

黄芪甲苷通过调控 GPR35/AMPK/mTOR 信号轴改善 线粒体能量代谢抑制放射性大鼠心肌纤维化

任春贞^{1,2,4}, 李倩蓉^{1,2}, 舒畅^{1,2,3}, 陈其林^{1,2}, 李琳婵^{1,2}, 蒋虎刚^{1,2,4},
支晓东^{1,2,4}, 赵信科^{1,2,4}, 李应东^{1,2,4*}

(1. 甘肃中医药大学 中西医结合学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃省中医药防治慢性病重点实验室,
甘肃 兰州 730000; 3. 甘肃中医药大学 国际教育学院, 甘肃 兰州 730000;
4. 甘肃中医药大学附属医院, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] 旨在探讨 G 蛋白偶联受体 35(GPR35)/AMP 活化蛋白激酶(AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号轴介导的线粒体能量代谢在放射性心肌纤维化中的作用机制及黄芪甲苷的干预作用。将 40 只 Wistar 大鼠随机分为 4 组,每组 10 只。除空白组不予辐射外,其余各组大鼠均经麻醉后接受 40 Gy X 射线单次局部胸部照射 1 次,建立放射性心肌纤维化大鼠模型。辐射后,黄芪甲苷各干预组以 80、160 mg·kg⁻¹ 剂量分别灌胃,每日 1 次,连续给药 30 d。连续给药 30 d 后,ELISA 法检测血清氨基末端 BNP 前体(NT-proBNP)、心肌肌钙蛋白 I(cTnI)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)含量;苏木素-伊红(HE)、Masson 染色观察心肌组织病理变化;TUNEL 染色检测心肌细胞凋亡情况;比色法检测心肌能量代谢腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)、腺嘌呤核苷二磷酸(ADP)、腺嘌呤核苷一磷酸(AMP)水平及心肌线粒体呼吸链复合物 I~IV 活性;荧光探针检测心肌组织 Ca²⁺ 荧光强度表达;透射电镜检测心肌超微结构;免疫荧光及 Western blot 检测心肌组织 GPR35、磷酸化 AMPK(p-AMPK)、磷酸化 mTOR(p-mTOR)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、胱天蛋白酶-9(Caspase-9)、B 细胞淋巴瘤-2 基因(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、I 型胶原蛋白(COL-I)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)荧光及蛋白表达。结果显示,与空白组相比,模型组大鼠血清 NT-proBNP、cTnI、CK-MB 含量明显升高;心肌组织可见局灶性心肌细胞坏死溶解,结缔组织增生,胶原纤维阳性面积增多;心肌细胞凋亡率升高;ATP 水平显著下降,AMP 和 ADP 水平明显升高,线粒体呼吸链复合物 I~IV 活性明显降低;心肌细胞 Ca²⁺ 荧光显著升高;心肌线粒体破损严重,呈絮状改变,受损线粒体增多、肿胀、破裂、排列紊乱,嵴紊乱,部分线粒体出现空泡。心肌组织 GPR35、p-AMPK、Bax、Caspase-3、Caspase-9、COL-I、 α -SMA 蛋白及荧光表达明显升高,p-mTOR、Bcl-2 蛋白及荧光表达下降。与模型组相比,黄芪甲苷可明显抑制 NT-proBNP、cTnI、CK-MB 含量;心肌细胞凋亡率显著下降;ATP 水平显著升高,AMP 和 ADP 水平明显降低,线粒体呼吸链复合物 I~IV 活性明显升高;Ca²⁺ 荧光强度降低;线粒体损伤缓解,排列较整齐;GPR35、p-AMPK、Bax、Caspase-3、Caspase-9、COL-I、 α -SMA 蛋白及荧光表达明显下降,p-mTOR、Bcl-2 蛋白及荧光表达升高。综上所述,黄芪甲苷对放射性心肌纤维化具有抑制作用,其机制可能是通过调控 GPR35/AMPK/mTOR 信号轴改善线粒体能量代谢发挥作用。

[关键词] 黄芪甲苷;放射性心肌纤维化;线粒体功能;能量代谢;GPR35/AMPK/mTOR 信号轴

Astragaloside IV ameliorates mitochondrial energy metabolism and inhibits radiation-induced myocardial fibrosis in rats via regulating GPR35/AMPK/mTOR signaling axis

REN Chun-zhen^{1,2,4}, LI Qian-rong^{1,2}, SHU Chang^{1,2,3}, CHEN Qi-lin^{1,2}, LI Lin-chan^{1,2}, JIANG Hu-gang^{1,2,4},
ZHI Xiao-dong^{1,2,4}, ZHAO Xin-ke^{1,2,4}, LI Ying-dong^{1,2,4*}

[收稿日期] 2025-08-31

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82360926,82374279);中医药传承与创新“百千万”人才工程(岐黄工程)青年岐黄学者基金项目;国家中医药管理局“李应东全国名中医传承工作室”建设项目(国中医药办人教函[2022]5号);甘肃省科技重大专项计划项目(20ZD7FA002);“双一流”科研重点项目(GSSYLXM-05);甘肃教育揭榜挂帅项目(2021jyjbgs-03);2024 年甘肃省优秀博士生项目(24JRRA569)

[通信作者] *李应东,博士,教授,博士生导师,E-mail:lyd412@163.com

[作者简介] 任春贞,博士,副教授,E-mail:969628276@qq.com

- (1. School of Traditional Chinese and Western Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;
2. Key Laboratory of Chinese Medicine for Prevention and Treatment of Chronic Diseases in Gansu Province, Lanzhou 730000, China;
3. International Education College, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;
4. Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] This study aimed to elucidate the role of the G protein-coupled receptor 35 (GPR35)/AMP-activated protein kinase (AMPK)/mechanistic target of rapamycin (mTOR) signaling axis in mediating mitochondrial energy metabolism in radiation-induced myocardial fibrosis (RIMF) and to evaluate the interventional effect of astragaloside IV (AS-IV). Forty Wistar rats were randomly divided into four groups ($n=10$ per group). Except for the blank group, all rats were anesthetized and subjected to a single 40-Gy local thoracic X-ray irradiation to establish the RIMF model. After irradiation, AS-IV was administered intragastrically once daily at doses of 80 and 160 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ for 30 consecutive days. After 30 days of continuous administration, the serum levels of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP), cardiac troponinI (cTnI), and creatine kinase-MB (CK-MB) were quantified by ELISA. Hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining were used to observe myocardial histopathological changes, and TUNEL staining was performed to detect cardiomyocyte apoptosis. The levels of adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), and adenosine monophosphate (AMP), as well as the activities of mitochondrial respiratory chain complexes I-IV, were measured colorimetrically. The fluorescence intensity of Ca^{2+} in myocardial tissue was detected using a fluorescent probe, and ultrastructural changes were observed by transmission electron microscopy. The fluorescence intensity and protein expression levels of GPR35, phosphorylated AMPK (p-AMPK), phosphorylated mTOR (p-mTOR), Caspase-3, Caspase-9, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), type I collagen (COL-I), and α -smooth muscle actin (α -SMA) in myocardial tissue were analyzed by immunofluorescence and Western blot. Results showed that compared with the blank group, serum NT-proBNP, cTnI, and CK-MB levels in the model group were significantly increased. Myocardial tissue exhibited focal myocyte necrosis and dissolution, connective tissue hyperplasia, and an increased area of collagen fiber positivity. The cardiomyocyte apoptosis rate was elevated. Myocardial ATP levels were significantly decreased, while ADP and AMP levels were significantly increased. The activities of mitochondrial respiratory chain complexes I-IV were markedly reduced. The Ca^{2+} fluorescence intensity in myocardial cells was significantly enhanced. Severe mitochondrial damage was observed, showing flocculent changes, increased numbers of damaged mitochondria, swelling, rupture, disordered arrangement, disrupted cristae, and partial vacuolation. The fluorescence intensity and protein expression levels of GPR35, p-AMPK, Bax, Caspase-3, Caspase-9, COL-I, and α -SMA in myocardial tissue were significantly increased, whereas those of p-mTOR and Bcl-2 were decreased. Compared with the model group, AS-IV significantly reduced serum NT-proBNP, cTnI, and CK-MB levels, markedly decreased the cardiomyocyte apoptosis rate, significantly increased ATP levels while reducing ADP and AMP content, enhanced the activities of mitochondrial respiratory chain complexes I-IV, diminished Ca^{2+} fluorescence intensity, and alleviated mitochondrial damage, with mitochondria arranged more regularly. The fluorescence intensity and protein expression levels of GPR35, p-AMPK, Bax, Caspase-3, Caspase-9, COL-I, and α -SMA were significantly decreased, while those of p-mTOR and Bcl-2 were increased. In conclusion, AS-IV exerts an inhibitory effect on RIMF, and its mechanism may be associated with the regulation of the GPR35/AMPK/mTOR signaling axis to improve mitochondrial energy metabolism.

