

引用: 韦晨龙, 许锁春. 基于AMPK/mTOR信号通路的白藜芦醇改善大鼠心力衰竭的作用机制[J]. 中医指导报, 2025, 31(10): 27-33, 40.

基于AMPK/mTOR信号通路的白藜芦醇改善大鼠心力衰竭的作用机制*

韦晨龙^{1,2}, 许锁春¹

(1. 西安交通大学研究生院, 陕西 西安 710049;

2. 西安高新医院, 陕西 西安 710077)

[摘要] 目的: 探究白藜芦醇对心力衰竭模型大鼠的改善作用和对腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路的影响。方法: 将6周龄的雄性SD大鼠随机分为假手术组(Sham)、模型组(Model)、白藜芦醇治疗组(RES)和白藜芦醇治疗加AMPK激动剂组(RES+EX229)。Sham组开胸后仅穿线不做冠状动脉左前支结扎, Model组给予冠状动脉左前支结扎, RES组在模型建立4周后, 给予50 mg/kg的白藜芦醇灌胃8周, RES+EX229组在模型建立4周后, 给予50mg/kg的白藜芦醇灌胃, 并肌内注射EX229 2.0 mg/kg, 共8周。多普勒超声仪测定心室功能指标, 包括左心室舒张末期容积(LVEDV)、左心室收缩末期容积(LVESV)、左心室射血分数(LVEF)、左心室内径值(LV)、左室后壁(LVPW), 以及心室重构指数, 包括左心室质量指数(LVMI)和球形指数(SI); TTC染色观察梗死面积, HE染色观察心脏组织病理学改变, Masson染色观察心肌胶原纤维变化, TUNEL染色观察心肌细胞凋亡情况, 免疫组织化学染色观察心肌细胞自噬蛋白LC3的表达; Western blotting法对心脏组织B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、微管相关蛋白1轻链3-II型(LC3-II)/LC3-I、Beclin1、AMPK、mTOR蛋白表达情况进行测定。结果: 与Sham组相比, Model组心脏的LVEDV、LVESV、LV、LVPW、LVMI升高, LVEF、SI降低, 差异均有统计学意义($P<0.05$), 与Model组相比, RES组LVEDV、LVESV、LV、LVPW、LVMI降低, LVEF、SI升高, 差异均有统计学意义($P<0.05$), 与RES组相比, RES+EX229组LVEDV、LVESV、LV、LVPW、LVMI升高, LVEF、SI降低, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 与Sham组相比, Model组的心肌梗死面积、病理程度、心肌胶原纤维程度、心肌细胞凋亡数量、自噬蛋白LC3和Beclin-1的表达明显上升, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 与Model组相比, RES组心肌梗死面积、病理程度、心肌胶原纤维程度、心肌细胞凋亡数量、自噬蛋白LC3的表达明显降低, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 与RES组相比, RES+EX229组心肌梗死面积、病理程度、心肌胶原纤维程度、心肌细胞凋亡数量、自噬蛋白LC3和Beclin1的表达明显升高, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 与Sham组相比, Model组的Bax、LC3-II/LC3-I、Beclin1、p-AMPK/AMPK表达量升高, Bcl-2、p-mTOR/mTOR表达量降低, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 与Model组相比, RES组的Bax、LC3-II/LC3-I、Beclin1、AMPK蛋白表达量降低, Bcl-2、p-mTOR/mTOR表达量升高, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 与RES组相比, RES+EX229组Bax、LC3-II/LC3-I、Beclin1、p-AMPK/AMPK表达量升高, Bcl-2、p-mTOR/mTOR表达量降低, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论: 白藜芦醇能够改善心力衰竭模型大鼠的心室功能、心脏组织病理学改变, 抑制心肌细胞凋亡, 改善心室重构, 可能与白藜芦醇抑制AMPK/mTOR自噬信号通路激活有关。

[关键词] 白藜芦醇; 心力衰竭; AMPK/mTOR信号通路; 凋亡; 自噬; 大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)10-0027-07

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2025.10.005

Research on the Mechanism of Resveratrol Improving Heart Failure in Rats Based on AMPK/mTOR Signaling Pathway

WEI Chenlong^{1,2}, XU Suochun¹

(1. Graduate School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an Shaanxi 710049, China;

2. Xi'an High Tech Hospital, Xi'an Shaanxi 710077, China)

[Abstract] Objective: To explore the improvement effect of resveratrol on heart failure model rat and its

*基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2024JC-YBMS-628)

