

## 丹参素通过 Nrf2/HO-1 通路减轻心肌缺血/再灌注大鼠心肌损伤的作用机制

付新<sup>1</sup>, 周霖<sup>2\*</sup>, 许成燕<sup>3</sup>, 刘闯<sup>4</sup>, 陈雅丽<sup>4</sup>, 庞颖颖<sup>4</sup>

1. 郑州大学第一附属医院 心内科, 河南 郑州 450052

2. 郑州大学第一附属医院 药学部, 河南 郑州 450052

3. 上海市闵行区吴泾社区卫生服务中心, 上海 201100

4. 郑州大学第一附属医院 综合科, 河南 郑州 450052

**摘要:** **目的** 探讨丹参素干预心肌缺血/再灌注损伤 (MIRI) 大鼠的作用及其机制。**方法** 采用左前降支动脉闭塞 30 min 后再灌注 3 h 构建 MIRI 大鼠模型。将 60 只大鼠随机分为假手术组、模型组及丹参素 5、15、25 mg/kg 组, 每组 12 只。假手术组大鼠进行相同的手术操作, LAD 穿线但不结扎。丹参素组在再灌注开始时 ip 丹参素 5、15、25 mg/kg, 每天 1 次, 连续给药 14 d。将另外 60 只大鼠随机分为假手术组、模型组、丹参素(25 mg/kg)组、erastin 组和丹参素+erastin 组, 每组 12 只。丹参素组大鼠在再灌注开始时 ip 丹参素 25 mg/kg, erastin 组在 MIR 手术前 1 h ip erastin 10  $\mu$ mol/L, 丹参素+erastin 组大鼠在再灌注开始时 ip 丹参素 25 mg/kg, 在 MIR 手术前 1 h ip erastin 10  $\mu$ mol/L, 每天 1 次, 连续给药 14 d。采用试剂盒检测心肌组织中氧化应激指标超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽活性 (GSH) 和丙二醛 (MDA) 的活性, 铁的含量, 炎症因子白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 肌酸激酶 (CK) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 水平, 以及  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 和胶原蛋白 II (Collagen II) 水平; 通过心电图检测血流动力学参数左心室收缩压 (LVSP)、左心室舒张末压 (LVEDP)、左心室压力最大上升速率 (+dp/dt<sub>max</sub>) 和左心室压力最大下降速率 (-dp/dt<sub>max</sub>) 水平; 采用苏木精-伊红 (HE) 染色观察心肌病理变化, TUNEL 染色观察心肌细胞情况, Masson 染色观察心肌纤维化程度; 蛋白免疫印迹法检测心肌损伤关键蛋白酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (ACSL4)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4)、核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、血红素氧合酶-1 (HO-1) 和核 Nrf2 表达水平。**结果** 与模型组相比, 丹参素组 SOD 及 GSH 活性明显升高, MDA 活性和铁含量明显降低 ( $P < 0.01$ ); IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  水平明显降低 ( $P < 0.01$ ); CK 和 LDH 水平显著降低 ( $P < 0.01$ );  $\alpha$ -SMA 和 Collagen II 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); LVEDP 水平显著降低, LVSP、+dp/dt<sub>max</sub> 和 -dp/dt<sub>max</sub> 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 丹参素可以有效改善细胞死亡状态, 显著升高 ACSL4、Nrf2、HO-1 以及核 Nrf2 表达水平 ( $P < 0.01$ ), 显著降低 GPX4 表达水平 ( $P < 0.01$ )。**结论** 丹参素通过 Nrf2/HO-1 通路抑制缺血/再灌注诱导的铁死亡从而减轻心肌损伤。

**关键词:** 丹参素; 铁死亡; 炎症; 缺血再灌注; 心肌缺血/再灌注损伤; Nrf2/HO-1 通路; 氧化应激

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2025)02-0261-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.02.002

## Mechanism of danshensu attenuating myocardial injury in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury through Nrf2/HO-1 pathway

FU Xin<sup>1</sup>, ZHOU Lin<sup>2</sup>, XU Chengyan<sup>3</sup>, LIU Chuang<sup>4</sup>, CHEN Yali<sup>4</sup>, PANG Yingying<sup>4</sup>

1. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

2. Department of Pharmacology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

3. Shanghai Minhang District Wujing Community Health Service Center, Shanghai 201100, China

4. General Department, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

**Abstract: Objective** To explore the effect and mechanism of danshensu in intervening in myocardial injury in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury (MIRI). **Methods** MIRI rat model was established by occlusion of the left anterior

收稿日期: 2024-09-26

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目 (23A360018)

作者简介: 付新, 博士, 副主任医师, 研究方向为心血管病学。E-mail: aaffuu@163.com

\*通信作者: 周霖, 博士, 副主任药师, 研究方向为中药药理学。E-mail: 524734490@qq.com

descending artery for 30 min followed by reperfusion for 3 h. 60 Rats were randomly divided into sham operation group, model group and danshensu 5, 15, 25 mg/kg groups, with 12 rats in each group. The rats in the sham operation group underwent the same surgical procedure, and LAD was threaded but not ligated. Danshensu groups were intraperitoneally injected with danshensu 5, 15 and 25 mg/kg at the beginning of reperfusion, once daily for 14 d. Another 60 rats were randomly divided into sham operation group, model group, danshensu (25 mg/kg) group, erastin group and danshensu + erastin group, with 12 rats in each group. Rats in the danshensu group were intraperitoneally injected with 25 mg/kg danshensu at the beginning of reperfusion. Rats in the erastin group were intraperitoneally injected with 10  $\mu\text{mol/L}$  erastin 1 h before MIR operation. Rats in the danshensu + erastin group were intraperitoneally injected with 25 mg/kg danshensu at the beginning of reperfusion. Rats in the erastin group were intraperitoneally injected with 10  $\mu\text{mol/L}$  erastin 1 h before MIR operation, once daily for 14 d. The activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA), the content of iron, the levels of inflammatory factors interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH), and the levels of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and Collagen II in myocardial tissue were detected by the kit. The levels of left ventricular systolic pressure (LVSP), left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), left ventricular pressure maximum rise rate ( $+dp/dt_{\text{max}}$ ) and left ventricular pressure maximum decline rate ( $-dp/dt_{\text{max}}$ ) were detected by electrocardiogram. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of myocardium, TUNEL staining was used to observe the myocardial cells, and Masson staining was used to observe the degree of myocardial fibrosis. Western blotting was used to detect the key proteins of myocardial injury, including acyl-CoA synthetase long chain family member 4 (ACSL4), glutathione peroxidase 4 (GPX4), nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 and nuclear Nrf2. **Results** Compared with the model group, the activities of SOD and GSH in the danshensu group were significantly increased, and the MDA activity and iron content were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The levels of IL-6, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The levels of CK and LDH were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The levels of  $\alpha$ -SMA and Collagen II were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The level of LVEDP was significantly decreased, and the levels of LVSP,  $+dp/dt_{\text{max}}$  and  $-dp/dt_{\text{max}}$  were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Danshensu could effectively improve the state of cell death, significantly increase the expression levels of ACSL4, Nrf2, HO-1 and nuclear Nrf2 ( $P < 0.01$ ), and significantly reduce the expression level of GPX4 ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Danshensu attenuates myocardial injury by inhibiting ischemia/reperfusion induced ferroptosis through the Nrf2/HO-1 pathway.

**Key words:** danshensu; ferroptosis; inflammation; ischemia/reperfusion; myocardial ischemia/reperfusion injury; Nrf2/HO-1 pathway; oxidative stress