[Key words] astragaloside IV; radiation-induced myocardial fibrosis; mitochondrial function; energy metabolism; GPR35/AMPK/mTOR signaling axis

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20251011.707

放射治疗是癌症治疗的重要手段之一,而在此治疗过程中位于纵隔的心脏不可避免地受到辐射影响,使得心肌受到不同程度的损害导致放射性心脏病(RIHD)^[1-2]。放射性心肌纤维化(RIMF)是RIHD的晚期病理表现,会造成心脏重塑、心功能破坏和心力衰竭,甚至心源性猝死^[3]。在RIMF的过程中,线粒体损伤是导致心肌凋亡和功能障碍的关

键因素之一。此外,X射线诱导的心脏线粒体能量代谢障碍应该是放疗诱导细胞凋亡及纤维化的重要原因之一。研究表明,G蛋白偶联受体35(GPR35)在缺血性心脏病及心力衰竭患者心肌组织中呈高表达状态^[4]。AMP活化蛋白激酶(AMPK)是细胞能量感应器,其通过调节葡萄糖代谢和脂肪酸氧化,提高心肌细胞的能量供应,增强心肌细胞的抗损伤能

力^[5]。在心肌损伤中,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的激活可以促进蛋白质合成和细胞生长,有助于心肌细胞的修复和再生。GPR35、AMPK和mTOR三者共同构成一个精细调控的信号网络,参与多种病理生理过程。新兴证据表明,GPR35作为信号分子,GPR35的激动剂能够激活AMPK,控制着细胞能量储存与消耗平衡的相关进程,并证明GPR35/AMPK轴是调节细胞功能的关键通路^[6]。二甲双胍可通过激活AMPK/mTOR通路介导的自噬减轻柯萨奇病毒B3诱导的病毒性心肌炎^[7]。因此,深入研究GPR35/AMPK/mTOR信号轴的调控方式,有望为心肌损伤的防治提供新的视角。

目前临床上治疗心肌纤维化(MF)主要使用他汀类药物、血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张肽受体阻滞剂、 β 受体阻滞剂等,但临床疗效欠佳。因此,迫切需要开发一种更为安全有效的防治RIMF药物。黄芪是我国传统的益气活血类中药,已被证明在抗肾和抗肺纤维化方面发挥着至关重要的作用^[8-9],而且黄芪还可通过调节TGF- β 1/Smads和MMPs防治放射性心脏纤维化^[10]。黄芪甲苷(AS-IV)是黄芪主要的活性成分之一,具有较强的抗MF的作用,通过调节能量代谢、干预炎症反应等作用逐渐受到关注。研究发现AS-IV可能通过EGR1/SIRT1/PPAR α /SCAD信号通路改善脂肪酸氧化,减轻TAC小鼠病理性心肌肥厚及纤维化^[11]。AS-IV可以抑制慢性心力衰竭大鼠MF,其机制可能是通过上调LCAD、下调PFK1、纠正能量代谢异常实现的^[12]。然而,AS-IV是否通过调控GPR35/AMPK/mTOR信号轴抑制MF目前尚未明确。因此,本研究利用X射线建立RIMF大鼠模型,给予AS-IV治疗,观察AS-IV对RIMF的作用并研究其分子机制,以期为临床预防及治疗RIMF提供实验基础。

1 材料

1.1 动物 6周龄雄性Wistar大鼠40只,体质量(200 $\pm$ 20)g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,在甘肃中医药大学科研实验动物中心SPF级实验室中进行饲养。实验动物生产许可证号SCXK(京)2019-0010。实验动物使用许可证号SYXK(甘)2021-0004。动物于相对湿度45%~55%、温度(22 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C、12 h光暗循环的环境下,适应性饲养2周,自由进食饮水。动物实验经甘肃中医药大学科研实验

中心伦理委员会批准(批准号SY2024-260)。

1.2 药物及试剂 AS-IV(纯度 $\geq$ 98.00%)购自美国GLP BIO公司,货号84687-43-4。苏木素-伊红(HE)、Masson染色试剂盒、磷酸化蛋白酶抑制剂、电镜固定液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为G1003、G1032、G2007-1ML、G1102-100ML);TUNEL试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号G1501-50T);GPR35抗体(英国Abcam公司,货号ab150635);AMPK、胱天蛋白酶(Caspase)-9抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号YT0216、YT0662);磷酸化AMPK(p-AMPK)、mTOR、磷酸化mTOR(p-mTOR)、Caspase-3、GAPDH抗体(美国GeneTex公司,货号分别为GTX139429、GTX101557、GTX103429、GTX110543、00118);B细胞淋巴瘤-2基因(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体(上海延慕实业有限公司,货号分别为YM3619、YM3041);活性氧试剂检测盒(上海碧云天生物技术股份有限公司,货号S0033S);线粒体呼吸链复合物I、II、III、IV活性、ATP含量检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为BC0510、BC3230、BC3245、BC0940、BC0300);腺嘌呤核苷二磷酸(ADP)、腺嘌呤核苷一磷酸(AMP)含量检测试剂盒(江苏酶免实业有限公司,货号分别为MM-70131R1、MM-0780R1)。

1.3 仪器 透射电子显微镜(日本HITACHI公司,型号HT7800/HT7700);X射线辐照仪(美国Faxitron公司,型号X-RAD-225);包埋机(浙江省金华市俊杰电子有限公司,型号JB-L7);组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司,型号KD-P);正置荧光显微镜(日本尼康公司,型号NIKON ECLIPSE C1);便携式数字化彩色超声诊断仪(苏州飞依诺科技有限公司,型号VINNO 6LAB);病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,型号RM2016)。