通信作者: 许锁春, 男, 主任医师, 研究方向为心脏大血管

influence on AMPK/mTOR pathway. Method: The 6-week-old male SD rats were randomly divided into sham operation group (Sham group), model group (Model group), resveratrol treatment group (RES group), and resveratrol treatment plus AMPK agonist group (RES+EX229 group). In the Sham group, the chest was opened but no suture was made, and the left anterior descending coronary artery was not ligated. In the Model group, ligation of the left anterior descending coronary artery was performed. In the RES group, 50 mg/kg resveratrol was administered via gastric tube for 8 weeks after the model was established 4 weeks earlier. In the RES+EX229 group, 50 mg/kg resveratrol was administered via gastric tube after the model was established 4 weeks earlier, and 2.0 mg/kg EX229 was injected intramuscularly for 8 weeks. The left ventricular end-diastolic volume (LVEDV), left ventricular end-systolic volume (LVESV), left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular inner diameter (LV), left ventricular posterior wall (LVPW), left ventricular remodeling index (LVMI) and spherical index (SI) were measured by Doppler ultrasound. TTC staining was used to observe the infarction area, and HE staining was used to observe heart tissue pathology change. Masson staining was used to observe changes of myocardial collagen fibers, and TUNEL staining was used to observe the myocardial cell apoptosis. Immunohistochemical staining was used to observe the myocardial cell autophagy genes expression of LC3, and Western blotting was used to detect expression of Bcl-2, Bax, LC3-II/LC3-I, Beclin1, AMPK and mTOR in cardiac tissue. Results: Compared with the Sham group, the LVEDV, LVESV, LV, LVPW and LVMI increased in Model group, while LVEF and SI decreased in Model group, with statistically significant difference ($P<0.05$). Compared with the Model group, the LVEDV, LVESV, LV, LVPW and LVMI decreased in RES group, while LVEF and SI increased in RES group, with statistically significant difference ($P<0.05$). Compared with the RES group, the LVEDV, LVESV, LV, LVPW and LVMI increased in RES+EX229 group, while LVEF and SI decreased in RES+EX229 group, with statistically significant difference ($P<0.05$). Compared with the Sham group, the myocardial infarction area, degree of pathology, degree of myocardial collagen fibers, number of myocardial cell apoptosis, and expression of LC3 and Beclin 1 increased in Model group, with statistically significant difference ($P<0.05$). Compared with the Model group, the myocardial infarction area, degree of pathology, degree of myocardial collagen fibers, number of myocardial cell apoptosis, and expression of LC3 decreased in RES group, with statistically significant difference ($P<0.05$). Compared with the RES group, the myocardial infarction area, degree of pathology, degree of myocardial collagen fibers, number of myocardial cell apoptosis, and expression of LC3 and Beclin-1 increased in RES+EX229 group, with statistically significant difference ($P<0.05$). Compared with the Sham group, the expression levels of Bax, LC3-II/LC3-I, Beclin1 and p-AMPK/AMPK increased in Model group, while Bcl-2 and p-mTOR/mTOR decreased in Model group, with statistically significant difference ($P<0.05$). Compared with the Model group, the expression levels of Bax, LC3-II/LC3-I, Beclin1 and AMPK decreased in RES group, while Bcl-2 and p-mTOR/mTOR increased in RES group, with statistically significant difference ($P<0.05$). Compared with the RES group, the expression levels of Bax, LC3-II/LC3-I, Beclin1 and p-AMPK/AMPK increased in RES+EX229 group, while Bcl-2 and p-mTOR/mTOR decreased in RES+EX229 group, with statistically significant difference ($P<0.05$). Conclusion: Resveratrol can improve ventricular function and pathological changes in cardiac tissue, inhibit myocardial cell apoptosis, and improve ventricular remodeling in heart failure model rats, which may be related to the inhibition of AMPK/mTOR autophagy signaling pathway activation.

[Keywords] resveratrol; heart failure; AMPK/mTOR signaling pathway; apoptosis; autophagy; rat

心力衰竭(heart failure, HF)作为一种严重的心脏疾病,通常是由于心脏泵血功能失常,导致心脏无法满足全身的基础代谢需要,严重影响患者的生存质量^[1-2]。HF的治疗手段以抗心力衰竭药物为主,配合生活方式改善等综合治疗用于延缓HF进程,传统的西药治疗毒副作用大,常会诱发患者电解质紊乱、肾功能损害等不良反应发生^[3]。白藜芦醇在治疗心力衰竭方面具有显著的应用价值。它可以保护心血管,预防心衰的发生,缓解心衰症状,增强心功能,并改善患者预后。研究^[4]表明,白藜芦醇能够减轻心肌水肿,增加回心血量,改善

心室重构,为心力衰竭的治疗提供新的选择。

研究^[5]显示,腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路在心室重构中发挥着重要的调控作用,能够介导细胞自噬,促进心肌细胞的肥大和凋亡,进而诱导和加重心室重构。调节AMPK/mTOR信号通路,可以影响B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax)和Bcl-2的表达和活性,从而调节细胞凋亡的过程。研究表明,mTOR在调节细胞能量代谢和应激反应中也起着重要作用。当mTOR被过度抑制时,细胞的能量代谢可能会受到干扰,导致细胞无法应对

外界应激刺激。这种应激反应的缺陷可能会增加心肌细胞的敏感性,使其更容易发生凋亡^[6]。AMPK和mTOR之间存在交互作用,共同调控自噬过程。当细胞能量状态降低时,AMPK被激活,进而抑制mTORC1的活性,从而解除对自噬的抑制;而当细胞能量状态充足时,AMPK活性降低,mTORC1活性增加,抑制自噬过程。这种交互作用在心室重构中起着重要的调节作用^[6]。白藜芦醇通过多种途径调控心肌自噬,抑制自噬流的过度活化,也能通过促进适度自噬来保护心肌细胞免受缺氧/复氧损伤^[7]。白藜芦醇对自噬的影响具有复杂性和多样性。它既可以作为自噬诱导剂发挥积极作用,也可能在特定条件下抑制自噬以保护细胞^[8-9]。有研究表明AMPK的激活可以促进自噬过程,导致微管相关蛋白1轻链3-I型(LC3-I)向LC3-II的转化增加。相反,mTOR的激活抑制自噬过程,导致LC3-II水平下降。因此,AMPK/mTOR信号通路可以调控LC3-II/LC3-I的比例,从而影响自噬体的形成和自噬过程的进行^[10]。AMPK的激活可以促进Beclin1的表达和活性,进而促进自噬过程。相反,mTOR的激活抑制Beclin1的活性,从而抑制自噬过程。因此,AMPK/mTOR信号通路可以调控Beclin1的活性,进而影响自噬体的形成和自噬过程的进行^[12]。

以往研究证实在治疗心力衰竭方面白藜芦醇具有独特优势,但是对AMPK/mTOR通路介导的自噬的调节作用,国内暂无文献报道。本研究旨在观察白藜芦醇通过AMPK/mTOR通路对HF模型大鼠心室重构的影响,探讨白藜芦醇的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 100只年龄为6周龄的成年健康雄性SD大鼠(SPF级)100只,体质量为180~270 g,由西安益丰达生物科技有限公司提供,动物生产许可证号:SCXK(陕)2023-002,动物质量合格证号:陕周至动防合字第20240001号。大鼠动物饲养在西安交通大学动物实验中心,动物使用许可证号:SYXK(陕)2023-004,饲养环境温度控制在18~26℃,相对湿度40~70%,12 h光照/12 h黑暗的周期环境下适应性饲养1周。本研究方案符合实验室动物管理与使用准则并通过西安高新医院伦理委员会审批(伦理批号:LWFB202406081)。

