

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.01.005

金丝桃苷对主动脉弓缩窄所致的小鼠心肌肥厚的保护作用*

周海佳 王芳芳 白宝宝 刘鹏云 纪兆乐[△]

(空军军医大学唐都医院心血管内科 陕西 西安 710038)

摘要 目的: 研究金丝桃苷(hyperoside, HYP)对主动脉弓缩窄所致小鼠病理性心肌肥厚的保护作用及其机制。**方法:** 将32只C57BL/6J小鼠随机分为4组:假手术(Sham)组、单纯给药(HYP)组、主动脉弓缩窄(TAC)组及主动脉弓缩窄给药(TAC+HYP)组,每组8只。采用经典的主动脉弓缩窄术建立小鼠压力负荷型心肌肥厚模型。TAC术后4周,超声心动图仪检测心脏功能;左心室导管监测血流动力学指标;分离心脏、肺脏和胫骨计算心/体比、肺/体比和心/胫比,HE染色计算心肌细胞平均横截面积,Masson染色观察心肌纤维化程度,试剂盒检测心肌组织中SOD的活性和MDA的含量;DHE荧光探针检测心肌组织ROS生成量;Western blotting检测SIRT3、NOX4、Collagen-1和Collagen-3蛋白表达,实时定量PCR检测SIRT3、ANP、 α -MHC、 β -MHC的mRNA表达情况。**结果:** 与Sham组相比,TAC组小鼠的LVPWD值增加,LVSP和LVEDP值上升,LVEF、LVFS、E/A和 $\pm dp/dt_{max}$ 值均降低;HM/BW、LW/BW和HW/TL值升高,心肌细胞横截面积增加;心肌组织胶原沉积加重;肥厚基因ANP的mRNA表达水平显著上升, α -MHC/ β -MHC的比例倒置;心肌组织SOD活性降低,MDA和ROS生成量增加;SIRT3信号表达明显降低(均 $P<0.05$)。给予HYP药物处理后,TAC+HYP组小鼠的心脏功能、血流动力学改变、心肌细胞肥厚程度、心肌组织纤维化和氧化应激水平均明显改善,并且心肌细胞SIRT3信号表达也显著增强(均 $P<0.05$)。**结论:** HYP能够通过减轻心肌组织氧化应激损伤,抑制心肌纤维化进展,改善压力负荷引起的病理性心肌肥厚,且其作用机制可能与激活SIRT3信号有关。

关键词: 金丝桃苷;心肌肥厚;纤维化;氧化应激;SIRT3

中图分类号:R-33;R542.2;R284 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2021)01-27-07

The Protective Effects of Hyperoside on Cardiac Hypertrophy Induced by Transverse Aortic Constriction*

ZHOU Hai-jia, WANG Fang-fang, BAI Bao-bao, LIU Peng-yun, JI Zhao-le[△]

(Department of Cardiovascular Diseases, Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether hyperoside (HYP) treatment could ameliorate cardiac hypertrophy induced by transverse aortic constriction (TAC) and explore its protective mechanisms. **Methods:** Thirty-two C57BL/6 mice were randomly divided into four groups ($n=8$ in each group): Sham, HYP group, TAC group, and TAC+ HYP group. TAC surgery was adopted to establish the pressure overload-induced cardiac hypertrophy model. Four weeks after TAC surgery, the cardiac function was detected by ultrasonic cardiograph. The hemodynamics indexes were monitored by left ventricular catheter. The ratios of heart weight/body weight (HW/BW), lung weight/body weight (LW/BW) and heart weight/tibia length (HW/TL) were calculated. The mean cross-sectional area of cardiomyocytes was calculated by HE staining. The degree of myocardial fibrosis was observed by Masson staining. The contents of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in myocardium were estimated by special kits. The production of reactive oxygen species (ROS) was detected by DHE fluorescence probe. The protein expressions of SIRT3, NOX4, Collagen-1 and Collagen-3 were detected by western blotting. The expressions of SIRT3, ANP, α -MHC and β -MHC mRNA was detected by real-time PCR (RT-PCR). **Results:** Compared with the Sham group, the TAC group had increased LVPWD, LVSP and LVEDP, decreased LVEF, LVFS, E/A and $\pm dp/dt_{max}$. The ratio of HM/BW, LW/BW and HW/TL were also raised, accompanied by an increased cardiomyocyte cross-sectional area. Besides, collagen deposition was exacerbated, hypertrophy-related gene expression was increased and the ratio of α -MHC/ β -MHC was inverted in the TAC group. In addition, the TAC group had reduced SOD activity and promoted MDA and ROS production, along with an decreased the expression of SIRT3 signaling ($P<0.05$). After HYP treatment, the cardiac function, hemodynamic changes, cardiomyocyte hypertrophy, myocardial fibrosis and oxidative stress levels in TAC+HYP group were all significantly improved, and the expression of SIRT3 signaling was also markedly enhanced ($P<0.05$). **Conclusion:** THC treatment could effectively attenuate pressure overload-induced pathological cardiac hypertrophy through alleviating oxidative stress in myocardium and inhibiting the progression of myocardial fibrosis, which may be associated with the activation of SIRT3 signaling.

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81902523);空军军医大学唐都医院创新发展基金前沿探索项目(2019QYTS011)

作者简介:周海佳(1988-),男,硕士,研究方向:心肌损伤保护,电话:18700916773,E-mail:haijiazhouafmu@126.com

[△] 通讯作者:纪兆乐(1988-),男,硕士,研究方向:心肌损伤保护,电话:15829269379,E-mail:lejizhaoafmu@126.com

(收稿日期:2020-06-05 接受日期:2020-06-30)

Key words: Hyperoside; Cardiac hypertrophy; Fibrosis; Oxidative stress; SIRT3

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R542.2; R284 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)01-27-07

前言

众所周知,心肌肥大是心肌质量的异常增加,在于心肌细胞形状和体积发生了特征性改变^[1,2]。大量研究表明,心肌肥大和心室重构是在心肌梗死,压力或容量超负荷(主动脉狭窄,高血压、瓣膜返流),炎性心肌病(心肌炎)或特发性扩张型心肌病中发生的适应性反应^[3,4]。然而,长期慢性刺激会导致病理性心肌肥厚的发生,随着病情的进展,心肌能量需求增加,当血液供应不能满足日益增长的需求时,病理性心肌肥厚会逐渐诱导心肌间质纤维化,心肌细胞死亡,并最终导致明显的心脏功能障碍^[5,6]。因此,对心肌肥厚的病理机制和有效治疗药物的研究具有重要的理论和临床意义。

