

凌霄花对小鼠心衰后心脏损伤保护机制的探索研究

刘志强¹, 王可欣¹, 杨代晓²

1. 济宁医学院药学院 (山东日照 276500)

2. 广东省生物制品与药物研究所 (广州 510000)

【摘要】目的 对凌霄花治疗小鼠心衰后心脏损伤的疗效及作用机制进行研究。**方法** 取 30 只小鼠随机分成假手术组、模型组、凌霄花组 3 组, 对模型组和凌霄花组小鼠进行主动脉弓缩窄造成心衰模型。造模后凌霄花组灌胃 10 mg/kg 的凌霄花总黄酮提取物, 假手术组及模型组灌胃等量生理盐水, 持续灌胃 1 个月后对 3 组小鼠的心脏功能、蛋白相对表达量、病理切片、血生化指标、炎症因子、细胞凋亡等情况进行比较分析。**结果** 与模型组相比, 凌霄花组显著改善心衰小鼠心功能, 表现为射血分数 (EF)、左室短轴缩短率 (FS)、心输出量 (CO) 显著提升, 左室前壁 (LVAW) 和左室后壁 (LVPW) 厚度及心脏重量/胫骨长度比 (HW/TL) 显著降低 ($P < 0.05$); 凌霄花组蛋白激酶 B (Akt)、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2) 蛋白相对表达量较模型组显著升高, Smad、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$); 凌霄花组心肌细胞排列趋于规整, 炎症细胞减少, 胶原纤维沉积显著减轻; 凌霄花组 Notch 同源物 1 (NOTCH1)、Split 多毛增强子 1 (HES1)、磷酸酶张力蛋白同源物 (PTEN)、转化生长因子- β (TGF- β) 表达水平均低于模型组 ($P < 0.05$); 血生化检测显示, 凌霄花组血清中丙二醛 (MDA)、乳酸脱氢酶 (LDH)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 及促炎因子白细胞介素 (IL)-6 水平显著降低, 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性及抗炎因子 IL-10、内皮标志物 CD31 表达显著升高 ($P < 0.05$)。**结论** 凌霄花通过激活 PTEN/磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/Akt 通路抑制心肌凋亡, 阻断 TGF- β /Smad 信号减轻纤维化, 具有心脏保护潜力, 为中药抗心衰治疗提供实验依据。

【关键词】 凌霄花; 心衰; 主动脉狭窄; 作用机制**【中图分类号】** R285.5**【文献标识码】** A

Exploratory study on the protective mechanism of Campsis flos against cardiac injury after heart failure in mice

LIU Zhiqiang¹, WANG Kexin¹, YANG Daixiao²

1. College of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276500, Shandong Province, China

2. Guangdong Province Institute of Biological Products and Materia Medica, Guangzhou 510000, China

Corresponding author: YANG Daixiao, Email: yangdaix123@163.com

【Abstract】Objective To investigate the therapeutic efficacy and mechanism of action of Campsis flos on cardiac injury in mice with heart failure (HF). **Methods** Thirty mice were

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202412078

基金项目: 广东省医学科研基金项目 (B2023031); 广东省中医药局科研项目 (20242011); 卫生健康平台科技创新人才项目 (0620220104); 广东省科技计划项目 (2023B1212010010)

通信作者: 杨代晓, 博士, 主管药师, Email: yangdaix123@163.com

https://yxqy.whuzhmedj.com

randomly divided into three groups: sham operation group, model group, and Campsis flos group. HF models were established in the model group and Campsis flos group via aortic arch constriction. After modeling, the Campsis flos group received intragastric administration of Campsis flos total flavonoid extract (10 mg/kg), while the sham operation group and model group received an equivalent volume of saline. After one month of continuous intragastric administration, comparative analyses were performed on cardiac function, relative protein expression levels, pathological sections, blood biochemical indicators, inflammatory factors, and apoptosis across the three groups. **Results** Compared with the model group, the Campsis flos group showed significant improvement in cardiac function in HF mice. This was evidenced by significantly increased ejection fraction (EF), fractional shortening (FS), and cardiac output (CO), along with significantly decreased left ventricular anterior wall thickness (LVAW), left ventricular posterior wall thickness (LVPW), and heart weight-to-tibia length ratio (HW/TL) ($P < 0.05$). The expression levels of Akt and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) proteins were significantly higher, while the expression levels of Smad and Bcl-2-associated X protein (Bax) were significantly lower in the Campsis flos group compared to the model group ($P < 0.05$). The myocardial cells in the Campsis flos group exhibited a more organized arrangement, reduced inflammatory cell infiltration, and significantly attenuated collagen fiber deposition. The expression levels of Notch homolog (NOTCH1), hairy and enhancer of Split 1 (HES1), phosphatase and tensin homolog (PTEN), and transforming growth factor- β (TGF- β) were significantly lower in the Campsis flos group than in the model group ($P < 0.05$). The blood biochemical analysis revealed that the serum levels of malondialdehyde (MDA), lactate dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST), and the pro-inflammatory cytokine interleukin (IL)-6 were significantly reduced in Campsis flos group ($P < 0.05$). Conversely, the activity of superoxide dismutase (SOD), the levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10, and the expression of the endothelial marker CD31 were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Campsis flos inhibits myocardial apoptosis by activating the PTEN/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway, blocks the TGF- β /Smad signaling pathway, and alleviates fibrosis, which has the cardioprotective potential and provides experimental evidence supporting its use in traditional Chinese medicine (TCM) for anti-heart failure therapy.

【Keywords】 Campsis flos; Heart failure; Aortic stenosis; Mechanism of action

心力衰竭作为心脏泵血功能失代偿的终末阶段，其病理机制涉及多重代偿与失代偿的动态演变过程。长期压力负荷过载可引发心肌适应性肥厚，表现为心肌细胞体积增大、纤维增粗及收缩力增强，这种代偿机制虽能暂时维持正常循环，但伴随心肌耗氧量增加和相对供血不足，最终导致心肌细胞凋亡、电生理紊乱及能量代谢障碍^[1-3]。值得注意的是，心室重构的核心病理改变—心肌纤维化，源于心脏成纤维细胞在转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 等促纤维化因子刺激下过度活化，导致细胞外基质异常沉积和瘢痕组织增生^[4-5]。这种病理性修复过程受多重信号通路调控，包括促进凋亡的 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 相关 X 蛋白 (associated X protein, Bax) 与抗凋亡 Bcl-2 的平衡调控，以及磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol

3-kinase, PI3K) -蛋白激酶 B (Akt) 通路对细胞生长、代谢的调节作用^[6]。近年来研究发现，Notch 同源物 1/Split 多毛增强子 1 (Notch homolog/hairy and enhancer of Split 1, NOTCH1/HES1) 信号通路在心肌重构中发挥重要作用，其通过调控细胞增殖分化参与纤维化进程。同时， α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 作为肌成纤维细胞活化的标志物，其持续表达与纤维化进展密切相关^[7]。在分子层面，TGF- β 1/Smad 信号级联反应通过激活 Smad2/3 等下游介质，促进胶原蛋白合成，而 CD31 作为内皮标志物的动态变化则反映血管新生与炎症清除的平衡状态^[8-9]。这些发现为寻找干预靶点提供了新方向。