2 方法

2.1 X射线建立放射性大鼠心肌纤维化模型 依据本实验课题组前期研究、预实验和相关文献,建立X射线诱导大鼠心肌纤维化的模型^[13]。使用X射线辐照仪对大鼠心脏进行局部照射,单次剂量40 Gy,剂量率2.0 Gy $\cdot$ min⁻¹。照射前1 d对大鼠禁食禁水。辐射时将大鼠进行戊巴比妥钠腹腔麻醉;然后将动物固定在消毒干净的木板上。充分暴露胸壁,观察到心跳最突出的部位,并用黑色记号笔进行标记。用铅板进行全身保护,仅使标记

(2 cm×2 cm)心脏区域接受单次剂量为 40 Gy 心脏局部辐射。照射后常规饲养 30 d 后,主要根据心肌组织 HE 及 Masson 染色判断 RIMF 造模是否成功。

2.2 分组及给药 选取 40 只体质量(200±20)g 的 Wistar 大鼠适应性饲养 2 周后,采用随机数字表法分为 4 组,每组 10 只:①空白(control)组;②模型(model)组;③黄芪甲苷低剂量(AS-IV-L)组;④黄芪甲苷高剂量(AS-IV-H)组。除空白组不予辐射外,其余各组大鼠均经麻醉后接受辐射剂量 40 Gy X 射线单次局部胸部照射 1 次,建立 RIMF 大鼠模型。辐射后,AS-IV 低、高剂量组大鼠以 80、160 mg·kg⁻¹剂量配以无菌蒸馏水灌胃,空白组与模型组均接受等体积生理盐水灌胃处理。每日 1 次,连续灌胃 30 d。

2.3 ELISA 法检测大鼠血清氨基末端 BNP 前体(NT-ProBNP)、心肌肌钙蛋白(cTnI)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)含量 采用 ELISA 试剂盒检测 NT-proBNP、cTnI、CK-MB 的浓度。取各组大鼠血清,4 ℃,12 000 r·min⁻¹离心 10 min,吸取上清液,使用酶标测定仪在 450 nm 波长下进行检测,并根据检测结果计算 NT-proBNP、cTnI、CK-MB 的含量。

2.4 观察心肌组织病理学形态变化 取大鼠左心室组织用 4%多聚甲醛固定,包埋切片,经脱蜡、水化,进行 HE 及 Masson 染色,封片后在显微镜下观察,并进行结果判定。

2.5 TUNEL 荧光染色评价心肌细胞凋亡 取左心室心肌组织切片,用 40%中性甲醛固定,脱水并包埋后采用病理切片机制作成连续切片,厚度 4 μm,严格根据 TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒操作要求进行,加入 TUNEL 反应混合液,于 37 ℃湿盒中孵育 60 s,用 PBS 充分冲洗,加入植物过氧化物酶(POD)转化剂,同条件继续孵育 30 s, PBS 充分冲洗,加入辣根过氧化物酶显色底物(DAB)溶液,常温孵育 3 s, PBS 溶液充分冲洗,苏木素复染,常规脱水后采用中性树胶封片,显微镜下观察心肌细胞凋亡情况。细胞核红色荧光为凋亡细胞,凋亡率=阳性细胞数/细胞总数×100%。

2.6 比色法检测大鼠心肌能量代谢(ATP、ADP、AMP)水平 用比色法检测心肌 ATP、ADP、AMP 水平。准确称量大鼠心脏组织,然后制成 10%的匀浆。然后根据相关试剂盒的检测要求,进行 ATP、

ADP、AMP 含量检测。

2.7 比色法检测心肌细胞线粒体呼吸链复合物 I~IV 活性 首先心肌提取线粒体,随后测定其蛋白质含量。分别通过消毒、复苏、清洗组织、润洗组织、匀浆组织、低速离心、高速离心、弃上清液等步骤,最后-80 ℃冰箱保存。然后采用比色法,按照线粒体呼吸链复合物测定试剂盒说明书进行线粒体呼吸链复合物 I~IV 活性的检测。

2.8 荧光探针检测大鼠心肌组织 Ca²⁺ 荧光强度表达 准备大鼠心脏组织样本,制作成冰冻切片。对切片进行固定处理,然后用 Ca²⁺ 特异性荧光抗体进行孵育。清洗掉未结合的抗体后,最后置荧光显微镜下观察。

2.9 透射电镜观察大鼠心肌组织超微结构 取大鼠左心室心尖部组织后浸入电镜液中保存,进行固定、脱水、浸透等步骤,最后用透射电镜观察。

2.10 免疫荧光检测大鼠心脏组织蛋白荧光表达 取左心室,脱蜡水化,微波炉枸橼酸抗原修复 4 次,冷却后用 5% BSA 于 37 ℃ 封闭 30 min,滴加 GPR35、p-AMPK、p-mTOR、Caspase-3、Caspase-9、Bax、Bcl-2、COL- I、α-SMA 一抗(1:100),4 ℃ 过夜;吸去一抗,PBS 冲洗 3 次,滴加 CY5 标记二抗,37 ℃ 孵育 1 h,PBS 冲洗,滴加 DAPI 染核,37 ℃ 孵育 10 min 后,抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜扫片,观察免疫荧光标记蛋白表达。使用 ImagePro Plus 软件对蛋白的相对表达(平均灰度=灰度/面积)进行测量和分析。

2.11 Western blot 检测心肌组织蛋白表达 取右心室组织并充分裂解提取总蛋白,用 BCA 试剂盒对蛋白定量。取各组蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,电转膜 1 h 至 PVDF 膜,转膜后以胎牛血清蛋白封闭 2 h,TBST 洗 3 次,每次 5 min,将 GPR35、AMPK、p-AMPK、p-mTOR、Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9、α-SMA、COL- I、GAPDH(1:2 000)用 TBST 稀释后加入一抗,4 ℃ 过夜。次日加入二抗,37 ℃ 孵育 2 h 后,TBST 洗 3 次,每次 5 min,用 ECL 显影,显影后,用 ImageJ 分析软件计算其条带灰度相对表达量。

2.12 统计分析 用 GraphPad Prism 8.0.2 进行统计分析。本实验结果数据均为计量资料,且数据符合正态分布,均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示。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, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠心脏解剖后体积、大小及形态观察
空白组中心脏光泽度较好,湿润有弹性,颜色红润。在 X 射线辐照 30 d 后,与空白组相比,模型组心脏光泽度较暗,湿润度较差,弹性下降,颜色暗红,体积增大;与模型组相比,AS-IV 各干预组心脏体积明显变小,光泽度较好,湿润度较高,弹性较好,颜色较鲜亮,见中国知网本文增强出版附加材料。

3.2 AS-IV 对各组大鼠血清 NT-proBNP、cTnI、CK-MB 的影响 与空白组相比,模型组大鼠血清 NT-proBNP、cTnI、CK-MB 含量明显升高;与模型组相比,AS-IV 低剂量、高剂量组大鼠血清 NT-proBNP、cTnI、CK-MB 含量明显降低,见表 1。

