

藁本内酯调控PKD1/HIF-1 α /VEGF通路对心力衰竭大鼠的改善作用

张 岚, 武永新, 张 涛, 王东伟

(郑州大学附属郑州中心医院心血管内科, 河南 郑州 450001)

[摘要] **目的:** 探讨藁本内酯对心力衰竭大鼠心功能和血管生成的影响, 并分析其对蛋白激酶D1 (PKD1) /缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α) /血管内皮生长因子 (VEGF) 通路的调节作用。**方法:** SD大鼠随机分为假手术组、模型组、藁本内酯组、PKD1/HIF-1 α /VEGF信号通路阻断剂CID755673 (CID)组和藁本内酯+CID组, 采用冠状动脉左前降支结扎法建立心力衰竭大鼠模型, 藁本内酯组大鼠尾静脉注射藁本内酯20 mg·kg⁻¹, CID组大鼠腹腔注射CID 50 mg·kg⁻¹, 藁本内酯+CID组大鼠腹腔注射CID 50 mg·kg⁻¹后尾静脉注射藁本内酯20 mg·kg⁻¹, 每日1次, 连续4周。采用心脏超声检查各组大鼠心功能指标, 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色法检测各组大鼠心肌梗死面积百分率, HE染色观察各组大鼠心肌组织病理形态表现, 实时荧光定量PCR法 (RT-qPCR) 法和蛋白印迹法检测各组大鼠缺血区心肌组织中PKD1、HIF-1 α 、CD31和VEGF mRNA及蛋白表达水平。**结果:** 与假手术组比较, 模型组和CID组大鼠心肌细胞形态发生改变, 细胞间隙增宽, 排列紊乱, 可见肌纤维断裂和炎性细胞浸润; 藁本内酯组和藁本内酯+CID组大鼠心肌纤维排列相对整齐, 肌纤维断裂相对较少, 炎性细胞数减少。与假手术组比较, 模型组大鼠左心室射血分数 (LVEF) 和左心室短轴缩短率 (LVFS) 降低 ($P < 0.05$), 左心室收缩末期内径 (LVESD) 和左心室舒张末期内径 (LVEDD) 增大 ($P < 0.05$), 心肌组织中PKD1、HIF-1 α 、CD31和VEGF mRNA及蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 藁本内酯组大鼠LVEF和LVFS升高 ($P < 0.05$), LVESD和LVEDD减小 ($P < 0.05$), 心肌梗死面积百分率降低 ($P < 0.05$), 心肌组织中PKD1、HIF-1 α 、CD31和VEGF mRNA及蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, CID组大鼠LVEF和LVFS降低 ($P < 0.05$), LVESD和LVEDD增大 ($P < 0.05$), 心肌梗死面积百分率升高 ($P < 0.05$), 心肌组织中PKD1、HIF-1 α 、CD31和VEGF mRNA及蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$); 与藁本内酯组比较, 藁本内酯+CID组大鼠LVEF和LVFS明显降低 ($P < 0.05$), LVESD和LVEDD增大 ($P < 0.05$), 心肌梗死面积百分率升高 ($P < 0.05$), 心肌组织中PKD1、HIF-1 α 、CD31和VEGF mRNA及蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$); 与CID组比较, 藁本内酯+CID组大鼠LVEF和LVFS升高 ($P < 0.05$), LVESD和LVEDD减小 ($P < 0.05$), 心肌梗死面积百分率降低 ($P < 0.05$), 心肌组织中PKD1、HIF-1 α 、CD31和VEGF mRNA及蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。**结论:** 藁本内酯可通过激活PKD1/HIF-1 α /VEGF通路发挥促进心力衰竭大鼠血管生成、缩小其心肌梗死面积和改善心功能的作用。

[关键词] 心力衰竭; 血管再生; 藁本内酯; 蛋白激酶D1; 缺氧诱导因子1 α ; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R285.5; R541.6 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2022-10-11

[基金项目] 河南省卫健委医学科技攻关计划项目 (2018010047)

[作者简介] 张 岚 (1982-), 女, 北京市人, 副主任医师, 主要从事心血管系统疾病临床方面的研究。

[通信作者] 张 岚, 副主任医师 (E-mail: yanyi79211@163.com)

Improvement effect of ligustilide on rats with heart failure by regulating PKD1/HIF-1 α /VEGF pathway