缺血性心脏病是主要的死亡原因之一，给健康和经济带来了巨大负担。在缺血心脏中，冠状动脉再灌注可有效限制梗死面积<sup>[1]</sup>。然而，再灌注本身会造成额外损伤，称为心肌缺血/再灌注（MIR）损伤（MIRI）。MIRI 是缺血性心脏病开胸治疗和心脏手术中不可避免的病理生理现象，可导致再灌注心律失常、暂时的机械功能障碍等病理变化。抑制 MIRI 对缺血性心肌病的预防和治疗至关重要<sup>[2]</sup>。铁死亡是一种由铁依赖的脂质过氧化驱动了的细胞死亡级联反应，其特征是铁依赖的氧化应激和脂质过氧化增加。铁被认为是铁死亡的必要条件。铁蛋白分解、铁储备减少和铁输出异常可能在铁死亡过程中导致铁过载。鉴于铁死亡是铁依赖的且血液为心肌细胞提供细胞内铁，铁死亡被认为是与缺血损伤相关的细胞死亡的关键机制。研究证实铁螯合剂（去铁胺）可通过铁依赖的方式减轻缺血/再灌注（IR）大鼠的心肌损伤，铁死亡干预可能对 MIRI 有益<sup>[3]</sup>。

丹参素是丹参中提取的水溶性有效成分，其治疗心肌缺血的理论依据包括改善血液流变学特性和保护血管内皮细胞。在改善血液流变学特性方面，它可抗血小板聚集，通过抑制血小板膜受体减少血栓形成，还能降低血液黏度，调节纤维蛋白原含量；在保护血管内皮细胞方面，它具有抗氧化作用，能清除自由基，减少对血管内皮细胞的损伤<sup>[4]</sup>。当前，后处理被认为是减少 IR 期间心肌损伤的一种新策略。因此，本研究旨在探讨丹参素后处理在 MIRI 大鼠中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

8 周龄雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 120 只，体质量 180~210 g，由河南省实验动物中心提供，饲养在 (23±2) °C，12 h/12 h 光照/黑暗周期环境中，自由获取食物和水。本研究经郑州大学第一附属医院科研和临床试验伦理委员会批准（批件号 2023-D-

025)。

## 1.2 主要试剂

超氧化物歧化酶 (SOD, 批号 G4306-48T)、谷胱甘肽 (GSH, 批号 GM1135)、丙二醛 (MDA, 批号 GM1134)、肌酸激酶 (CK, 批号 GM1121)、乳酸脱氢酶 (LDH, 批号 GM1120) 和铁测定试剂盒 (批号 G4301-96T) 均购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 白细胞介素-6 (IL-6, 批号 SEKR-0005)、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , 批号 SEKR-0002)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , 批号 SEKR-0009)、总蛋白提取试剂盒 (批号 EX1100) 和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA, 批号 fk1144Y) 均购自北京索莱宝科技有限公司; 胶原蛋白 II (Collagen II, 批号 ab188570)、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (ACSL4, 批号 ab155282)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4, 批号 ab125066)、核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2, 批号 ab62352)、血红素氧合酶-1 (HO-1, 批号 ab189491) 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH, 批号 ab8245) 均购自 Abcam 生物科技有限公司; 丹参素 (质量分数  $\geq 98\%$ , 批号 wkq-00158) 购自四川维克奇生物科技有限公司; erastin (质量分数  $\geq 98\%$ , 批号 S80804) 购自上海源叶生物科技有限公司。

## 1.3 主要仪器

Vevo 1100 超声系统购自加拿大 Visual Sonics 公司; TE300 型荧光显微镜和 ECLPSE 80i 型光学显微镜均购自日本 Nikon 公司; SOPTOP ICX4I 型倒置显微镜购自上海普赫光电科技有限公司; SW-CJ-2D 型超净工作台购自苏州净化科技有限公司; HV8-85 型高压灭菌锅购自日本 HIRAYA 公司; DK-98-II 型电热恒温水浴锅购自天津市泰斯特仪器有限公司; SIM-F140AY65-PC 型制冰机购自日本 Panasonic 公司; Bio-Rad ChemiDoc XRS+ 化学发光成像系统 (ChemiDoc XRS+) 购自伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司。