1.2 药物与试剂 白藜芦醇(批号:36227353,纯度:99.9%,美国Sigma-Aldrich公司);AMPK激动剂EX229(批号:HP-3726754,纯度:98%,上海瀚香生物科技有限公司);TUNEL试剂盒(批号:ab206386)、Masson试剂盒(批号:ab150669)均购自美国Abcam公司;LC3抗体(批号:2775)、Beclin1抗体(批号:3738)购自美国Cell Signaling公司;p62抗体(批号:ab109012)、AMPK抗体(批号:ab271188)、p-AMPK抗体(批号:ab133448)、Bax抗体(批号:ab32503)、Bcl-2抗体(批号:ab182858)、mTOR抗体(批号:ab134903)、p-mTOR抗体(批号:ab109268)均购自美国Abcam公司; β -actin(批号:AF0003)购自上海碧云天生物科技有限公司。

1.3 主要仪器 电子天平(型号:XS205DR,梅特勒-托利多公司);台式低速离心机(型号:micro210,梅特勒-托利多公司);多功能酶标仪(型号:Varioskan LUX,赛默飞公司);荧光倒置显微镜(型号:IX73,奥林巴斯公司);电泳仪(型号:Mini P-4,北京六一仪器厂);凝胶成像系统(型号:iBright,赛默飞

公司)。

1.4 造模与分组 将适应性饲养1周后的100只大鼠,随机分为假手术组(Sham组)、模型组(Model组)、白藜芦醇治疗组(RES组)和白藜芦醇加AMPK激动剂组(RES+EX229组),每组各25只大鼠,所有大鼠均自由摄食。各组作如下处理,进行入组。

1.5 实验给药 Sham组:将大鼠按照模型组处理方式进行打开胸腔,开胸后仅穿线不进行左冠状动脉前支结扎术。Model组:大鼠腹腔注射剂量为30 mg/kg的1%戊巴比妥钠进行麻醉后,打开胸腔,并小心地将心脏轻轻挤出,于肺动脉圆锥与左心耳下缘部位距离主动脉根部2~3 mm处进行冠状动脉左前支的结扎手术,结扎完毕后,将心脏放回原处,缝合好切口,监测大鼠呼吸顺畅后,撤去呼吸机,并给予青霉素注射预防感染,以左心室射血分数(LVEF)小于45%确定为模型建立成功。RES组:模型大鼠建立成功后的4周,给予白藜芦醇50 mg/kg灌胃^[26]。RES+EX229组:于模型构建成功后4周,给予白藜芦醇50 mg/kg灌胃基础上每日肌肉注射AMPK激动剂EX229 2.0 mg/kg^[26]。与此同时,大鼠造模成功后4周,分别给予Sham组和Model组灌胃等体积生理盐水。以上各组大鼠均为每日灌胃1次,连续8周。

1.6 观察指标

1.6.1 心室功能指标检测 以上各组大鼠末次灌胃后,禁食16 h但不禁水进行处理,断头法处死大鼠。(1)左心室质量指数(LVMI)的测定:记录大鼠体质量,同时小心取出心脏,剔除心脏周围的结缔组织和血管,并剪去右心室,称量左心室的质量,记录为LVM,根据左心室质量和大鼠体质量,计算LVMI。 $I_{LVM} = m_{LV} / m_W$,式中: I_{LVM} 为左心室质量指数; m_{LV} 为左心室质量,单位为g; m_W 为大鼠体质量,单位为g。(2)球形指数(SI)的测定:小动物多普勒超声仪对左心室长轴左心室长轴长度LVLAL和左心室短轴长度LVSA,计算 $SI = I_{LVLAL} / I_{LVSA}$,式中: I_S 为球形指数; I_{LVLAL} 为左心室长轴长度,单位为mm; I_{LVSA} 为左心室短轴长度,单位为mm。(3)左心室舒张末期容积(LVEDV)、左心室收缩末期容积(LVESV)、左心室射血分数(LVEF)、左心室内径值(LV)、左室后壁(LVPW):小动物多普勒超声仪对LVEDV、LVESV、LVEF、LV、LVPW进行测定。以上指标通过双人双盲进行测定。

1.6.2 血清炎症因子、心衰标志物和氧化应激指标的检测 以上各组大鼠末次灌胃后,禁食但不禁水进行处理,麻醉大鼠。腹主动脉取血,以2000xg的转速离心10 min,取出血清。按照指定的酶联免疫试剂盒对血清炎症因子水平白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及心衰标志物B型钠尿肽(BNP)、心房钠尿肽(ANP)及心肌肌钙蛋白T1(cT1)进行测定。按照指定的超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒和丙二醛(MDA)试剂盒对氧化应激指标SOD和MDA进行测定。

1.6.3 病理组织学染色对各组大鼠心脏病理改变的检测 (1)TTC染色测定心肌梗死面积:各组大鼠处死后,取出心脏组织,置于冰冷的PBS缓冲液中清洗,去除血迹和杂质。将心脏沿左心室长轴均匀地切成厚度为2~3 mm的薄片,确保切片完整且厚度一致。将切好的心脏薄片置于2% TTC溶液中,在37℃恒温

水浴锅中孵育15~30 min。注意避光操作,以防TTC见光分解。取出染色后的心脏薄片,用PBS缓冲液轻轻漂洗后,置于4%多聚甲醛或其他固定液中固定。随后在显微镜下观察并拍照记录染色结果。(2)苏木精-伊红(HE)染色检测心脏组织病理学改变。①固定:10%的甲醛固定液对大鼠心脏组织进行固定以确保细胞完整性和形态;②脱水和包埋:将固定好的心脏组织进行脱水处理,并进行透明和石蜡包埋;③切片:取出包埋好的石蜡组织,石蜡切片片机切片,切片厚度约为3 μm ,并固定于载玻片上;④脱蜡:脱蜡至水,去除包埋剂,恢复组织亲水性;⑤细胞核染色:苏木素染色,使细胞核着色,展现其结构与状态;⑥细胞质染色:伊红染色,为细胞质及间质成分上色,对比明显;⑦封片与拍照:脱水、透明与封片,烘干,显微镜拍照。(3)Masson染色检测心脏组织病理学改变。重复HE染色①~⑤步骤;胶原纤维染色:使用丽春红酸性品红液进行复染,使胶原纤维和肌纤维着色。随后用磷酸水溶液处理,使肌纤维颜色褪去,仅保留胶原纤维的染色。最后使用苯胺蓝液或亮绿液对切片进行再次复染,使心肌细胞着色为红色而胶原纤维保持蓝色。脱水、透明与封片:经过一系列乙醇梯度脱水、二甲苯透明处理后,使用中性树脂胶封固切片,制成永久性的病理切片供显微镜下观察。(4)TUNEL染色检测心肌细胞凋亡情况:重复HE染色检测①~⑤步骤;在样本区域上滴加平衡缓冲液(equilibration buffer),室温平衡10 min。在冰上解冻生物素化的核苷混合物,并配制TdT酶反应液。吸去样本区域周围的多余液体,滴加TdT酶反应液,确保样本区域被完全覆盖。在37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中孵育60 min,使末端标记反应发生。注意保持样本湿润,避免干燥。将切片放入2X SSC溶液中终止反应,室温放置15 min。然后用PBS洗涤3次,每次5 min。在样本上加入0.3%的过氧化氢溶液浸洗3~5 min,以抑制内源性过氧化氢酶的活性。之后用PBS洗涤3次,每次5 min,用于抑制内源酶活性;在样本上加DAB显色液,室温显色0.5~5.0 min,具体时间根据显色情况而定。显色后用蒸馏水冲洗终止显色。烘片,显微镜拍片。(5)LC3/Beclin-1免疫染色检测心肌细胞自噬情况:重复HE染色检测①~⑤步骤,滴加LC3/Beclin-1一抗稀释液(1:500),后用PBS润洗3次,去除多余的一抗。滴加二抗-PBS(1:1 000)孵育3 h,后用TBST润洗3次,去除多余的二抗。封片烘干,显微镜下拍照。

