

橙皮素调节Notch/Hes-1信号通路对慢性心力衰竭大鼠心功能和心肌纤维化的影响

廖启发* 李文强 易胜利

(重庆市开州区人民医院全科医学科, 重庆 405400)

摘要 该文旨在探讨橙皮素(HSP)调节Notch/发状分裂相关增强子1(Hes-1)信号通路对慢性心力衰竭(CHF)大鼠心功能和心肌纤维化的影响。构建CHF大鼠模型, 并将成功建模的大鼠随机分为CHF组、HSP低剂量组(HSP-L组)、HSP中剂量组(HSP-M组)、HSP高剂量组(HSP-H组)、HSP高剂量+Notch/Hes-1信号通路抑制剂DAPT组(DAPT组), 每组各15只。同时, 随机选取15只正常大鼠为Con组。采用小动物超声影像系统检测各组大鼠心功能参数; ELISA法检测各组大鼠血清氨基末端脑钠肽前体(NT-proBNP)和心肌酶水平; 检测各组大鼠心脏质量指数及左心室质量指数; HE和Masson染色观察各组大鼠心肌组织形态学及纤维化变化; 羟脯氨酸(HYP)测试盒检测各组大鼠心肌组织羟脯氨酸(HYP)含量; 免疫组化和Western blot检测各组大鼠心肌组织纤维化及Notch/Hes-1信号通路相关蛋白表达。与Con组比较, CHF组大鼠心肌组织结构损伤严重, 可见心肌纤维结构紊乱、断裂及局灶性溶解现象, 左室射血分数(LVEF)、左心室短轴缩短率(LVFS)以及Notch1、Hes-1表达水平降低, NT-proBNP、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、心脏质量指数、左心室质量指数、胶原容积分数(CVF)、HYP含量、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)荧光强度以及I型胶原蛋白(Coll)、III型胶原蛋白(CollIII)表达水平升高($P<0.05$); 与CHF组比较, HSP-L组、HSP-M组、HSP-H组大鼠心肌组织结构损伤和胶原纤维沉积改善, LVEF、LVFS以及Notch1、Hes-1表达水平升高, NT-proBNP、CK、CK-MB、心脏质量指数、左心室质量指数、CVF、HYP含量、 α -SMA荧光强度以及Coll、CollIII表达水平降低($P<0.05$); 与HSP-H组比较, DAPT组大鼠心肌组织结构损伤及纤维化加重, LVEF、LVFS以及Notch1、Hes-1表达水平降低, NT-proBNP、CK、CK-MB、心脏质量指数、左心室质量指数、CVF、HYP含量、 α -SMA荧光强度以及Coll、CollIII表达水平升高($P<0.05$)。HSP能够改善CHF大鼠心功能和心肌纤维化, 可能与激活Notch/Hes-1信号通路有关。

关键词 橙皮素; Notch/发状分裂相关增强子1信号通路; 慢性心力衰竭; 心功能; 心肌纤维化

Effects of Hesperetin on Cardiac Function and Myocardial Fibrosis in Rats with Chronic Heart Failure by Regulating Notch/Hes-1 Signaling Pathway

LIAO Qifa*, LI Wenqiang, YI Shengli

(Department of General Medicine, Kaizhou District People's Hospital of Chongqing, Chongqing 405400, China)

Abstract This study aims to explore the effects of HSP (hesperetin) on cardiac function and myocardial fibrosis in rats with CHF (chronic heart failure) by regulating the Notch/Hes-1 (hairy and enhancer of split homolog 1) signaling pathway. A CHF rat model was constructed, and successfully modeled rats were randomly separated into CHF group, HSP low-dose group (HSP-L group), HSP medium-dose group (HSP-M group), HSP high-dose group

收稿日期: 2025-09-09

接受日期: 2025-11-14

*通信作者。Tel: 023-52633422, E-mail: lb1781@sina.com

Received: September 9, 2025

Accepted: November 14, 2025

*Corresponding author. Tel: +86-23-52633422, E-mail: lb1781@sina.com

(HSP-H group), and HSP high-dose+Hotch/Hes-1 signaling pathway inhibitor DAPT group (DAPT group), with 15 rats in each group. Another 15 normal rats were randomly selected as the Con group. The ultrasonic imaging system for small animals was used to detect the cardiac function parameters of each group of rats. ELISA was used to measure serum NT-proBNP (N-terminal pro-B-type natriuretic peptide) and myocardial enzymes; the cardiac mass index and left ventricular mass index of rats in each group were also measured. HE and Masson staining were used to observe the morphological changes and fibrosis in the myocardial tissues of each group of rats. The content of HYP (hydroxyproline) in myocardial tissue was detected by HYP test box. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect myocardial fibrosis and Notch/Hes-1 signaling pathway-related protein expression. Compared with the Con group, the CHF group showed severe damage to the myocardial tissue structure, and structural disorder, rupture and focal dissolution of myocardial fibers were observed. The LVEF (left ventricular ejection fraction), LVFS (left ventricular fractional shortening), the Notch1 and Hes-1 expression levels reduced, while the NT-proBNP, CK (creatin kinase), CK-MB (creatin kinase isoenzyme), cardiac mass index, left ventricular mass index, CVF (collagen volume fraction), HYP content, α -SMA (α -smooth muscle actin) fluorescence intensity, and ColI (collagen I) and ColIII (collagen III) expression levels elevated ($P<0.05$). Compared with the CHF group, the HSP-L group, HSP-M group, and HSP-H group showed improvement in myocardial tissue structure damage and collagen fiber deposition, the LVEF, LVFS, and the Notch1 and Hes-1 expression levels elevated, while the NT-proBNP, CK, CK-MB, cardiac mass index, left ventricular mass index, CVF, HYP content, α -SMA fluorescence intensity, and the ColI and ColIII expression levels reduced ($P<0.05$). Compared with the HSP-H group, the DAPT group showed aggravated myocardial tissue structural damage and fibrosis, the LVEF, LVFS, and the Notch1 and Hes-1 expression levels reduced, while the NT-proBNP, CK, CK-MB, cardiac mass index, left ventricular mass index, CVF, HYP content, α -SMA fluorescence intensity, and the ColI and ColIII expression levels elevated ($P<0.05$). HSP can improve cardiac function and myocardial fibrosis in CHF rats, which may be related to the activation of the Notch/Hes-1 signaling pathway.

