

益母草碱调节 GAS6/Axl 信号通路对冠心病大鼠心肌损伤的影响[△]

孟王桃*, 崔冬玲, 吴冬景, 陈 超, 张颖颖[#](信阳职业技术学院护理学院, 河南 信阳 464000)

中图分类号 R965;R541.4 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)01-0051-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.01.09



摘要 **目的** 探讨益母草碱对生长停滞特异性蛋白6(GAS6)/酪氨酸蛋白激酶受体(Axl)信号通路的影响,阐明其减轻冠心病大鼠心肌损伤的机制。**方法** 构建冠心病大鼠模型,将造模成功的大鼠按随机抽样方法分为模型组,益母草碱低、高剂量组(分别灌胃25、100 mg/kg 益母草碱+腹腔注射75 mg/kg 生理盐水),益母草碱高剂量+GAS6/Axl信号通路抑制剂组(灌胃100 mg/kg 益母草碱+腹腔注射75 mg/kg的R428),每组12只;另取12只正常大鼠作对照组。各给药组大鼠给予相应药物,对照组和模型组大鼠灌胃并腹腔注射等体积生理盐水,每天1次,连续48 d。给药结束后,检测大鼠心功能和血清中炎症因子及心肌损伤标志物水平;观察其心肌组织病理形态;检测其心肌组织细胞凋亡率和心肌组织中凋亡及GAS6/Axl信号通路相关蛋白表达。**结果** 与对照组比较,模型组大鼠出现心肌细胞与心肌纤维排列紊乱、心肌细胞肥大、细胞核固缩等病变,左室射血分数、左室短轴缩短率、二尖瓣环舒张早期与舒张晚期运动速度之比及GAS6蛋白相对表达量和B细胞淋巴瘤2/B细胞淋巴瘤2相关X蛋白、磷酸化Axl/Axl比值均显著降低($P<0.05$),肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1 β 、白细胞介素6、肌酸激酶同工酶、肌钙蛋白I、肌红蛋白水平以及心肌组织细胞凋亡率和剪切型胱天蛋白酶3/胱天蛋白酶3比值均显著升高($P<0.05$);益母草碱各剂量组大鼠上述病理情况及各检测指标均显著改善($P<0.05$),且益母草碱高剂量组效果较益母草碱低剂量组明显($P<0.05$);R428处理可逆转高剂量益母草碱对冠心病大鼠心肌损伤的改善作用($P<0.05$)。**结论** 益母草碱可减轻冠心病大鼠心肌损伤,其作用机制可能与激活GAS6/Axl信号通路相关。**关键词** 益母草碱;GAS6/Axl信号通路;冠心病;心肌损伤

Effects of leonurine on myocardial injury in rats with coronary heart disease by regulating the GAS6/Axl signaling pathway

MENG Wangtao, CUI Dongling, WU Dongjing, CHEN Chao, ZHANG Yingying (School of Nursing, Xinyang Vocational and Technical College, Henan Xinyang 464000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the effects of leonurine on growth arrest-specific protein-6 (GAS6)/Axl signaling pathway, and clarify its mechanism of alleviating myocardial injury in rats with coronary heart disease. **METHODS** The rat model of coronary heart disease was constructed; successfully modeled rats were randomly separated into model group, leonurine low-dose and high-dose groups (intragastric administration of leonurine 25, 100 mg/kg+intraperitoneal injection of normal saline 75 mg/kg), and leonurine high-dose+GAS6/Axl signaling pathway inhibitor group (intragastric administration of leonurine 100 mg/kg+intraperitoneal injection of R428 75 mg/kg), with 12 rats in each group. Additional 12 normal rats were selected as control group. Each administration group was given relevant medicine; control group and model group were given a constant volume of normal saline intragastrically and intraperitoneally, once a day, for 48 consecutive days. After administration, the heart function of rats, and serum levels of inflammatory factors and myocardial injury markers were detected; the pathological morphology of myocardial tissue was observed; the myocardial cell apoptosis rate, the expressions of apoptosis and GAS6/Axl signaling pathway-related proteins were determined. **RESULTS** Compared with control group, model group showed disorders in the arrangement of myocardial cells and myocardial fibers, hypertrophy of myocardial cells, and nuclear condensation; left ventricular ejection fraction, left ventricular fractional shortening, ratio of early-diastolic and late-diastolic motion velocity of the mitral ring, the protein expression of GAS6, B-cell lymphoma 2/B-cell lymphoma 2 associated X protein and phosphorylated Axl/Axl ratios were decreased significantly ($P<0.05$). The levels of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , interleukin-6, creatine kinase isoenzyme, troponin I and myoglobin, the cell apoptosis rate, and cleaved caspase-3/caspase-3 ratio were increased significantly ($P<0.05$). Leonurine could obviously improve the above pathological conditions and detection indicators ($P<0.05$), and the effect of leonurine high-dose group was more significant than that of leonurine low-dose group ($P<0.05$); R428 treatment could reverse the ameliorating effect of high-dose of leonurine on myocardial injury in rats with coronary heart disease ($P<0.05$). **CONCLUSIONS**

Leonurine can alleviate myocardial injury in rats with coronary heart disease, and its mechanism of action is related to the activation of the GAS6/Axl signaling pathway.

