

茯苓酸通过调控 PINK1/Parkin 信号通路介导的线粒体自噬改善冠心病大鼠心肌损伤^Δ

谢 建*, 高 波, 梁珊珊, 杨 清, 郭思言#, 龚龙家(湖北医药学院附属随州医院心血管内科, 湖北 随州 441300)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)18-2267-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.18.09



摘要 目的 探讨茯苓酸(Pac)是否通过调控 PTEN 诱导激酶 1(PINK1)/Parkin RBR E3 泛素蛋白连接酶(Parkin)信号通路介导线粒体自噬来改善冠心病(CHD)大鼠的心肌损伤。**方法** 将 SD 大鼠分为对照(Con)组、CHD 组、Pac 低剂量组(Pac-L 组)、Pac 高剂量组(Pac-H 组)、Pac 高剂量+PINK1/Parkin 信号通路抑制剂组(Pac-H+3-MA 组),每组 10 只。除 Con 组外,其余各组大鼠建立 CHD 模型。造模成功后,各组大鼠腹腔注射相应药物或生理盐水。连续干预 4 周后,检测大鼠左室射血分数(LVEF)、左室舒张末容积(LVEDV)、左室收缩末容积(LVESV)、平均动脉压(MAP),血清中肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌钙蛋白 I(cTnI)、肌钙蛋白 T(cTnT)水平,心肌组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 10(IL-10)、IL-1 β 、活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)水平和过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)活性,以及 p62、活化型胱天蛋白酶 3(cleaved caspase-3)、Parkin、PINK1 蛋白表达量与微管相关蛋白 1 轻链 3 II 型(LC3 II)/LC3 I 比值;观察心肌组织形态和线粒体自噬囊泡,统计单位面积线粒体自噬囊泡数量和心肌细胞凋亡率。**结果** 与 CHD 组比较,Pac-L 组和 Pac-H 组大鼠的 LVEF,MAP,IL-10 水平,CAT、SOD 活性,p62、Parkin、PINK1 蛋白表达量,LC3 II/LC3 I 值,单位面积线粒体自噬囊泡数量均显著升高($P<0.05$);LVEDV、LVESV、CK-MB、LDH、cTnI、cTnT、TNF- α 、IL-1 β 、ROS 和 MDA 水平,细胞凋亡率,cleaved caspase-3 蛋白表达量均显著降低($P<0.05$);且 Pac-H 组各指标改变更显著($P<0.05$);两组心肌组织病理形态均有不同程度改善。与 Pac-H 组比较,Pac-H+3-MA 组大鼠上述指标均显著逆转($P<0.05$)。**结论** Pac 可能通过激活 PINK1/Parkin 信号通路促进 CHD 大鼠心肌细胞线粒体自噬,从而减轻炎症反应和氧化应激,改善心肌损伤。

关键词 茯苓酸;PINK1/Parkin 信号通路;冠心病;心肌细胞;线粒体自噬

Improvement effects of pachymic acid on myocardial injury in coronary heart disease rats by regulating mitochondrial autophagy mediated by the PINK1/Parkin signaling pathway

XIE Jian, GAO Bo, LIANG Shanshan, YANG Qing, GUO Siyan, GONG Longjia (Dept. of Cardiovas Medicine, Suizhou Hospital, Hubei University of Medical, Hubei Suizhou 441300, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore whether pachymic acid (Pac) regulates mitochondrial autophagy mediated by the PTEN-induced kinase 1 (PINK1)/Parkin RBR E3 ubiquitin-protein ligase (Parkin) signaling pathway to alleviate myocardial injury in coronary heart disease (CHD) rats. **METHODS** SD rats were divided into control (Con) group, CHD group, Pac low-dose group (Pac-L group), Pac high-dose group (Pac-H group), Pac-H+PINK1/Parkin signaling pathway inhibitor group (Pac-H+3-MA group), with 10 rats in each group. Except for the Con group, CHD models were established in the remaining groups of rats. After successful modeling, the rats in each group were intraperitoneally injected with the corresponding drugs or normal saline. After continuous intervention for 4 weeks, the left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular end-diastolic volume (LVEDV), left ventricular end-systolic volume (LVESV), and mean arterial pressure (MAP) of the rats were detected. The levels of creatine kinase isoenzyme (CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH), cardiac troponin I (cTnI), and cardiac troponin T (cTnT) in the serum, as well as the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-10 (IL-10), IL-1 β , reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA) in the myocardial tissue, and the activities of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), as well as the expression levels of p62, cleaved caspase-3, Parkin, PINK1 proteins and the ratio of microtubule-associated protein 1 light chain 3 II (LC3 II)/LC3 I ratio were measured. The morphology of myocardial tissue and mitochondrial autophagic vesicles were observed, and the number of mitochondrial autophagic vesicles per unit area and the rate of cardiomyocyte apoptosis were counted.