表 1 各组大鼠血清 NT-proBNP、cTnI、CK-MB 的含量比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Comparison of serum content of NT-proBNP, cTnI and CK-MB of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	NT-proBNP /pg·mL ⁻¹	cTnI /U·L ⁻¹	CK-MB /U·L ⁻¹
control	237.01±18.11	218.29±23.05	515.61±71.21
model	360.04±25.29 ²⁾	415.58±50.74 ²⁾	1 069.00±203.64 ²⁾
AS-IV-L	304.62±19.09 ³⁾	354.13±21.37 ³⁾	889.56±77.51 ³⁾
AS-IV-H	266.47±25.92 ⁴⁾	253.74±23.51 ⁴⁾	688.16±69.24 ⁴⁾

注:control. 空白组;model. 模型组;AS-IV-L. 黄芪甲苷低剂量组(80 mg·kg⁻¹);AS-IV-H. 黄芪甲苷高剂量组(160 mg·kg⁻¹)(图 1~6、表 2~6 同)。与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~6 同)。

3.3 AS-IV 对各组大鼠心肌组织病理形态学的影响

HE 染色显示空白组大鼠的心肌细胞排列整齐,肌纤维连接紧密,胞核清晰;模型组大鼠心肌组织可见局灶性肌细胞坏死溶解,结缔组织增生,肌纤维断裂,排列较紊乱,有炎性细胞浸润;AS-IV 低、高剂量大鼠心肌细胞排列较整齐,肌纤维断裂较少,部分间隙稍有增宽。Masson 染色显示空白组大鼠心肌组织结构形态正常;与空白组相比,模型组大鼠心肌组织胶原纤维阳性面积增多,心肌纤维化程度加重;与模型组相比,AS-IV 低、高剂量组大鼠心肌组织中胶原纤维阳性面积减少,心肌纤维化程度减轻,见图 1、表 2。

3.4 AS-IV 对各组大鼠心肌细胞凋亡影响 与空白组相比,模型组的心肌细胞凋亡率显著升高;给予 AS-IV 低、高剂量组干预后心肌细胞凋亡率显著下降,见图 2、表 2。

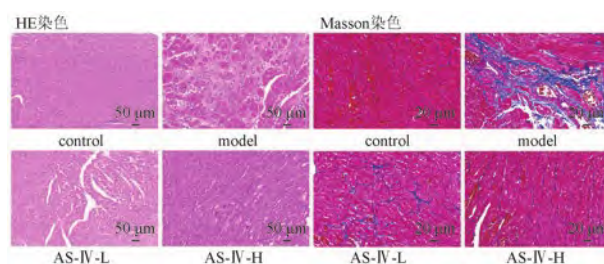


图 1 各组大鼠心肌组织结构和纤维化分析

Fig. 1 Analysis of myocardial tissue structure and fibrosis of rats in each group

表 2 各组大鼠心肌纤维化阳性面积和心肌细胞凋亡率的比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Comparison of positive area of myocardial fibrosis and cardiomyocyte apoptosis rate of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	胶原纤维相对阳性面积	心肌细胞凋亡率 %
control	6.81±1.04	1.97±0.48
model	37.49±3.43 ²⁾	18.32±2.21 ²⁾
AS-IV-L	24.76±4.01 ⁴⁾	9.98±1.98 ⁴⁾
AS-IV-H	15.75±4.12 ⁴⁾	6.30±1.51 ⁴⁾

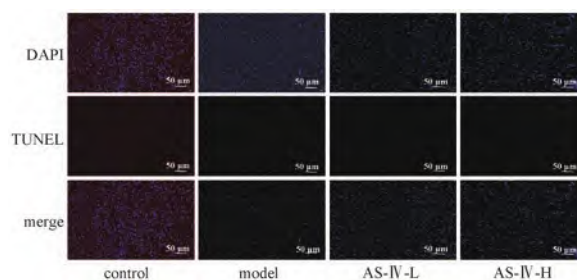


图 2 各组大鼠心肌细胞凋亡率(TUNEL, ×200)

Fig. 2 Cardiomyocyte apoptosis rate of rats in each group (TUNEL, ×200)

3.5 AS-IV 对各组大鼠心肌组织 ATP、AMP 及 ADP 含量的影响 与空白组相比,模型组心肌组织 ATP 水平显著下降,AMP 和 ADP 含量明显升高;与模型组相比,AS-IV 低、高剂量组心肌组织 ATP 含量显著增加,同时 AMP 和 ADP 含量明显降低,见表 3。

3.6 AS-IV 对各组大鼠心肌线粒体呼吸链复合物 I~IV 活性的影响 与空白组相比,模型组心肌组织线粒体呼吸链复合物 I~IV 活性呈明显降低;与模型组相比,AS-IV 低剂量、高剂量组心肌组织线粒体呼吸链复合物 I~IV 活性明显升高,见表 4。

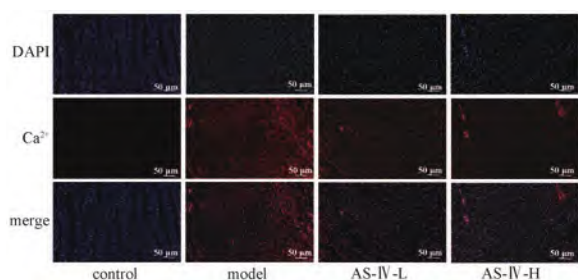
3.7 AS-IV 对各组大鼠心肌组织 Ca²⁺ 荧光强度的影响 与空白组相比,模型组心肌细胞内 Ca²⁺ 荧光强

表 3 各组大鼠心肌组织 ATP、AMP 及 ADP 含量的比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 3 Comparison of ATP, AMP, and ADP contents in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$) nmol·mg⁻¹

组别	ATP	AMP	ADP
control	4 224.58±289.24	3 889.65±141.75	3 878.43±221.31
model	2 190.29±238.98 ²⁾	5 816.56±813.07 ¹⁾	6 317.52±408.39 ²⁾
AS-IV-L	2 732.48±301.61 ³⁾	4 637.52±376.49 ³⁾	5 222.36±260.50 ³⁾
AS-IV-H	3 537.51±346.36 ⁴⁾	4 180.62±174.64 ⁴⁾	4 312.55±251.34 ⁴⁾

表 4 各组大鼠心肌线粒体呼吸链复合物 I~IV 活性及心肌组织 Ca²⁺ 荧光表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 4 Comparison of myocardial mitochondrial respiratory chain complex I-IV activity and Ca²⁺ fluorescence expression in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	线粒体呼吸链复合物 I /U·mg ⁻¹	线粒体呼吸链复合物 II /U·mg ⁻¹	线粒体呼吸链复合物 III /U·mg ⁻¹	线粒体呼吸链复合物 IV /U·mg ⁻¹	Ca ²⁺ 荧光强度 /%
control	1 813.16±52.12	135.54±4.53	78.84±4.20	179.25±17.70	3.12±0.48
model	792.64±110.71 ²⁾	34.27±1.55 ²⁾	33.08±5.69 ²⁾	76.67±16.54 ²⁾	42.47±4.80 ²⁾
AS-IV-L	910.76±84.89 ³⁾	75.18±4.34 ⁴⁾	59.90±1.87 ⁴⁾	119.56±8.22 ³⁾	34.35±4.16 ⁴⁾
AS-IV-H	1 272.82±56.23 ⁴⁾	119.60±4.23 ⁴⁾	66.24±5.25 ⁴⁾	134.51±5.11 ⁴⁾	21.28±2.92 ⁴⁾