ZHANG Lan, WU Yongxin, ZHANG Tao, WANG Dongwei

(Department of Cardiology, Affiliated Zhengzhou Central Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of ligustilide on the cardiac function and angiogenesis in the rats with heart failure, and to clarify its regulatory effect on protein kinase D1 (PKD1)/hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)/vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway. **Methods:** The SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, ligustilide group, PKD1/HIF-1 α /VEGF signaling pathway inhibitor CID755673 (CID) group, and ligustilide+CID group. The heart failure rat model was established by ligation of the left anterior descending coronary artery. The rats in ligustilide group were injected intravenously with 20 mg \cdot kg⁻¹ ligustilide, the rats in CID group were injected intraperitoneally with 50 mg \cdot kg⁻¹ CID, and the rats in ligustilide+CID group were injected intraperitoneally with 50 mg \cdot kg⁻¹ CID followed by intravenous injection of 20 mg \cdot kg⁻¹ ligustilide, once per day for 4 consecutive weeks. The cardiac function indexes of the rats in various groups were detected by echocardiography; the percentages of myocardial infarction areas of the rats in various groups were detected by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining; the pathomorphology of myocardium tissue of the rats in various groups was observed by HE staining; the expression levels of PKD1, HIF-1 α , CD31, and VEGF mRNA and proteins in ischemic area of myocardium tissue of the rats in various groups were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting methods. **Results:** Compared with sham operation group, the rats in model group and CID group had altered myocardial cell morphology, increased intercellular gaps, disorganized arrangement, visible muscle fiber breaks and inflammatory cell infiltration; the rats in ligustilide group and ligustilide+CID group had relatively orderly myocardial fiber arrangement, fewer myocardial fiber breaks and decreased number of inflammatory cells. Compared with sham operation group, the left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular fractional shortening (LVFS) of the rats in model group were decreased ($P<0.05$), the left ventricular end-systolic diameter (LVESD) and left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD) were increased ($P<0.05$), and the expression levels of PKD1, HIF-1 α , CD31, and VEGF mRNA and proteins in myocardium tissue were decreased ($P<0.05$). Compared with model group, the LVEF and LVFS of the rats in ligustilide group were increased ($P<0.05$), the LVESD and LVEDD were decreased ($P<0.05$), the percentage of myocardium infarction area was decreased ($P<0.05$), and the expression levels of PKD1, HIF-1 α , CD31, and VEGF mRNA and proteins in myocardium tissue were increased ($P<0.05$); compared with model group, the LVEF and LVFS of the rats in CID group were decreased ($P<0.05$), the LVESD and LVEDD were increased ($P<0.05$), the percentage of myocardium infarction area was increased ($P<0.05$), and the expression levels of PKD1, HIF-1 α , CD31, and VEGF mRNA and proteins in myocardium tissue were decreased ($P<0.05$); compared with ligustilide group, the LVEF and LVFS of the rats in ligustilide+CID group were decreased ($P<0.05$), the LVESD and LVEDD were increased ($P<0.05$), the percentage of myocardium infarction area was increased ($P<0.05$), and the expression levels of PKD1, HIF-1 α , CD31, and VEGF mRNA and proteins in myocardium tissue were decreased ($P<0.05$); compared with CID group, the LVEF and LVFS of the rats in ligustilide+CID group were increased ($P<0.05$), the LVESD and LVEDD were decreased ($P<0.05$), the percentage of myocardium infarction area was decreased ($P<0.05$), and the expression levels of PKD1, HIF-1 α , CD31,

and VEGF mRNA and proteins in myocardium tissue were increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Ligustilide can promote the angiogenesis, reduce the myocardium infarction area, and improve the cardiac function in the rats with heart failure; it works through activation of the PKD1/HIF-1 α /VEGF pathway.

KEYWORDS Heart failure; Vascular regeneration; Ligustilide; Protein kinase D1; Hypoxia induced factor-1 α ; Vascular endothelial growth factor

心力衰竭是多种心脏疾病发展的终末阶段,是心血管疾病患者死亡的主要原因。心力衰竭患者临床上主要表现为血液输出量不足、心脏充盈能力低下和全身组织器官灌注不足等症状,其发病率和死亡率均较高^[1]。

血管生成是发生心肌缺血后对心肌损伤修复的一种重要补偿机制,因此促进心肌缺血区血运重建成为缺血性心血管疾病治疗和研究的重点关注领域^[2]。研究^[3]显示:大蒜素通过促进心力衰竭大鼠心肌梗死区血管生成,从而抑制心肌细胞凋亡和心肌纤维化,提高心脏射血功能。