1.6.4 蛋白质印迹法(Western blotting)对凋亡和自噬蛋白及AMPK-mTOR通路蛋白表达的检测 (1)心室总蛋白提取:取处超低温冰箱中的大鼠心肌组织,洗净灭菌的显微剪将血管

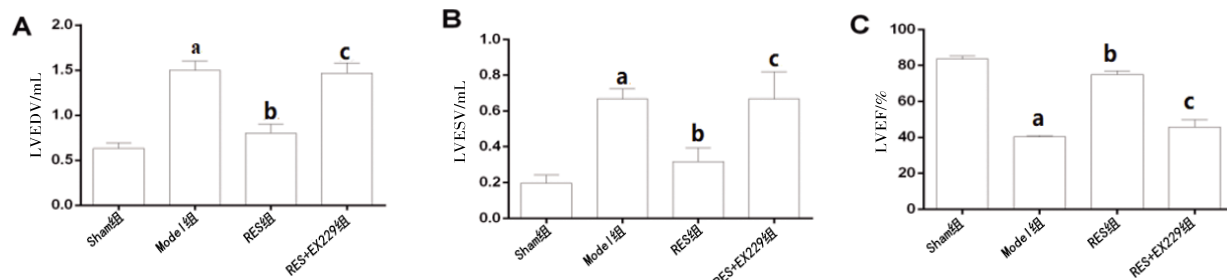
剪碎,放置研磨器中,加入约250 μL 的组织裂解蛋白提取液(RIPA),研磨棒用力研磨使心肌组织研磨成匀浆,将研磨好的匀浆放置实现准备的冰上面放置15 min。取处匀浆置于1.5 mL的EP管中,以12 000 $\times g$ 的转速在低温台式高速离心机中离心10 min后,取上清液进行BCA总蛋白定量。将定量后的蛋白加入loading buffer上样缓冲液,使用100 $^{\circ}\text{C}$ 热水进行煮沸,使蛋白变性,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中进行保存,备用。(2)SDS-PAGE蛋白分离电泳:取(1)中保存备用的总蛋白20 μL 加入预先配制好的分离胶中,接通电源设置恒定电压为80 V,当显色剂进入浓缩胶中,将电压调节至110 V,当观察到显色剂至底部时关闭电源停止电泳。(3)蛋白电转:取出(2)中的胶,事先准备用甲醇活化的PVDF膜,将胶与膜完整接触,使用电转仪设置恒定电流300 mA进行电转150 min,电转完毕后,取处PVDF膜。(4)封闭:5%的脱脂奶粉进行PVDF的封闭。(5)一抗孵育:配制各抗体稀释液(1:1 000)进行膜的抗体孵育,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件孵育过夜。使用TBST进行洗膜。(6)二抗孵育:将(5)中的膜放置于5%脱脂奶粉稀释的二抗稀释液(1:5 000)孵育2 h后,TBST进行洗脱。(7)显色:凝胶成像系统对PVDF进行显色,获取合适的图片,通过ImageJ进行分析各蛋白条带的灰度值。

1.7 统计学方法 所有的实验数据采用“均数 $\pm$ 标准差”($\bar{x}\pm s$)表示,SPSS 24.0统计分析软件对数据进行处理分析,采用独立样本 t 检验对两组间数据进行比较,多组数据比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 白藜芦醇对HF大鼠心室功能的影响 与Sham组相比,Model组大鼠LVEDV、LVESV高于Sham组,LVEF低于Sham组,差异均有统计学意义($P<0.05$);与Model组大鼠相比,RES组大鼠LVEDV、LVESV低于Model组,LVEF高于Model组,差异均有统计学意义($P<0.05$);与RES组大鼠相比,RES+EX229组LVEDV、LVESV高于RES组,LVEF低于RES组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结果如图1所示,结果提示白藜芦醇能够改善HF大鼠心室功能,而RES+AMPK激动剂(EX229)无法逆转HF大鼠心室功能。以上结果表白藜芦醇可能通过抑制AMPK相关信号通路改善HF心室功能。

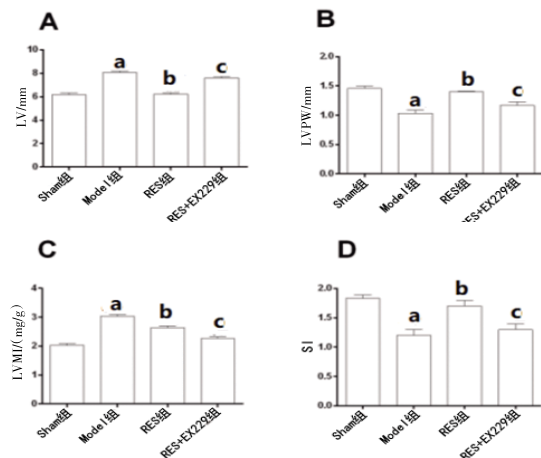
2.2 白藜芦醇对HF大鼠心室重构的影响 与Sham组相比,Model组大鼠LV、LVPW、LVMI高于Sham组,SI低于Sham组,差异均有统计学意义($P<0.05$);与Model组大鼠相比,RES组大鼠LV、LVPW、LVMI低于Model组,SI高于Model组,差异均有统计学意义($P<0.05$);与RES组大鼠相比,RES+EX229组LV、LVPW、