中医药在改善心功能方面展现独特优势，现有临床常用药物如附子、黄芪通过增强心肌收缩力发挥作用，芪苈强心胶囊等复方制剂则体现多

靶点调控特点^[10]。其中,凌霄花作为传统活血化瘀中药,其总黄酮成分被证实具有抗氧化应激、抑制炎症因子释放及调节细胞凋亡等作用。基础研究显示,凌霄花提取物可通过改善微循环障碍减轻心肌缺血,其黄酮类成分对肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 (interleukin, IL)-6 等炎症介质具有显著抑制作用^[11-12]。特别值得注意的是,动物实验发现凌霄花能下调心肌组织 TGF- β 1 表达水平,提示其可能干预心肌纤维化关键通路^[13]。但现有研究多集中于血管扩张效应,对其在压力超负荷性心衰中的保护机制,特别是对心肌细胞凋亡与纤维化通路的调控作用尚未阐明。

基于此,本研究拟建立压力超负荷诱导的心衰小鼠模型,系统评价凌霄花提取物对心功能参数及心室重构的影响。通过检测心肌组织 Bcl-2/Bax 比值、PI3K-Akt 通路活化状态及 TGF- β 1/Smad 信号转导变化,结合 α -SMA、CD31 等组织学标记物分析,旨在揭示凌霄花抗心肌纤维化的分子机制,为拓展中药在心衰治疗中的应用提供实验依据。该研究不仅有助于阐明传统中药的现代化作用机理,更为开发具有多靶点干预特性的抗心衰药物奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

Vevo 3100LT 小动物超声成像系统(加拿大 VisualSonics 公司); DZKW-17-2 酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司]; DXR3 激光共聚焦仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; FL1000 超灵敏多功能成像系统(杭州申花科技有限公司); ABI Veriti 96 荧光定量 PCR 仪(上海木森生物科技有限公司); BX53 显微镜(日本奥林巴斯)。

1.2 主要药品与试剂

凌霄花(产地:天津)购自亳州市三淞堂药业有限公司,经济宁医学院药学院刘玉凤副教授检验符合《中国药典(2020年版)》相关规定;戊巴比妥钠(上海依赫生物科技有限公司,批号:20221011);多聚甲醛(天津奥普升化工有限公司,批号:20230124);二甲苯(北京高纯科技有限公司,批号:20220914);RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术股份有限公司,批号:R0010-20230601);苯甲基磺酰氟

(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:20230306);磷酸酶抑制剂(上海源叶生物科技有限公司,批号:20220701);高效切片石蜡(上海华永石蜡有限公司,批号:20230102);苏木素-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色试剂盒(北京雷根生物技术有限公司,批号:20211214);MASSON 染色试剂盒(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:20221005);天狼猩红染色试剂盒(上海麦克林生化科技股份有限公司,批号:20221121);脱蜡液(无锡市江原实业技贸总公司,批号:20230425);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD, 批号:20221125)、丙二醛(malondialdehyde, MDA 批号:20230230)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH, 批号:20230215)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate transaminase, AST, 批号:20230426)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;SABC 免疫组化染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号:20221230);反转录试剂盒(上海麦克林生化科技股份有限公司,批号:20230119);PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 动物

昆明小鼠 30 只,清洁级,体重 20~26 g,鼠龄 2~3 个月,雌雄均可,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,许可证号:SCXK(鲁)20190003。动物饲养于济宁医学院 SPF 级动物房,采用饲养环境明暗 12 h 循环,温度 22~25℃,相对湿度 50%~70%。本实验经济宁医学院动物伦理委员会批准[伦理审批号:JNMC-2022-DW-081]。

1.4 方法

1.4.1 凌霄花总黄酮提取

凌霄花中总黄酮类物质的提取采用水提醇沉法^[14]。取凌霄花干燥花朵 1 000 g,用粉碎机粉碎成细粉,将粉碎后的药材置于容器中,加入 10 倍量(10 L)的蒸馏水,室温浸泡 6 h,将浸泡后的药材连同浸泡液一并转移至提取罐中,进行 2 次热回流提取。第 1 次加热回流提取 1.5 h,提取温度控制在 85~90℃,提取结束后,趁热用 4 层纱布过滤,收集滤液;第 2 次向滤渣中加入 8 倍量的蒸馏水,加热回流提取 1.5 h,提取温度同上;过滤,合并 2 次滤液。将预处理后的洗脱液进行减压浓缩,浓缩至原体积的 1/5 左右,浓缩液中

缓慢加入 95% 乙醇，边加边搅拌，使溶液中乙醇浓度最终达到 80% 以上。将混合液置于 4℃ 冰箱中静置 24 h 促进杂质沉淀；静置完成后，用抽滤装置过滤，收集滤液，弃去沉淀，将滤液进行减压浓缩，回收乙醇，即得凌霄花总黄酮提取物 200 mL（总黄酮的含量为 1.28 mg/mL）。

1.4.2 小鼠心衰模型建立及给药方法

30 只小鼠随机均分为 3 组，即假手术组、模型组、凌霄花组。所有小鼠于手术前 1 天禁食，配制 0.3% 戊巴比妥钠（现配现用），按 0.2 mL/10 g 腹腔注射麻醉；待小鼠呼吸平稳，肌肉松弛，钳夹后肢无反应，角膜反射消失后即麻醉成功；将其仰卧于小鼠手术台上并固定好四肢和上颌。小鼠心衰模型的建立采用主动脉弓缩窄方法^[15]。将小鼠仰卧于手术台上并固定好四肢和上颌。模型组和凌霄花组小鼠剪开小鼠颈、胸部皮肤，在左上胸骨边缘第二肋间隙处建立切口；插入胸部牵开器以扩宽创口，便于后续操作；分离胸腺与暴露主动脉弓；在扩宽的创口内，小心分离胸腺，以暴露主动脉弓及其分支；主动脉弓穿线与结扎：使用 6-0 线对主动脉弓部进行穿线，并在穿线后打结；将 26G 垫针放置于主动脉旁，并扎紧线结；快速并轻柔地取出针头，以获得直径约为 0.4 mm 的狭窄，使主动脉保持 65%~70% 的收缩。术后，鼠笼内垫保温毯，观察呼吸和活动情况。造模完成第 2 天行心脏彩超检测，射血分数（ejection fraction, EF）<50% 表示心衰造模成功。假手术组小鼠接受与模型组、凌霄花组完全相同的外科手术流程，包括麻醉、开胸、主动脉弓暴露与分离等操作，未进行缩窄，最终缝合伤口。造模成功后凌霄花组灌胃凌霄花总黄酮提取物（10 mg/kg, 0.3 mL），假手术组和模型组灌胃等量的生理盐水（0.3 mL），1 次/d，持续 1 月。有 6 只建模小鼠意外死亡，因此将建模成功且存活 14 只小鼠随机分为模型组和凌霄花组，且考虑到 3 组样本的均衡性，故每组最终纳入分析的小鼠数量各为 7 只。