藁本内酯主要来源于当归和川芎等传统中药材,其在呼吸系统、循环系统和免疫功能等方面具有较强的药理作用^[4-5]。研究^[6]表明:藁本内酯可促进局灶性脑缺血大鼠缺血区血管生成,从而保护缺血性脑损伤和神经功能损伤。蛋白激酶D1 (protein kinase D1, PKD1) /缺氧诱导因子1 α (hypoxia induced factor-1 α , HIF-1 α) /血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 信号通路在血管生成、稳定和成熟中发挥重要作用^[7]。体内外研究^[8]表明:藁本内酯对阿霉素所引起的心肌损伤具有保护作用。目前关于藁本内酯对心力衰竭动物模型保护作用的相关研究较少,因此本研究主要探讨藁本内酯是否能够通过调节PKD1/HIF-1 α /VEGF信号通路对心力衰竭大鼠心功能和血管生成产生影响,并分析其具体机制,为心力衰竭的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 SPF级雄性SD大鼠60只,8周龄,体质量200~220 g,购自北京科兴中维生物技术有限公司,动物使用许可证号:SYXK(京)2020-0054,大鼠自由进食进水,在室温(20 \pm 2) $^{\circ}$ C、湿度50%~80%和12 h明暗交替环境中适应性饲养3 d后用于实验。藁本内酯(纯度 \geq 98%,批号:B20492)购自上海源叶生物科技有限公司,PKD1/HIF-1 α /VEGF信号通路阻断剂CID755673(简称CID,批号:S718802)购

自美国Selleck公司,引物序列由广州锐博生物科技有限公司合成,GAPDH、PKD1、HIF-1 α 和VEGF抗体(批号分别为ab8245, ab234670, ab179483和ab32152)购自美国Abcam公司,逆转录试剂盒(批号:BTN63826)购自北京百奥莱博科技有限公司。Vevo2100型小动物超声系统购自加拿大Visual Son公司,VentElite型小动物呼吸机购自北京友诚生物科技有限公司,1645050型电泳仪购自美国Bio-Rad公司。

1.2 大鼠心力衰竭模型的制备 随机取50只大鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,气管插管,连接小动物呼吸机。在心脏左侧第3~4肋间开胸,暴露心脏,在左心耳和肺动脉圆锥中间位置找到左冠状动脉前降支并进行结扎,直至左心室壁发白,逐层缝合切口。连接心电图机,出现ST段抬高说明结扎成功,另10只大鼠仅在冠状动脉左前降支挂线,不进行结扎,其余操作同上。术后4周进行心脏超声检查,若左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF) < 50%则为造模成功^[9]。

1.3 动物分组及给药 50只造模成功大鼠随机分为模型组(12只)、藁本内酯组(12只)、CID组(13只)和藁本内酯+CID组(13只),另10只仅行冠状动脉左前降支挂线大鼠作为假手术组。从造模成功后第2天开始,藁本内酯组大鼠尾静脉注射藁本内酯20 mg \cdot kg⁻¹^[10],其余组大鼠尾静脉注射等量生理盐水,CID组大鼠腹腔注射CID 50 mg \cdot kg⁻¹,藁本内酯+CID组大鼠腹腔注射CID 50 mg \cdot kg⁻¹后尾静脉注射藁本内酯20 mg \cdot kg⁻¹,其余组大鼠腹腔注射等量生理盐水,每日1次,连续4周。模型组大鼠死亡2只,CID组大鼠死亡4只,藁本内酯+CID组大鼠死亡1只,其余组大鼠无死亡。

1.4 心脏超声检查各组大鼠心功能指标 给药结束后当日,麻醉所有大鼠,仰卧位固定于鼠板上,进行超声检查,测定各组大鼠LVEF、左心室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS)、左心室收缩末期内径(left ventricular end-systolic diameter, LVESD)和左心室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD)。

1.5 2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑 (2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 染色法检测各组大鼠心肌梗死面积百分率 麻醉后打开大鼠胸腔取心脏, 生理盐水冲洗干净, 滤干水分, 沿左室长轴切成 1 mm 薄片并加入 TTC 染料, 37 °C 水浴箱中水浴 20 min, 甲醛固定, 显微镜拍照, 梗死区显示为白色, 计算心肌梗死面积百分率。心肌梗死面积百分率=梗死区面积/心肌总面积 \times 100%。

1.6 HE 染色观察各组大鼠心肌组织病理形态表现 取各组大鼠梗死区心肌组织, 常规脱水、包埋和切片, 按照 HE 试剂盒说明书进行操作, 显微镜下观察各组大鼠心肌组织病理形态表现。

1.7 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 法检测各组大鼠缺血区心肌组织中 PKD1、HIF-1 α 、VEGF 和 CD31 mRNA 表达水平 取各组大鼠缺血区心肌组织, 组织匀浆至无明显组织块, 加入 TRIzol 试剂提取组织中的总 RNA, 采用逆转录试剂盒逆转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板, GAPDH 为内参, 加入 PCR 引物, 对所需基因进行 PCR 扩增, PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 15 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 75 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组大鼠缺血区心肌组织中 PKD1、HIF-1 α 、VEGF 和 CD31 mRNA 水平, 引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Tab. 1 Primer sequences of RT-qPCR

