

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research野马追内酯 B 通过 p38 MAPK 调控阿霉素诱导
心肌病中心肌细胞凋亡及炎症的研究Research of eupalinolide B regulating cardiomyocyte apoptosis and inflammation
in doxorubicin - induced cardiomyopathy through p38 MAPK陈徐波^{1a,2,3}, 黄春艳^{1a,2,3},
胡益冰^{1b,2,3}, 许 竞⁴,
潘轶斌^{1a,2,3,5}

(1. 金华市中心医院/浙江大学 医学院 附属金
华医院 a. 心血管内科; b. 消化内科, 浙江 金华
321000; 2. 金华市心血管介入质控中心, 浙江
金华 321000; 3. 中国医学科学院 阜外医院 心
血管病技术培训中心, 浙江 金华 321000; 4. 温州
医科大学 第二临床医学院, 浙江 温州 325000;
5. 浙江大学 医学院, 浙江 杭州 310058)

CHEN Xu - bo^{1a,2,3},
HUANG Chun - yan^{1a,2,3},
HU Yi - bing^{1b,2,3}, XU Jing⁴,
PAN Yi - bin^{1a,2,3,5}

(1. a. Department of Cardiovascular
Internal Medicine; b. Department of
Digestive Medicine, Jinhua Municipal
Central Hospital/Jinhua Hospital
Affiliated to Zhejiang University School of
Medicine, Jinhua 321000, Zhejiang
Province, China; 2. Jinhua
Cardiovascular Interventional Quality
Control Center, Jinhua 321000, Zhejiang
Province, China; 3. Cardiovascular
Technology Training Center, Fuwai
Hospital, Chinese Academy of Medical
Sciences, Jinhua 321000, Zhejiang
Province, China; 4. College of Second
Clinical Medical, Wenzhou Medical
University, Wenzhou 325000, Zhejiang
Province, China; 5. College of Medicine,
Zhejiang University, Hangzhou 310058,
Zhejiang Province, China)

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划基金资助
项目(2019RC302); 金华市科技计划
基金资助项目(2023 - 3 - 107)

作者简介: 陈徐波(1991 -), 男, 主治医师, 主要
从事心血管病的研究

通信作者: 潘轶斌, 主任医师, 硕士生导师
MP: 13868982160

E - mail: pyb202208@163.com

摘要:目的 探讨野马追内酯 B (EB) 在阿霉素 (DOX) 诱导扩张型心肌病 (DCM) 的潜在靶点及通路, 并验证 EB 是否通过调控 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 信号通路抑制心肌细胞凋亡及炎症反应。方法 用数据库筛选 EB 与 DCM 的交集靶点, 进行功能与通路富集分析及分子对接验证。构建 DCM 小鼠模型, 建模成功后的小鼠随机分为模型组、低剂量实验组 (5 mg · kg⁻¹ EB)、高剂量实验组 (20 mg · kg⁻¹ EB)、阳性对照组 (5 mg · kg⁻¹ 阳性药物卡托普利 captopril)、抑制剂组 (1 mg · kg⁻¹ p38 MAPK 抑制剂 SB203580) 和激活剂组 (20 mg · kg⁻¹ EB + 0.10 mg · kg⁻¹ p38 MAPK 激活剂 anisomycin), 另外选取正常健康小鼠为空白组 (给予等剂量生理盐水)。每组 10 只。给药干预结束后, 用超声心电图法检测各组小鼠心功能; 收集血清和心肌组织, 用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测血清炎症因子及心肌损伤标志物水平变化; 用苏木精 - 伊红 (HE)、马松 (Masson) 和末端脱氧核糖核酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记 (TUNEL) 染色法检测心肌组织病理损伤、纤维化及细胞凋亡变化; 用免疫组化法和蛋白质印迹法检测心肌组织中凋亡、炎症因子、磷酸化 (p -) p38 MAPK 和 p38 MAPK 蛋白表达情况。结果 共筛选出 EB 存在 34 个潜在作用靶点, DCM 特异性靶点 1 018 个, EB 治疗 DCM 潜在作用靶点 5 个, 涉及 MAPK 信号通路等。空白组、模型组、低剂量实验组、高剂量实验组、抑制剂组和激活剂组的左室短轴缩短率 (LVFS) 分别为 (41.26 ± 0.07)%、(26.60 ± 0.72)%、(30.90 ± 0.29)%、(44.26 ± 1.73)%、(42.62 ± 1.82)% 和 (33.66 ± 2.74)% ; N 末端 B 型利钠肽原 (NT - proBNP) 分别为 (734.85 ± 90.24)、(1 509.28 ± 163.17)、(1 240.62 ± 157.95)、(841.57 ± 88.06)、(862.91 ± 87.92) 和 (1 159.76 ± 125.71) pg · mL⁻¹; B 细胞淋巴瘤因子 - 2 (Bcl - 2) 阳性率分别为 (16.81 ± 1.82)%、(3.02 ± 0.54)%、(6.97 ± 0.86)%、(14.29 ± 1.43)%、(13.51 ± 1.46)% 和 (8.14 ± 0.95)% ; Bcl - 2 相关 X 蛋白 (Bax) 阳性率分别为 (1.59 ± 0.18)%、(18.37 ± 2.51)%、(12.42 ± 1.63)%、(3.84 ± 0.45)%、(4.09 ± 0.41)% 和 (11.53 ± 1.28)% ; p - p38 MAPK/p38 MAPK 相对表达水平分别为 0.23 ± 0.03、0.86 ± 0.09、0.64 ± 0.08、0.35 ± 0.04、0.38 ± 0.05 和 0.61 ± 0.08, 模型组与空白组比较, 低、高剂量实验组和抑制剂组与模型组比较, 激活剂组与高剂量实验组比较, 上述指标在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。结论 EB 可能通过抑制 p38 MAPK 磷酸化, 减轻 DOX 诱导的心肌病小鼠心肌炎症反应和心肌细胞凋亡, 改善心肌损伤。

