

乌头碱调控 miR-150-5p 表达对心力衰竭模型大鼠心功能及心室重构的影响

赵彩霞¹, 刘爽², 刘文秀³, 岳华⁴, 庞鑫鑫¹, 马玉昕⁵

1. 中国人民解放军联勤保障部队第九八〇医院 医疗保障中心 药剂科, 河北 石家庄 050000

2. 中国人民解放军联勤保障部队第九八〇医院 病理科, 河北 石家庄 050000

3. 中国人民解放军联勤保障部队第九八〇医院 心血管内科, 河北 石家庄 050000

4. 中国人民解放军联勤保障部队第九八〇医院 临床药学科, 河北 石家庄 050000

5. 中国人民解放军联勤保障部队第九八〇医院 皮肤科, 河北 石家庄 050000

摘要: **目的** 探究乌头碱对心力衰竭模型大鼠心功能及心室重构的影响及对 miR-150-5p 的调控作用。**方法** 将 SPF 级 SD 雄性大鼠随机分为假手术组、模型组、曲美他嗪组、乌头碱组、乌头碱+antagomir-NC 组、乌头碱+miR-150-5p antagomir 组, 每组 15 只。除假手术组外, 其余组均利用结扎左前降支冠状动脉法建立心力衰竭大鼠模型。测定各组大鼠心功能指标左室舒张末期内径 (LVEDD)、左室收缩末期内径 (LVESD)、左室射血分数 (LVEF); ELISA 检测各组大鼠心肌损伤指标心肌肌钙蛋白 I (CTnI)、脑钠肽 (BNP) 和 N 末端 B 型脑钠肽前体 (NT-proBNP) 的水平; 测定各组大鼠心脏和左心室质量指数; Masson 染色观察各组大鼠心肌组织形态; TUNEL 染色检测各组大鼠心肌细胞凋亡率; RT-qPCR 检测各组大鼠心肌组织中 miR-150-5p 和细胞周期蛋白 D2 (CCND2) 的表达; 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-150-5p 与 CCND2 的靶向关系; Western blotting 检测心肌细胞中 CCND2 蛋白的表达。**结果** 与模型组相比, 乌头碱组大鼠心功能指标 LVEDD、LVESD、心肌损伤指标 CTnI、BNP 和 NT-proBNP 水平、心脏质量指数、左心室质量指数、心肌纤维化区域、心肌细胞凋亡率和 CCND2 mRNA 水平均降低 ($P<0.05$), LVEF、miR-150-5p 水平升高 ($P<0.05$); 使用 miR-150-5p antagomir 进行回补实验, 结果显示, 乌头碱对心力衰竭大鼠心功能和心室重构的保护作用被逆转, 且 CCND2 mRNA 水平升高 ($P<0.05$); 与 miR-150-5p mimic-NC 组相比, miR-150-5p mimic 组心肌细胞 CCND2 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$), 且双荧光素酶报告基因实验验证了 miR-150-5p 与 CCND2 之间存在靶向关系。**结论** 乌头碱通过上调 miR-150-5p 表达对心力衰竭大鼠心功能和心室重构发挥保护作用。

关键词: 乌头碱; 心力衰竭; miR-150-5p; 心功能; 心室重构; 细胞周期蛋白 D2

中图分类号: R285; R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2024)05-1099-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.05.003

Effect of aconitine on cardiac function and ventricular remodeling in heart failure model rats by regulating miR-150-5p expression

ZHAO Caixia¹, LIU Shuang², LIU Wenxiu³, YUE Hua⁴, PANG Xinxin¹, MA Yuxin⁵

1. The Pharmacy Department of the Medical Care Center, 980th Hospital of the Chinese People's Liberation Army Joint Logistic Support Force, Shijiazhuang 050000, China

2. Department of Pathology, 980th Hospital of the Chinese People's Liberation Army Joint Logistic Support Force, Shijiazhuang 050000, China

3. Department of Cardiovascular Medicine, 980th Hospital of the Chinese People's Liberation Army Joint Logistic Support Force, Shijiazhuang 050000, China

4. Department of Clinical Medicine, 980th Hospital of the Chinese People's Liberation Army Joint Logistic Support Force, Shijiazhuang 050000, China

5. Department of Dermatology, 980th Hospital of the Chinese People's Liberation Army Joint Logistic Support Force, Shijiazhuang 050000, China

Abstract: Objective To investigate the impacts of aconitine on cardiac function and ventricular remodeling in heart failure model

收稿日期: 2024-02-27

基金项目: 河北省中医药管理局科研课题 (2022442)