^Δ 基金项目 湖北省自然科学基金项目(No.2023AFC049)

* 第一作者 副主任医师,硕士。研究方向:冠心病、心律失常、心血管药理学。E-mail:xj1980x@163.com

通信作者 副主任医师,硕士。研究方向:心血管药理学。E-mail:hzdpt@163.com

RESULTS Compared with CHD group, LVEF, MAP, IL-10 levels, CAT and SOD activities, p62, Parkin, PINK1 protein expressions, LC3 II/LC3 I ratio, the numbers of mitochondrial autophagic vesicles per unit area in the Pac-L and Pac-H groups were increased significantly ($P<0.05$); the levels of

LVEDV, LVESV, CK-MB, LDH, cTnI, cTnT, TNF- α , IL-1 β , ROS and MDA, cell apoptosis rates, and protein expression of cleaved caspase-3 were all decreased significantly ($P<0.05$); and the changes in various indicators were more pronounced in the Pac-H group ($P<0.05$); both groups showed varying degree of improvement in myocardial histopathological morphology. Compared with the Pac-H group, the aforementioned indicators in rats from the Pac-H+3-MA group were all significantly reversed ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Pac may promote mitochondrial autophagy in cardiomyocytes of CHD rats by activating the PINK1/Parkin signaling pathway, thereby reducing inflammatory responses and oxidative stress and improving myocardial injury.

KEYWORDS pachymic acid; PINK1/Parkin signaling pathway; coronary heart disease; cardiomyocytes; mitochondrial autophagy

冠心病(coronary heart disease, CHD)是一种因冠状动脉粥样硬化导致心肌供血不足、引发心脏功能障碍的心血管疾病^[1],其高死亡率对人类健康构成严重威胁^[2]。目前,临床主要采用抗血栓药物进行症状控制和预防,但不能治愈,且存在患者需长期服药及可能引发诸多药物不良反应的问题^[3]。茯苓酸(pachymic acid, Pac)是一种从茯苓中提取的天然四环三萜类化合物,具有抗炎、抗氧化和降糖等活性^[4]。研究显示,Pac可通过抑制心肌细胞铁死亡和氧化应激来减轻心肌缺血再灌注损伤^[5];还可改善心力衰竭大鼠的心功能^[6],但具体作用机制尚未阐明。PTEN 诱导激酶 1 (PTEN-induced kinase 1, PINK1)/Parkin RBR E3 泛素蛋白连接酶(Parkin RBR E3 ubiquitin-protein ligase, Parkin)信号通路是调控线粒体自噬的关键通路,研究证实,激活该通路可促进缺血性心脏病大鼠和心力衰竭大鼠的线粒体自噬,抑制心肌细胞凋亡,改善心肌损伤^[7-8]。本研究主要探讨Pac是否可通过调控PINK1/Parkin信号通路介导线粒体自噬来改善CHD大鼠心肌损伤,旨在为CHD的治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括DW-T5型彩色多普勒超声诊断仪[大为医疗(江苏)有限公司]、SGO-HD800X型显微镜(深圳市深视光谷光学仪器有限公司)、AU2700型全自动生化分析仪(日本Olympus公司)、ZC1099型透射电镜(上海茁彩生物科技有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

Pac(批号29070-92-6,纯度>98%)购自湖北健楚生物医药有限公司;盐酸异丙肾上腺素(批号HY-B0468,纯度>99.86%)和PINK1/Parkin信号通路抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA;批号HY-19312,纯度>99.91%)均购自美国MCE公司;苏木精-伊红(HE)试剂(批号SB-CP091)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素10(interleukin-10, IL-10)和IL-1 β 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为SB-FY7591、SB-FY4991、SB-FY7634)以及过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、TUNEL检测试剂盒(批号分别为SB-EC8453、SB-EC5759、SB-R6033、SB-ZR2653、

SB-T6013)均购自上海圣尔生物科技有限公司;肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme, CK-MB)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、肌钙蛋白I(cardiac troponin I, cTnI)、肌钙蛋白T(cardiac troponin T, cTnT)试剂盒(批号分别为ALD36903、ALD29174、ALD29481、ALD30609)均购自上海艾连达生物科技有限公司;微管相关蛋白1轻链3 II(microtubule-associated protein 1 light chain 3 II, LC3 II)、LC3 I、选择性自噬衔接蛋白p62、活化型胱天蛋白酶3(cleaved caspase-3)、Parkin、PINK1和 β -肌动蛋白(β -actin)一抗(批号分别为ab229327、ab167421、ab140651、ab214430、ab315376、ab300623、ab118777)及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(货号ab302644)均购自英国Abcam公司。

1.3 实验动物与饲料来源

雄性SD大鼠70只,SPF级,体重180~200 g,由南方医科大学实验中心提供,生产许可证编号为SCXK(粤)2021-0041。高脂饲料购自北京华阜康生物科技股份有限公司。大鼠在温度(23 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C、相对湿度(60 $\pm$ 5)%,12 h昼夜交替的环境中饲养,自由摄食、饮水。动物实验经湖北医药学院动物伦理委员会批准,审查批号为湖北医药学院动(福)第2023-申072号。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