## 1.4 MIRI 大鼠模型建立、分组及给药

通过结扎左前降支冠状动脉 (LAD) 30 min 后再灌注 3 h 诱导建立 MIRI 大鼠模型<sup>[5]</sup>。大鼠用 2.5% 戊巴比妥钠麻醉并仰卧固定, 用 6-0 丝线结扎 LAD 30 min 造成缺血期, 通过心脏表面变色和心电图记录的 ST 段抬高确认缺血。30 min 后, 松开 LAD 结扎线, 继续再灌注 3 h, 通过心脏表面变红和心电图记录的 ST 段降低确认再灌注。将 60 只大鼠随机分为假手术组、模型组及丹参素 5、15、25 mg/kg

组, 每组 12 只。假手术组大鼠进行相同的手术操作, LAD 穿线但不结扎。丹参素组在再灌注开始时通过 ip 丹参素 5、15、25 mg/kg, 每天 1 次, 连续给药 14 d<sup>[6]</sup>。

为研究丹参素对铁死亡的影响, 将另外 60 只大鼠随机分为假手术组、模型组、丹参素组、erastin 组和丹参素+erastin 组, 每组 12 只。模型组造模过程同上。假手术组大鼠进行相同的手术操作, LAD 穿线但不结扎。丹参素组大鼠在再灌注开始时 ip 丹参素 25 mg/kg, erastin 组在 MIR 手术前 1 h ip erastin 10  $\mu$ mol/L, 丹参素+erastin 组大鼠在再灌注开始时 ip 丹参素 25 mg/kg, 在 MIR 手术前 1 h ip erastin 10  $\mu$ mol/L, 每天 1 次, 连续给药 14 d。

## 1.5 生化参数检测

使用相应试剂盒测量心脏组织裂解液中的氧化应激指标 SOD、GSH 和 MDA 的活性。使用铁测定试剂盒分析组织裂解液中 Fe 的含量水平。使用相应试剂盒分析血清中肌酸激酶 (CK) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 水平。使用相应试剂盒测量组织裂解液中 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  水平, 所有操作均按试剂盒的说明书进行。

## 1.6 超声心动图测量

研究丹参素对铁死亡的影响实验中, 给药结束后, 使用配备 30 MHz 线性换能器的 Vevo 1100 超声系统进行经胸超声心动图检查。通过右颈总动脉将导管插入左心室, 记录左心室收缩压 (LVSP)、左心室舒张末压 (LVEDP)、左心室压力最大上升速率 (+dp/dt<sub>max</sub>) 和左心室压力最大下降速率 (-dp/dt<sub>max</sub>), 所有参数至少重复测量 3 次。

## 1.7 心肌组织病理组织学分析

给药结束后, 处死大鼠, 迅速取出心脏并固定在 10% 福尔马林溶液中。将左心室包埋在石蜡中并切片 (5  $\mu$ m)。按照常规程序用苏木精-伊红 (HE) 和 Masson 染色对切片进行染色, 在光学显微镜下观察心肌的病理变化。

TUNEL 染色: 心脏石蜡切片脱蜡至水, 然后经过蛋白酶 K 修复, 破膜, 室温平衡, 加反应液, DAPI 复染细胞核, 封片, 镜检拍照。DAPI 染色的细胞核在紫外激发下为蓝色, TUNEL 试剂盒为 TMR 荧光素标记, 阳性凋亡细胞核为红色。

$\alpha$ -SMA 和 Collagen II 检测: 制备心脏组织切片, 用特异性抗体与  $\alpha$ -SMA 和 Collagen II 抗原结合, 通过显色反应标记其位置, 利用图像分析

软件根据染色区域的面积和强度进行相应定量，通过测量阳性染色区域占整个视野面积的比例。

### 1.8 蛋白印迹分析

给药结束后，使用总蛋白提取试剂盒从心肌组织中提取总蛋白，使用核质提取试剂分别分离核蛋白。通过 BCA 方法测定蛋白浓度，样品通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转移到聚偏二氟乙烯膜上。在 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h，然后在 4 °C 下与 ACSL4 (1:10 000)、GPX4 (1:1 000)、Nrf2 (1:500)、核 Nrf2 (1:1 000)、HO-1 (1:2 000) 和 GAPDH (1:1 000) 一抗孵育过夜。膜在室温下与二抗孵育 1 h。加入增强化学发光试剂，并用凝胶成像系统扫描和分析条带。通过 Image J 分析条带强度以表示相对表达量。