作者简介: 赵彩霞, 女, 副主任药师, 硕士, 研究方向为药理学、临床药学。E-mail: need115@163.com

rats, and its regulatory effect on miR-150-5p during this process. **Methods** SPF grade SD male rats were randomly grouped into sham surgery group, model group, trimetazidine group, aconitine group, aconitine + antagonimir NC group, and aconitine + miR-150-5p antagonimir group, with 15 rats in each group. Except for the sham surgery group, all other groups established heart failure rat models by ligating the left anterior descending coronary artery. The left ventricular end diastolic diameter (LVEDD), left ventricular end systolic diameter (LVESD), and left ventricular ejection fraction (LVEF) were measured for cardiac function indicators of rats in each group. ELISA was applied to detect the levels of myocardial injury indicators cardiac troponin I (CTnI), brain natriuretic peptide (BNP), and N-terminal B-type brain natriuretic peptide precursor (NT-proBNP) of rats in each group. Heart and left ventricular mass index of rats in each group were measured. Masson staining was applied to observe the myocardial tissue morphology of rats in each group, TUNEL staining was applied to detect the apoptosis rate of myocardial cells of rats in each group. RT-qPCR was applied to detect the expression of miR-150-5p and cyclin D2 (CCND2) in myocardial tissue of rats in each group. The double luciferase reporter gene experiment verified the targeting relationship between miR-150-5p and CCND2. Western blotting was used to detect the expression of CCND2 protein in myocardial cells. **Results** Compared with the model group, the cardiac function indicators LVEDD, LVESD, myocardial injury indicators CTnI, BNP, and NT proBNP levels, cardiac mass index, left ventricular mass index, myocardial fibrosis area, myocardial cell apoptosis rate and the level of CCND2 mRNA in the aconitine group decreased ($P < 0.05$). The levels of LVEF and miR-150-5p increased ($P < 0.05$). Supplementation experiments with miR-150-5p antagonimir showed that the protective effects of aconitine on cardiac function and ventricular remodeling in rats with heart failure were reversed, and CCND2 mRNA levels were increased ($P < 0.05$). Compared with miR-150-5p mimic-NC group, the expression of CCND2 protein in myocardial cells in miR-150-5p mimic group was significantly decreased ($P < 0.05$), and the double luciferase reporter gene experiment verified that there was a targeted relationship between miR-150-5p and CCND2. **Conclusion** Aconitine plays a protective role in cardiac function and ventricular remodeling in rats with heart failure by up-regulating the expression of miR-150-5p.

Key words: aconitine; heart failure; miR-150-5p; cardiac function; ventricular remodeling; CCND2

心力衰竭是一种复杂的临床综合征, 由任何心内压升高或心输出量减少的功能性心脏疾病引起, 其发病率高, 预后差。心力衰竭的症状包括疲劳、呼吸困难、运动耐量下降和液体潴留^[1]。心室重构是心力衰竭的一个重要病理基础, 是心肌凋亡、心肌肥大和心肌纤维化综合作用的结果, 同时改变了心肌功能, 加速心力衰竭的进程, 被认为在心脏病的临床结果中发挥关键作用^[2]。但目前没有特定的药物能够逆转不利的心室重塑。因此, 探索心力衰竭心室重塑的发生机制对心力衰竭的治疗非常重要。miRNAs 是一组长度约为 22 个核苷酸的小 RNA 分子, 通过直接结合人类疾病靶标的 mRNA, 在基因沉默和翻译抑制中发挥重要作用^[3]。目前越来越多的研究证明, miRNA 在心力衰竭等心血管疾病中起重要作用, 如敲除 miR-27b 可减轻病理性心室重构, 包括由横主动脉缩窄 (TAC) 和血管紧张素 (Ang) II 引起的心脏肥大、心肌纤维化和炎症^[4]。另一项研究显示, miR-150-5p 在晚期左心衰竭患者中显著下调, 其与心衰患者的疾病严重程度和预后呈负相关, 可用于预测心力衰竭^[5]。附子作为传统中药通常用于风湿病、心力衰竭和肾功能衰竭的治疗^[6]。乌头碱是附子的主要活性成分, 为二酯型二萜生物碱, 在镇痛、利尿、抗肿瘤、平喘和抗炎等

药物的生物活性中起着重要作用^[7]。有研究发现, 用低剂量乌头碱可以通过提高左心室收缩压和左心室舒张末期压而显著改善大鼠的心脏功能, 同时对心力衰竭有明显的强心作用^[8]。因此, 本研究旨在探讨乌头碱对心力衰竭大鼠心功能及心室重构以及在该过程中对 miR-150-5p 的调节作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞

SPF 级 SD 雄性大鼠, 6 周龄, 体质量 (180 ± 20) g, 购自河北省实验动物中心, 许可证号 SCXK (冀) 2021-002。所有大鼠均在温度 26 °C, 相对湿度 60%, 且 12 h 光照和 12 h 黑暗交替的环境中适应性饲养 1 周。本研究经中国人民解放军联勤保障部队第九八〇医学伦理委员会批准 (2024-KY-84)。心肌细胞株系 H9C2 购自美国 ATCC 细胞库。

1.2 主要试剂和仪器

乌头碱 (质量分数 ≥ 98%, 规格 20 mg/支, 货号 HA001001, 宝鸡市辰光生物科技有限公司); 盐酸曲美他嗪片 (批号 0109112022, 瑞阳制药股份有限公司); miR-150-5p antagonimir 及其阴性对照 (antagonimir-NC) (上海艾博思生物科技有限公司); 心肌肌钙蛋白 I (CTnI)、脑钠肽 (BNP) 和 N 末端 B 型脑钠肽前体 (NT-proBNP) 酶联免疫吸附

(ELISA) 试剂盒(武汉益普生物科技有限公司, 货号 MM-61550R1、MM-0067R2、MM-0329R2); Masson 染色试剂(上海信裕生物科技有限公司, 货号 XY-4422-1); 一步法 TUNEL 原位细胞凋亡试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 货号 E-CK-A320); miRcute miRNA 提取分离试剂盒(北京天根生化科技有限公司, 货号 DP501); All-in-One™miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit 和 All-in-One™miRNA qPCR Kit(北京亚太恒信生物科技有限公司, 货号 AMRT-0020、AMPR-0600); 引物设计及合成(苏州金唯智生物科技); 细胞周期蛋白 D2(CCND2)一抗、山羊抗兔 IgG 二抗(英国 abcam 公司, 货号 ab308258、ab205718)。