金丝桃苷(hyperoside, HYP)是一种从草本植物金丝桃中提取的黄酮醇苷类物质,具有抗氧化、抗炎、抗抑郁、抗肿瘤和自由基清除等多重药理学作用^[7,8]。近年来,金丝桃苷在高糖及烫伤所致心肌损伤^[9,10]、心肌缺血再灌注损伤^[11,12]和心力衰竭^[13]等多种心血管疾病中均表现出了积极的作用。但是金丝桃苷能否减轻压力负荷引起的心肌肥厚尚未见相关报道,本研究旨在通过主动脉弓缩窄法建立小鼠心肌肥厚动物模型,以观察金丝桃苷能否减轻压力负荷引起的病理性心肌肥厚,并探讨其潜在的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

雄性 C57BL/6 小鼠(SPF 级),体重 20~25 g,购自空军军医大学实验动物中心。使用许可证号:SYXK(军)2012-0022。金丝桃苷(hyperoside, HYP)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;反转录试剂盒及 RT-PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司;二氢乙啶(Dihydroethidium, DHE)染液和 Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;MDA 和 SOD 试剂盒购自南京建成生物工程研究所;anti- β -actin、anti-SIRT3、anti-Collagen-1、anti-Collagen-3 和 anti-NOX 4 抗体购自美国 Abcam 公司;羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及给药 将 32 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为 4 组:假手术(Sham)组、单纯给药(HYP)组、主动脉弓缩窄(TAC)组及主动脉弓缩窄给药(TAC+HYP)组,每组 8 只。HYP 组和 TAC+HYP 组在 TAC 术后 1 天开始灌胃给药 HYP (50 mg/kg/d),共 4 周,Sham 组和 TAC 组小鼠 TAC 术后以等量的生理盐水灌胃,共 4 周。

1.2.2 小鼠心肌肥厚 TAC 模型的建立 采用微创主动脉弓缩窄术建立小鼠心肌肥厚模型^[14]。小鼠吸入 1%~2%的异氟烷维持麻醉后置于恒温手术台上,在胸骨左旁第二肋间做一长约 0.5 cm 的纵向切口,钝性解剖各层肌肉并打开胸腔,小心将胸腺和脂肪组织与主动脉弓分离;将 27 G 规格针头(直径 0.4 mm)紧贴主动脉弓,用 7-0 丝线在无名动脉和左颈总动脉之间将针

头一并结扎后,抽出针头,造成主动脉管腔部分狭窄;依次关闭胸壁各层,缝合皮肤。Sham 组和 HYP 组小鼠接受相同的手术程序,但主动脉弓不结扎。使用 VisualSonics 770 超声心动图仪测量主动脉缩窄处的压力梯度,将压力梯度大于 30 mmHg 视为模型成功建立。

1.2.3 心脏功能检测 调整异氟烷麻醉剂流量,将小鼠心率维持在 400~500 次/min,以最大程度降低不同心率对主动脉压力梯度和左心室功能的混杂影响。使用 VisualSonics 770 超声心动图仪进行经胸超声检查,并使用 30 MHz 换能器测量左心室收缩功能和心室壁厚度。检测指标包括舒张末期左心室后壁厚度(Left ventricular posterior wall thickness at end diastole, LVPWD)、舒张早晚期的最大血流速度比值(E/A)、左心室射血分数(Left ventricular ejection fraction, LVEF)和左心室短轴缩短率(Left ventricular fractional shortening, LVFS)。

1.2.4 血流动力学监测 麻醉成功后,将小鼠仰卧位固定在恒温手术台上,取颈前正中切口,小心分离右侧颈总动脉,导管经颈总动脉到达左心室行动脉插管,稳定 2 min 后,通过压力换能器采集并监测各组小鼠左心室收缩压(Left ventricular systolic pressure, LVSP)、左室舒张末期压力(Left ventricular end diastolic pressure, LVEDP)、左心室压力上升或下降最大速率($\pm dp/dt_{max}$)。

1.2.5 心/体比、肺/体比和心/胫比测定 实验完成后,小鼠进行安乐死并称重,记录各小鼠体质量(Body weight, BW),迅速摘取完整心脏和肺脏组织,挤出心脏内残留的血液,用干净的滤纸吸干脏器水分,天平称取心脏重量(Heart weight, HW),肺部重量(Lung weight, LW);同时分离出小鼠右下肢胫骨,测量其长度并记录(Tibial length, TL)。根据这些数据,计算出 HW/BW、LW/BW 和 HW/TL 的比值。

1.2.6 心肌组织氧化应激水平测定 实验完成后,将小鼠心脏用冰冷的 PBS 灌注漂洗后迅速取出,剪取部分左心室组织在液氮中快速冷冻,然后切成厚度为 5 μ m 的切片备用;严格按照试剂盒说明书在 37℃ 的避光水浴箱中将组织切片用 DHE 染色 15 min;将组织玻片密封并用 Olympus FV1000 激光共聚焦显微镜拍照,使用 ImageJ 软件分析每组中的乙锭荧光强度表示活性氧簇(Reactive oxygen species, ROS)的生成量。另剪取部分左心室心肌组织,用生理盐水制备成组织匀浆;严格按照试剂盒说明书测定心肌组织中超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活性和丙二醛(Malondialdehyde, MDA)的含量,使用 SpectraMax M5 设备以分光光度法分析数据。

1.2.7 HE 和 Masson 染色 将心脏组织经 10%多聚甲醛固定、石蜡包埋等步骤后,制备成厚度为 5 μ m 的切片备用;行 HE 染色以评估心肌细胞的横截面积,行 Masson 染色以评估心肌组织纤维化程度。用光学显微镜观察并随机选择每张切片 5 个高倍视野进行拍照,用 ImageJ 软件对心肌病理改变进行定量评估。

1.2.8 实时定量 PCR (RT-PCR) 检测 取适量左心室心肌组

织,Trizol 法在冰上提取总 RNA 后,用逆转录试剂盒获得 cDNA。 GAPDH 为内参基因, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法检测目标基因相对表达水平。引物由上海吉凯基因有限公司合成,序列如表 1 所示:

95 °C 5 min;95 °C 30 s;55 °C 30 s;72 °C 30 s;共 40 个循环。以

表 1 各引物序列

Table 1 A list of the primers used in the RT-PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
ANP	GTGCGGTGTCCAACACAGAT	GCCATTTCTCCGACTTTTCTC
α -MHC	TGCACTACGGAAACATGAAGTT	CGATGGAATAGTACACTTGCTGT
β -MHC	ACTGTCAACACTAAGAGGGTCA	TTGGATGATTTGATCTTCCAGGG
SIRT3	CCCCAAGCCCTTTTTCACATT	CGACACTCTCTCAAGCCCA
GAPDH	AGAACATCATCCCTGCATCC	AGTTGCTGTTGAAGTCGC

1.2.9 Western blotting 蛋白检测 各组小鼠心肌组织经裂解、离心、加上样缓冲液、煮沸等操作后,得到蛋白样本,并通过电泳、转膜、封闭等步骤后于 4 °C 下用抗 SIRT3 (1:1 000)、Collagen-1 (1:1 000)、Collagen-3 (1:1 000)、NOX 4 (1:1 000) 和 β -actin (1:1 000) 的抗体孵育过夜。继而在辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 标记的二抗中 (1:1 000) 室温孵育 1 h。使用 Bio-Rad 显像系统检测蛋白条带并用 Image Lab 软件进行定量分析。

1.3 统计学方法

用 Graphpad prism 5.0 统计学软件进行统计分析,实验资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。差异显著性检验采用单因素方差分析(one-way ANOVA),比较两组间差异用 LSD-t 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HYP 对小鼠心脏功能及血流动力学指标的影响

超声检测结果显示(表 2),与 Sham 组相比,TAC 组小鼠的 LVEF、LVFS 和 E/A 值明显降低,LVPWD 值显著增加($P<0.01$),而给予药物处理后,与 TAC 组相比,TAC+HYP 组小鼠 LVEF、LVFS 和 E/A 值明显上升,LVPWD 值显著降低($P<0.01$);与 Sham 组相比,单纯给予 HYP 治疗对小鼠的心脏功能未见明显影响($P>0.05$)。

心导管监测结果显示(表 3),与 Sham 组相比,TAC 组小鼠的 LVSP 和 LVEDP 值显著增加, $\pm dp/dtmax$ 值明显降低($P<0.01$),而给予药物处理后,与 TAC 组相比,TAC+HYP 组小鼠 LVSP 和 LVEDP 值显著下降, $\pm dp/dtmax$ 值明显升高($P<0.01$);与 Sham 组相比,单纯给予 HYP 治疗对小鼠的血流动力学指标未见明显影响($P>0.05$)。

表 2 各组小鼠心脏超声检测结果($\bar{x}\pm s$, n=8)Table 2 The ultrasonic parameter of mice in each group ($\bar{x}\pm s$, n=8)

Groups	LVPWD(mm)	E/A	LVEF(%)	LVFS(%)
Sham	0.50 $\pm$ 0.13	1.68 $\pm$ 0.16	73.46 $\pm$ 1.94	37.87 $\pm$ 4.11
HYP	0.48 $\pm$ 0.08	1.75 $\pm$ 0.09	74.81 $\pm$ 2.42	38.12 $\pm$ 3.73
TAC	1.13 $\pm$ 0.15 ^{##}	0.71 $\pm$ 0.05 ^{##}	38.85 $\pm$ 3.73 ^{##}	19.39 $\pm$ 2.35 ^{##}
TAC+HYP	0.75 $\pm$ 0.11 ^{###**}	1.12 $\pm$ 0.12 ^{###**}	56.21 $\pm$ 3.16 ^{###**}	28.66 $\pm$ 3.57 ^{###**}

注:与 Sham 组相比,## 为 $P<0.01$;与 TAC 组相比,** 为 $P<0.01$ 。

Note: ^{##} $P<0.01$ vs. Sham group; ^{**} $P<0.01$ vs. TAC group.

表 3 各组小鼠血流动力学指标检测结果($\bar{x}\pm s$, n=8)Table 3 The hemodynamic indexes of mice in each group ($\bar{x}\pm s$, n=8)

Groups	dp/dtmax (mmHg/s)	-dp/dtmax (mmHg/s)	LVSP (mmHg)	LVEDP (mmHg)
Sham	6 468.7 $\pm$ 313.6	5 646.3 $\pm$ 225.8	68.61 $\pm$ 3.55	7.23 $\pm$ 0.51
HYP	6 535.5 $\pm$ 322.3	5 429.3 $\pm$ 317.7	67.42 $\pm$ 2.42	7.11 $\pm$ 0.47
TAC	4 647.8 $\pm$ 249.5 ^{##}	3 578.9 $\pm$ 227.4 ^{##}	112.58 $\pm$ 4.61 ^{##}	15.46 $\pm$ 1.43 ^{##}
TAC+HYP	5 583.7 $\pm$ 328.1 ^{###**}	4 533.1 $\pm$ 297.3 ^{###**}	89.74 $\pm$ 1.74 ^{###**}	11.23 $\pm$ 0.79 ^{###**}

注:与 Sham 组相比,## 为 $P<0.01$;与 TAC 组相比,** 为 $P<0.01$ 。

Note: ^{##} $P<0.01$ vs. Sham group; ^{**} $P<0.01$ vs. TAC group.

