

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.12.004

桃叶珊瑚昔对冠心病大鼠 Nrf2 介导的铁死亡途径的影响 *

寇进¹ 曾宪飞² 原平利¹ 任锋¹ 王颖¹ 夏鸣扬¹ 胡建库^{1△}

(1 武警陕西总队医院心内科 陕西 西安 710054; 2 西安区域医学检验中心有限公司 陕西 西安 710016)

摘要 目的:探讨桃叶珊瑚昔(AU)对冠心病(CHD)大鼠的治疗作用及其对核因子红系2相关因子2(Nrf2)介导的铁死亡途径的影响。**方法:**将大鼠分为NC组、CHD组、L-AU组、M-AU组、H-AU组和ML385组,每组12只大鼠。NC组为正常饲料喂养的对照大鼠,其他组均为高脂饮食联合腹腔注射垂体后叶素诱导的CHD模型大鼠。NC组和CHD组大鼠灌胃0.3%羧甲基纤维素钠(CMC),L-AU组、M-AU组和H-AU组大鼠灌胃20、40和80 mg/kg/d的桃叶珊瑚昔,ML385组大鼠灌胃80 mg/kg/d的桃叶珊瑚昔并腹腔注射30 mg/kg/d Nrf2抑制剂ML385,共给药4周。分别检测各组大鼠的心功能指标[射血分数(EF)和短轴缩短率(FS)]、血清指标[肌酸激酶同工酶MB(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和游离脂肪酸(FFA)]、心肌组织氧化应激指标[还原型谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)]和心肌组织Fe²⁺含量。通过苏木素伊红(HE)染色观察大鼠心肌形态。通过Western blot检测大鼠心肌组织中Nrf2、Kelch样ECH相关蛋白1(Keap1)、血红素加氧酶-1(HO-1)、NADPH:醌氧化还原酶-1(NQO-1)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)、铁蛋白重链1(FTH1)和膜铁转运蛋白1(FPN1)的蛋白水平。**结果:**与NC组比较,CHD组大鼠的EF和FS水平降低,CK-MB和LDH水平升高,心肌出现明显损伤;TC、TG、LDL-C、FFA和MDA水平升高,HDL-C和GSH水平降低;Nrf2、HO-1、NQO-1、GPX4、FTH1和FPN1蛋白水平降低,Keap1蛋白水平升高,Fe²⁺含量升高($P<0.05$)。与CHD组比较,L-AU组、M-AU组和H-AU组大鼠的EF和FS升高,CK-MB和LDH水平降低,心肌形态明显改善;TC、TG、LDL-C、FFA和MDA水平降低,HDL-C和GSH水平升高;Nrf2、HO-1、NQO-1、GPX4、FTH1和FPN1蛋白水平升高,Keap1蛋白水平降低,Fe²⁺含量降低($P<0.05$)。与H-AU组比较,ML385组大鼠的EF和FS降低,CK-MB和LDH水平升高,心肌损伤加重,TC、TG、LDL-C、FFA和MDA水平升高,HDL-C和GSH水平降低;Nrf2、HO-1、NQO-1、GPX4、FTH1和FPN1蛋白水平降低,Keap1蛋白水平升高,Fe²⁺含量升高($P<0.05$)。**结论:**桃叶珊瑚昔表现出了良好的抗冠心病作用,其机制与抑制Nrf2介导的铁死亡途径有关。

关键词:桃叶珊瑚昔;冠心病;氧化应激;核因子红系2相关因子2;铁死亡

中图分类号:R-33; R541.4 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2024)12-2220-08

Effects of Aucubin on Nrf2-mediated Ferroptosis Pathway in Rats with Coronary Heart Disease*

KOU Jin¹, ZENG Xian-fei², YUAN Ping-li¹, REN Feng¹, WANG Ying¹, XIA Ming-yang¹, HU Jian-ku^{1△}

(1 Department of Cardiology, Shaanxi Provincial Corps Hospital, Chinese People's Armed Police Force, Xi'an, Shaanxi, 710054, China;

2 Greater Xi'an Area Medical Diagnostic Lab Center, Xi'an, Shaanxi, 710016, China)

ABSTRACT Objective: To explore the therapeutic effect of aucubin (AU) on rats with coronary heart disease (CHD) and its effect on the ferroptosis pathway mediated by nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). **Methods:** Rats were divided into NC group, CHD group, L-AU group, M-AU group, H-AU group and ML385 group ($n=12$). The NC group was control rats fed with normal diet, and the other groups were rats with coronary heart disease induced by high-fat diet combined with intraperitoneal injection of pituitaryin. Rats in the NC group and CHD group were orally administered 0.3% sodium carboxymethylcellulose (CMC), and rats in the L-AU group, M-AU group, and H-AU group were orally administered 20, 40, and 80 mg/kg/d of aucubin. Rats in H-AU group were orally administered 80 mg/kg/d aucubin and intraperitoneally injected with 30 mg/kg/d Nrf2 inhibitor ML385. Administration was given for a total of 4 weeks. The cardiac function indexes [ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS)], serum indexes [creatinine kinase isoenzyme MB (CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH), total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and free fatty acids (FFA)], myocardial tissue oxidative stress indicators [glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA)] and Fe²⁺ content in myocardial tissue of rats in each group were measured respectively. Myocardial morphology was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The protein expression levels of Nrf2, Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), heme oxygenase-1 (HO-1), NADPH: quinone oxidoreductase-1 (NQO-1), glutathione peroxidase 4 (GPX4), ferritin heavy chain

* 基金项目:西安市科技计划 - 重大应用示范项目(22YYCJ-QCY3-0004)

作者简介:寇进(1985-),男,硕士研究生,主治医师,E-mail:koujin0423@126.com

△ 通讯作者:胡建库(1984-),男,硕士研究生,主治医师,E-mail:13720425342@163.com

(收稿日期:2023-12-24 接受日期:2024-01-20)

