

沙棘黄酮对长期力竭运动大鼠心肌保护作用的机制研究

孔海军^{1,2}, 谌晓安², 李新龙^{1*}

¹喀什大学体育学院,喀什 844000;²吉首大学体育科学学院,湘西 416000

摘要:观察沙棘黄酮(sea-buckthorn flavone,SF)对长期力竭运动大鼠心肌组织的保护作用。50只6周龄SPF级雄性SD大鼠随机分为正常组、模型组和SF低中高剂量组(100,200,400 mg/kg)。通过连续6周力竭跑台训练建立运动性心肌损伤模型。ELISA法检测心肌炎症反应、氧化应激相关指标及血清心肌损伤标志物;免疫组织化学法检测心肌半胱天冬酶3(cysteinyI aspartate specific proteinase-3,Caspase-3)蛋白表达;免疫印迹法检测心肌Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein,Bax)、B淋巴细胞瘤-2基因(B cell lymphoma-2,Bcl-2)、I型胶原(type I Collagen,Collagen-I)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)蛋白表达;HE、Masson染色观察心肌组织形态及胶原沉积。结果表明,与模型组比较,SF各剂量组大鼠血清谷草转氨酶(aspartate aminotransferase,AST)、肌酸激酶同工酶MB(creatine kinase MB,CK-MB)、心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin I,cTn I)、心肌组织胶原容积(collagen volume fraction,CVF)水平和心肌组织Caspase-3、Bax、Collagen-I蛋白表达显著降低($P < 0.01$),心肌组织Bcl-2蛋白表达和Bcl-2/Bax比值显著上升($P < 0.01$);中高剂量SF还可显著降低大鼠心肌组织丙二醛(malondialdehyde,MDA)、白介素1- β (interleukin-1 β ,IL-1 β)、白介素-6(interleukin-6,IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)水平和心肌组织CTGF蛋白表达($P < 0.01$),提高心肌组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)水平($P < 0.01$)。研究结果提示,中、高剂量SF可抑制长期力竭训练大鼠心肌组织氧化应激、炎症反应、细胞凋亡和纤维化,减轻心肌损伤,且高剂量作用效果更佳。

关键词:力竭运动;沙棘黄酮;心肌损伤;细胞凋亡;纤维化

中图分类号:R873

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)6-0954-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.6.005

Mechanism of sea-buckthorn flavone on myocardial protection in rats after long-term exhausted exercise

KONG Hai-jun^{1,2}, CHEN Xiao-an², LI Xin-long^{1*}

¹College of Physical Education, Kashi University, Kashi 844000, China;

²College of Physical Education Science, Jishou University, Xiangxi 416000, China

Abstract: The study was conducted to observe the protective effect of sea-buckthorn flavone (SF) on myocardium in rat subjected to long-term exhausted exercise. Fifty six-week-old SPF-grade male SD rat were randomly divided into normal group, model group, and SF low, medium and high dose (100, 200 and 400 mg/kg) group. An exercise induced myocardial injury model was established through six-week exhausted treadmill training. Inflammatory reaction in myocardium, oxidative stress related index and the serum markers of myocardial injury were detected by ELISA; myocardial cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Caspase-3) protein expression was detected by the immunohistochemical method; protein expressions of myocardial BCL2-associated X (Bax), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), type I Collagen (Collagen-I), and connective tissue growth factor (CTGF) were detected by Western blot; myocardial tissue morphology and collagen deposition were observed by HE and Masson staining. The results showed that compared with the model group, the levels of serum aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase MB (CK-MB), cardiac troponin I (cTn I), collagen volume fraction (CVF), and the expression of Caspase-3, Bax, and Collagen-I proteins in the myocardial tissue of rats in each dose group of SF were significantly reduced ($P <$

收稿日期:2023-03-20 接受日期:2024-04-16

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(Y2021S037);新疆维吾尔自治区高校科技计划(XJEDU2021SY040);喀什地区科技计划(KS2020024)

*通信作者 Tel:86-998-85708758;E-mail:15275475183@163.com

0.01), while the expression of Bcl-2 protein and Bcl-2/Bax ratio in the myocardial tissue were significantly increased ($P < 0.01$); Medium to high doses of SF can significantly reduce malondialdehyde (MDA), interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and expression of CTGF protein in myocardial tissue ($P < 0.01$), increase the levels of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in myocardial tissue ($P < 0.01$). The results of the study suggested that medium and high doses of SF could inhibit oxidative stress, inflammatory reaction, cell apoptosis, and fibrosis in the myocardial tissues of rat subjected to long-term exhausted exercise, and alleviate myocardial injury. It was found that the effect of a high dose was better.

Key words: exhaustive exercise; sea-buckthorn flavone; myocardial injury; apoptosis; fibrosis

研究证实,适度的体育运动可诱导心脏形态、结构和功能的良性变化,但长期力竭运动可能对心血管系统产生负性影响,甚至导致运动性心肌损伤^[1]。在持续力竭运动中,内源性活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成增多,ROS清除能力受限,过量的ROS诱导心肌细胞功能障碍、蛋白质和脂质过氧化、DNA损伤^[2]。此外,长期力竭运动可诱导机体广泛的炎症反应,炎症细胞浸润造成心肌细胞结构和功能障碍。力竭运动诱发的氧化应激和炎症反应激活了多种心肌肥大信号激酶和转录因子,并通过DNA和线粒体损伤以及促凋亡信号的激活诱导细胞凋亡^[3]。研究发现,6周力竭运动可通过上调大鼠心肌细胞Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)/B淋巴细胞瘤-2基因(B cell lymphoma-2, Bcl-2)表达比率激活心肌细胞的凋亡程序并加速心脏结构功能性“重塑”过程^[4]。此外,亦有研究证实,长期力竭运动诱导的心肌细胞外基质成分沉积及纤维化可能与细胞凋亡密切相关^[5]。

