $\pm$ 0.02 ^①	0.24 $\pm$ 0.02 ^①
阳性组	1.10 $\pm$ 0.07 ^②	0.96 $\pm$ 0.08 ^②	1.04 $\pm$ 0.07 ^②
BVP组	0.91 $\pm$ 0.08 ^{①②③}	0.80 $\pm$ 0.06 ^{①②③}	0.86 $\pm$ 0.06 ^{①②③}
AE组	0.78 $\pm$ 0.06 ^{①②③}	0.67 $\pm$ 0.05 ^{①②③}	0.71 $\pm$ 0.05 ^{①②③}
BVP+AE组	1.09 $\pm$ 0.06 ^{②④⑤}	0.97 $\pm$ 0.07 ^{②④⑤}	1.03 $\pm$ 0.08 ^{②④⑤}
BVP+AE+BML-275组	0.37 $\pm$ 0.02 ^{①②⑥}	0.34 $\pm$ 0.03 ^{①②⑥}	0.41 $\pm$ 0.03 ^{①②⑥}

注:与对照组比较,① $P<0.05$;与模型组比较,② $P<0.05$;与阳性组比较,③ $P<0.05$;与BVP组比较,④ $P<0.05$;与AE组比较,⑤ $P<0.05$;与BVP+AE组比较,⑥ $P<0.05$ 。

图1 大鼠心肌组织的病理变化 (HE染色, $\times 200$)

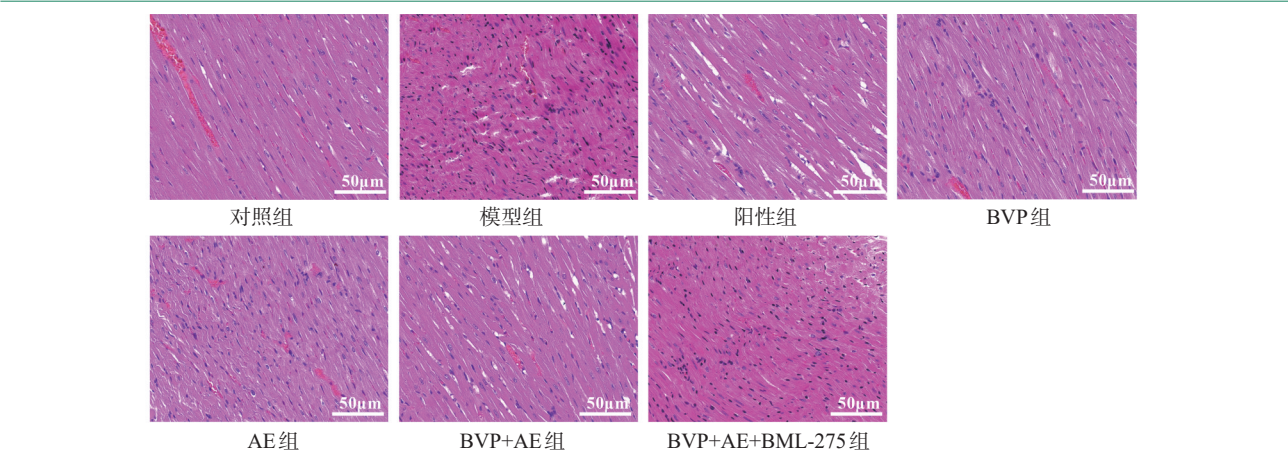


图2 TUNEL法检测大鼠心肌细胞的凋亡情况 ($\times 400$)

