

丹参酮 II A 对缺血性心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响

唐关敏 钱 钢 翟昌林 胡惠林 汪世军 李佳寅 金丹丹

摘 要 **目的** 研究丹参酮 II A 通过抑制 Galectin-3 表达对缺血性心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响。**方法** 36 只 Wistar 大鼠随机均分为 3 组:假手术组(Sham),缺血性心力衰竭组(IHF),丹参酮 II A 组(TSA),建立缺血性心力衰竭模型,其中丹参酮 II A 组于结扎冠脉前 1 周每天给予 TSA 预处理,剂量为 40mg/kg,通过心脏彩超观察手术后 4 周各组心功能情况,通过 Masson 染色观察各组大鼠心肌纤维化程度,蛋白免疫印迹法测定 Galectin-3 蛋白表达情况。**结果** TSA 组与 IHF 组相比,心功能参数均出现显著改善(P 均 <0.01);Masson 染色示,TSA 组明显降低了缺血性心力衰竭所造成的大片胶原纤维增生,深蓝色显色较少,心肌纤维走形平整。Western blot 法结果显示,与 IHF 组比较,TSA 组显著降低了由缺血性心力衰竭所造成的 Galectin-3 的上升(0.52 ± 0.09 vs 1.43 ± 0.18 , $P < 0.01$)。**结论** 丹参酮 II A 可有效抑制缺血性心力衰竭大鼠心肌纤维化,其作用可能与抑制 Galectin-3 表达相关。

关键词 丹参酮 II A 缺血性心力衰竭 心肌纤维化

中图分类号 R541

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.09.024

Tanshinone II A Inhibits Myocardial Fibrosis in Rats with Ischemic Heart Failure. Tang Guanmin, Qian Gang, Zhai Changlin, et al. Department of Cardiology, Jiaxing First Hospital, Zhejiang 314000, China

Abstract Objective To research the effect of tanshinone II A on myocardial fibrosis in rats with ischemic heart failure, and to investigate its correlation with the expression of Galectin-3. **Methods** A total of Wistar rats were randomly divided into 3 groups: sham operation group (Sham), ischemic heart failure group (IHF), tanshinone II A group (TSA). To Establish an ischemic heart failure model, Tanshinone II A group was given TSA pretreatment 1 hours before operation, the dose was 40mg/kg. Heart function was observed by echocardiography at 4 weeks after operation. The degree of myocardial fibrosis in each group was observed by Masson staining, and the expression of Galectin-3 protein was detected by Western blot. **Results** TSA group compared with IHF group, LVW/BW, HW/BW, LVW, HW, BW were significantly improved ($P < 0.01$). Masson staining showed that TSA group significantly reduced the large collagen fiber hyperplasia caused by ischemic heart failure, and myocardial fibers were smooth. The results of Westernblot showed that compared with the IHF group, the TSA group significantly decreased the expression of Galectin-3 caused by ischemic heart failure (0.52 ± 0.09 vs 1.43 ± 0.18 , $P < 0.01$). **Conclusion** Tanshinone II A effectively inhibited myocardial fibrosis in rats with ischemic heart failure, and its effect may be related to the inhibition of the expression of Galectin-3.

Key words Tanshinone II A; Ischemic heart failure; Myocardial fibrosis

心力衰竭发生率近年来逐年升高,作为多种心脏疾病的终末阶段,严重影响了患者的生活质量,心力衰竭病理生理过程中主要环节为心脏重塑,心脏重塑的严重程度与心力衰竭的预后呈负相关^[1]。相关研究显示:半乳糖凝集素(Galectin-3)在心力衰竭心脏重塑中可加重心肌纤维化程度,起到了重要作用。因此 Galectin-3 也作为心力衰竭的生物学标志指标之

一,抑制 Galectin-3 表达可以有效发挥延缓心脏重塑的作用^[2-5]。丹参酮 II A 在治疗心肌缺血再灌注的研究较多,而抗缺血性心力衰竭的研究较少,本研究主要探索了丹参酮 II A 对于缺血性心力衰竭心肌纤维化的影响以及与 Galectin-3 表达的相关性。

材料与方法

1. 实验材料:36 只雄性 Wistar 大鼠,购自浙江中医药大学实验动物中心,于 SPF 动物房充足食水喂养,10 周龄,体质量 200~250g,galectin-3 兔多克隆一抗购自 CST 公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自武汉谷歌生物公司,Masson 试剂盒购自英国 Abcam 公司。