1 (FTH1) and membrane iron transporter 1 (FPN1) in myocardial tissue were detected by Western blot. **Results:** Compared with NC group, EF and FS decreased, CK-MB and LDH levels increased, myocardial injury appeared, TC, TG, LDL-C, FFA and MDA levels increased, HDL-C and GSH level decreased, Nrf2, HO-1, NQO-1, GPX4, FTH1 and FPN1 protein expression decreased, Keap1 protein expression increased, Fe²⁺ content increased in CHD group ($P<0.05$). Compared with CHD group, EF and FS increased, CK-MB and LDH levels decreased, myocardial morphology was significantly improved, TC, TG, LDL-C, FFA and MDA levels decreased, HDL-C and GSH level increased, Nrf2, HO-1, NQO-1, GPX4, FTH1 and FPN1 protein expression increased, Keap1 protein expression decreased and Fe²⁺ content decreased in L-AU group, M-AU group and H-AU group ($P<0.05$). Compared with H-AU group, EF and FS decreased, CK-MB and LDH increased, myocardial injury aggravated, TC, TG, LDL-C, FFA and MDA increased, HDL-C and GSH decreased, Nrf2, HO-1, NQO-1, GPX4, FTH1 and FPN1 protein expression decreased, Keap1 protein expression increased, Fe²⁺ content increased in ML385 group ($P<0.05$). **Conclusion:** Auucrin shows good anti-coronary heart disease effect, and its mechanism is related to inhibiting the Nrf2-mediated ferroptosis pathway.

Key words: Aucubin; Coronary heart disease; Oxidative stress; Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; Ferroptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R541.4 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2024)12-2220-08

前言

随着人口老龄化和人们生活方式的改变,冠心病(coronary heart disease, CHD)的发病率和死亡率也在逐年上升^[1]。动脉粥样硬化是冠心病的病理基础,其形成与炎症、脂质沉积、斑块形成和钙化有关。长期服用治疗冠心病的西药可能引起副作用,与西药相比,天然药物安全性高、副作用少,因此,具有治疗冠心病作用的天然药物可能更有助于防治冠心病。桃叶珊瑚昔(aucubin, AU)是一种从许多传统草药中提取的环烯醚萜苷,具有许多生物学活性,例如抗氧化、抗衰老、抗炎、抗菌、抗纤维化、抗癌、心脏保护、肝保护、神经保护和骨保护作用^[2-4]。研究表明,桃叶珊瑚昔具有心脏保护作用,可减轻心脏重构和纤维化,改善心功能^[5-7]。此外,桃叶珊瑚昔具有明显的降脂作用,可减少高脂血症发生^[8]。并且,桃叶珊瑚昔在高剂量条件下无明显毒副作用^[3]。这些报道提示桃叶珊瑚昔在治疗冠心病方面具有潜力。

目前,氧化应激和铁死亡在冠心病发病机制中的作用越来越受到学者的关注。在冠心病中,过量的活性氧(reactive oxygen species, ROS)会破坏抗氧化系统、激活炎症信号、引起线粒体依赖性细胞凋亡、破坏内皮细胞和平滑肌功能,从而加重冠心病。研究表明,抗氧化剂通过降低ROS产生和提高抗氧化酶活性有效降低了冠心病的发生风险^[9]。转录因子核因子红系2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)是一种调节抗氧化基因表达的主要正调控转录因子,Nrf2调节的下游抗氧化基因包括血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)等^[10-12]。激活Nrf2可提升机体抗炎和能力,并有助于治疗冠心病^[13]。铁死亡是一种铁依赖性、脂质过氧化驱动的细胞死亡级联反应,其在机制和表型上与其他细胞死亡过程不同,已成为预防心血管疾病的关键目标^[14]。铁死亡过程伴随游离铁的增加和脂质过氧化物的积累^[15]。大多数细胞内铁以三价铁(Fe³⁺)的形式储存。铁死亡过程中,二价铁(Fe²⁺)含量升高,通过与过氧化氢反应形成羟基自由基,羟基自由基又与多不饱和脂肪酸反应形成脂质过氧化物,从而使大量的游离铁成为铁死亡的关键引发剂^[16]。研究表明,

铁代谢失调与冠心病有关^[17,18]。另外,Nrf2在减轻脂质过氧化和铁死亡中发挥着关键作用^[14]。

据报道,桃叶珊瑚昔是Nrf2的激活剂^[19]。桃叶珊瑚昔通过Nrf2和AMPK信号通路抑制氧化应激和脂质积累^[8]。另外,桃叶珊瑚昔通过激活Nrf2减轻实验性创伤性脑损伤中的氧化应激和炎症^[20]。本研究推测桃叶珊瑚昔可能通过激活Nrf2介导的铁死亡途径防治冠心病。因此,本研究考察了桃叶珊瑚昔对冠心病大鼠的治疗作用,并分析了其对Nrf2介导的铁死亡途径的影响,从而揭示桃叶珊瑚昔的抗冠心病作用和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 90只SPF级SD大鼠(雄性,8周龄,300~350g)购自陕西医药控股集团生物制品有限公司【生产许可证号:SCXK(陕)2018-001】。大鼠在12 h/12 h光暗照明、(23±2)℃、55%±5%湿度的屏障环境中饲养。所有大鼠均预适应饲养1周,然后进行实验。

1.1.2 实验试剂 桃叶珊瑚昔(HY-N0664,纯度:99.49%)、Nrf2抑制剂ML385(HY-100523,纯度:99.96%)购自美国MCE公司;羧甲基纤维素钠(CMC,C8621)、亚铁离子含量检测试剂盒(BC5415)购自北京索莱宝科技有限公司。正常(D12450J)和高脂(D12492)饲料购自美国Research Diets公司;垂体后叶素注射液(国药准字H43021449)购自康普药业股份有限公司;苏木素伊红(HE)染液(C0105M)购自碧云天生物技术研究所;还原型谷胱甘肽(GSH)(A006-2-1)、游离脂肪酸(FFA)(A042-1-1)、丙二醛(MDA)(A003-1-2)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;Nrf2(ab62352)、Kelch样ECH相关蛋白1(Keap1)(ab227828)、HO-1(ab189491)、NAD(P)H:醌氧化还原酶-1(NQO-1)(ab80588)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)(ab125066)、铁蛋白重链1(FTH1)(ab183781)、膜铁转运蛋白1(FPN1)(ab235166)、Lamin B1(ab16048)、GAPDH(ab9485)、IgG HcL(HRP)(货号:ab205718)抗体购自英国Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 冠心病大鼠模型的建立 参考文献^[21]采用高脂饮食联

