

DOI: 10.14188/j.1671-8852.2025.0643

文章编号 1671-8852(2026)09-1180-10

常春藤皂苷元对压力超负荷诱导的小鼠心肌肥厚及纤维化的影响

德吉尼玛 郭 振 项嘉华 马晨晨 吴婧禧 樊 迪

武汉大学中南医院心血管内科/武汉大学心肌损伤与修复研究所/湖北省心血管病介入诊疗临床医学研究中心 湖北 武汉 430071

摘要 目的:探讨常春藤皂苷元(HD)对压力超负荷诱导的小鼠心肌肥厚及纤维化的影响及其潜在分子机制。方法:采用小鼠主动脉弓缩窄(TAC)模型构建心肌纤维化模型。采用随机数表法将8~10周龄雄性C57BL/6小鼠分为4组,初始每组10只,假手术组(Sham组)、假手术+HD组(Sham+HD组)、主动脉弓缩窄组(TAC组)、主动脉弓缩窄+HD组(TAC+HD组)。TAC或假手术3周后给予常春藤皂苷元($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)腹腔注射,连续1周。为验证JAK2/STAT3信号通路在HD抗纤维化作用中的关键性,另设置JAK2特异性抑制剂鲁索利替尼($30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)对照组。通过超声心动图评估心脏功能;采用组织染色评估心肌肥大和纤维化程度;结合分子生物学方法分析心肌肥厚/纤维化标志物表达和JAK2/STAT3信号通路活化水平。结果:与TAC组相比,HD治疗显著降低心质量/体质量比和肺质量/体质量比,改善心功能(LVEF及LVFS升高,LVEDd降低, $P<0.05$),减轻心肌细胞肥大(细胞横截面积减小,Anp和Bnp表达降低, $P<0.05$)和纤维化(COL-I、COL-III表达和纤维化面积减少, $P<0.05$)。同时,HD处理明显抑制了JAK2/STAT3信号通路的活化(p-JAK2/t-JAK2和p-STAT3/t-STAT3比值降低, $P<0.05$)。作为机制验证,JAK2特异性抑制剂鲁索利替尼处理组表现出与HD组相似的保护作用,进一步支持HD通过抑制JAK2/STAT3信号通路发挥抗纤维化效应。结论:常春藤皂苷元可有效改善压力超负荷诱导的小鼠心肌肥厚和心肌纤维化,其作用机制主要是通过抑制JAK2/STAT3信号通路的过度活化。

关键词 心肌纤维化;常春藤皂苷元;鲁索利替尼;JAK2/STAT3信号通路;压力超负荷

中图分类号 R542.2

文献标志码 A

Effects of Hederagenin on cardiac hypertrophy and fibrosis induced by pressure overload in mice

DEJI NIMA, GUO Zhen, XIANG Jiahua, MA Chenchen, WU Jingxi, FAN Di

Department of Cardiology, Zhongnan Hospital of Wuhan University; Institute of Myocardial Injury and Repair, Wuhan University; & Hubei Provincial Clinical Medical Research Center for Cardiovascular Disease Interventional Diagnosis and Treatment, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract

Objective: To investigate the effects of hederagenin (HD) on pressure overload-induced cardiac hypertrophy and fibrosis in mice, and to explore the underlying molecular mechanisms. **Methods:** A myocardial fibrosis model was established using transverse aortic constriction (TAC) in mice. Male C57BL/6 mice (aged 8 - 10 weeks) were randomly divided into four groups ($n=10/\text{group}$): Sham group, Sham+HD group, TAC group, and TAC+HD group. Three weeks after TAC or sham

课题来源:国家自然科学基金资助项目(编号:82272233);中央高校基本科研业务费专项资金资助(编号:2042025YXA003)。
作者简介:德吉尼玛,女,2000—,医学硕士生,主要从事心力衰竭和心室重构等相关研究,E-mail:1402196966@qq.com。
通信作者:樊迪,E-mail:drfanti@yeah.net。

operation, mice received daily intraperitoneal injections of hederagenin ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) for 1 week. To verify the critical role of the JAK2/STAT3 signaling pathway in HD's anti-fibrotic effects, an additional group receiving the JAK2-specific inhibitor ruxolitinib ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) was included as a positive control. Cardiac function was assessed by echocardiography, myocardial hypertrophy and fibrosis by histological staining, and the expression of hypertrophic/fibrotic markers and JAK2/STAT3 pathway activation by Western blot and qPCR. **Results:** Compared with the TAC group, HD treatment significantly reduced heart weight/body weight and lung weight/body weight ratios, improved cardiac function (increased LVEF and LVFS, decreased LVEDd, $P < 0.05$), attenuated cardiomyocyte hypertrophy (reduced cross-sectional area, decreased Anp and Bnp expression, $P < 0.05$), and mitigated fibrosis (reduced COL-I, COL-III expression and fibrotic area, $P < 0.05$). Furthermore, HD treatment notably inhibited JAK2/STAT3 pathway activation (decreased p-JAK2/t-JAK2 and p-STAT3/t-STAT3 ratios, $P < 0.05$). Mechanistically, the ruxolitinib-treated group exhibited protective effects similar to those of HD, further supporting that HD exerts anti-fibrotic effects through inhibition of the JAK2/STAT3 signaling pathway. **Conclusion:** Hederagenin effectively ameliorates pressure overload-induced cardiac hypertrophy and myocardial fibrosis in mice, primarily by inhibiting hyperactivation of the JAK2/STAT3 signaling pathway.