图 3 各组大鼠心肌组织 Ca²⁺ 表达变化 (荧光探针, ×200)Fig. 3 Changes of Ca²⁺ expression in myocardial tissue of rats in each group (fluorescent probe, ×200)

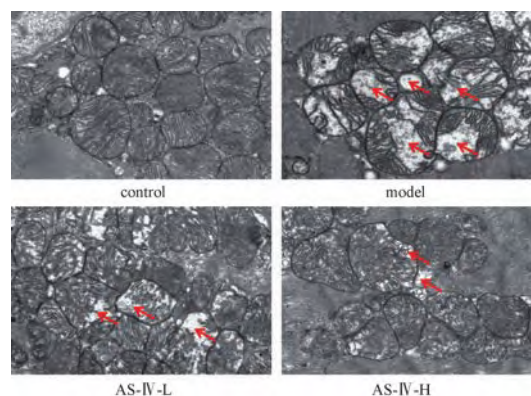
乱,部分肌丝断裂,线粒体排列稍整齐,线粒体形态不规则,嵴紊乱,部分有线粒体破裂和肿胀;AS-IV高剂量组肌丝排列较整齐,线粒体排列较整齐,形态较规则,个别线粒体轻微肿胀,嵴大多排列整齐,少量断裂,细胞排列整齐,见图 4。

3.9 AS-IV 对大鼠心肌组织 GPR35、p-AMPK、p-mTOR、Caspase-3、Caspase-9、Bax、Bcl-2、COL- I、α-SMA 的荧光表达的影响 与空白组相比,模型组 GPR35、p-AMPK、Bax、Caspase-3、Caspase-9、COL-I、α-SMA 荧光表达明显升高,p-mTOR、Bcl-2 荧光强度明显下降;与模型组相比,AS-IV 低剂量、高剂量组 GPR35、p-AMPK、Bax、Caspase-3、Caspase-9、COL-I、α-SMA 荧光表达明显下降,p-mTOR、Bcl-2 荧光表达明显升高,见图 5、表 5。

510

度显著升高;与模型相比,AS-IV 低、高剂量组大鼠心肌细胞 Ca²⁺ 荧光强度明显降低,见图 3、表 4。

3.8 AS-IV 对大鼠心肌超微架构的影响 空白组心肌肌丝完整,排列整齐紧密,线粒体排列整齐,形态正常,边界清晰,嵴明显;模型组肌丝排列疏松紊乱,心肌线粒体破损严重,呈絮状改变,受损线粒体增多、肿胀、破裂、排列紊乱,形态不规则,嵴紊乱,部分线粒体出现空泡;AS-IV 低剂量组肌丝排列稍紊



红色箭头指示线粒体破损严重,肿胀、破裂,呈絮状改变,部分出现空泡。

图 4 各组大鼠心肌超微结构 (透射电镜, ×6 300)

Fig. 4 Myocardial ultrastructure of rats in each group (transmission electron microscope, ×6 300)

3.10 AS-IV 对大鼠心肌组织 GPR35、AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR、Caspase-3、Caspase-9、Bax、Bcl-2、COL- I、α-SMA 蛋白表达的影响 与空白组相比,模型组 GPR35、p-AMPK、Caspase-3、Caspase-9、Bax、COL- I、α-SMA 蛋白表达显著升高,p-mTOR、Bcl-2 蛋白表达降低;与模型组相比,AS-IV 低剂量、高剂量组 GPR35、p-AMPK、Caspase-3、Caspase-9、Bax、COL- I、α-SMA 蛋白表达降低,p-mTOR、Bcl-2 蛋白表达升高,见图 6、表 6。

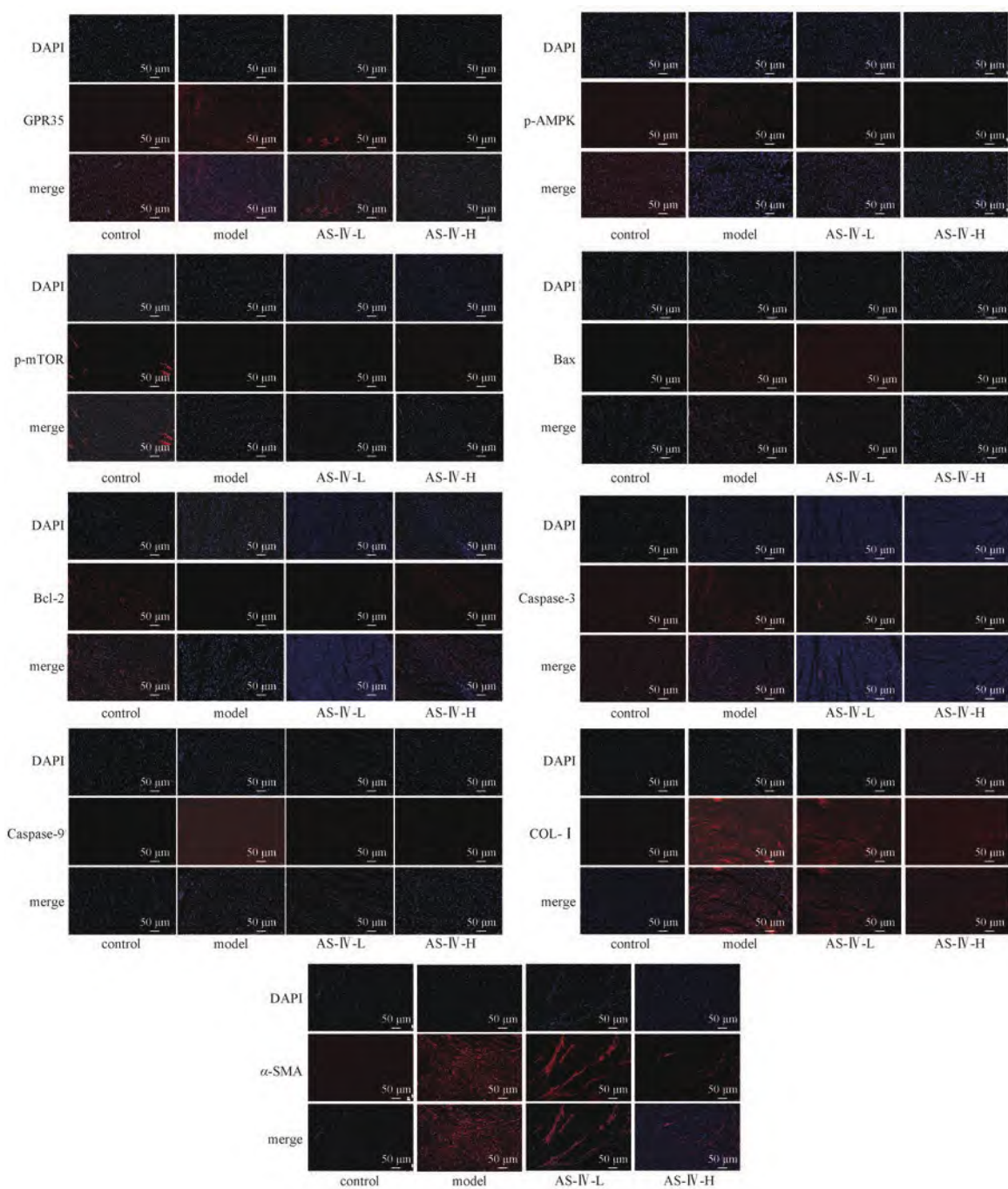


图 5 各组大鼠心肌组织 GPR35、p-AMPK、p-mTOR、Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9、COL-1、 α -SMA 荧光表达变化 ($\times 200$)