沙棘(sea-buckthorn)属胡颓子科,是我国传统药用和食用植物,其抗氧化^[6]、抗肿瘤^[7]和抗凋亡^[8]效果已得到广泛证实。沙棘黄酮(sea-buckthorn flavone, SF)是沙棘最重要的活性组分,50~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SF可改善小鼠细胞吞噬能力且有效抑制Raw 264.7细胞内氧化应激、炎症反应标志物生成^[6];4 g/kg SF灌胃联合有氧运动可抑制大鼠海马组织凋亡反应^[9]。但现阶段尚缺乏SF对长期力竭运动大鼠心肌保护作用的相关研究。基于此,本研究拟通过长期力竭运动建立运动性心肌损伤大鼠模型,研究SF对长期力竭运动大鼠心肌损伤的干预作用,从而为运动性心肌损伤的预防和康复提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

50只6周龄SPF级雄性SD大鼠,购自新疆医科大学医学实验动物中心,实验动物许可证编号:

SYXK(新)2016-0002。动物于实验室条件适应性饲养3 d后,动物表观状况良好、进食正常,均符合实验要求。将大鼠随机分为5组,每组10只,分别为:正常组、模型组、低剂量SF组(sea-buckthorn flavone group in low dose, SF-L; 100 mg/kg)、中剂量SF组(sea-buckthorn flavone group in medium dose, SF-M; 200 mg/kg)及高剂量沙棘黄酮组(sea-buckthorn flavone group in high dose, SF-H; 400 mg/kg)。各组大鼠自由饮食,饲养环境温度23~25 $^{\circ}\text{C}$,湿度55%~60%,光照条件12 h/d,自由摄食水,定期对鼠笼清理消毒、更换垫料。本研究方案经喀什大学实验动物伦理委员会审批(KS20220024)。

1.2 试剂和药物

中华沙棘黄酮(青海康普德生物制品有限公司;中国沙棘果(*H. rhamnoides* L. subsp. *sinen-sis* Rousi)产地:青海省海东市,纯度 $\geq 90\%$,批号:19013C);谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、肌酸激酶同工酶MB(creatine kinase MB, CK-MB)、心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin I, cTn I)检测试剂盒、Masson三色染色液(南京建成生物,批号分别为:A006-2、A003-4、A001-3、H007-1、H002-1、H052-1、C010-2、H197-1、H149-2、D026-1);RIPA裂解液、电泳缓冲液、苏木素伊红染色试剂盒、二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒、半胱天冬酶3(cysteinyI aspartate specific proteinase-3, Caspase-3)抗体、6.6 cm \times 8.5 cm PVDF膜、免疫组化洗涤和封闭试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物公司,批号分别为:P0013B、ST466、C0105S、P0202、AC030、FFP19、P0106、P0012); β -actin内参抗体、Mouse源二抗、Rabbit源

二抗(美国 CST 公司,批号分别为:93473、80403、58802);Bax 抗体、Bcl-2 抗体、I 型胶原(type I Collagen, Collagen-I)抗体、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)抗体(美国 Proteintech 公司,批号分别为:60267-1-Ig、68103-1-Ig、19792-1-AP、25474-1-AP)。

1.3 大鼠力竭运动及沙棘黄酮给药方案

模型组、SF-L 组、SF-M 组和 SF-H 组大鼠接受连续 3 d 适应性跑台训练(跑速 15 m/min, 30 min 次, 1 次/d, 跑台坡度 0°); NC 组不接受运动干预, 保持自由活动。适应性训练后进行连续 6 周力竭跑台运动, 运动方案参照 Zhao 等^[10]的研究: 6 d/w, 1 次/d, 跑速 25 m/min, 坡度, 跑台坡度 0°, 直至力竭。跑台运动力竭判断标准: 大鼠跑姿由蹬地式变为伏地式, 滞留在跑道末端不能继续跑动, 且声波和光刺激均不能驱使动物继续维持跑动^[10]。LSF 组、MSF 组和 HSF 组大鼠每次力竭运动后 30 min 分别接受 100 mg/kg、200 mg/kg 和 400 mg/kg SF 灌胃, 每只 2.5 mL^[11], NC 组和 Ee 组接受等体积生理盐水灌胃。

1.4 样本采集与处理

末次力竭运动后次日晨间, 大鼠空腹状态下麻醉, 腹主动脉取血, 3 000 r/min 离心 10 min 分离血清后 -20 °C 保存; 迅速分离心肌组织, 横向切分心脏, 上半部液氮保存备用, 下半部经 PBS 冲洗、4% 多聚甲醛固定 24 h, 并制作石蜡切片。取心脏上半部, 加入 PBS 匀浆介质, 2 000 r/min 匀浆 1 min, 匀浆液转移至离心管, 4 °C、6 000 r/min, 离心 10 min, 取上清 -80 °C 保存。

1.5 血清心肌损伤标志物及心肌组织氧化应激、炎症反应指标的测定

取预先制备血清及心肌组织匀浆液, 免疫酶联吸附法(ELISA)检测血清中心肌损伤因子 AST、CK-MB、cTn I 和心肌组织匀浆液氧化应激标志物 MDA、SOD、GSH-Px 及心肌组织匀浆液炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量。