Keywords hesperetin; Notch/hairy and enhancer of split homolog 1 signaling pathway; chronic heart failure; cardiac function; myocardial fibrosis

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)作为心血管疾病发展的终末阶段,是一种以心室收缩或舒张功能障碍为特征的临床综合征^[1]。其核心病理特征表现为心室收缩/舒张功能受损、心输出量持续降低,继而引发全身低灌注状态,引起心肌肥厚、心室扩张及间质纤维化,这些结构改变与不良预后相关^[2]。CHF患者常表现为活动耐量下降,伴随日常活动能力受限,病情进展至终末期可出现静息状态下呼吸困难,导致患者生活质量显著降低^[3]。在CHF病理过程中,心肌纤维化扮演至关重要角色,这一病理改变导致心肌间质中胶原纤维异常沉积和重构,最终造成心肌组织顺应性下降,加剧心功能损害^[4]。因此,改善心肌纤维化和心功能对于延缓CHF进展具有重要意义。橙皮素(hesperetin, HSP)是广泛存在于柑橘类水果中的天然黄酮类化合物,展现出包括抗炎、抗肿瘤、神经保护、软骨保护在内的多种药理学作用^[5]。已有研究显示,HSP能够增强心脏肥大大鼠心脏抗氧化能力,减轻

氧化应激损伤,改善病理性心脏重塑,对心肌损伤起到保护作用^[6]。因此猜测HSP对CHF大鼠心功能损伤的修复及纤维化进程的延缓可能具有调控作用。然而,HSP在CHF患者心肌纤维化发展中的作用机制尚未得到充分阐明。Notch/发状分裂相关增强子1(hairy and enhancer of split homolog 1, Hes-1)信号通路在多种生物过程(包括分化调控、细胞增殖以及程序性死亡等)中扮演核心角色,对组织稳态维持至关重要^[7]。研究表明,激活Notch/Hes-1信号通路,能够减少CHF大鼠心肌细胞凋亡及心肌纤维化,减轻心肌损伤,从而改善心脏功能^[8]。本研究通过建立CHF大鼠模型,探究HSP对大鼠心功能和心肌纤维化的干预作用,以及其与Notch/Hes-1信号通路的调控关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级SD雄性大鼠(6周龄,体质

量200~220 g)由斯莱克实验动物有限责任公司[生产许可证号: SCXK(沪) 2022-0004]提供。所有实验动物均饲养于SPF级实验环境中, 12 h光照/12 h黑暗循环, 环境温度恒定维持在23~25 °C, 相对湿度控制在60%~65%, 自由获取标准饲料和水。所有动物实验方案均经过重庆市开州区人民医院动物伦理委员会严格审查和批准(批准号: CZ2025-014)。

1.1.2 实验试剂及相关仪器 橙皮素(货号: JKB0336)购自上海经科化学科技有限公司; 阿霉素(货号: 51410ES10)购自翌圣生物科技(上海)有限公司; Notch/Hes-1信号通路抑制剂DAPT(货号: wlb1618)购自上海瓦兰生物科技有限公司; 大鼠氨基末端脑钠肽前体(N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, NT-proBNP)、肌酸激酶(creatine kinase, CK)、肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme, CK-MB) ELISA试剂盒以及羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)测试盒(货号: FY-A014908、FY-A014699、FY-A014596、FY-F01347)购自上海富雨生物科技有限公司; HE、Masson染色试剂盒(货号: AC11547、AG1340)购自上海吉至生化科技有限公司; 免疫荧光染色试剂盒(货号: KGIF005)购自江苏凯基生物技术股份有限公司; 抗体 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、I型胶原蛋白(collagen I, Coll)、III型胶原蛋白(collagen III, ColIII)、Notch1、Hes-1(货号: HY-P83739、HY-P81227、HY-P81101、HY-P80768、HY-P80155)购自MedChemExpress公司; 小动物超声影像系统(型号: Vevo2100)购自维胜(中国)有限公司; 酶标仪(型号: ELx800™)购自上海然哲仪器设备有限公司; 荧光显微镜(型号: BX63)购自仪景通光学科技(上海)有限公司; 凝胶成像系统(型号: GelDoc Go)购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 CHF大鼠模型制备及分组干预 大鼠在标准实验动物房中进行为期7天的适应性饲养。参考郭冰等^[9]造模方法, 采用阿霉素腹腔注射诱导CHF大鼠模型。将阿霉素以无菌生理盐水稀释至2 mg/mL浓度。按1.5 mg/kg剂量, 每周2次腹腔注射, 持续7周, 累计给药剂量达21 mg/kg。此剂量设计基于前期实验结果。末次给药后观察1周, 出现大鼠活动减少、反应迟钝、毛发紊乱枯黄、腹水等现象, 且左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF) $\leq 60\%$ ^[10],

