

# 丹参酮 II A 通过半乳糖凝集素 -3 抑制心肌重塑的机制研究

张美齐 程抗 余利美 吴微华 王亚坤 陈云

浙江中医药大学附属杭州市中医院丁桥院区重症医学科, 杭州 310021

通信作者: 陈云, Email: 1134586451@qq.com

**【摘要】 目的** 分析丹参酮 II A 对缺血/再灌注(I/R)所致心力衰竭(心衰)模型大鼠心肌重构的影响。**方法** ① 体内实验: 将 30 只健康雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组、心衰模型组和丹参酮 II A 组, 每组 10 只。采用结扎大鼠左冠状动脉(冠脉)待心电图监护出现明显 ST 段抬高 30 min 后放松结扎线进行再灌注 2 h 来制备 I/R 后心衰模型; 假手术组于同期开胸, 仅丝线绕过左冠脉而不结扎。丹参酮 II A 组术后 3 d 开始腹腔注射丹参酮 II A 10 mg/kg, 连续用药 9 周; 其他两组于同期腹腔注射等量生理盐水。干预 9 周后观察各组大鼠的行为学表现, 检测血流动力学相关指标。处死大鼠取心脏组织, Masson 染色后光镜下观察心肌组织纤维化程度; 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测半乳糖凝集素 -3(Galectin-3)含量; 采用荧光定量反转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 I 型胶原、III 型胶原、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)的 mRNA 表达; 采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测 MMP-2 和 TIMP-1 的蛋白表达。② 体外实验: 提取并分离大鼠的原代心肌成纤维细胞, 分为空白对照组、血管紧张素 II 组(给予 7~10 mmol/L 血管紧张素 II)和血管紧张素 II + 丹参酮 II A 组(同时给予 7~10 mmol/L 血管紧张素 II + 5~10 mmol/L 丹参酮 II A)。分别于培养 24 h 和 48 h 时, 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)检测细胞吸光度(A)值并计算细胞增殖率; 采用 qRT-PCR 法检测 I 型胶原、III 型胶原、MMP-2 和 TIMP-1 的 mRNA 表达; 采用 ELISA 法检测 Galectin-3 含量。**结果** ① 体内实验: 大鼠活动状态、毛发顺帖程度及进食量由好到差依次为假手术组、丹参酮 II A 组和心衰模型组。与假手术组相比, 心衰模型组大鼠心率(HR)明显下降、心功能明显受损, I 型胶原、III 型胶原、TIMP-1 的 mRNA 和蛋白表达及 Galectin-3 含量均明显升高, MMP-2 的 mRNA 和蛋白表达均明显降低。与心衰模型组相比, 丹参酮 II A 组大鼠 HR 明显升高、心功能明显改善, I 型胶原、III 型胶原的 mRNA 表达均明显降低, TIMP-1 的 mRNA 和蛋白表达及 Galectin-3 含量均明显降低, MMP-2 的 mRNA 和蛋白表达均明显升高, 以制模 9 周变化最为明显 [I 型胶原 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $4.70 \pm 1.19$  比  $10.21 \pm 1.62$ , III 型胶原 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $3.03 \pm 0.46$  比  $13.84 \pm 1.93$ , TIMP-1 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $1.90 \pm 0.19$  比  $4.55 \pm 0.43$ , TIMP-1/GAPDH:  $0.33 \pm 0.04$  比  $0.67 \pm 0.05$ , Galectin-3 (ng/L):  $489.93 \pm 79.30$  比  $821.72 \pm 94.09$ , MMP-2 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $0.37 \pm 0.07$  比  $0.03 \pm 0.01$ , MMP-2/GAPDH:  $0.69 \pm 0.09$  比  $0.21 \pm 0.04$ , 均  $P < 0.05$ ]。Masson 染色显示, 心衰模型组大鼠心肌组织出现明显纤维化, 而丹参酮 II A 干预能够改善大鼠心肌组织的纤维化。② 体外实验: 与空白对照组相比, 血管紧张素 II 组培养 24 h 和 48 h 心肌成纤维细胞增殖率、I 型胶原、III 型胶原和 TIMP-1 表达及 Galectin-3 含量均明显升高, MMP-2 表达明显降低。与血管紧张素 II 组相比, 血管紧张素 II + 丹参酮 II A 组心肌成纤维细胞增殖率及 I 型胶原、III 型胶原和 TIMP-1 表达及 Galectin-3 含量均明显降低, MMP-2 mRNA 表达明显升高, 以培养 48 h 改变最明显 [细胞增殖率: ( $57.0 \pm 3.7$ )% 比 ( $67.0 \pm 2.4$ )%, I 型胶原 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $551.43 \pm 67.10$  比  $871.48 \pm 12.25$ , III 型胶原 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $233.76 \pm 18.73$  比  $385.51 \pm 31.35$ , TIMP-1 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $238.69 \pm 17.37$  比  $351.84 \pm 26.17$ , Galectin-3 (ng/L):  $283.76 \pm 28.73$  比  $415.51 \pm 31.35$ , MMP-2 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $108.54 \pm 12.10$  比  $51.47 \pm 6.25$ , 均  $P < 0.05$ ]。**结论** 丹参酮 II A 可以改善 I/R 后心衰大鼠的心功能, 抑制心肌纤维化, 改善心衰大鼠的心肌重构。