### 1.9 统计学分析

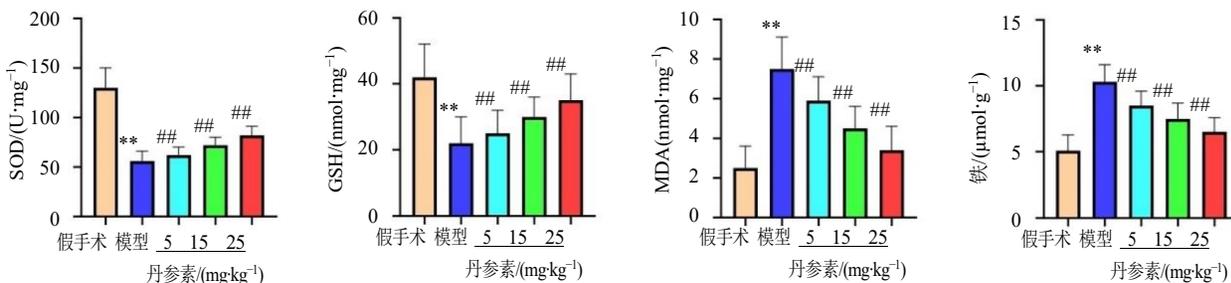
所有数据使用 SPSS 24.0 进行分析。符合正态分布的测量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析，然后进行事后检验，两组间比较采用 *t* 检验，*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 丹参素对大鼠心肌组织氧化应激指标和铁含量的影响

与假手术组相比，模型组大鼠心肌组织中 SOD 和 GSH 的活性降低，MDA 活性和铁含量升高 (*P* < 0.01)；与模型组相比，丹参素各组大鼠心肌组织中 SOD 和 GSH 的活性升高，MDA 活性和铁含量降低 (*P* < 0.01)，且随着丹参素剂量的升高，作用效果越显著，见图 1。因此，后续实验丹参素剂量设为 25 mg/kg。

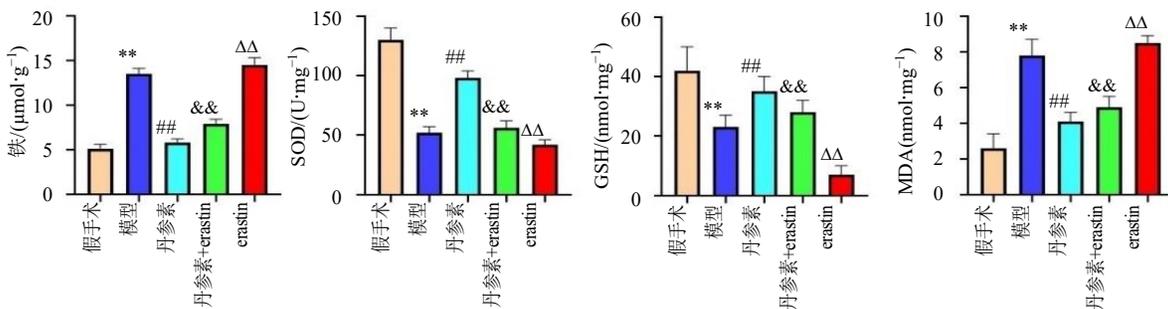
铁死亡实验中，与假手术组相比，模型组铁含量和 MDA 活性显著升高，SOD 和 GSH 活性显著降低 (*P* < 0.01)；与模型组相比，丹参素组铁含量和 MDA 活性显著降低，SOD 和 GSH 活性显著升高 (*P* < 0.01)；与丹参素组相比，丹参素+erastin 组铁含量和 MDA 活性显著增高，SOD 和 GSH 活性显著降低 (*P* < 0.01)；与丹参素+erastin 组相比，erastin 组的铁含量和 MDA 活性显著升高，SOD 和 GSH 活性显著降低 (*P* < 0.01)，见图 2。



与假手术组比较: \*\**P* < 0.01; 与模型组比较: ##*P* < 0.01。  
\*\**P* < 0.01 vs control group; ##*P* < 0.01 vs model group.