则提示CHF大鼠模型建立成功。

将造模成功的大鼠随机分为CHF组、HSP低剂量组(HSP-L组)、HSP中剂量组(HSP-M组)、HSP高剂量组(HSP-H组)、HSP高剂量+Notch/Hes-1信号通路抑制剂DAPT组(DAPT组), 每组各15只。本研究基于G*Power 3.1.9软件确定实验样本量, 预设显著性水平 α 为0.05, 统计检验效能1- β 为0.8, 效应量 f 值采用0.4作为预设值, 分析方法选择单因素方差分析, 理论计算结果显示, 在完全满足上述参数条件下, 每组实验动物需要16只才能达到理想统计学效能。考虑到动物伦理、实验条件设置及资源优化配置, 最终确定每组实验纳入15只大鼠, 这样既能有效筛查潜在的生物学效应, 又能严格遵循动物实验3R原则。其中不同剂量HSP组分别通过灌胃进行HSP干预, 剂量分别为7.5、15、30 mg/kg^[11], 剂量确定主要是依据参考文献[11]中大鼠HSP使用剂量以及前期预实验结果; DAPT组灌胃给予30 mg/kg HSP和腹腔注射10 mg/kg DAPT^[8]。随机选取15只正常大鼠为Con组, Con组和CHF组均给予等量生理盐水, 持续干预4周。

1.2.2 心功能参数检测 在完成药物干预周期后, 采用腹腔注射20%乌拉坦(6 mg/kg)麻醉大鼠, 通过小动物超声影像系统对大鼠进行心功能检测, 评估LVEF、左心室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS), 至少测量3个连续心动周期取平均值。

1.2.3 血清氨基末端脑钠肽前体(NT-proBNP)和心肌酶水平检测 在心功能参数检测完成后, 对各组大鼠进行称重并记录。通过腹主动脉穿刺收集大鼠全血样本。采集后将血液样本于冰上静置1.5 h, 置于离心机中于4 °C、3 000 r/min离心30 min, 收集上层血清并分装保存。采用ELISA试剂盒对血清中NT-proBNP、CK、CK-MB进行定量检测。整个实验过程严格遵循试剂盒操作规范。

1.2.4 心脏质量指数及左心室质量指数检测 完成腹主动脉取血后, 立即进行心脏解剖, 并使用4 °C预冷的0.9%生理盐水进行清洗, 滤纸吸附去除表面液体。使用电子天平对心脏组织进行称重, 然后切除心房组织和右心室, 分离左心室进行称重, 计算心脏质量指数即全心质量(mg)/体质量(g)以及左心室质量指数即左心室质量(mg)/体质量(g)。

1.2.5 心肌组织形态学及纤维化变化 各组随机取5只大鼠左心室心肌组织(样本量选取主要使用

G*Power 3.1.9软件, 效应量 $d=1.5$, α 为0.05, power=0.8, 计算得到每组需4.3个样本, 向上取整为5), 使用4%多聚甲醛于4 °C冰箱中进行为期24 h的充分固定。随后通过乙醇(从70%、80%、90%、95%、100%逐渐递增)脱水, 二甲苯透明处理后, 利用石蜡进行渗透包埋。使用切片机制备厚度为5 μm 的连续切片, 通过HE和Masson染色试剂盒处理切片, 光学显微镜下观察心肌细胞形态学改变以及心肌间质纤维化程度, 计算大鼠胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)。

1.2.6 心肌组织HYP含量 剩余大鼠左心室心肌组织随机选取5个, 置于预冷的RIPA裂解缓冲液中, 使用组织匀浆器在冰浴条件下进行匀浆。将匀浆液转移至离心管进行4 °C、12 000 r/min离心15 min, 吸取上清液, 用HYP测定试剂盒处理样本, 酶标仪测定吸光度(D)值, 计算HYP含量。

1.2.7 心肌组织 α -SMA表达变化 取1.2.5中制备的石蜡切片, 采用梯度二甲苯脱蜡、水化处理, 柠檬酸盐缓冲液进行高压热修复, 并经过0.1%硼氢化钠溶液、75%乙醇脱水以及苏丹黑工作液处理。于10%血清+5%牛血清白蛋白湿盒内室温下封闭1 h。一抗 α -SMA(稀释比例1:100)湿盒过夜孵育(4 °C)。接着使用荧光标记二抗(1:200)避光室温下孵育1.5 h, DAPI工作液室温下孵育10 min, 抗荧光淬灭剂进行复染, 荧光显微镜观察分析 α -SMA荧光强度变化。