Gene	Primer sequence
HIF-1 α	F:5'-ATCCATGTGACCATGAGGAAAATG-3' R:5'-TCGGCTAGTTAGGGTACACTTC-3'
VEGF	F:5'-AGGGCAGAATCATCACGAAGT-3' R:5'-AGGGTCTCGATTGGATGGCA-3'
PKD1	F:5'-AGACCAACGATACCCTGTTCT-3' R:5'-GGCTGTACCTCACTAGGACTC-3'
CD31	F:5'-AACAGTGTTGACATGAAGAGCC-3' R:5'-TGTAACAGCAGCAGTCATCCTT-3'
GAPDH	F:5'-CTGGGCTACACTGAGCACC-3' R:5'-AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'

1.8 蛋白印迹法检测各组大鼠缺血区心肌组织中 PKD1、HIF-1 α 、VEGF 和 CD31 蛋白表达水平 取各组大鼠缺血区心肌组织, 匀浆, 加入裂解液置于冰上 30 min, 12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 取上清

液。BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 煮沸变性。取总蛋白 30 μ g 进行 SDS-PAGE, 当蛋白电泳至分离胶底部时, 将蛋白湿转至 PVDF 膜上, PVDF 膜用 5% 胎牛血清封闭, GAPDH、PKD1、CD31、HIF-1 α 和 VEGF 一抗 (1:1 000) 4 °C 孵育过夜, 二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h, TBST 洗膜, 滴加 ECL 发光液进行显影, 采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/GAPDH 蛋白条带灰度值。

1.9 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计学分析。各组大鼠心功能指标、心肌梗死面积百分率、缺血区心肌组织中 PKD1、HIF-1 α 、VEGF 和 CD31 mRNA 及蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心功能指标 与假手术组比较, 模型组大鼠 LVEF 和 LVFS 降低 ($P<0.05$), LVESD 和 LVEDD 增大 ($P<0.05$); 与模型组比较, 藁本内酯组大鼠 LVEF 和 LVFS 升高 ($P<0.05$), LVESD 和 LVEDD 减小 ($P<0.05$); 与模型组比较, CID 组大鼠 LVEF 和 LVFS 降低 ($P<0.05$), LVESD 和 LVEDD 增大 ($P<0.05$); 与藁本内酯组比较, 藁本内酯+CID 组大鼠 LVEF 和 LVFS 降低 ($P<0.05$), LVESD 和 LVEDD 增大 ($P<0.05$); 与 CID 组比较, 藁本内酯+CID 组大鼠 LVEF 和 LVFS 升高 ($P<0.05$), LVESD 和 LVEDD 减小 ($P<0.05$)。见表 2。

2.2 各组大鼠心肌梗死面积百分率 与模型组 (30.93% \pm 1.88%) 比较, 藁本内酯组大鼠心肌梗死面积百分率 (17.35% \pm 1.83%) 降低 ($P<0.05$), CID 组大鼠心肌梗死面积百分率 (38.88% \pm 2.06%) 升高 ($P<0.05$); 与藁本内酯组比较, 藁本内酯+CID 组大鼠心肌梗死面积百分率 (25.70% \pm 5.66%) 升高 ($P<0.05$); 与 CID 组比较, 藁本内酯+CID 组大鼠心肌梗死面积百分率降低 ($P<0.05$)。

2.3 各组大鼠心肌组织病理形态表现 假手术组大鼠肌纤维形态正常, 排列整齐, 几乎无炎性细胞浸润; 与假手术组比较, 模型组和 CID 组大鼠心肌细胞形态发生改变, 细胞间隙增宽, 排列紊乱, 可

表2 各组大鼠LVEF、LVFS、LVESD和LVEDD
Tab. 2 LVEF, LVFS, LVESD, and LVEDD of rats in various groups