注:A.各组LVEDV比较;B.各组LVESV比较;C.各组LVEF比较。与Sham组比较,^a $P<0.01$;与Model组比较,^b $P<0.01$;与RES组比较,^c $P<0.01$ 。

图1 各组大鼠心室功能比较

LVMi高于RES组,SI低于RES组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结果如图2所示,结果提示白藜芦醇能够改善HF大鼠心室重构,而RES+AMPK激动剂(EX229)无法逆转HF大鼠心室重构。以上结果表白藜芦醇可能通过抑制AMPK相关信号通路改善HF心室重构。



注:A.各组LV比较;B各组LVPV比较;C各组LVMi比较;D各组SI比较。与Sham组比较,^a $P<0.01$;与Model组比较,^b $P<0.01$;与RES组比较,^c $P<0.01$ 。

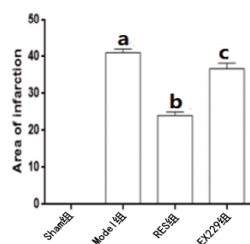
图2 各组心室重构比较

2.3 白藜芦醇对HF大鼠心肌组织病理学改变的影响 研究分别通过TTC染色、HE染色及Masson染色对各组大鼠心肌组织心肌梗死面积、病理改变及心肌胶原沉积情况进行评估。结果显示,与Sham组相比,Model组的心肌梗死面积,病理程度、心肌胶原纤维程度明显提高,差异有统计学意义($P<0.05$);与Model组相比,RES组心肌梗死面积,病理程度、心肌胶原纤维程度明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与RES组相比,RES+EX229组心肌梗死面积,病理程度、心肌胶原纤维程度明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。结果如图3所示,以上结果表白藜芦醇可能通过抑制AMPK相关信号通路改善HF心肌组织梗死,降低心肌组织病理学改变及心肌组织胶原沉积。

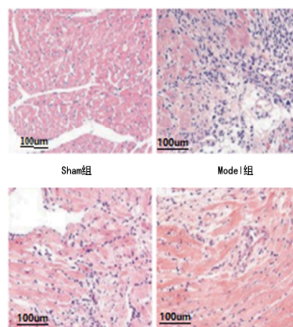
2.4 白藜芦醇对HF大鼠心肌细胞凋亡的影响 研究首先通过TUNEL染色对各组大鼠心肌组织进行固定,与Sham组相比,Model组心肌细胞凋亡率明显增加,差异有统计学意义($P<$



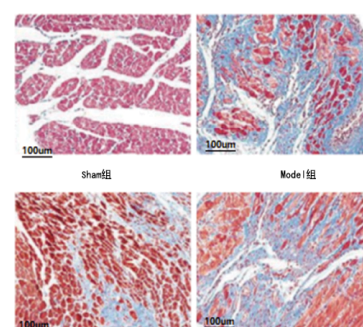
A



B



C

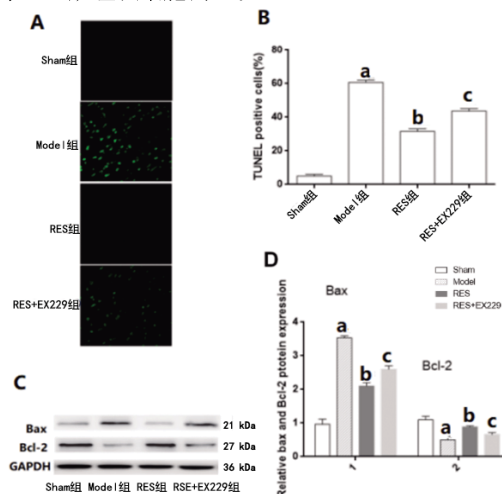


D

注:A.心肌组织TTC染色;B.心肌组织梗死面积定量;C.心肌组织HE染色;D.各组大鼠心肌组织Masson染色。与Sham组比较,^a $P<0.01$;与Model组比较,^b $P<0.01$;与RES组比较,^c $P<0.01$ 。

图3 各组大鼠心肌组织病理变化

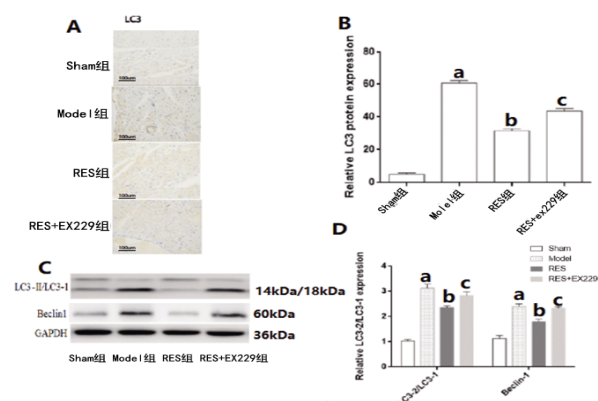
0.05);与Model组相比,RES组的心肌细胞凋亡率显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与RES组相比,RES+EX229组心肌细胞凋亡率显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。与此同时Western blotting法对各组心肌组织进行心肌凋亡蛋白Bcl-2、Bax进行检测,结果与TUNEL染色结果一致。结果如图4所示。以上结果表明,白藜芦醇可能通过抑制AMPK相关信号通路抑制HF心肌组织细胞凋亡。



注:A.各组大鼠心肌细胞凋亡率比较(400×);B.各组大鼠心肌细胞凋亡定量分析;C.各组大鼠心肌组织凋亡蛋白表达情况;D.定量分析各组大鼠心肌组织凋亡蛋白表达。与Sham组比较,^a $P<0.01$;与Model组比较,^b $P<0.01$;与RES组比较,^c $P<0.01$ 。