大为 DW-PF522 彩色多普勒超声诊断仪(上海聚慕医疗器械有限公司); 德朗 DR-200B 酶标仪(济南骏驰生物科技有限公司); CFX Connect 荧光定量 PCR 仪(上海伯乐生命医学产品有限公司)。

1.3 心力衰竭大鼠模型的制备

从适应性饲养 1 周的大鼠中随机选取 15 只作为假手术组, 剩余大鼠参照文献报道^[9]制备心力衰竭大鼠模型: 将大鼠禁食不禁水 12 h 后, ip 1%戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉大鼠, 并将大鼠仰卧位放在手术台上用胶带固定四肢, 将气管内导管连接至呼吸机(呼吸速率 80 次/min, 潮气量 10 mL), 然后在第 3~4 肋间隙纵向开胸暴露心脏, 用 6-0 聚丙烯缝合线结扎左前降支冠状动脉, 后将切口分层缝合, 放置胸管排空气胸, 直至动物可以走动后取下胸管。术中通过心电图及心脏彩超监测到大鼠 ST 段抬高或压低且左室射血分数(LVEF)≤50%时提示大鼠造模成功。术后所有大鼠 ip 50 000 U/mL 青霉素以防感染。术中大鼠若出现死亡则立即补足, 最终 89 只造模大鼠中有 77 只造模成功, 造模成功率为 86.52%。假手术组大鼠不进行冠状动脉结扎, 其余步骤与造模大鼠相同。

1.4 动物分组及给药

将造模成功的大鼠随机分为模型组、曲美他嗪组、乌头碱组、乌头碱+antagomir-NC 组、乌头碱+miR-150-5p antagomir 组, 每组 15 只。曲美他嗪组大鼠 ig 10 mg/kg 曲美他嗪^[10], 乌头碱组大鼠 ip 10 μg/kg 乌头碱^[11], 乌头碱+antagomir-NC 组和乌头碱+miR-150-5p antagomir 组大鼠在乌头碱组的基础上分别 ip 40 mg/kg antagomir-NC 和 miR-150-5p antagomir, 假手术组和模型组均以相同方式给予等

体积生理盐水。1 次/d, 共持续 28 d。

1.5 大鼠左室舒张末期左室内径(LVEDD)、左室收缩末期左室内径(LVESD)、LVEF 检测

末次给药结束后, 将各组大鼠用 1%戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉, 并使其仰卧位固定在手术台上, 剃去胸腹部的毛发, 用心脏彩超检测大鼠心功能指标 LVEDD、LVESD、LVEF。

1.6 ELISA 检测血清肌钙蛋白 I (CTnI)、脑钠肽(BNP)和 N 末端 B 型脑钠肽前体(NT-proBNP)的水平

心功能检测指标结束后, 禁食不禁水 12 h, 然后麻醉大鼠并在大鼠胸部左侧第 3~4 肋间隙进行穿刺采血 1 mL, 置于 2 mL 无菌离心管中, 在 4 °C 下以 3 000 r/min 离心 10 min, 收集上清。根据 ELISA 试剂盒操作步骤检测血清中 CTnI、BNP、NT-proBNP 的水平。

1.7 大鼠心脏指数和左心室指数

大鼠采血结束后, 麻醉并处死大鼠, 通过开胸取出完整心脏, 用预冷的生理盐水冲洗心脏, 并清除周围多余组织, 取部分用干净的滤纸吸去心脏表面和心室中的水分, 称取完整心脏质量, 并计算心脏指数(心脏质量/体质量)。然后分离并弃去大鼠的心房和右心室, 保留左心室和室间隔称质量, 并计算左心室指数(左心室质量/体质量)。再另取部分心脏, 切取心尖组织固定在 4%多聚甲醛溶液中, 其余的组织冻存至-80 °C 冰箱中备用。

1.8 Masson 染色观察大鼠心肌组织纤维化

将 1.7 项下中固定过夜的心脏进行石蜡包埋, 并切成 5 μm 心脏冠状切片, 随后用二甲苯和梯度乙醇对石蜡切片进行脱蜡和水化。蒸馏水清洗后置于 5%硫代硫酸钠中浸泡 5 min, 然后在 Weiger 铁苏木素中染色 10 min, 在丽春红酸性品红染液中染色 10 min。蒸馏水冲洗后用 1%磷钼酸水溶液处理 5 min, 再用苯胺蓝复染 5 min。最后用梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。在光学显微镜下观察心肌组织纤维化, 并利用 Image pro plus 6.0 软件量化视野中纤维化区域的比率。

1.9 TUNEL 染色检测大鼠心肌细胞凋亡率

取 1.8 项下中的石蜡切片脱蜡再水合后, 将切片与重组蛋白酶 K 在室温下一起孵育 30 min。然后根据 TUNEL 染色试剂盒操作步骤, 将切片置于提前配制好的 TUNEL 溶液中在 37 °C 中避光孵育 1 h, 蒸馏水清洗后再放入 DAPI 中复染 10 min, 最后使

用荧光显微镜观察，并计算细胞凋亡率。

1.10 RT-qPCR 检测心肌组织中 miR-150-5p 和 CCND2 mRNA 表达

取出 1.7 项下冻存心脏，利用 TRIzol 法提取组织总 RNA，随后根据 cDNA 反转试剂盒将 RNA 反转为 cDNA，并以 cDNA 为模板，用 qPCR 试剂盒进行 qPCR 反应，反应程序：95 °C、5 min；95 °C、15 s，60 °C、30 s 共 40 个循环；70 °C、10 s。分别以 U6 和 GAPDH 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-150-5p 和 CCND2 的 mRNA 相对表达量。引物序列如下：miR-150-5p：上游 5'-AACCCCTTGACCACTGGTCG-3'，下游 5'-GTATCCAGTGCGTGTCTG-3'；U6：上游 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'，下游 5'-AACGCTTACGAATTTGCGT-3'；CCND2：上游 5'-GCAGAACCTGTTGACCATCG-3'，下游 5'-GCTTGCGAAGGATGTGCTC-3'；3-磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）：上游 5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'，下游 5'-CAAAGTTGTCATGGATGHACC-3'。