关键词: 野马追内酯 B; 心肌病; p38 丝裂原活化蛋白激酶; 凋亡; 炎症

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.09.015

中图分类号: R28 **文献标志码:** A

文章编号: 1001 - 6821 (2026) 09 - 1293 - 08

Abstract: Objective To investigate the potential targets and pathways

of eupalinolide B (EB) in doxorubicin (DOX) – induced dilated cardiomyopathy (DCM), and to verify EB inhibits cardiomyocyte apoptosis and inflammatory response by regulating the p38 mitogen – activated protein kinase (p38 MAPK) signaling pathway. **Methods** Database screening was used to identify the intersecting targets of EB and DCM, followed by functional and pathway enrichment analyses and molecular docking validation. A DCM mouse model was established. The successfully modeled mice were randomly divided into model group, experimental – L group ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ EB), experimental – H group ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ EB), positive control group ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ positive drug captopril), inhibitor group ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ p38 MAPK inhibitor SB203580) and activator group ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ EB + $0.10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ p38 MAPK activator anisomycin). In addition, normal and healthy mice were selected as the blank group. Each group had 10 mice. After the intervention, cardiac function was detected by echocardiography; serum and myocardial tissues were collected, serum inflammatory factors and myocardial injury markers were measured by enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA); pathological damage, fibrosis and cell apoptosis of myocardial tissue were detected by hematoxylin and eosin (HE) staining, Masson staining and terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) staining; the expression of apoptosis – related proteins, inflammatory factors, phosphorylation (p –) p38 MAPK and p38 MAPK in myocardial tissue was detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results** A total of 34 potential targets of EB and 1 018 DCM – specific targets were screened, and 5 potential targets of EB for DCM treatment were identified, involving the MAPK signaling pathway. The left ventricular fractional shortening (LVFS) values in blank group, model group, experimental – L group, experimental – H group, inhibitor group and activator group were (41.26 ± 0.07)%, (26.60 ± 0.72)%, (30.90 ± 0.29)%, (44.26 ± 1.73)%, (42.62 ± 1.82)% and (33.66 ± 2.74)%, respectively; the N – terminal pro – brain natriuretic peptide (NT – proBNP) levels were (734.85 ± 90.24), ($1\ 509.28 \pm 163.17$), ($1\ 240.62 \pm 157.95$), (841.57 ± 88.06), (862.91 ± 87.92) and ($1\ 159.76 \pm 125.71$) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the B – cell lymphoma – 2 (Bcl – 2) positive rates were (16.81 ± 1.82)%, (3.02 ± 0.54)%, (6.97 ± 0.86)%, (14.29 ± 1.43)%, (13.51 ± 1.46)% and (8.14 ± 0.95)%, respectively; the Bcl – 2 – associated X protein (Bax) positive rates were (1.59 ± 0.18)%, (18.37 ± 2.51)%, (12.42 ± 1.63)%, (3.84 ± 0.45)%, (4.09 ± 0.41)% and (11.53 ± 1.28)%, respectively; the relative expression levels of p – p38 MAPK/p38 MAPK were 0.23 ± 0.03 , 0.86 ± 0.09 , 0.64 ± 0.08 , 0.35 ± 0.04 , 0.38 ± 0.05 and 0.61 ± 0.08 , respectively. Comparisons between model group and blank group, between experimental – L / – H groups or inhibitor group and model group, and between activator groups and experimental – H group, the above indicators all showed statistically significant differences (all $P < 0.05$). **Conclusion** EB may alleviate the myocardial inflammatory response and cardiomyocyte apoptosis in DOX – induced cardiomyopathy mice and improve myocardial damage by inhibiting the phosphorylation of p38 MAPK.

Key words: eupalinolide B; p38 mitogen – activated protein kinase; cardiomyopathy; apoptosis; inflammation

扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)是一种以单侧或双侧心室异常扩大及收缩功能严重下降为特征的慢性进行性心肌疾病^[1-2]。DCM是终末期心力衰竭的主要病因之一,也是导致心脏移植的关键因素^[3]。DCM早期症状轻微,当出现明显心力衰竭体征时,心肌已发生不可逆重塑。因此,寻找能够延缓DCM病变进程的有效药物具有重要意义。野马追为菊科泽兰属多年生草本植物,含有黄酮类、生物碱类及挥发油等多种生物活性物质,在呼吸系统调节、心血管保护与免疫调节等方面展现出显著药理作用^[4]。野马追内酯B(eupalinolide B, EB)作为结构明确、活性突出的倍半萜内酯类化合物,因其抗肿瘤与

抗炎活性而成为当前研究热点^[5-6]。然而,关于EB对DCM所引发的炎症反应的作用仍需进一步研究。本研究通过整合网络药理学与分子对接技术,初步预测EB治疗DCM的潜在通路;在此基础上,构建DCM小鼠模型,旨在验证EB是否通过调控p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen – activated protein kinase, p38 MAPK)信号通路抑制心肌细胞凋亡及炎症反应,以阐明其心脏保护机制。

材料与方法

1 材料

动物 SPF级的雄性C57BL/6J小鼠76只,鼠龄

6周,初始体质量范围为18~22 g,购自复星万邦(江苏)医药集团有限公司,生产许可证号:SCXK(苏)2023-0022,使用许可证号:SYXK(苏)2023-0097。所有小鼠均被安置于符合国家标准的屏障环境实验动物房,温度恒温(20 ± 2)℃、相对湿度控制在50%~60%以及严格的12 h明/暗交替光照制度,并自由获取经辐照灭菌的饲料及高压灭菌的饮用水。本研究经金华市中心医院实验动物福利与伦理委员会批准,伦理批号:AL-JHY202503。