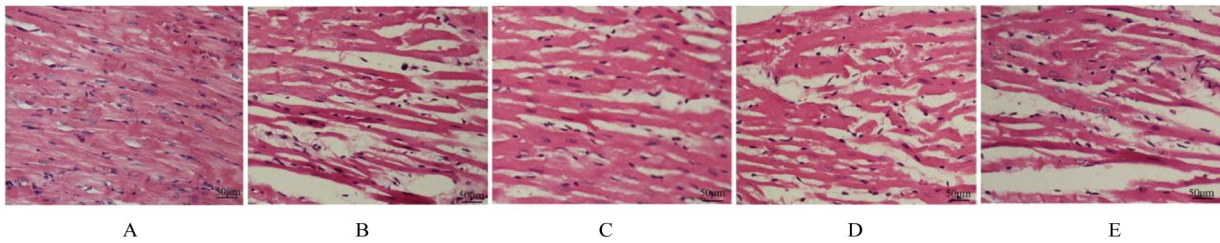
($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	LVEF($\eta/\%$)	LVFS($\eta/\%$)	LVESD(<i>l</i> /mm)	LVEDD(<i>l</i> /mm)
Sham operation	10	71.38 \pm 8.44	48.30 \pm 6.07	3.49 \pm 0.55	5.93 \pm 0.44
Model	10	37.28 \pm 5.39*	30.44 \pm 5.31*	6.88 \pm 0.63*	11.37 \pm 0.97*
Ligustilide	12	47.94 \pm 6.22 Δ	41.59 \pm 6.99 Δ	4.74 \pm 0.53 Δ	7.05 \pm 0.76 Δ
CID	9	33.58 \pm 5.75 Δ	26.46 \pm 6.15 Δ	8.09 \pm 0.75 Δ	13.56 \pm 1.22 Δ
Ligustilide+CID	12	41.86 \pm 5.54 Δ \circ	36.89 \pm 6.35 Δ \circ	5.79 \pm 0.34 Δ \circ	9.46 \pm 0.65 Δ \circ

* $P < 0.05$ compared with sham operation group; $\Delta P < 0.05$ compared with model group; $\#P < 0.05$ compared with ligustilide group; $\circ P < 0.05$ compared with CID group.

见肌纤维断裂, 炎性细胞浸润; 与模型组比较, 藜本内酯组和藜本内酯+CID组大鼠肌纤维排列相对

规整, 肌纤维断裂相对较少, 炎性细胞数减少。见图1。



A: Sham operation group; B: Model group; C: Ligustilide group; D: CID group; E: Ligustilide+CID group.

图1 各组大鼠心肌组织病理形态表现(HE, $\times 400$)

Fig. 1 Pathomorphology of myocardium tissue of rats in various groups(HE, $\times 400$)

2.4 各组大鼠缺血区心肌组织中PKD1、HIF-1 α 、VEGF和CD31 mRNA表达水平 与假手术组比较, 模型组大鼠缺血区心肌组织中PKD1、HIF-1 α 、VEGF和CD31 mRNA表达水平降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 藜本内酯组大鼠缺血区心肌组织中PKD1、HIF-1 α 、VEGF和CD31 mRNA表达水平升高($P < 0.05$), CID组大鼠缺血区心肌组织中PKD1、HIF-1 α 、VEGF和CD31

mRNA表达水平降低($P < 0.05$); 与藜本内酯组比较, 藜本内酯+CID组大鼠缺血区心肌组织中PKD1、HIF-1 α 、VEGF和CD31 mRNA表达水平降低($P < 0.05$); 与CID组比较, 藜本内酯+CID组大鼠缺血区心肌组织中PKD1、HIF-1 α 、VEGF和CD31 mRNA表达水平升高($P < 0.05$)。见表3。

表3 各组大鼠缺血区心肌组织中PKD1、HIF-1 α 、VEGF和CD31 mRNA表达水平

Tab. 3 Expression levels of PKD1, HIF-1 α , VEGF, and CD31 mRNA in ischemia area of myocardium tissue of rats in various groups

($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	PKD1 mRNA	HIF-1 α mRNA	VEGF mRNA	CD31 mRNA
Sham operation	10	7.59 \pm 0.38	7.40 \pm 0.41	9.57 \pm 0.74	11.42 \pm 0.88
Model	10	2.81 \pm 0.33*	3.13 \pm 0.42*	4.31 \pm 0.57*	3.88 \pm 0.67*
Ligustilide	12	6.05 \pm 0.46 Δ	5.95 \pm 0.37 Δ	7.55 \pm 0.53 Δ	8.35 \pm 0.74 Δ
CID	9	1.56 \pm 0.44 Δ	2.05 \pm 0.40 Δ	2.63 \pm 0.41 Δ	1.69 \pm 0.79 Δ
Ligustilide+CID	12	4.77 \pm 0.34 Δ \circ	4.82 \pm 0.35 Δ \circ	6.24 \pm 0.50 Δ \circ	5.42 \pm 0.62 Δ \circ

* $P < 0.05$ compared with sham operation group; $\Delta P < 0.05$ compared with model group; $\#P < 0.05$ compared with ligustilide group; $\circ P < 0.05$ compared with CID group.