1.4.3 样本收集与处理

小鼠称重后，经眼球取血用于血生化检测。随后采用颈椎脱臼法处死小鼠，立即沿胸骨正中线快速剪开胸腔（约 30 s 内完成），暴露心脏；迅速剪断连接的大血管，完整摘取心脏；将取出的心脏立即浸入预冷的 PBS 缓冲液中，轻柔挤

压冲洗以去除残留血液；用滤纸吸干心脏表面液体后，精确称量全心脏湿重；随后分离胫骨，清除附着肌肉组织后，精确测量其长度。心脏称重与胫骨长度测量旨在计算心脏重量/胫骨长度比（heart weight/tibia length, HW/TL），作为评估心脏肥大的客观形态学指标。

心脏样本处理：将心脏沿矢状面纵向剖开。取一半（通常包含左心室等关键区域）立即置于 4% 多聚甲醛或 10% 中性福尔马林缓冲液中固定 24~48 h，用于后续石蜡包埋、组织切片制备（HE 染色、Masson 染色、天狼猩红染色等病理学分析）。将另一半心脏组织或剩余部分迅速置于液氮中速冻，随后转移至 -80℃ 冰箱长期保存，用于后续分子生物学检测（如 Western blotting、实时荧光定量反转录 PCR 等）或生化指标测定。

1.4.4 心脏彩超检测

小鼠禁食 24 h 后胸口脱毛，进行异氟烷吸入麻醉后，仰卧固定，B 超和 M 超探头垂直接触小鼠心脏，观察心脏跳动情况，检测 EF、左室短轴缩短率（fractional shortening, FS）、心输出量（cardiac output, CO）、舒张期左室前壁厚度（left ventricular anterior wall thickness, LVAW）、收缩期 LVAW、舒张末期后壁厚度（left ventricular posterior wall thickness, LVPW）、收缩末期 LVPW。

1.4.5 Western blotting 检测

将适量的 RIPA 裂解液预冷至 4℃，并根据需要添加 PMSF 和磷酸酶抑制剂。取 20 mg 心脏组织，用生理盐水和 PBS 冲洗干净，吸干表面液体，放入离心管；按照 1:10 的比例添加 RIPA 裂解液进行匀浆，观察无明显组织块后，在冰上孵育 30 min；10 000 × g 离心 10 min，收集上清液作为蛋白提取物；然后在 96 孔板中加入标准蛋白和待测蛋白（每种蛋白设置 2 个副孔），摇匀后在 37℃ 孵育 30 min；采用酶标仪在 562 nm 测定吸光度（OD）值，计算样品蛋白浓度；然后清洗并准备玻璃板，灌胶后进行电泳；使用湿转法进行蛋白转膜，用特定孔径的 PVDF 膜；膜用 5% 脱脂奶粉的缓冲液封闭 2 h，随后在 4℃ 孵育一抗（稀释比例 1:3 000）过夜，用 TBS-T 洗涤后孵育二抗（稀释比例 1:800）1.5 h，再次洗涤，最后加入 ECL 混合液，利用化学发光仪进行显影。

1.4.6 病理组织观察

HE 染色：取心脏组织，组织立即投入到固定

液中固定 24 h (固定液用量大于组织 10 倍), 洗涤、脱水、透明、浸蜡, 石蜡包埋后切片, 切片脱蜡及水化, 最后进行染色、切片脱水、透明和封片。MASSON 染色: 将心脏石蜡切片放置在 60℃ 烘箱中 120 min 脱蜡, 浸染, 分化, 经 95% 乙醇快速脱水, 无水乙醇脱水 3 次, 二甲苯透明后用中性树脂封片。天狼猩红染色: 将心脏石蜡切片用天狼猩红染色液滴染 1 h 后用自来水冲洗, 在无水乙醇中脱水, 用二甲苯透明, 中性树脂封片。所有染色后的切片均使用显微镜进行图像采集, 对采集的数字图像使用 Image J 软件进行定量分析。

1.4.7 实时荧光定量反转录PCR检测

将冰冻的心脏组织解冻, 用眼科剪剪取少于 0.1 g 的组织, 加入 1 mol/L Trizol 匀浆; 将匀浆转入新的 EP 管, 加入 200 μL 氯仿, 剧烈震荡后静置 10 min, 15 984 × g、4℃ 离心 15 min, 取上清; 加入等量异丙醇, 轻轻混匀, 静置 20 min, 再离心, 弃上清; 加入 700 μL 75% 乙醇洗涤, 15 984 × g、4℃ 离心 5 min, 弃去上清, 风干至沉淀边缘略透明, 加入去离子水溶解 RNA。定量后使用反转录试剂盒将 mRNA 反转录为 cDNA, 并进行荧光定量 PCR, 具体样品量按 5 μL Mix+2 μL 引物 +1 μL cDNA。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算, 引物序列见表 1。

表1 引物序列

Table 1. The primer sequences

名称	序列: 5'-3'
GAPDH	正向: CCTCGTCCCGTAGACAAAATG 反向: TGAGGTCAATGAAGGGTCTGT
TGF-β	正向: TAATGGTGGACCGCAACAAC 反向: CCACATGTTGCTCCACACTTGAT
NOTCH1	正向: CTTCTGCTCCTGTTCTTTGTG 反向: TCTTCGTCTCCCACACTCGTTCT
HES1	正向: CGAGCGTGTGGGAAATA 反向: CGTTGATCTGGGTCATGCAGTT
PTEN	正向: TTGAAGACCATAACCCACCACA 反向: ATCATTACACCACTCCGTCCT

1.4.8 血清中MDA、SOD测定

按照试剂盒说明书, 测定 MDA 时, 设空白管和标准管以消除标准品无水乙醇的影响。将空白管、标准管、测定管和对照管加入血清样品后混匀, 95℃ 水浴 80 min, 冷却至室温后在 2 000 × g、5℃ 条件下离心 10 min; 取上清, 用酶标仪在 532 nm 波长下检测 OD 值。根据公式计算血清中 MDA 含量: $MDA \text{ 含量} = (\text{测定 } OD -$

$\text{对照 } OD) / (\text{标准 } OD - \text{空白 } OD) \times \text{标准浓度}$
(10 nmol/mL) × 稀释倍数。

测定 SOD 时, 取 20 μL 待测小鼠血清, 用蒸馏水稀释 5 倍至 100 μL 后混匀, 加入样品, 室温放置 10 min; 然后将混合液在 96 孔板中点样, 每孔 20 μL, 于 550 nm 波长下测定 OD 值, 计算小鼠 SOD 活性。