药品与试剂 EB,规格:每支20 mg,纯度:98.5%,批号:SND-628,安徽滁州仕诺达生物科技有限公司生产;卡托普利(captopril),规格:每支5 g,纯度:99.8%,批号:VS12449,北京沃比森科技有限公司生产;p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase,p38 MAPK)抑制剂SB203580,规格:每瓶1 mg,纯度:98.0%,批号:KGR0067,江苏凯基生物技术股份有限公司生产;p38 MAPK激活剂anisomycin,规格:A5862-0.5 mL,纯度:98.0%,批号:A5862,浙江亦高生物科技有限公司生产;小鼠白细胞介素-1 β (interleukin-1 β ,IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)、IL-10、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)、N-末端脑钠肽前体(N-terminal pro-brain natriuretic peptide,NT-proBNP)酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒,均由上海酶研生物科技有限公司生产;苏木素-伊红(hematoxylin-eosin,HE)、马松三色(Masson trichrome,Masson)和末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling,TUNEL)染色试剂盒,均由上海钰博生物科技有限公司生产;B细胞淋巴瘤因子-2(B-cell lymphoma-2,Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X protein,Bax)、IL-1 β 、IL-10、TNF- α 、p-p38 MAPK和p38 MAPK抗体,均由浙江杭州斯达特生物科技有限公司生产。

仪器 MB-602酶标仪,北京赛必达科技有限公司产品;CERNTRY™ 117离心机,法国吉尔森实验仪器公司产品;EXAKT 310CP组织切片机,四川成都艾伟科技公司产品;BB320包埋机,四川里来思诺生物科技有限公司产品;ChemiScope 6000化学发光成像系统,上海勤翔科学仪器公司产品。

2 实验方法

2.1 网络药理学分析EB对DCM的潜在靶点

通过PubChem数据库获取EB的标准化信息,

结合SwissTargetPrediction平台预测EB的潜在作用靶点。以“Dilated cardiomyopathy”为检索词,在GeneCards、OMIM和DisGeNET数据库中进行系统性检索,整合并去重后获得DCM相关基因。将EB靶点与DCM疾病靶点输入Venny 2.1在线工具,获得交集靶基因。将交集靶点导入STRING数据库,物种设置为“人源”(homo sapiens),蛋白质相互作用的最低置信阈值设为 ≥ 0.9 ,过滤后导出TSV格式数据,并通过Cytoscape 3.9.1软件进行蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction,PPI)网络可视化分析。用DAVID生物信息学平台对核心治疗靶点进行基因本体(gene ontology,GO)富集分析(包括生物过程、细胞组分、分子功能)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)通路富集分析,设定统计学阈值 $P < 0.01$ 。最后,通过蛋白质数据库(protein data bank,PDB)和PubChem数据库获取靶蛋白晶体与EB的三维结构,用AutodockTools 4软件执行半柔性分子对接,预测结合自由能。结合能 ≤ 0 kcal $\cdot$ mol $^{-1}$ 表示化合物与靶蛋白可以发生结合,结合能 < -5.0 kcal $\cdot$ mol $^{-1}$ 表示2者具有较强亲和力和。

2.2 DCM模型制备^[7]

用阿霉素诱导DCM小鼠模型。小鼠按照5 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ 的剂量,通过腹腔注射途径给药,每5 d给药1次,总计给药4次。整个造模周期20 d。若造模小鼠心肌结构破坏、肌纤维断裂与溶解,且造模组小鼠经超声心动图检查左室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening,LVFS)和左室射血分数(left ventricular ejection fraction,LVEF)较正常小鼠显著降低($P < 0.05$,且降低幅度 $\geq 30\%$),左室收缩末期内径(left ventricular end-systolic diameter,LVESD)和左室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic diameter,LVEDD)较正常小鼠显著增加($P < 0.05$,且增加幅度 $\geq 20\%$),则提示DCM小鼠构建成功。造模过程中,小鼠死亡3只,无脱落小鼠,最终造模成功小鼠共60只。

2.3 动物分组与处理方法

造模成功的60只小鼠按随机数表法进行分组,每组含10只,即模型组、低剂量实验组(腹腔注射5.00 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ EB)、高剂量实验组(腹腔注射20.00 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ EB)^[8]、阳性对照组(腹腔注射7.20 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ captopril)^[9]、抑制剂组(腹腔注射1.00 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ SB203580)^[10]、激活剂组(腹腔注射20 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ EB + 0.10 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ anisomycin)^[11],

药物每天干预1次,持续处理21 d。从正常小鼠中随机选取10只作为空白组,每天腹腔注射等体积的无菌生理盐水,持续处理21 d。

2.4 超声心电图法检测小鼠心功能^[12]

药物干预21 d后,小鼠进行腹腔注射麻醉,用高分辨率超声心动技术检测心脏参数LVEF、LVFS、LVESD和LVEDD。

2.5 ELISA法检测血清炎症因子及心肌损伤标志物水平^[12]

心超检测结束后,采集各组小鼠心尖部位血液样本至预冷的离心管中,以 $1\,200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min。离心后,收集上层血清,严格按照ELISA试剂盒说明书进行操作,依据标准曲线计算出血清LDH、NT-proBNP、IL-1 β 、TNF- α 和IL-10水平。

2.6 HE和Masson染色法检测心肌组织病理损伤和纤维化^[12]

心尖采血结束后,迅速分离心肌组织。将获取的心肌组织分为2组,随机选取5只小鼠心肌组织立即浸没于4%多聚甲醛固定液。固定24 h的心肌组织经过梯度乙醇脱水及二甲苯透明等处理后,置于56~58℃石蜡中包埋并制备成石蜡切片。选部分切片进行脱蜡、复水以及蒸馏水冲洗后,分别进行HE染色和Masson染色,用显微镜观察,并用Image J软件分析纤维化程度。

2.7 TUNEL染色法检测心肌细胞凋亡^[13]

取“2.6”制备的石蜡切片,按照TUNEL检测试剂盒说明书进行蛋白酶K通透化(37℃,30 min)、TdT反应液孵育(37℃,1 h)和荧光标记后,用共聚焦显微镜采集图像,并用Image J软件进行TUNEL阳性细胞计数,计算细胞凋亡率。