取60只大鼠建立CHD模型,以高脂饲料(10%猪油、2%丙硫氧嘧啶、0.2%胆固醇、0.5%牛磺胆酸钠、其余为基础饲料)喂养6周,然后连续3 d腹腔注射盐酸异丙肾上腺素(5 mg/kg),每日给药1次。以大鼠心电图ST段抬高 ≥ 0.1 mV且心肌组织HE染色显示明显受视为造模成功^[9]。将造模成功的43只大鼠中的40只按随机数字表法分为模型组(CHD组)、Pac低剂量组(Pac-L组)、Pac高剂量组(Pac-H组)、Pac高剂量+PINK1/Parkin信号通路抑制剂组(Pac-H+3-MA组),每组10只。同时,取10只正常大鼠作为对照组(Con组)。造模结束后第1天开始给药,Pac-L组和Pac-H组大鼠分别腹腔注射10和20 mg/kg的Pac^[10],Pac-H+3-MA组大鼠腹腔注射20 mg/kg的Pac和30 mg/kg的3-MA(根据相关文献^[11]换算),Con组和CHD组大鼠腹腔注射等体积生理盐水,每日给药1次,连续给药4周。

2.2 心功能指标检测

末次给药 12 h 后对所有大鼠进行心功能检测,用 4% 的戊巴比妥钠将大鼠麻醉后用彩色多普勒超声诊断仪检测大鼠的左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室舒张末容积(left ventricular end-diastolic volume, LVEDV)、左室收缩末容积(left ventricular end-systolic volume, LVESV)、平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)。

2.3 样本采集

心功能检测结束后,将所有大鼠麻醉后于腹主动脉采血 3 mL,然后颈椎脱臼处死,取完整心脏,备测。

2.4 血清中心肌损伤指标检测

分别取“2.3”项下各组 10 只大鼠的新鲜血液适量,以 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,按试剂盒说明书操作,检测血清中 CK-MB、LDH、cTnI、cTnT 水平。

2.5 心肌组织中炎症因子水平检测

分别取“2.3”项下各组 5 只大鼠的左心室组织适量,4 °C 匀浆后以 3 500 r/min 离心 10 min,取上清液,按试剂盒说明书操作,检测心肌组织中 TNF-α、IL-10、IL-1β 水平。

2.6 心肌组织形态观察

分别取“2.3”项下各组 5 只大鼠的左心室组织适量,用 4% 多聚甲醛固定、乙醇脱水、二甲苯透明后,石蜡包埋切片(4 μm)。切片置于载玻片上,经脱蜡、水化处理后,进行 HE 染色,最后经脱水、透明、封片后,使用显微镜观察心肌组织形态。

2.7 心肌细胞线粒体自噬囊泡观察

分别取“2.3”项下各组 5 只大鼠的右心室组织适量,分别用 3% 戊二醛和 1% 四氧化锇固定、丙酮脱水后,渗透,包埋,切片(50~60 nm)。切片置于水面漂浮伸展,再转移至铜网,用 2% 醋酸铀染色 30 min,枸橼酸铅再染色 15 min 后,使用透射电镜观察心肌细胞线粒体自噬囊泡数量,并用 Image J 软件统计单位面积线粒体自噬囊泡数量(5 个视野)。

2.8 心肌组织中氧化应激指标水平检测

取“2.3”项下各组剩余 5 只大鼠的右心室组织适量,在预冷生理盐水中匀浆,以 3 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,按试剂盒说明书操作,检测心肌组织中 CAT、SOD 活性和 ROS、MDA 水平。

2.9 心肌组织细胞凋亡检测

取“2.6”项下各组大鼠的心肌组织切片,置于蛋白酶 K 工作液中孵育 30 min,再滴加 TUNEL 反应混合液,避光孵育 60 min,洗涤终止反应,二氨基联苯胺显色,苏木精复染 20 s,盐酸乙醇分化,乙醇脱水,二甲苯透明后封片,使用显微镜观察心肌组织细胞凋亡情况,并用 Image J 软件分析细胞凋亡率。

2.10 心肌组织中线粒体自噬和凋亡相关蛋白表达检测

取“2.7”项下各组 5 只大鼠的左心室组织适量,提取

总蛋白,以 BCA 法分析蛋白浓度,将蛋白样品与上样缓冲液混合后于沸水中变性 5 min,电泳分离蛋白,通过湿转法将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后,加入 LC3 II、LC3 I、p62、cleaved caspase-3、Parkin、PINK1 和 β-actin 一抗(稀释比例均为 1:4 000),4 °C 下孵育过夜;次日,用 TBST 缓冲液洗涤后,加入相应二抗(稀释比例为 1:1 500),室温孵育 2 h;ECL 显影后,采用 Image-Pro Plus 软件分析,以目的蛋白与内参蛋白(β-actin)的灰度值比值表示各目的蛋白的表达量,并计算 LC3 II/LC3 I 值。