**【关键词】** 丹参酮 II A; 半乳糖凝集素 -3; 心肌重构; 心肌纤维化

**基金项目:** 浙江省中医药管理局重点项目(2018ZZ001)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220309-00232

## Mechanism of tanshinone II A inhibiting myocardial remodeling by Galectin-3

Zhang Meiqi, Cheng Kang, Yu Limei, Wu Weihua, Wang Yakun, Chen Yun

Hangzhou Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310021, Zhejiang, China

Corresponding author: Chen Yun, Email: 1134586451@qq.com

**【Abstract】 Objective** To explore the effect of tanshinone II A on myocardial remodeling in ischemia/reperfusion (I/R)-induced heart failure of rodent model. **Methods** ① *In vivo*, 30 SD rats were randomly divided into sham operation, heart failure and tanshinone II A treatment group, with 10 rats in each group. The I/R model was established by ligating the left coronary artery until ST segment elevation for 30 minutes, then the ligation was removed for 2 hours as reperfusion. In the sham operation group, the rat chest was opened without artery ligation. Three days

after model establishment, tanshinone II A (10 mg/kg) were given intraperitoneal injected in tanshinone II A group for 9 weeks. In the other two groups, normal saline was administrated in the same way. The behavioral manifestations of the rats in each group were observed; hemodynamic indexes were evaluated; Masson staining was performed to observe the degree of myocardial fibrosis; enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the content of Galectin-3 in myocardial tissue; quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expressions of collagen III, collagen I, matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1). ② *In vitro*, rats primary cardiac fibroblasts were extracted and isolated, and divided into blank control group, angiotensin II group (7–10 mmol/L angiotensin II) and angiotensin II + tanshinone II A group (7–10 mmol/L angiotensin II + 5–10 mmol/L tanshinone II A). At 24 hours and 48 hours of culture, the cell proliferation in each group was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT); the expressions of collagen III, collagen I, MMP-2 and TIMP-1 were detected by qRT-PCR; the content of Galectin-3 in cardiac fibroblasts was detected by ELSIA. **Results** ① *In vivo*, the rats' activity status, hair conformity and food intake were ranked from good to bad in order of sham operation group, tanshinone II A group and heart failure model group. Compared with the sham-operated group, the heart rate (HR) of the rats in the heart failure model group was significantly decreased and the heart function was significantly impaired. The mRNA and protein expression of collagen I, collagen III, TIMP-1 and Galectin-3 content were significantly increased, while the mRNA and protein expression of MMP-2 were significantly decreased. Compared with the heart failure model group, rats in the tanshinone II A group showed significantly higher HR and improved cardiac function, significantly lower mRNA expression of collagen I and collagen III, significantly lower mRNA and protein expression of TIMP-1 and Galectin-3, and significantly higher mRNA and protein expression of MMP-2, and the most obvious changes were in the 9th weeks of modeling [collagen I mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $4.70 \pm 1.19$  vs.  $10.21 \pm 1.62$ , collagen III mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $3.03 \pm 0.46$  vs.  $13.84 \pm 1.93$ , TIMP-1 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $1.90 \pm 0.19$  vs.  $4.55 \pm 0.43$ , TIMP-1/GAPDH:  $0.33 \pm 0.04$  vs.  $0.67 \pm 0.05$ , Galectin-3 (ng/L):  $489.93 \pm 79.30$  vs.  $821.72 \pm 94.09$ , MMP-2 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $0.37 \pm 0.07$  vs.  $0.03 \pm 0.01$ , MMP-2/GAPDH:  $0.69 \pm 0.09$  vs.  $0.21 \pm 0.04$ , all  $P < 0.05$ ]. Masson staining showed that myocardial tissue fibrosis was obvious in the heart failure group, and the degree of fibrosis in the tanshinone II A group was reduced. ② *In vitro*, compared with the blank control group, the proliferation rate, collagen I, collagen III and TIMP-1 expression and Galectin-3 content of myocardial fibroblasts were significantly increased, and MMP-2 expression was significantly decreased in the angiotensin group at 24 h and 48 h of culture. Compared with the angiotensin group, the proliferation rate of cardiac fibroblasts and the expression of collagen I, collagen III and TIMP-1 and the content of Galectin-3 were significantly decreased, and the expression of MMP-2 mRNA was significantly increased in the angiotensin + tanshinone II A group, and the most significant changes were at 48 hours of culture [proliferation rate:  $(57.0 \pm 3.7)\%$  vs.  $(67.0 \pm 2.4)\%$ , collagen I mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $551.43 \pm 67.10$  vs.  $871.48 \pm 12.25$ , collagen III mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $233.76 \pm 18.73$  vs.  $385.51 \pm 31.35$ , TIMP-1 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $238.69 \pm 17.37$  vs.  $351.84 \pm 26.17$ , Galectin-3 (ng/L):  $283.76 \pm 28.73$  vs.  $415.51 \pm 31.35$ , MMP-2 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $108.54 \pm 12.10$  vs.  $51.47 \pm 6.25$ , all  $P < 0.05$ ]. **Conclusion** Tanshinone II A can improve cardiac function, inhibit myocardial fibrosis and improve myocardial remodeling in rats with I/R-induced heart failure.