2.8 免疫组化法检测心肌组织凋亡相关蛋白表达^[9]

取“2.6”制备的石蜡切片,去除包埋石蜡与组织复水,与3%过氧化氢溶液在室温下孵育15 min。用pH 6.0的柠檬酸钠缓冲液作为修复液,将切片置于其中并加热至95℃,持续10 min。修复完成后,冷却至室温,将经1:100稀释的抗Bax、Bcl-2的一抗工作液滴加于组织区域。随后于4℃环境下孵育过夜,继续滴加二抗,于室温下孵育1 h,用二氨基联苯胺显色,用苏木素对细胞核进行复染,用显微镜采集图片,并用Image J软件分析棕黄色染色占比。

2.9 蛋白质印迹法检测心肌组织中炎症因子及p-p38 MAPK和p38 MAPK蛋白表达^[9]

取心肌组织,将组织剪碎并置于预冷匀浆器,加入含蛋白酶抑制剂与磷酸酶抑制剂的裂解缓冲液

进行组织匀浆。匀浆液在低温环境下以 $4.5\times 10^4\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,取上清液即为总蛋白提取物。用聚丙烯酰胺凝胶电泳系统进行分离,并转移至膜上,进行封闭。置于对应IL-1 β 、TNF- α 、IL-10、p-p38 MAPK、p38 MAPK一抗(1:1 000)中,4℃孵育过夜。在室温下用一抗种属匹配的羊抗兔二抗溶液(1:5 000)孵育1 h。洗涤后,与ECL发光底物反应,并用凝胶成像仪进行曝光与图形采集,用Image J软件对蛋白条带区域进行灰度值分析。

3 统计学处理

用SPSS 27.0软件进行统计分析。数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,涉及3个及以上组别的数据比较,用单因素方差分析,进一步用SNK- q 检验进行两两比较。

结 果

1 EB在DOX诱导DCM中的潜在靶点

通过PubChem数据库和SwissTargetPrediction平台筛选出EB的34个潜在作用靶点,通过GeneCards、OMIM和DisGeNET数据库筛选出1 018个DCM相关疾病靶点。用Venny 2.1在线工具处理EB靶点集与DCM疾病靶点集,获得5个共同潜在作用靶点。用STRING平台对上述交集靶点进行PPI网络分析,关键节点包括IL-1 β 、PPARG、PRKCA、TERT和EDNRA。GO功能富集分析显示,EB可能干预的生物过程涉及炎症反应等;KEGG通路富集分析显示,相关通路涉及MAPK信号通路和AGE-RAGE信号通路等。分子对接进一步表明,EB与p38 MAPK蛋白具有良好的结合活性。

2 EB对DCM小鼠心功能影响

与空白组比较,模型组的LVFS和LVEF均显著减少,LVESD和LVEDD均显著增加(均 $P<0.05$);与模型组比较,低、高剂量实验组、阳性对照组和抑制剂组的LVFS和LVEF均显著增加,LVESD和LVEDD均显著减少(均 $P<0.05$);与高剂量实验组比较,激活剂组的LVFS和LVEF均显著减少,LVESD和LVEDD均显著增加(均 $P<0.05$),见表1。

3 EB对DCM小鼠血清炎症因子及心肌损伤标志物水平的影响

与空白组比较,模型组的血清IL-10水平显著减少,LDH、NT-proBNP、IL-1 β 和TNF- α 水平均显著增加(均 $P<0.05$);与模型组比较,低、高剂量实验组、阳性对照组和抑制剂组的血清IL-10水平均显著增加,LDH、NT-proBNP、IL-1 β 和TNF- α 水平均

显著减少(均 $P < 0.05$);与高剂量实验组比较,激活剂组的血清 IL-10 水平显著减少,LDH、NT-proBNP、IL-1 β 和 TNF- α 水平均显著增加(均 $P < 0.05$),见表 2。

4 EB 对 DCM 小鼠心肌组织病理损伤和纤维化的影响

HE 染色法显示:与空白组比较,模型组小鼠心肌纤维结构紊乱、断裂,大量心肌细胞变性,间隙病理学增宽。与模型组比较,低、高剂量实验组、阳性对照组和抑制剂组小鼠心肌组织病理损伤得到改善,心肌纤维排列不规则减轻,断裂现象改善。与高剂量实验组比较,激活剂组小鼠心肌纤维结构损伤加重,见图 1。

Masson 染色法显示:空白组、模型组、低剂量实验组、高剂量实验组、阳性对照组、抑制剂组和激活剂组小鼠的心肌组织胶原纤维占比分别为 $(3.05 \pm 0.42)\%$ 、 $(18.91 \pm 2.04)\%$ 、 $(11.46 \pm 1.59)\%$ 、

$(5.27 \pm 0.64)\%$ 、 $(5.64 \pm 0.58)\%$ 、 $(5.49 \pm 0.57)\%$ 和 $(9.53 \pm 1.06)\%$,与空白组比较,模型组小鼠的胶原纤维占比显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,低、高剂量实验组、阳性对照组和抑制剂组小鼠的胶原纤维占比均显著比减少(均 $P < 0.05$);与高剂量实验组比较,激活剂组小鼠的胶原纤维占比显著增加($P < 0.05$)。