1.6 心肌组织病理观察与胶原沉积分析

取心肌组织石蜡切片, 梯度酒精(75%、85%、95% \times 2、100% \times 2)各脱水 1 h, 二甲苯透明, 重复 2 次, 各 30 min; 50~52 °C 浸蜡 2 次, 各 1 h; 组织包埋, 凝固后转移至 4 °C 冰箱保存。沿样品横截面切片, 厚度 8 μ m, 40 °C 水浴展片, 60 °C 烤片过夜。二

甲苯脱蜡 3 次, 各 10 min; 梯度酒精(100% \times 2、95% \times 2、85%、75%)及蒸馏水各复水 5 min。按照 HE 染色及 Masson 染色试剂盒说明书分别进行 HE 染色及 Masson 染色。镜下观察, 切片中心视野采集图像。Masson 染色结果以 Image Pro Plus 6.0 软件测量并计算心肌组织胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF): $CVF = (\text{蓝色胶原纤维面积} / \text{图像视野总面积}) \times 100\%$ 。

1.7 免疫组织化学染色

取心肌组织石蜡切片, 经脱蜡、复水、抗原修复后加抗 Caspase-3 抗体(1:200), 4 °C 孵育过夜, PBS 缓冲液清洗, 二抗孵育, 按照 DAB 显色试剂盒流程进行显色反应。显色终止后使用苏木素染色液将核染为蓝色, 染色结束后脱水、封片, 细胞内棕黄色颗粒即为 Caspase-3 阳性细胞, Carl Zeiss Imaging Systems 图象分析软件(Carl Zeiss 公司)计算总光密度, 以反映 Caspase-3 蛋白表达情况。

1.8 免疫印迹法检测蛋白表达量

取大鼠心肌组织匀浆液, 采用 RIPA 法提取组织总蛋白, 4 °C、15 000 g 离心 20 min; 取上清液使用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定蛋白浓度, 加入 5 \times SDS 上样缓冲液, 95 °C 变性 15 min。配置 SDS-PAGE 凝胶, 浓缩胶恒压 80 V 电泳 30 min, 分离胶恒压 110 V 电泳至溴酚蓝到达分离胶底部, 20 μ g 上样, 采用电转法将蛋白质转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加入一抗(Bax 1:1 000、Bcl-2 1:1 000、Collagen-I 1:500、CTGF 1:500), 4 °C 摇床孵育过夜; TBST 洗膜 10 min \times 3 次, 加二抗(1:3 000 稀释), 37 °C 孵育 40 min; TBST 洗膜 10 min \times 5 次。ECL 法显影, 凝胶成像系统成像后使用 Quantity One 3.0 软件分析, 以 β -actin 为内参, 计算目的蛋白相对表达量。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计学软件进行统计分析, 数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 数据处理均采用 One-Way ANOVA 进行方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 沙棘黄酮对力竭运动大鼠心肌组织损伤标志物的影响

由表 1 可知, 与正常组比较, 模型组大鼠血清

AST、CK-MB 和 cTn I 水平均显著上升 ($P < 0.01$), 表明本试验通过 6 周持续力竭运动成功建立了运动性心肌损伤动物模型。与模型组比较, SF 各剂量组血清 AST、CK-MB 和 cTn I 水平均显著降低 ($P < 0.01$)。与 SF-L 组比较, SF-M 组和 SF-H 组血清

AST、CK-MB 和 cTn I 水平均显著降低 ($P < 0.01$)。与 SF-M 组比较, SF-H 组血清 AST、CK-MB 和 cTn I 水平均显著降低 ($P < 0.01$)。表明各剂量 SF (100、200、400 mg/(kg · d)) 均可有效减轻长期力竭运动诱导的心肌损伤, 其中, 高剂量组效果更佳。

表 1 各组大鼠血清 AST、CK-MB 和 cTn I 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 AST, CK-MB and cTn I levels in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 group	剂量 Dose (mg/kg)	AST (U/L)	CK-MB (U/mL)	cTnI (pg/mL)
正常 Normal	-	122.51 ± 24.70	83.16 ± 2.56	50.62 ± 2.28
模型 Model	-	296.74 ± 52.65**	177.86 ± 4.28**	118.73 ± 4.12**
SF-L	100	278.32 ± 45.27##	159.08 ± 3.79##	106.45 ± 3.97##
SF-M	200	193.55 ± 39.35###△△	131.27 ± 3.43###△△	82.90 ± 3.74###△△
SF-H	400	160.94 ± 32.68###△△□□	98.46 ± 3.40###△△□□	67.13 ± 2.76###△△□□

注:与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 SF-L 组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与 SF-M 组比较, □ $P < 0.05$, □□ $P < 0.01$; 下同。

Note: Compared with normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; Compared with SF-L group, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; Compared with the SF-M group, □ $P < 0.05$, □□ $P < 0.01$; the same below.