1.11 双荧光素酶报告基因实验

首先通过 ENCORI 生物信息网站预测 miR-150-5p 在 CCND2 的 3' UTR 上的结合位点。然后将 CCND2 序列片段克隆到 pmirR-GLO 载体中，构建 CCND2-WT 野生型和 CCND2-MUT 突变型质粒。随后利用 Lipofectamine 3000 将各质粒与 miR-150-5p mimic 或 miR-150-5p mimic-NC 共转染至心肌细胞 H9C2 中，24 h 后采用双荧光素酶活性检测试剂盒检测荧光素酶活性。

1.12 Western blotting 检测心肌细胞中 CCND2 蛋白的表达

收集转染 miR-150-5p mimic 和 miR-150-5p mimic-NC 质粒的心肌细胞 H9C2，使用蛋白裂解液

提取总蛋白。将等量蛋白质用 10% SDS-PAGE 分离并转至 PVDF 膜。结束后，将膜用 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h，然后加入 CCND2 一抗稀释液（1：1000）在 4 °C 孵育过夜，次日加入羊抗兔 IgG 二抗稀释液（1：500）在室温孵育 1 h，最后用显影剂显色。以 GAPDH 为内参，观察蛋白条带，并用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

1.13 统计学分析

采用 Graphpad prism8.0 软件统计分析数据，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组比较使用单因素方差分析，两两多重比较使用 Tukey 检验。

2 结果

2.1 乌头碱对各组大鼠心功能指标的影响

与模型组相比，曲美他嗪组和乌头碱组大鼠的 LVEDD、LVESD 降低，LVEF 升高（ $P < 0.05$ ）；与乌头碱组相比，乌头碱+miR-150-5p antagomir 组大鼠的 LVEDD、LVESD 升高，LVEF 降低（ $P < 0.05$ ），见表 1。

2.2 乌头碱对各组大鼠血清中 CTnI、BNP 和 NT-proBNP 水平的影响

与模型组相比，曲美他嗪组和乌头碱组大鼠血清中 CTnI、BNP、NT-proBNP 水平显著降低（ $P < 0.05$ ）；与乌头碱组相比，乌头碱+miR-150-5p antagomir 组大鼠血清中 CTnI、BNP、NT-proBNP 水平升高（ $P < 0.05$ ），见表 2。

2.3 乌头碱对各组大鼠心脏和左心室指数的影响

与模型组相比，曲美他嗪组和乌头碱组大鼠心脏指数和左心室指数显著降低（ $P < 0.05$ ）；与乌头碱组相比，乌头碱+miR-150-5p antagomir 组大鼠心脏质量指数和左心室质量指数均显著升高（ $P < 0.05$ ），见表 3。

表 1 各组大鼠心功能指标的比较（ $\bar{x} \pm s$ ， $n = 15$ ）

Table 1 Comparison of cardiac function indicators in each group of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

组别	剂量	LVEDD/mm	LVESD/mm	LVEF/%
假手术		5.14±0.58	1.91±0.27	75.34±6.21
模型		7.62±0.81*	4.20±0.55*	41.67±3.82*
曲美他嗪	10 mg·kg ⁻¹	5.95±0.62 [#]	2.38±0.32 [#]	68.91±4.73 [#]
乌头碱	10 μg·kg ⁻¹	6.18±0.68 [#]	2.45±0.39 [#]	65.24±4.38 [#]
乌头碱+antagomir-NC	10 μg·kg ⁻¹ +40 mg·kg ⁻¹	6.29±0.65 [#]	2.51±0.46 [#]	65.52±4.61 [#]
乌头碱+miR-150-5p antagomir	10 μg·kg ⁻¹ +40 mg·kg ⁻¹	7.35±0.79 ^{&@}	3.87±0.49 ^{&@}	44.85±3.76 ^{&@}

与假手术组比较：* $P < 0.05$ ；与模型组比较：[#] $P < 0.05$ ；与曲美他嗪组比较：[&] $P < 0.05$ ；与乌头碱组比较：[@] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs sham-operated group；[#] $P < 0.05$ vs model group；[&] $P < 0.05$ vs trimetazidine group；[@] $P < 0.05$ vs aconitine group。

表 2 各组大鼠血清中 CTnI、BNP 和 NT-proBNP 水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Table 2 Comparison of CTnI, BNP, and NT-proBNP levels in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量	CTnI/(pg mL ⁻¹)	BNP/(pg mL ⁻¹)	NT-proBNP/(pg mL ⁻¹)
假手术	—	28.64 ± 1.35	69.37 ± 7.12	157.35 ± 12.62
模型	—	67.24 ± 3.69*	182.46 ± 13.65*	315.64 ± 23.87*
曲美他嗪	10 mg·kg ⁻¹	32.82 ± 1.57 [#]	78.63 ± 8.21 [#]	174.92 ± 15.83 [#]
乌头碱	10 μg·kg ⁻¹	35.43 ± 1.62 [#]	83.54 ± 9.16 [#]	185.37 ± 16.20 [#]
乌头碱+antagomir-NC	10 μg·kg ⁻¹ +40 mg·kg ⁻¹	35.78 ± 1.80 [#]	84.23 ± 8.69 [#]	189.84 ± 16.17 [#]
乌头碱+miR-150-5p antagomir	10 μg·kg ⁻¹ +40 mg·kg ⁻¹	63.57 ± 3.48 ^{&@}	172.34 ± 12.07 ^{&@}	283.65 ± 20.68 ^{&@}

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与曲美他嗪组比较: [&] $P < 0.05$; 与乌头碱组比较: [@] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs sham-operated group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs trimetazidine group; [@] $P < 0.05$ vs aconitine group.