1.4.9 免疫荧光检测

石蜡切片后复温, 用 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 充分浸泡样本, 微波炉中低火加热修复, 保持微沸状态 5 min, 用 0.5% Triton X-100 (PBS 配制) 室温通透 20 min; 封闭液蛋白的选择原则与一抗蛋白和目标蛋白种属不同, 将非特异性位点结合掉, 从而保证后续荧光染色的特异性。用抗体稀释液将一抗 (稀释比例 1:100) 孵育后洗脱, 用抗体稀释液稀释荧光二抗 (稀释比例 1:200) 后洗脱, 然后进行封片, 置于显微镜下观察获取荧光图像。

1.5 统计学分析

采用 Gradpad Prism 9.5.0 软件分析作图, 用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。计量资料先进行齐性检验, 经正态性检验符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠HW/TL检测

HW/TL 是评估心脏肥大程度的重要指标。本研究通过测定该比值, 探究凌霄花对心脏损伤的影响。与假手术组相比, 模型组小鼠 HW 显著增加, HW/TL 显著升高 ($P < 0.05$), 符合心衰模型的标准, 表明心衰模型构建成功。相较于模型组, 凌霄花组的 HW 低于模型组, 凌霄花组小鼠 HW/TL 显著降低 ($P < 0.05$), 提示凌霄花干预可有效减轻心脏肥大程度。具体见图 1 和图 2。

2.2 小鼠心脏彩超分析

图 3 的 M 超检查结果显示, $EF < 50\%$, 表明心衰造模成功。与假手术组小鼠相比, 模型组其 EF、FS、CO 显著降低, LVAW、LVPW 显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组小鼠比较, 凌霄花组其 EF、FS、CO 显著降低升高, LVAW、LVPW 显著降低 ($P < 0.05$) (图 4)。说明凌霄花可以增加心

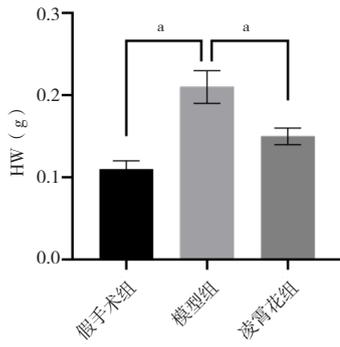


图1 小鼠HW与TL检测结果 (n=7)

Figure 1. The detection result of HW and TL in mice (n=7)
注: ^aP<0.05.

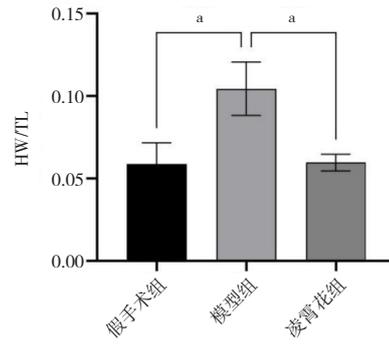


图2 小鼠HW/TL检测结果 (n=7)

Figure 2. The detection result of HW/TL in mice (n=7)
注: ^aP<0.01。

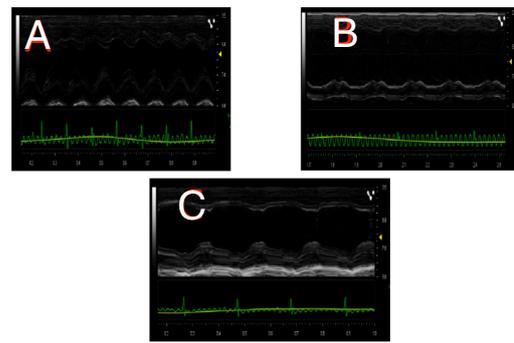
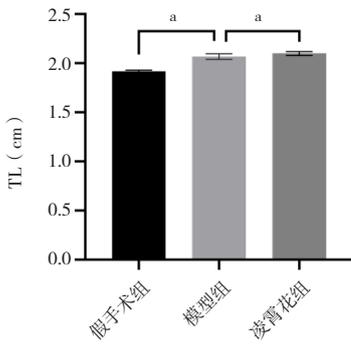


图3 小鼠的M超图

Figure 3. The M-ultrasound images of mice
注: A. 假手术组; B. 模型组; C. 凌霄花组。

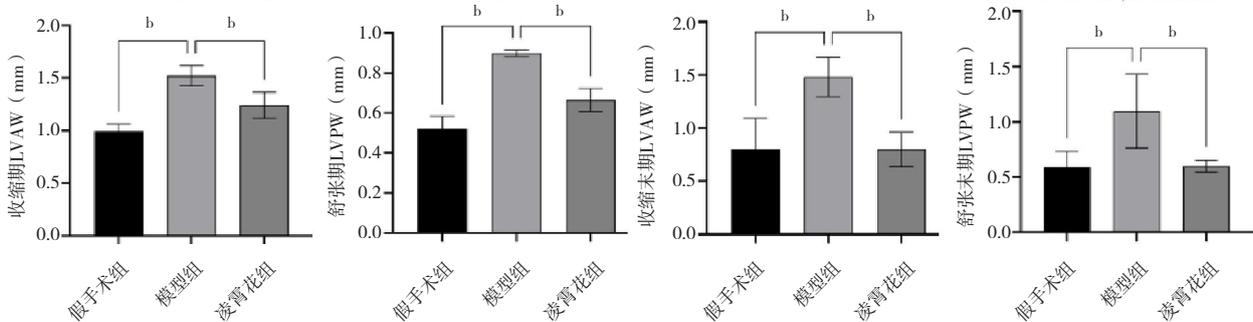
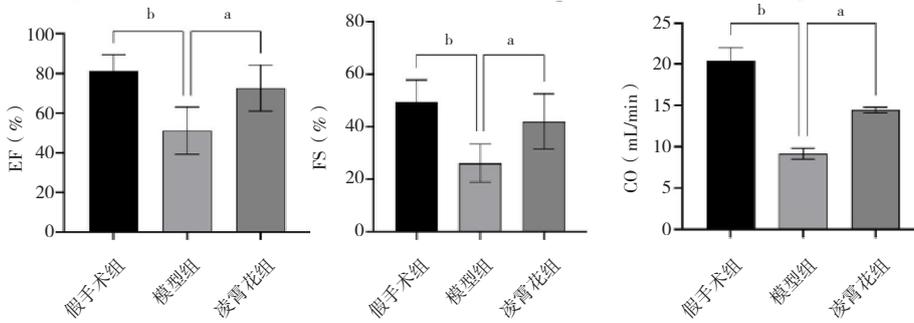


图4 小鼠心脏彩超心功能统计结果 (n=7)

Figure 4. The statistical results of cardiac function in three groups of mice (n=7)