Key Words Myocardial Fibrosis; Hederagenin; Ruxolitinib; JAK2/STAT3 Signaling Pathway; Pressure Overload

心力衰竭作为心血管疾病发展的终末阶段,以心脏收缩和/或舒张功能严重受损为特征,导致全身组织灌注不足并引发多器官功能障碍综合征,其全球患病率呈持续上升趋势,目前已成为公共卫生领域的重大挑战^[1]。根据《中国心血管健康与疾病报告2023》^[2]数据显示,我国心力衰竭患病人数已达890万,且呈持续上升趋势。随着人口老龄化进程加速及不健康生活方式的普遍存在,心力衰竭的发病率和死亡率预计将持续攀升,医疗经济负担日益加重^[3]。

在该病理进程中,心肌纤维化作为关键的组织学改变,通过复杂的分子机制推动心力衰竭的发生与发展。心肌纤维化是心肌组织在损伤、慢性炎症、缺血缺氧或毒性物质刺激下,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积的病理性修复过程。这一改变导致心脏结构异常,僵硬度显著增加,进而损害心室的顺应性与电机械耦联功能。随着纤维化程度的加重,心肌收缩力下降与舒张功能障碍出现,最终形成心力衰竭的恶性循环^[4-5]。研究^[6]表明,心肌纤维化不仅是心力衰竭发生发展的关键病理基础,也是决定其预后的重要因素。因此,深入探究心肌纤维化的发病机制并寻找有效的干预措施,对心力衰竭的防治具有重要意义。

Janus激酶/信号转导和转录激活因子(Janus kinase/signal transducer and activator of transcription,

JAK/STAT)信号通路作为一种快速的跨膜信号传导系统,在心血管疾病的病理生理过程中发挥着关键作用^[7]。特别是JAK2/STAT3亚型在心肌肥厚、炎症反应、纤维化和心肌重构等过程中起着核心调控作用^[8]。研究^[9]表明,多种促纤维化因子(如TGF- β 1、IL-6、Ang II等)可通过活化JAK2/STAT3通路,上调 α -SMA和胶原蛋白的表达,促进心脏成纤维细胞向肌成纤维细胞转化,最终导致细胞外基质过度沉积和心肌纤维化。在压力超负荷性心脏重塑模型中,JAK2/STAT3信号通路被显著激活^[10]。研究^[11]发现,Ang II可直接促进JAK2磷酸化并随后激活STAT3,从而诱导纤维化相关基因的表达。而TGF- β 1也能通过JAK2依赖性机制激活STAT3,形成TGF- β 1/JAK2/STAT3信号轴,在心肌纤维化中发挥协同作用^[12]。研究^[13]表明,选择性JAK2抑制剂能够通过抑制JAK2/STAT3通路的过度激活,显著减轻心肌肥厚与纤维化。这些发现为临床开发靶向JAK2/STAT3的抗心肌纤维化药物提供了重要的理论基础。

常春藤皂苷元(Hederagenin, HD)是一种从常春藤(Hedera helix)等植物中分离出的五环三萜类化合物,化学结构式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$,在自然界中资源丰富,广泛分布于川续断科、忍冬科、毛茛科、五加科及败酱科等多种药用植物中。HD具有多种药理活性,包括抗肿瘤、抗炎、抗氧化和免疫调节等作用。

在抗肿瘤领域,HD可通过抑制肿瘤细胞自噬,显著增强顺铂和紫杉醇的细胞毒性作用^[14];在神经保护方面,HD能够通过PPAR α /TFEB介导的自噬途径改善阿尔茨海默病^[15];在代谢性疾病中可改善胰岛素抵抗、改善脂质代谢紊乱等^[16];在肺、肾脏等纤维化中起到抗纤维化作用^[17-18];同时还具备显著的抗炎作用^[19]。在心血管疾病中,研究^[20]发现,HD可以改善心肌缺血再灌注损伤,其作用与影响细胞凋亡、氧化应激和铁过载等有关,但目前HD与心肌纤维化等方面的研究仍较少,其潜在的分子机制尚不完全明确。

鉴于JAK2/STAT3信号通路在心肌纤维化中的关键调控作用,以及HD在多种器官纤维化中展现的抗纤维化效应,我们提出假设:HD可能通过调控JAK2/STAT3信号通路发挥抗心肌纤维化作用。本研究拟采用小鼠主动脉弓缩窄(transverse aortic constriction, TAC)模型,结合体内外实验,系统探究HD对压力超负荷诱导的心肌肥厚及纤维化的影响,并进一步阐明其潜在的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料 常春藤皂苷元(纯度 $\geq 98\%$)购自美国MedChemExpress(批号:HY-N0256);鲁索利替尼(Ruxolitinib)购自美国MedChemExpress(HY-50856);小麦胚芽凝集素(wheat germ agglutinin, WGA)荧光染料购自美国Invitrogen公司(批号:W849);天狼猩红(picro sirius red, PSR)染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司(批号:S8060-5);抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体(批号:ab7817)、抗磷酸化JAK2(p-JAK2)抗体(批号:ab32101)、抗总JAK2(t-JAK2)抗体(批号:ab108596)、抗磷酸化STAT3(p-STAT3)抗体(批号:ab76315)、抗总STAT3(t-STAT3)抗体(批号:ab68153)、抗GAPDH抗体(批号:ab181602)均购自英国Abcam公司;TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司(批号:15596);反转录试剂盒和实时PCR(real-time PCR, RT-PCR)试剂(瑞士Roche公司, 896866001), SYBR Green I Master(瑞士Roche公司, 4707516001)。定量RT-PCR仪(瑞士Roche公司, 型号:LC480), 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司, Synergy HT)。其他试剂均为分析纯。

1.2 动物模型的构建与分组 实验动物为8~10周龄雄性C57BL/6小鼠(体重质量22~25 g), 购自北

京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号:SCXK(京)2021-0008。所有动物实验方案均经武汉大学中南医院动物护理和使用委员会批准。小鼠在温度(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度(55 ± 5)%、12 h光照/黑暗周期下饲养, 自由摄食饮水。初始分组:采用随机数表法将小鼠分为四组, 每组10只:假手术组(Sham组)、假手术+HD组(Sham+HD组)、主动脉弓缩窄组(TAC组)、主动脉弓缩窄+HD组(TAC+HD组)。TAC手术按以下步骤进行:小鼠经异氟烷(1.5%~2.0%)吸入麻醉后, 仰卧位固定, 消毒胸部皮肤, 在胸骨左侧第2~3肋间做1.0~1.5 cm切口, 分离胸部肌肉, 暴露胸腔。仔细分离组织, 显露主动脉弓。在无名动脉与左颈总动脉之间的主动脉弓上放置一根27G针头作为支架, 用7-0丝线将主动脉弓和针头一起缝合, 随后小心取出针头, 形成约65%~70%的主动脉狭窄。关闭胸腔, 缝合肌肉和皮肤。Sham组进行相同的手术步骤但不进行主动脉缩窄。术后给予布洛芬($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 皮下注射)用于镇痛, 并密切监控恢复情况。待病理性重塑稳定期(失代偿心衰)后, 即手术后3周, TAC+HD组和Sham+HD组小鼠每天腹腔注射HD($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 溶于0.5%DMSO和生理盐水中), 连续1周。验证性分组:基于初期实验结果, 为验证HD与Ruxolitinib在抑制心肌纤维化方面具有相同的生物学效应, 进一步将小鼠分为4组, 每组10只:Sham组、TAC组、TAC+HD组、TAC+Ruxolitinib组。TAC+Ruxolitinib组小鼠每天腹腔注射鲁索利替尼($30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 溶于0.5%DMSO和生理盐水中), TAC组和Sham组小鼠每天腹腔注射等体积的溶剂(0.5%DMSO生理盐水)。所有小鼠连续给药1周后进行心脏超声检查和组织采集。本研究动物初始入组数量为每组10只;部分组织学、分子生物学检测中, 因标本降解、蛋白提取失败等原因剔除不合格样本, 各检测指标最终有效样本量详见对应图注。