1.2.8 心肌组织纤维化及Notch/Hes-1信号通路相关蛋白表达检测 将各组大鼠剩余的左心室心肌组织置于组织裂解液中, 使用机械匀浆充分裂解组织样本, 通过低温离心机在4 °C条件下, 12 000 r/min离心20 min分离上清液, 然后测定蛋白浓度。每孔上样等量蛋白并在恒定电压下进行电泳, 电泳结束后, 采用湿转法将蛋白转移至PVDF膜。使用5%脱脂奶粉室温封闭2 h, 并将膜置于ColII、ColIII、Notch1、Hes-1、GAPDH(稀释比例1:2 000)一抗溶液中, 4 °C冰箱中孵育过夜。TBST洗涤3次并通过对应种属二抗(稀释比例1:3 000)室温孵育1 h。使用化学发光试剂显色, 凝胶成像系统曝光显影, 图形分析软件进行灰度值测定, 以GAPDH为内参计算蛋白相对表达量。

1.3 统计学分析

采用SPSS 26.0统计软件进行数据分析处理, 所有计量资料均以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。在数据分

析过程中, 首先对数据进行正态性和方差齐性检验。对于符合正态分布和方差齐性的数据, 采用单因素方差分析进行多组间差异比较。当组间差异具有统计学意义时, 进一步采用SNK- q 检验进行事后多重比较。显著性水平为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 HSP对大鼠心功能参数的影响

CHF组与Con组相比, 大鼠LVEF、LVFS降低($P<0.05$); HSP-L组、HSP-M组、HSP-H组与CHF组相比, 大鼠LVEF、LVFS升高($P<0.05$); DAPT组与HSP-H组相比, 大鼠LVEF、LVFS显著降低($P<0.05$)。见表1。

2.2 HSP对大鼠血清NT-proBNP、心肌酶水平的影响

CHF组大鼠血清NT-proBNP、CK、CK-MB水平比Con组高($P<0.05$); HSP-L组、HSP-M组、HSP-H组大鼠血清NT-proBNP、CK、CK-MB水平比CHF组低($P<0.05$); DAPT组大鼠血清NT-proBNP、CK、CK-MB水平比HSP-H组高($P<0.05$)。见表2。

2.3 HSP对大鼠心脏质量指数及左心室质量指数的影响

CHF组大鼠心脏质量指数及左心室质量指数高于Con组($P<0.05$); HSP-L组、HSP-M组、HSP-H组大鼠心脏质量指数及左心室质量指数低于CHF组($P<0.05$); DAPT组大鼠心脏质量指数及左心室质量指数高于HSP-H组($P<0.05$)。见表3。

2.4 HSP对大鼠心肌组织形态学的影响

Con组大鼠左心室心肌组织结构完整, 心肌纤维束整齐排列, 细胞核形态正常; CHF组大鼠心肌组织结构破坏, 心肌纤维断裂溶解, 排列紊乱; HSP-L组、HSP-M组、HSP-H组与CHF组相比, 大鼠心肌组织病理损伤有所改善, 细胞水肿及心肌纤维损伤减轻; DAPT组与HSP-H组相比, 大鼠心肌组织病理损伤加重, 心肌细胞核异型性改变明显。见图1。

2.5 HSP对大鼠心肌组织纤维化的影响

Con组大鼠心肌纤维呈现红色染色, 胶原纤维以蓝色染色规则分布; CHF组大鼠心肌细胞排列不规则, 胶原纤维沉积区域增加, CVF、HYP含量较Con组升高($P<0.05$); HSP-L组、HSP-M组、HSP-H组心肌细胞排列趋于整齐, 胶原纤维沉积区域减少, CVF、HYP较CHF组降低($P<0.05$); DAPT组大鼠

表1 各组大鼠LVEF、LVFS比较

Table 1 Comparison of LVEF and LVFS of rats in each group

组别 Groups	LVEF /%	LVFS /%
Con	76.95±8.04	79.51±8.26
CHF	18.43±2.06*	25.76±3.58*
HSP-L	31.56±3.18 [#]	38.28±4.09 [#]
HSP-M	44.82±4.31 ^{#&}	56.43±5.97 ^{#&}
HSP-H	62.68±6.57 ^{#&@}	70.32±7.35 ^{#&@}
DAPT	35.29±3.95 [§]	47.66±5.13 [§]

* $P<0.05$, 与Con组比较; [#] $P<0.05$, 与CHF组比较; [&] $P<0.05$, 与HSP-L组比较; [@] $P<0.05$, 与HSP-M组比较; [§] $P<0.05$, 与HSP-H组比较。 $n=15$, $\bar{x}\pm s$ 。

* $P<0.05$ compared with Con group; [#] $P<0.05$ compared with CHF group; [&] $P<0.05$ compared with HSP-L group; [@] $P<0.05$ compared with HSP-M group; [§] $P<0.05$ compared with HSP-H group. $n=15$, $\bar{x}\pm s$.

表2 各组大鼠血清NT-proBNP、CK、CK-MB水平比较

Table 2 Comparison of serum NT-proBNP, CK and CK-MB levels in rats of each group

组别 Groups	NT-proBNP /pg·mL ⁻¹	CK /pg·mL ⁻¹	CK-MB /pg·mL ⁻¹
Con	328.17±40.35	85.49±10.57	157.62±21.45
CHF	784.51±82.64*	315.68±33.96*	629.37±64.28*
HSP-L	579.73±58.26 [#]	269.92±28.52 [#]	546.54±55.85 [#]
HSP-M	487.29±54.71 ^{#&}	193.14±22.43 ^{#&}	408.98±46.62 ^{#&}
HSP-H	396.85±46.83 ^{#&@}	118.43±15.75 ^{#&@}	235.72±26.97 ^{#&@}
DAPT	543.47±58.92 [§]	237.31±26.84 [§]	515.46±61.29 [§]

* $P<0.05$, 与Con组比较; [#] $P<0.05$, 与CHF组比较; [&] $P<0.05$, 与HSP-L组比较; [@] $P<0.05$, 与HSP-M组比较; [§] $P<0.05$, 与HSP-H组比较。 $n=15$, $\bar{x}\pm s$ 。

* $P<0.05$ compared with Con group; [#] $P<0.05$ compared with CHF group; [&] $P<0.05$ compared with HSP-L group; [@] $P<0.05$ compared with HSP-M group; [§] $P<0.05$ compared with HSP-H group. $n=15$, $\bar{x}\pm s$.