图4 TUNEL染色和Western blotting对大鼠心肌细胞凋亡情况进行分析

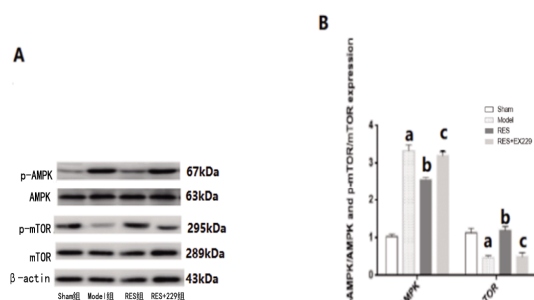
2.5 白藜芦醇对HF大鼠心肌细胞自噬的影响 研究首先通过免疫组化染色对大鼠心肌组织细胞进行染色,与Sham组相比,Model组心肌细胞自噬蛋白LC3(微管关键蛋白1轻链3)表达显著提高,差异有统计学意义($P<0.05$);与Model组相比,RES组LC3表达量显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与RES组相比,RES+EX229组LC3表达量显著提高,差异有统计学意义($P<0.05$)。与此同时通过Western blotting对大鼠心肌组织的LC3和Beclin-1蛋白表达情况进行检测,结果与免疫组化染色一致。结果如图5所示。以上结果表明,白藜芦醇可能通过抑制AMPK相关信号通路抑制HF心肌组织细胞自噬。



注:A.各组大鼠心肌细胞自噬情况比较(400×);B.各组大鼠心肌细胞LC3表达情况定量分析;C.各组大鼠心肌组织自噬蛋白表达情况。D.定量分析各组大鼠心肌组织自噬蛋白表达。与Sham组比较,^a $P<0.05$;与Model组比较,^b $P<0.05$;与RES组比较,^c $P<0.05$ 。

图5 免疫组化染色和Western blotting对各组大鼠心肌细胞凋亡情况进行分析

2.6 白藜芦醇对HF大鼠心肌细胞AMPK/mTOR通路的影响 提取各组大鼠心肌组织蛋白,Western blotting法对各组大鼠AMPK和mTOR蛋白表达情况进行检测。结果显示,与Sham组相比,Model组p-AMPK/AMPK表达显著提高,p-mTOR/mTOR表达显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与Model组相比,RES组p-AMPK/AMPK表达显著降低,p-mTOR/mTOR表达显著提高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与RES组相比,RES+EX229组p-AMPK/AMPK表达显著提高,p-mTOR/mTOR表达显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),结果如图6所示。以上结果表明,白藜芦醇可能通过抑制AMPK相关信号通路改善HF相关表型。



注:A.各组心肌细胞AMPK和mTOR的表达;B.各组心肌细胞AMPK和mTOR的定量分析。与Sham组比较,^a $P<0.05$;与Model组比较,^b $P<0.05$;与RES组比较,^c $P<0.05$ 。

图6 Western blotting法分析各组心肌细胞 AMPK 和 mTOR 的表达

3 讨 论

根据最新估计,全世界有超过6 400万例HF患者,患病率为1%~2%,HF的死亡率和预后较差,即使接受最佳的药物治疗,5年生存率仅为50%^[13-14]。HF目前治疗药物疗效有限,无法全面控制病情进展。其次,部分患者对药物耐受性差,出现

不良反应。再者,患者依从性低,影响治疗效果。联合治疗虽可增强疗效,但方案复杂,难以精准实施。经济负担重也限制了部分患者的治疗选择。同时,目标剂量的实现往往因个体差异而困难重重。最后,在特殊情况如老年患者或伴有多种疾病时,目前的临床药物治疗的决策和处理尤为棘手^[14-15]。

白藜芦醇具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、延长寿命等多种生物学效应。特别是在心血管系统中,白藜芦醇被证实能够对抗心肌缺血-再灌注损伤、舒张血管、抗动脉粥样硬化,对防治冠心病和心力衰竭具有潜在作用^[16]。有研究^[17]显示,通过腹主动脉缩窄术(TAC)构建HF大鼠模型后,给予白藜芦醇连续灌胃,可以显著改善大鼠的左心室舒张末期内径和左心室收缩末期内径,增加LVEF和左心室短轴缩短率,从而减轻心室重构程度。本研究结果显示,白藜芦醇能够改善冠状动脉左前支的结扎手术诱导的HF模型大鼠的LVEDV、LVESV、LVEF、LV、LVPW、SI等心室功能指标。与以往研究^[14-16]相比,本研究的心室功能指标更为全面,进一步补充论证以往研究的可靠性。有研究^[17]表明,白藜芦醇能够剂量依赖性地降低大鼠心肌冠脉结扎后ST段抬高,缩小心肌梗死面积,这一效果可能与白藜芦醇上调Bcl-2蛋白表达,下调Fas、Bax蛋白表达,从而抑制心肌细胞凋亡有关。研究^[18]表明,白藜芦醇能够通过多种途径抑制纤维化相关分子的表达,如转化生长因子β1(TGF-β1),从而减少心肌间质的胶原纤维沉积。本研究结果显示,白藜芦醇能够降低HF模型大鼠心肌梗死面积,改善心肌细胞病理状态,降低心肌胶原蛋白沉积。此外研究还通过TUNEL染色和Western blotting法对各组心肌细胞的凋亡情况和凋亡蛋白(Bax和Bcl-2)进行检测,结果显示白藜芦醇能够降低心肌细胞凋亡,结果与文献报道趋势一致^[19-20]。本研究从组织病理学、分子生物更为全面揭示白藜芦醇是通过抑制心肌细胞凋亡从而改善心肌梗死面积和胶原沉积。有研究^[21-22]显示,在HF的早期阶段,自噬可能通过降解受损的线粒体、蛋白质等细胞成分,减轻心肌细胞的损伤。这种保护机制有助于减少炎症反应和细胞凋亡,从而延缓心力衰竭的进展。然而,在心力衰竭的后期或某些特定条件下,自噬的过度激活可能导致心肌细胞过度消耗能量和营养物质,从而加剧细胞损伤。这种过度自噬可能通过激活凋亡途径导致心肌细胞死亡。有研究^[23-24]表明,白藜芦醇预处理可激活心肌细胞自噬,使心肌细胞提前进入应激防备状态,从而缓解缺氧/复氧损伤所致的自噬流过度活化,调节适度自噬。这种激活作用可能通过促进自噬相关蛋白(如Beclin-1、LC3等)的表达来实现。然而当自噬过度激活引发心肌细胞损伤时,白藜芦醇能够通过其抗氧化、抑制活性氧释放等机制来抑制过度自噬,从而保护心肌细胞。本研究结果显示,白藜芦醇抑制了心肌细胞的自噬,与相关文献^[21-22]报道一致。AMPK/mTOR通路的平衡调控确保了细胞能够根据外界环境的变化灵活调整自噬水平,以维持细胞内的稳态和生存能力^[23]。AMPK/mTOR通路的异常调控与多种疾病的发生和发展密切相关^[24]。例如,在肿瘤、神经退行性疾病、代谢性疾病等中,AMPK/mTOR通路的失衡往往导致自噬水平的异常变化,进而促进疾病的发展^[25]。有研究^[26]显示,附萸汤具有改善心力衰竭大鼠心室重构作