1.3 小动物超声心动图检查 采用MyLab 30CV超声仪(Esaote SpA, Genoa, Italy)评估小鼠心脏功能。小鼠经1.5%~2.0%异氟烷吸入麻醉后, 俯卧位固定于加热平台上, 保持体温在(37.0 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 。使用MS400探头(30 MHz)在短轴切面和长轴切面下采集二维和M型超声心动图图像, 测量以下参数:左室舒张末期内径(left ventricular end diastolic dimension, LVEDd)、左室收缩末期内径(left ventricular end systolic diameter, LVESd)、

左室前壁厚度(left ventricular anterior wall thickness, LVAWT)和左室后壁厚度(left ventricular posterior wall thickness, LVPWT)。计算左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)和左室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS)。每只小鼠连续测量3个心动周期取平均值,所有超声心动图检查和分析均由不知晓分组情况的研究人员完成。

1.4 组织学检查与染色分析 超声检查后,小鼠处死后迅速摘取心脏,用预冷的PBS冲洗,测量心脏质量并计算心脏质量/体质量(HW/BW)比值。同时,称取肺脏质量,计算肺质量/体质量(LW/BW)比值评估肺水肿程度。将心脏组织一部分固定于4%多聚甲醛溶液中24 h,一部分在液氮中速冻后保存于 -80°C 冰箱备用。

固定的心脏组织经石蜡包埋后,制备 $5\text{ }\mu\text{m}$ 厚连续切片,并用梯度乙醇溶液脱水。采用荧光标记的WGA染色评估心肌细胞横截面积,每只小鼠随机选取5个视野($200\times$),每个视野测量20个心肌细胞的横截面积并取平均值;PSR染色观察心肌胶原纤维沉积,在光学显微镜下拍照($200\times$),通过Image J软件(NIH,美国)计算纤维化面积占总面积的百分比。

1.5 心脏成纤维细胞的分离、培养与处理 心脏成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)采用贴壁分离法从1~3日龄新生SD大鼠心脏组织中获取。具体而言,将新生大鼠心脏无菌取出,PBS冲洗后剪碎成 1 mm^3 小块, 0.1% I型胶原酶(德国Sigma-Aldrich公司,C0130) 37°C 消化45 min。终止消化后, $1\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min收集细胞,并用含 10% 胎牛血清(FBS,美国Gibco公司,10099-141)、 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素的DMEM培养基(美国Gibco公司,11995-065)重悬。细胞悬液转移至培养皿中, 37°C 、 5% CO_2 条件下培养90 min,利用成纤维细胞比心肌细胞更快贴壁的特性进行分离。弃去上清后,用新鲜培养基继续培养贴壁细胞。采用流式细胞术和免疫荧光染色(使用抗波形蛋白抗体,Vimentin,1:200,美国Cell Signaling Technology公司)鉴定成纤维细胞纯度($>95\%$)。

实验分组:将第2~3代CFs接种于6孔板(用于Western Blot和qRT-PCR)或预置盖玻片的24孔板(用于免疫荧光染色),待细胞生长至 $60\%\sim 70\%$ 融合度时,用血清饥饿处理24 h后分组。①PBS对照

组:使用等体积PBS处理;②TGF- β 刺激组:加入重组人TGF- β 1($10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,美国R&D Systems公司,240-B)刺激24 h;③TGF- β +HD组:预先加入HD($20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理1 h,随后加入TGF- β 1($10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)共同孵育24 h;④TGF- β +Ruxolitinib组:预先加入Ruxolitinib($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理1 h,随后加入TGF- β 1($10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)共同孵育24 h。处理结束后,收集细胞用于后续实验。

1.6 免疫荧光染色 细胞免疫荧光染色:CFs经不同处理后,用PBS洗涤3次, 4% 多聚甲醛固定20 min, 0.1% Triton X-100透化10 min, 1% BSA封闭1 h,随后与抗 α -SMA抗体(1:200) 4°C 孵育过夜。次日,PBS洗涤3次后,与荧光标记的二抗(1:500,美国Invitrogen公司,A-11008)室温避光孵育1 h,DAPI(1:1 000)染色5 min。荧光显微镜(Olympus BX53,日本)下观察拍照,使用Image J软件分析荧光强度。

1.7 蛋白质印迹分析(Western Blot) 取 -80°C 保存的心脏组织约50 mg,加入含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液(上海碧云天公司,批号:P0013B)进行匀浆, 4°C 下 $14\text{ }000\text{ g}$ 离心20 min收集上清。采用BCA法测定蛋白浓度(美国Thermo Scientific公司,批号:23225)。取等量蛋白样品(每孔 $50\text{ }\mu\text{g}$)进行 10% 或 12% SDS-PAGE电泳分离,然后转移至PVDF膜(德国Millipore公司,批号:IPVH00010)。PVDF膜用 5% 脱脂奶粉(用于非磷酸化蛋白)或 5% BSA(用于磷酸化蛋白)在TBST中室温封闭1 h,随后与下列一抗 4°C 孵育过夜:抗p-JAK2(1:1 000)、抗t-JAK2(1:1 000)、抗p-STAT3(1:1 000)、抗t-STAT3(1:2 000)、抗 α -SMA(1:1 000)、抗GAPDH(1:5 000)。TBST洗涤 $3\times 10\text{ min}$ 后,与相应的HRP标记二抗(1:5 000)室温孵育1 h。使用增强化学发光试剂盒(美国Thermo Scientific公司,批号:32106)显影,在ChemiDoc XRS⁺系统(Bio-Rad公司,美国)上成像。采用Image J软件进行灰度分析,p-JAK2和p-STAT3的活化水平分别以p-JAK2/t-JAK2和p-STAT3/t-STAT3的灰度比值表示,GAPDH作为内参蛋白。