2. 缺血性心力衰竭模型建立:参考 Giuseppe

基金项目:浙江省中医药科技计划项目(2015ZA203,2016ZA191,2017ZA136);浙江省医药卫生计划项目(2016KYB287);嘉兴市科技计划项目(AY23038,AY33021);嘉兴市心血管重点学科基金资助项目(04-F-08);嘉兴市创新团队项目(JX-1)

作者单位:314000 嘉兴市第一医院心内科

通讯作者:翟昌林,电子邮箱:yesterdaygun@126.com

等^[6]研究方法,大鼠称重后,以 1~2ml/kg 的 5% 戊巴比妥钠腹腔注射,待大鼠麻醉后固定并胸前区备皮,气管插管,小动物呼吸机连接后行正压通气,待大鼠生命体征平稳后,胸前区消毒铺巾,胸骨左缘 3~4 肋间做一纵行切口,逐层打开胸腔及心包膜,镊子固定心尖部,食指顺势提起左心耳,镊子挑起冠脉左前降支(LAD),于肺动脉圆锥下 2~4mm 处带针的 0 号线穿过结扎,造成心肌梗死模型。逐层缝合关闭胸腔,留置直径 1.5mm 聚乙烯管,注射器抽去胸腔内气体。心梗造模成功以肢体导联 II 导联 ST 段出现弓背向上抬高为基准。术后予以青霉素,40000U,肌肉注射,每天 1 次,持续 3 天,缺血性心力衰竭造模成功以术后 4 周心脏彩超结果判断,即左心室射血分数(LVEF) $\leq 45\%$ 为造模成功,缺血性心力衰竭组造模成功率为 100%。

3. 动物分组:36 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 3 组,每组 12 只。假手术组(Sham):手术过程中冠脉只穿线不结扎;缺血性心力衰竭组(IHF):结扎左心室支后继续正常喂养 4 周;丹参酮 II A 组(TSA):于结扎冠脉前 1 周每天给予 TSA 预处理,剂量为 40mg/kg,手术结束后继续正常喂养 4 周。其中缺血性心力衰竭组麻醉死亡 1 只,丹参酮 II A 组心肌破裂死亡 1 只,予剔除。

4. 心脏彩超比较各组心功能:于手术后 4 周,通过彩色多普勒超声(Anasonic C7)检测 IHF 组大鼠,左心室射血分数(LVEF) $\leq 45\%$ 说明各组造模成功。随即测定各组大鼠体重(BW),处死各组大鼠,摘除心脏,于 0.9% 的冰生理盐水中挤压润洗心脏,滤纸吸干测定全心质量(HW),测定左心室质量(LVW),检测左心室肥厚指数(LVW/BW),全心肥厚指数(HW/BW)。

5. Masson 染色观察各组心肌纤维化程度:手术

后 4 周,处死各组大鼠,取 6 只大鼠左心室组织,固定于 10% 的多聚甲醛溶液中,组织脱水机自动脱水、透明,石蜡包埋后以 3 μm 厚度切片,最后按照说明书的说明进行 Masson 染色。ImageProPlus 图像分析软件定量分析各组切片心肌胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF) = 同一视野中胶原面积/视野面积,每张切片随机挑选 5 个视野,计算 CVF 的均数及标准差进行比较。

6. 蛋白免疫印迹法检测 Galectin-3 蛋白表达情况:待缺血性心力衰竭成功造模后处死各组大鼠,每组取 6 只大鼠左心室心肌组织,于 0℃ 环境中匀浆裂解,4℃ 低温离心机 12000 $\times g$ 离心 15min,提取上清液即蛋白样品,BCA 测定蛋白浓度后加入 3 $\times$ buffer,于 95℃ 煮 5min,短暂离心后 -20℃ 保存,制备浓缩胶与 10% 的分离胶,电泳上样量为每孔 60 μg 蛋白,电泳至分离胶后采用 120mA 恒流,转膜采用 250mA 恒流 2h, PBS 洗膜后 5% 牛奶室温封闭 1h,洗膜后孵育 Galectin-3 一抗,4℃ 摇床过夜,再次洗膜后室温孵育二抗 1h,最后通过 ECL 化学显影。

7. 统计学方法:采用 SPSS 18.0 统计学软件对数据进行统计分析,计量资料结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并进行正态性及方差齐性检验,多组均数比较采用 ANOVA 分析,两两比较采用 Dunnett-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 心脏彩超对手术后 4 周各组心脏功能的比较分析:手术后 4 周, IHF 组 LVW/BW、HW/BW、LVW、HW、BW 与 Sham 组相比均出现显著恶化(P 均 < 0.01),而手术前经丹参酮 II A 预处理则有效改善了左心室前壁梗死后的心功能, TSA 组与 IHF 组相比各指标均出现显著改善,见表 1。