2.2 沙棘黄酮对力竭运动大鼠心肌组织抗氧化能力标志物的影响

如表 2 所示, 与正常组比较, 模型组大鼠心肌组织 MDA 水平显著上升 ($P < 0.01$), SOD 和 GSH-Px 水平均显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, SF-L 组心肌组织 MDA、SOD 和 GSH-Px 水平均无显著差异 ($P > 0.05$); SF-M 组和 SF-H 组心肌组织 MDA 水平显著降低 ($P < 0.01$), SOD 和 GSH-Px 水平均显著

上升 ($P < 0.01$)。与 SF-L 组比较, SF-M 组和 SF-H 组心肌组织 MDA 水平显著降低 ($P < 0.01$), SOD 和 GSH-Px 水平均显著上升 ($P < 0.01$)。SF-M 组和 SF-H 组间比较均不存在显著差异 ($P > 0.05$)。表明中、高剂量 SF (200、400 mg/(kg · d)) 可有效抑制长期力竭运动诱导的大鼠心肌组织氧化应激反应, 组间无显著差异。

表 2 各组大鼠心肌组织 MDA、SOD 和 GSH-Px 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 MDA, SOD and GSH-Px levels in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	MDA (nmol/mg prot)	SOD (U/mg prot)	GSH-Px (U/mg prot)
正常 Normal	-	5.72 ± 1.05	92.35 ± 15.79	1.55 ± 0.14
模型 Model	-	12.35 ± 2.47**	49.12 ± 11.77**	0.63 ± 0.11**
SF-L	100	11.82 ± 2.98	54.73 ± 10.82	0.72 ± 0.13
SF-M	200	9.13 ± 1.81###△△	70.51 ± 12.04###△△	0.97 ± 0.13###△△
SF-H	400	8.10 ± 1.28###△△	74.48 ± 16.85###△△	1.03 ± 0.15###△△

2.3 沙棘黄酮对力竭运动大鼠心肌组织炎症反应标志物的影响

由表 3 可知, 与正常组比较, 模型组大鼠心肌组织 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平均显著上升 ($P < 0.01$)。与模型组比较, SF-L 组心肌组织 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平均不存在显著差异 ($P > 0.05$); SF-M 组和 SF-H 组 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平均显著降低

($P < 0.01$)。与 SF-L 组比较, SF-M 组和 SF-H 组 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平均显著降低 ($P < 0.01$)。与 SF-M 组比较, SF-H 组 IL-1β 水平显著降低 ($P < 0.01$), IL-6 和 TNF-α 水平不存在显著差异 ($P > 0.05$)。表明中、高剂量 SF (200、400 mg/(kg · d)) 可有效抑制长期力竭运动诱导的大鼠心肌组织炎症反应, 其中, 高剂量组对心肌组织 IL-1β 的干预效果最佳。

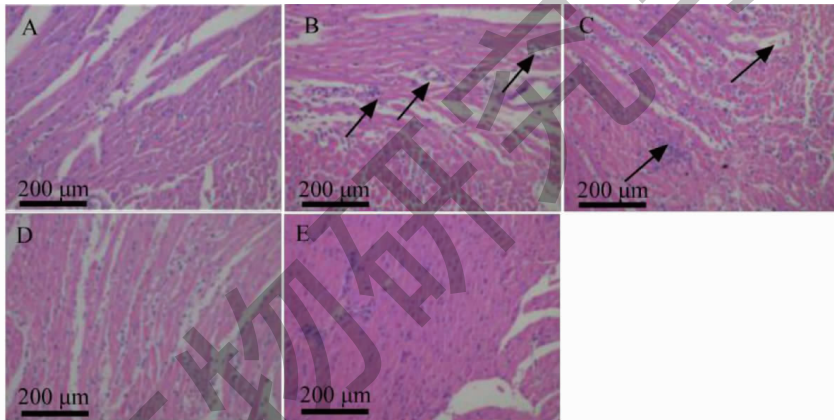
表3 各组大鼠心肌组织 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	剂量 Dose(mg/kg)	IL-1 β (pg/mg prot)	IL-6 (pg/mg prot)	TNF- α (pg/mg prot)
正常 Normal	-	5.41 \pm 0.37	0.83 \pm 0.24	2.28 \pm 0.24
模型 Model	-	16.72 \pm 0.74**	3.65 \pm 0.45**	5.41 \pm 0.35**
SF-L	100	15.80 \pm 0.66	3.18 \pm 0.41	4.89 \pm 0.29
SF-M	200	10.83 \pm 0.79 ^{##$\Delta$$\Delta$}	1.74 \pm 0.30 ^{##$\Delta$$\Delta$}	3.86 \pm 0.39 ^{##$\Delta$$\Delta$}
SF-H	400	9.34 \pm 0.42 ^{##$\Delta$$\Delta$$\square$}	1.55 \pm 0.39 ^{##$\Delta$$\Delta$}	3.77 \pm 0.32 ^{##$\Delta$$\Delta$}

2.4 沙棘黄酮对力竭运动大鼠心肌组织病理形态特征的影响

由图1可知,正常组大鼠心肌细胞结构正常,排列有序,组织形态、边界均正常;模型组心肌细胞肿胀、碎解,可见大量炎性细胞浸润,组织间隙散布不

均,细胞排列混乱;与模型组比较,SF-M组和SF-H组心肌细胞肿胀及炎症组织浸润减轻,细胞形态及边界组织趋于正常。表明中、高剂量SF(200、400 mg/(kg·d))均可减轻长期力竭运动造成的大鼠心肌结构损伤。

图1 各组大鼠心肌组织 HE 染色 ($\times 200$)Fig.1 Each group of rats myocardial tissue HE standing ($\times 200$)

注:A:正常组;B:模型组;C:SF-L;D:SF-M;E:SF-H,下同。Note:A:Normal;B:Model;C:SF-L;D:SF-M;E:SF-H,the same below.