表3 各组大鼠心脏质量指数及左心室质量指数比较

Table 3 Comparison of heart mass index and left ventricular mass index of rats in each group

组别 Groups	心脏质量指数 Heart mass index	左心室质量指数 Left ventricular mass index
Con	1.89±0.21	0.84±0.09
CHF	4.52±0.46*	2.79±0.29*
HSP-L	4.05±0.42 [#]	2.35±0.26 [#]
HSP-M	3.24±0.35 ^{#&}	1.62±0.18 ^{#&}
HSP-H	2.13±0.22 ^{#&@}	1.02±0.12 ^{#&@}
DAPT	3.86±0.39 [§]	2.19±0.23 [§]

* $P<0.05$, 与Con组比较; [#] $P<0.05$, 与CHF组比较; [&] $P<0.05$, 与HSP-L组比较; [@] $P<0.05$, 与HSP-M组比较; [§] $P<0.05$, 与HSP-H组比较。 $n=15$, $\bar{x}\pm s$ 。

* $P<0.05$ compared with Con group; [#] $P<0.05$ compared with CHF group; [&] $P<0.05$ compared with HSP-L group; [@] $P<0.05$ compared with HSP-M group; [§] $P<0.05$ compared with HSP-H group. $n=15$, $\bar{x}\pm s$.

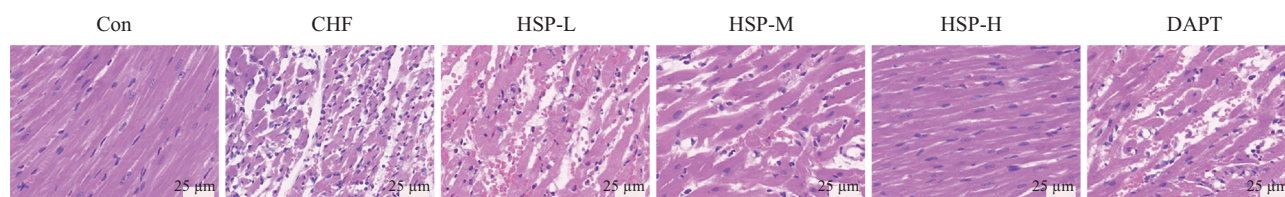


图1 大鼠心肌组织形态学变化

Fig.1 Histomorphological changes in rat myocardium

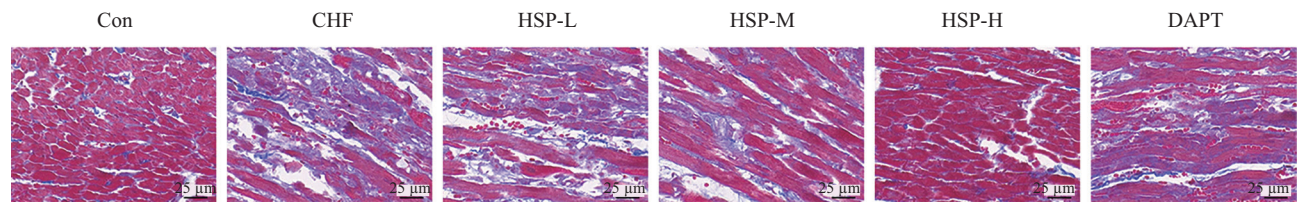


图2 大鼠心肌组织纤维化变化
Fig.2 Changes in myocardial fibrosis in rats

表4 各组大鼠CVF及HYP含量比较
Table 4 Comparison of CVF and HYP contents of rats in each group

组别 Groups	CVF /%	HYP / $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$
Con	4.35 $\pm$ 0.52	3.12 $\pm$ 0.34
CHF	39.58 $\pm$ 4.27*	12.68 $\pm$ 1.52*
HSP-L	32.26 $\pm$ 3.69 [#]	9.87 $\pm$ 1.06 [#]
HSP-M	21.73 $\pm$ 2.54 ^{#&}	7.52 $\pm$ 0.08 ^{#&}
HSP-H	8.45 $\pm$ 0.91 ^{#&@}	4.76 $\pm$ 0.57 ^{#&@}
DAPT	28.17 $\pm$ 3.36 [§]	8.59 $\pm$ 0.09 [§]

* $P<0.05$, 与Con组比较; [#] $P<0.05$, 与CHF组比较; [&] $P<0.05$, 与HSP-L组比较; [@] $P<0.05$, 与HSP-M组比较; [§] $P<0.05$, 与HSP-H组比较。 $n=5$, $\bar{x}\pm s$ 。
* $P<0.05$ compared with Con group; [#] $P<0.05$ compared with CHF group; [&] $P<0.05$ compared with HSP-L group; [@] $P<0.05$ compared with HSP-M group; [§] $P<0.05$ compared with HSP-H group. $n=5$, $\bar{x}\pm s$.