表 3 各组大鼠心脏指数和左心室指数的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Comparison of heart mass index and left ventricular mass index of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量	心脏指数/(mg g ⁻¹)	左心室指数/(mg g ⁻¹)
假手术	—	2.68 ± 0.17	0.45 ± 0.04
模型	—	4.15 ± 0.28*	0.78 ± 0.08*
曲美他嗪	10 mg·kg ⁻¹	2.87 ± 0.20 [#]	0.58 ± 0.05 [#]
乌头碱	10 μg·kg ⁻¹	2.91 ± 0.18 [#]	0.61 ± 0.06 [#]
乌头碱+antagomir-NC	10 μg·kg ⁻¹ +40 mg·kg ⁻¹	2.94 ± 0.19 [#]	0.60 ± 0.07 [#]
乌头碱+miR-150-5p antagomir	10 μg·kg ⁻¹ +40 mg·kg ⁻¹	3.85 ± 0.26 ^{&@}	0.74 ± 0.07 ^{&@}

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与曲美他嗪组比较: [&] $P < 0.05$; 与乌头碱组比较: [@] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs sham-operated group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs trimetazidine group; [@] $P < 0.05$ vs aconitine group.

2.4 乌头碱对各组大鼠心肌组织纤维化的影响

假手术组大鼠心肌细胞有序排列,着色均匀,未见明显纤维化;与假手术组相比,模型组大鼠心肌细胞紊乱,蓝色心肌纤维化区域明显增大($P < 0.05$);与模型组相比,曲美他嗪组和乌头碱组大鼠蓝色心肌纤维化区域减小($P < 0.05$);与乌头碱组相比,乌头碱+miR-150-5p antagomir 组大鼠蓝色心肌纤维化区域明显增大($P < 0.05$),见图 1、表 4。

2.5 乌头碱对各组大鼠心肌细胞凋亡的影响

与模型组相比,曲美他嗪组和乌头碱组大鼠心肌细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$);与乌头碱组相比,乌头碱+miR-150-5p antagomir 组大鼠心肌细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$),见图 2、表 5。

2.6 乌头碱对各组大鼠心肌组织中 miR-150-5p 和 CCND2 mRNA 水平的影响

与模型组相比,曲美他嗪组和乌头碱组大鼠心

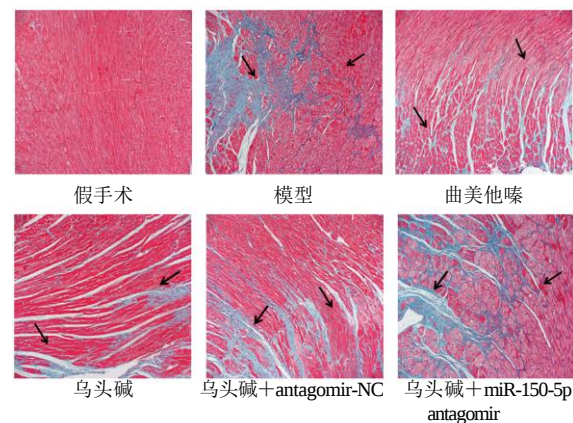


图 1 Masson 染色观察大鼠心肌组织纤维化 (×200)

Fig. 1 Masson staining observation of pathological changes in rat myocardial tissue (×200)

表 4 各组大鼠心肌纤维化程度的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Comparison of the degree of myocardial fibrosis in each group of rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量	纤维化区域/%
假手术	—	0.75 ± 0.05
模型	—	25.64 ± 1.38*
曲美他嗪	10 mg·kg ⁻¹	6.83 ± 0.73 [#]
乌头碱	10 μg·kg ⁻¹	7.24 ± 0.86 [#]
乌头碱+antagomir-NC	10 μg·kg ⁻¹ +40 mg·kg ⁻¹	7.35 ± 0.83 [#]
乌头碱+miR-150-5p antagomir	10 μg·kg ⁻¹ +40 mg·kg ⁻¹	21.93 ± 1.14 ^{&@}

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与曲美他嗪组比较: [&] $P < 0.05$; 与乌头碱组比较: [@] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs sham-operated group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs trimetazidine group; [@] $P < 0.05$ vs aconitine group.