2.5 沙棘黄酮对力竭运动大鼠心肌组织细胞凋亡的影响

由图2、图3可知,与正常组比较,模型组大鼠心肌组织 Caspase-3、Bax 蛋白表达均显著上升 ($P < 0.01$), Bcl-2 蛋白表达和 Bcl-2/Bax 比值显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,SF 各剂量组 Caspase-3、Bax 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.01$), Bcl-2 蛋白表达、Bcl-2/Bax 比值显著上升 ($P < 0.01$)。与 SF-L 组比较,SF-M 组和 SF-H 组 Caspase-3、Bax 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.01$), Bcl-2 蛋白表达、Bcl-2/Bax 比值显著上升 ($P < 0.01$)。与 SF-M 组比较,SF-H 组 Caspase-3 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。表明长期力竭运动可激活大鼠心肌细胞凋亡反应,SF (100、200、400 mg/(kg·d)) 可有效抑制心肌细胞

凋亡,其中,高剂量组对心肌组织 Caspase-3 蛋白表达的干预效果最佳。

2.6 沙棘黄酮对长期力竭运动大鼠心肌组织纤维化的影响

由图4、图5可知,与正常组比较,模型组大鼠心肌组织 CVF 和 Collagen- I、CTGF 蛋白表达均显著上升 ($P < 0.01$)。与模型组比较,SF-L 组 CVF 和 Collagen- I 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.01$);SF-M 组、SF-H 组 CVF 和 Collagen- I、CTGF 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.01$)。与 SF-L 组比较,SF-M 组、SF-H 组 CVF 和 Collagen- I、CTGF 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.01$)。与 SF-M 组比较,SF-H 组 CVF 显著降低 ($P < 0.01$)。表明长期力竭运动可诱导大鼠心肌组织纤维化,SF(100、200、400 mg/(kg·d)) 可有

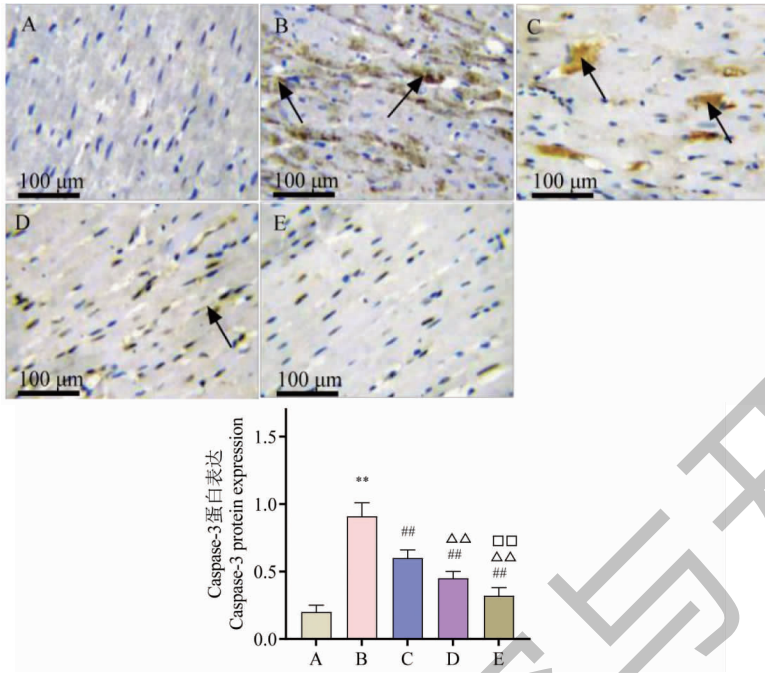


图2 各组大鼠心肌组织 Caspase-3 免疫组化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Immunohistochemistry of Caspase-3 in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

注:黑色箭头表示 Caspase-3 阳性细胞。Note: Black arrows indicate Caspase-3 positive cells.

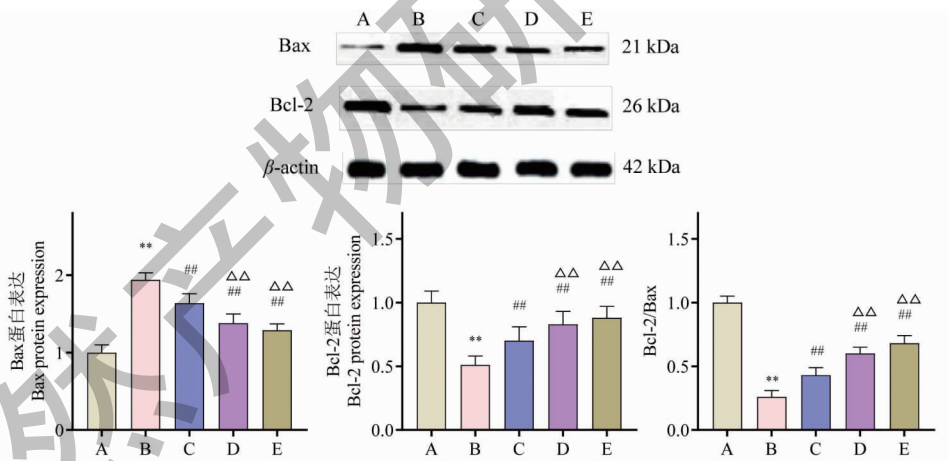


图3 各组大鼠心肌组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 比值 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Bax, Bcl-2 protein expression and Bcl-2/Bax in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