KEYWORDS leonurine; GAS6/Axl signaling pathway; coronary heart disease; myocardial injury

[△] 基金项目 河南省高等学校重点科研项目计划(No.23B320017)
* 第一作者 讲师,硕士。研究方向:老年人常见病诊治。电话:0376-6280023。E-mail:ocgwe6@163.com
[#] 通信作者 副教授,硕士。研究方向:老年人常见病诊治。电话:0376-6280023。E-mail:b50pox@163.com

冠心病属于心血管相关疾病,具有高致残率及高致死率,其主要是由于沉积物积聚促使冠状动脉狭窄、阻塞,引发心肌组织缺氧、缺血、坏死等损伤,导致患者出现心绞痛、心悸、呼吸急促、乏力等症状,若不及时治疗,还可加剧损伤,引发心肌梗死、心力衰竭,甚至威胁患者的生命安全^[1]。目前,冠心病的临床治疗主要通过服用防血栓类药物以防止冠状动脉阻塞,但现有治法服药周期长且难以消除病根,因此迫切需要寻求新型特效药以缓解患者病情^[2]。

益母草碱提取自中药益母草,具有降血脂、溶栓、保护心血管等多种药理作用,被广泛应用于心血管相关疾病的治疗。已有研究显示,益母草碱可减轻血管紧张素Ⅱ(angiotensinⅡ,AngⅡ)诱导的小鼠心脏肥大、纤维化和炎症,抑制心脏损伤和功能障碍,改善心功能^[3]。生长停滞特异性蛋白6(growth arrest-specific protein-6,GAS6)/酪氨酸蛋白激酶受体(Axl)信号通路在维持心脏正常功能中具有重要作用,激活GAS6/Axl-AMP活化蛋白质激酶(AMP-activated protein kinase,AMPK)信号通路可抑制过氧化氢诱导的心肌细胞氧化应激损伤,抑制心肌细胞凋亡^[4]。本研究通过探究益母草碱对GAS6/Axl信号通路的影响,阐明其减轻冠心病大鼠心肌损伤的机制,以期对冠心病的治疗寻求新策略。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括ReadMax 1500型酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司)、RX50型显微镜[思科诺思生物科技(北京)有限公司]、4200SF型凝胶成像分析系统(上海天能科技有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

益母草碱对照品(批号yb-019,纯度 $\geq 98\%$)购自上海钰博生物科技有限公司;GAS6/Axl信号通路抑制剂R428对照品(批号ab141364,纯度 $> 98\%$)购自英国Abcam公司;肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)、白细胞介素1 β (interleukin-1 β ,IL-1 β)、IL-6酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为ER006、ER008-16、ER003-48)均购自上海吉泰依科赛生物科技有限公司;肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme,CK-MB)、肌钙蛋白I(troponin I,cTn I)、肌红蛋白(myoglobin,Mb)ELISA试剂盒(批号分别为JLC15558、JLC14924、JLC15548)均购自江西江蓝纯生物试剂有限公司;兔源胱天蛋白酶3(caspase-3)、B细胞淋巴瘤2(B-cell lymphoma-2,Bcl-2)相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein,Bax)抗体(批号分别为LM-0081R、LM0057)均购自上海联迈生物工程有限公司;兔源GAS6抗体(批号BK-KT17001)购自上海帛科生物技术有限公司;兔源磷酸化Axl(phosphorylated Axl,p-Axl)、Axl抗体(批号分别

为kl-5181R、kl230Ra21)均购自上海康朗生物科技有限公司;兔源剪切型caspase-3(cleaved-caspase-3)抗体(批号9661T)购自上海远慕生物科技有限公司;兔源Bcl-2抗体(批号FNab00839)购自武汉菲恩生物科技有限公司;兔源 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(批号k10085)购自北京百奥莱博科技有限公司;TUNEL试剂盒(批号Y1040S)购自优利科(上海)生命科学有限公司;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)染色液(批号B1061)购自北京普利莱基因技术有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的免疫球蛋白G二抗(批号abs20002)购自爱必信(上海)生物科技有限公司。

1.3 实验动物

60只7周龄、体重(200 ± 20)g的SPF级正常健康雄性SD大鼠[动物生产许可证号SCXK(豫)2022-0001]购自河南省实验动物中心。所有大鼠饲养于温度 $21 \sim 23^\circ\text{C}$ 、相对湿度55%、12 h光/12 h暗交替的环境中,饲养期间自由摄食、饮水。本研究方案已获得河南利欣制药股份有限公司动物伦理委员会审批(审批号2022-030195)。