注: ^aP<0.05, ^bP<0.01。

肌收缩力，提高心功能，对心力衰竭的治疗有一定的疗效，为凌霄花治疗心血管疾病提供新思路。

2.3 心脏组织相关蛋白水平表达情况

Western blotting 结果表明，与假手术组相比，模型组 Akt、Bcl-2 蛋白表达显著降低，Smad、Bax 显著升高 ($P<0.05$)；与模型组相比，凌霄花组 Akt、Bcl-2 蛋白表达显著升高，Bax 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$)，Smad 蛋白表达降低，但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。具体见图 5。

2.4 病理切片结果

HE 染色后，假手术组小鼠细胞饱满，细胞

核呈椭圆形且完整，排列紧密整齐；模型组可见细胞数量较假手术组减少，具有细胞凋亡现象，产生炎性细胞，排列不规则；凌霄花组细胞分布较模型组致密，可见炎性细胞减少，与模型组对比分布紧凑且清晰，伴有少量细胞浸润 (图 6)。

MASSON 染色后，假手术组血管壁周围可见少量胶原纤维 (呈现蓝色)，但属于正常范围；模型组心脏组织内有大量蓝色胶原纤维沉积，表明胶原纤维较多，梗死面积很大，纤维化较严重；凌霄花组仍能见少量蓝色纤维胶原沉积，但较模型组有所改善 (图 7)。

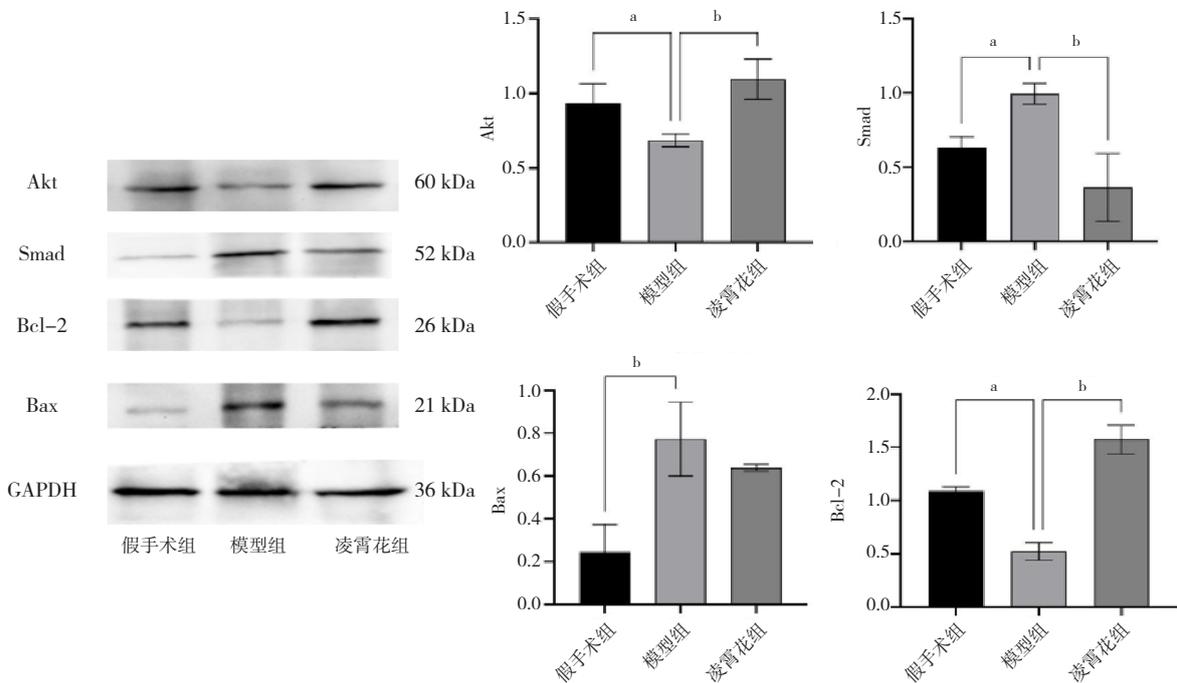


图5 小鼠蛋白表达结果 (n=7)

Figure 5. The protein expression results of mice (n=7)

注：^a $P<0.05$ ，^b $P<0.01$ 。

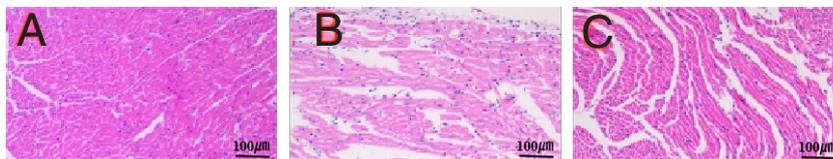


图6 HE染色图 (100 ×)

Figure 6. The HE staining diagram (100 ×)

注：A. 假手术组；B. 模型组；C. 凌霄花组。

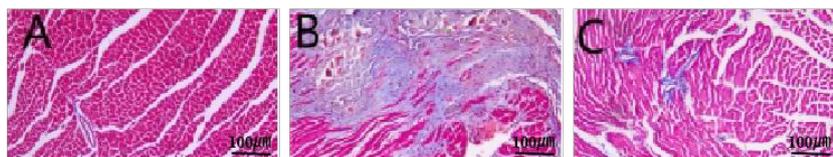


图7 MASSON染色图 (100 ×)

Figure 7. The MASSON staining diagram (100 ×)

注：A. 假手术组；B. 模型组；C. 凌霄花组。

天狼猩红染色后，假手术组少见红色的胶原纤维，细胞核完整。模型组心脏组织内有较多红色胶原纤维沉积且着色较深，纤维化严重；凌霄花组见少量红色纤维胶原沉积，与模型组比较，假手术组与凌霄花组小鼠心肌胶原容积比均显著降低 ($P < 0.05$)。具体见图 8 和图 9。

2.5 PCR结果

模型组 NOTCH、HES1、PTEN、TGF- β 的 mRNA 表达水平与假手术组相比显著升高 ($P < 0.05$)；凌霄花组 NOTCH、HES1、PTEN、TGF- β 的 mRNA 表达水平均较模型组显著降低 ($P < 0.05$)。具体见图 10。

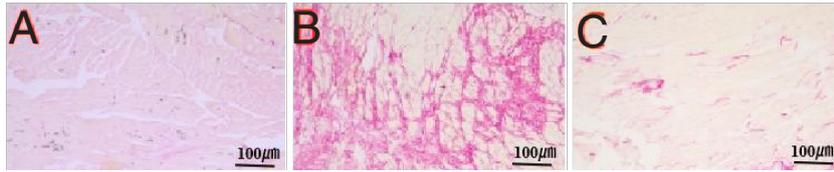


图8 天狼猩红染色图 (100 ×)

Figure 8. The sirius crimson staining of cardiac tissue (100 ×)