效抑制心肌组织纤维化,其中,高剂量组对心肌组织 Masson 染色胶原容积分数的干预效果最佳。

3 讨论及结论

系统、科学的运动训练可使心脏产生良性适应性变化,但长期力竭运动可能通过炎症反应、氧化应激反应、细胞凋亡激活和纤维化增生等方式对心肌组织产生不良影响。有研究证实,长期力竭运动可能通过激活心肌细胞氧化应激反应并介导凋亡程

序,ROS 与 Caspase-3 途径活化过程密切相关,可诱导线粒体损伤并导致心肌机械功能障碍^[12]。同时,细胞因子释放、中性粒细胞浸润诱导的炎症反应可能是细胞凋亡的始动因素,凋亡的发生也为组织炎症反应的加剧提供了条件。研究发现,力竭运动后心肌凋亡基因表达谱的变化,心肌促凋亡基因表达和 Bax/Bcl-2 比值显著上调^[13]。本实验也观察到类似的结果,长期力竭运动导致大鼠心肌MDA、IL-

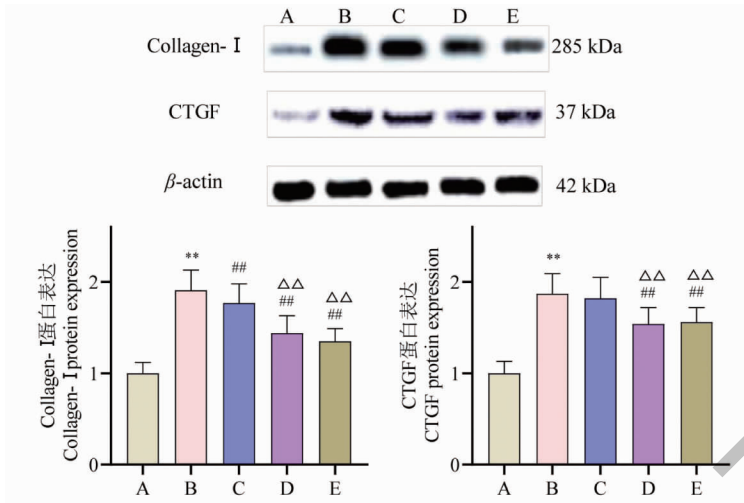


图4 各组大鼠心肌组织 Collagen-I、CTGF 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 Collagen-I, CTGF protein expression in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

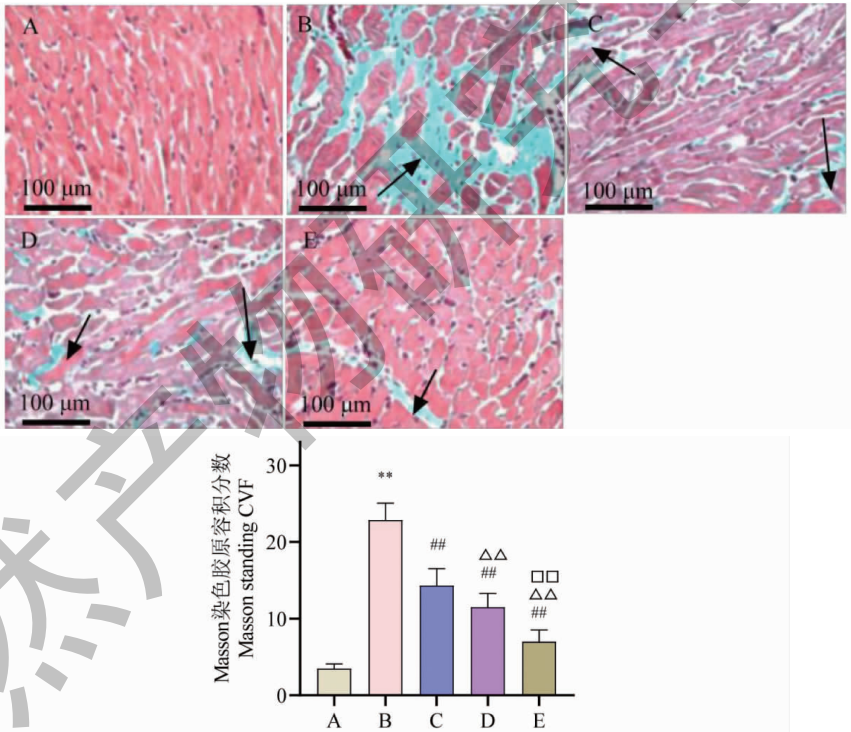


图5 各组大鼠心肌组织 Masson 染色 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 5 Masson staining in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

注:黑色箭头表示心肌坏死纤维化区域。Note: Black arrows indicate areas of myocardial necrosis and fibrosis.

1β 、IL-6、TNF- α 水平和 Caspase-3、Bax 蛋白表达、Bcl-2/Bax 比值均显著升高显著上升, SOD、GSH-Px 水平和 Bcl-2 蛋白表达显著降低, 表明长期力竭运动加剧氧化应激和炎症反应并诱导了大鼠心肌组织凋亡程序激活。

研究发现, 超负荷运动刺激可通过多种途径诱

导心肌组织纤维化, 且心肌组织的凋亡激活可能加速胶原蛋白合成及心肌纤维化进程^[14]。长期力竭运动通过诱导机体微环境损伤(炎症反应、细胞凋亡等)促进心肌组织梗死及纤维化。长期力竭运动可能通过大鼠 TNF- α 和细胞间黏附分子-1 等前炎症细胞因子表达诱导心肌组织炎症反应, 构成运动