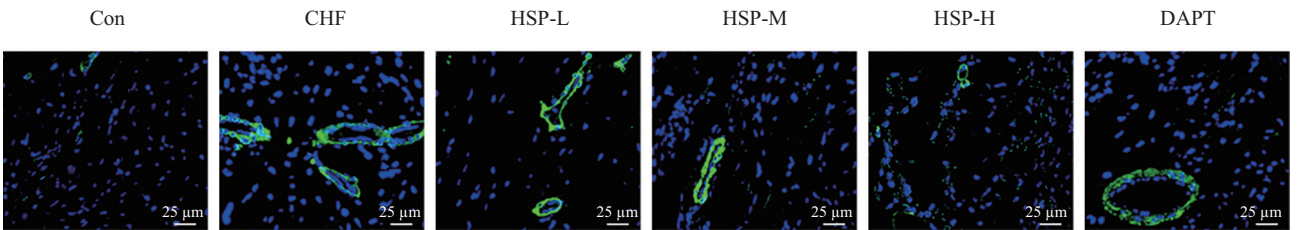


图3 大鼠心肌组织α-SMA表达变化
Fig.3 Expression changes of α-SMA in rat myocardial tissue

心肌细胞排列紊乱, 胶原纤维沉积面积增加, CVF、HYP含量较HSP-H组升高($P<0.05$)。见图2和表4。

2.6 HSP对大鼠心肌组织α-SMA表达的影响

与Con组比较, CHF组大鼠心肌组织α-SMA绿色荧光强度增加; 与CHF组比较, HSP-L组、HSP-M组、HSP-H组大鼠心肌组织α-SMA绿色荧光强度降低; 与HSP-H组比较, DAPT组大鼠心肌组织α-SMA绿色荧光强度显著增加。见图3。这一结果说明HSP能够通过抑制α-SMA表达, 进一步改善CHF大鼠心肌纤维化。

2.7 HSP对大鼠心肌组织纤维化及Notch/Hes-1信号通路相关蛋白表达的影响

CHF组与Con组相比, 大鼠心肌组织Notch1、Hes-1表达水平降低, ColII、ColIII表达水平升高($P<0.05$); HSP-L组、HSP-M组、HSP-H组与CHF

组相比, 大鼠心肌组织Notch1、Hes-1表达水平升高, ColII、ColIII表达水平降低($P<0.05$); DAPT组与HSP-H组相比, 大鼠心肌组织Notch1、Hes-1表达水平显著降低, ColII、ColIII表达水平显著升高($P<0.05$)。见图4和表5。这一结果表明HSP可能通过激活Notch1/Hes-1通路, 提升Notch1、Hes-1表达水平, 降低ColII、ColIII表达水平, 减缓CHF大鼠心肌组织纤维化进程。

3 讨论

CHF作为多种心血管疾病病人死亡的重要原因, 五年生存率较低, 是当代心血管医学领域的重大挑战^[12]。其主要病理特征为心肌细胞代偿性肥大暂时维持心脏泵血功能, 但伴随胶原蛋白异常沉积导致心肌纤维化程度加重, 最终导致心室收缩、

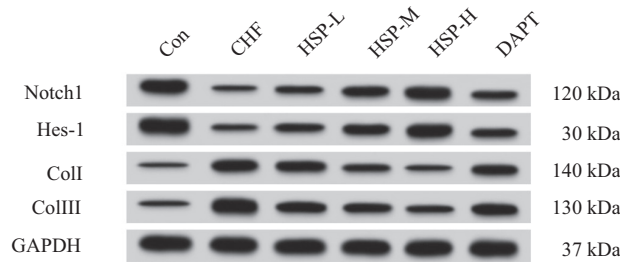


图4 大鼠心肌组织ColI、ColIII、Notch1、Hes-1蛋白表达情况
Fig.4 Protein expression of ColI, ColIII, Notch1 and Hes-1 in rat myocardial tissue

表5 各组大鼠Notch1、Hes-1、ColI、ColIII蛋白表达比较
Table 5 Comparison of protein expression of Notch1, Hes-1, ColI and ColIII in rats of each group

组别 Groups	Notch1	Hes-1	ColI	ColIII
Con	0.95±0.13	0.99±0.12	0.28±0.03	0.35±0.04
CHF	0.32±0.06*	0.37±0.04*	0.86±0.09*	0.92±0.12*
HSP-L	0.49±0.05 [#]	0.54±0.06 [#]	0.73±0.08 [#]	0.76±0.08 [#]
HSP-M	0.68±0.08 ^{#&}	0.73±0.09 ^{#&}	0.51±0.06 ^{#&}	0.61±0.07 ^{#&}
HSP-H	0.87±0.11 ^{#&@}	0.91±0.14 ^{#&@}	0.36±0.05 ^{#&@}	0.43±0.05 ^{#&@}
DAPT	0.46±0.06 [§]	0.58±0.06 [§]	0.69±0.07 [§]	0.75±0.09 [§]

* $P<0.05$, 与Con组比较; [#] $P<0.05$, 与CHF组比较; [&] $P<0.05$, 与HSP-L组比较; [@] $P<0.05$, 与HSP-M组比较; [§] $P<0.05$, 与HSP-H组比较。 $n=5$, $\bar{x}\pm s$ 。
* $P<0.05$ compared with Con group; [#] $P<0.05$ compared with CHF group; [&] $P<0.05$ compared with HSP-L group; [@] $P<0.05$ compared with HSP-M group; [§] $P<0.05$ compared with HSP-H group. $n=5$, $\bar{x}\pm s$.