2 方法

2.1 冠心病大鼠模型构建

大鼠适应性喂养1周后,选取12只正常健康大鼠喂养普通饲料作为对照组。剩余48只大鼠进行冠心病造模,具体造模方法及成模判断标准如下:先以高脂饲料(87.3%基础饲料+10%猪油+2%胆固醇+0.5%牛磺胆酸钠+0.2%丙基硫氧嘧啶)喂养6周,再连续注射5 mg/(kg·d)盐酸异丙肾上腺素3 d,每天1次。大鼠注射药物期间仍用高脂饲料喂养。注射3 d后,用30 mg/kg戊巴比妥钠麻醉大鼠并连接心电图,观察其心电图ST段变化,当ST段抬高 ≥ 0.1 mV表明冠心病大鼠模型构建成功^[5]。

2.2 分组与给药

将造模成功的48只大鼠按随机抽样方法分为模型组,益母草碱低、高剂量组(益母草碱-L、益母草碱-H组,分别灌胃25、100 mg/kg的益母草碱+腹腔注射75 mg/kg的生理盐水^[6]),益母草碱高剂量+GAS6/Axl信号通路抑制剂组(益母草碱-H+R428组,灌胃100 mg/kg的益母草碱+腹腔注射75 mg/kg的R428^[7]),每组12只。各给药组大鼠给予相应药物,对照组和模型组大鼠灌胃并腹腔注射等体积生理盐水,每天1次,连续48 d。

2.3 大鼠心功能检测

给药结束后24 h,用戊巴比妥钠麻醉大鼠,超声心动图监测5个周期(1个周期0.10~0.16 s)的左室射血分数(left ventricular ejection fraction,LVEF),取均值作为最终结果,计算左室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening,LVFS)及二尖瓣舒张早期与舒张晚

期运动速度之比(ratio of early-diastolic and late-diastolic motion velocity of the mitral ring, Em/Am)。LVFS=(左心室的舒张末期内径-左心室的收缩末期内径)/左心室的舒张末期内径×100%。

2.4 大鼠血清中炎症因子及心肌损伤标志物水平检测

心功能检测结束后,各组大鼠腹主动脉取血,静置后离心,取血清,按照相应ELISA试剂盒说明书操作,检测血清中炎症因子(TNF-α、IL-1β、IL-6)及心肌损伤标志物(CK-MB、cTn I、Mb)水平。

2.5 大鼠心肌组织病理形态观察

取血结束,处死大鼠,取心肌组织。每组选择6只大鼠的心肌组织,制成石蜡切片(厚5 μm),行常规HE染色,显微镜下观察心肌组织病理形态。其余心肌组织置于-20℃冰箱中冷冻保存。

2.6 大鼠心肌组织细胞凋亡率检测

取“2.5”项下各组大鼠的心肌组织石蜡切片,常规脱蜡至水后进行TUNEL染色、DAPI染色,具体操作参照试剂盒说明书;脱水后透明密封,显微镜下观察心肌组织细胞凋亡情况(凋亡细胞呈红色)。计算心肌组织细胞凋亡率:细胞凋亡率(%)=TUNEL阳性细胞数/DAPI阳性细胞数×100%。

2.7 大鼠心肌组织中凋亡及GAS6/Axl信号通路相关蛋白表达检测

取各组剩余6只大鼠的心肌组织,研碎后加入蛋白裂解液在冰上充分裂解,提取总蛋白并进行定量,沸水浴变性。取变性蛋白,在电压60 V下电泳分离4~5 h,然后在电压60 V下湿转2 h至硝酸纤维素膜,封闭液室温摇床封闭1 h。将膜与cleaved-caspase-3、caspase-3、Bcl-2、Bax、GAS6、p-Axl、Axl、β-actin一抗(其中cleaved-caspase-3、caspase-3抗体的稀释比例均为1:1 000,其余一抗的稀释比例均为1:2 000)在4℃下共孵育8 h;洗膜后,将膜与HRP标记的二抗(稀释比例1:10 000)在37℃下共孵育1 h。经可视化处理后,凝胶成像系统采集图像,并使用Image软件分析条带灰度值,以目的蛋白与内参蛋白(β-actin)条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达量,并计算cleaved-caspase-3/caspase-3、Bcl-2/Bax、p-Axl/Axl比值。

2.8 统计学方法

采用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析。实验数据均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准α=0.05。

3 结果

3.1 大鼠心功能测定结果

模型组大鼠LVEF、LVFS、Em/Am均较对照组显著降低($P<0.05$);益母草碱各剂量组大鼠LVEF、LVFS、

Em/Am均较模型组显著升高($P<0.05$),且益母草碱-H组上述指标变化均较益母草碱-L组更明显($P<0.05$);益母草碱-H+R428组大鼠LVEF、LVFS、Em/Am均较益母草碱-H组显著降低($P<0.05$)。结果见表1。