表 1 各组大鼠心脏功能比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	BW (g)	HW (mg)	LVW (mg)	HW/BW (mg/g)	LVW/BW (mg/g)
Sham 组	380.31 $\pm$ 17.64	1228 $\pm$ 68.37	859.34 $\pm$ 69.87	3.25 $\pm$ 0.17	2.15 $\pm$ 0.18
IHF 组	360.29 $\pm$ 18.97 [*]	1473 $\pm$ 72.34 [*]	992.16 $\pm$ 81.35 [*]	4.04 $\pm$ 0.31 [*]	2.73 $\pm$ 0.23 [*]
TSA 组	372.56 $\pm$ 17.28 [#]	1236 $\pm$ 64.51 [#]	871.25 $\pm$ 57.22 [#]	3.36 $\pm$ 0.12 [#]	2.32 $\pm$ 0.13 [#]

与 Sham 组比较, ^{*} $P < 0.01$; 与 IHF 组比较, [#] $P < 0.01$

2. Masson 染色对各组心脏纤维化情况比较:通过 Masson 染色对各组心肌纤维化比较,胶原纤维呈现深蓝色显色,心肌细胞呈现红色显色, Sham 组心肌细胞均为红色染色,而 IHF 组心肌纤维走形混乱,具

有大片深蓝色显色,而 TSA 组则明显降低了缺血性心力衰竭所造成的大片胶原纤维增生,深蓝色显色较少,心肌纤维走形平整,见图 1。ImageProPlus 图像分析软件对各组左心心肌胶原纤维相对含量比较,结果

显示,与 Sham 组 ($6.91\% \pm 1.14\%$) 比较,IHF 组 ($19.37\% \pm 3.42\%$) 心肌胶原含量明显上升 ($P < 0.01$);与 IHF 组比较,TSA 组 ($13.69\% \pm 2.82\%$) 显

著降低了由缺血性心力衰竭所造成的心肌胶原相对含量 ($P < 0.01$),提示丹参酮 II A 可有效抑制胶原纤维增生。

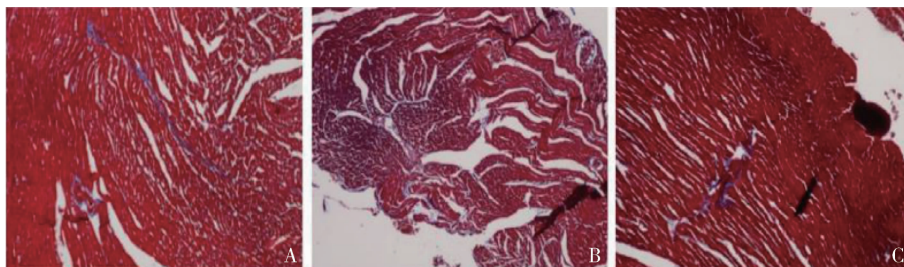


图 1 各组心脏 Masson 染色比较 ($\times 200$)

A. Sham 组;B. IHF 组;C. TSA 组

3. 蛋白免疫印迹法对各组 galectin-3 蛋白表达情况比较:通过 Western blot 法测定各组 Galectin-3 表达情况,IHF 组相对于 Sham 组 Galectin-3 相对表达量显著上升 (1.43 ± 0.18 vs 0.16 ± 0.04 , $P < 0.01$),TSA 组则显著降低了由缺血性心力衰竭所造成的 Galectin-3 的上升 (0.52 ± 0.09 vs 1.43 ± 0.18 , $P < 0.01$),见图 2。