舒张功能进行性恶化, 显著影响患者生活质量^[13]。虽然目前“新四联疗法”是心衰药物治疗方案的核心, 能够改善患者预后, 降低心血管疾病死亡率, 但许多患者预后仍然较差^[14]。因此, 需要更深入了解CHF发生心室重构的分子机制和研发新型药物用于改善心肌纤维化。

HSP是重要的黄酮类化合物, 广泛存在于柑橘类水果中, 近年来越来越多的研究揭示其在心血管系统中展现出显著的保护作用。左新华等^[11]研究表明, HSP能够增加急性心肌梗死大鼠LVFS和LVEF, 改善心肌组织损伤, 对心脏保护具有重要意义。LIU等^[15]研究显示, HSP通过调节异丙肾上腺素诱导的小鼠心率, 减轻心肌组织病理损伤, 降低血清CK及乳酸脱氢酶水平, 缓解心肌缺血。以上研究结果均说明HSP具有保护心脏的潜在作用。本研究通过阿霉素构建CHF大鼠模型发现, 大鼠LVEF、LVFS降低, 心脏质量指数及左心室质量指数增加, 心肌组织结构损伤严重, 与霍雨佳等^[10]研究结果一致, 提示模型构建成功。经过HSP治疗后, 大鼠LVEF、LVFS升高, 心脏质量指数及左心室质量指数降低, 心肌组织病

理损伤减轻, 提示HSP能够减轻阿霉素导致的心肌损伤, 有效改善CHF大鼠心功能。

NT-proBNP在心力衰竭诊断和预后评估中具有重要意义。CK、CK-MB是心肌损伤标记物, 与心室重塑进程密切相关。本研究结果显示, CHF大鼠NT-proBNP、CK、CK-MB水平升高, 与前人研究结果^[16]相似。经过HSP处理后, 大鼠NT-proBNP、CK、CK-MB水平降低, 提示HSP可能减轻CHF大鼠心肌损伤。心肌纤维化在CHF病理进程中发挥关键作用, 其本质特征在于细胞外基质异常沉积与结构紊乱。而细胞外基质主要由ColI、ColIII组成, 与心脏功能密切相关。当心肌发生纤维化时, 各型胶原比例失调, 能够导致心功能障碍^[17]。其中 α -SMA是心肌成纤维细胞向肌成纤维细胞转化的特异性分子标志。本研究结果显示, CHF大鼠心肌组织胶原纤维沉积严重, CVF、HYP含量以及 α -SMA、ColI、ColIII表达水平升高, 与前人研究结果^[18]相似。通过HSP干预后, 大鼠心肌组织胶原纤维沉积显著减少, α -SMA、ColI、ColIII表达水平降低。这些结果均表明HSP能够改善CHF大鼠心功能, 减缓心肌纤维

化进程。

Notch1信号通路是一种高度保守的信号通路, Hes-1作为Notch通路的关键效应分子, 与心脏发育和修复, 以及各种心血管疾病的治疗和预后相关^[19]。ZHOU等^[20]研究发现, 激活Notch/Hes-1信号通路, 可减缓横主动脉收缩诱导的大鼠心脏重塑, 改善心功能, 延缓心力衰竭病理进程。WEI等^[21]研究表明, 激活Notch/Hes-1信号通路, 能够抑制病理性心肌肥大, 减轻心肌纤维化程度, 改善心脏功能, 参与压力超负荷所致的心肌损伤保护过程。以上研究结果表明, 激活Notch/Hes-1信号通路可能对改善心脏纤维化具有重要意义。本研究结果显示, 经过HSP干预后, Notch1、Hes-1表达水平升高, 大鼠心功能和心肌纤维化显著改善, 推测HSP改善心功能, 减轻心肌纤维化, 其机制可能与激活Notch/Hes-1信号通路有关。回补实验中CHF大鼠经过高剂量HSP干预的同时引入Notch/Hes-1通路抑制剂DAPT, 发现HSP对心肌组织的改善作用被削弱, 这提示激活Notch/Hes-1通路可能是HSP发挥保护心脏作用的机制。

综上所述, HSP可能通过激活Notch/Hes-1信号通路, 发挥改善CHF大鼠心功能和心肌纤维化的作用。本文创新性在于初步探究HSP对CHF大鼠的潜在疗效, 通过结合他人研究结果中指标的变化, 侧面反映HSP具有心脏保护作用, 为HSP未来能够成为治疗CHF的候选药物提供充实依据。然而, 本研究不足之处在于未设置临床治疗药物对照组, 后续研究将进一步设置Hes-1敲除模型, 明确Hes-1是否是HSP调控的Notch1下游分子, 并设置卡托普利阳性药物组, 深入阐明HSP疗效及其作用机制。

参考文献 (References)