**[Key words]** Tanshinone II A; Galectin-3; Myocardial remodeling; Fibrosis

**Fund program:** Zhejiang Administration of traditional Chinese Medicine (2018ZZ001)

DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20220309-00232

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)为各种心脏病的严重阶段,而心肌重塑是心力衰竭(心衰)发生发展的重要病理基础,是心功能由代偿向失代偿演变的关键步骤<sup>[1-3]</sup>。CHF的治疗目标不仅仅是改善症状、提高生活质量,更重要的是针对心肌重构机制,防止和延缓心肌重构的发展。

中医认为心气虚是CHF的基本病机之一,贯穿CHF的始终,是疾病发展和恶化的重要因素<sup>[4]</sup>。丹参作为我国的传统中药,具有药理学效应广泛、价格低廉、不良反应少等优点<sup>[5]</sup>。丹参酮II A是从丹参中提取的一种脂溶性成分,具有抗缺氧、改善微循环、改善血液流变学特性、舒张冠状动脉(冠脉),减轻心肌缺血等多种药理作用<sup>[6-7]</sup>。本研究通过建立缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)后CHF大鼠模型,评价丹参酮II A对CHF血流动力学以及心肌重构的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 体内实验

**1.1.1 实验动物分组及I/R后心衰模型制备和干预:**将30只6周龄健康雄性SD大鼠用随机数字表法分为假手术组、心衰模型组和丹参酮II A组,每组10只。戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,经气管插管连接小动物呼吸机(频率80次/min,潮气量1.6 mL/g,吸呼比1:2);胸导联行十二导联心电图监护;结扎左冠脉,阻断冠脉血流30 min,放松结扎线再灌注2 h,制备I/R损伤导致的心衰模型。待大鼠状态平稳后停止机械通气;术后记录大鼠十二导联心电图;青霉素 $40 \times 10^4$  U + 生理盐水1 mL腹腔注射持续3 d以预防感染。假手术组只开胸将丝线绕过左冠脉后打松结不结扎。丹参酮II A组于术后3 d腹腔注射丹参酮II A 10 mg/kg,连续用药9周;假手术组和心衰模型组于同期腹腔注射等量生理盐水。

**1.1.2 行为学观察:**观察各组大鼠活动、进食、睡眠、精神状态、皮毛及存活情况。

**1.1.3 血流动力学监测:**在用药9周后麻醉大鼠,经右颈总动脉行左心室插管接8道生理记录仪,记录左心室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)、左心室内压最大上升和下降速率(maximum rate of rise and fall of LV pressure,  $\pm dp/dt \max$ )、左室舒张期末压(left ventricular end diastolic pressure, LVEDP);经腹主动脉插管记录动脉收缩压(systolic blood pressure, SBP)和舒张压(diastolic blood pressure, DBP);同步记录心率(heart rate, HR)。

**1.1.4 采用 Masson 染色观察心肌组织纤维改变:**完成血流动力学监测后处死大鼠,取部分心脏组织用4%甲醛溶液固定,Masson 染色,光镜下观察心肌组织纤维染色情况。

**1.1.5 采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定心肌组织半乳糖凝集素-3(Galectin-3)含量:**完成血流动力学监测后处死大鼠取部分心脏组织制备匀浆,取上清检测 Galectin-3 含量,操作按照 ELISA 试剂盒说明书。

**1.1.6 采用荧光定量反转录-聚合酶链反应(quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测心肌组织中 I 型胶原、III 型胶原、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、基质金属蛋白酶抑制剂-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)的表达:**取部分心肌组织,采用 TRIzol 试剂分离总 RNA,用 SureScript 试剂盒反转录得到 cDNA,之后使用微小 RNA(microRNA, miRNA) qRT-PCR 检测试剂盒检测 I 型胶原、III 型胶原、MMP-2 和 TIMP-1 mRNA 表达,用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各基因的相对表达量。

**1.1.7 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测心肌组织中 MMP-2 和 TIMP-1 蛋白表达:**取部分心肌组织匀浆液,用 BCA 法检测蛋白含量,加上样缓冲液后煮沸,经上样、转膜、封闭 2 h、加入一抗二抗洗膜后,用电化学发光(electrochemiluminescent immunoassay, ECL)法显像,采用 Image J 软件分析灰度值。以目的蛋白与内参 GAPDH 的灰度值比值作为 MMP-2 和 TIMP-1 蛋白表达量。