2.11 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件对数据进行分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 大鼠心功能指标比较

与 Con 组比较,CHD 组大鼠的 LVEDV 和 LVESV 均显著升高,LVEF 和 MAP 均显著降低($P < 0.05$)。与 CHD 组比较,Pac-L 组和 Pac-H 组大鼠的 LVEDV 和 LVESV 均显著降低,LVEF 和 MAP 均显著升高($P < 0.05$),且 Pac-H 组改变更显著($P < 0.05$)。与 Pac-H 组比较,Pac-H+3-MA 组大鼠的 LVEDV 和 LVESV 均显著升高,LVEF 和 MAP 均显著降低($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 各组大鼠心功能指标比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	LVEF/%	LVEDV/mL	LVESV/mL	MAP/mmHg
Con 组	1.17 ± 0.13	3.26 ± 0.31	1.32 ± 0.15	128.64 ± 15.27
CHD 组	0.26 ± 0.03 ^a	6.78 ± 0.62 ^a	4.71 ± 0.38 ^a	53.12 ± 4.86 ^a
Pac-L 组	0.54 ± 0.04 ^b	5.32 ± 0.48 ^b	3.56 ± 0.34 ^b	76.83 ± 7.42 ^b
Pac-H 组	0.85 ± 0.07 ^{bc}	4.19 ± 0.37 ^{bc}	2.28 ± 0.26 ^{bc}	102.58 ± 9.45 ^{bc}
Pac-H+3-MA 组	0.47 ± 0.03 ^d	5.67 ± 0.50 ^d	3.94 ± 0.37 ^d	71.43 ± 6.53 ^d

a: 与 Con 组比较, $P < 0.05$; b: 与 CHD 组比较, $P < 0.05$; c: 与 Pac-L 组比较, $P < 0.05$; d: 与 Pac-H 组比较, $P < 0.05$; 1 mmHg = 133.32 Pa。

3.2 大鼠血清中心肌损伤指标比较

与 Con 组比较,CHD 组大鼠血清中 CK-MB、LDH、cTnI 和 cTnT 水平均显著升高($P < 0.05$)。与 CHD 组比较,Pac-L 组和 Pac-H 组大鼠血清中 CK-MB、LDH、cTnI 和 cTnT 水平均显著降低($P < 0.05$),且 Pac-H 组降低更显著($P < 0.05$)。与 Pac-H 组比较,Pac-H+3-MA 组大鼠血清中 CK-MB、LDH、cTnI 和 cTnT 水平均显著升高($P < 0.05$)。结果见表 2。

表 2 各组大鼠血清中 CK-MB、LDH、cTnI 和 cTnT 水平比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	CK-MB/(U/mL)	LDH/(U/mL)	cTnI/(ng/mL)	cTnT/(ng/mL)
Con 组	0.42 ± 0.05	1.48 ± 0.16	0.52 ± 0.07	65.84 ± 3.71
CHD 组	1.76 ± 0.19 ^a	5.34 ± 0.47 ^a	1.46 ± 0.12 ^a	126.38 ± 7.19 ^a
Pac-L 组	1.28 ± 0.14 ^b	3.72 ± 0.34 ^b	1.13 ± 0.09 ^b	108.64 ± 5.23 ^b
Pac-H 组	0.74 ± 0.06 ^c	2.29 ± 0.25 ^c	0.81 ± 0.06 ^c	93.16 ± 4.37 ^c
Pac-H+3-MA 组	1.39 ± 0.17 ^d	4.13 ± 0.38 ^d	1.24 ± 0.11 ^d	112.57 ± 6.48 ^d

a: 与 Con 组比较, $P < 0.05$; b: 与 CHD 组比较, $P < 0.05$; c: 与 Pac-L 组比较, $P < 0.05$; d: 与 Pac-H 组比较, $P < 0.05$ 。

3.3 大鼠心肌组织中炎症因子水平比较

与Con组比较,CHD组大鼠心肌组织中TNF-α和IL-1β水平均显著升高,IL-10水平显著降低($P<0.05$)。与CHD组比较,Pac-L组和Pac-H组大鼠心肌组织中TNF-α和IL-1β水平均显著降低,IL-10水平均显著升高($P<0.05$),且Pac-H组改变更显著($P<0.05$)。与Pac-H组比较,Pac-H+3-MA组大鼠心肌组织中TNF-α和IL-1β水平均显著升高,IL-10水平显著降低($P<0.05$)。结果见表3。