2.2 HYP 对小鼠组织学指标的影响

小鼠组织学检测结果显示(图1),与Sham组相比,TAC组小鼠的HW/BW、LW/BW和HW/TL值均显著增高($P<0.01$),并且小鼠的心肌细胞平均横截面积明显增加,而给予药物处理后,与TAC组相比,TAC+HYP组小鼠的HW/BW、

LW/BW和HW/TL值均显著降低($P<0.05/0.01$),同时小鼠的心肌细胞平均横截面积明显减小;与Sham组相比,单纯给予HYP治疗对小鼠的心肌肥厚组织学指标未见明显影响($P>0.05$)。

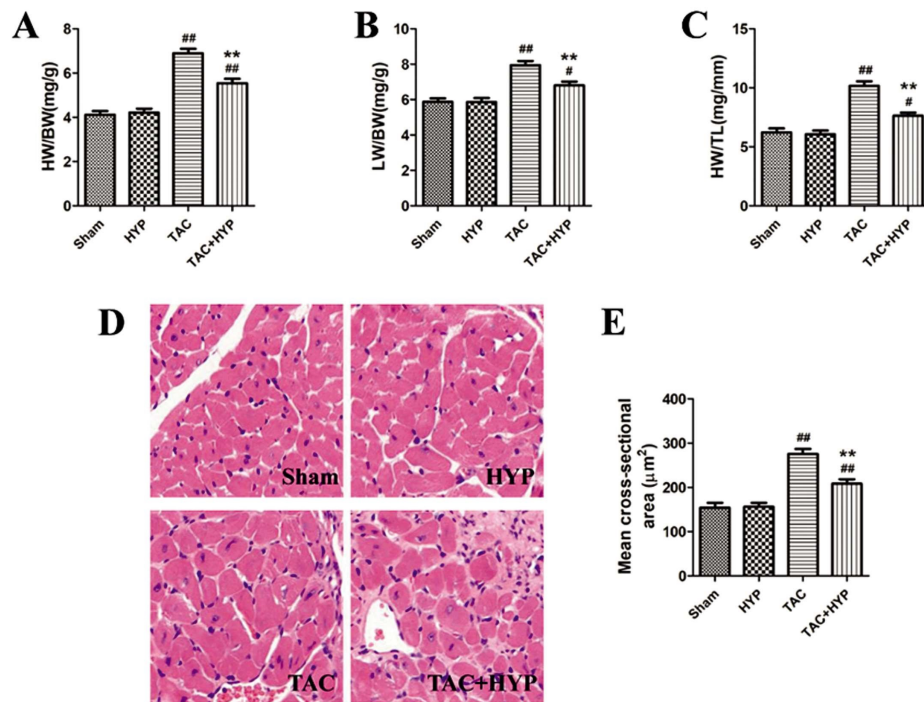


图1 各组小鼠心肌肥厚组织学指标的比较

Fig. 1 Comparison of the histological indexes of cardiac hypertrophy among different groups

注:A:心/体比;B:肺/体比;C:心/胫比;D:典型HE染色照片($\times 400$);E:心肌细胞平均横截面积。 $n=8$,与Sham组相比,##为 $P<0.01$;与TAC组相比,*/**为 $P<0.05/0.01$ 。

Note: A: HW/BW; B: LW/BW; C: HW/TL; D: typical HE staining photos ($\times 400$); E: mean cross-sectional area of cardiomyocyte. $n=8$, ^{##} $P<0.01$ vs. Sham group; ^{*/**} $P<0.05/0.01$ vs. TAC group.

2.3 HYP 对小鼠心肌纤维化程度的影响

小鼠心肌组织Masson染色显示(图2A-2B),与Sham组相比,TAC组小鼠的心肌组织内胶原沉积程度显著增加,心肌纤维化程度显著升高($P<0.01$),而给予药物处理后,与TAC组相比,TAC+HYP组小鼠的心肌组织内胶原沉积程度显著降低,心肌纤维化程度显著缓解($P<0.01$);与Sham组相比,单纯给予HYP治疗对小鼠的心肌组织内胶原沉积程度未见明显影响($P>0.05$)。

小鼠心肌组织胶原蛋白表达程度显示(图2C-2E),与Sham组相比,TAC组小鼠的心肌组织内Collagen-1和Collagen-3表达程度显著增加($P<0.01$),而给予药物处理后,与TAC组相比,TAC+HYP组小鼠的心肌组织内Collagen-1和Collagen-3表达程度显著降低($P<0.01$);与Sham组相比,单纯给予HYP治疗对小鼠的心肌组织内胶原表达程度未见明显影响($P>0.05$)。

2.4 HYP 对小鼠心肌肥厚相关基因表达的影响

小鼠心肌肥厚相关基因表达情况显示(图3),与Sham组相比,TAC组小鼠的心肌组织内 α -MHC表达程度显著降低, β -MHC和ANP表达程度明显升高($P<0.01$),而给予药物处理后,与TAC组相比,TAC+HYP组小鼠的心肌组织内 α -MHC

表达程度显著增加, β -MHC和ANP表达程度明显下降($P<0.01$);与Sham组相比,单纯给予HYP治疗对小鼠的心肌肥厚相关基因表达情况未见明显影响($P>0.05$)。

2.5 HYP 对小鼠心肌组织氧化应激水平的影响

小鼠心肌组织氧化应激水平显示(图4),与Sham组相比,TAC组小鼠的心肌组织内SOD含量显著下降,MDA和ROS生成显著增加,NADPH氧化酶(NOX4)的表达明显上调($P<0.01$),而给予药物处理后,与TAC组相比,TAC+HYP组小鼠的心肌组织内SOD含量显著升高,MDA和ROS生成显著抑制,NOX4的表达明显下调($P<0.01$);与Sham组相比,单纯给予HYP治疗对小鼠心肌组织氧化应激水平未见明显影响($P>0.05$)。

2.6 HYP 对小鼠心肌组织SIRT3信号表达的影响

小鼠心肌组织SIRT3信号表达程度显示(图5),与Sham组相比,TAC组小鼠的心肌组织内SIRT3蛋白及SIRT3基因的表达程度均显著降低($P<0.01$),而给予药物处理后,与TAC组相比,TAC+HYP组小鼠的心肌组织内SIRT3蛋白及SIRT3基因的表达程度均显著上升($P<0.01$);与Sham组相比,单纯给予HYP治疗对小鼠的心肌组织内SIRT3信号的表达情况未见明显影响($P>0.05$)。