## 1.2 体外实验

**1.2.1 原代心肌成纤维细胞分离:**取出生 1 d SD 大鼠的心脏,加入消化液消化心脏组织,差速离心筛选出心肌成纤维细胞,单独对心肌成纤维细胞进行培养。

**1.2.2 心肌成纤维细胞处理及分组:**收集心肌成纤维细胞,配置悬液以每孔  $1 \times 10^4$  个铺于 96 孔培养板,血管紧张素 II 组加入终浓度为 7~10 mmol/L 的血管紧张素 II,血管紧张素 II + 丹参酮 II A 组加入终浓度为 7~10 mmol/L 的血管紧张素 II 和终浓度为 5~10 mmol/L 的丹参酮 II A,培养 24 h 或 48 h 后用于后续实验。

**1.2.3 四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)法检测心肌成纤维细胞增殖情况:**收集心肌成纤维细胞,用 10% FBS 的 DMEM 培养液配成单个细胞悬液,每孔  $1 \times 10^4$  个铺于 96 孔培养板,处理细胞后每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20  $\mu$ L 孵育 4 h,吸取培养液,每孔加入二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO) 150  $\mu$ L,振荡 10 min,用 490 nm 出酶标仪检测吸光度(absorbance, A)值,计算细胞增殖率。

**1.2.4 qRT-PCR 检测 I 型胶原、III 型胶原、TIMP-1 和 TIMP-2 的 mRNA 表达:**按照上述 qRT-PCR 方法检测各组大鼠心肌成纤维细胞中 I 型胶原、III 型胶原、TIMP-1 和 TIMP-2 的 mRNA 表达。

**1.3 统计学分析:**采用 SPSS 17.0 统计软件包分析数据。计量资料符合正态分布,以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用重复测量数据的方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 体内实验

**2.1.1 行为学观察:**假手术组大鼠活动较多,毛发呈白色,顺帖有光泽,进食正常;心衰模型组大鼠活动很少,毛发枯黄倒竖,精神萎靡,进食很少;丹参酮 II A 组干预后大鼠活动较少,进食量介于假手术组与心衰模型组之间,部分毛发呈白色,无光泽、较顺帖,部分毛发枯黄倒竖。

**2.1.2 血流动力学监测(表 1):**与假手术组相比,心衰模型组大鼠 HR 明显下降,心功能明显受损(均  $P < 0.05$ );经丹参酮 II A 干预后,大鼠 HR 明显升高,心功能得到明显改善(均  $P < 0.05$ )。

**2.1.3 心肌组织病理学改变(图 1):**心衰模型组大鼠心肌组织出现明显纤维化,而丹参酮 II A 干预能够改善大鼠心肌组织的纤维化。

**2.1.4 心肌组织 I 型胶原、III 型胶原、MMP-2 和 TIMP-1 mRNA 表达(表 2):**与假手术组相比,心衰模型组大鼠制模 3 周和 9 周 I 型胶原、III 型胶原和 TIMP-1 mRNA 表达均明显升高, MMP-2 mRNA 表

表1 各组大鼠血流动力学监测指标比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	HR (次/min)	LVSP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	+dP/dt max	-dP/dt max	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)
假手术组	10	593.2 ± 55.48	131.53 ± 17.85	3.26 ± 1.04	5 296.36 ± 417.39	4 042.91 ± 413.64	116.74 ± 18.04	85.58 ± 7.88
心衰模型组	10	349.2 ± 41.09 <sup>a</sup>	84.55 ± 9.59 <sup>a</sup>	13.29 ± 3.89 <sup>a</sup>	3 122.45 ± 388.07 <sup>a</sup>	2 282.92 ± 252.62 <sup>a</sup>	180.38 ± 30.19 <sup>a</sup>	136.76 ± 14.80 <sup>a</sup>
丹参酮II A组	10	451.5 ± 36.74 <sup>b</sup>	106.74 ± 9.55 <sup>b</sup>	9.25 ± 2.36 <sup>b</sup>	4 015.83 ± 478.95 <sup>b</sup>	2 884.89 ± 366.10 <sup>b</sup>	141.02 ± 18.32 <sup>b</sup>	110.36 ± 9.88 <sup>b</sup>

注: I/R 为缺血/再灌注, HR 为心率, LVSP 为左心室收缩压, LVEDP 为左心室舒张期末压, +dP/dt max 为最大上升速率, -dP/dt max 为最大下降速率, SBP 为收缩压, DBP 为舒张压; 与假手术组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与 I/R 后心衰模型组比较, <sup>b</sup>*P* < 0.05; 1 mmHg ≈ 0.133 kPa