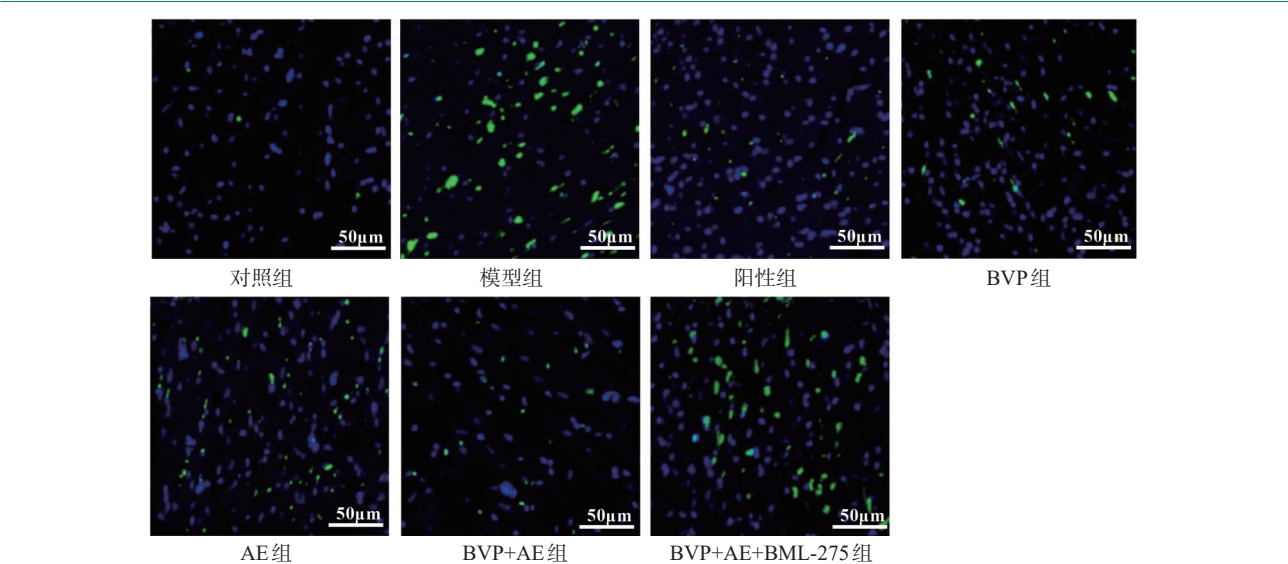
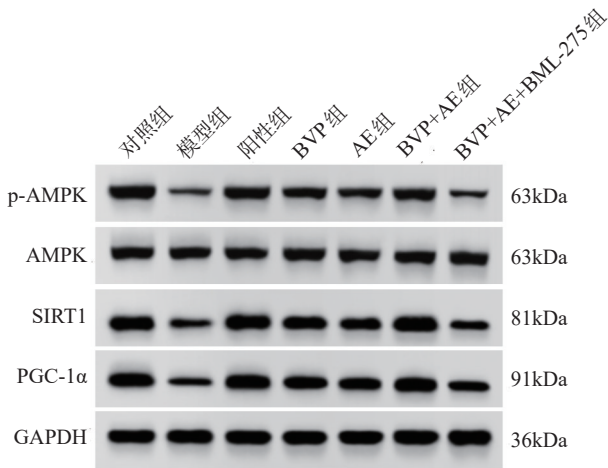


图3 各组大鼠心肌组织中AMPK/SIRT1/PGC-1 α 通路相关蛋白的表达条带



3 讨论

CHD是常见心脑血管疾病之一,由冠状动脉粥样硬化引起的冠状动脉阻塞,从而导致心肌缺血和缺氧。如果治疗不及时,可能会导致患者死亡或残疾,或对生存质量造成严重影响^[12]。在CHD的发病过程中,血脂指标TG、TC、HDL-C、LDL-C均被认为是主要的危险因素,炎症因子CRP、IL-6、TNF- α 的表达也与CHD的血管内环境失衡有关^[13-14]。目前,中药和有氧运动在冠心病中被广泛研究且显示出巨大的治疗优势。BVP作为一种黄酮类化合物,具有抗氧化、抗炎、心肌保护和血管舒张等多种功能,而有氧运动也具有提高CHD患者心肺运动能力、增加脂肪酸氧化及降低血脂的作用^[15-16]。因此,本研究猜测BVP与AE联合对CHD具有更好的治疗作用。已知评价心功能的指标包括左心室舒张末期容量LVEDV和收缩末期容量LVESV,以及左心室泵血功能指标SV和收缩功能指标LVEF。从本研究结果中发现,BVP组和AE组大鼠的心功能指标LVEDV、LVESV,血脂指标TG、TC、LDL-C及心肌组织中炎症因子CRP、IL-6、TNF- α 的含量低于模型组,SV、LVEF和HDL-C含量高于模型组;而BVP与AE联合治疗组大鼠心功能指标LVEDV、LVESV,血脂指标TG、TC、LDL-C及炎症因子CRP、IL-6、TNF- α 的含量均低于BVP组和AE组,SV、LVEF和HDL-C含量均高于BVP组和AE组,且与阳性组无