肌组织中 miR-150-5p 显著升高, CCND2 mRNA 降低($P < 0.05$);与乌头碱组相比,乌头碱+miR-150-5p antagomir 组大鼠心肌组织中 miR-150-5p 显著降低, CCND2 mRNA 显著升高($P < 0.05$),见表 6。

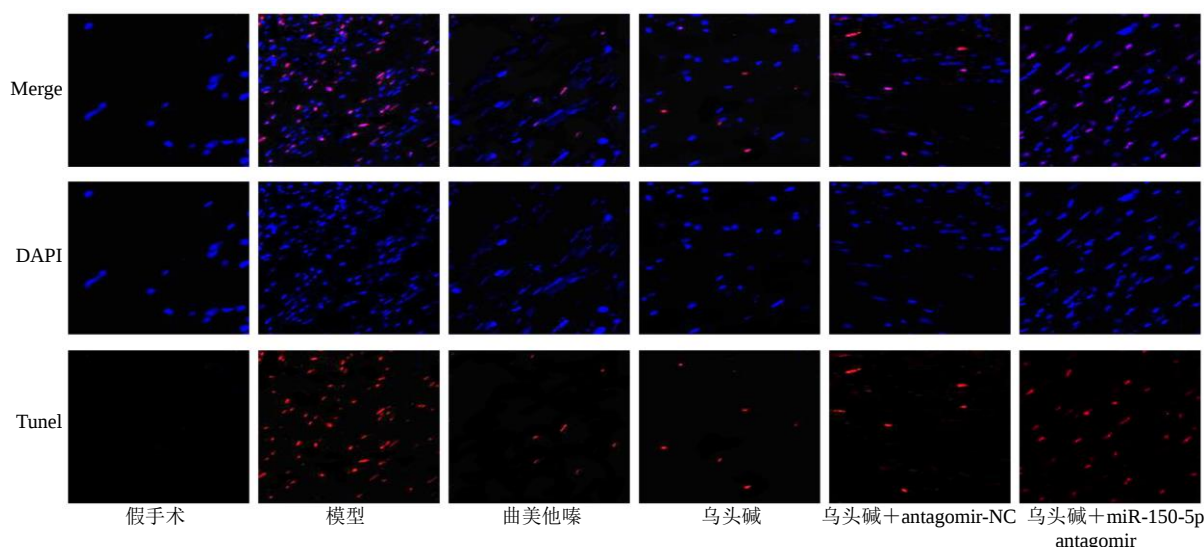


图 2 TUNEL 法检测大鼠心肌细胞的凋亡情况 (×400)

Fig. 2 TUNEL method for detecting apoptosis of rat cardiomyocytes (×400)

表 5 各组大鼠心肌细胞凋亡率的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 5 Comparison of myocardial cell apoptosis rates among different groups of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量	凋亡率/%
假手术	—	0.00 ± 0.00
模型	—	32.51 ± 1.87*
曲美他嗪	10 mg·kg ⁻¹	8.97 ± 0.93 [#]
乌头碱	10 μg·kg ⁻¹	9.25 ± 1.05 [#]
乌头碱+ antagomir-NC	10 μg·kg ⁻¹ +40 mg·kg ⁻¹	9.41 ± 1.03 [#]
乌头碱+miR-150-5p antagomir	10 μg·kg ⁻¹ +40 mg·kg ⁻¹	28.63 ± 1.52 ^{&@}

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与曲美他嗪组比较: [&] $P < 0.05$; 与乌头碱组比较: [@] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs sham-operated group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs trimetazidine group; [@] $P < 0.05$ vs aconitine group.

表 6 各组大鼠心肌组织中 miR-150-5p 和 CCND2 mRNA 水平的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 6 Comparison of miR-150-5p and CCND2 mRNA levels in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

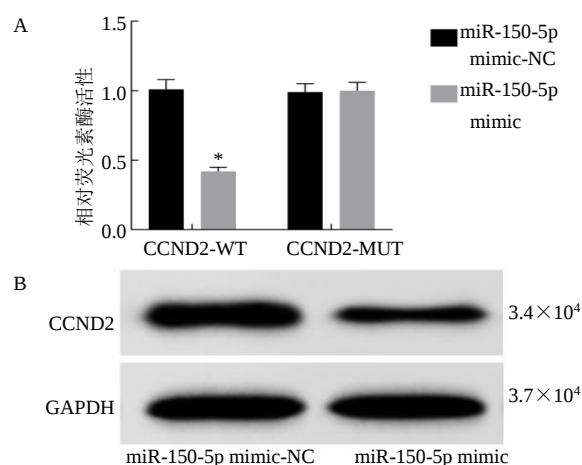
组别	剂量	mRNA 相对表达量	
		miR-150-5p	CCND2
假手术	—	1.02 ± 0.08	0.98 ± 0.07
模型	—	0.27 ± 0.02*	1.73 ± 0.14*
曲美他嗪	10 mg·kg ⁻¹	0.83 ± 0.06 [#]	1.15 ± 0.09 [#]
乌头碱	10 μg·kg ⁻¹	0.79 ± 0.05 [#]	1.27 ± 0.10 [#]
乌头碱+ antagomir-NC	10 μg·kg ⁻¹ + 40 mg·kg ⁻¹	0.78 ± 0.05 [#]	1.28 ± 0.10 [#]
乌头碱+miR-150- 5p antagomir	10 μg·kg ⁻¹ + 40 mg·kg ⁻¹	0.30 ± 0.02 ^{&@}	1.67 ± 0.13 ^{&@}

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与曲美他嗪组比较: [&] $P < 0.05$; 与乌头碱组比较: [@] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs sham-operated group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs trimetazidine group; [@] $P < 0.05$ vs aconitine group.

2.7 miR-150-5p 和 CCND2 之间的关系验证

如图 3 所示, ENCORI 分析发现 miR-150-5p 与 CCND2 存在靶向结合位点。通过双荧光素酶报告基因实验发现, 转染 CCND2-WT 后, 共转染 miR-150-5p mimic 的细胞相对荧光素酶活性显著低于共转染 miR-150-5p mimic-NC 的细胞 ($P < 0.05$)。Western blotting 结果显示, 与 miR-150-5p mimic-NC 组心肌细胞 CCND2 的蛋白相对表达量 (0.98 ± 0.10) 相比, miR-150-5p mimic 组心肌细胞 CCND2 的蛋白表达



与 miR-150-5p mimic-NC 组比较: * $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs miR-150-5p mimic-NC group.