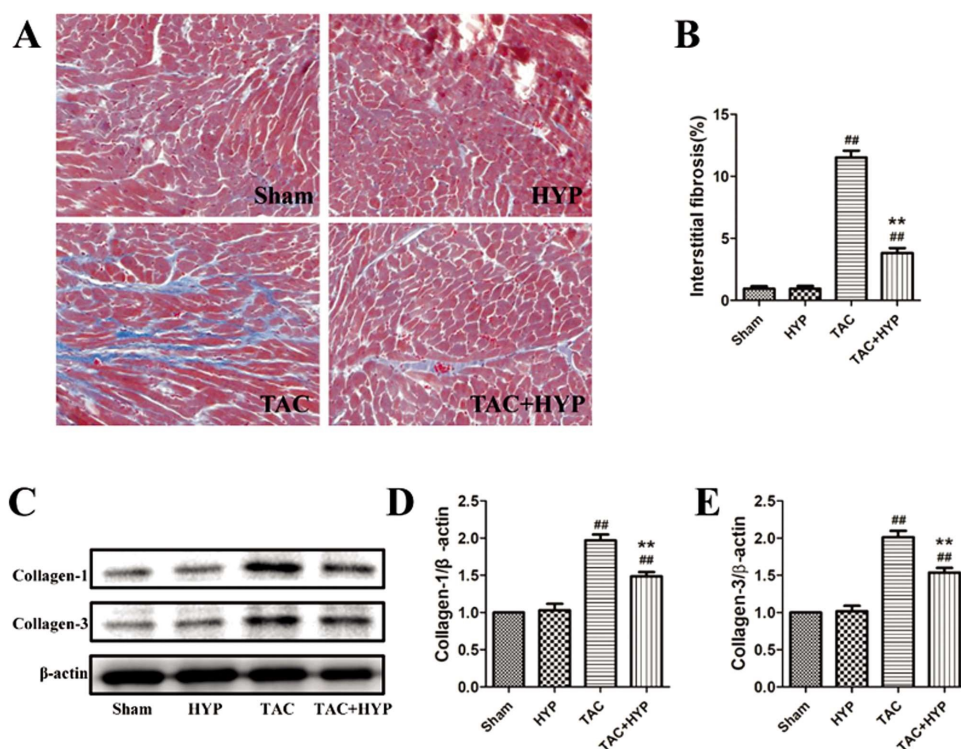


图2 各组小鼠心肌纤维化程度的比较

注:A:典型 Masson 染色照片(×200);B:间质纤维化百分比;C:典型蛋白表达条带;D:Collagen-1 蛋白表达;E:Collagen-3 蛋白表达。

n=8,与 Sham 组相比,## 为 $P < 0.01$;与 TAC 组相比,** 为 $P < 0.01$ 。

Fig. 2 Comparison of the degree of myocardial fibrosis among different groups

Note: A: typical Masson staining photos (×200); B: percentage of interstitial fibrosis;

C: typical protein bands; D: Collagen-1 protein expression level; E: Collagen-3 protein expression level.

n=8, ## $P < 0.01$ vs. Sham group; ** $P < 0.01$ vs. TAC group.

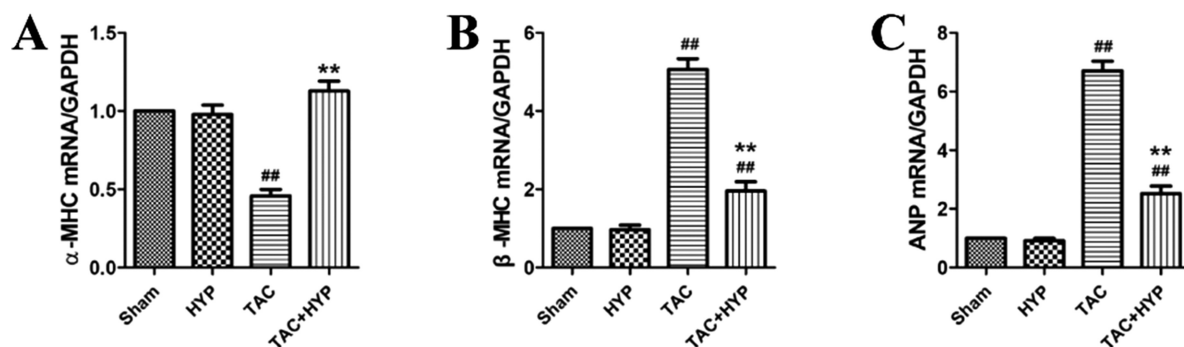


图3 各组小鼠心肌肥厚相关标志物的基因表达的比较

Fig. 3 Comparison of the gene expressions of cardiac hypertrophy related markers among different groups

注:A:α-MHC mRNA 表达水平;B:β-MHC mRNA 表达水平;C:ANP mRNA 表达水平。

n=8,与 Sham 组相比,## 为 $P < 0.01$;与 TAC 组相比,** 为 $P < 0.01$ 。

Note: A: α-MHC mRNA expression level; B: β-MHC mRNA expression level; C: ANP mRNA expression level. n=8, ## $P < 0.01$ vs.

Sham group; ** $P < 0.01$ vs. TAC group.

3 讨论

病理性心肌肥厚被认为是多种心血管疾病向终末期心力衰竭进展的中心环节。心肌肥厚是以心肌细胞肥大为主要特点,为适应机体循环超负荷的一种代偿性改变。如果未得到及时的医学干预,在缺血或压力超负荷等多种病理因素的持续刺激下,心肌细胞及间质会发生一系列复杂的病理反应导致适应

不良的心脏重塑和心脏功能障碍,并逐步发展为心力衰竭,成为影响患者预后的重要原因^[15,16]。本研究采用主动脉缩窄术建立的心肌肥厚模型观察到,TAC 术后 4 周,小鼠的 HW/BW、LW/BW 和 HW/TL 值均显著增高,心肌细胞平均横截面积明显增加,表明单个心肌细胞形态的明显增大及心脏质量的明显增加,并且由压力负荷引起的肺淤血程度显著加重。此外,TAC 组小鼠的 LVEF、LVFS 和 E/A 值明显下降,LVPWD 值显著升