显著差异。揭示了BVP与AE联合治疗比单一治疗更好的抑制了CHD大鼠心脏收缩功能和泵血功能障碍,降低血脂水平和炎症因子的含量。接着通过HE染色和TUNEL法观察大鼠的心肌组织病理变化,结果发现BVP与AE联合组大鼠的心肌组织损伤以及细胞凋亡率均显著低于BVP组和AE组,进一步揭示了BVP与AE联合治疗更好的抑制CHD大鼠心肌组织的病理损伤和细胞凋亡。

AMPK作为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶中的一种,在细胞内能量稳态中起着关键作用,SIRT1是NAD⁺依赖性脱乙酰酶家族,可以通过控制细胞过程来协调运动的保护心脏作用,PGC-1 α 是一种转录辅激活因子,调节线粒体动力学和生物能量^[17-18]。AMPK被激活后可以通过提高NAD⁺含量来增强SIRT1活性,然后使PGC-1 α 去乙酰化,从而调节线粒体活性,发挥抗氧化应激作用。已知适宜的运动训练也能够改善线粒体的功能,调节能量代谢平衡。有研究发现AE可通过激活AMPK/SIRT1/PGC-1 α 通路已知炎症反应来减轻心肌缺血/再灌注损伤并抑制血栓形成,而且该通路被激活后也能够减轻肥胖相关的血脂增加^[19-20]。本研究结果发现,BVP组和AE组大鼠的心肌组织中AMPK磷酸化水平、SIRT1和PGC-1 α 蛋白水平均高于模型组。表明BVP和AE可能促进了AMPK的磷酸化,提高SIRT1的活性,进而使PGC-1 α 去乙酰化,维持能量稳定,减少组织损伤。但BVP与AE联合治疗组大鼠心肌组织中AMPK磷酸化水平、SIRT1和PGC-1 α 蛋白水平均显著高于BVP和AE单独治疗组,且联合组与阳性组无显著差异。揭示了BVP和AE联合对AMPK的激活作用优于单独治疗组。为了进一步验证AMPK/SIRT1/PGC-1 α 通路在BVP和AE联合治疗CHD过程中的调控作用,在联合治疗的基础上加入AMPK抑制剂进行回补实验发现,BML-275逆转了BVP和AE联合对CHD大鼠心脏损伤的缓解作用,同时SIRT1和PGC-1 α 蛋白水平受到抑制。由此推测BVP和AE联合治疗可能是通过激活AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路来减轻CHD大鼠的心脏功能障碍,且联合治疗比两者单一治疗效果更好。

4 结论

BVP 和 AE 联合治疗能够通过激活 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路改善 CHD 大鼠的心脏功能障碍。本研究为治疗 CHD 等心血管疾病提供了更有效的方法和思路。但本研究仅在大鼠体内进行研究,其在临床上的具体作用还需进一步进行研究。