2.5 各组大鼠缺血区心肌组织中 PKD1、HIF-1 α 、VEGF 和 CD31 蛋白表达水平 与假手术组比较, 模型组大鼠缺血区心肌组织中 PKD1、HIF-1 α 、VEGF 和 CD31 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 藁本内酯组大鼠缺血区心肌组织中 PKD1、HIF-1 α 、VEGF 和 CD31 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$), CID 组大鼠缺血区心肌组织中

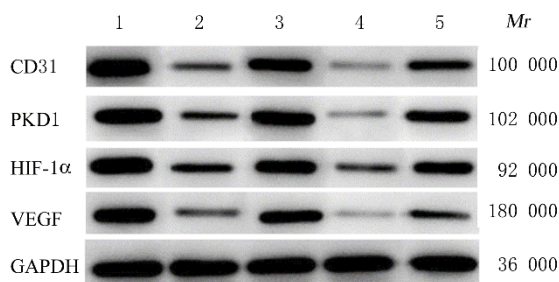
PKD1、HIF-1 α 、VEGF 和 CD31 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$); 与藁本内酯组比较, 藁本内酯 + CID 组大鼠缺血区心肌组织中 PKD1、HIF-1 α 、VEGF 和 CD31 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$); 与 CID 组比较, 藁本内酯 + CID 组大鼠缺血区心肌组织中 PKD1、HIF-1 α 、VEGF 和 CD31 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。见表 4 和图 2。

表 4 各组大鼠缺血区心肌组织中 PKD1、HIF-1 α 、VEGF 和 CD31 蛋白表达水平

Tab. 4 Expression levels of PKD1, HIF-1 α , VEGF, and CD31 proteins in ischemia area of myocardium tissue of rats in various groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	PKD1 protein	HIF-1 α protein	VEGF protein	CD31 protein
Sham operation	10	0.98 \pm 0.04	0.95 \pm 0.03	0.93 \pm 0.05	0.96 \pm 0.03
Model	10	0.30 \pm 0.03*	0.34 \pm 0.04*	0.13 \pm 0.04*	0.24 \pm 0.04*
Ligustilide	12	0.81 \pm 0.04 Δ	0.77 \pm 0.04 Δ	0.83 \pm 0.04 Δ	0.75 \pm 0.04 Δ
CID	9	0.10 \pm 0.02 Δ	0.15 \pm 0.03 Δ	0.07 \pm 0.02 Δ	0.08 \pm 0.02 Δ
Ligustilide+CID	12	0.73 \pm 0.04 $\#$ \circ	0.62 \pm 0.03 $\#$ \circ	0.33 \pm 0.03 $\#$ \circ	0.41 \pm 0.03 $\#$ \circ

* $P < 0.05$ compared with sham operation group; $\Delta P < 0.05$ compared with model group; $\# P < 0.05$ compared with ligustilide group; $\circ P < 0.05$ compared with CID group.



Lane 1: Sham operation group; Lane 2: Model group; Lane 3: Ligustilide group; Lane 4: CID group; Lane 5: Ligustilide + CID group.

图 2 各组大鼠缺血区心肌组织中 PKD1、HIF-1 α 、VEGF 和 CD31 蛋白表达电泳图

Fig. 2 Electrophoregram of expressions of PKD1, HIF-1 α , VEGF, and CD31 proteins in ischemia area of myocardium tissue of rats in various groups

3 讨论

藁本内酯又名 3-丁烯基-4, 5-二氢-1 (3H) -异苯并呋喃酮, 是传统中药当归挥发油的主要活性成分, 具有广泛的药理学作用。研究^[11]显示: 藁本内酯可促进线粒体自噬, 具有神经保护作用。藁本内酯对肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞损伤具有保护作用, 通过 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 下调前列腺癌相关成纤维细胞血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A,

VEGFA) 分泌, 抑制肿瘤血管生成^[12-13]。但关于藁本内酯在心血管疾病治疗方面的研究较少, 因此本研究主要探讨藁本内酯对心力衰竭大鼠心功能和血管生成的影响及其机制。

心脏收缩和舒张功能障碍是心力衰竭患者死亡的主要原因^[14]。本研究中心心力衰竭大鼠心功能指标检查结果表明: 结扎冠状动脉左前降支造成大鼠心功能衰退, 而藁本内酯可改善心力衰竭大鼠心功能障碍。本研究中 TTC 染色和 HE 染色结果显示: 藁本内酯可改善心力衰竭大鼠心肌缺血状况, 并可减轻大鼠心肌细胞损伤。赵香梅等^[15]研究表明: 藁本内酯可降低脂多糖导致的心肌细胞炎症反应, 抑制心肌细胞凋亡。邹常超等^[16]研究显示: 理气活血滴丸主要成分之一藁本内酯可通过降低氧化应激和炎症反应治疗心肌缺血再灌注损伤。本研究与以上研究结果具有一致性, 即藁本内酯对心肌损伤具有保护作用。