表3 各组大鼠心肌组织中炎症因子水平和线粒体自噬囊泡数量比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	TNF-α/(ng/L)	IL-1β/(ng/L)	IL-10/(ng/L)	单位面积线粒体自噬囊泡数量/个
Con组	53.52±6.37	41.56±6.43	114.76±15.31	10.37±1.42
CHD组	184.67±22.92 ^a	137.82±18.54 ^a	29.34±3.78 ^a	21.86±2.51 ^a
Pac-L组	132.94±16.78 ^b	105.43±14.91 ^b	56.83±6.92 ^b	28.62±3.47 ^b
Pac-H组	91.43±12.56 ^{bc}	72.38±9.76 ^{bc}	87.52±11.64 ^{bc}	35.43±4.09 ^{bc}
Pac-H+3-MA组	145.28±17.64 ^d	112.64±15.37 ^d	51.68±7.25 ^d	26.58±3.16 ^d

a: 与Con组比较, $P<0.05$; b: 与CHD组比较, $P<0.05$; c: 与Pac-L组比较, $P<0.05$; d: 与Pac-H组比较, $P<0.05$ 。

3.4 大鼠心肌组织形态比较

心肌组织病理观察结果显示,Con组大鼠心肌组织结构完整;CHD组大鼠心肌细胞排列不规则且有大量坏死,细胞有明显水肿现象且间隙增大,并伴有炎症细胞浸润;Pac-L组和Pac-H组大鼠心肌组织病理形态较CHD组均有不同程度的改善;与Pac-H组比较,Pac-H+3-MA组大鼠心肌组织损伤明显。结果见图1。

3.5 大鼠心肌细胞线粒体自噬囊泡数量比较

透射电镜观察结果显示,Con组大鼠心肌细胞线粒体数量丰富且结构完整;与Con组比较,CHD组大鼠心肌细胞线粒体肿胀明显、数量减少且排列紊乱,单位面积线粒体自噬囊泡数量显著增加($P<0.05$);与CHD组比较,Pac-L组和Pac-H组大鼠心肌细胞线粒体损伤程度有所减轻、数量有所增加且排列相对规则,单位面积线

粒体自噬囊泡数量均显著增加($P<0.05$),且Pac-H组增加更显著($P<0.05$);与Pac-H组比较,Pac-H+3-MA组大鼠心肌细胞线粒体肿胀明显、数量减少,单位面积线粒体自噬囊泡数量显著减少($P<0.05$)。结果见表3和图2。

3.6 大鼠心肌组织中氧化应激指标比较

与Con组比较,CHD组大鼠心肌组织中CAT和SOD活性均显著降低,ROS和MDA水平均显著升高($P<0.05$)。与CHD组比较,Pac-L组和Pac-H组大鼠心肌组织中CAT和SOD活性均显著升高,ROS和MDA水平均显著降低($P<0.05$),且Pac-H组改变更显著($P<0.05$)。与Pac-H组比较,Pac-H+3-MA组大鼠心肌组织中CAT和SOD活性均显著降低,ROS和MDA水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表4。

表4 各组大鼠心肌组织中CAT、SOD活性和ROS、MDA水平比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	CAT/(U/mg)	SOD/(U/mg)	ROS/%	MDA/(nmol/mg)
Con组	126.51±14.73	157.32±16.85	42.17±5.48	1.17±0.15
CHD组	34.68±4.52 ^a	53.94±7.26 ^a	117.36±13.94 ^a	5.23±0.64 ^a
Pac-L组	61.32±8.46 ^b	82.63±10.48 ^b	91.58±12.62 ^b	3.86±0.43 ^b
Pac-H组	87.43±11.61 ^{bc}	119.34±14.72 ^{bc}	64.53±8.17 ^{bc}	2.41±0.32 ^{bc}
Pac-H+3-MA组	53.24±7.18 ^d	71.85±9.34 ^d	98.64±12.56 ^d	4.29±0.48 ^d

a: 与Con组比较, $P<0.05$; b: 与CHD组比较, $P<0.05$; c: 与Pac-L组比较, $P<0.05$; d: 与Pac-H组比较, $P<0.05$ 。

3.7 大鼠心肌细胞凋亡率比较

Con组、CHD组、Pac-L组、Pac-H组和Pac-H+3-MA组大鼠心肌细胞凋亡率分别为(4.97±0.58)%、(38.63±4.27)%、(27.46±3.24)%、(15.82±2.06)%、(30.54±3.71)%($n=5$)。与Con组比较,CHD组大鼠心肌细胞凋亡率显著升高($P<0.05$);与CHD组比较,Pac-L组和Pac-H组大鼠心肌细胞凋亡率均显著降低($P<0.05$),且Pac-H组降低更显著($P<0.05$);与Pac-H组比较,Pac-H+3-MA组大鼠心肌细胞凋亡率显著升高($P<0.05$)。结果见图3。