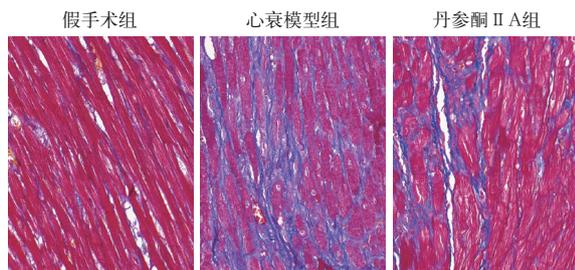


图1 光镜下观察各组大鼠心肌组织病理学改变 蓝色部分为纤维化产生的区域; 假手术组几乎无明显纤维化; 缺血/再灌注(I/R)所致心衰模型组心肌组织产生明显纤维化及胶原沉积; 丹参酮II A组心肌组织的纤维化程度及胶原沉积较心衰模型组明显降低 Masson染色 中倍放大

达明显降低(均 *P* < 0.05); 经丹参酮II A 干预后, 大鼠I型胶原、III型胶原和TIMP-1 mRNA 表达均明显降低, 而MMP-2 mRNA 表达明显升高(均 *P* < 0.05)。

表2 各组大鼠制模各时间点心肌组织I型胶原、III型胶原、MMP-2和TIMP-1 mRNA 表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	I型胶原(2 <sup>-ΔΔCt</sup> )		III型胶原(2 <sup>-ΔΔCt</sup> )	
		制模3周	制模9周	制模3周	制模9周
假手术组	10	1.12 ± 0.54	1.03 ± 0.24	1.45 ± 0.57	1.51 ± 0.60
心衰模型组	10	12.07 ± 1.42 <sup>a</sup>	10.21 ± 1.62 <sup>a</sup>	15.34 ± 1.59 <sup>a</sup>	13.84 ± 1.93 <sup>a</sup>
丹参酮II A组	10	6.80 ± 0.69 <sup>b</sup>	4.70 ± 1.19 <sup>b</sup>	7.64 ± 2.08 <sup>b</sup>	3.03 ± 0.46 <sup>b</sup>

组别	动物数 (只)	MMP-2(2 <sup>-ΔΔCt</sup> )		TIMP-1(2 <sup>-ΔΔCt</sup> )	
		制模3周	制模9周	制模3周	制模9周
假手术组	10	0.96 ± 0.15	0.86 ± 0.15	1.06 ± 0.13	0.91 ± 0.13
心衰模型组	10	0.05 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>a</sup>	4.83 ± 0.62 <sup>a</sup>	4.55 ± 0.43 <sup>a</sup>
丹参酮II A组	10	0.16 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.37 ± 0.07 <sup>b</sup>	2.73 ± 0.31 <sup>b</sup>	1.90 ± 0.19 <sup>b</sup>

注: MMP-2 为基质金属蛋白酶-2, TIMP-1 为基质金属蛋白酶抑制剂-1; 与假手术组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与心衰模型组比较, <sup>b</sup>*P* < 0.05

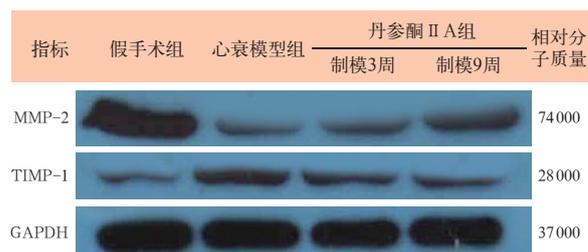
2.1.5 心肌组织 Galectin-3 含量(表3): 与假手术组相比, 心衰模型组大鼠制模3周和9周 Galectin-3 含量均明显升高(*P* < 0.05); 经丹参酮II A 干预后, Galectin-3 含量明显下降, 且随时间延长下降越明显(*P* < 0.05)。

表3 各组大鼠制模各时间点心肌组织 Galectin-3 含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	Galectin-3 (ng/L)	
		制模3周	制模9周
假手术组	10	326.42 ± 47.47	305.79 ± 34.80
心衰模型组	10	897.35 ± 93.10 <sup>a</sup>	821.72 ± 94.09 <sup>a</sup>
丹参酮II A组	10	604.99 ± 62.88 <sup>b</sup>	489.93 ± 79.30 <sup>b</sup>

注: Galectin-3 为半乳糖凝集素-3, 与假手术组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与 I/R 后心衰模型组比较, <sup>b</sup>*P* < 0.05

2.1.6 心肌组织 MMP-2 和 TIMP-1 蛋白表达(图2; 表4): 与假手术组相比, 心衰模型组大鼠 MMP-2 蛋白表达降低, TIMP-1 蛋白表达升高; 丹参酮II A 干预后, MMP-2 蛋白表达升高, TIMP-1 蛋白表达降低。



MMP-2 为基质金属蛋白酶-2, TIMP-1 为基质金属蛋白酶抑制剂-1, GAPDH 为3-磷酸甘油醛脱氢酶

图2 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组大鼠心肌组织 MMP-2 和 TIMP-1 的蛋白表达

表4 各组大鼠 MMP-2 和 TIMP-1 的蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	MMP-2/ GAPDH	TIMP-1/ GAPDH
假手术组	10	1.21 ± 0.17	0.24 ± 0.04
心衰模型组	10	0.21 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.05 <sup>a</sup>
丹参酮II A组	制模3周	0.36 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.48 ± 0.04 <sup>b</sup>
	制模9周	0.69 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.33 ± 0.04 <sup>b</sup>