5 EB 对 DCM 小鼠心肌细胞凋亡影响

空白组、模型组、低剂量实验组、高剂量实验组、阳性对照组、抑制剂组和激活剂组的细胞凋亡率分别为 $(3.26 \pm 0.59)\%$ 、 $(42.95 \pm 6.84)\%$ 、 $(31.06 \pm 3.27)\%$ 、 $(6.82 \pm 0.92)\%$ 、 $(7.05 \pm 0.81)\%$ 、 $(7.13 \pm 0.72)\%$ 和 $(27.54 \pm 3.82)\%$,模型组与空白组比较,低、高剂量实验组、阳性对照组、抑制剂组与模型组比较,激活剂组与高剂量实验组比较,上述指标在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠心功能参数的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of mouse cardiac function parameters in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	n	LVFS(%)	LVEF(%)	LVESD(mm)	LVEDD(mm)
Blank	10	41.26 $\pm$ 0.07	84.72 $\pm$ 5.49	3.53 $\pm$ 0.26	6.01 $\pm$ 0.45
Model	10	26.60 $\pm$ 0.72 *	37.28 $\pm$ 2.57 *	5.96 $\pm$ 0.37 *	8.12 $\pm$ 0.59 *
Experimental - L	10	30.90 $\pm$ 0.29 #	49.56 $\pm$ 3.08 #	5.01 $\pm$ 0.24 #	7.25 $\pm$ 0.38 #
Experimental - H	10	44.26 $\pm$ 1.73 # Δ	76.49 $\pm$ 5.26 # Δ	3.64 $\pm$ 0.32 # Δ	6.53 $\pm$ 0.36 # Δ
Positive control	10	43.55 $\pm$ 1.04 # Δ	74.35 $\pm$ 4.65 # Δ	3.72 $\pm$ 0.31 # Δ	6.59 $\pm$ 0.42 # Δ
Inhibitor	10	42.62 $\pm$ 1.82 # Δ	75.81 $\pm$ 5.92 # Δ	3.77 $\pm$ 0.35 # Δ	6.57 $\pm$ 0.39 # Δ
Activator	10	33.66 $\pm$ 2.74 $\blacktriangle$	53.94 $\pm$ 5.73 $\blacktriangle$	4.75 $\pm$ 0.41 $\blacktriangle$	7.16 $\pm$ 0.31 $\blacktriangle$

LVFS: Left ventricular fractional shortening; LVEF: Left ventricular ejection fraction; LVESD: Left ventricular end - systolic diameter; LVEDD: Left ventricular end - diastolic diameter; Blank group: Saline; Model group: Modeled; Experimental - L group: Modeled + 5 mg $\cdot$ kg⁻¹ EB; Experimental - H group: Modeled + 20 mg $\cdot$ kg⁻¹ EB; Positive control group: Modeled + 5 mg $\cdot$ kg⁻¹ captopril; Inhibitor group: Modeled + 1 mg $\cdot$ kg⁻¹ SB20358; Activator group: Modeled + 20 mg $\cdot$ kg⁻¹ EB + 0.10 mg $\cdot$ kg⁻¹ anisomycin; Compared with blank group, * $P < 0.05$; Compared with model group, # $P < 0.05$; Compared with experimental - L group, Δ $P < 0.05$; Compared with experimental - H group, $\blacktriangle$ $P < 0.05$.

表 2 各组小鼠血清炎症因子及心肌损伤标志物水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum inflammatory factors and myocardial injury markers levels in mice in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	n	LDH(U $\cdot$ L ⁻¹)	NT-proBNP(pg $\cdot$ mL ⁻¹)	IL-1 β (pg $\cdot$ mL ⁻¹)	TNF- α (pg $\cdot$ mL ⁻¹)	IL-10(pg $\cdot$ mL ⁻¹)
Blank	10	125.24 $\pm$ 16.95	734.85 $\pm$ 90.24	2.08 $\pm$ 0.26	3.62 $\pm$ 0.49	95.34 $\pm$ 10.82
Model	10	246.72 $\pm$ 25.83 *	1 509.28 $\pm$ 163.17 *	12.95 $\pm$ 1.53 *	15.86 $\pm$ 1.67 *	38.72 $\pm$ 5.38 *
Experimental - L	10	198.65 $\pm$ 21.06 #	1 240.62 $\pm$ 157.95 #	8.16 $\pm$ 0.95 #	10.41 $\pm$ 1.82 #	56.28 $\pm$ 6.04 #
Experimental - H	10	149.59 $\pm$ 18.39 # Δ	841.57 $\pm$ 88.06 # Δ	3.72 $\pm$ 0.39 # Δ	4.65 $\pm$ 0.49 # Δ	81.96 $\pm$ 9.25 # Δ
Positive control	10	136.42 $\pm$ 15.71 # Δ	876.43 $\pm$ 91.53 # Δ	3.89 $\pm$ 0.42 # Δ	4.83 $\pm$ 0.52 # Δ	82.53 $\pm$ 8.78 # Δ
Inhibitor	10	138.46 $\pm$ 17.24 # Δ	862.91 $\pm$ 87.92 # Δ	3.84 $\pm$ 0.38 # Δ	4.81 $\pm$ 0.48 # Δ	82.45 $\pm$ 9.11 # Δ
Activator	10	187.69 $\pm$ 20.45 $\blacktriangle$	1 159.76 $\pm$ 125.71 $\blacktriangle$	7.03 $\pm$ 0.76 $\blacktriangle$	9.16 $\pm$ 1.35 $\blacktriangle$	59.71 $\pm$ 6.19 $\blacktriangle$

LDH: Lactate dehydrogenase; NT-proBNP: N-terminal pro-brain natriuretic peptide; IL-1 β : Interleukin-1 β ; TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; IL-10: Interleukin-10; Compared with blank group, * $P < 0.05$; Compared with model group, # $P < 0.05$; Compared with experimental - L group, Δ $P < 0.05$; Compared with experimental - H group, $\blacktriangle$ $P < 0.05$.