注：A. 假手术组；B. 模型组；C. 凌霄花组。

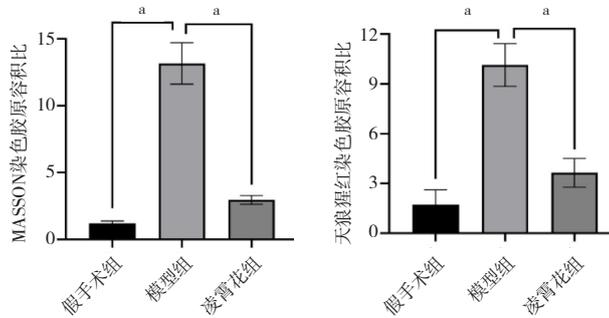


图9 小鼠心脏染色胶原容积比 (n=7)

Figure 9. The stained collagen volume ratio in mouse heart (n=7)

注：* $P < 0.05$ 。

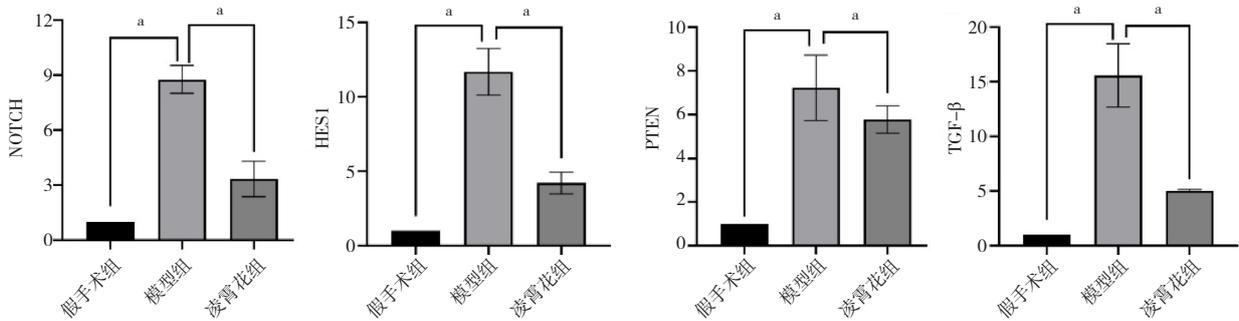


图10 小鼠mRNA表达结果 (n=7)

Figure 10. The mRNA expression results of mice (n=7)

注：* $P < 0.05$ 。

2.6 小鼠血清中LDH、AST、MDA、SOD水平比较

当发生心肌损伤时，心肌细胞会破裂，其中LDH和AST会释放到血液中。检测血浆中两者的水平，反映心肌损伤的程度^[16]。与假手术组相比，模型组小鼠血清内LDH、AST水平显著升高 ($P < 0.05$)；与模型组相比，凌霄花组血清中LDH、AST水平显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组比，凌霄花组小鼠MDA水平显著降低 ($P < 0.05$)，

SOD活力水平明显显著升高 ($P < 0.05$)。具体见图 11。

2.7 免疫荧光检测结果

免疫荧光染色发现，与假手术组相比，模型组小鼠CD31、IL-10表达水平显著降低 ($P < 0.05$)， α -SMA、IL-6表达水平显著升高 ($P < 0.05$)；与模型组相比，凌霄花组小鼠CD31、IL-10表达显著升高 ($P < 0.05$)， α -SMA、IL-6表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。具体见图 12。

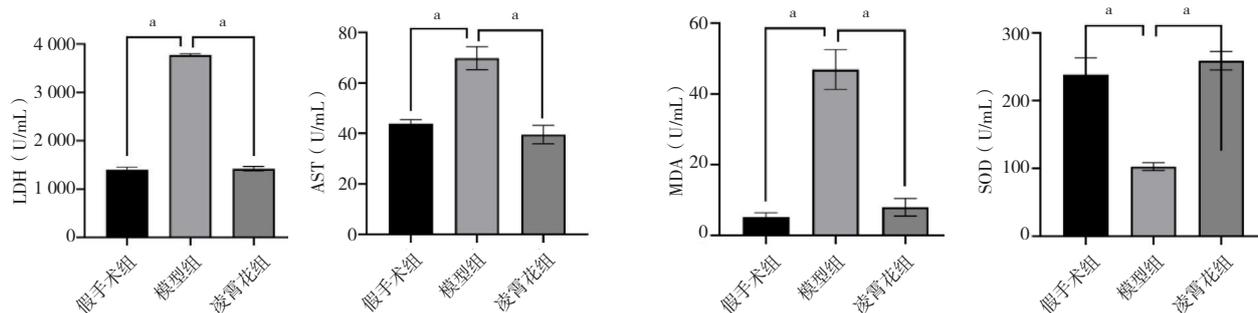


图11 小鼠血清中LDH、AST、MDA、SOD水平检测结果 (n=7)

Figure 11. The detection results of LDH, AST, MDA, and SOD levels in mouse serum (n=7)

注: *P<0.05.

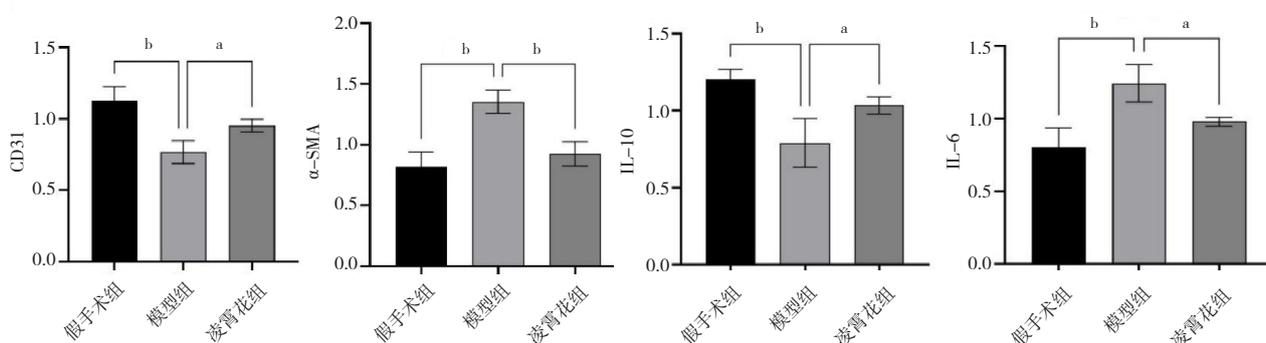


图12 小鼠心脏组织中CD31、α-SMA、IL-10、IL-6水平检测结果 (n=7)

Figure 12. The detection results of CD31, α-SMA, IL-10, and IL-6 in mouse heart tissue (n=7)

注: *P<0.05, ^bP<0.01.