Fig. 5 Changes of GPR35, p-AMPK, p-mTOR, Bax, Bcl-2, Caspase-3, Caspase-9, COL-1, and α -SMA fluorescence expression in myocardial tissue of rats in each group ($\times 200$)

4 讨论

X 射线会导致心肌顺应性下降、僵硬、收缩舒张功能减退从而引发心力衰竭,最终病理结果发展为 MF。中医学认为 RIMF 属于“胸痹、心悸”等范畴。其基本病机是气血亏虚、血脉瘀阻,治疗以“益气养

血活血”为原则,药选补药之长的黄芪为宜。黄芪,味甘,性微温,归肺、脾经,有补气升阳,益卫固表,托毒生肌之效;而且黄芪还能活血通络,扶正祛邪,被广泛应用于治疗炎症、病毒和细菌感染以及癌症^[14]。AS-IV 是黄芪中活性最强的单体,具有抗炎、

表 5 各组大鼠心肌组织 GPR35/AMPK/mTOR 轴蛋白荧光表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 5 Comparison of fluorescence expression of GPR35/AMPK/mTOR axis protein in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	GPR35	p-AMPK	p-mTOR	Bax	Bcl-2	Caspase-3	Caspase-9	COL- I	α -SMA
control	1.86 $\pm$ 0.65	2.56 $\pm$ 0.50	14.38 $\pm$ 2.08	1.77 $\pm$ 0.51	10.86 $\pm$ 1.18	2.62 $\pm$ 0.59	2.11 $\pm$ 0.92	1.66 $\pm$ 0.64	3.35 $\pm$ 0.94
model	10.82 $\pm$ 1.28 ²⁾	14.57 $\pm$ 1.98 ²⁾	3.10 $\pm$ 1.52 ²⁾	11.21 $\pm$ 1.49 ²⁾	2.37 $\pm$ 0.51 ²⁾	10.44 $\pm$ 1.19 ²⁾	16.49 $\pm$ 1.56 ²⁾	10.04 $\pm$ 1.10 ²⁾	27.46 $\pm$ 3.98 ²⁾
AS-IV-L	7.97 $\pm$ 1.15 ³⁾	10.54 $\pm$ 0.73 ⁴⁾	6.04 $\pm$ 1.57 ⁴⁾	7.21 $\pm$ 1.31 ³⁾	3.51 $\pm$ 1.03 ³⁾	7.43 $\pm$ 1.07 ⁴⁾	10.05 $\pm$ 1.26 ⁴⁾	5.78 $\pm$ 0.75 ⁴⁾	15.90 $\pm$ 2.25 ⁴⁾
AS-IV-H	5.95 $\pm$ 0.72 ⁴⁾	6.15 $\pm$ 0.68 ⁴⁾	9.67 $\pm$ 1.16 ⁴⁾	3.67 $\pm$ 0.59 ⁴⁾	6.60 $\pm$ 1.16 ⁴⁾	4.90 $\pm$ 0.89 ⁴⁾	6.82 $\pm$ 0.72 ⁴⁾	3.47 $\pm$ 0.75 ⁴⁾	9.42 $\pm$ 1.09 ⁴⁾

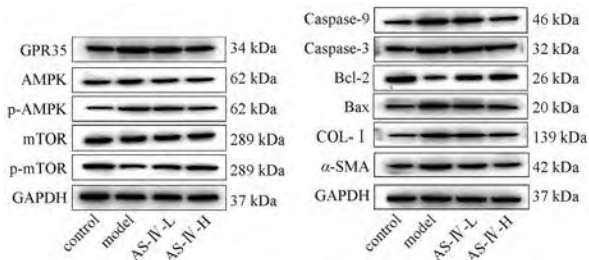


图 6 蛋白免疫印迹检测大鼠心肌中 GPR35/AMPK/mTOR 轴、凋亡及纤维化相关蛋白表达

Fig. 6 Western blot analysis of GPR35/AMPK/mTOR axis, apoptosis-related, and fibrosis-related protein expression in rat myocardial tissue

抗纤维化和抗氧化应激,抑制心肌纤维化,改善心室重构等作用^[15]。动物实验证实,AS-IV 具有器官保护作用,对脓毒症、呼吸衰竭模型动物心、肺、肠组织均有抗损伤作用^[16-17]。既往研究显示,AS-IV 也可联合曲美他嗪调节心力衰竭犬心肌能量代谢,维持心肌细胞的功能^[18]。此外,AS-IV 可通过激活 PPAR 来增强脂肪酸氧化从而改善心力衰竭小鼠心脏功能,也可通过抑制 Ca^{2+} 通道及改善脂肪酸代谢从而抑制心室重构^[19]。此外,AS-IV 能够明显改善 AS 小鼠血脂水平及主动脉组织脂质沉积,其机制可能与激活 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路、改善脂质代

表 6 各组大鼠心肌组织 GPR35/AMPK/mTOR 轴、凋亡及纤维化相关蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 6 Comparison of GPR35/AMPK/mTOR axis, apoptosis-related and fibrosis-related protein expression in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	GPR35	p-AMPK/AMPK	p-mTOR/mTOR	Caspase-3	Caspase-9	Bcl-2	Bax	COL- I	α -SMA
control	0.73 $\pm$ 0.01	0.82 $\pm$ 0.01	1.22 $\pm$ 0.02	0.78 $\pm$ 0.02	0.69 $\pm$ 0.02	1.01 $\pm$ 0.02	0.65 $\pm$ 0.02	0.66 $\pm$ 0.01	0.54 $\pm$ 0.01
model	1.14 $\pm$ 0.02 ²⁾	1.35 $\pm$ 0.02 ²⁾	0.74 $\pm$ 0.01 ²⁾	1.10 $\pm$ 0.01 ²⁾	1.04 $\pm$ 0.03 ²⁾	0.50 $\pm$ 0.01 ²⁾	1.02 $\pm$ 0.04 ²⁾	1.11 $\pm$ 0.02 ²⁾	1.09 $\pm$ 0.02 ²⁾
AS-IV-L	0.99 $\pm$ 0.01 ⁴⁾	1.25 $\pm$ 0.01 ⁴⁾	0.92 $\pm$ 0.01 ⁴⁾	0.99 $\pm$ 0.02 ³⁾	0.97 $\pm$ 0.01 ⁴⁾	0.73 $\pm$ 0.02 ³⁾	0.91 $\pm$ 0.01 ⁴⁾	0.98 $\pm$ 0.03 ⁴⁾	0.86 $\pm$ 0.03 ⁴⁾
AS-IV-H	0.80 $\pm$ 0.02 ⁴⁾	1.01 $\pm$ 0.02 ⁴⁾	1.12 $\pm$ 0.03 ⁴⁾	0.87 $\pm$ 0.01 ⁴⁾	0.82 $\pm$ 0.01 ⁴⁾	0.87 $\pm$ 0.03 ⁴⁾	0.77 $\pm$ 0.03 ⁴⁾	0.82 $\pm$ 0.01 ⁴⁾	0.67 $\pm$ 0.02 ⁴⁾