6 EB 对 DCM 小鼠心肌组织凋亡蛋白表达影响

与空白组比较,模型组小鼠心肌组织 Bcl-2 阳性率显著减少, Bax 阳性率显著增加(均 $P < 0.05$)。与模型组比较,低、高剂量实验组、阳性对照组和抑制剂组小鼠心肌组织 Bcl-2 阳性率均显著增加, Bax 阳性率均显著减少(均 $P < 0.05$)。与高剂量实验组比较,激活剂组小鼠心肌组织 Bcl-2 阳性率显著减少, Bax 阳性率显著增加(均 $P < 0.05$),见表3。

7 EB 对 DCM 小鼠心肌组织炎症因子及 p-p38 MAPK 和 p38 MAPK 蛋白表达的影响

与空白组比较,模型组小鼠心肌组织 IL-10 蛋

白相对表达水平显著降低, IL-1 β 、TNF- α 和 p-p38 MAPK/p38 MAPK 蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.05$)。与模型组比较,低、高剂量实验组、阳性对照组和抑制剂组小鼠心肌组织 IL-10 蛋白相对表达水平显著升高, IL-1 β 、TNF- α 和 p-p38 MAPK/p38 MAPK 蛋白相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.05$)。与高剂量实验组比较,激活剂组小鼠心肌组织 IL-10 蛋白相对表达水平显著降低, IL-1 β 、TNF- α 和 p-p38 MAPK/p38 MAPK 蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.05$),见图2和表4。

表3 各组小鼠心肌组织细胞淋巴瘤因子-2(Bcl-2)和 Bcl-2相关X蛋白(Bax)阳性率的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of positivity rates of B-cell lymphoma-2(Bcl-2) and Bcl-2-associated X protein(Bax) in mouse myocardial tissue in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Bcl-2 positive rate(%)	Bax positive rate(%)
Blank	5	16.81 $\pm$ 1.82	1.59 $\pm$ 0.18
Model	5	3.02 $\pm$ 0.54 [*]	18.37 $\pm$ 2.51 [*]
Experimental-L	5	6.97 $\pm$ 0.86 [#]	12.42 $\pm$ 1.63 [#]
Experimental-H	5	14.29 $\pm$ 1.43 ^{#Δ}	3.84 $\pm$ 0.45 ^{#Δ}
Positive control	5	13.05 $\pm$ 1.59 ^{#Δ}	4.05 $\pm$ 0.42 ^{#Δ}
Inhibitor	5	13.51 $\pm$ 1.46 ^{#Δ}	4.09 $\pm$ 0.41 ^{#Δ}
Activator	5	8.14 $\pm$ 0.95 [▲]	11.53 $\pm$ 1.28 [▲]

Compared with blank group, ^{*} $P < 0.05$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$; Compared with experimental-L group, ^{Δ} $P < 0.05$; Compared with experimental-H group, [▲] $P < 0.05$.

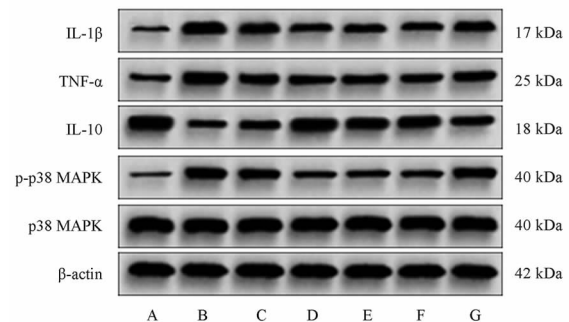


图2 蛋白质印迹法检测小鼠心肌组织炎症因子及磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p-p38 MAPK)和 p38 MAPK 蛋白相对表达水平

Figure 2 The relative expression levels of phosphorylation-p38 mitogen-activated protein kinase(p-p38 MAPK), p38 MAPK and inflammatory cytokines protein in mouse myocardial tissue detected by Western blot

A: Blank group; B: Model group; C: Experimental-L group; D: Experimental-H group; E: Positive control group; F: Inhibitor group; G: Activator group.

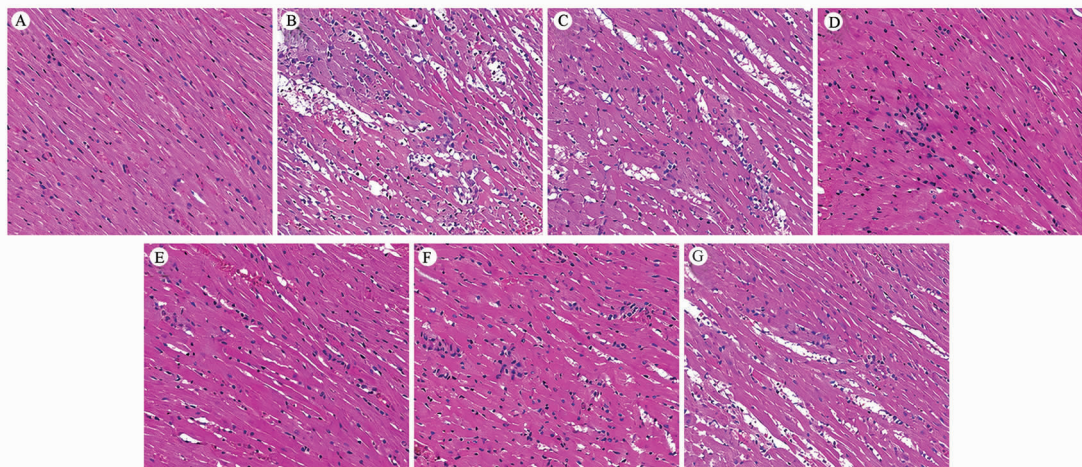


图1 苏木精-伊红(HE)染色法观察各组小鼠心肌组织病理变化($\times 200$)

Figure 1 Pathological changes in of mice myocardial tissue in each group observed by hematoxylin and eosin (HE) staining ($\times 200$)

A: Blank group; B: Model group; C: Experimental-L group; D: Experimental-H group; E: Positive control group; F: Inhibitor group; G: Activator group.