3 讨论

心衰是许多心脏疾病的最终归宿,当心脏前负荷增大时,进一步演化成心肌梗厚、心室重构、心肌纤维化等生理病理改变,最终造成心衰^[17]。心脏损伤的发展过程与氧化应激、炎症反应、细胞凋亡、纤维化、线粒体损伤等多种分子机制有关。针对心衰方面的心脏疾病治疗中,传统中医药具有疗效确切、不良反应少的应用优势一直广受关注,临床上用于治疗心脏疾病的中药不断丰富,所以找到一种疗效好、易得的抗心脏损伤的药物具有重大的临床意义^[18]。中药凌霄花中总黄酮成分具有抗炎、抗氧化、防治心血管系统疾病、抑菌、抗肿瘤等多种作用,但关于治疗心衰的作用未见报道,本研究针对凌霄花黄酮类提取物对心衰小鼠的治疗作用进行研究,为临床治疗提供依据。

发生心衰时伴随着抗凋亡分子 Bcl-2 在心肌细胞中的表达下降,促凋亡分子 Bax 分子表达上升,导致心室重构。研究表明 PTEN/PI3K/Akt 通

路调控细胞凋亡,影响细胞的增殖,激活 Bax 或 Bcl-2。Western blotting 结果显示,模型组 Bcl-2 蛋白相对表达量低于假手术组,其 Bax 蛋白相对表达量高于假手术组;凌霄花组 Bcl-2 蛋白相对表达量高于模型组,其 Bax 蛋白相对表达量低于模型组。组织中 Akt 蛋白是促进细胞存活的蛋白,经检测发现,模型组 Akt 蛋白相对表达量低于假手术组,凌霄花组 Akt 相对表达量高于模型组。PCR 结果表明,模型组 PTEN mRNA 表达水平高于假手术组,凌霄花组 PTEN mRNA 表达水平低于模型组。故凌霄花可以通过 PTEN/PI3K/Akt 信号通路,抑制 PTEN 对 PI3K 的作用,同时促进 PI3K 磷酸化,激活下游信号 Akt 高表达,启动保护机制,使细胞存活。

细胞纤维化的发生也同样促进心衰^[19]。CD31 反映内皮细胞组织的存在,在血管的生成中起重要作用。α-SMA 是肌纤维母细胞标志蛋白,可用于评估心间质纤维化损伤程度^[20]。在纤维化进展过程中,间质成纤维细胞转化为肌成纤维细胞,表现为 α-SMA 呈高水平表达^[21]。

通过免疫荧光发现, 模型组 CD31 荧光强度低于假手术组, 其 α -SMA 荧光强度高于假手术组; 凌霄花组 CD31 荧光强度高于模型组, 其 α -SMA 荧光强度低于模型组。通过 Western blotting 检测发现, 模型组 Smad 蛋白相对表达量高于假手术组, 凌霄花组 Smad 蛋白相对表达量低于模型组。PCR 检测发现, 模型组 TGF- β mRNA 表达水平高于假手术组, 凌霄花组 TGF- β mRNA 表达水平低于模型组。当心衰发生后, 激活 TGF- β /Smad 信号通路, 诱导肌成纤维细胞合成、分泌, 激活下游 Smad 蛋白并使其发生核移位, 诱导上皮细胞间质转化, 导致上皮细胞丧失附着力并向肌成纤维细胞转化, 在此过程中 α -SMA 水平特异性提高^[22]。高水平表达能分泌大量胶原, 加快系膜细胞产生细胞外基质, 同时对细胞外基质降解有抑制作用, 表现为间质纤维化及不可逆转的心功能损害^[23-24]。通过天狼猩红染色发现, 模型组细胞之间胶原纤维沉积明显多于假手术组, 且心肌纤维化较明显。与模型组比较, 凌霄花组小鼠心肌细胞排列规整, 胶原纤维分布明显比模型组减少, 心肌纤维化有所减轻。HE 染色发现, 假手术组小鼠心肌细胞排列整齐致密, 细胞结构完整, 心肌纤维排列整齐, 边界清晰, 未见坏死、炎性细胞浸润; 模型组心肌细胞紊乱, 细胞坏死和炎性细胞浸润程度增大; 凌霄花组上述现象则有所减轻。

综上, 凌霄花治疗心衰的作用机制主要通过多通路调控实现: 通过 PTEN/PI3K/Akt 信号通路发挥抗心肌细胞凋亡作用, 下调 PTEN 表达以解除其对 PI3K 的抑制, 激活 PI3K 磷酸化并上调下游促存活蛋白 Akt, 进而增加抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达、减少促凋亡蛋白 Bax 表达, 抑制心肌细胞凋亡, 改善心室重构; 靶向 TGF- β /Smad 信号通路抑制心肌纤维化, 下调 TGF- β 及其下游 Smad 蛋白表达, 抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞转化, 减少 α -SMA 阳性细胞及胶原纤维沉积, 减轻间质纤维化; 同时可能通过 NOTCH/HES1 通路或其他抗炎途径调控氧化应激与炎症反应, 提升机体抗氧化酶活性, 降低促炎因子水平, 减轻心肌细胞氧化损伤与炎症浸润。其中, PTEN/PI3K/Akt 通路在心肌缺血-再灌注损伤等模型中已被证实与细胞存活调控密切相关, TGF- β /Smad 通路过度激活是心肌纤维化的核心机制之一, 阻断该通

路可显著改善心衰患者的心功能, NOTCH 信号通路在心血管疾病中参与调控炎症细胞活化, 其抑制剂已被证实可改善心肌肥厚。通过上述多靶点协同作用, 凌霄花黄酮类提取物可综合改善心肌损伤, 为心衰治疗提供新的药物选择。