谢平衡、减轻铁死亡有关^[20]。本研究发现,以 AS-IV 干预 RIMF 大鼠后,血清 NT-proBNP、CK-MB 和 cTnI 水平均显著降低;大鼠心肌组织坏死溶解减少,肌纤维断裂较少,排列较整齐,胶原纤维阳性面积减少。

近年来发现,线粒体能量代谢异常在 RIMF 病理进程中起关键作用。线粒体是独立的细胞器,通过呼吸消耗氧气、燃烧糖类等生产约 95% 的 ATP,被称为细胞动力室^[21]。线粒体功能受损源于 Ca^{2+} 过度蓄积,引发心功能减退及纤维化改变。心脏作为高能量需求器官,正常生理活动依赖大量 ATP 供应。RIMF 发生时,心肌细胞 ATP 合成受阻,糖酵解途径激活, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶功能受抑, Na^+ 浓度升高,促使 $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ 逆向转运增强,胞外 Ca^{2+} 大量内流,细胞内 Ca^{2+} 浓度异常升高并向线粒体转移,形成线

粒体 Ca^{2+} 超载。随后,线粒体通透性转换孔开放,促凋亡因子释放,激活细胞凋亡级联反应,造成 ATP 显著减少,加剧心肌细胞凋亡和心功能障碍^[22-23]。此外,在心脏能量代谢异常过程中,ATP、ADP 和 AMP 之间的转换是重要生化过程。ATP 是细胞内主要能量货币,心脏细胞通过有氧呼吸产生 ATP,依赖脂肪酸和葡萄糖氧化代谢。正常时,ATP 合成与消耗保持动态平衡。然而,心肌受损会使心脏能量代谢异常,影响 ATP 生成和利用^[24-25]。能量需求增加或 ATP 水平下降时,ATP 去磷酸化转化为 ADP,ADP 进一步去磷酸化生成 AMP。AMP 是细胞能量水平重要指标,其与 ADP、ATP 的比率影响心肌细胞代谢反应。心脏代谢异常时,ATP/ADP/AMP 比率失衡,可能导致心肌细胞代谢重新编程,影响心脏舒缩功能。另外,线粒体呼吸链复合物酶在线粒体

氧化磷酸化过程中起关键作用。线粒体呼吸链复合物 I~IV 位于线粒体内膜上,在氧化磷酸化过程中,通过传递 H^+ 产生电子势能,线粒体呼吸链复合物 V 利用梯度差将 ADP 转化为 ATP。线粒体呼吸链复合物活性降低会引发线粒体功能障碍、氧化磷酸化受损,进而影响 ATP 正常供应,导致心功能下降^[26]。此外,心脏缺血缺氧时,线粒体呼吸链复合物 IV 的亚单位三磷酸腺苷合成酶 δ 亚基(ATP5D)低表达^[27],导致 ATP 合成减少,ATP 降解为 ADP 或 AMP。研究发现心肌缺血模型大鼠线粒体呼吸链复合物 III 活性下降会损害线粒体呼吸功能,且与心脏功能障碍明显相关^[28]。本研究中,模型组大鼠心肌组织 Ca^{2+} 荧光强度明显升高;ATP 含量降低,ADP、AMP 含量显著升高;线粒体复合物 I~IV 活性降低;心肌肌丝排列疏松紊乱,心肌细胞破裂、线粒体破损严重,呈絮状改变,受损线粒体增多、肿胀、破裂、排列紊乱,形态不规则,嵴紊乱,部分线粒体出现空泡;经 AS-IV 干预后,心肌组织 Ca^{2+} 荧光强度降低;心肌组织 ATP 含量升高,ADP、AMP 含量显著降低。线粒体呼吸链复合物 I~IV 活性升高;线粒体损伤缓解,嵴大多排列整齐,细胞排列整齐。

辐射不仅损伤细胞 DNA,还会导致线粒体损伤,诱导能量代谢障碍、细胞凋亡信号的激活等,从而加剧心肌纤维化。GPCR 作为体内最大的超家族膜细胞表面受体,是心脏分化、生长、收缩和心率调控的关键分子。GPCR 活化在心血管疾病中扮演着重要角色。有研究者运用基因组方法对 12 例慢性心力衰竭患者心肌样本分析发现,GPR35 表达明显升高,揭示 GPR35 与心力衰竭之间的关联^[29]。研究发现,心力衰竭、压力负荷性心肌肥厚的代偿期和失代偿期均可诱导 GPR35 蛋白表达增加,在上调 GPR35 表达后加速病理性心肌重塑和心力衰竭,特异性抑制剂干预可部分逆转这种改变^[30-31]。与此同时,研究证实 AMPK/mTOR 信号通路的异常激活在 MF 过程中发挥着重要的作用^[32]。作为细胞能量变化感受器的 AMPK,是一种“能量调节剂”,在心肌线粒体生物发生中发挥着重要作用^[33-34]。AMPK 被高比例的 AMP/ATP 激活,随后抑制 mTOR 和磷酸化的活性结节性硬化复合蛋白 2(TSC2),最终导致能量代谢的激活。同时,AMPK 可通过增加 Bax 的比例发挥抗凋亡作用。然而,AMPK 的激活同样会触发一系列细胞反应,包括促进细胞凋亡。

AMPK 通过对 mTOR 途径的负向调节影响细胞生长和蛋白质合成,进一步导致细胞周期的中断和自噬过程的增加。在持续的压力下,mTOR 信号的抑制推动细胞向凋亡方向发展^[35]。在心肌纤维化发展过程中,AMPK/mTOR 通路的失调与心肌细胞凋亡的增加密切相关。Caspase 家族在促细胞凋亡中起重要作用,Caspase-3 和 Caspase-9 是细胞凋亡的执行者^[36]。心肌细胞凋亡释放的信号因子,如 α -SMA、COL-I 等,能够促进成纤维细胞活化和细胞外基质蛋白质的过度合成,造成心肌组织结构和功能的障碍,进一步加重大量的胶原纤维沉积和增多,最终导致心肌纤维化。本实验结果显示,模型组心肌细胞凋亡率显著增加,GPR35、p-AMPK、Bax、Caspase-3、Caspase-9、COL-I、 α -SMA 荧光信号及蛋白表达明显升高,p-mTOR、Bcl-2 荧光信号及蛋白表达明显降低;而经 AS-IV 干预后心肌细胞凋亡率明显减少;Bax、Caspase-3、Caspase-9、COL-I、 α -SMA 荧光信号及蛋白表达降低,p-mTOR、Bcl-2 荧光信号及蛋白表达升高。

综上所述,X 线辐射通过 GPR35/AMPK/mTOR 轴引发心脏线粒体能量代谢紊乱,引起心肌细胞的凋亡,导致 RIMF 的发生。AS-IV 可能通过调节 GPR35/AMPK/mTOR 信号轴,改善心脏线粒体结构和功能,提高线粒体氧化零酸化,改善心肌能量代谢,抑制大鼠心肌细胞的凋亡,减少胶原纤维的沉积,从而有效缓解 RIMF。

[参考文献]