血管内皮细胞增殖是血管生成的基础, 研究^[17]显示: 藁本内酯对糖氧剥夺-复糖氧损伤引起的人脐静脉血管内皮细胞具有保护作用, 可抑制血管内皮细胞凋亡和自噬。此外, 藁本内酯还具有促进体外模拟缺血环境下血管生成的能力^[18]。因此本研究主要通过检测 CD31 mRNA 和蛋白表达水平, 探讨藁本内酯对心力衰竭大鼠心肌缺血区血管

生成能力的影响。CD31主要表达于血管内皮细胞,是血管生成的重要标志物^[19]。本研究结果表明:藁本内酯可促进心力衰竭大鼠心肌缺血区血管生成。

PKD1是胚胎发育进程中必不可少的调控蛋白,在心肌组织、血管内皮细胞和成纤维细胞中高表达,在介导心肌细胞对缺血反应及缺血后血管生成和心脏重塑进程中发挥重要作用^[20]。研究^[21]显示:下调PKD1表达可抑制小鼠动脉内斑块形成和斑块内血管生成。VEGF主要通过其同源受体血管内皮细胞生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)发出信号控制血管生成,是心血管疾病和癌症的关键生理过程,而PKD1下调可降低VEGFR2的表达,抑制VEGF诱导的细胞增殖和迁移^[22-23]。HIF-1 α 在缺氧条件下稳定表达,是细胞内氧平衡的关键调节因子,在缺氧诱导的血管生成、肿瘤发生和炎症反应等方面起关键作用^[24]。WANG等^[25]研究发现:丁苯酞注射液通过上调VEGF和HIF-1 α 表达促进慢性心肌缺血大鼠血管生成。香兰素联合己酮可可碱通过上调心肌组织中VEGF和HIF-1 α 表达增强心肌梗死大鼠血管生成^[26]。因此为探讨藁本内酯对心力衰竭大鼠心肌缺血区血管生成的具体机制,本研究通过同时给予心力衰竭大鼠藁本内酯和PKD1阻断剂CID进行治疗,结果表明:藁本内酯可拮抗CID对PKD1的阻断作用,升高PKD1、HIF-1 α 和VEGF mRNA及蛋白表达水平,促进心力衰竭大鼠血管生成。

综上所述,藁本内酯可促进心力衰竭大鼠心肌梗死区血管再生,减轻大鼠心肌损伤,改善心功能指标,其可能是通过激活PKD1/HIF-1 α /VEGF信号通路发挥作用。本研究结果为临床治疗心肌梗死和心肌缺血再灌注损伤提供了理论依据。但本研究仍存在不足之处,今后需进一步研究藁本内酯对血管生成标志物表达的调节作用,进一步分析藁本内酯对心肌细胞和血管内皮细胞损伤的保护作用。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

张岚参与实验方案设计和论文撰写,武永新参与实验操作,张涛参与数据分析,王东伟参与论文撰写和审校。

[参考文献]

- [1] SAVARESE G, BECHER P M, LUND L H, et al. Global burden of heart failure: a comprehensive and updated review of epidemiology [J]. *Cardiovasc Res*, 2023, 118(17): 3272-3287.
- [2] KIM H, PARK S J, PARK J H, et al. Enhancement strategy for effective vascular regeneration following myocardial infarction through a dual stem cell approach[J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(8): 1165-1178.
- [3] 赵静,赵颖,李晗.大蒜素通过调控SIRT3/PPAR γ 信号通路促进心衰大鼠血管再生和心功能改善[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2021, 13(8): 1011-1014.
- [4] LU Y J, NIU L, SHEN F K, et al. Ligustilide attenuates airway remodeling in COPD mice by covalently binding to MH2 domain of Smad3 in pulmonary epithelium, disrupting the Smad3-SARA interaction[J]. *Phytother Res*, 2023, 37(2): 717-730.
- [5] FANG Z C, LUO Z H, JI Y Y, et al. A network pharmacology technique used to investigate the potential mechanism of Ligustilide's effect on atherosclerosis[J]. *J Food Biochem*, 2022, 46(7): e14146.
- [6] REN C H, LI N, GAO C, et al. Ligustilide provides neuroprotection by promoting angiogenesis after cerebral ischemia[J]. *Neurol Res*, 2020, 42(8): 683-692.
- [7] 刘暖,杨雷,毛秉豫.丹参酚酸B调控PKD1-HIF-1 α -VEGF通路促心肌梗死大鼠血管新生的作用[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(7): 984-990.
- [8] 孙嘉,刘冰,张陆勇.藁本内酯对阿霉素所致心肌损伤的保护作用[J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(12): 1776-1784.
- [9] 赵地,赵添,赵卓,等.生脉散对心衰大鼠心肌重塑及TGF- β 1/Smad3信号通路的影响[J]. *中国中医急症*, 2021, 30(12): 2099-2103.
- [10] 汪小青,竹梅,李英博,等.藁本内酯对大鼠蛛网膜下腔出血后迟发性血管痉挛的影响[J]. *神经解剖学杂志*, 2020, 36(4): 389-396.
- [11] 吴倩,刘娇,田丽宇,等.藁本内酯介导的线粒体自噬减轻HT22细胞的缺糖缺氧/复氧损伤[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(7): 1897-1903.
- [12] 罗剑锋,罗丹,文丹宁.藁本内酯通过抑制DAPK1表达对肺炎链球菌感染的肺泡上皮细胞损伤的保护作用及其机制[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(24): 5667-5671.
- [13] MA J, CHEN X, CHEN Y M, et al. Ligustilide inhibits tumor angiogenesis by downregulating VEGFA secretion from cancer-associated fibroblasts in prostate cancer via TLR4[J]. *Cancers*, 2022, 14(10): 2406.