用,其机制可能与抑制AMPK/mTOR信号通路介导的心肌细胞自噬有关。综上,抑制AMPK/mTOR信号通路介导的心肌细胞自噬是HF疾病治疗的重要靶点。然而白藜芦醇能否抑制AMPK/mTOR信号通路介导的心肌细胞自噬暂无文献报道。笔者研究首次揭示了白藜芦醇通过抑制AMPK/mTOR信号通路介导的心肌细胞自噬,从而改善HF模型大鼠心室重构,具有创新性。

综上所述,白藜芦能够改善心力衰竭模型大鼠的心室功能、心脏组织病理学改变,抑制心肌细胞凋亡,改善心室重构,可能与白藜芦醇抑制AMPK/mTOR自噬信号通路过度激活有关。

参考文献

- [1] DANDEL M. Role of Echocardiography in the management of patients with advanced (stage D) heart failure related to nonischemic cardiomyopathy[J]. *Reviews in Cardiovascular Medicine*, 2022, 23(6): 214.
- [2] TANG H, DAN H, GAO Z, et al. Specificity and sensitivity of cardiac color doppler ultrasound in clinical diagnosis of patients with chronic heart failure[J]. *Chinese Journal of Clinicians(Electronic Edition)*, 2022, 16(7): 676–679.
- [3] HUANG Y T, ZHANG K, WANG X, et al. Reflections on prevention and treatment of heart failure with preserved ejection fraction using traditional Chinese medicine [J]. *SCIENTIA SINICA Vitae*, 2022, 52(6): 840–848.
- [4] SILBERT B, SHAH A, DEMBD L. Left ventricular assist devices for treatment of refractory advanced heart failure: The Western Australian experience [J]. *Internal medicine journal*, 2024, 54(3): 438–445.
- [5] MA H H, MA Y M. Dapagliflozin inhibits ventricular remodeling in heart failure rats by activating autophagy through AMPK/mTOR pathway[J]. *Comput Math Methods Med*, 2022, (23)2022: 6260202.
- [6] ZHANG W, QIAN S H, TANG B, et al. Resveratrol inhibits ferroptosis and decelerates heart failure progression via Sirt1/p53 pathway activation[J]. *J Cell Mol Med*, 2023, 27(20): 3075–3089.
- [7] 熊凤梅, 刘瑞萍, 郭焕利, 等. 白藜芦醇通过抑制细胞凋亡和自噬减轻川崎病诱发的心肌损伤[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2021, 46(10): 1102–1108.
- [8] 刘松. 白藜芦醇通过DJ-1/MEKK1/JNK途径抑制自噬对抗心肌缺血再灌注损伤[D]. 南昌: 南昌大学, 2023.
- [9] SHOURAV M M I, GOSWAMI R M, PHAM S M, et al. Trends and predictors of intracranial hemorrhage in patients with advanced heart failure on left ventricular assist device from 2005 to 2014 in the United States[J]. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 2023, 32(11): 107340–107340.
- [10] AKŞIT E, KÜÇÜK U, TAYLAN G. The increasing importance of the ablation therapy in patients with atrial fibrillation and heart failure with preserved ejection fraction[J]. *Europace*, 2023, 26(1): 112–117.
- [11] OKADA S, KATO M, TAKEDA Y, et al. Certified nurses' practice of palliative care for later-stage elderly patients with end-stage heart failure[J]. *Journal of Japan Society of Nursing Research*, 2023, 46(1): 19–23.
- [12] NOVELLO G, BURSI F, BONAZZI C, et al. Lack of correlation between levels of surfactant B and NT-pro-BNP in acute heart failure: An admission to discharge study[J]. *European Heart Journal*, 2023, 12(14): 112–116.
- [13] LIU S, REN J M, LIU S Y, et al. Resveratrol inhibits autophagy against myocardial ischemia-reperfusion injury through the DJ-1/MEKK1/JNK pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 15(951): 175748.
- [14] ZHENG M S, BAI Y L, SUN X Y, et al. Resveratrol reestablishes mitochondrial quality control in myocardial ischemia/reperfusion injury through Sirt1/Sirt3–Mfn2–Parkin–PGC-1 α pathway[J]. *Molecules*, 2022, 27(17): 5545.
- [15] 章立冰, 徐尚, 金其贯, 等. 白藜芦醇干预运动性疲劳大鼠心室重构的作用机制[J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(16): 2587–2592.
- [16] 何忠开, 郑玉菡, 姚峰, 等. 白藜芦醇对急性心肌梗死大鼠心肌保护及Akt/JNK3/caspase-3信号通路的影响[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2018, 10(11): 1310–1314, 1321.
- [17] JOJIMA K, TANAKA A, NODE K. Resveratrol supplementation: A therapeutic potential for cardiac remodeling in hypertensive heart disease[J]. *Hypertension Research*, 2023, 46(6): 1596–1598.
- [18] THIRUNAVUKKARASU M, PENUMATHSA S V, KONERU S, et al. Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2007, 43(5): 720–729.
- [19] DAS S, CORDIS G A, MAULIK N, et al. Pharmacological preconditioning with resveratrol: Role of CREB-dependent Bcl-2 signaling via adenosine A3 receptor activation[J]. *American Journal of Physiology Heart & Circulatory Physiology*, 2005, 288(1): H328–H335.
- [20] BHIMARAJ A. Remote monitoring of heart failure patients[J]. *Methodist De Bakey cardiovascular journal*, 2013, 9(1): 26–31.
- [21] 缪美琪, 韩宇博, 刘莉. 线粒体自噬在心力衰竭中的研究进展[J]. *医学综述*, 2023, 29(4): 630–634.
- [22] CHEN Y F, QIU Q, WANG L, et al. Quercetin ameliorates myocardial injury in diabetic rats by regulating autophagy and apoptosis through AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2024, 52(3): 841–864. (下转第40页)