图 1 丹参素对大鼠心肌组织 SOD、GSH、MDA 和铁含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Fig. 1 Effects of danshen on SOD, GSH and MDA and iron content in myocardial tissue of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )



与假手术组比较: \*\**P* < 0.01; 与模型组比较: ##*P* < 0.01; 与丹参素组比较: &&*P* < 0.01; 与丹参素+erastin 组比较: ΔΔ*P* < 0.01。  
\*\**P* < 0.01 vs control group; ##*P* < 0.01 vs model group; &&*P* < 0.01 vs danshen group; ΔΔ*P* < 0.01 vs danshen + erastin group.

图 2 铁死亡实验中各组氧化应激指标 (SOD、GSH 和 MDA) 和铁含量比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Fig. 2 Comparison on oxidative stress indexes (SOD, GSH and MDA) and iron content in each group in iron death experiment ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

### 2.2 丹参素对大鼠心肌组织炎症因子和 CK、LDH 水平的影响

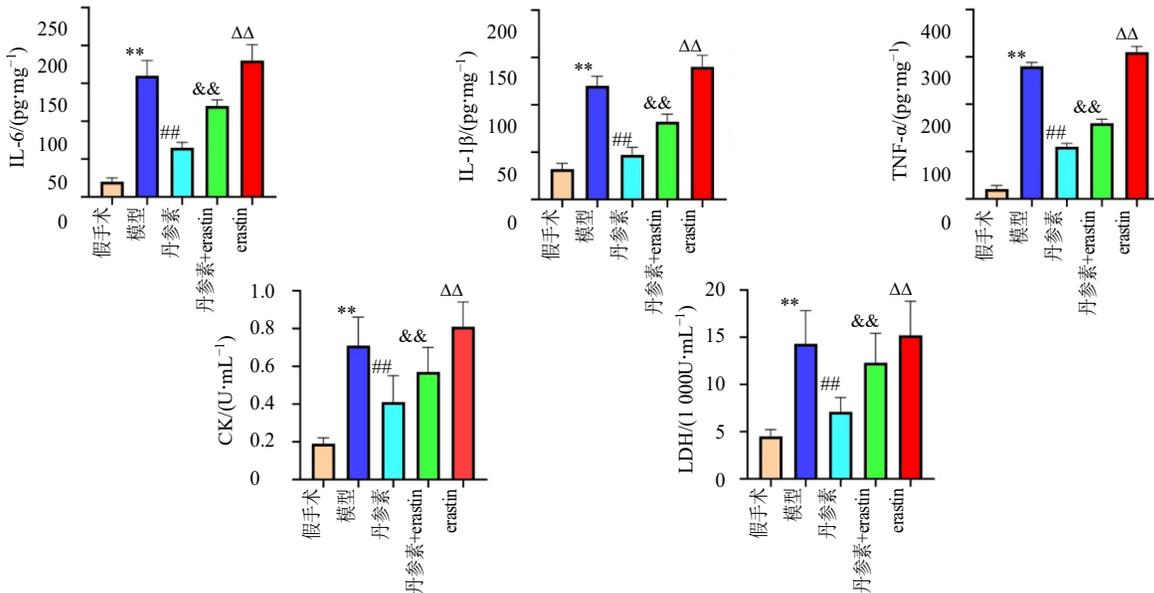
与假手术组相比,模型组 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  水平显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组相比,丹参素组 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  水平显著降低 ( $P < 0.01$ );与丹参素组相比,丹参素+erastin 组 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  水平显著升高 ( $P < 0.01$ );与丹参素+erastin 组相比,erastin 组 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  水平升高更多 ( $P < 0.01$ )。

与假手术组相比,模型组 CK 和 LDH 水平显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组相比,丹参素组 CK 和 LDH 水平显著降低 ( $P < 0.01$ );与丹参素组相比,丹参素+erastin 组 CK 和 LDH 水平显著升高 ( $P <$