图 3 miR-150-5p 与 CCND2 双荧光素酶活性 (A)、miR-150-5p mimic-NC 和 miR-150-5p mimic 组心肌细胞中 CCND2 蛋白表达 (B)

Fig. 3 Dual luciferase activity of miR-150-5p and CCND2 (A), expression of CCND2 protein in cardiomyocytes of miR-150-5p mimic-NC and miR-150-5p mimic groups (B)

量 (0.36 ± 0.05) 显著降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

心力衰竭是一种心功能障碍所致的疾病, 主要是由于心脏不能泵出足够的血液来满足身体的需要。心力衰竭的临床综合征可由多种病理生理学变化引发, 包括心肌缺血和梗死、压力或容量超负荷、代谢失调、肌节蛋白功能的遗传干扰和对病毒感染的反应^[12-13]。近一半的心力衰竭患者死于由不利的心室重构和室性心律失常引起的心脏性猝死。因此, 预防不良心室重构和心功能不全可以改善心力衰竭患者的预后^[14]。心室重构是指由心肌损伤或心脏压力负荷引起心肌肥大、细胞凋亡、间质纤维化、心肌细胞紊乱, 进而导致 LVEF 降低, LVEDD 和 LVESD 增加^[15]。因此, 本研究通过结扎左前降支冠状动脉来建立心力衰竭大鼠模型, 并通过超声检测大鼠的心功能指标, 结果显示, 模型组大鼠 LVEDD、LVESD 升高, LVEF 降低, 且 LVEF 低于 50%, 提示大鼠模型建立成功。而曲美他嗪组和乌头碱组大鼠的 LVEDD、LVESD 降低, LVEF 升高, 表明乌头碱可以改善心力衰竭大鼠的心功能障碍, 进而缓解心室重构。

BNP 是一种内分泌激素, 由心肌细胞合成和分泌, BNP 不受其他因素的干扰, 是反映心室功能变化最敏感、最特异的指标^[16]。NT-proBNP 是 BNP 的氮末端产物, 其表达升高反映了心力衰竭的恶化。有研究已经证明血清 NT-proBNP 水平是预测心肌梗死患者心室重构的敏感指标^[17]。cTnI 是诊断心肌损伤的重要标志物, 其同样是从受损心肌细胞释放到血液中, 在心肌舒张和收缩中具有重要作用^[10]。本研究结果显示, 模型组大鼠血清中 cTnI、BNP 和 NT-proBNP 水平高于假手术组, 曲美他嗪组和乌头碱组大鼠血清中 cTnI、BNP 和 NT-proBNP 水平低于模型组, 提示乌头碱可以减轻心力衰竭大鼠的心肌损伤, 改善心室功能和心室重构。重构过程的特征在于大量的炎症、促纤维化反应、心肌肥大等, 尽管心肌肥大最初是一种代偿机制, 但持续的肥大合并纤维化最终会导致左心室功能下降, 这是心力衰竭的一个独立危险因素^[18]。因此, 本研究通过称取心脏重量, 并利用 Masson 染色观察心肌纤维化程度, 结果显示, 曲美他嗪组和乌头碱组大鼠的心脏质量指数和左心室质量指数较模型组均降低, 心肌组织中的心肌纤维化区域及心肌细胞的凋亡率也较模型组减小, 提示乌头碱能够抑制心肌肥大和心

肌细胞凋亡, 减轻心肌纤维化, 进而阻断心室重构过程。

近年来, 越来越多研究证明 miRNA 可作用于对生命至关重要的多个过程, 由于其能够调节体内平衡和疾病中的各种细胞功能, 因此已成为人类疾病诊断或预后的重要生物标志物^[19]。有研究发现, miRNA 可通过靶向相应的 mRNAs 在心力衰竭的发展中发挥重要作用, 被认为是左心室重构的有前途的生物标志物^[1]。另一项研究发现龙生蛭胶囊通过上调 miR-150-5p 靶向基质金属蛋白酶 14 来保护 Ang II 诱导的心功能障碍和心室重构, 长链非编码锌指反义 1 (ZFAS1) 可以通过海绵化 miR-150-5p, 并靶向下调 CCND2 以促进心肌细胞铁下垂和糖尿病心肌病的发展^[20-21]。而 CCND2 作为细胞周期蛋白家族的一员, 是细胞周期进程和增殖的关键调节因子, 其在调节心肌细胞增殖、增强心肌修复、改善心脏功能障碍等方面发挥重要作用^[22]。但关于 miR-150-5p/CCND2 信号轴在乌头碱治疗心力衰竭过程中的作用机制尚未了解。因此, 本研究通过 RT-qPCR 检测 miR-150-5p 和 CCND2 的表达, 结果显示, 曲美他嗪组和乌头碱组大鼠心肌组织中 miR-150-5p 的表达较模型组明显升高, CCND2 mRNA 水平明显降低, 表明乌头碱可以上调 miR-150-5p 的表达。而进一步使用 miR-150-5p 抑制剂 miR-150-5p antagomir 进行回补实验, 结果显示, miR-150-5p 被抑制后逆转了乌头碱对心力衰竭大鼠的保护作用, 并上调了 CCND2 mRNA 水平。本研究利用双荧光素酶报告基因实验和 Western blotting 进一步验证 miR-150-5p 和 CCND2 之间的靶向关系, 结果显示转染 CCND2-WT 后, 共转染 miR-150-5p mimic 的细胞相对荧光素酶活性显著低于共转染 miR-150-5p mimic-NC 的细胞, 且 miR-150-5p mimic 组细胞的 CCND2 蛋白表达显著低于 miR-150-5p mimic-NC 组, 提示 miR-150-5p 和 CCND2 之间具有功能靶向关系。因此, 本研究推测乌头碱改善心力衰竭大鼠心功能和心室重构的作用机制可能与上调 miR-150-5p, 并靶向下调 CCND2 有关。