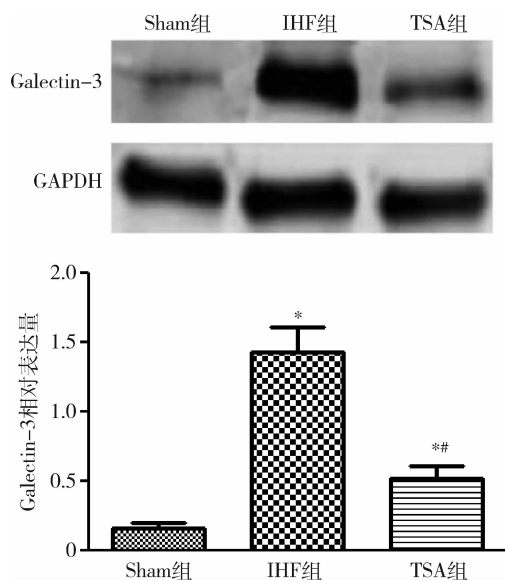


图 2 各组 galectin-3 蛋白表达情况比较

与 Sham 组比较, * $P < 0.01$;与 IHF 组比较, # $P < 0.01$

讨 论

丹参酮 II A 是治疗心脑血管疾病的常用药物,提取于丹参中,丹参性微寒、味苦,丹参酮 II A 作为丹参脂溶性成分中的重要活性物质,得其特性,具有清热安神、行经止痛、活血化瘀的功效^[4]。目前丹参酮 II A 治疗心肌缺血的研究已逐渐成为临床热点,相关研究发现丹参酮 II A 可抑制 p38MAPK 细胞通路的激

活,从而下调 MEF2、SRF 等下游特异性转录因子等基因,抑制 miR-1 表达上升从而发挥保护心肌梗损伤的作用^[5]。另有研究报道丹参酮 II A 可调节 ERK1/2 细胞通路从而改善 miR-133 的表达发挥缺血心肌的保护作用^[6,7]。金云晔等^[4]研究发现丹参酮 II A 可通过调节 PI3K/Akt/Fox3a 细胞通路从而发挥抑制缺血后心肌细胞凋亡坏死的作用,本研究则从抑制纤维化相关蛋白表达的角度探索了丹参酮 II A 对于缺血性心力衰竭大鼠心肌的影响。

缺血性心力衰竭必然会导致心脏重构及纤维化进程,因此抑制心力衰竭后心肌纤维化对于缺血性心力衰竭具有重要的保护作用^[8-11]。Galectin-3 作为半乳糖凝集素家族中的组成因子,可集结于巨噬细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞等炎症细胞中^[12-14]。Galectin-3 参与了多种病理生理学反应,如炎症反应与病灶的纤维化,纤维化和炎症反应是心力衰竭与心脏重塑进程的重要标志与关键环节^[15,16]。Sharma 等^[17]对 Ren-2 大鼠构建了缺血性心力衰竭模型,其在失代偿性心力衰竭的进程中 Galectin-3 基因的表达逐渐上调。在对 H9C2 细胞构建缺血缺氧细胞模型中也可以发现,Galectin-3 激活了成纤维细胞,使其分化成为肌成纤维细胞,纤连蛋白、胶原蛋白、TGF- β 等基质蛋白分泌增多^[18,19]。Yu 等^[20]则证实了 Galectin-3 不仅参与了基质蛋白的分泌,同时促进了基质蛋白的成熟与交联进程,加重心肌细胞外基质的增生,组织僵硬上升,进一步印证了 Galectin-3 对于缺血性心力衰竭纤维化的重要作用。本次实验探索了丹参酮 II A 对于心脏缺血后 Galectin-3 蛋白表达的相关性。

本研究发现,丹参酮 II A 对于心力衰竭左心重塑的保护作用,IHF 组于 4 周后 LVW/BW、HW/BW、

LVW、HW、BW 等心功能指标均较 Sham 组出现显著恶化,这说明缺血后 4 周心力衰竭模型成功建立,通过 Masson 染色可见伴有明显的病理性心肌细胞肥大,左心室心室壁出现肥厚,心腔容积减小,左心室射血分数 <45%。而丹参酮预处理的 TSA 组,于手术后 4 个月心功能较 IHF 明显改善,病理学改变不明显,心肌纤维走行规整。同时 Western blot 法结果发现丹参酮 II A 组较 IHF 组 Galectin-3 的表达出现明显下调,因此可以预知 TSA 组于缺血性心力衰竭的过程中成纤维细胞的活化及相关促凝集因子的表达均受到了显著的抑制^[18-20]。这证实了丹参酮 II A 可有效抑制缺血性心力衰竭大鼠心肌纤维化,其作用可能与抑制 Galectin-3 表达相关,其具体分子机制还需要进一步研究。