表1 各组大鼠心功能比较($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	LVEF/%	LVFS/%	Em/Am
对照组	82.54±8.51	56.48±6.11	1.28±0.13
模型组	44.67±3.37 ^a	31.76±2.46 ^a	0.71±0.08 ^a
益母草碱-L组	50.79±5.22 ^b	36.41±3.82 ^b	0.93±0.10 ^b
益母草碱-H组	77.63±7.98 ^{bc}	53.22±5.54 ^{bc}	1.19±0.12 ^{bc}
益母草碱-H+R428组	55.29±5.83 ^d	38.65±4.02 ^d	0.97±0.10 ^d

a:与对照组相比, $P<0.05$;b:与模型组相比, $P<0.05$;c:与益母草碱-L组相比, $P<0.05$;d:与益母草碱-H组相比, $P<0.05$ 。

3.2 大鼠血清中炎症因子水平测定结果

模型组大鼠血清中TNF-α、IL-1β、IL-6水平均较对照组显著升高($P<0.05$);益母草碱各剂量组大鼠血清中TNF-α、IL-1β、IL-6水平均较模型组显著降低($P<0.05$),且益母草碱-H组上述指标变化均较益母草碱-L组更明显($P<0.05$);益母草碱-H+R428组大鼠血清中TNF-α、IL-1β、IL-6水平均较益母草碱-H组显著升高($P<0.05$)。结果见表2。

表2 各组大鼠血清中炎症因子水平比较($\bar{x} \pm s, n=12$, pg/mL)

组别	TNF-α	IL-1β	IL-6
对照组	55.26±6.92	12.69±1.45	24.85±2.73
模型组	224.51±23.48 ^a	57.83±5.97 ^a	106.79±1.15 ^a
益母草碱-L组	163.28±18.76 ^b	36.47±3.82 ^b	71.58±7.79 ^b
益母草碱-H组	105.74±13.22 ^{bc}	16.54±1.91 ^{bc}	33.26±3.64 ^{bc}
益母草碱-H+R428组	147.56±16.51 ^d	32.71±3.45 ^d	65.72±6.85 ^d

a:与对照组相比, $P<0.05$;b:与模型组相比, $P<0.05$;c:与益母草碱-L组相比, $P<0.05$;d:与益母草碱-H组相比, $P<0.05$ 。

3.3 大鼠血清中心肌损伤标志物水平测定结果

模型组大鼠血清中CK-MB、cTn I、Mb水平均较对照组显著升高($P<0.05$);益母草碱各剂量组大鼠血清中CK-MB、cTn I、Mb水平均较模型组显著降低($P<0.05$),且益母草碱-H组上述指标变化均较益母草碱-L组更明显($P<0.05$);益母草碱-H+R428组大鼠血清中CK-MB、cTn I、Mb水平均较益母草碱-H组显著升高($P<0.05$)。结果见表3。

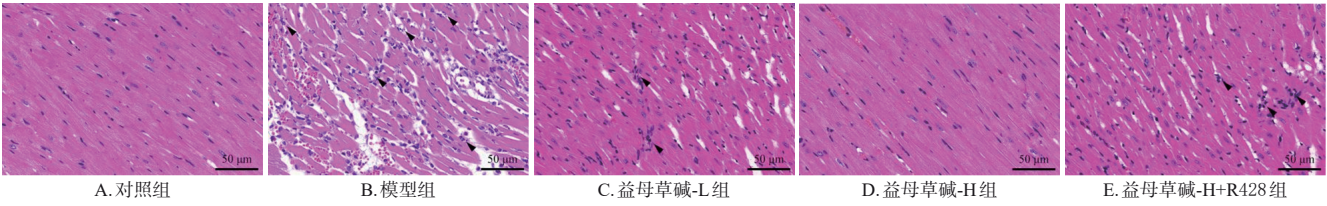
表3 各组大鼠血清中心肌损伤标志物水平比较($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	CK-MB/(U/L)	cTn I/(ng/mL)	Mb/(ng/mL)
对照组	15.39±1.74	0.17±0.02	33.74±3.48
模型组	56.84±5.88 ^a	0.58±0.06 ^a	128.56±13.14 ^a
益母草碱-L组	37.63±3.92 ^b	0.39±0.04 ^b	89.37±9.27 ^b
益母草碱-H组	18.25±2.01 ^{bc}	0.19±0.02 ^{bc}	48.25±5.11 ^{bc}
益母草碱-H+R428组	34.52±3.65 ^d	0.35±0.04 ^d	83.16±8.64 ^d

a:与对照组相比, $P<0.05$;b:与模型组相比, $P<0.05$;c:与益母草碱-L组相比, $P<0.05$;d:与益母草碱-H组相比, $P<0.05$ 。