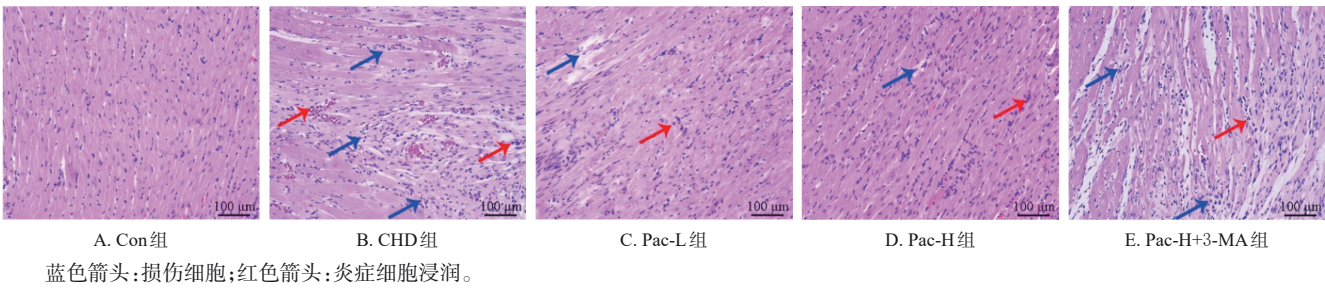


图1 各组大鼠心肌组织形态的HE染色图

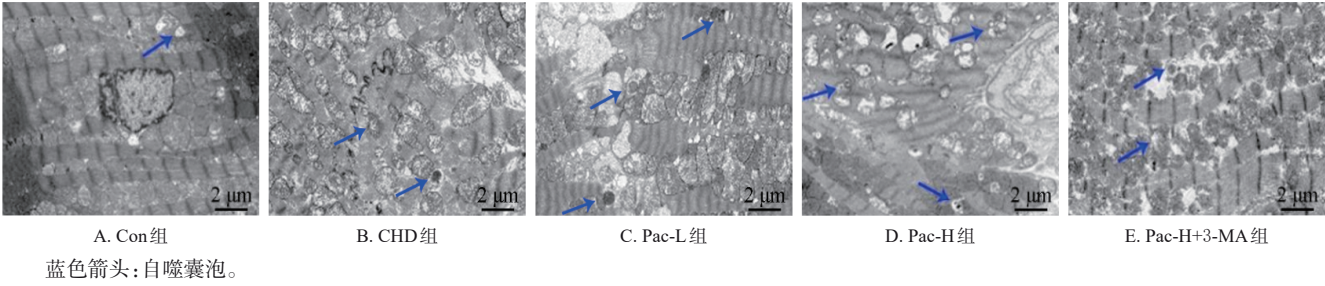


图2 各组大鼠心肌组织线粒体自噬囊泡的透射电镜图

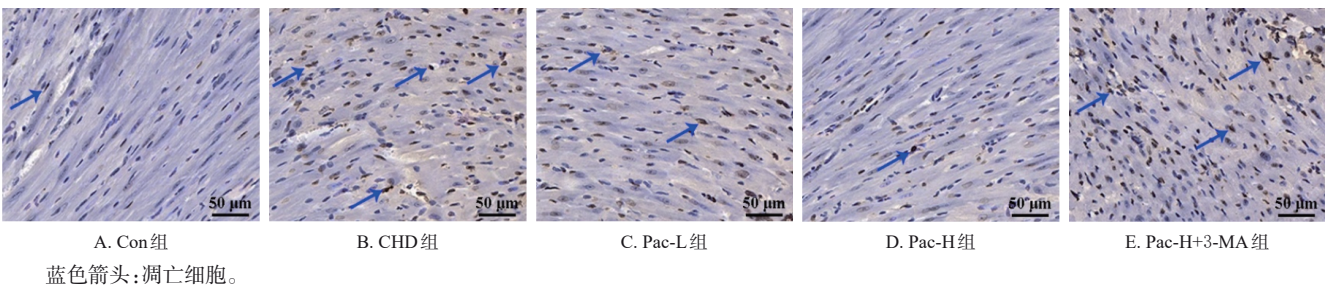


图3 各组大鼠心肌细胞凋亡的TUNEL染色图

3.8 大鼠心肌组织中线粒体自噬和凋亡相关蛋白表达比较

与Con组比较,CHD组大鼠心肌组织中p62、Parkin、PINK1蛋白表达量和LC3 II/LC3 I值均显著降低,cleaved caspase-3蛋白表达量显著升高($P<0.05$)。与CHD组比较,Pac-L组和Pac-H组大鼠心肌组织中p62、Parkin、PINK1蛋白表达量和LC3 II/LC3 I值均显著升高,cleaved caspase-3蛋白表达量均显著降低($P<0.05$),且Pac-H组改变更显著($P<0.05$)。与Pac-H组比较,Pac-H+3-MA组大鼠心肌组织中p62、Parkin、PINK1蛋白表达量和LC3 II/LC3 I值均显著降低,cleaved caspase-3蛋白表达量显著升高($P<0.05$)。结果见图4和表5。

4 讨论

CHD是一种心肌缺血性心脏病,可引起心肌细胞凋亡和心肌损伤,导致心脏的有效收缩单元减少,心肌收缩力下降,心输出血量减少,进而引发心功能障碍。LVEF、MAP、LVEDV和LVESV是评价心功能的核心指标。cleaved caspase-3作为一种细胞凋亡蛋白,其过表达会触发凋亡级联反应,进而加速细胞凋亡进程^[12]。本研究发现,Pac干预后可改善CHD大鼠心肌组织形态,提高LVEF和MAP,降低LVEDV、LVESV和心肌组织中cleaved caspase-3蛋白表达量,抑制心肌细胞凋亡,改善心功能。