合腹腔注射垂体后叶素建立冠心病(CHD)大鼠模型。70只大鼠用于建模,大鼠用高脂饲料喂养8周,最后3 d腹腔注射垂体后叶素(30 U/kg/d)。随机处死3只大鼠进行病理学和心电图检查,观察冠脉内膜、脂质沉积、心肌形态,另外,心电图显示T波高耸、心律不齐、ST段抬高超过0.1 mV表示造模成功^[22]。62只大鼠建模成功,成功率88.57%,随机选择60只用于后续实验。

1.2.2 大鼠分组及药物处理 将CHD模型大鼠分为CHD组、L-AU组、M-AU组、H-AU组和ML385组(n=12),另取12只未做建模处理的健康大鼠作为NC组。NC组和CHD组大鼠给予灌胃2 mL的0.3%CMC,L-AU组、M-AU组、H-AU组大鼠给予灌胃2 mL的20、40和80 mg/kg/d的桃叶珊瑚苷(溶于0.3% CMC)^[8,20]。ML385组大鼠给予灌胃2 mL的80 mg/kg/d的桃叶珊瑚苷并腹腔注射30 mg/kg/d Nrf2抑制剂ML385^[23]。所有组大鼠均给药处理4周。

1.2.3 大鼠心功能参数测定 使用加拿大VisualSonics公司生产的VEVO 3100小动物超声成像系统评估各组大鼠的心功能参数:射血分数(EF)和短轴缩短率(FS)。

1.2.4 大鼠血清指标测定 采集各组大鼠腹主动脉血,离心取血清。采用日立7600-010型生化分析仪检测肌酸激酶同工酶MB(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平。按照检测试剂盒说明检测血清中FFA水平。

1.2.5 大鼠心肌组织学观察 无菌分离大鼠心脏,清水冲洗,制作4 μm厚的石蜡切片,通过HE染色观察心肌组织形态。

1.2.6 大鼠心肌组织氧化应激指标检测 分离心肌制备组织匀浆,离心取上清,MDA含量采用硫代巴比妥酸法检测,GSH活性采用微板法检测。

1.2.7 大鼠心肌组织 Fe²⁺含量测量 取大鼠心肌组织匀浆液上清,按照亚铁离子含量检测试剂盒说明通过微量法检测大鼠心肌组织中Fe²⁺含量。

1.2.8 Western blot 检测大鼠心肌组织相关蛋白水平 使用RIPA提取心肌总蛋白,然后经过10% SDS-PAGE电泳并转移到PVDF膜。5%脱脂牛奶封闭1 h,将膜与Nrf2(1:2000)、Keap1(1:2000)、HO-1(1:1000)、NQO-1(1:1000)、GPX4(1:1000)、FTH1(1:500)、FPN1(1:500)、Lamin B1(1:1000,核蛋白内参)、GAPDH(1:1000,总蛋白内参)一抗4℃过夜孵育,然后与二抗(1:1000)37℃孵育1 h。ECL显影,ImageJ软件分析条带灰度值。

1.3 统计学分析

使用SPSS 22.0软件分析数据,组间差异比较采用单因素方差分析、LSD检验,P<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 桃叶珊瑚苷对冠心病大鼠心功能的影响

与NC组比较,CHD组大鼠的EF和FS降低(P<0.05)。与CHD组比较,L-AU组、M-AU组和H-AU组大鼠的EF和FS呈桃叶珊瑚苷剂量依赖性升高(P<0.05)。与H-AU组比较,ML385组大鼠的EF和FS降低(P<0.05)。见表1。

表1 大鼠的EF和FS
Table 1 EF and FS of rats

Groups	EF (%)	FS (%)
NC	78.25± 4.43	50.43± 3.63
CHD	40.81± 4.31 ^a	23.92± 3.50 ^a
L-AU	58.07± 6.58 ^{ab}	33.32± 1.96 ^{ab}
M-AU	63.56± 5.26 ^{abc}	40.61± 4.35 ^{abc}
H-AU	72.40± 7.80 ^{abcd}	45.74± 3.86 ^{abcd}
ML385	51.25± 6.56 ^{abcde}	30.38± 2.33 ^{abcde}
F value	63.859	104.419
P value	<0.001	<0.001

Note: Compared with NC group, ^aP<0.05; Compared with CHD group, ^bP<0.05; Compared with L-AU group, ^cP<0.05;
Compared with M-AU group, ^dP<0.05; Compared with H-AU group, ^eP<0.05.

2.2 桃叶珊瑚苷对冠心病大鼠血清心肌损伤标志物的影响

与NC组比较,CHD组CK-MB和LDH水平升高(P<0.05)。与CHD组比较,L-AU组、M-AU组和H-AU组CK-MB和LDH水平降低(P<0.05)。与H-AU组比较,ML385组CK-MB和LDH水平升高(P<0.05)。见表2。

2.3 桃叶珊瑚苷对冠心病大鼠心肌组织病变的影响

大鼠心肌组织HE染色显示,NC组大鼠心肌组织结构清晰,心肌细胞排列规则。CHD组大鼠心肌细胞排列紊乱,心肌细胞肥大,血管充血扩张,并伴有大量炎性细胞浸润。与CHD

组比较,L-AU组、M-AU组和H-AU组大鼠心肌形态明显改善。然而,与H-AU组比较,ML385组大鼠的心肌组织损伤加重。见图1。

2.4 桃叶珊瑚苷对冠心病大鼠血清脂代谢指标的影响

与NC组比较,CHD组TC、TG、LDL-C和FFA水平升高,HDL-C水平降低(P<0.05)。与CHD组比较,L-AU组、M-AU组和H-AU组TC、TG、LDL-C和FFA水平降低,HDL-C水平升高(P<0.05)。与H-AU组比较,ML385组TC、TG、LDL-C和FFA水平升高,HDL-C水平降低(P<0.05)。见表3。

表 2 大鼠的血清 CK-MB 和 LDH 水平
Table 2 Serum CK-MB and LDH levels of rats

Groups	CK-MB (U/mL)	LDH (U/mL)
NC	0.48± 0.04	1.59± 0.08
CHD	1.69± 0.16 ^a	3.38± 0.36 ^a
L-AU	1.35± 0.12 ^{ab}	2.35± 0.28 ^{ab}
M-AU	1.00± 0.11 ^{abc}	2.02± 0.15 ^{abc}
H-AU	0.70± 0.05 ^{abcd}	1.88± 0.15 ^{abcd}
ML385	1.45± 0.12 ^{abcde}	2.58± 0.35 ^{abcde}
F value	220.306	75.093
P value	<0.001	<0.001

Note: Compared with NC group, ^aP<0.05; Compared with CHD group, ^bP<0.05; Compared with L-AU group, ^cP<0.05;
Compared with M-AU group, ^dP<0.05; Compared with H-AU group, ^eP<0.05.