综上所述, 乌头碱对心力衰竭大鼠心功能和心室重构发挥保护作用, 其作用机制可能与上调 miR-150-5p, 并靶向下调 CCND2 有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 戴闰柱. 慢性心力衰竭治疗的现代概念 [J]. 中华心血

- 管病杂志, 2000(1): 74-77.
- [2] 程进波, 李红莲, 张艳. 慢性心力衰竭患者心肌能量代谢变化与心脏收缩功能及左心室重构的相关性 [J]. 临床和实验医学杂志, 2024, 23(7): 686-690.
- [3] Zhang B, Mao S Y, Liu X D, *et al.* MiR-125b inhibits cardiomyocyte apoptosis by targeting BAK1 in heart failure [J]. *Mol Med*, 2021, 27(1): 72.
- [4] Li G Q, Shao Y H, Guo H C, *et al.* MicroRNA-27b-3p down-regulates FGF1 and aggravates pathological cardiac remodeling [J]. *Cardiovasc Res*, 2022, 118(9): 2139-2151.
- [5] Abu-Halima M, Meese E, Saleh M A, *et al.* Micro-RNA 150-5p predicts overt heart failure in patients with univentricular hearts [J]. *PLoS One*, 2019, 14(10): e0223606.
- [6] Chen Z Y, Wei X Y, Qiu Z D, *et al.* Compatibility of Fuzi and ginseng significantly increase the exposure of aconitines [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 883898.
- [7] Peng F, Zhang N, Wang C T, *et al.* Aconitine induces cardiomyocyte damage by mitigating BNIP3-dependent mitophagy and the TNF α -NLRP3 signalling axis [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(1): e12701.
- [8] Qiu L Z, Zhou W, Yue L X, *et al.* Repeated aconitine treatment induced the remodeling of mitochondrial function via AMPK-OPA1-ATP5A1 pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 646121.
- [9] Nawaz W, Naveed M, Zhang J, *et al.* Cardioprotective effect of silicon-built restraint device (ASD), for left ventricular remodeling in rat heart failure model [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2022, 33(5): 42.
- [10] 张梦, 全毅红, 郭明星, 等. 黄芪甲苷对阿霉素诱导心力衰竭大鼠模型心室重构及心肌能量代谢的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(7): 1494-1497.
- [11] Zhou C, Wu M Z, Liu Q, *et al.* Synergistic and attenuating effect of electroacupuncture on aconitine in improving heart failure and its calcium regulation mechanism [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 4940745.
- [12] Hanna A, Frangogiannis N G. Inflammatory cytokines and chemokines as therapeutic targets in heart failure [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2020, 34(6): 849-863.
- [13] 张垚, 杨继, 穆丽婷, 等. 丹参多酚酸盐注射液联合西医常规治疗对慢性心力衰竭疗效及安全性的系统评价及试验序贯分析 [J]. 中草药, 2022, 53(19): 6139-6158.
- [14] Zheng Y, Lang Y H, Qi Z C, *et al.* Macrophage-related genes biomarkers in left ventricular remodeling induced by heart failure [J]. *Rev Cardiovasc Med*, 2022, 23(3): 109.
- [15] Ni Y J, Deng J, Liu X, *et al.* Echinacoside reverses myocardial remodeling and improves heart function via regulating SIRT1/FOXO3a/MnSOD axis in HF rats induced by isoproterenol [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(1): 203-216.
- [16] Li X, Xiang D K, Shu Y Z, *et al.* Mitigating effect of tanshinone IIA on ventricular remodeling in rats with pressure overload-induced heart failure [J]. *Acta Cir Bras*, 2019, 34(8): e201900807.
- [17] Xie Y T, Dang Y, Zhang F F, *et al.* Combination of serum TIMP-3, CA125, and NT-proBNP in predicting ventricular remodeling in patients with heart failure following acute myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2020, 10(5): 1184-1191.
- [18] Tamayo M, Mart ín-Nunes L, Piedras M J, *et al.* The aryl hydrocarbon receptor ligand FICZ improves left ventricular remodeling and cardiac function at the onset of pressure overload-induced heart failure in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5403.
- [19] Tual-Chalot S, Stellos K. MicroRNA-based therapy of postmyocardial infarction heart failure [J]. *Hellenic J Cardiol*, 2021, 62(2): 149-151.
- [20] Gu Y, Zhang S M, Chen X, *et al.* LongShengZhi alleviated cardiac remodeling via upregulation microRNA-150-5p with matrix metalloproteinase 14 as the target [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 291: 115156.
- [21] Ni T J, Huang X X, Pan S L, *et al.* Inhibition of the long non-coding RNA ZFAS1 attenuates ferroptosis by sponging miR-150-5p and activates CCND2 against diabetic cardiomyopathy [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(21): 9995-10007.
- [22] Zhu W Q, Zhao M, Mattapally S, *et al.* CCND2 overexpression enhances the regenerative potency of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Remuscularization of injured ventricle [J]. *Circ Res*, 2018, 122(1): 88-96.

[责任编辑 高源]