- [5] 欧阳晓霞,吴华.大承气汤加减联合西医治疗肠梗阻的效果分析[J].中国现代药物应用,2023,17(2):6-10.
- [6] 程华初,徐琦,杨茜芸,等.大承气汤治疗肠梗阻的临床研究进展[J].中医药导报,2021,27(11):142-146.
- [7] 孔祥辉.大承气汤治疗外科术后早期炎症性肠梗阻的临床效果观察[J].北方药学,2023,20(12):62-64.
- [8] 任龙艳,杨亮,曾真,等.益肾结透合剂制备工艺研究和验证[J].贵州科学,2024,42(6):41-45.
- [9] 李力,何靓,刘蔚,等.清血解毒合剂的制备工艺及质量标准研究[J].湖北中医药大学学报,2023,25(4):33-37.
- [10] 李兴海,李萌,刘仕杰,等.乌司他丁对粘连性肠梗阻大鼠的作用机制研究[J].解放军医药杂志,2022,34(1):14-18.
- [11] YUAN M L, YANG Z, LI Y C, et al. Comparison of different methods of intestinal obstruction in a rat model[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(5):692-705.
- [12] 李禹呈,杨拯,袁梦郎,等.新方法建立大鼠不完全性肠梗阻模型的实验研究[J].四川动物,2013,32(2):276-279, 156.
- [13] 龚颖,董越,张春彬,等.基于网络药理学和动物实验探讨增味承气方治疗肠梗阻作用机制[J/OL].亚太传统医药, 2025:1-9[2025-07-12].<https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CJFD&dbname=CJFD&filename=YTCT20250701008>.
- [14] 李敏,林思思,刘胜远,等.中药大承气汤改良方对术后肠梗阻小鼠胃肠功能的影响及机制研究[J].中国病理生理杂志,2021,37(3):466-474.
- [15] 文建文,孙雪林,徐奎,等.通痹止痛合剂工艺优化和质量标准的研究[J].中国民族民间医药,2025,34(2):65-69.
- [16] 贾传春,马力.中药合剂制备工艺探讨[J].基层中药杂志, 1995,9(2):15-16.
- [17] 王鹤.盐酸洛哌丁胺致老年腹泻患者肠梗阻1例[J].中华保健医学杂志,2011,13(4):294.
- [18] 于林枫,朱安龙.术后麻痹性肠梗阻的发病机制及防治策略[J].医学综述,2019,25(23):4716-4719,4725.
- [19] 颜帅,汪小辉,王晓鹏,等.大黄-桃仁配伍对粘连性肠梗阻大鼠炎症细胞因子及肠黏膜屏障的影响[J].国际中医
- 中药杂志,2021,43(2):150-155.
- [20] 邱佳惠,陈萌.基于PI3K/Akt信号通路探索“化瘀通便汤”对慢传输型便秘模型大鼠的作用机制[J].江苏中医药, 2025,57(8):70-75.
- [21] TANAKA T, NARAZAKI M, KISHIMOTO T. Interleukin (IL-6) immunotherapy[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, 10(8):a028456.
- [22] 赵菲菲,高会芳,杨桂玲.D-二聚体和白细胞介素-6在溃疡性结肠炎患者中的表达及其与肠道菌群的相关性研究[J].中国肛肠病杂志,2025,45(1):44-47.
- [23] LOPEZ-CASTEJON G, BROUGH D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2011, 22(4):189-195.
- [24] BRADLEY J R. TNF-mediated inflammatory disease[J]. J Pathol, 2008, 214(2):149-160.
- [25] JAYARAMAN A, HTIKE T T, JAMES R, et al. TNF-mediated neuroinflammation is linked to neuronal necroptosis in Alzheimer's disease hippocampus[J]. Acta Neuropathol Commun, 2021, 9(1):159.
- [26] 钟佳琳,郑立,贺花,等.PI3K/Akt信号通路相关的生物学调控机制研究进展[J].基因组学与应用生物学,2019,38(1):143-147.
- [27] 徐利本,吴朝阳,王远东.PI3 K/Akt信号传导通路在肿瘤发生发展及治疗中的作用[J].现代肿瘤医学,2021,29(1):177-180.
- [28] 沈浩伟,夏长军,陈剑,等.黄芪多糖通过PI3K-Akt信号通路对大鼠术后肠梗阻的改善作用[J].世界中西医结合杂志,2023,18(5):915-918,923.
- [29] 曹婷婷,郑东林,商磊凌,等.肠病药方调控PI3K/AKT/NF- κ B信号通路改善溃疡性结肠炎的研究[J].贵州医科大学学报,2024,49(5):672-677.
- [30] 程扬,宾东华,尹园缘,等.参苓白术散对克罗恩病大鼠肠道炎症及PI3K/Akt信号通路的影响[J].中医药导报,2024, 30(4):30-34.

(收稿日期:2025-01-13 编辑:时格格)

(上接第33页)

- [23] WANG T, LI M M, DONG Z, et al. P3H4 Regulates apoptosis and autophagy of breast cancer cells via BCL-2/BAX/Caspase-3 and AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathways[J]. Molecular Biology, 2024, 58(4):646-657.
- [24] MARCONDES-DE-CASTRO I A, REIS-BARBOSA P H, MARINHO T S. AMPK/mTOR pathway significance in healthy liver and non-alcoholic fatty liver disease and its progression [J]. Journal of gastroenterology and hepatology, 2023, 38(11):1868-1876.
- [25] CHEN Y F, QIU Q, WANG L, et al. Quercetin ameliorates myocardial injury in diabetic rats by regulating autophagy and apoptosis through AMPK/mTOR signaling pathway[J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2024, 52(3):841-864.
- [26] 马金苗,项志兵,朱杰,等.附黄汤改善心力衰竭大鼠的心室重构:基于抑制AMPK/mTOR通路介导的细胞自噬[J].南方医科大学学报,2023,43(3):466-473.

(收稿日期:2025-01-02 编辑:李海洋)