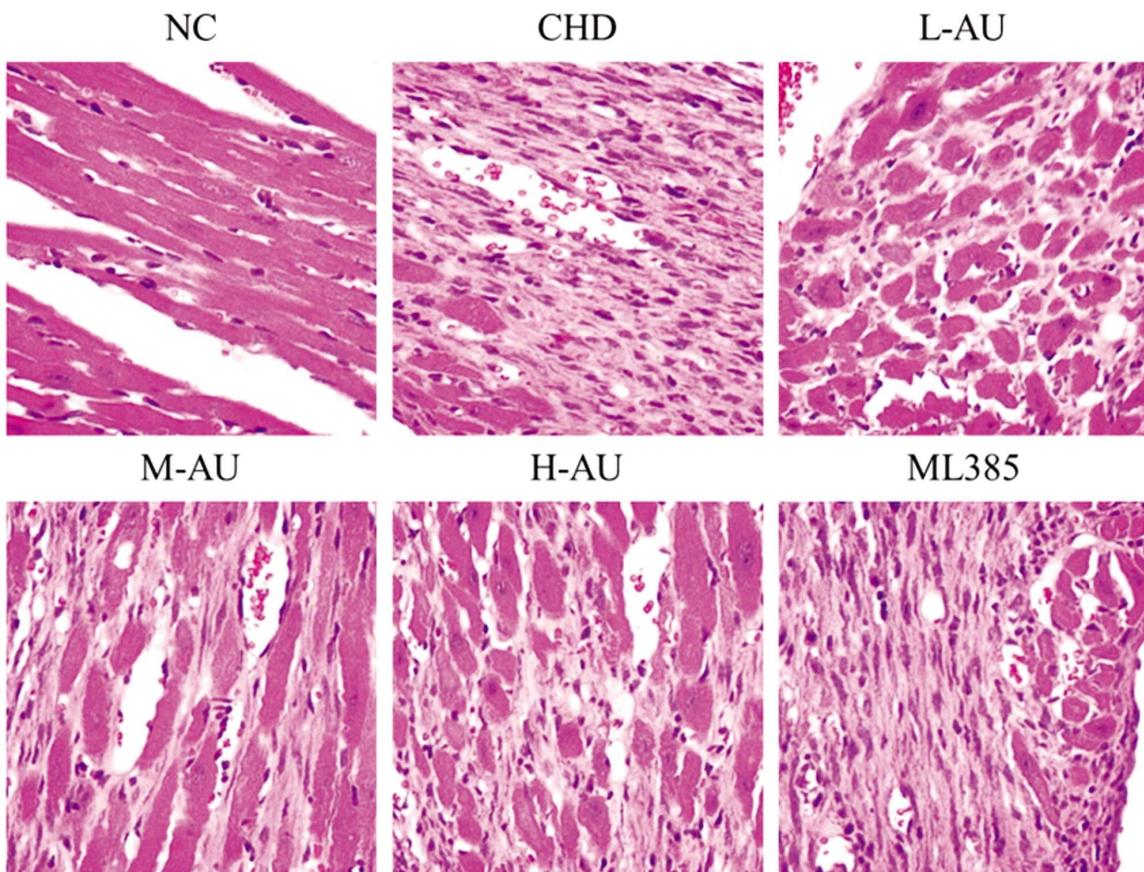


图 1 大鼠心肌组织 HE 染色 (× 200)

Fig.1 HE staining of myocardial tissue of rats (× 200)

2.5 桃叶珊瑚苷对冠心病大鼠心肌组织氧化应激指标的影响

与 NC 组比较, CHD 组 MDA 水平升高, GSH 水平降低 ($P<0.05$)。与 CHD 组比较, L-AU 组、M-AU 组和 H-AU 组 MDA 水平降低, GSH 水平升高 ($P<0.05$)。与 H-AU 组比较, ML385 组 MDA 水平升高, GSH 水平降低 ($P<0.05$)。见表 4。

2.6 桃叶珊瑚苷对冠心病大鼠心肌组织 Nrf2 途径的影响

各组大鼠的心肌组织 Nrf2 (核)、Keap1、HO-1 和 NQO-1 蛋白水平差异具有统计学意义 ($F=941.342, 519.622, 825.726, 1357.145, P<0.001$)。与 NC 组比较, CHD 组 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 蛋白水平降低, Keap1 蛋白水平升高

($P<0.05$)。与 CHD 组比较, L-AU 组、M-AU 组和 H-AU 组 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 蛋白水平升高, Keap1 蛋白水平降低 ($P<0.05$)。与 H-AU 组比较, ML385 组 Nrf2、HO-1 和 NQO-1 蛋白水平降低, Keap1 蛋白水平升高 ($P<0.05$)。见图 2。

2.7 桃叶珊瑚苷对冠心病大鼠心肌组织 Fe²⁺ 含量的影响

NC 组、CHD 组、L-AU 组、M-AU 组、H-AU 组、ML385 组大鼠的心肌组织 Fe²⁺ 含量分别为 $169.16 \pm 14.98, 383.31 \pm 22.19, 302.75 \pm 33.73, 263.51 \pm 15.09, 221.43 \pm 22.74, 327.14 \pm 28.79 \mu\text{mol}/\text{mg prot}$, 组间比较差异显著 ($F=123.377, P<0.001$)。与 NC 组比较, CHD 组 Fe²⁺ 含量升高 ($P<0.05$)。与 CHD 组比