性心肌组织结构微损伤及心房纤维化^[15]。力竭运动诱导的心肌氧化应激反应可能进一步诱导了心肌纤维化,但目前尚缺乏直接的证据。此外,研究发现,6 w 力竭运动可能通过上调大鼠心肌组织 Bax/Bcl-2 比值并激活 p38 MAPK/Smad2/3 信号通路,进而诱导心肌纤维化及成纤维细胞增殖^[16]。本试验与既往研究一致,本实验采用长期力竭跑台运动建立运动性心肌损伤动物模型,结果发现,长期力竭运动大鼠表现为血清心肌损伤标志物上调,心肌组织氧化应激、炎症反应及细胞凋亡加剧,组织形态发生改变并呈现纤维化。

现阶段尚缺乏 SF 对力竭运动诱导心肌损伤的干预效果研究,但部分植物源性黄酮提取物的侧面干预证据显示,多种植物性黄酮提取物对运动性心肌损伤的防治效果^[17]。本试验中,与模型组比较,中、高剂量 SF (200、400 mg/kg) 可有效降低大鼠血清心肌损伤标志物,同时心肌 HE 染色显示,中、高剂量 SF (200、400 mg/kg) 有效减轻了长期力竭训练造成的心肌组织形态损伤。目前,SF 的抗氧化及抗炎活性效果已得到广泛认可,本研究亦支撑了既往研究结论。在本研究中亦证实,补充 200、400 mg/(kg·d) SF 可有效抑制心肌组织氧化应激、炎症反应及血清心肌损伤标志物表达,与模型组比较,100 mg/kg SF 灌胃也可降低长期力竭训练大鼠心肌组织炎症因子、氧化应激水平,但其作用效果并不显著。研究表明,沙棘水提物可抑制人永生角质形成细胞凋亡并促进其增殖,同时参与多靶向下游凋亡信号通路调控^[18]。此外,沙棘多糖灌胃(200 mg/kg)可抑制脓毒症诱导肝损伤小鼠肝细胞凋亡,上调脓毒症小鼠肝脏过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 、Bcl-2 表达并下调 NF- κ B、Bax、Caspase-3 表达^[19]。

本研究发现,经 SF 干预后,力竭运动大鼠心肌 Caspase-3、Bax 蛋白表达和 Bcl-2/Bax 比值均显著上升、Bcl-2 蛋白表达显著降低,证明 SF (100、200、400 mg/(kg·d)) 可抑制长期力竭运动诱导的心肌细胞凋亡反应。研究表明,沙棘总黄酮可通过抑制兔耳增生性瘢痕组织炎症反应和氧化应激反应降低纤维化相关蛋白表达,进而降低纤维化组织肌成纤维细胞转化效率并抑制增生性瘢痕的进展^[20]。黄酮类活性物质通过上调成纤维细胞生长因子 21 蛋白表达,抑制转化生长因子- β 1 信号通路诱导下调心肌纤维化标志物 CTGF、Collagen-I 及 Collagen-III 表达,进而减轻心肌纤维化、氧化应激和细胞凋亡,最

终改善心肌纤维化小鼠心脏功能^[21]。本实验也得到类似的结果,长期力竭运动显著上调大鼠心肌组织 CTGF、Collagen-I 蛋白表达及心肌组织 CVF、SF (100、200、400 mg/(kg·d)) 可有效抑制心肌组织纤维化。

综上所述,本研究表明 6 周连续力竭运动诱导大鼠心肌组织氧化应激、炎症反应加剧,引发心肌细胞凋亡及纤维化,导致心肌组织损伤。SF 可有效缓解长期力竭运动大鼠心肌组织氧化应激和炎症反应,抑制心肌细胞凋亡及心肌纤维化,进而发挥心肌保护效应。

参考文献

- 1 Shi M, Dong Z, Zhao K, et al. Novel insights into exhaustive exercise-induced myocardial injury: focusing on mitochondrial quality control [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 1015639.
- 2 Yang M, Xiao Z, Chen Z, et al. S100A1 is involved in myocardial injury induced by exhaustive exercise [J]. *Int J Sports Med*, 2022, 43: 444-454.
- 3 Guo YP, Pan SS, Chen TR, et al. Exercise preconditioning promotes myocardial GLUT4 translocation and induces autophagy to alleviate exhaustive exercise-induced myocardial injury in rats [J]. *J Mol Histol*, 2023, 54: 453-472.
- 4 Xu SY, Wang WD, Fu Y, et al. Exercise and apoptosis in different tissues [J]. *Chin J Tiss Eng Res (中国组织工程研究)*, 2012, 16: 2055-2058.
- 5 Jiao Y, Li CX, Gao HN, et al. Antioxidant activity of flavonoids from branches-leaves and berry of *Hippophae rhamnoides* Linn [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2015, 27: 655-660.
- 6 Tian JH, Zhang CY, Wei L. Study on the extraction technology and antioxidant activity of total flavonoids from the pomace of sea buckthorn [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2021, 33: 65-72.
- 7 Tan L, Zhao J, Ma JL, et al. Analysis of nutritional compositions and nutritional quality evaluation in different parts of Yushu *Hippophae (Hippophae rhamnoides* L. subsp. *sinensis*) [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2018, 30: 807-816.
- 8 Huang GD, Yang ZF, You Y, et al. Observe the possible mechanisms of sea buckthorn procyanidins (SBPC) treat gastritis and study the relationship with apoptosis [J]. *J Chongqing Med Univ (重庆医科大学学报)*, 2008, 33: 970-972.
- 9 Luo H, Fu LY, Liu JQ. Sea Buckthorn Flavone combined with