3.4 大鼠心肌组织病理形态观察结果

对照组大鼠心肌细胞与心肌纤维排列整齐,心肌细胞形态正常、大小均匀,无炎症细胞浸润;与对照组比较,模型组大鼠心肌细胞与纤维排列紊乱,细胞肥大,细胞核固缩,细胞数量减少,大量炎症细胞浸润;与模型组相比,益母草碱各剂量组大鼠心肌细胞与纤维排列相对整齐,细胞形态相对正常,细胞数量增多,炎症细胞浸润减少;与益母草碱-H组比较,益母草碱-H+R428组大鼠心肌组织损伤严重,细胞及纤维排列紊乱,细胞异常肥大,细胞数量减少,炎症细胞浸润明显。结果见图1。



A. 对照组
箭头: 炎症细胞浸润。

图1 各组大鼠心肌组织病理形态观察显微图(HE 染色)

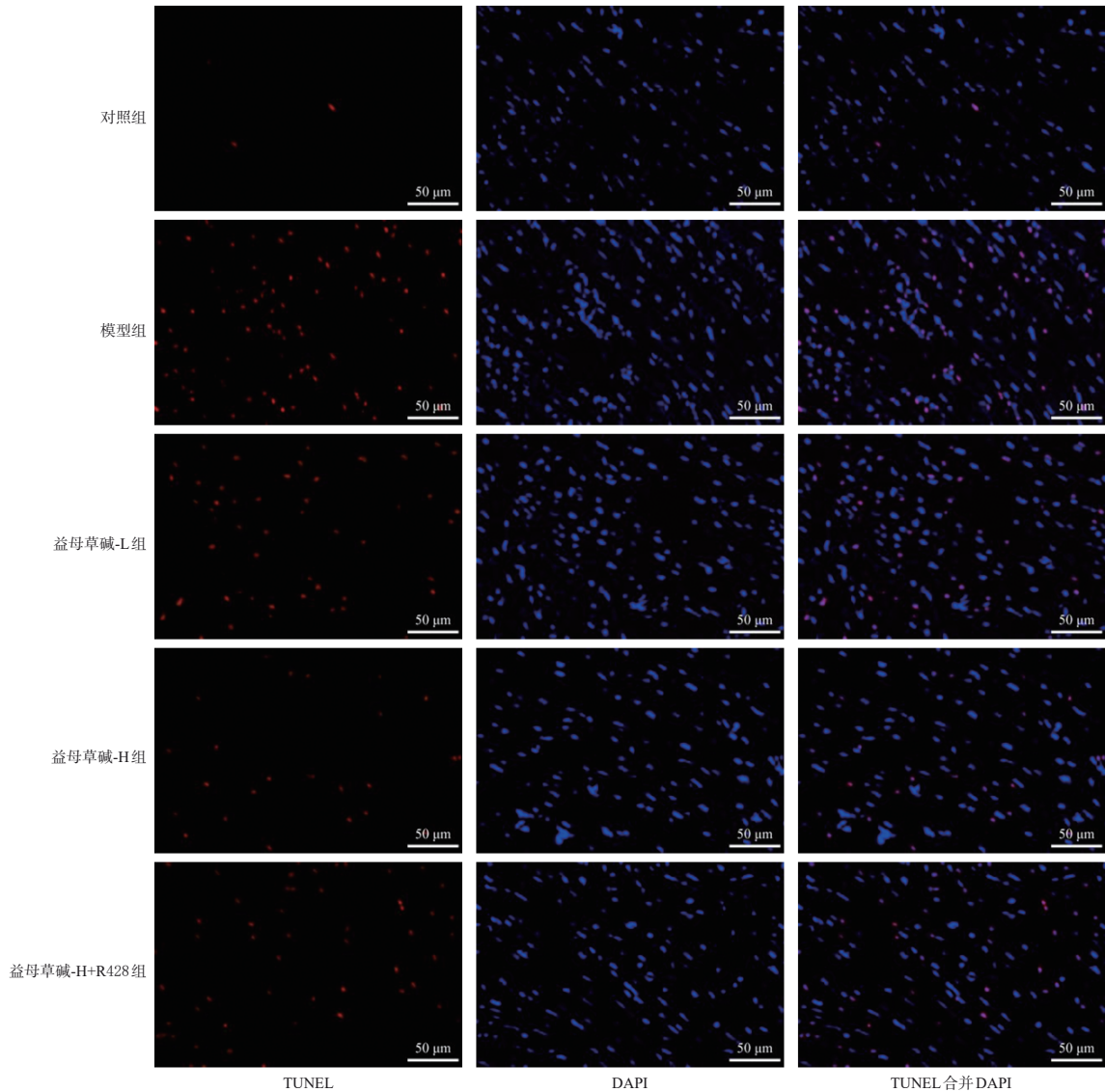


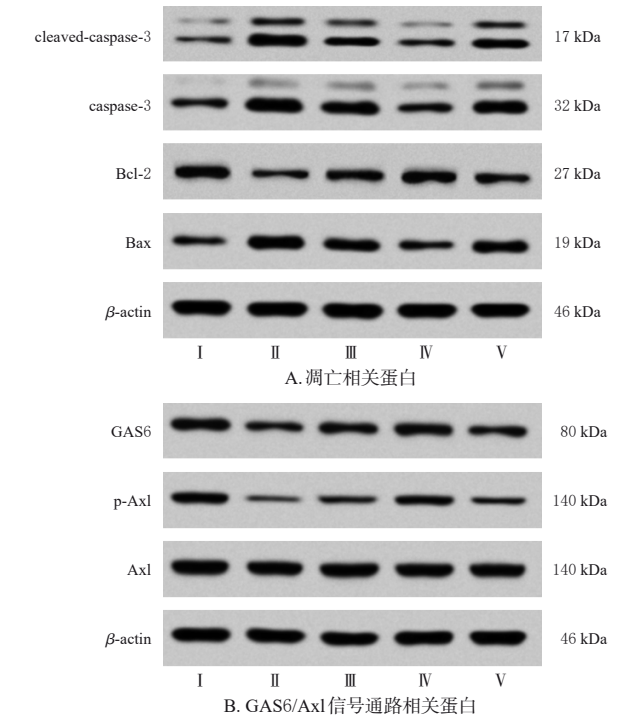
图2 各组大鼠心肌组织细胞凋亡观察显微图

3.5 大鼠心肌组织细胞凋亡率测定结果

模型组大鼠心肌组织细胞凋亡率[(34.69 ± 3.56)%]较对照组[(1.53 ± 0.19)%]显著升高($P < 0.05$);益母草碱-L组、益母草碱-H组大鼠心肌组织细胞凋亡率[分别为(21.25 ± 2.34)%、(9.44 ± 9.87)%]均较模型组显著降低($P < 0.05$),且益母草碱-H组大鼠上述指标变化较益母草碱-L组更明显($P < 0.05$);益母草碱-H+R428组大鼠心肌组织细胞凋亡率[(18.67 ± 1.93)%]较益母草碱-H组显著升高($P < 0.05$)。结果见图2。

3.6 大鼠心肌组织中凋亡及 GAS6/Axl 信号通路相关蛋白表达测定结果

模型组大鼠心肌组织中 cleaved-caspase-3/caspase-3 比值较对照组显著升高 ($P<0.05$), Bcl-2/Bax、p-Axl/Axl 比值及 GAS6 蛋白相对表达量均较对照组显著降低 ($P<0.05$); 益母草碱各剂量组大鼠心肌组织中 cleaved-caspase-3/caspase-3 比值均较模型组显著降低 ($P<0.05$), Bcl-2/Bax、p-Axl/Axl 比值及 GAS6 蛋白相对表达量均较模型组显著升高 ($P<0.05$), 