较,L-AU组、M-AU组和H-AU组 Fe^{2+} 含量呈桃叶珊瑚苷剂量依赖性降低($P<0.05$)。与H-AU组比较,ML385组的心肌组织

表3 大鼠的血清TC、TG、LDL-C、HDL-C和FFA水平
Table 3 Serum TC, TG, LDL-C, HDL-C and FFA levels of rats

Groups	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	FFA ($\mu\text{mol}/\text{L}$)
NC	1.52± 0.13	0.51± 0.05	0.36± 0.04	0.79± 0.11	316.45± 44.38
CHD	5.37± 0.31 ^a	1.45± 0.14 ^a	1.78± 0.15 ^a	0.30± 0.03 ^a	626.59± 76.98 ^a
L-AU	3.53± 0.40 ^{ab}	1.21± 0.13 ^{ab}	1.20± 0.11 ^{ab}	0.45± 0.05 ^{ab}	520.21± 67.09 ^{ab}
M-AU	2.53± 0.22 ^{abc}	0.90± 0.06 ^{abc}	0.85± 0.06 ^{abc}	0.57± 0.04 ^{abc}	462.73± 41.21 ^{abc}
H-AU	1.78± 0.10 ^{abcd}	0.69± 0.08 ^{abcd}	0.60± 0.03 ^{abcd}	0.75± 0.07 ^{abcd}	366.16± 34.51 ^{abcd}
ML385	3.75± 0.44 ^{abde}	1.37± 0.15 ^{abde}	1.34± 0.17 ^{abde}	0.40± 0.03 ^{abde}	585.08± 65.59 ^{abde}
F value	281.238	149.703	117.360	288.969	54.513
P value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compared with NC group, ^a $P<0.05$; Compared with CHD group, ^b $P<0.05$; Compared with L-AU group, ^c $P<0.05$; Compared with M-AU group, ^d $P<0.05$; Compared with H-AU group, ^e $P<0.05$.

表4 大鼠的心肌组织MDA和GSH水平
Table 4 MDA and GSH levels in myocardial tissue of rats

Groups	MDA (nmol/mg prot)	GSH (nmol/mg prot)
NC	15.09± 1.37	39.66± 2.04
CHD	40.49± 3.93 ^a	15.34± 0.85 ^a
L-AU	30.31± 1.84 ^{ab}	23.35± 1.39 ^{ab}
M-AU	23.04± 1.47 ^{abc}	29.82± 2.15 ^{abc}
H-AU	17.54± 0.82 ^{abcd}	34.79± 3.28 ^{abcd}
ML385	33.17± 3.08 ^{abde}	20.49± 1.91 ^{abde}
F value	207.884	234.329
P value	<0.001	<0.001

Note: Compared with NC group, ^a $P<0.05$; Compared with CHD group, ^b $P<0.05$; Compared with L-AU group, ^c $P<0.05$; Compared with M-AU group, ^d $P<0.05$; Compared with H-AU group, ^e $P<0.05$.

2.8 桃叶珊瑚苷对冠心病大鼠心肌组织铁死亡途径的影响

各组大鼠的心肌组GPX4、FTH1和FPN1蛋白水平差异显著($F=1020.122, 1615.456, 2053.709, P<0.001$)。与NC组比较,CHD组GPX4、FTH1和FPN1蛋白水平降低($P<0.05$)。与CHD组比较,L-AU组、M-AU组和H-AU组GPX4、FTH1和FPN1蛋白水平呈桃叶珊瑚苷剂量依赖性升高($P<0.05$)。与H-AU组比较,ML385组GPX4、FTH1和FPN1蛋白水平降低($P<0.05$)。见图3。

3 讨论

桃叶珊瑚苷具有明显的心脏保护作用。研究表明,桃叶珊瑚苷可抑制转化生长因子- $\beta 1$ 诱导的心脏成纤维细胞的增殖和激活,并减少纤维化相关蛋白的表达^[5]。桃叶珊瑚苷还通过调节心肌梗死或压力超负荷诱导的小鼠心脏重构中神经元型一氧化氮合酶介导的信号通路来减轻心肌肥大、纤维化、氧化应激和炎症,并改善心功能^[6,7]。这些文献提示桃叶珊瑚苷可能在治疗冠心病方面具有潜力。本研究表明桃叶珊瑚苷(20、40和80 mg/kg/d)升高了冠心病大鼠的EF和FS,降低了血清

CK-MB和LDH水平,改善了心肌形态,从而有效缓解了冠心病。

此外,脂代谢异常与冠心病斑块形成有关,过量脂肪会引起DNA和细胞损伤^[24,25]。改善脂代谢是治疗冠心病的重要途径^[26]。据报道,桃叶珊瑚苷(10、20、40 mg/kg)可降低非酒精性脂肪肝(NAFLD)小鼠血液中TC、TG、LDL-C、极低密度脂蛋白(VLDL)水平,升高HDL-C水平,抑制高脂血症,并且促进了腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK α)的磷酸化^[8]。本研究也观察到桃叶珊瑚苷部分减少了冠心病大鼠的血清脂代谢指标异常。

细胞具有清除ROS和减轻氧化应激的机制。许多内源性抗氧化系统在基因表达水平上受转录因子Nrf2。在正常生理条件下,Keap1与Nrf2结合并增强Nrf2降解。在促氧化剂存在的条件下,Nrf2移位到细胞核,与抗氧化基因启动子中的抗氧化反应元件(ARE)结合,从而诱导抗氧化和解毒酶以及下游蛋白如HO-1、NQO-1、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽S移换酶(GST)和SOD的表达^[10-12]。本研究中,桃叶珊瑚苷降低了冠心病大鼠的心肌组织MDA水平,升高了GSH水平,升高了Nrf2、HO-1和NQO-1蛋白水平,降低了Keap1蛋白水平。