参考文献

- Zhang S, Zhao D, Yang Z, et al. Circulating mitochondria promoted endothelial cGAS-derived neuroinflammation in subforncial organ to aggravate sympathetic overdrive in heart failure mice[J]. *J Neuroinflammation*, 2024, 21(1): 27. DOI: [10.1186/s12974-024-03013-x](https://doi.org/10.1186/s12974-024-03013-x).
- 唐婉婷. 补肺化痰益心汤治疗慢性心衰阴虚痰浊证疗效观察[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2021. DOI: [10.27138/d.cnki.ghuzc.2021.000392](https://doi.org/10.27138/d.cnki.ghuzc.2021.000392).
- Han X, Zhang G, Chen G, et al. Buyang Huanwu decoction promotes angiogenesis in myocardial infarction through suppression of PTEN and activation of the PI3K/Akt signalling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 287: 114929. DOI: [10.1016/j.jep.2021.114929](https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114929).
- Hu HH, Chen DQ, Wang YN, et al. New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis[J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 292: 76-83. DOI: [10.1016/j.cbi.2018.07.008](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.07.008).
- Shinde AV, Humeres C, Frangogiannis NG. The role of α -smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(1): 298-309. DOI: [10.1016/j.bbadis.2016.11.006](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.006).
- 国家卫生计生委合理用药专家委员会, 中国药师协会. 心力衰竭合理用药指南(第2版)[J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2019, 11(7): 1-78. [Committee of Experts on Rational Drug Use National Health and Family Planning Commission of The People's Republic of China, Chinese Pharmacists Association. Guidelines for rational medication use in heart failure (2nd edition)[J]. *Chinese Journal of the Frontiers of Medical Science (Electronic Version)*, 2019, 11(7): 1-78.] DOI: [10.12037/YXQY.2019.07-01](https://doi.org/10.12037/YXQY.2019.07-01).
- Dörmann N, Hammer E, Struckmann K, et al. Metabolic remodeling in cardiac hypertrophy and heart failure with reduced ejection fraction occurs independent of transcription factor EB in mice[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2024, 10: 1323760. DOI: [10.3389/fcvm.2023.1323760](https://doi.org/10.3389/fcvm.2023.1323760).
- 蒋瑞远. Notch1 信号通路介导 NSAID 对压力超负荷性心肌肥厚大鼠心脏结构与功能影响的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2021. DOI: [10.27231/d.cnki.gnmyc.2021.000261](https://doi.org/10.27231/d.cnki.gnmyc.2021.000261).
- 袁慧. 基于 TGF- β /Smads 通路探讨愈梗通瘀方防治急性心梗后心室重构的作用机制[D]. 北京: 中国中医科学院, 2022. DOI: [10.27658/d.cnki.gzzyy.2022.000029](https://doi.org/10.27658/d.cnki.gzzyy.2022.000029).
- Shan M, Feng H, Mingli J, et al. Inhibition of MEG3 ameliorates cardiomyocyte apoptosis and autophagy by regulating the expression of miRNA-129-5p in a mouse model of heart failure[J]. *Redox Rep*, 2023, 28(1): 2224607. DOI: [10.1080/13510002.2023.2224607](https://doi.org/10.1080/13510002.2023.2224607).

- 11 Zhao Q, Cai MM, Li D, et al. S14G-humanin confers cardioprotective effects against chronic adrenergic and pressure overload-induced heart failure in mice[J]. *Heliyon*, 2023, 9(11): e21892. DOI: [10.1016/j.heliyon.2023.e21892](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21892).
- 12 金晓琴, 沈建飞, 盛一梁, 等. 凌霄花化学及临床应用研究进展[J]. *中国处方药*, 2021, 19(2): 18-20. [Jin XQ, Shen JF, Sheng YL, et al. Research progress on chemistry and clinical applications of campsis grandiflora[J]. *Journal of China Prescription Drug*, 2021, 19(2): 18-20.] DOI: [10.3969/j.issn.1671-945X.2021.02.009](https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-945X.2021.02.009).
- 13 Tanai E, Frantz S. Pathophysiology of heart failure[J]. *Compr Physiol*, 2015, 6(1): 187-214. DOI: [10.1002/cphy.c140055](https://doi.org/10.1002/cphy.c140055).
- 14 代丽萍, 高爱社, 方晓艳, 等. 凌霄花提取物中总黄酮的含量测定[J]. *中医学报*, 2015, 30(5): 706-707. [Dai LP, Gao AS, Fang XY, et al. Determination of total flavonoids content in campsis grandiflora extract[J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2015, 30(5): 706-707.] DOI: [10.16368/j.issn.1674-8999.2015.05.243](https://doi.org/10.16368/j.issn.1674-8999.2015.05.243).
- 15 Nakao Y, Aono J, Hamaguchi M, et al. Author Correction: O-ring-induced transverse aortic constriction (OTAC) is a new simple method to develop cardiac hypertrophy and heart failure in mice[J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 12964. DOI: [10.1038/s41598-025-89839-8](https://doi.org/10.1038/s41598-025-89839-8).
- 16 Markousis-Mavrogenis G, Tromp J, Ouwerkerk W, et al. The clinical significance of interleukin-6 in heart failure: results from the BIOSTAT-CHF study[J]. *Eur J Heart Fail*, 2019, 21(8): 965-973. DOI: [10.1002/ejhf.1482](https://doi.org/10.1002/ejhf.1482).
- 17 Perez AL, Grodin JL, Chaikijurajai T, et al. Interleukin-6 and outcomes in acute heart failure: an ASCEND-HF substudy[J]. *Card Fail*, 2021, 27(6): 670-676. DOI: [10.1016/j.cardfail.2021.01.006](https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2021.01.006).
- 18 Li X, Zou F, Lu Y, et al. Notch1 contributes to TNF- α -induced proliferation and migration of airway smooth muscle cells through regulation of the Hes1/PTEEN axis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 88: 106911. DOI: [10.1016/j.intimp.2020.106911](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106911).
- 19 Abdin A, Anker SD, Butler J, et al. 'Time is prognosis' in heart failure: time-to-treatment initiation as a modifiable risk factor[J]. *ESC Heart Fail*, 2021, 8(6): 4444-4453. DOI: [10.1002/ehf2.13646](https://doi.org/10.1002/ehf2.13646).
- 20 Wang Y, Li Y, Chen Z, et al. GSDMD-dependent neutrophil extracellular traps promote macrophage-to-myofibroblast transition and renal fibrosis in obstructive nephropathy[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(8): 693. DOI: [10.1038/s41419-022-05138-4](https://doi.org/10.1038/s41419-022-05138-4).
- 21 肖懿瑶, 张纾难, 熊轶敏, 等. Notch 信号通路对变应性鼻炎的免疫调控机制及中药干预作用的研究进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(23): 2616-2622. [Xiao SY, Zhang SN, Xiong YM, et al. Research progress on the immunomodulatory mechanism of Notch signaling pathway in allergic rhinitis and the interventional effects of traditional Chinese medicine[J]. *Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 2021, 30(23): 2616-2622.] DOI: [10.3969/j.issn.1008-8849.2021.23.023](https://doi.org/10.3969/j.issn.1008-8849.2021.23.023).
- 22 Yang AT, Kim YO, Yan XZ, et al. Fibroblast activation protein activates macrophages and promotes parenchymal liver inflammation and fibrosis[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2023, 15(4): 841-867. DOI: [10.1016/j.jcmgh.2022.12.005](https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2022.12.005).
- 23 Du JJ, Yu DM, Li JH, et al. Asiatic acid protects against pressure overload-induced heart failure in mice by inhibiting mitochondria-dependent apoptosis[J]. *Free Radic Biology Med*, 2023, 208: 545-554. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2023.09.015](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.09.015).
- 24 Magnus JA, Jonas S, Ingrid A, et al. Response by aronsen et al to letter regarding article, "Disruption of Phosphodiesterase 3A Binding to SERCA2 Increases SERCA2 Activity and Reduces Mortality in Mice With Chronic Heart Failure"[J]. *Gut*, 2023, 148(10): 857-858. DOI: [10.1136/gutjnl-2021-326544](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-326544).

收稿日期: 2024年12月19日 修回日期: 2025年04月27日

本文编辑: 马琳璐 钟巧妮