- regular exercise improves memory and learning through FOXO signaling pathway[J]. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2022, 20:5477-5483.
- 10 Zhao J, Zou RL, Hu XF, et al. Progress on methods of rat treadmill training model[J]. *Prog Vet Med* (动物医学进展), 2014, 35:101-105.
- 11 Jiao Y, Xie SJ, Li Z. Effects of seabuckthorn flavone on atherosclerotic plaque in rats and its mechanism[J]. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 2022, 42:1472-1475.
- 12 Sun XJ. Effects of exercise preconditioning on expression of STAT3 and Caspase-3 in the heart of rats with exhaustive exercise injury[J]. *Chin J Tiss Eng Res* (中国组织工程研究), 2015, 19:6450-6454.
- 13 Pu YQ. Effects of treadmill exercise on cardiac function and myocardial injury in mice with heart failure[J]. *Genom Appl Biol* (基因组学与应用生物学), 2020, 39:4227-4234.
- 14 Chang Y, Yu T, Yang H, et al. Exhaustive exercise-induced cardiac conduction system injury and changes of cTnT and Cx43[J]. *Int J Sports Med*, 2015, 36:1-8.
- 15 Xu W, Qian Y, Yin J. Changes of cardiac function and myocardial apoptosis regulatory factors in rat models of excessive fatigue[J]. *J Clin Rehabil Tis Eng Res*, 2019, 23:3074-3079.
- 16 Wang SQ, Chang Y, Li D, et al. Occurrence characteristics, possible mechanism and subside reversal of exercise-induced myocardial fibrosis[J]. *Chin Sport Sci* (体育科学), 2018, 38:81-91.
- 17 Chen KH, Yang F, Zhao CK, et al. Total flavonoids from *Puerariae Lobatae Radix* alleviate exhaustive exercise-caused myocardial injury in mice by down-regulating NF- κ B signaling pathway[J]. *Pharm Clin Chin Mate Med* (中药药理与临床), 2023, 39:48-52.
- 18 Ma WY, Chen XY, Wu DT. Effects of aqueous extract of *Hippophae rhamnoides* L. on apoptosis and mitochondrial membrane potential of HaCaT cells induced by UVC[J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2017, 32:5633-5636.
- 19 Wang H, Zhang X, Xue QL, et al. Effects and mechanism of seabuckthorn polysaccharide on sepsis induced liver injury based on liver specific PPAR γ knockout mice[J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 2022, 38:789-794.
- 20 Niu ZH, Yu Y, Ai J, et al. Total flavonoids of *Hippophae rhamnoides* L. interfere with the regression of hypertrophic scar tissue blocks in a rabbit ear model[J]. *Chin J Tiss Eng Res* (中国组织工程研究), 2023, 27:258-263.
- 21 Sun B, Xia Q, Gao Z. Total flavones of *choerospondias axillaris* attenuate cardiac dysfunction and myocardial interstitial fibrosis by modulating NF- κ B signaling pathway[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2015, 15:283-289.

(上接第 985 页)

- 6 Rokas A, Mead ME, Steenwyk JL, et al. Biosynthetic gene clusters and the evolution of fungal chemodiversity[J]. *Nat Prod Rep*, 2020, 37:868-878.
- 7 Zhang HW, Song YC, Tan RX. Biology and chemistry of endophytes[J]. *Nat Prod Rep*, 2006, 23:753-771.
- 8 Gunatilaka AAL. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence[J]. *J Nat Prod*, 2006, 69:509-526.
- 9 Zhang Q, Li HQ, Zong SC, et al. Chemical and bioactive diversities of the genus *Chaetomium* secondary metabolites[J]. *Mini-Rev Med Chem*, 2012, 12:127-148.
- 10 Fatima N, Muhammad SA, Khan I, et al. *Chaetomium* endophytes: a repository of pharmacologically active metabolites[J]. *Acta Physiol Plant*, 2016, 38:136.
- 11 Yang MY, Wang YX, Chang QH, et al. Cytochalasans and azaphilones: suitable chemotaxonomic markers for the *Chaetomium* species[J]. *Appl Microbiol Biot*, 2021, 105:8139-8155.
- 12 Dwibedi V, Rath SK, Jain S, et al. Key insights into secondary metabolites from various *Chaetomium* species[J]. *Appl Microbiol Biot*, 2023, 107:1077-1093.
- 13 Tian Y, Li Y. A review on bioactive compounds from marine-derived *Chaetomium* species[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2022, 32:541.
- 14 Motohashi K, Irie K, Toda T, et al. Studies on terpenoids produced by actinomycetes[J]. *J Antibiot*, 2008, 61:75-80.
- 15 Tuan NT, Dam NP, Van Hieu M, et al. Chemical constituents of the Lichen *Parmotrema tinctorum* and their antifungal activity[J]. *Chem Nat Compd +*, 2020, 56:315-317.
- 16 Zhang HQ, Deng GG, Wang JZ, et al. Study on constituents from cultures of fungus *Phellinus lonicerinus*[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2021, 33:1866-1870.
- 17 Lu H, Zou WX, Meng JC, et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*[J]. *Plant Sci*, 2000, 151:67-73.
- 18 Choudhary MI, Ali M, Wahab A, et al. New antiglycation and enzyme inhibitors from *Parmotrema cooperi*[J]. *Sci China Chem*, 2011, 54:1926-1931.