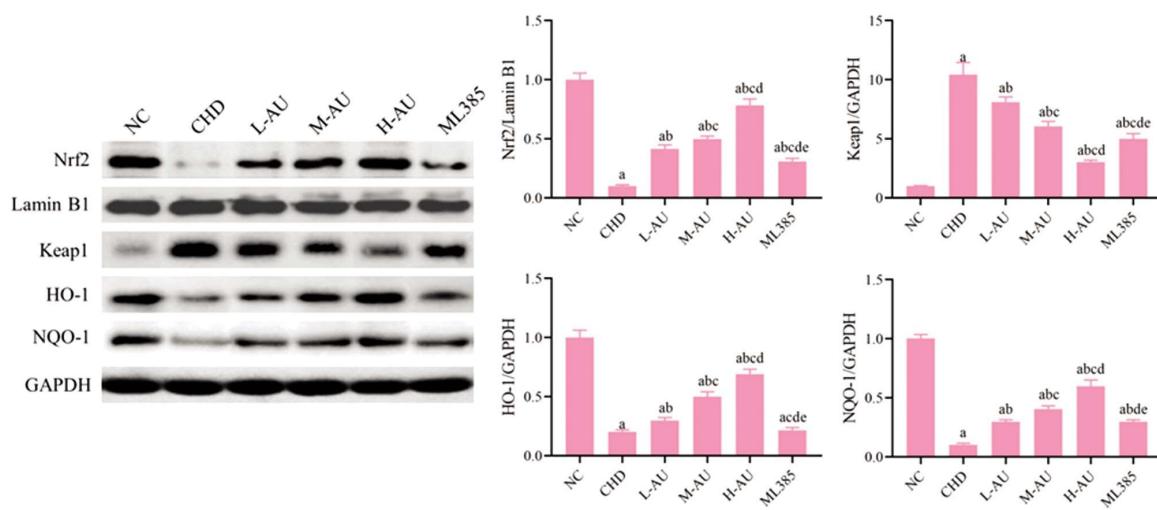


图 2 大鼠的心肌组织 Nrf2、Keap1、HO-1 和 NQO-1 蛋白水平

注:与 NC 组比较, ^a $P<0.05$;与 CHD 组比较, ^b $P<0.05$;与 L-AU 组比较, ^c $P<0.05$;与 M-AU 组比较, ^d $P<0.05$;与 H-AU 组比较, ^e $P<0.05$ 。

Fig.2 Expression levels of Nrf2, Keap1, HO-1 and NQO-1 proteins in myocardial tissue of rats

Note: Compared with NC group, ^a $P<0.05$; Compared with CHD group, ^b $P<0.05$; Compared with L-AU group, ^c $P<0.05$;
Compared with M-AU group, ^d $P<0.05$; Compared with H-AU group, ^e $P<0.05$.

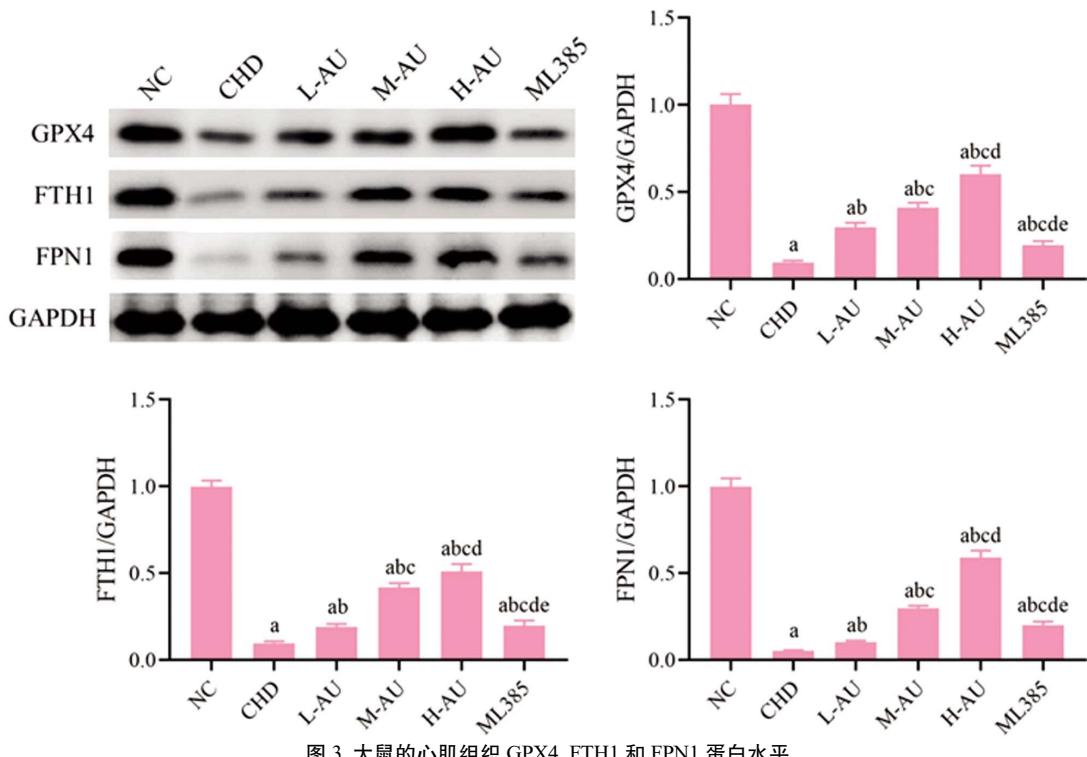


图 3 大鼠的心肌组织 GPX4、FTH1 和 FPN1 蛋白水平

注:与 NC 组比较, ^a $P<0.05$;与 CHD 组比较, ^b $P<0.05$;与 L-AU 组比较, ^c $P<0.05$;与 M-AU 组比较, ^d $P<0.05$;与 H-AU 组比较, ^e $P<0.05$ 。

Fig.3 GPX4, FTH1 and FPN1 protein expression levels in myocardial tissue of rats

Note: Compared with NC group, ^a $P<0.05$; Compared with CHD group, ^b $P<0.05$; Compared with L-AU group, ^c $P<0.05$;
Compared with M-AU group, ^d $P<0.05$; Compared with H-AU group, ^e $P<0.05$.