表4 各组小鼠心肌组织炎症因子及 p-p38 MAPK/p38 MAPK 蛋白相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)Table 4 Comparison of p-p38 MAPK/p38 MAPK and inflammatory cytokines protein in mouse myocardial tissue in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	n	IL-1 β	TNF- α	IL-10	p-p38 MAPK/p38 MAPK
Blank	5	0.31 $\pm$ 0.05	0.39 $\pm$ 0.04	0.99 $\pm$ 0.13	0.23 $\pm$ 0.03
Model	5	0.98 $\pm$ 0.10 [*]	0.95 $\pm$ 0.12 [*]	0.41 $\pm$ 0.05 [*]	0.86 $\pm$ 0.09 [*]
Experimental-L	5	0.72 $\pm$ 0.08 [#]	0.69 $\pm$ 0.07 [#]	0.56 $\pm$ 0.07 [#]	0.64 $\pm$ 0.08 [#]
Experimental-H	5	0.43 $\pm$ 0.06 ^{#Δ}	0.46 $\pm$ 0.05 ^{#Δ}	0.86 $\pm$ 0.09 ^{#Δ}	0.35 $\pm$ 0.04 ^{#Δ}
Positive control	5	0.47 $\pm$ 0.05 ^{#Δ}	0.49 $\pm$ 0.08 ^{#Δ}	0.84 $\pm$ 0.08 ^{#Δ}	0.37 $\pm$ 0.06 ^{#Δ}
Inhibitor	5	0.45 $\pm$ 0.07 ^{#Δ}	0.48 $\pm$ 0.05 ^{#Δ}	0.83 $\pm$ 0.09 ^{#Δ}	0.38 $\pm$ 0.05 ^{#Δ}
Activator	5	0.69 $\pm$ 0.09 [▲]	0.62 $\pm$ 0.07 [▲]	0.59 $\pm$ 0.06 [▲]	0.61 $\pm$ 0.08 [▲]

Compared with blank group, ^{*} $P < 0.05$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$; Compared with experimental-L group, ^{Δ} $P < 0.05$; Compared with experimental-H group, [▲] $P < 0.05$.

讨 论

DCM 是一种以心室扩大和收缩功能严重受损为特征的异质性心肌病变^[14]。其病理本质在于进行性、弥漫性的心肌重构,最终导致心肌细胞凋亡、坏死及间质纤维化^[15-16]。目前,DCM 的药物治疗包括血管紧张素转换酶抑制药、 β -受体阻滞药等,但对部分患者疗效有限,无法有效遏制心室容积持续扩大与功能进行性衰退^[17-18]。因此,探索可以改善心肌细胞存活与功能的新型有效药物,已成为 DCM 患者长期预后的研究方向。

炎症反应在 DCM 发生发展中起关键作用。本研究显示,DCM 小鼠心功能指标明显减退,血清促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 水平及心肌组织 IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达升高,抗炎因子 IL-10 水平及蛋白表达减少,与李芸^[19]等研究相似,提示促炎因子与抗炎因子之间动态平衡被打破可能是加剧心肌损伤及心功能恶化的重要原因。经 EB 治疗后,上述指标均显著逆转,且呈剂量依赖性,说明 EB 可能通过调节炎症因子平衡发挥心肌保护作用。心肌细胞凋亡是 DCM 进展的核心环节。凋亡导致功能性心肌细胞不可逆减少,幸存心肌细胞代偿性肥大,进而引发心脏结构异常改变。同时,凋亡细胞释放的炎症介质可以刺激成纤维细胞活化,促进胶原沉积,加剧心肌纤维化^[20]。本研究显示,DCM 小鼠心肌组织胶原纤维沉积占比、心肌细胞凋亡率、凋亡因子 Bax 表达增加,抗凋亡因子 Bcl-2 表达减少,与闫爱丽^[21]等研究相似。经 EB 治疗后,上述凋亡指标均显著改善,纤维化程度减轻。阳性药对照组结果与低、高剂量实验组一致,进一步提示 EB 可能与 captopril 具有相似的心脏保护作用机制。

网络药理学及分子对接预测 EB 治疗 DCM 的潜在机制涉及 MAPK 信号通路。杨娜等^[11]研究表明,抑制 p38MAPK 通路活性可以改善缺血性心律失常大鼠心肌损伤,抑制炎症因子释放;朱悦等^[22]研究发现,抑制 p38MAPK 磷酸化可以减轻 2 型糖尿病小鼠心肌纤维化和细胞凋亡。以上研究提示,p38MAPK 是连接心肌损伤与不良重构的关键机制。尽管 p38 MAPK 未直接出现在 5 个核心交集靶点(IL-1 β 、PPARG、PRKCA、TERT、EDNRA)中,但富集分析指向的 MAPK 信号通路包含 p38 等多条亚通路,且分子对接证实 EB 与 p38 MAPK 具有良好结合活性。因此,本研究选择 p38 MAPK 作为深入探究 EB 药效机制的关键通路。本研究发现,DCM 小鼠心肌组织 p-p38 MAPK/p38 MAPK 比值增加,经 EB 处理后该比值减少。为验证 EB 是否通过 p38 MAPK 通路发挥作用,分别使用 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 和激活剂 anisomycin 干预。结果显示,SB203580 组心功能及炎症凋亡指标改善效果与 EB 组相近;而加入 anisomycin 后,EB 的心脏保护作用被部分逆转。提示 EB 可能通过抑制 p38MAPK 通路发挥心脏保护效应。本研究证实,EB 通过抑制 p38 MAPK 通路发挥心脏保护作用,但其上游调控机制尚待阐明。p38 MAPK 的活化由上游激酶②髓性/淋巴系或混合谱系白血病 3/6 (myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3/6, MKK3/6)及③促分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MAP3K)家族成员介导如④转化生长因子 β 激活激酶 1 (transforming growth factor- β -activated kinase 1, TAK1)、凋亡信号调节激酶 1 (apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK1),阿霉素诱导的氧化应激可以促进活性氧爆发,进而激活 TAK1/ASK1-p38 MAPK 级联反应,诱发细胞凋亡和炎症,据此推测 EB

可能通过清除 ROS 或直接抑制 TAK1/ASK1 活性来调控 p38 MAPK。本研究仍存在一定局限性,未设置 EB 与 p38 MAPK 抑制剂的联合干预组,尚不能完全排除 EB 通过其他平行通路(如 NF- κ B)间接影响 p38 MAPK 磷酸化的可能性,EB 对 p38 MAPK 的调控是直接作用还是间接效应仍需通过体外基因敲减或过表达实验加以明确。后续将通过细胞实验和分子互作技术验证 EB 与 p38 MAPK 的直接结合,并利用 TAK1、ASK1 等上游分子的特异性干预,以全面阐明 EB 调控 p38 MAPK 通路的分子机制。