CK-MB、cTnI和cTnT为心肌损伤标志物,在心肌细胞遭遇损伤或凋亡之际,会释放入血,其含量变化能够直观反映心肌细胞的受损程度;LDH参与细胞的正常生理代谢,细胞受损时,其会经破损的细胞膜孔隙入血,也是一种细胞损伤标志物^[13]。本研究发现,与Con组比较,CHD组大鼠血清中CK-MB、LDH、cTnI和cTnT水平均显著升高,提示心肌组织受损;Pac干预可显著降低CK-MB、LDH、cTnI和cTnT水平,减轻心肌组织损伤。

炎症在CHD的病理进程中扮演着关键角色,促炎因子可通过损伤血管内皮、加速粥样斑块形成导致冠脉狭窄与心肌缺血,同时直接诱导心肌细胞损伤、凋亡及心功能障碍^[14]。炎症因子可直接抑制线粒体电子传递链复合体活性,降低膜电位,导致线粒体功能受损;还可诱导线粒体膜通透性转换孔异常开放,进一步加剧线粒体功能障碍^[7]。受损线粒体会生成并释放过量ROS,进而引发线粒体DNA损伤和膜脂质过氧化,进一步破坏线粒体自身结构。在这种情况下,线粒体自噬作为一种选择性清除受损线粒体的自噬-溶酶体途径,成为维持心肌细胞内环境稳态的关键代偿机制。它通过及时清除ROS过量累积和结构受损的线粒体,减少炎症因子释放,同时保留功能正常的线粒体以维持能量代谢,从而在一定程度上阻断这一恶性循环,减轻心肌细胞损伤^[15]。本研究发现,Pac干预后可降低CHD大鼠心肌组织中炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、ROS和MDA水平,提高抗炎因子IL-10以及自噬负相关蛋白p62的表达水平,CAT

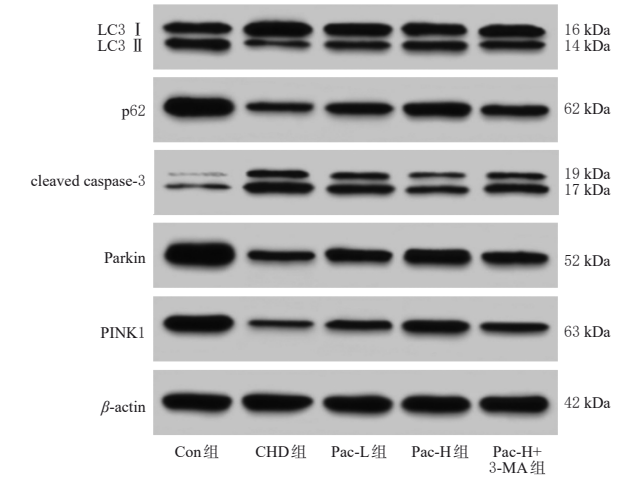


图4 各组大鼠心肌组织中线粒体自噬和凋亡相关蛋白表达的电泳图

表5 各组大鼠心肌组织中线粒体自噬和凋亡相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	LC3 II/LC3 I	p62/β-actin	cleaved caspase-3/β-actin	Parkin/β-actin	PINK1/β-actin
Con组	0.82 ± 0.10	1.16 ± 0.014	0.18 ± 0.03	1.31 ± 0.15	0.95 ± 0.12
CHD组	0.24 ± 0.03 ^a	0.38 ± 0.05 ^a	0.79 ± 0.10 ^a	0.45 ± 0.06 ^a	0.28 ± 0.04 ^a
Pac-L组	0.47 ± 0.06 ^b	0.61 ± 0.07 ^b	0.57 ± 0.07 ^b	0.72 ± 0.09 ^b	0.49 ± 0.06 ^b
Pac-H组	0.65 ± 0.08 ^{bc}	0.87 ± 0.11 ^{bc}	0.36 ± 0.05 ^{bc}	1.03 ± 0.12 ^{bc}	0.76 ± 0.10 ^{bc}
Pac-H+3-MA组	0.42 ± 0.06 ^d	0.54 ± 0.07 ^d	0.52 ± 0.07 ^d	0.67 ± 0.09 ^d	0.44 ± 0.06 ^d

a: 与Con组比较, $P<0.05$; b: 与CHD组比较, $P<0.05$; c: 与Pac-L组比较, $P<0.05$; d: 与Pac-H组比较, $P<0.05$ 。