且益母草碱-H 组大鼠上述指标变化均较益母草碱-L 组更明显 ($P<0.05$); 益母草碱-H+R428 组大鼠心肌组织中 cleaved-caspase-3/caspase-3 比值较益母草碱-H 组显著升高 ($P<0.05$), Bcl-2/Bax、p-Axl/Axl 比值及 GAS6 蛋白相对表达量均较益母草碱-H 组显著降低 ($P<0.05$)。结果见图 3、表 4。



I : 对照组; II : 模型组; III : 益母草碱-L 组; IV : 益母草碱-H 组; V : 益母草碱-H+R428 组。

图3 各组大鼠心肌组织中凋亡及 GAS6/Axl 信号通路相关蛋白表达的电泳图

表4 各组大鼠心肌组织中凋亡及 GAS6/Axl 信号通路相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	cleaved-caspase-3/caspase-3	Bcl-2/Bax	GAS6/ β -actin	p-Axl/Axl
对照组	0.37 $\pm$ 0.04	2.93 $\pm$ 0.30	1.08 $\pm$ 0.09	0.79 $\pm$ 0.08
模型组	1.10 $\pm$ 0.12 ^a	0.30 $\pm$ 0.04 ^a	0.40 $\pm$ 0.04 ^a	0.26 $\pm$ 0.03 ^a
益母草碱-L 组	0.87 $\pm$ 0.09 ^b	0.84 $\pm$ 0.09 ^b	0.61 $\pm$ 0.07 ^b	0.47 $\pm$ 0.05 ^b
益母草碱-H 组	0.63 $\pm$ 0.07 ^{bc}	2.25 $\pm$ 0.23 ^{bc}	0.83 $\pm$ 0.09 ^{bc}	0.71 $\pm$ 0.08 ^{bc}
益母草碱-H+R428 组	1.08 $\pm$ 0.11 ^d	0.95 $\pm$ 0.10 ^d	0.65 $\pm$ 0.07 ^d	0.51 $\pm$ 0.06 ^d

a: 与对照组相比, $P<0.05$; b: 与模型组相比, $P<0.05$; c: 与益母草碱-L 组相比, $P<0.05$; d: 与益母草碱-H 组相比, $P<0.05$ 。