提示桃叶珊瑚苷通过激活 Nrf2 途径抑制了心肌组织氧化应激。其他文献报道, 桃叶珊瑚苷可升高 NAFLD 小鼠 SOD 活性, 降低 MDA 水平, 抑制氧化应激, 其机制与激活 Nrf2 介导的抗氧化基因表达有关^[8]。在 H₂O₂诱导的皮层神经元氧化损伤模型中, 桃叶珊瑚苷 (50、100 或 200 μg/mL) 处理 12 h 增强了 Nrf2 向细胞核的易位, 激活了抗氧化酶, 抑制了 ROS 的过度产生, 并减少了细胞凋亡; 在创伤性脑损伤(TBI)小鼠模型中, 桃叶珊瑚苷(20 或 40 mg/kg)显著减轻了脑水肿、组织学损伤, 并

改善了神经和认知缺陷, 敲除 Nrf2 减弱了桃叶珊瑚苷对 TBI 小鼠的抗氧化和神经保护作用^[20]。

铁是人体必需的金属, 也是制造血红蛋白和肌红蛋白的主要原料。此外, 铁对细胞的存活至关重要, 参与了广泛的生化和生理过程, 包括氧的储存和运输、线粒体的呼吸、DNA 的合成和修复以及细胞中的酶反应。然而, 过量的铁对身体有毒害作用。铁具有活跃的氧化还原能力, 使游离铁很容易接收和贡献电子。铁生物毒性最重要的机制是细胞内过量的二价铁(Fe²⁺)

参与Fenton或Haber-Weiss反应^[27]。Fe²⁺与氧或过氧化氢的相互作用催化产生大量的ROS,导致脂质过氧化和进一步的严重器官损伤,同时,Fe²⁺被氧化为三价铁(Fe³⁺)^[16]。研究表明,铁代谢失调与冠心病有关^[17,18]。本研究观察到冠心病大鼠心肌组织中Fe²⁺含量升高。然而,桃叶珊瑚苷降低了冠心病大鼠心肌组织Fe²⁺含量。严重的铁超载参与血管损伤,促进了动脉粥样硬化的发展^[28]。在一项研究中,敲除小鼠载脂蛋白E和铁转运蛋白基因导致非转铁蛋白结合铁增加,并导致慢性铁超载,随后增加了血管氧化应激水平,促进了动脉粥样硬化,相反,限制饮食中的铁摄入量或使用铁络合剂治疗可以抑制小鼠动脉粥样硬化的进展^[29]。这些研究结果提示,桃叶珊瑚苷可能通过降低Fe²⁺含量从而抑制冠心病进展。

研究表明,铁死亡与冠心病的进展有关,抑制铁死亡途径可有效减轻冠心病^[17,18]。Fe²⁺通过与过氧化氢反应形成羟基自由基,羟基自由基又与多不饱和脂肪酸反应形成脂质过氧化物,从而引发铁死亡途径^[16]。GPX4是铁死亡的主要负调节因子,也是铁死亡特异性标志物^[30]。GSH是一种抗氧化剂,GPX4通过催化GSH发挥抗氧化作用,GPX4的缺失可降低GSH水平和提高ROS水平,从而诱导铁死亡^[31]。铁稳态受到铁储存和运输相关蛋白调节。FTH1和FPN1分别调节铁的储存和输出^[32],这两种蛋白在心脏中含量丰富,是维持心脏铁稳态的重要蛋白^[18,33]。本研究观察到冠心病大鼠心肌组织中GPX4、FTH1和FPN1蛋白水平降低,而桃叶珊瑚苷升高了这些蛋白的表达,提示桃叶珊瑚苷抑制了铁死亡途径。

Nrf2靶标在介导铁/血红素代谢中发挥着关键作用^[34]。负责铁储存的FTH1以及负责铁流出细胞的FPN1均受Nrf2控制^[35,36]。此外,GPX4也是一个已确定的Nrf2转录靶标^[37,38],为了验证桃叶珊瑚苷是否通过激活Nrf2抑制铁死亡途径,本研究使用Nrf2抑制剂ML385和80 mg/kg/d的桃叶珊瑚苷同时处理冠心病大鼠,结果表明ML385部分抑制了桃叶珊瑚苷的抗冠心病作用,并且抑制了Nrf2的激活,诱导了铁死亡途径。这些结果充分说明桃叶珊瑚苷对冠心病的治疗机制与抑制Nrf2介导的铁死亡途径有关。

综上所述,本研究表明桃叶珊瑚苷表现出了良好的抗冠心病作用,其机制与抑制Nrf2介导的铁死亡途径有关。在现有的文献报道中,尚无文献显示桃叶珊瑚苷的毒副作用,即使是340 mg/kg口服3 d^[39]或20 mg/kg腹腔注射30 d^[40]均未显示毒副作用,表明桃叶珊瑚苷具有良好的安全性。因此,本研究认为桃叶珊瑚苷在治疗冠心病方面具有较高的开发价值。

参考文献(References)