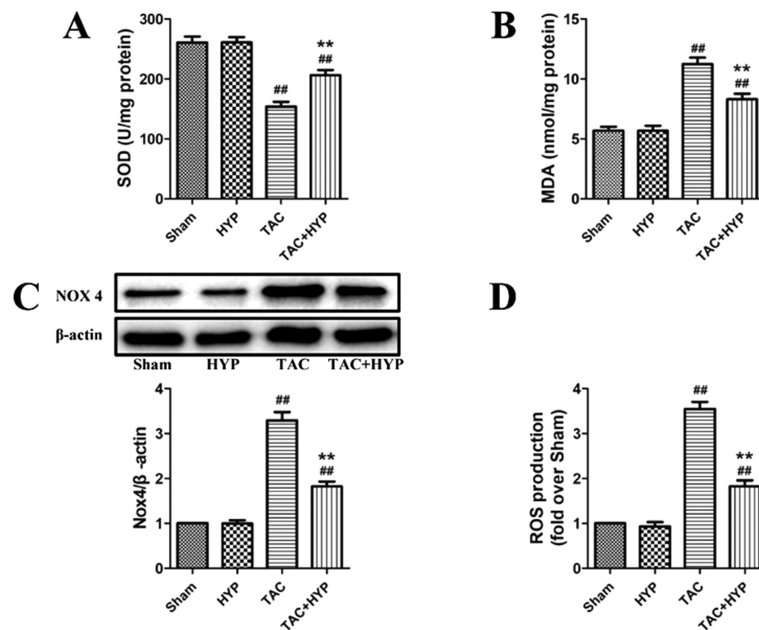


图 4 各组小鼠心肌氧化应激水平的比较

注:A:超氧化物歧化酶(SOD)活性;B:丙二醛(MDA)含量;C:NOX4 蛋白表达;D:活性氧簇(ROS)生成量。

n=8,与 Sham 组相比,## 为 $P < 0.01$;与 TAC 组相比,** 为 $P < 0.01$ 。

Fig. 4 Comparison of the myocardial oxidative stress level among different groups

Note: A: Superoxide dismutase (SOD) activity; B: Malondialdehyde (MDA) content; C: NOX 4 protein expression level;

D: Reactive oxygen species (ROS) production. n=8, ^{##} $P < 0.01$ vs. Sham group; ^{**} $P < 0.01$ vs. TAC group.

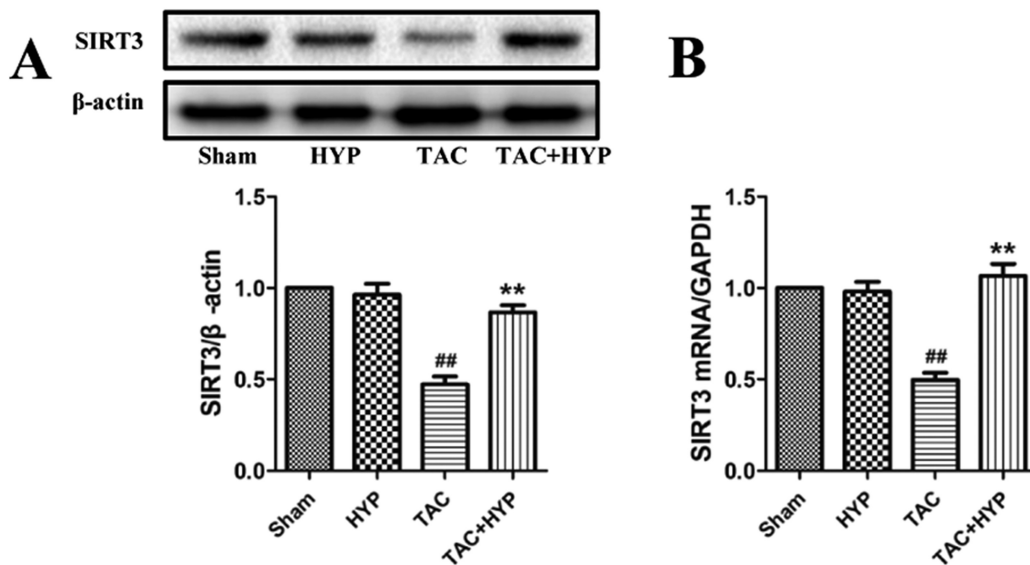


图 5 各组小鼠心肌组织 SIRT3 信号表达的比较

Fig. 5 Comparison of the protein and gene expressions of SIRT3 among different groups

注:A:SIRT3 蛋白表达水平;B:SIRT3 mRNA 表达水平。

n=8,与 Sham 组相比,## 为 $P < 0.01$;与 TAC 组相比,** 为 $P < 0.01$ 。

Note: A: SIRT3 protein expression level; B: SIRT3 mRNA expression level.

n=8, ^{##} $P < 0.01$ vs. Sham group; ^{**} $P < 0.01$ vs. TAC group.

高;同时 TAC 组小鼠 LVSP 和 LVEDP 值显著上升,± dp/dtmax 值明显降低,表明小鼠心脏功能明显受损且血流动力学异常持续恶化。因此,探求可应用于临床治疗的心肌保护药物抑制病理性心肌肥厚进展,对降低心力衰竭的发生率和死亡率尤为关键。

近年来研究显示,金丝桃苷在高糖及烫伤所致心肌损伤、

心肌缺血再灌注损伤和心力衰竭等多种心血管疾病模型中都具有保护作用^[9-13],并且单独给予金丝桃苷对小鼠心血管系统无显著不良影响,表现出了较高的生物安全性^[17]。但金丝桃苷能否抑制压力负荷引起的心肌肥厚尚未见报道。本研究在给予 TAC 术后小鼠长时间药物干预后发现,金丝桃苷治疗能明显

抑制心肌细胞形态的增大及心脏质量的增加,减轻压力负荷型心肌肥厚的小鼠心脏功能障碍,改善血流动力学异常。这些结果提示金丝桃苷可能在压力负荷引起的心肌肥厚中扮演积极的作用,然而其减轻心肌肥厚的具体作用机制有待进一步探究。

心肌纤维化是心脏重塑的重要组成部分,主要表现为胶原蛋白的过度积聚、胶原成分的比例失调和空间结构排列紊乱,不仅会导致心室壁僵硬和顺应性降低,还会破坏心肌兴奋-收缩偶联,最终影响心脏收缩和舒张功能^[18-20]。肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)是肌球蛋白的基本组成单位,在保证肌细胞正常工作中发挥着重要的作用。MHC 的两个亚型 α -MHC 和 β -MHC 在肥厚性心脏中将发生典型的 α -MHC 向 β -MHC 的转变^[21,22]。本研究同样观察到,TAC 组小鼠心肌胶原沉积明显加重,Collagen-1 和 Collagen-3 的蛋白表达明显上调,心脏中的 α -MHC mRNA 表达显著下降,伴随着 β -MHC mRNA 表达明显上升。此外,心肌扩张导致心脏功能不全的生物标志物 ANP 的核酸表达在 TAC 术后也明显增加。而给予 HYP 治疗后,TAC+HYP 组小鼠心肌纤维化程度明显缓解, α -MHC mRNA/ β -MHC mRNA 比例明显上调,ANP mRNA 表达也显著降低。