- [1] HUFNAGLE J J, ANDERSEN S N, MAANI E V. Radiation-induced cardiac toxicity [M]. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2025.
- [2] KAI X W, CONG Y, XU Y, et al. New insights into the understanding of mechanisms of radiation-induced heart disease [J]. Curr Treatment Options Oncol, 2023, 24(1): 12.
- [3] GU J J, LI H X, WEI W, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation alleviates radiation-induced myocardial fibrosis through inhibition of the TGF- β 1/Smad2/3 signaling pathway in rabbit model [J]. Regen Ther, 2023, 24: 1.
- [4] 张启情, 焦宇, 张尊建, 等. GPR35 去孤儿化研究及其在疾病中的作用 [J]. 药学报, 2023, 58(8): 2139.
- [5] MINA K, SARA P, FATTAH S, et al. Activation of AMPK promotes cardiac differentiation by stimulating the autophagy pathway [J]. J Cell Commun Sign, 2023, 17(3): 939.
- [6] ZHEN D, LIU J, ZHANG X D, et al. Kynurenic acid acts as a signaling molecule regulating energy expenditure and is closely associated with metabolic diseases [J]. Front Endocrinol, 2022,

- 13; 847611.
- [7] GAO Y, LIU J, LI K, et al. Metformin alleviates sepsis-associated myocardial injury by enhancing AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin signaling pathway-mediated autophagy[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2023, 82(4): 308.
- [8] 周森, 李侃, 安海倩, 等. 基于网络药理学的“黄芪-当归”药对抗肾纤维化的作用机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(2): 179.
- [9] 王春玲, 任春贞, 王旭勇, 等. 当归黄芪超滤物通过调控 Nrf2/xCT/GPX4 信号通路抑制铁死亡改善放射性大鼠肺纤维化[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(16): 4338.
- [10] 赵信科, 王新强, 蒋虎刚, 等. 黄芪有效活性成分防治心肌纤维化的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(4): 593.
- [11] 卿丽媛, 刘兰婷, 徐庆萍, 等. 黄芪甲苷 IV 基于 EGR1-SIRT1-PPAR α -SCAD 信号通路减轻小鼠病理性心肌梗厚及纤维化[J]. 中国药理学通报, 2025, 41(2): 242.
- [12] 唐斌, 张金国, 谭洪勇, 等. 黄芪甲苷对慢性心衰大鼠心肌纤维化及能量代谢的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(3): 411.
- [13] 任春贞, 陈其林, 张启立, 等. 当归黄芪超滤物通过调控 ROS/GSH/GPx4 轴抑制铁死亡改善放射性大鼠心肌纤维化[J]. 中国药理学通报, 2024, 40(4): 723.
- [14] 戴瑜婷, 张雪燕, 王艺璇, 等. 黄芪的现代研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(7): 1754.
- [15] 赵小强, 赵静, 张浩波, 等. 黄芪甲苷的提取、分离、纯化及其药理作用的研究进展[J]. 华西药理学杂志, 2022, 37(6): 711.
- [16] 黄鑫, 尹鑫, 马世玉, 等. 黄芪甲苷对脓毒症大鼠脏器的影响[J]. 广东医学, 2018, 39(3): 340.
- [17] 屈高洁, 廖玲, 胡康. 黄芪甲苷治疗急性呼吸衰竭模型大鼠的效果及作用机制研究[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(19): 3014.
- [18] 霍红, 王凤荣. 曲美他嗪联合黄芪甲苷对心力衰竭犬心肌细胞 Ca^{2+} 水平的影响[J]. 中成药, 2018, 40(5): 1164.
- [19] 施敏, 魏佳明, 袁惠, 等. 黄芪活性成分治疗心力衰竭作用机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(3): 208.
- [20] 秦合伟, 孙孟艳, 王梦楠, 等. 黄芪甲苷控 Nrf2/HO-1/GPX4 通路抑制铁死亡改善 ApoE $^{-/-}$ 小鼠动脉粥样硬化的机制研究[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(13): 3619.
- [21] CHEN Q, AN S, WANG C, et al. Phase separation in mitochondrial fate and mitochondrial diseases[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2025, 122(21): e2422255122.
- [22] BERNARD P, GERLE C, HALESTRAP A P, et al. Identity, structure, and function of the mitochondrial permeability transition pore: controversies, consensus, recent advances, and future directions[J]. Cell Death Differ 30, 2023, 30(8): 1869.
- [23] WANG R, WANG M, LIU B, et al. Calenduloid E protects against myocardial ischemia-reperfusion injury induced calcium overload by enhancing autophagy and inhibiting L-type Ca^{2+} channels through BAG3[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 145: 112432.
- [24] 崔喜元, 杨丁, 王哲, 等. 基于 PGC-1 α /PPAR α 信号通路探讨稳心颗粒对心梗后心衰大鼠能量代谢的影响[J]. 海南医学院学报, 2025, 31(11): 801.
- [25] 王星禹, 朱国琴, 宁可, 等. 银杏酮酯激活 ATP 敏感的钾通道对心肌缺血再灌注损伤大鼠的预防作用[J]. 中成药, 2023, 45(9): 3052.
- [26] WU C, ZHANG Z, ZHANG W, et al. Mitochondrial dysfunction and mitochondrial therapies in heart failure[J]. Pharmacol Res, 2022, 175: 106038.
- [27] 李竹, 王嫣, 周雯静, 等. 线粒体呼吸链酶复合物在心肌缺血再灌注损伤中的作用进展[J]. 实用医学杂志, 2024, 40(15): 2172.
- [28] HEATHER L C, CARR C A, STUCKEY D J, et al. Critical role of complex III in the early metabolic changes following myocardial infarction[J]. Cardiovasc Res, 2010, 85(1): 127.
- [29] MIN K D, ASAKURA M, LIAO Y, et al. Identification of genes related to heart failure using global gene expression profiling of human failing myocardium[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 393(1): 55.
- [30] RONKAINEN V P, TUOMAINEN T, HUUSKO J, et al. Hypoxia-inducible factor 1-induced G protein-coupled receptor 35 expression is an early marker of progressive cardiac remodelling[J]. Cardiovasc Res, 2014, 101(1): 69.
- [31] 贺磊, 杨怡, 田玥, 等. 抑制 G 蛋白偶联受体 35 对小鼠缺血性心肌损伤的保护作用[J]. 解放军医学杂志, 2018, 43(2): 101.
- [32] HUANG H, WANG T, WANG L, et al. Saponins of *Panax japonicus* ameliorates cardiac aging phenotype in aging rats by enhancing basal autophagy through AMPK/mTOR/ULK1 pathway[J]. Exp Gerontol, 2023, 182: 112305.
- [33] YIN X, GUO Z, SONG C, et al. AMPK, a key molecule regulating aging-related myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Mol Biol Rep, 2024, 51(1): 257.
- [34] MURAKAWA T, ITO J, RUSU M C, et al. AMPK regulates Bcl2-L-13-mediated mitophagy induction for cardioprotection[J]. Cell Rep, 2024, 43(12): 115001.
- [35] XI S, DING W, WENG D, et al. Chrysophanol induces apoptosis and ferroptosis of gastric cancer cells by targeted regulation of mTOR[J]. Chem Biol Drug Des, 2024, 103(1): e14417.
- [36] JUN F Y, YI X, JING S, et al. Crosstalk of the Caspase family and mammalian target of rapamycin signaling[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2): 817.

[责任编辑 陈玲]