1.8 实时荧光定量PCR(qRT-PCR) 采用TRIzol试剂提取心脏组织总RNA,经NanoDrop 2000分光光度计(Thermo Scientific,美国)测定RNA浓度和纯度(A_{260}/A_{280} 比值在 $1.8\sim 2.0$ 之间)。取 $2\text{ }\mu\text{g}$ 总RNA,使用PrimeScript RT试剂盒按照说

明 书 合 成 cDNA。qRT-PCR 反 应 使 用 SYBR Green PCR Master Mix 在 ABI 7500 实 时 PCR 系 统 上 进 行。

PCR 反应条件:95 ℃预变性 3 min;95 ℃变性 15 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,共 40 个循环。每个样本设置 3 个技术重复,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算目

表 1 目的基因及内参基因 qRT-PCR 所需的引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	种属
COL-I	上游:AGTCGCTTCACCTACAGCAC	小鼠
	下游:TTCGATGACTGTCCTTGCCCC	
COL-III	上游:ACGTAAGCACTGGTGGACAG	小鼠
	下游:GGAGGGCCATAGCTGAAGTG	
GAPDH	上游:GGGTCCCAGCTTAGGTTTCATC	小鼠
	下游:TACGGCCAAATCCGTTCACA	
Anp	上游:ACGTGGAGTTGAGTTCCTTGCC	小鼠
	下游:TTCTCTGCCAGGACTTCCAAGC	
Bnp	上游:TCCTAGCCAGTCTCCAGAGCAA	小鼠
	下游:GGTCCTTCAAGAGCTGTCTCTG	
COL-I	上游:GGATCGACCCTAACCAAGGC	大鼠
	下游:GATCGGAACCTTCGCTTCCA	
COL-III	上游:AGTGGCCATAATGGGGAACG	大鼠
	下游:CACCTTTGTCACCTCGTGGA	
GAPDH	上游:AGTGCCAGCCTCGTCTCATA	大鼠
	下游:TCCCGTTGATGACCAGCTTC	

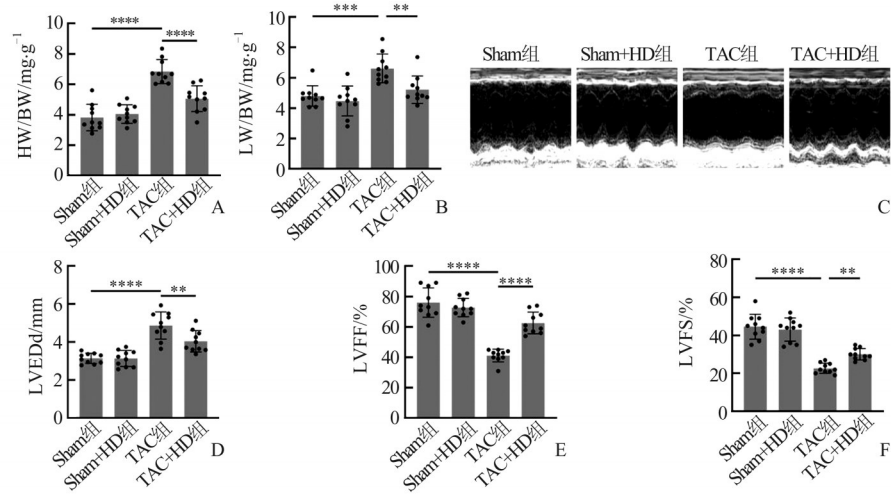
注:COL-I. I 型胶原蛋白;COL-III. III 型胶原蛋白;GAP-DH. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶,内参基因;Anp. 心房钠尿肽;Bnp. 脑钠尿肽。

的基因相对表达量,GAPDH作为内参基因,相关引物序列见表 1。

1.9 统计学方法 所有数据使用 SPSS 22.0 统计软件进行分析。采用 Shapiro-Wilk 检验评估数据正态性,结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。各组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间多重比较采用最小显著性差异法。 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。所有实验至少重复 3 次。GraphPad Prism 8.0 软件用于绘制图表。

2 结果

2.1 HD 改善压力超负荷诱导的心肌肥厚及心脏功能障碍 与 Sham 组相比,TAC 组小鼠 HW/BW 显著增加($P<0.05$);而 TAC+HD 处理组与 TAC 组相比,HW/BW 显著降低($P<0.05$),提示 HD 可有效改善压力超负荷诱导的心肌肥厚(图 1A)。与 Sham 组相比,TAC 组 LW/BW 显著增加($P<0.05$);与 TAC 组相比,HD 处理后 LW/BW 显著降低($P<0.05$),表明 HD 能显著减轻压力负荷引起的肺水肿(图 1B)。超声心动图分析显示,TAC+HD 组 LVEDd 显著低于 TAC 组($P<0.05$),而 LVEF 和 LVFS 均显著高于 TAC 组($P<0.05$),提示 HD 处理可明显改善由压力超负荷引起的心脏功能障碍(图 1C~1F)。



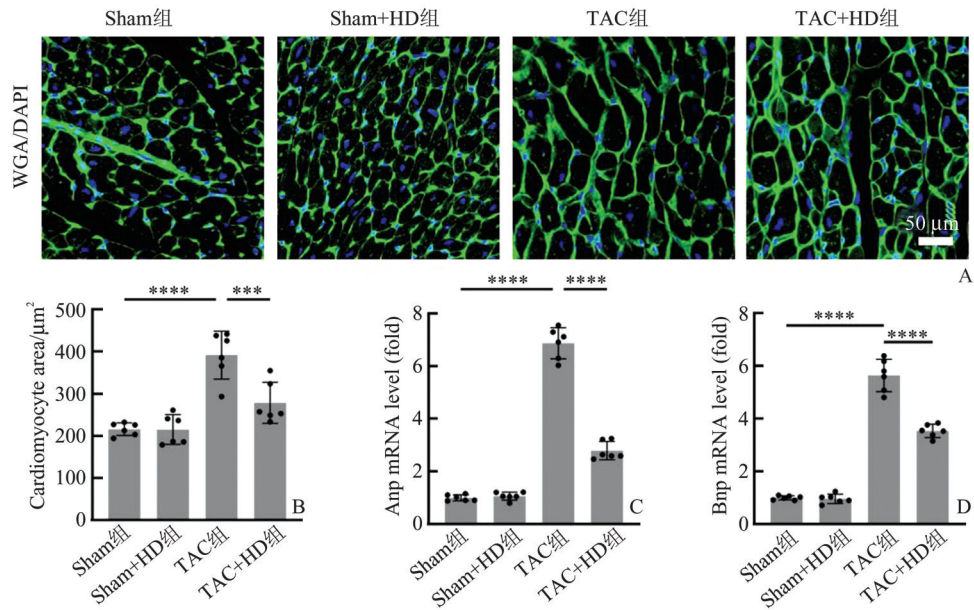
A. 各组小鼠 HW/BW 的比较;B. 各组小鼠 LW/BW 比值的比较;C. 各组小鼠心脏超声心动图图像;D. 各组小鼠 LVEDd 水平比较;E. 各组小鼠 LVEF 水平比较;F. 各组小鼠 LVFS 水平比较。* $P<0.01$,** $P<0.001$,*** $P<0.0001$, $n=10$ /组。