参考文献

- [1] Xia Y, Brewer A, Bell JT. DNA methylation signatures of incident coronary heart disease: findings from epigenome-wide association studies[J]. *Clin Epigenetics*, 2021, 13(1): 186—202.
- [2] Ou-Yang WL, Guo B, Xu F, et al. The controversial role of irisin in clinical management of coronary heart disease[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12(1):1—11.
- [3] Chen ZQ, Zhou Y, Chen F, et al. Breviscapine pretreatment inhibits myocardial inflammation and apoptosis in rats after coronary microembolization by activating the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15(1):843—855.
- [4] Gao J, Chen G, He H, et al. Therapeutic effects of breviscapine in cardiovascular diseases: a review[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8(1):289—302.
- [5] Wang Y, Shen L, Xu D. Aerobic exercise reduces triglycerides by targeting apolipoprotein C3 in patients with coronary heart disease[J]. *Clin Cardiol*, 2019, 42(1):56—61.
- [6] Lin JY, Kuo WW, Baskaran R, et al. Swimming exercise stimulates IGF1/ PI3K/Akt and AMPK/SIRT1/PGC1 α survival signaling to suppress apoptosis and inflammation in aging hippocampus[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(8): 6852—6864.
- [7] Wen JJ, Cummins CB, Szczesny B, et al. Cardiac dysfunction after burn injury: role of the AMPK- SIRT1- PGC1 α - NFE2L2-ARE pathway[J]. *J Am Coll Surg*, 2020, 230(4): 562—571.
- [8] Fan Y, Jin L, Wu Y, et al. Effects of metoprolol on serum inflammatory factors and myocardial ischemia in rats modeled with coronary heart disease[J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(4):2518—2527.
- [9] 戴华, 林建珍, 王彦蕊. 山姜素对冠心病大鼠心功能、血脂和血管内皮功能的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(20):2813—2817.
- [10] 李悦, 刘雪梅, 胡古月. 青稞麸皮油联合有氧运动对高脂饮食大鼠动脉硬化脂代谢的影响[J]. *中国粮油学报*, 2020, 35(11):93—97.
- [11] Tian L, Cao W, Yue R, et al. Pretreatment with Tilianin improves mitochondrial energy metabolism and oxidative stress in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury via AMPK/SIRT1/PGC-1 α signaling pathway[J]. *J Pharmacol Sci*, 2019, 139(4):352—360.
- [12] Zheng J, Zhang S, Wang T. Expression of Notch-1 and nuclear factor- κ B signal pathway in myocardial cells of coronary heart disease rats[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(3): 1587—1592.
- [13] Shu J, Huang R, Tian Y, et al. Andrographolide protects against endothelial dysfunction and inflammatory response in rats with coronary heart disease by regulating PPAR and NF- κ B signaling pathways[J]. *Ann Palliat Med*, 2020, 9(4):1965—1975.
- [14] Saadatagah S, Pasha AK, Alhalabi L, et al. Coronary heart disease risk associated with primary isolated hypertriglyceridemia; a population-based study[J]. *J Am Heart Assoc*, 2021, 10(11):1—23.
- [15] Peng L, Wen L, Shi QF, et al. Scutellarin ameliorates pulmonary fibrosis through inhibiting NF- κ B/NLRP3-mediated epithelial-mesenchymal transition and inflammation[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(11):978—994.
- [16] Yang Y, Li Y, Zheng Y, et al. The effect of acupuncture combined with aerobic exercise for coronary heart disease as cardiac rehabilitation[J]. *J Healthc Eng*, 2022, 2022(1):1—6.
- [17] Gu M, Wei Z, Wang X, et al. Myostatin knockout affects mitochondrial function by inhibiting the AMPK/SIRT1/PGC1 α pathway in skeletal muscle[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22):13703—13717.
- [18] Thompson G, Davison GW, Crawford J, et al. Exercise and cardioprotection in coronary artery disease: a pilot quasi-experimental study[J]. *J Aging Phys Act*, 2022, 30(2): 281—296.
- [19] Wang G. Aerobic exercise ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury and thrombosis of diabetic rats via activation of AMPK/Sirt1/PGC-1 α pathway[J]. *Gen Physiol Biophys*, 2022, 41(4):319—328.
- [20] Lee Y, Lee J, Lee MS, et al. Chrysanthemum morifolium flower extract ameliorates obesity-induced inflammation and increases the muscle mitochondria content and AMPK/SIRT1 activities in obese rats[J]. *Nutrients*, 2021, 13(10): 3660—3675.