- [1] Shaya GE, Leucker TM, Jones SR, et al. Coronary heart disease risk: Low-density lipoprotein and beyond [J]. Trends Cardiovasc Med, 2022, 32(4): 181-194.
- [2] Potočnjak I, Marinić J, Batić L, et al. Aucubin administered by either oral or parenteral route protects against cisplatin-induced acute kidney injury in mice[J]. Food Chem Toxicol, 2020, 142: 111472.
- [3] Kartini K, Irawan MA, Setiawan F, et al. Characteristics, Isolation Methods, and Biological Properties of Aucubin [J]. Molecules, 2023, 28(10): 4154.
- [4] Zeng X, Guo F, Ouyang D. A review of the pharmacology and toxicology of aucubin[J]. Fitoterapia, 2020, 140: 104443.
- [5] Xiao Y, Chang W, Wu QQ, et al. Aucubin protects against TGFβ1-induced cardiac fibroblasts activation by mediating the AMPKα/mTOR signaling pathway [J]. Planta Med, 2018, 84 (2): 91-99.
- [6] Wu QQ, Xiao Y, Duan MX, et al. Aucubin protects against pressure overload-induced cardiac remodelling via the β (3)-adrenoceptor-neuronal NOS cascades[J]. Br J Pharmacol, 2018, 175(9): 1548-1566.
- [7] Yang Z, Wu QQ, Xiao Y, et al. Aucubin protects against myocardial infarction-induced cardiac remodeling via nNOS/NO-regulated oxidative stress[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 4327901.
- [8] Shen B, Zhao C, Wang Y, et al. Aucubin inhibited lipid accumulation and oxidative stress via Nrf2/HO-1 and AMPK signalling pathways [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(6): 4063-4075.
- [9] Yang X, He T, Han S, et al. The role of traditional Chinese medicine in the regulation of oxidative stress in treating coronary heart disease[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 3231424.
- [10] Ding K, Wang H, Xu J, et al. Melatonin stimulates antioxidant enzymes and reduces oxidative stress in experimental traumatic brain injury: the Nrf2-ARE signaling pathway as a potential mechanism[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 73: 1-11.
- [11] Lv H, Liu Q, Zhou J, et al. Daphnetin-mediated Nrf2 antioxidant signaling pathways ameliorate tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)-induced mitochondrial dysfunction and cell death[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 106: 38-52.
- [12] Wang J, Fields J, Zhao C, et al. Role of Nrf2 in protection against intracerebral hemorrhage injury in mice [J]. Free Radic Biol Med, 2007, 43(3): 408-414.
- [13] Li Y, Zhang W. Effect of ginsenoside Rb2 on a myocardial cell model of coronary heart disease through Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Biol Pharm Bull, 2022, 45(1): 71-76.
- [14] Dodson M, Castro-Portuguez R, Zhang DD. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis [J]. Redox Biol, 2019, 23: 101107.
- [15] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. Cell, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [16] Galaris D, Barbouti A, Pantopoulos K. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2019, 1866(12): 118535.
- [17] Lakhal-Littleton S. Mechanisms of cardiac iron homeostasis and their importance to heart function [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 133: 234-237.
- [18] Lakhal-Littleton S, Wolna M, Carr CA, et al. Cardiac ferroportin regulates cellular iron homeostasis and is important for cardiac function[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(10): 3164-3169.
- [19] Moratilla-Rivera I, Sánchez M, Valdés-González JA, et al. Natural Products as Modulators of Nrf2 signaling pathway in neuroprotection [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(4): 3748.
- [20] Wang H, Zhou XM, Wu LY, et al. Aucubin alleviates oxidative stress and inflammation via Nrf2-mediated signaling activity in experimental traumatic brain injury [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 188.

- [21] 陈蕊肖, 王立新, 王庆海. 茜参还五胶囊对冠心病大鼠血脂水平的影响[J]. 河北中医, 2017, 39(12): 1857-1861.
- [22] 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.
- [23] 陈玄, 闫一敏, 魏璐璐. 巴曲酶对缺血性眩晕大鼠及其脑组织Nrf2/HO-1信号通路的影响 [J]. 现代药物与临床, 2021, 36(8): 1549-1555.
- [24] Miyake Y, Tanaka K, Okubo H, et al. Soy isoflavone intake and prevalence of depressive symptoms during pregnancy in Japan: baseline data from the Kyushu Okinawa Maternal and Child Health Study[J]. Eur J Nutr, 2018, 57(2): 441-450.
- [25] Bieghs V, Wouters K, van Gorp PJ, et al. Role of scavenger receptor A and CD36 in diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in hyperlipidemic mice[J]. Gastroenterology, 2010, 138(7): 2477-2486.e2471-2473.
- [26] 梁伟, 吴春芳, 杨晖, 等. 不同调脂方案对冠心病患者ICAM-1、VCAM-1 和 MCP-1 的影响[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2011, 31(2): 208-211, 215.
- [27] Wardman P, Candeias LP. Fenton chemistry: an introduction [J]. Radiat Res, 1996, 145(5): 523-531.
- [28] Li S, Zhang X. Iron in cardiovascular disease: challenges and potentials[J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 707138.
- [29] Vinchi F, Porto G, Simmelmäuer A, et al. Atherosclerosis is aggravated by iron overload and ameliorated by dietary and pharmacological iron restriction [J]. Eur Heart J, 2020, 41 (28): 2681-2695.
- [30] Liu W, Chakraborty B, Safi R, et al. Dysregulated cholesterol homeostasis results in resistance to ferroptosis increasing tumorigenicity and metastasis in cancer [J]. Nat Commun, 2021, 12 (1): 5103.
- [31] Yang WS, Stockwell BR. Ferroptosis: death by lipid peroxidation[J]. Trends Cell Biol, 2016, 26(3): 165-176.
- [32] Jiang T, Chu J, Chen H, et al. Gastrodin Inhibits H₂O₂-Induced Ferroptosis through Its Antioxidative Effect in Rat Glioma Cell Line C6[J]. Biol Pharm Bull, 2020, 43(3): 480-487.
- [33] Fang X, Cai Z, Wang H, et al. Loss of cardiac ferritin h facilitates cardiomyopathy via Slc7a11-mediated ferroptosis[J]. Circ Res, 2020, 127(4): 486-501.
- [34] Kerins MJ, Ooi A. The roles of NRF2 in modulating cellular iron homeostasis[J]. Antioxid Redox Signal, 2018, 29(17): 1756-1773.
- [35] Agyeman AS, Chaerkady R, Shaw PG, et al. Transcriptomic and proteomic profiling of KEAP1 disrupted and sulforaphane-treated human breast epithelial cells reveals common expression profiles[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 132(1): 175-187.
- [36] Harada N, Kanayama M, Maruyama A, et al. Nrf2 regulates ferroportin 1-mediated iron efflux and counteracts lipopolysaccharide-induced ferroportin 1 mRNA suppression in macrophages[J]. Arch Biochem Biophys, 2011, 508(1): 101-109.
- [37] Osburn WO, Wakabayashi N, Misra V, et al. Nrf2 regulates an adaptive response protecting against oxidative damage following diquat-mediated formation of superoxide anion [J]. Arch Biochem Biophys, 2006, 454(1): 7-15.
- [38] Salazar M, Rojo AI, Velasco D, et al. Glycogen synthase kinase-3beta inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2 [J]. J Biol Chem, 2006, 281(21): 14841-14851.
- [39] Chang IM. Liver-protective activities of aucubin derived from traditional oriental medicine[J]. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1998, 102(2): 189-204.
- [40] Qiu YL, Cheng XN, Bai F, et al. Aucubin protects against lipopolysaccharide-induced acute pulmonary injury through regulating Nrf2 and AMPK pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 192-199.