4 讨论

冠心病是引发心血管相关死亡的主要因素, 其主要是由于血脂沉积造成冠状动脉狭窄阻塞, 促使心肌缺血

缺氧, 造成组织坏死, 同时大量巨噬细胞浸润, 释放炎症因子, 引发应激反应, 加剧心肌缺血缺氧性损伤^[8]。寻求冠心病的特效治疗药物至关重要。中药益母草前期主要应用于治疗痛经、恶露、更年期综合征、阴道异常出血等妇科相关疾病, 后期证实其在治疗心肌梗死、缺血性脑卒中、动脉粥样硬化等相关心脑血管疾病中发挥降血脂、溶栓、保护心血管等多种作用, 而提取自益母草的主要活性生物碱益母草碱在其中发挥至关重要的作用^[9]。已有研究显示, 益母草碱可通过减少梗死相关酶的释放、心肌细胞的凋亡, 缩小梗死面积, 改善心功能, 对心肌缺血再灌注损伤具有改善作用^[10]; 同时, 益母草碱还可抑制心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡, 改善心功能^[11]。LVEF、LVFS、Em/Am 是检测心功能的常用指标, 可以直观反映心功能情况, 而心肌损伤标志物 CK-MB、cTn I、Mb 水平可以反映心肌损伤程度。本研究中, 冠心病大鼠的 LVEF、LVFS、Em/Am 水平降低, CK-MB、cTn I、Mb 水平升高, 心肌组织发生损伤; 而益母草碱给药后可升高冠心病大鼠的 LVEF、LVFS、Em/Am 水平, 降低其血清中心肌损伤标志物 CK-MB、cTn I、Mb 水平。这说明益母草碱可改善心功能, 减轻心肌损伤, 对冠心病大鼠具有心肌保护作用。

冠心病的发生发展受多种因素影响, 其中炎症及细胞凋亡均与冠心病心肌损伤息息相关; 当心肌组织受到缺血缺氧刺激时, 心肌组织发生坏死, 炎症细胞浸润加剧, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症因子大量释放, 进而促使细胞线粒体发生损伤, 释放大量细胞色素 C, 促进促凋亡蛋白 Bax 表达, 然后激活并活化 caspase-3, 促进细胞凋亡, 加剧心肌损伤^[12-13]。抗凋亡蛋白 Bcl-2 与促凋亡蛋白 Bax 两者相互拮抗, 共同调控细胞凋亡, Bcl-2/Bax 比值可以反映细胞内凋亡与抗凋亡的平衡状态; cleaved-caspase-3 作为 caspase-3 的活化形式, 是执行细胞凋亡的关键蛋白, cleaved-caspase-3/caspase-3 比值可以反映细胞凋亡程度。已有研究显示, 降低炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平可缓解内皮组织炎症反应, 减少血管内皮活性物质表达, 从而缓解内皮细胞损伤, 减少心肌细胞凋亡, 减轻心肌组织损伤, 改善冠心病患者病情^[14]。抑制 TNF- α 、IL-6 水平, 下调 caspase-3、Bax 表达, 可抑制炎症反应, 减少心肌细胞凋亡, 减轻冠心病大鼠心肌损伤^[15]。本研究结果显示, 益母草碱可降低冠心病大鼠炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平, 降低 cleaved-caspase-3/caspase-3、Bcl-2/Bax 比值, 抑制炎症反应, 减少心肌细胞凋亡, 进而减轻心肌损伤。

GAS6/Axl 信号通路参与调控多种生理病理进程, 包括心肌保护, 并在其中发挥关键作用。其中, 维生素 K 依赖性蛋白家族成员 GAS6 参与动脉粥样硬化及冠状动脉炎性损伤的发生发展, 当机体受到刺激时, GAS6 可被激活, 使其结合并磷酸化激活细胞膜表面的 Axl, 进而激活下游多条效应通路, 抑制炎症发生及细胞凋亡等,

从而抑制心肌损伤^[16]。已有研究显示,激活 GAS6/Axl-含 NOD 样受体家族 pyrin 结构域蛋白 3 信号通路,可抑制炎症反应,减少心肌细胞凋亡,改善脓毒症小鼠心功能^[17]。另外,激活 GAS6/Axl-AMPK 信号通路可抑制炎症反应与细胞凋亡,改善心功能和脓毒症心肌损伤^[18]。本研究结果显示,益母草碱可上调冠心病大鼠心肌组织中 GAS6 蛋白表达和升高 p-Axl/Axl 比值;而加入 GAS6/Axl 信号通路抑制剂 R428 后,其可逆转高剂量益母草碱对冠心病大鼠心肌损伤的改善作用,进一步证实了益母草碱可通过激活 GAS6/Axl 信号通路减轻冠心病大鼠心肌损伤。