和SOD活性,以及线粒体自噬囊泡数量和自噬促进蛋白LC3 II/LC3 I 值,减轻炎症反应和氧化应激,促进线粒体自噬。

PINK1/Parkin 信号通路与线粒体自噬密切相关,当线粒体受损时,PINK1 转运受阻并聚集于线粒体外膜,并将 Parkin 激活并募集在线粒体表面,促进线粒体自噬^[16]。Guan 等^[17]研究发现,激活 PINK1/Parkin 信号通路可促进心力衰竭大鼠线粒体自噬,改善线粒体损伤和心脏重塑,同时减少心肌细胞凋亡和心脏纤维化。本研究发现,Pac 干预后可提高 CHD 大鼠心肌组织中的 Parkin 和 PINK1 蛋白表达量,激活 PINK1/Parkin 信号通路。为进一步验证 Pac 改善 CHD 大鼠心肌损伤与该通路的关系,本研究采用 Pac 和 3-MA 同时干预发现,3-MA 可逆转 Pac 对 CHD 大鼠的改善作用。

综上所述,Pac 可能通过激活 PINK1/Parkin 信号通路促进 CHD 大鼠心肌细胞线粒体自噬,从而减轻炎症反应和氧化应激,改善心肌损伤。但 CHD 发生机制复杂,且 Pac 在动物体内的作用通路可能具有多效性,其具体作用机制还需进一步探究。

参考文献

[1] YE J H, YANG R P, LI L, et al. Molecular mechanism of Danxiong tongmai granules in treatment of coronary heart disease[J]. Aging (Albany NY), 2024, 16(10):8843-8865.

[2] LI Z, CHENG Q, HE Y Y, et al. Effect of Dan-Lou tablets on coronary heart disease revealed by microarray analysis integrated with molecular mechanism studies[J]. Heliyon, 2023, 9(5):e15777.

[3] YUAN Y, LIU H J, MENG Q W. The cardioprotective effects and mechanisms of *Astragalus*-safflower herb pairs on coronary heart disease identified by network pharmacology and experimental verification[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2023, 28(5):94.

[4] HE Y, ZHONG J H, WEI X D, et al. Pachymic acid ameliorates pulmonary hypertension by regulating Nrf2-Keap1-ARE pathway[J]. Curr Med Sci, 2022, 42(1):56-67.

[5] LIU D M, DING J R, LI Z Z, et al. Pachymic acid (PA) inhibits ferroptosis of cardiomyocytes via activation of the AMPK in mice with ischemia/reperfusion-induced myocardial injury[J]. Cell Biol Int, 2024, 48(1):46-59.

[6] YOUNIS N N, SALAMA A, SHAHEEN M A, et al. Pachymic acid attenuated doxorubicin-induced heart failure by suppressing miR-24 and preserving cardiac junc-

tophilin-2 in rats[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(19):10710.

- [7] 李召彬,孔佳杰,席树强,等.红景天苷调节 PINK1/Parkin 信号通路对缺血性心脏病大鼠线粒体自噬的影响[J].实用临床医药杂志,2024,28(22):8-15.
- [8] ABUDUREYIMU M, ZHAO L F, LUO X M, et al. Influences of ALDH2 on cardiomyocyte apoptosis in heart failure rats through regulating PINK1-parkin signaling pathway-mediated mitophagy[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2022, 68(2):94-102.
- [9] FAN Y L, JIN L J, 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.
- [10] 赖震宇,赵展庆,符妹垂.茯苓酸调节 CCL2-CCR2 信号轴对急性心肌梗死大鼠心肌损伤的影响[J].河北医药, 2024, 46(5):684-687,692.
- [11] 张俊丽,李媛媛,尹静,等.咪达唑仑调节 PINK1/PARKIN 信号通路对缺血性脑卒中大鼠神经元损伤的影响[J].药学实践与服务,2025,43(6):288-292,312.
- [12] ZHAO L, WANG L, ZHANG D, et al. Puerarin alleviates coronary heart disease via suppressing inflammation in a rat model[J]. Gene, 2021, 771(2):145354-145362.
- [13] ZHANG D Z, JIA M Y, WEI H Y, et al. Systematic review and meta-analysis of the interventional effects of resveratrol in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Front Pharmacol, 2024, 15:1301502.
- [14] LIN J, YANG R R, ZHANG Y, et al. The mediation effects of metabolic and immune-inflammation factors on the depression-premature coronary heart disease association[J]. J Affect Disord, 2023, 331:434-441.
- [15] 梁荣珍,王太成,林德文,等.艾帕素 13(apelin-13)通过阻断 PINK1/parkin 信号通路促进线粒体自噬改善大鼠心肌缺血再灌注损伤[J].细胞与分子免疫学杂志,2023, 39(11):981-987.
- [16] CAO Y H, CHEN X, PAN F Q, et al. Xinmaikang-mediated mitophagy attenuates atherosclerosis via the PINK1/Parkin signaling pathway[J]. Phytomedicine, 2023, 119:154955.
- [17] GUAN S B, XIN Y F, DING Y G, et al. Ginsenoside Rg₁ protects against cardiac remodeling in heart failure via SIRT1/PINK1/parkin-mediated mitophagy[J]. Chem Biodivers, 2023, 20(2):e202200730.

(收稿日期:2025-05-27 修回日期:2025-08-26)

(编辑:邹丽娟)