- [1] GUO B, SHI S, GUO Y, et al. Interventional therapies for chronic heart failure: an overview of recent developments [J]. ESC Heart Fail, 2025, 12(2): 1081-94.
- [2] SHRESTHA J, DONE S. An overview of chronic heart failure [J]. Nurs Stand, 2023, 38(8): 43-9.
- [3] PELLICORI P, CLELAND J G F, CLARK A L. Chronic obstructive pulmonary disease and heart failure: a breathless conspiracy [J]. Cardiol Clin, 2022, 40(2): 171-82.
- [4] SŁONINA G, ZEMLEDUCH T, KIMLA P, et al. Is it time for the practical application of biomarkers in chronic heart failure management [J]? Pol Merkur Lekarski, 2022, 50(296): 73-7.
- [5] YANG H, WANG Y, XU S, et al. Hesperetin, a promising treatment option for diabetes and related complications: a literature review [J]. J Agric Food Chem, 2022, 70(28): 8582-92.
- [6] VELUSAMY P, MOHAN T, RAVI D B, et al. Targeting the Nrf2/ARE signalling pathway to mitigate isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: plausible role of hesperetin in redox homeostasis [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020(9): 9568278.
- [7] ZENG C, SHAO Z, WEI Z, et al. The NOTCH-HES-1 axis is involved in promoting Th22 cell differentiation [J]. Cell Mol Biol Lett, 2021, 26(1): 7-21.
- [8] 王长宗, 洪玲玲, 陈怡园. 依达拉奉调节Notch/Hes-1信号通路对慢性心力衰竭大鼠心肌损伤的影响 [J]. 解剖学报 (WANG C Z, HONG L L, CHEN Y Y. Effect of edaravone on myocardial injury in rats with chronic heart failure by regulating Notch/Hes-1 signaling pathway [J]. Chinese Journal of Anatomy, 2025, 56(1): 95-104.
- [9] 郭冰, 毛以林, 余意, 等. 基于lncGAS5/DNMT3A通路探讨心康冲剂对慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响 [J]. 中华中医药学刊 (GUO B, MAO Y L, YU Y, et al. Investigation into the influence of xinkang granules on myocardial fibrosis in rats with chronic heart failure based on the lncGAS5/DNMT3A pathway [J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2024, 42(3): 82-6.
- [10] 霍雨佳, 阳远舟, 邹成丽, 等. 汉黄芩素调节Hippo/YAP信号通路对慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志 (HUO Y J, YANG Y Z, ZOU C L, et al. Effects of wogonin on myocardial fibrosis in rats with chronic heart failure by regulating Hippo/YAP signaling pathway [J]. Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Cardio-Cerebrovascular Disease, 2024, 22(15): 2740-5.
- [11] 左新华, 朱光旭, 刘岩. 橙皮素通过调控SIRT1/PGC-1 α 信号通路保护急性心肌梗死大鼠 [J]. 中国病理生理杂志 (ZUO X H, ZHU G X, LIU Y. Hesperetin protects rats with acute myocardial infarction by regulating SIRT1/PGC-1 α signaling pathway [J]. Chin J Pathophysiology, 2021, 37(5): 928-33.
- [12] ROGER V L. Epidemiology of heart failure: a contemporary perspective [J]. Circ Res, 2021, 128(10): 1421-34.
- [13] MCLELLAN M A, SKELLY D A, DONA M S I, et al. High-resolution transcriptomic profiling of the heart during chronic stress reveals cellular drivers of cardiac fibrosis and hypertrophy [J]. Circulation, 2020, 142(15): 1448-63.
- [14] HU J R, SCHWANN A N, TAN J W, et al. Sequencing quadruple therapy for heart failure with reduced ejection fraction: does it really matter [J]? Heart Fail Clin, 2024, 20(4): 373-86.
- [15] LIU P, LI J, LIU M, et al. Hesperetin modulates the Sirt1/Nrf2 signaling pathway in counteracting myocardial ischemia through suppression of oxidative stress, inflammation, and apoptosis [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 139(7): 111552-60.
- [16] 胡亚丽, 张鹏鹏, 冯超, 等. 藏红花素对慢性心力衰竭大鼠心肌损伤和能量代谢的影响 [J]. 中华老年心脑血管病杂志 (HU Y L, ZHANG P P, FENG C, et al. Effect of crocin on myocardial injury and energy metabolism in rats with chronic heart failure [J]. Chinese Journal of Geriatric Cardio-Cerebrovascular Disease, 2023, 25(12): 1364-8.
- [17] NEFF L S, BRADSHAW A D. Cross your heart? Collagen cross-links in cardiac health and disease [J]. Cell Signal, 2021, 79(3): 109889-95.
- [18] 阮丹, 黄磊, 任凤娟, 等. 柚皮素对慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化及激活素A/卵泡抑素系统的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化 (RUAN D, HUANG L, REN F J, et al. Effects of naringenin on myocardial fibrosis and activin A/follistatin system

- in rats with chronic heart failure [J]. World Science and Technology-Traditional Chinese Medicine Modernization, 2024, 26(3): 751-7.
- [19] PENG X, WANG S, CHEN H, et al. Role of the notch1 signaling pathway in ischemic heart disease (review) [J]. Int J Mol Med, 2023, 51(3): 27-39.
- [20] ZHOU W W, DAI C, LIU W Z, et al. Gentianella acuta improves TAC-induced cardiac remodelling by regulating the notch and PI3K/Akt/FOXO1/3 pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 154(10): 113564-74.
- [21] WEI M, LU Z, ZHANG H, et al. Aspirin and celecoxib regulate Notch1/Hes1 pathway to prevent pressure overload-induced myocardial hypertrophy [J]. Int Heart J, 2024, 65(3): 475-86.