图 1 不同处理组小鼠心脏形态学指标与心功能参数比较

2.2 HD 改善压力超负荷诱导的小鼠心肌肥厚相关标志物表达 WGA 染色显示,与 TAC 组相比,TAC+HD 组小鼠心肌细胞横截面积显著减小($P<0.05$),表明 HD 可有效抑制压力超负荷诱导的

心肌细胞肥大(图 2A、2B)。实时荧光定量 PCR 结果显示,与 Sham 组相比,TAC 组心肌肥厚相关标志物心房钠尿肽(Anp)和脑钠尿肽(Bnp)的 mRNA 表达水平显著升高($P<0.05$);而与 TAC 组相比,TAC+

HD 组 Anp 和 Bnp 显著降低 ($P<0.05$), 这进一步证实 HD 能有效改善心肌肥厚状态 (图 2C、2D)。



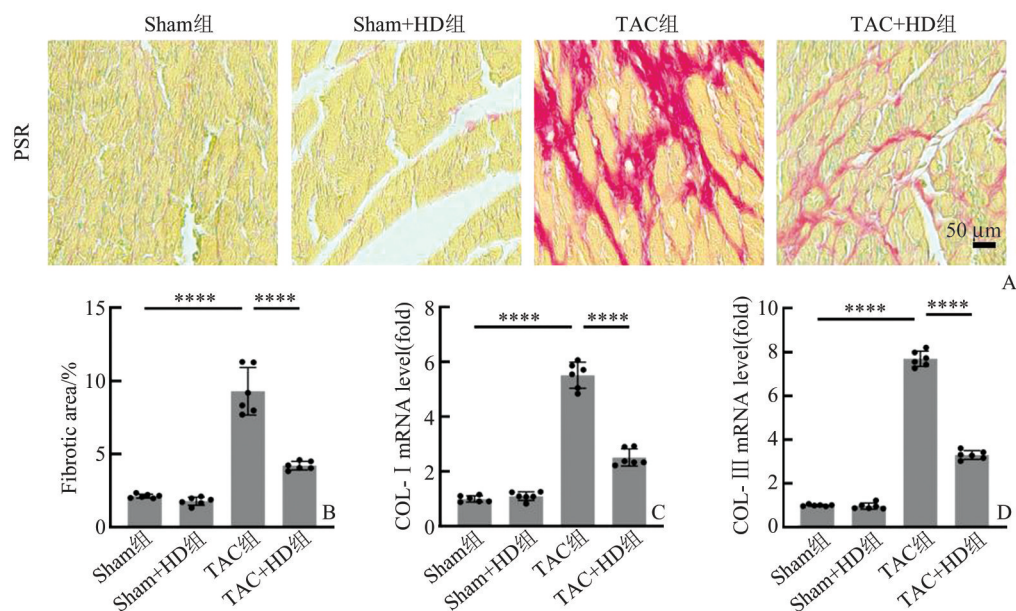
A. 各组小鼠心肌组织 WGA-DAPI 双重染色图像 (比例尺=50 μm); B. 各组小鼠心肌细胞横截面积定量分析; C. 各组小鼠心肌组织 Anp mRNA 相对表达水平; D. 各组小鼠心肌组织 Bnp mRNA 相对表达水平。*** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, $n=6$ /组。

图 2 不同处理组小鼠心肌肥厚相关分子标志物表达比较

2.3 HD 改善压力超负荷诱导的小鼠心肌纤维化 PSR 染色显示, 与 TAC 组相比, TAC+HD 组小鼠心肌组织胶原纤维沉积显著减少, 且心肌纤维化面积明显低于 TAC 组 ($P<0.05$, 图 3A、3B)。实时荧光定量 PCR 结果显示, 与 TAC 组相比, TAC+HD 组小鼠心肌组织中 COL-I 和 COL-III 的 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$, 图 3C、

3D), 这提示 HD 能有效抑制压力超负荷诱导的心肌纤维化进程。

2.4 HD 抑制小鼠 JAK2/STAT3 信号通路的活化 Western Blot 分析显示, 与 Sham 组相比, TAC 组小鼠心肌组织中 JAK2 和 STAT3 磷酸化水平 (p-JAK2/t-JAK2 和 p-STAT3/t-STAT3 比值) 显著升高 ($P<0.05$); 与 TAC 组相比, TAC+HD 组小鼠心肌



A. 各组小鼠心肌组织 PSR 染色图像 (比例尺=50 μm), 红色区域代表胶原纤维沉积; B. 各组小鼠心肌纤维化面积百分比定量分析; C. 各组小鼠心肌组织 COL-I mRNA 相对表达水平; D. 各组小鼠心肌组织 COL-III mRNA 相对表达水平。**** $P<0.0001$, $n=6$ /组。