越来越多的数据证实,氧化应激损伤与心肌肥厚和心力衰竭的发生发展密切相关^[23,24]。病理条件下,心肌耗氧量增加与供血相对不足处于不平衡的状态,心脏为克服过载的压力会产生大量的氧自由基等中间代谢产物。此外机体抗氧化系统能力的下降不足以消耗大量堆积的氧自由基导致了心肌细胞的坏死凋亡和心脏重塑的形成,加速了心肌肥厚向心力衰竭的过渡^[25-27]。本研究结果也发现,TAC 术后小鼠的心肌组织内 SOD 含量显著下降,MDA 和 ROS 生成显著增加,NOX 4 蛋白表达明显上调。而给予 HYP 治疗后,TAC+HYP 组小鼠心肌组织氧化应激水平显著下降,抗氧化能力显著提高。

SIRT3 是线粒体内一种 NAD⁺ 依赖的去乙酰化酶,广泛分布于富含线粒体的组织器官中。因其在细胞代谢和线粒体功能等方面的关键调控作用,SIRT3 已成为多种心血管疾病的潜在干预靶点^[28,29]。最近研究报道,SIRT3 在心肌肥厚进展中也发挥了明显的抑制效应^[30-32]。Sundaresan 等^[33]研究发现,SIRT3 敲除的小鼠会出现伴有明显心脏功能障碍的心肌肥厚,而过表达心脏 SIRT3 信号可减轻激动剂引起的心肌肥厚。Vinodkumar 等^[34]也证实和厚朴酚可通过激活线粒体 SIRT3 信号阻断并逆转小鼠心脏肥大。本研究结果同样显示,TAC 组小鼠的心肌组织内 SIRT3 蛋白及 SIRT3 基因的表达程度均显著降低,而给予药物处理后,TAC+HYP 组小鼠的心肌组织内 SIRT3 蛋白及 SIRT3 基因的表达程度均显著上升。该结果进一步表明,SIRT3 在病理性心肌肥厚发病过程中扮演了重要角色,并且可能介导了金丝桃苷抗压力负荷型心肌肥厚的效应。

综上所述,本研究首次证实,金丝桃苷能够明显减轻压力负荷引起的心肌细胞肥大,降低心肌组织氧化应激水平,延缓心肌纤维化进程,进而改善小鼠血流动力学,增强心脏功能,减缓了病理性心肌肥厚向心力衰竭的进一步发展。同时,本研究首次发现,金丝桃苷发挥抗压力负荷诱导的病理性心肌肥厚的保护作用与其激活心肌细胞 SIRT3 信号密切相关,以上研究结

果为临床上应用金丝桃苷治疗压力负荷型心肌肥厚患者提供了新的理论依据。

参考文献(References)

- [1] Raut G K, Manchineela S, Chakrabarti M, et al. Imine stilbene analog ameliorate isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and hydrogen peroxide-induced apoptosis[J]. Free Radic Biol Med, 2020, 153: 80-88
- [2] Xu C N, Kong L H, Ding P, et al. Melatonin ameliorates pressure overload-induced cardiac hypertrophy by attenuating Atg5-dependent autophagy and activating the Akt/mTOR pathway [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(10): 165848
- [3] Lu H I, Chung S Y, Chen Y L, et al. Exendin-4 therapy still offered an additional benefit on reducing transverse aortic constriction-induced cardiac hypertrophy-caused myocardial damage in DPP-4 deficient rats[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(2): 778-798
- [4] Gallo S, Vitacolonna A, Bonzano A, et al. ERK: A Key Player in the Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20 (9): 2164
- [5] Ji X B, Li X R, Hao-Ding, et al. Inhibition of Uncoupling Protein 2 Attenuates Cardiac Hypertrophy Induced by Transverse Aortic Constriction in Mice[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 36(5): 1688-1698
- [6] Blaustein M P. How does pressure overload cause cardiac hypertrophy and dysfunction? High-ouabain affinity cardiac Na⁺ pumps are crucial[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2017, 313(5): H919-H930
- [7] 林萍, 易宏伟, 张斐. 金丝桃苷药理作用研究进展[J]. 中国现代中药, 2012, 14(10): 23-26
- [8] Guo X, Zhu C, Liu X, et al. Hyperoside protects against heart failure-induced liver fibrosis in rats[J]. Acta Histochem, 2019, 121(7): 804-811
- [9] 王长鹰, 李军. 金丝桃苷对严重烧伤大鼠的心肌保护作用及机制[J]. 山西医科大学学报, 2019, 50(12): 1718-1724
- [10] 王成, 李霞, 刘振, 等. 金丝桃苷对高糖诱导的心肌细胞氧化应激损伤的影响及其机制研究 [J]. 四川大学学报 (医学版), 2018, 49 (04): 518-523
- [11] 舒庆, 郑其萍. 金丝桃苷抗心 / 脑缺血损伤作用的药理学研究进展 [J]. 中国药房, 2016, 27(10): 1415-1417
- [12] Hou J Y, Liu Y, Liu L, et al. Protective effect of hyperoside on cardiac ischemia reperfusion injury through inhibition of ER stress and activation of Nrf2 signaling[J]. Asian Pac J Trop Med, 2016, 9(1): 76-80
- [13] Guo X, Zhang Y, Lu C, et al. Protective effect of hyperoside on heart failure rats via attenuating myocardial apoptosis and inducing autophagy[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2020, 84(4): 714-724
- [14] Furihata T, Kinugawa S, Takada S, et al. The experimental model of transition from compensated cardiac hypertrophy to failure created by transverse aortic constriction in mice [J]. Int J Cardiol Heart Vasc, 2016, 11: 24-28
- [15] Shimizu I, Minamino T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy[J]. J Mol Cell Cardiol, 2016, 97: 245-262
- [16] Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy [J]. Nat Rev Cardiol, 2018, 15(7): 387-407
- [17] 艾国, 王德文, 黄正明, 等. 金丝桃苷的一般药理学研究[J]. 药物评价研究, 2016, 39(02): 202-206