综上所述,益母草碱可减轻冠心病大鼠心肌损伤,其作用机制可能与激活 GAS6/Axl 信号通路相关,但其具体作用机制还需多方实验加以论证。

参考文献

- [1] MENOTTI A, PUDDU P E, KROMHOUT D, et al. Coronary heart disease mortality trends during 50 years as explained by risk factor changes: the European cohorts of the seven countries study[J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2020, 27(9):988-998.
- [2] MEI Y X, WU H, ZHANG H Y, et al. Health-related quality of life and its related factors in coronary heart disease patients: results from the Henan rural cohort study[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):5011.
- [3] SHEN S Y, WU G J, LUO W, et al. Leonurine attenuates angiotensin II-induced cardiac injury and dysfunction via inhibiting MAPK and NF- κ B pathway[J]. *Phytomedicine*, 2023, 108:154519.
- [4] LIANG Z X, YANG Y, WU X, et al. GAS6/Axl is associated with AMPK activation and attenuates H₂O₂-induced oxidative stress[J]. *Apoptosis*, 2023, 28(3/4):485-497.
- [5] 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.
- [6] LI Z Y, CHEN K Y, ZHU Y Z. Leonurine inhibits cardiomyocyte pyroptosis to attenuate cardiac fibrosis via the TGF- β /Smad2 signalling pathway[J]. *PLoS One*, 2022, 17(11):e0275258.
- [7] HIRSCHI K M, TSAI K Y F, DAVIS T, et al. Growth arrest-specific protein-6/Axl signaling induces preeclampsia in rats[J]. *Biol Reprod*, 2020, 102(1):199-210.
- [8] ELIGINI S, COSENTINO N, FIORELLI S, et al. Biological profile of monocyte-derived macrophages in coronary heart disease patients: implications for plaque morphology [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):8680.
- [9] LI Y Y, LIN Y K, LIU X H, et al. Leonurine: from gynecologic medicine to pleiotropic agent[J]. *Chin J Integr Med*, 2020, 26(2):152-160.
- [10] LU H P, GONG J R, ZHANG T T, et al. Leonurine pretreatment protects the heart from myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Exp Biol Med*, 2023, 248(18):1566-1578.
- [11] 王天光,陈泽伦,赵朝阳,等. 益母草碱抑制 ERK/NF- κ B 信号通路对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2023, 21(12):2176-2180.
WANG T G, CHEN Z L, ZHAO C Y, et al. Effect of leonurine on cardiomyocyte apoptosis in rats with heart failure by inhibiting ERK/NF- κ B signaling pathway[J]. *Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis*, 2023, 21(12):2176-2180.
- [12] 张文强,文亮,李慧,等. 儿茶素经 PI3K-Akt-eNOS 信号通路对冠心病大鼠心肌损伤及抗炎作用分析[J]. *现代生物医学进展*, 2023, 23(9):1619-1623.
ZHANG W Q, WEN L, LI H, et al. Analysis of myocardial injury and anti-inflammatory effect of catechin in coronary heart disease rats through PI3K-Akt-eNOS signaling pathway[J]. *Prog Mod Biomed*, 2023, 23(9):1619-1623.
- [13] SONG X D, FENG J P, YANG R X. Alamandine protects rat from myocardial ischemia-reperfusion injury by activating JNK and inhibiting NF- κ B[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(15):6718-6726.
- [14] 熊纭辉,王娟,邓海华. MiR-362-3p 通过 MAPK1/PTEN/AKT 信号通路调节冠心病大鼠心肌细胞凋亡和内皮细胞损伤[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2023, 21(14):2582-2586.
XIONG Y H, WANG J, DENG H H. MiR-362-3p regulates cardiomyocyte apoptosis and endothelial cell injury in rats with coronary heart disease through MAPK1/PTEN/AKT signaling pathway[J]. *Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis*, 2023, 21(14):2582-2586.
- [15] 谭子富,李家权,于颖,等. 基于 AKT/FOXO1 信号通路探讨豨莶草提取物对冠心病大鼠心肌损伤的保护作用[J]. *中医药导报*, 2023, 29(7):35-40.
TAN Z F, LI J Q, YU Y, et al. Investigating the protective effect of Herba Siegesbeckiae extract on myocardial injury in rats with coronary heart disease based on the AKT/FOXO1 signaling pathway[J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm*, 2023, 29(7):35-40.
- [16] LU C X, SONG Y B, WU X P, et al. Pleiotropic role of GAS6 in cardioprotection against ischemia-reperfusion injury[J]. *J Adv Res*, 2024;S2090-S1232(24)00163-2.
- [17] JI T, LIU Q, YU L M, et al. GAS6 attenuates sepsis-induced cardiac dysfunction through NLRP3 inflammasome-dependent mechanism[J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 210:195-211.
- [18] LEI W R, XU X Z, LI N, et al. Isopropyl 3-(3,4-dihydroxyphenyl) 2-hydroxypropanoate protects septic myocardial injury via regulating GAS6/Axl-AMPK signaling pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2024, 221:116035.

(收稿日期:2024-07-05 修回日期:2024-11-06)

(编辑:林 静)