注: MMP-2 为基质金属蛋白酶-2, TIMP-1 为基质金属蛋白酶抑制剂-1, GAPDH 为3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与假手术组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与心衰模型组比较, <sup>b</sup>*P* < 0.05

## 2.2 体外实验

2.2.1 细胞增殖率(表5): 与空白对照组相比, 血管紧张素II组培养24h和48h心肌成纤维细胞增殖率均明显升高; 而加入丹参酮II A 后心肌成纤维细胞增殖率则明显降低(均 *P* < 0.05)。

表5 各组大鼠心肌成纤维细胞培养24h和48h的细胞增殖率比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数 (孔)	细胞增殖率(%)	
		培养24h	培养48h
空白对照组	10	34.0 ± 3.0	47.0 ± 8.2
血管紧张素II组	10	66.0 ± 3.6 <sup>a</sup>	67.0 ± 2.4 <sup>a</sup>
血管紧张素II + 丹参酮II A组	10	53.0 ± 2.6 <sup>b</sup>	57.0 ± 3.7 <sup>b</sup>

注: 与空白对照组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与血管紧张素II组比较, <sup>b</sup>*P* < 0.05

表6 各组大鼠心肌成纤维细胞培养24h和48h的I型胶原、III型胶原、MMP-2和TIMP-1 mRNA表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数 (孔)	I型胶原(2 <sup>-ΔΔCt</sup> )		III型胶原(2 <sup>-ΔΔCt</sup> )		MMP-2(2 <sup>-ΔΔCt</sup> )		TIMP-1(2 <sup>-ΔΔCt</sup> )	
		培养24h	培养48h	培养24h	培养48h	培养24h	培养48h	培养24h	培养48h
空白对照组	10	238.42±35.78	233.99±26.02	120.25±15.62	118.37±11.03	127.38±15.78	131.47±16.02	89.42±11.43	92.34±10.53
血管紧张素II组	10	685.38±11.44 <sup>a</sup>	871.48±12.25 <sup>a</sup>	314.65±22.92 <sup>a</sup>	385.51±31.35 <sup>a</sup>	63.53±8.44 <sup>a</sup>	51.47±6.25 <sup>a</sup>	267.54±27.34 <sup>a</sup>	351.84±26.17 <sup>a</sup>
血管紧张素II+丹参酮II A组	10	401.47±10.11 <sup>b</sup>	551.43±67.10 <sup>b</sup>	189.92±15.55 <sup>b</sup>	233.76±18.73 <sup>b</sup>	96.45±10.11 <sup>b</sup>	108.54±12.10 <sup>b</sup>	156.76±9.45 <sup>b</sup>	238.69±17.37 <sup>b</sup>

注:TMMP-2为基质金属蛋白酶-2,IMP-1为基质金属蛋白酶抑制剂-1;与空白对照组比较,<sup>a</sup>P<0.05;与血管紧张素II组比较,<sup>b</sup>P<0.05

**2.2.2 I型胶原、III型胶原、MMP-2和TIMP-1 mRNA表达(表6):**与空白对照组相比,血管紧张素II组培养24h和48h心肌成纤维细胞I型胶原、III型胶原和TIMP-1 mRNA表达均明显升高,MMP-2 mRNA表达明显降低(均P<0.05);而加入丹参酮II A后心肌成纤维细胞I型胶原、III型胶原和TIMP-1 mRNA表达明显下降,MMP-2 mRNA表达明显升高(均P<0.05)。

**2.2.3 Galectin-3含量(表7):**与空白对照组相比,血管紧张素II组培养24h和48h心肌成纤维细胞Galectin-3含量均明显升高,而加入丹参酮II A后Galectin-3含量均明显下降(均P<0.05)。

表7 各组大鼠心肌成纤维细胞培养24h和48h的Galectin-3含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数 (孔)	Galectin-3 (ng/L)	
		培养24h	培养48h
空白对照组	10	120.25±15.62	118.37±11.03
血管紧张素II组	10	354.65±32.92 <sup>a</sup>	415.51±31.35 <sup>a</sup>
血管紧张素II+丹参酮II A组	10	249.92±25.55 <sup>b</sup>	283.76±28.73 <sup>b</sup>

注:Galectin-3为半乳糖凝集素-3;与空白对照组比较,<sup>a</sup>P<0.05;与血管紧张素II组比较,<sup>b</sup>P<0.05

### 3 讨论

本研究首先通过建立I/R诱导的心衰大鼠模型评价丹参酮II A对心衰的治疗作用,结果显示,丹参酮II A可以显著改善大鼠心功能,减轻心肌组织纤维化。随后,本研究建立血管紧张素II诱导的心肌纤维化细胞损伤模型,提示丹参酮II A能够抑制由血管紧张素II诱导的心肌成纤维细胞增殖。