- [14] ABELANET A, CAMOIN M, RUBIN S, et al. Increased capillary permeability in heart induces diastolic dysfunction independently of inflammation, fibrosis, or cardiomyocyte dysfunction [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2022, 42(6): 745-763.
- [15] 赵香梅, 徐雅欣, 陈 龙, 等. 藜本内酯通过调控 miR-133b-5p 表达对脂多糖所致心肌损伤的保护作用[J]. *中国医院药学杂志*, 2020, 40(18): 1932-1936.
- [16] 邹常超, 周海燕, 徐启丽, 等. 基于网络药理学探究理气活血滴丸对心肌缺血再灌注损伤的作用机制[J]. *微量元素与健康研究*, 2022, 39(1): 35-39.
- [17] 杜旌畅, 谢晓芳, 于 思, 等. 藜本内酯对糖氧剥夺-再灌注诱导的血管内皮细胞凋亡和 ERK 磷酸化水平的影响[J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(6): 33-38.
- [18] 杜旌畅, 程青青, 母昌会. 藜本内酯体外促进模拟缺血环境血管内皮细胞增殖研究[J]. *四川医学*, 2020, 41(5): 463-467.
- [19] ABBONA A, PACCAGNELLA M, ASTIGIANO S, et al. Effect of eribulin on angiogenesis and the expression of endothelial adhesion molecules [J]. *Anticancer Res*, 2022, 42(6): 2859-2867.
- [20] BOSSUYT J, BORST J M, VERBERCKMOES M, et al. Protein kinase D1 regulates cardiac hypertrophy, potassium channel remodeling, and arrhythmias in heart failure[J]. *J Am Heart Assoc*, 2022, 11(19): e027573.
- [21] YANG Y Y, TANG F, WEI F, et al. Silencing of long non-coding RNA H19 downregulates CTCF to protect against atherosclerosis by upregulating PKD1 expression in ApoE knockout mice [J]. *Aging*, 2019, 11(22): 10016-10030.
- [22] WANG Y, HOEPPNER L H, ANGOM R S, et al. Protein kinase D up-regulates transcription of VEGF receptor-2 in endothelial cells by suppressing nuclear localization of the transcription factor AP2 β [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(43): 15759-15767.
- [23] 王 璐, 邢 玮, 齐 进, 等. 缺氧对 5-氟尿嘧啶干预的胃癌细胞中 HIF-1 α /MDR1/VEGF 表达的影响[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2022, 47(12): 1629-1636.
- [24] LI X L, LI H F, LI Z H, et al. TRPV3 promotes the angiogenesis through HIF-1 α -VEGF signaling pathway in A549 cells[J]. *Acta Histochem*, 2022, 124(8): 151955.
- [25] WANG Y B, YUAN H F, ZHI W, et al. The effect and mechanism of dl-3-n-butylphthalide on angiogenesis in a rat model of chronic myocardial ischemia[J]. *Am J Transl Res*, 2022, 14(7): 4719-4727.
- [26] ELSEWEIDY M M, ALI S I, SHAHEEN M A, et al. Vanillin and pentoxifylline ameliorate isoproterenol-induced myocardial injury in rats *via* the Akt/HIF-1 α /VEGF signaling pathway[J]. *Food Funct*, 2023, 14(7): 3067-3082.