参考文献

- 1 Yu L, Ruifrok WPT, Meissner M, *et al.* Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis[J]. *Circulation: Heart Failure*, 2013, 6(1):107
- 2 Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, *et al.* Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2006, 103(13): 5060-5065
- 3 Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, *et al.* Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis[J]. *Am J Pathol*, 2008, 172(2): 288-298
- 4 金云哗, 翟昌林, 沈震, 等. 丹参酮 II A 磺酸钠对大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2014, 32(6): 1414-1416
- 5 Chen W, Tang F, Xie B, *et al.* Amelioration of atherosclerosis by tanshinone II A in hyperlipidemic rabbits through attenuation of oxidative stress [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 674(2/3): 359-364
- 6 Zhang L, Wu Y, Li Y, *et al.* Tanshinone II A improves miR-133 expression through MAPK ERK1/2 pathway in hypoxic cardiac myocytes[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 30(4): 843-852
- 7 Yang L, Zou X, Liang Q, *et al.* Sodium tanshinone II A sulfonate depresses angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy through MEK/ERK pathway[J]. *Exp Mol Med*, 2007, 39(1): 65-73
- 8 Sun R, Wang J, Zheng Y, *et al.* Traditional Chinese medicine baixin decoction improves cardiac fibrosis of rats with dilated cardiomyopathy [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(5):1900-1906
- 9 Agnello L, Bivona G, Lo Sasso B, *et al.* Galectin-3 in acute coronary syndrome [J]. *Clin Biochem*, 2017, 50(13-14):797-803
- 10 A VA, Zaslavskaya EL, Soboleva AV, *et al.* Galectin-3 in patients with paroxysmal and persistent atrial fibrillation and metabolic syndrome [J]. *Kardiologia*. 2016, 56(6):41-45
- 11 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
- 12 Pejnovic N, Jeftic I, Jovicic N, *et al.* Galectin-3 and IL-33/ST2 axis roles and interplay in diet-induced steatohepatitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(44):9706-9717
- 13 Ho JE, Liu C, Lyass A, *et al.* Galectin-3, a marker of cardiac fibrosis, predicts incident heart failure in the community[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 60(14):1249-1256
- 14 Mayr A, Klug G, Mair J, *et al.* Galectin-3; relation to infarct scar and left ventricular function after myocardial infarction[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 163(3):335-337
- 15 De Boerra, Voors AA, Muntendam P, *et al.* Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression [J]. *Eur J Heart Fail*, 2009, 11(9):811-817
- 16 Van Den Borne SW, Diez J, Blankesteyn WM, *et al.* Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2010, 7(1):30-37
- 17 Sharma UC, Pokharel S, Van Brakel TJ, *et al.* Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction [J]. *Circulation*, 2004, 110(19): 3121-3128
- 18 Vergaro G, Prud'homme M, Fazal L, *et al.* Inhibition of Galectin-3 pathway prevents isoproterenol-induced left ventricular dysfunction and fibrosis in mice novelty and significance [J]. *Hypertension*, 2016, 67(3): 606-612
- 19 Zhang L, Wu Y, Li Y, *et al.* Tanshinone II A improves miR-133 expression through MAPK ERK1/2 pathway in hypoxic cardiac myocytes[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 30(4): 843-852
- 20 Yu L, Ruifrok WP, Meissner M, *et al.* Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis[J]. *Circ Heart Fail*, 2013, 6(1):107-117

(收稿日期:2017-09-11)

(修回日期:2017-10-01)

(接第 111 页)

- 6 徐波. 穴位艾灸治疗糖尿病神经源性膀胱 47 例[J]. *中医外治杂志*, 2010, 19(5): 46-47
- 7 Niu X, Wang X, Huang H, *et al.* Bulbocavernosus reflex test for diagnosis of pudendal nerve injury in female patients with diabetic neurogenic bladder[J]. *Aging Dis*, 2016, 7(6): 715-720
- 8 于洋, 洪仕君, 赵丽萍, 等. 神经生长因子 NGF 的神经元保护作用机制及临床应用研究现状[J]. *昆明医科大学学报*, 2014, 8(2): 148-151
- 9 王前. 神经生长因子治疗糖尿病胃轻瘫患者的效果观察[J]. *中国继续医学教育*, 2015, 7(31): 194-195
- 10 Sowa Y, Imura T, Numajiri T, *et al.* Adipose-derived stem cells produce factors enhancing peripheral nerve regeneration: influence of

age and anatomic site of origin [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(11): 1852-1862

- 11 Nirmal J, Tyagi P, Chuang YC, *et al.* Functional and molecular characterization of hyposensitive underactive bladder tissue and urine in streptozotocin-induced diabetic rat [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e102644
- 12 Lewin GR, Lechner SG, Smith ES. Nerve growth factor and nociception: from experimental embryology to new analgesic therapy [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2014, 220(26): 251-282
- 13 官常荣, 朱英标, 丁莉, 等. 鼠神经生长因子联合 α -硫辛酸治疗糖尿病周围神经病变的临床观察[J]. *中国临床药理学杂志*, 2014, 16(10): 892-894

(收稿日期:2017-11-29)

(修回日期:2017-12-13)