- potential candidate genes for esophageal squamous cell carcinoma[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp, 2012, 13 (3): 767-773
- [17] Busca A, Djordjevic B, Giassi A, et al. IFITM1 Is Superior to CD10 as a Marker of Endometrial Stroma in the Evaluation of Myometrial Invasion by Endometrioid Adenocarcinoma [J]. American Journal of Clinical Pathology, 2016, 145(4): 486-96
- [18] 颜欣, 金晶兰, 董洪静, 等. 以发热为主要临床表现的子宫颈癌肝转移误诊为肝脓肿 1 例报告 [J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(12): 2400-2402
- [19] 吴乾凤, 高国兰, 孔为民. I ~ II A2 期宫颈癌淋巴结转移高危因素及对预后的影响[J]. 中国妇产科临床杂志, 2016, 17(5): 407-409
- [20] Ola CPB, De MIUD, Cenaglia LLG, et al. Prognostic implications of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway activation in gastric carcinomas [J]. Archives of Medical Science, 2017, 13 (6): 1262-1268
- [21] Milella M, Falcone I, Conciatori F, et al. PTEN: multiple functions in human malignant tumors[J]. Frontiers in Oncology, 2015, 5: 24-37
- [22] Fragoso R, Barata JT. Kinases, tails and more: Regulation of PTEN function by phosphorylation[J]. Methods, 2015, 77-78: 75-81
- [23] Yang Z, Xie C, Xu W, et al. Phosphorylation and inactivation of PTEN at residues Ser380/Thr382/383 induced by Helicobacter pylori promotes gastric epithelial cell survival through PI3K/Akt pathway[J]. Oncotarget, 2015, 6(31): 31916-31926
- [24] Lopez C, Abuel-Haija M, Pena L, et al. Novel Germline PTEN Mutation Associated with Cowden Syndrome and Osteosarcoma [J]. Cancer Genomics & Proteomics, 2018, 15(2): 115-120
- [25] Yang X, Cheng Y, Li P, et al. A lentiviral sponge for miRNA-21 diminishes aerobic glycolysis in bladder cancer T24 cells via the PTEN/PI3K/AKT/mTOR axis[J]. Tumor Biology, 2015, 36(1): 383-391
- [26] Zhang S, Cui R. The targeted regulation of miR-26a on PTEN-PI3K/AKT signaling pathway in myocardial fibrosis after myocardial infarction[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(2): 523-531
- [27] Yang WB, Zhang WP, Shi JL, et al. MiR-4299 suppresses non-small cell lung cancer cell proliferation, migration and invasion through modulating PTEN/AKT/PI3K pathway [J]. European Review for Medical & Pharmacological Sciences, 2018, 22(11): 3408
- [28] Cai J, Li R, Xu X, et al. CK1 α suppresses lung tumour growth by stabilizing PTEN and inducing autophagy [J]. Nature Cell Biology, 2018, 20(4): 465-478

(上接第 33 页)

- [18] Lazzeroni D, Rimoldi O, Camici P G. From Left Ventricular Hypertrophy to Dysfunction and Failure[J]. Circ J, 2016, 80(3): 555-564
- [19] Rai V, Sharma P, Agrawal S, et al. Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research [J]. Mol Cell Biochem, 2017, 424(1-2): 123-145
- [20] Rockey D C, Bell P D, Hill J A. Fibrosis--a common pathway to organ injury and failure[J]. N Engl J Med, 2015, 372(12): 1138-1149
- [21] Zhai M, Liu Z, Zhang B, et al. Melatonin protects against the pathological cardiac hypertrophy induced by transverse aortic constriction through activating PGC-1 β : In vivo and in vitro studies[J]. J Pineal Res, 2017, 63(3): 10.1111/jpi.12433
- [22] Marian A J, Braunwald E. Hypertrophic Cardiomyopathy: Genetics, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Therapy [J]. Circ Res, 2017, 121(7): 749-770
- [23] Maulik S K, Kumar S. Oxidative stress and cardiac hypertrophy: a review[J]. Toxicol Mech Methods, 2012, 22(5): 359-366
- [24] Rababa'H A M, Guillery A N, Mustafa R, et al. Oxidative Stress and Cardiac Remodeling: An Updated Edge [J]. Curr Cardiol Rev, 2018, 14(1): 53-59
- [25] Tham Y K, Bernardo B C, Ooi J Y, et al. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets[J]. Arch Toxicol, 2015, 89(9): 1401-1438
- [26] Seddon M, Looi Y H, Shah A M. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure[J]. Heart, 2007, 93 (8): 903-907
- [27] Facundo H, Brainard R E, Caldas F, et al. Mitochondria and Cardiac Hypertrophy[J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 982: 203-226
- [28] Lu Y, Wang Y D, Wang X Y, et al. SIRT3 in cardiovascular diseases: Emerging roles and therapeutic implications [J]. Int J Cardiol, 2016, 220: 700-705
- [29] Parodi-Rullan R M, Chapa-Dubocq X R, Javadov S. Acetylation of Mitochondrial Proteins in the Heart: The Role of SIRT3 [J]. Front Physiol, 2018, 9: 1094
- [30] Zhu L, Li C, Liu Q, et al. Molecular biomarkers in cardiac hypertrophy[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(3): 1671-1677
- [31] Pillai V B, Sundaresan N R, Gupta M P. Regulation of Akt signaling by sirtuins: its implication in cardiac hypertrophy and aging [J]. Circ Res, 2014, 114(2): 368-378
- [32] Xu M, Xue R Q, Lu Y, et al. Choline ameliorates cardiac hypertrophy by regulating metabolic remodelling and UPRmt through SIRT3-AMPK pathway[J]. Cardiovasc Res, 2019, 115(3): 530-545
- [33] Sundaresan N R, Gupta M, Kim G, et al. Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice[J]. J Clin Invest, 2009, 119(9): 2758-2771
- [34] Pillai V B, Samant S, Sundaresan N R, et al. Honokiol blocks and reverses cardiac hypertrophy in mice by activating mitochondrial Sirt3[J]. Nat Commun, 2015, 6: 6656