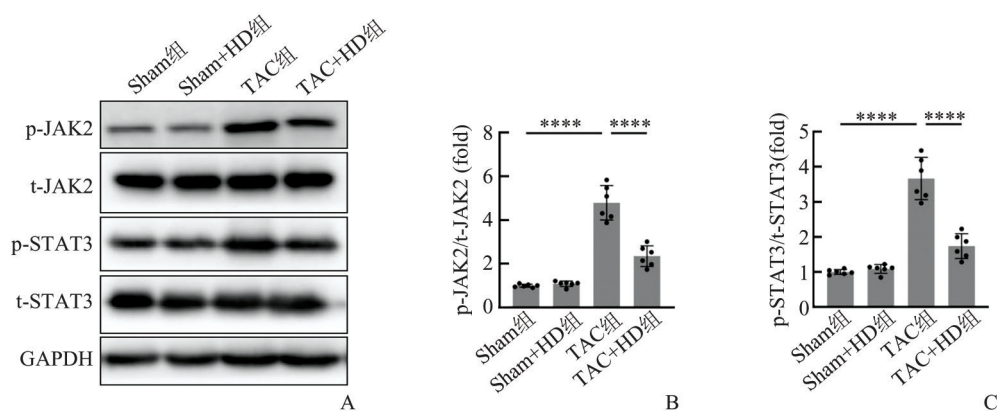
图 3 不同处理组小鼠心肌组织纤维化程度比较

组织中 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白相对表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 表明 HD 可能通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路的过度激活发挥心脏保护作用(图 4A~4C)。

2.5 JAK2 特异性抑制剂验证 HD 通过 JAK2/STAT3 通路抑制心脏成纤维细胞活化 α -SMA 免疫荧光染色显示, 与 PBS 组相比, TGF- β +HD 组和 TGF- β +Ruxolitinib 组大鼠 α -SMA 阳性细胞荧光强度均显著降低 ($P < 0.05$), 且两组间差异无统计学意义(图 5A、5B, $P > 0.05$)。实时荧光定量 PCR 结果显示, 与 TGF- β 组相比, TGF- β +HD 组和 TGF- β +Ruxolitinib 组的 COL-I 和 COL-III 的 mRNA 表达

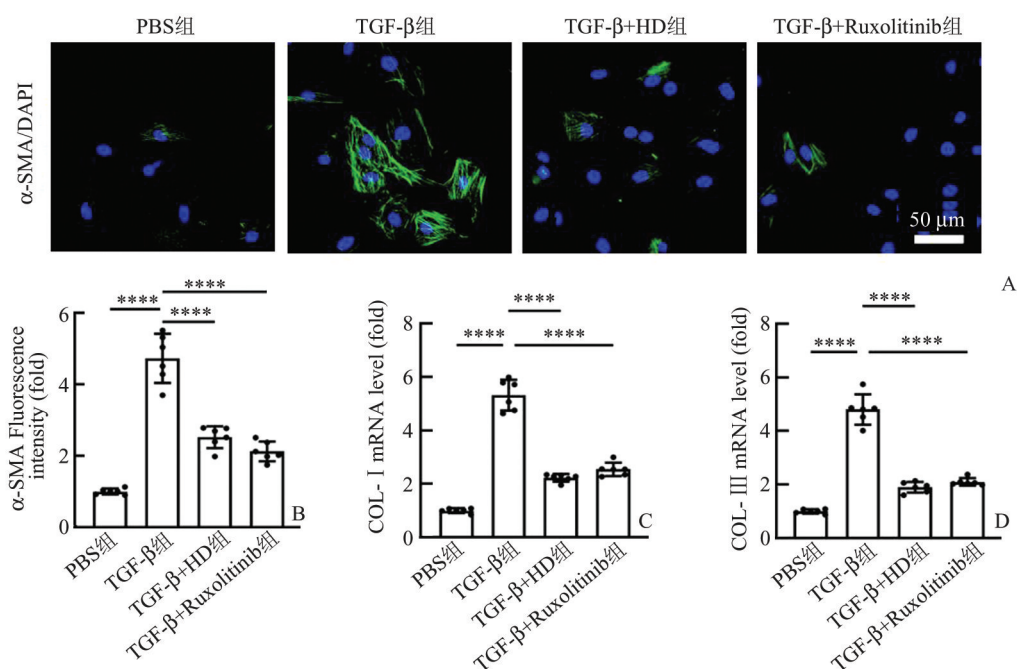
水平均显著降低(图 5C、5D, $P < 0.05$), 表明 HD 与 JAK2 特异性抑制剂鲁索利替尼具有相似的抑制成纤维细胞活化的作用, 支持 HD 通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路发挥抗纤维化效应。

2.6 JAK2 抑制剂与 HD 对压力超负荷诱导的心肌肥厚及心功能障碍具有相似保护作用 与 TAC 组比较, TAC+HD 组和 TAC+Ruxolitinib 组小鼠 HW/BW、LW/BW 均显著低于 TAC 组 ($P < 0.05$), 且两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)(图 6A、6B)。超声心动图结果表明, TAC+HD 组和 TAC+Ruxolitinib 组小鼠的



A. 各组小鼠心肌组织 p-JAK2、t-JAK2、p-STAT3 和 t-STAT3 蛋白表达的 Western Blot 代表性图像, GAPDH 为内参; B、C. 各组小鼠心肌组织 p-JAK2/t-JAK2 和 p-STAT3/t-STAT3 蛋白相对表达水平定量分析。**** $P < 0.0001$, $n = 6$ /组。