从丹参中提取的丹参酮II A为含有雌激素环(即植物雌激素)的植物源性分子,因其对炎症和心肌肥大的抑制作用、对自由基的清除剂活性和舒张血管的潜力而被广泛研究<sup>[8]</sup>。本研究进一步确定了丹参酮II A在心血管疾病治疗中的作用。

研究表明,丹参酮II A能够通过Toll样受体4/髓样分化因子88/核转录因子-κB(Toll-like receptor

4/myeloid differentiation factor 88/nuclear factor-κB, TLR4/MyD88/NF-κB)信号通路调节心肌梗死导致的左心室重构<sup>[9]</sup>。丹参酮II A抑制心室重构的功能可能是通过抑制炎症和心肌细胞凋亡实现的<sup>[10]</sup>,也能够通过上调沉默信息调节子1(silence information regulator 1, SIRT1)表达实现抑制心肌重塑<sup>[11]</sup>。本研究在明确丹参酮II A的药理学作用后,也开始探寻其分子作用机制。

Galectin-3是糖类结合蛋白半乳糖凝集素家族的成员,该蛋白质家族成员对β-半乳糖苷有亲和力,编码的蛋白质具有1个N端富含脯氨酸的串联重复结构域和1个C端碳水化合物识别结构域,可以通过N端结构域自结合,从而与多价糖配体结合。从机制方面,体外Galectin-3将静止的成纤维细胞转化为肌成纤维细胞,产生和分泌基质蛋白,包括胶原蛋白、纤维连接蛋白和转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)<sup>[12]</sup>。Sharma等<sup>[13]</sup>发现,在体内Galectin-3和巨噬细胞共同定位于高血压大鼠纤维化区域的成纤维细胞。Li等<sup>[14]</sup>再次证明,在高血压大鼠中,干扰Galectin-3可以防止心肌纤维化,并证实Galectin-3与α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)染色有关。然而,目前还没有关于丹参酮II A与Galectin-3之间是否有调控关系的报道。本研究显示,丹参酮II A能够抑制心肌组织及心肌成纤维细胞内Galectin-3的表达,从而抑制心肌重塑。

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是一种动态结构,对控制心脏重塑至关重要。ECM内胶原的分解、重建、剪裁和塑形(重塑)之间存在微妙的生理平衡,由锌依赖性氧化还原敏感内肽酶家族MMPs维持和控制。而TIMP能够绑定MMPs并阻断其活性位点,以防止其与底物反应。为探究丹参酮II A能否影响ECM,本研究检测MMP-2和TIMP-1的mRNA和蛋白表达,结果显示,丹参酮II A能够促进MMP-2表达,抑制TIMP1表达<sup>[15]</sup>。这又

是一个全新的发现。

Poller 等<sup>[16]</sup>研究表明,非编码基因组在发育过程中的基因编程和基因调控以及在健康和心血管疾病中起着关键作用,约 99% 的人类基因组不编码蛋白质,但具有转录活性,代表着具有重要调节和结构功能的 lncRNA。苏彤等<sup>[17]</sup>研究也发现,循环 miRNA-1 可能具备早期诊断对稳定型冠心病患者发生冠状动脉斑块破裂的潜力。因此非编码 RNA 被确定为心血管疾病及其他慢性疾病的危险因素和细胞功能的关键新型调节因子,是改善诊断和预后评估的重要指标<sup>[18]</sup>,我们会在将来的研究中进一步探索丹参酮 II A 调控非编码 RNA 的作用和机制。

本研究通过体内外实验证实了丹参酮 II A 能够抑制心肌纤维化,抑制心肌纤维化细胞的增殖能力,并从分子层面揭示了丹参酮 II A 抑制 Galectin-3 表达的机制。更多关于丹参酮 II A 作用机制的研究还有待进一步发掘,这一发现拓宽了人们对于丹参酮 II A 分子作用机制的认识,为更好地利用丹参酮 II A 奠定了理论基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Ewen S, Nikolovska A, Zivanovic I, et al. Chronic heart failure—new insights [J]. Dtsch Med Wochenschr, 2016, 141 (21): 1560–1564. DOI: 10.1055/s-0042-102706.
- [2] 柴军武. 心脏移植供心热灌注维护系统研究进展 [J/CD]. 实用器官移植电子杂志, 2017, 5 (3): 220–222. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2017.03.011.
- [3] Rogers C, Bush N. Heart failure: pathophysiology, diagnosis, medical treatment guidelines, and nursing management [J]. Nurs Clin North Am, 2015, 50 (4): 787–799. DOI: 10.1016/j.cnur.2015.07.012.
- [4] 吴昱杰, 刘建勋. 益气活血中药改善慢性心衰气虚证作用机制研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37 (1): 234–239.
- [5] Subedi L, Gaire BP. Tanshinone II A: a phytochemical as a promising