本研究提示,EB 能够减轻阿霉素诱导的 DCM 小鼠中心肌细胞凋亡及炎症反应,可能与抑制 p38MAPK 通路有关,这说明 EB 具备成为 DCM 治疗候选药物的潜力。但本研究仅通过动物模型进行体内实验进行验证,后续将通过体外实验与临床研究,以评估 EB 的医学转化价值,从而为 DCM 患者探索新的治疗策略提供依据。

参考文献:

- [1] LI M, HUANG H. Anesthetic management of patients with dilated cardiomyopathy undergoing noncardiac surgery [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2023, 59(9): 1567—1579.
- [2] DING R, CAO W, CHEN Y, et al. snRNA-seq reveals differential functional transcriptional pathway alterations in three mutant types of dilated cardiomyopathy [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 281(3): 136353—136389.
- [3] JIANG M, CHEN X, SONG Y, et al. NEXN deficiency leads to dilated cardiomyopathy in human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2025, 16(1): 402—417.
- [4] WANG X, MA S, LAI F, et al. Traditional applications, phytochemistry, and pharmacological activities of eupatorium lindleyanum DC.: A comprehensive review [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 8(12): 577124—577145.
- [5] HUANG Q, YANG J, ZHANG J, et al. Eupalinolide B suppresses pancreatic cancer by ROS generation and potential cuproptosis [J]. *iScience*, 2024, 27(8): 110496—110518.
- [6] KUANG W, ZHUGE R, SONG P, et al. Eupalinolide B inhibits periodontitis development by targeting ubiquitin conjugating enzyme UBE2D3 [J]. *MedComm* (2020), 2025, 6(1): e70034—e70052.
- [7] 刘丽茹, 姜海瑞, 隋慧颖. 缬草酸改善阿霉素诱导的小鼠心肌损伤的作用机制研究 [J]. *免疫学杂志*, 2025, 41(9): 609—617.
- [8] 杨璐瑶. 野马追内酯 B 通过靶向生物标志物 TAK1 调节 NF- κ B 和 MAPKs 信号通路对急性肺损伤的作用研究 [D]. 四川 成都: 成都中医药大学, 2023.
- [9] 吴琼, 董艺丹, 马梦娇, 等. 扩心方调控 ASK1/JNK/Cx43 信号通路对阿霉素诱导扩张型心肌病小鼠心肌细胞凋亡的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2024, 35(15): 3340—3347.
- [10] YANG F, LUO G, LIU MN, et al. Network pharmacology and experimental validation to investigate the mechanism of action of Zhilong Huoxue Tongyu capsule in the prevention and treatment of diabetic cardiomyopathy [J]. *PLoS One*, 2025, 20(5): e0323745—e0323765.
- [11] 杨娜, 曹跃岭, 郭丽华, 等. 沙棘黄酮抑制 p38MAPK/NF- κ B 信号通路改善大鼠缺血性心律失常的机制研究 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2026, 24(1): 50—56.
- [12] 薛松妍, 董怡, 王冕, 等. 黄芩苷对阿霉素诱导的扩张型心肌病大鼠心肌纤维化和 Th17 细胞分化的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2024, 24(12): 2207—2213, 2268.
- [13] 赵学飞, 陈凯. 冬凌草甲素对大鼠心肌梗死后心肌细胞凋亡和纤维化及 NLRP3 炎症通路的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2022, 31(15): 2064—2071, 2180.
- [14] DUNGU J N, LANGLEY S G, HARDY - WALLACE A, et al. Dilated cardiomyopathy: The role of genetics, highlighted in a family with filamin C (FLNC) variant [J]. *Heart*, 2022, 108(9): 676—682.
- [15] HEYMANS S, LAKDAWALA N K, TSCHÖPE C, et al. Dilated cardiomyopathy: Causes, mechanisms, and current and future treatment approaches [J]. *Lancet*, 2023, 402(10406): 998—1011.
- [16] LIU C F, LEON S, TANG W H W. Epigenetic regulation in dilated cardiomyopathy [J]. *Heart Fail Clin*, 2026, 22(1): 29—43.
- [17] ENZAN N, MATSUSHIMA S, IDE T, et al. The use of angiotensin II receptor blocker is associated with greater recovery of cardiac function than angiotensin-converting enzyme inhibitor in dilated cardiomyopathy [J]. *ESC Heart Fail*, 2022, 9(2): 1175—1185.
- [18] SADASIVAN C, GAGNON L R, HAZRA D, et al. Early genetic screening and cardiac intervention in patients with cardiomyopathies in a multidisciplinary clinic [J]. *ESC Heart Fail*, 2025, 12(3): 1942—1955.
- [19] 李芸, 牛璐璐, 关新义, 等. 茯苓多糖通过抑制炎症和氧化应激改善阿霉素诱导的心肌细胞损伤 [J]. *中华中医药学刊*, 2025, 43(6): 239—243.
- [20] ZHANG H, GUO H, HAN F, et al. Regulatory mechanisms of m6A methylation in dilated cardiomyopathy [J]. *Am J Transl Res*, 2025, 17(1): 47—59.
- [21] 闫爱丽, 罗梦瑶, 常晋瑞, 等. 橙皮素通过调控 AMPK/NLRP3 通路减轻阿霉素诱导的小鼠心肌毒性 [J]. *南方医科大学学报*, 2025, 45(9): 1850—1858.
- [22] 朱悦, 张蒙, 张源源, 等. 跑台运动通过下调 p38MAPK 信号抑制细胞焦亡改善 2 型糖尿病小鼠心肌纤维化的研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2024, 39(10): 1417—1429.

(本文编辑: 冀希炜 收稿日期 2026-04-20)