图 4 不同处理组小鼠心肌组织 JAK2/STAT3 信号通路蛋白表达及磷酸化水平比较

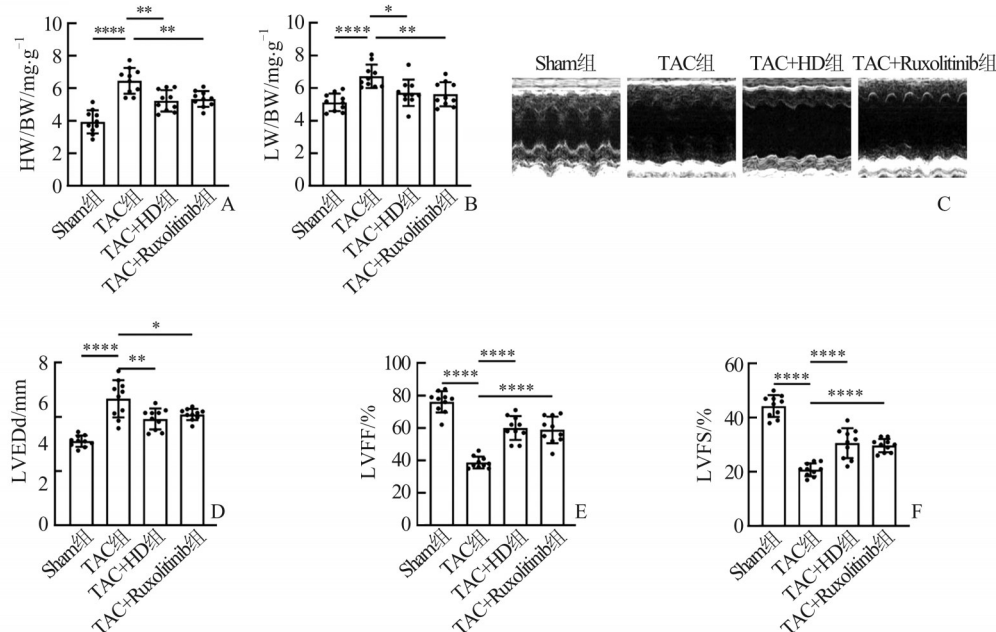


A. 各组大鼠成纤维细胞 α -SMA 免疫荧光染色图像(比例尺 = 20 μ m); B. 各组大鼠成纤维细胞 α -SMA 免疫荧光强度定量分析; C. 各组大鼠成纤维细胞 COL-I mRNA 相对表达水平; D. 各组大鼠成纤维细胞 COL-III mRNA 相对表达水平。**** $P < 0.0001$, $n = 6$ /组。

图 5 鲁索利替尼及 HD 处理对大鼠成纤维细胞的影响比较

LVEDd均显著低于TAC组($P<0.05$),而LVEF和LVFS均显著高于TAC组($P<0.05$),且两组间差异无统计学意义($P>0.05$)(图6C~6F),提

示HD与鲁索利替尼对压力超负荷诱导的心功能障碍具有相似的保护作用。



A. 各组小鼠心质量/体质量比值;B. 各组小鼠肺质量/体质量比值;C. 各组小鼠心脏超声心动图代表性图像;D. 各组小鼠LVEDd水平比较;E. 各组小鼠LVEF水平比较;F. 各组小鼠LVFS水平比较。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.0001$, $n=10$ /组。

图6 HD与鲁索利替尼对小鼠心脏形态学指标与心功能的影响比较

3 讨论

本研究证实HD能显著改善压力超负荷诱导的心肌肥厚和纤维化,主要表现为心脏形态学指标改善、心功能参数提升以及纤维化标志物表达下降。更重要的是,通过与JAK2特异性抑制剂鲁索利替尼的对比实验,我们明确了HD主要通过抑制JAK2/STAT3信号通路发挥心脏保护作用。

这些发现与既往关于HD抗纤维化作用的研究既有一致性又表现出组织特异性。既往研究^[17]发现HD通过抑制ISG15调控的JAK/STAT通路改善肾纤维化,与本研究机制相似。然而在其他组织中,HD表现出不同的作用机制:文献^[18]报道HD在肺纤维化中主要通过调控Ras/JNK/NFAT4通路发挥作用,而另有研究^[21]表明在糖尿病心肌病模型中HD主要抑制NF- κ B和Smads信号通路。这种差异可能反映了HD在不同疾病背景下的多靶点特性,也暗示其可能通过上游共同分子间接影响多条信号通路。值得强调的是,我们首次在压力超负荷心肌纤维化模型中验证了HD的保护作用,并通过使用特异性JAK2抑制剂作为阳性对照,提供了更

直接的机制证据。

JAK2/STAT3信号通路在心脏病理生理过程中发挥着关键作用。在压力超负荷状态下,多种细胞因子和生长因子可激活JAK2,导致STAT3磷酸化、二聚化和核转位,最终调控下游基因表达。活化的STAT3可直接促进COL-I、 α -SMA等纤维化相关基因的转录,并通过调控心脏成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化促进ECM沉积^[8]。本研究证实,HD能显著抑制JAK2和STAT3的磷酸化激活,这可能是其抗纤维化作用的核心机制。HD可能通过直接结合JAK2蛋白抑制其激酶活性,干扰上游受体与JAK2的相互作用,促进负调控分子如SOCS3的表达,或激活蛋白酪氨酸磷酸酶介导JAK2去磷酸化^[22]。这些可能的机制并不相互排斥,HD作为一种多靶点天然产物,可能同时通过多种途径发挥作用^[14]。

HD不仅抑制了JAK2/STAT3通路,还改善了心肌细胞肥大和心脏功能,这可能与STAT3在心肌细胞中的多重作用有关。STAT3已被证实参与调控心肌细胞肥大、存活和钙稳态,HD通过调节STAT3活性可能实现对心肌细胞功能的全面保

护^[23]。此外,JAK2/STAT3通路与其他信号通路存在广泛的交叉调控,HD抑制JAK2/STAT3可能间接影响多条信号网络,产生协同保护效应^[24]。

本研究的创新之处在于系统证实了HD在压力超负荷诱导的心肌肥厚和纤维化中的保护作用,拓展了HD作为抗纤维化药物的适应范围。采用JAK2特异性抑制剂鲁索利替尼作为阳性对照,通过比较两者效应的相似性,直接验证了JAK2/STAT3通路在HD抗纤维化作用中的关键地位。同时在体内和体外模型中验证了HD的作用,不仅观察到整体心脏保护效应,还在细胞水平证实了HD对成纤维细胞活化的直接抑制作用。更重要的是,本研究将HD的抗纤维化作用与心脏功能改善相关联,证实HD能同时改善心肌结构和功能,这种多方位保护作用增加了其作为治疗药物的潜在价值。

尽管取得了重要发现,本研究仍存在一些局限性,如尚未阐明HD与JAK2蛋白的直接相互作用,未来可通过分子对接或蛋白质共沉淀等技术探究两者的结合特性。本研究采用预防性给药方案,而HD对已建立的心肌纤维化是否具有逆转作用尚需通过治疗性实验设计进一步验证。我们未能全面排除HD对其他信号通路的调控作用,全转录组或磷酸化蛋白质组学分析可能有助于揭示更全面的作用机制。此外,研究仅在小鼠模型中开展,物种差异可能影响结果的临床转化性。最后,HD的药代动力学、长期安全性、最佳给药方案以及与现有心力衰竭药物的相互作用等关键问题尚未解决。

未来研究应着重明确HD与JAK2/STAT3通路分子的直接相互作用机制,评估HD在不同类型心肌纤维化模型中的作用,开展治疗性干预实验,探索HD与现有抗心力衰竭药物的协同作用,筛选和优化HD的结构类似物,开展长期安全性和药代动力学研究,为临床转化奠定基础。