- drug candidate for neurodegenerative diseases [J]. Pharmacol Res, 2021, 169: 105661. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.105661.
- [6] Zhong CH, Lin Z, Ke LY, et al. Recent research progress (2015–2021) and perspectives on the pharmacological effects and mechanisms of Tanshinone II A [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 778847. DOI: 10.3389/fphar.2021.778847.
- [7] Fang ZY, Zhang M, Liu JN, et al. Tanshinone II A: a review of its anticancer effects [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 611087. DOI: 10.3389/fphar.2020.611087.
- [8] 吴茂林, 翟昌林, 张亚梅, 等. 丹参酮 II A 对急性心肌梗死大鼠 S100A1 蛋白表达的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 26 (5): 350–353. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.05.008.
- [9] Wu DM, Wang YJ, Han XR, et al. Tanshinone II A prevents left ventricular remodelling via the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signalling pathway in rats with myocardial infarction [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22 (6): 3058–3072. DOI: 10.1111/jcmm.13557.
- [10] Li X, Xiang DK, Shu YZ, et al. Mitigating effect of tanshinone II A on ventricular remodeling in rats with pressure overload-induced heart failure [J]. Acta Cir Bras, 2019, 34 (8): e201900807. DOI: 10.1590/s0102-86502019008000007.
- [11] Feng J, Li SS, Chen HW. Tanshinone II A inhibits myocardial remodeling induced by pressure overload via suppressing oxidative stress and inflammation: possible role of silent information regulator 1 [J]. Eur J Pharmacol, 2016, 791: 632–639. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.09.041.
- [12] Suthahar N, Meijers WC, Silljé HHW, et al. Galectin-3 activation and inhibition in heart failure and cardiovascular disease: an update [J]. Theranostics, 2018, 8 (3): 593–609. DOI: 10.7150/thno.22196.
- [13] Sharma UC, Mosleh W, Chaudhari MR, et al. Myocardial and serum galectin-3 expression dynamics marks post-myocardial infarction cardiac remodelling [J]. Heart Lung Circ, 2017, 26 (7): 736–745. DOI: 10.1016/j.hlc.2016.11.007.
- [14] Li TZ, Zha LH, Luo H, et al. Galectin-3 mediates endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary arterial hypertension [J]. Aging Dis, 2019, 10 (4): 731–745. DOI: 10.14336/AD.2018.1001.
- [15] Perestrelo AR, Silva AC, Oliver-De La Cruz J, et al. Multiscale analysis of extracellular matrix remodeling in the failing heart [J]. Circ Res, 2021, 128 (1): 24–38. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317685.
- [16] Poller W, Dimmeler S, Heymans S, et al. Non-coding RNAs in cardiovascular diseases: diagnostic and therapeutic perspectives [J]. Eur Heart J, 2018, 39 (29): 2704–2716. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx165.
- [17] 苏彤, 邵小南, 杨玲, 等. 循环微小 RNA-1 对稳定性冠心病患者发生冠状动脉斑块破裂的早期诊断价值 [J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33 (5): 568–572. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200907-00614.
- [18] 尹春琼, 王玉明. 长链非编码 RNA 在非小细胞肺癌诊断及治疗中的研究进展 [J]. 实用检验医师杂志, 2020, 12 (2): 123–126. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2020.02.018.

(收稿日期: 2022-03-09)

## • 科研新闻速递 •

### 感染性休克的限制性静脉输液策略: 一项多中心随机临床试验

感染性休克患者需要接受静脉输液抗休克治疗,但在重症监护病房(intensive care unit, ICU)的患者中,过量补液也会使患者产生一定的不良反应。为此,有学者进行了一项国际性随机试验,以比较限制性输液和常规输液的疗效差别。在该试验中,研究人员将 ICU 中接受过至少 1 L 静脉输液的感染性休克患者随机分为两组,分别给予限制性静脉输液或标准静脉输液治疗。主要评价指标是随机分组后 90 d 内的全因病死率。结果显示,该研究共招募了 1 554 例患者,其中 770 例被分配到限制性输液组,784 例被分配到标准输液组。共有 1 545 例(99.4%)患者获得了主要结局数据。限制性输液组接受的静脉输液量的中位数(四分位距)为 1 798(500, 4 366) mL;标准液体组为 3 811(1 861, 6 762) mL。90 d 时,限制性输液组 764 例患者中有 323 例(42.3%)死亡,而标准输液组 781 例患者中有 329 例(42.1%)死亡,组间比较差异无统计学意义[95% 可信区间(95% confidence interval, 95%CI)为 -4.7%~4.9%,  $P=0.96$ ]。限制性输液组 751 例患者中有 221 例(29.4%)发生严重不良事件,标准输液组 772 例患者中有 238 例(30.8%)发生严重不良事件,组间比较差异无统计学意义(校正后的绝对差异为 -1.7%, 95%CI 为 -7.7%~4.3%)。随机分组后 90 d,两组患者无生命支持的存活天数、总存活天数和出院天数均相似。研究人员据此得出结论:对于在 ICU 的感染性休克成人患者,与标准静脉输液疗法相比,限制性静脉输液并不能降低患者 90 d 内的死亡风险。

罗红敏, 编译自《N Engl J Med》, 2022, 386: 2459–2470