综上所述,本研究证实常春藤皂苷元能有效改善压力超负荷诱导的心肌肥厚和纤维化,其作用机制主要是通过抑制JAK2/STAT3信号通路的过度活化。这一发现不仅为理解心肌纤维化的分子机制提供了新视角,也为开发基于JAK2/STAT3通路的抗心肌纤维化药物提供了候选化合物和实验依据。鉴于心肌纤维化在心力衰竭发展中的核心地位,常春藤皂苷元及其类似物有望成为心力衰竭治疗策略的重要补充。



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

参考文献

- [1] TOMASONI D, ADAMO M, LOMBARDI C M, et al. Highlights in heart failure[J]. ESC Heart Fail, 2019, 6(6): 1105-1127.
- [2] 刘明波, 何新叶, 杨晓红, 等. 《中国心血管健康与疾病报告 2023》要点解读[J]. 中国心血管杂志, 2024, 29(4): 305-324.
- [3] LIU M B, HE X Y, YANG X H, et al. Interpretation of report on cardiovascular health and diseases in China 2023[J]. Chin J Cardiovasc Med, 2024, 29(4): 305-324.
- [4] VIRANI S S, ALONSO A, APARICIO H J, et al. Heart disease and stroke statistics: 2021 update[J]. Circulation, 2021, 143(8): e254-e743.
- [5] 周维祥, 李星星, 王禹萌, 等. 心肌纤维化相关信号通路的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2024, 22(12): 2175-2179.
- [6] ZHOU W X, LI X X, WANG Y M, et al. Research progress of signal pathways related to myocardial fibrosis[J]. Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis, 2024, 22(12): 2175-2179.
- [7] 李雪, 赵雅静, 张芹, 等. 心肌纤维化调控机制的研究进展[J]. 中国医药, 2024, 19(2): 285-288.
- [8] LI X, ZHAO Y J, ZHANG Q, et al. Advances in the regulatory mechanisms of myocardial fibrosis[J]. China Med, 2024, 19(2): 285-288.
- [9] GYÖNGYÖSI M, WINKLER J, RAMOS I, et al. Myocardial fibrosis: Biomedical research from bench to bedside[J]. Eur J Heart Fail, 2017, 19(2): 177-191.
- [10] PANG Q Y, YOU L, MENG X M, et al. Regulation of the JAK/STAT signaling pathway: The promising targets for cardiovascular disease[J]. Biochem Pharmacol, 2023, 213: 115587.
- [11] JIANG H, YANG J J, LI T, et al. JAK/STAT3 signaling in cardiac fibrosis: A promising therapeutic target[J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1336102.
- [12] SINGH R, KAUNDAL R K, ZHAO B Y, et al. Resistin induces cardiac fibroblast-myofibroblast differentiation through JAK/STAT3 and JNK/c-Jun signaling[J]. Pharmacol Res, 2021, 167: 105414.
- [13] ZHANG Y, ZHANG L, FAN X X, et al. Captopril attenuates TAC-induced heart failure via inhibiting Wnt3a/ β -catenin and JAK2/STAT3 pathways[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 113: 108780.
- [14] ZHAO L, CHENG G M, JIN R M, et al. Deletion of interleukin-6 attenuates pressure overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction[J]. Circ Res,

- 2016, 118(12): 1918-1929.
- [12] ZHANG X Y, ZHENG C T, GAO Z Q, et al. PKM2 promotes angiotensin-Ⅱ-induced cardiac remodelling by activating TGF- β /Smad2/3 and Jak2/Stat3 pathways through oxidative stress[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(22): 10711-10723.
- [13] EID R A, ALKHATEEB M A, EL-KOTT A F, et al. A high-fat diet rich in corn oil induces cardiac fibrosis in rats by activating JAK2/STAT3 and subsequent activation of ANG Ⅱ/TGF-1 β /Smad3 pathway: The role of ROS and IL-6 trans-signaling[J]. J Food Biochem, 2019, 43(8): e12952.
- [14] WANG K, LIU X D, LIU Q M, et al. Hederagenin potentiated cisplatin- and paclitaxel-mediated cytotoxicity by impairing autophagy in lung cancer cells[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(8): 611.
- [15] XIE Z S, ZHAO J P, WU L M, et al. Hederagenin improves Alzheimer's disease through PPAR α /TFEB-mediated autophagy[J]. Phytomedicine, 2023, 112: 154711.
- [16] LU S H, GUAN J H, HUANG Y L, et al. Experimental study of antiatherosclerosis effects with hederagenin in rats[J]. Evid Based Complementary Altern Med, 2015, 2015(1): 456354.
- [17] JIA J, XU L H, DENG C, et al. Hederagenin ameliorates renal fibrosis in chronic kidney disease through blocking ISG15 regulated JAK/STAT signaling[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 118: 110122.
- [18] MA W J, HUANG Q S, XIONG G F, et al. The protective effect of Hederagenin on pulmonary fibrosis by regulating the Ras/JNK/NFAT4 axis in rats[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2020, 84(6): 1131-1138.
- [19] LEE C W, PARK S M, ZHAO R J, et al. Hederagenin, a major component of *Clematis mandshurica* Ruprecht root, attenuates inflammatory responses in RAW 264.7 cells and in mice[J]. Int Immunopharmacol, 2015, 29(2): 528-537.
- [20] ZHAO L, SHI H T, ZHANG F, et al. Hederagenin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via attenuating ALOX5-mediated ferroptosis[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2024, 397(5): 3411-3424.
- [21] LI Y, DONG J L, SHANG Y H, et al. Anti-inflammatory effects of hederagenin on diabetic cardiomyopathy via inhibiting NF- κ B and Smads signaling pathways in a type-2 diabetic mice model[J]. RSC Adv, 2019, 9(45): 26238-26247.
- [22] SCHWARTZ D M, KANNO Y, VILLARINO A, et al. JAK inhibition as a therapeutic strategy for immune and inflammatory diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(12): 843-862.
- [23] HARHOUS Z, BOOZ G W, OVIZE M, et al. An update on the multifaceted roles of STAT3 in the heart [J]. Front Cardiovasc Med, 2019, 6: 150.
- [24] YAMAUCHI-TAKIHARA K, KISHIMOTO T. A novel role for STAT3 in cardiac remodeling[J]. Trends Cardiovasc Med, 2000, 10(7): 298-303.

(2025-06-22 收稿)

编辑 沈建国