$0.01$ );与丹参素+erastin 组相比,erastin 组的 CK 和 LDH 水平升高更多 ( $P < 0.01$ ),见图 3。

### 2.3 丹参素对大鼠心肌组织血流动力学参数的影响

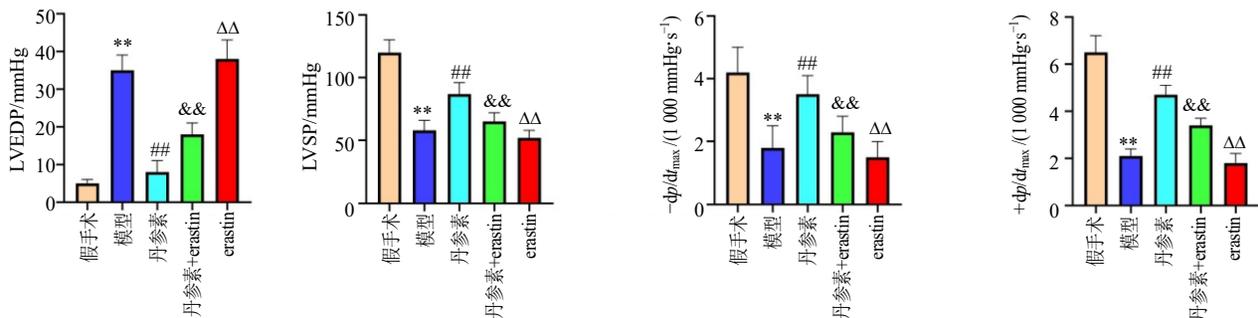
与假手术组相比,模型组 LVEDP 水平显著增高,而 LVSP、+dp/dt<sub>max</sub> 和 -dp/dt<sub>max</sub> 水平显著降低 ( $P < 0.01$ );与模型组相比,丹参素组 LVEDP 水平显著降低,而 LVSP、+dp/dt<sub>max</sub> 和 -dp/dt<sub>max</sub> 水平显著升高 ( $P < 0.01$ );与丹参素组相比,丹参素+erastin 组 LVEDP 水平显著增高,而 LVSP、+dp/dt<sub>max</sub> 和 -dp/dt<sub>max</sub> 水平显著降低 ( $P < 0.01$ );与丹参素+erastin 组相比,erastin 组 LVEDP 水平升高更多,而 LVSP、+dp/dt<sub>max</sub> 和 -dp/dt<sub>max</sub> 水平降低更多 ( $P < 0.01$ ),见图 4。



与假手术组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ ; 与丹参素组比较: && $P < 0.01$ ; 与丹参素+erastin 组比较:  $\Delta\Delta P < 0.01$ 。  
\*\* $P < 0.01$  vs control group; ## $P < 0.01$  vs model group; && $P < 0.01$  vs danshensu group;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs danshensu + erastin group.

图 3 各组心肌组织 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 CK、LDH 水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Fig. 3 Comparison on IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , CK, LDH levels in myocardial tissue of each group ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )



与假手术组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ ; 与丹参素组比较: && $P < 0.01$ ; 与丹参素+erastin 组比较:  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; (1 mmHg=133 Pa)。  
\*\* $P < 0.01$  vs control group; ## $P < 0.01$  vs model group; && $P < 0.01$  vs danshensu group;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs danshensu + erastin group; (1 mmHg=133 Pa).

图 4 各组血流动力学参数比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Fig. 4 Comparison on hemodynamic parameters of each group ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

### 2.4 丹参素对大鼠心肌组织病理的影响

HE 染色结果表明,与模型组相比,给予 erastin 可进一步对 MIRI 大鼠造成心肌组织损伤,丹参素可以有效起到保护作用。TUNEL 染色结果显示,erastin 可进一步加重 MIRI 大鼠心肌细胞的死亡,丹参素可以有效改善心肌细胞的死亡状态,见图 5。

染色结果显示,假手术组心肌纤维排列整齐、规则,心肌组织细胞呈均匀的红色,细胞核清晰可见,细胞形态完整;模型组可见心肌纤维出现不同程度的紊乱,部分心肌细胞肿胀、坏死,表现为红色的心肌细胞区域出现颜色变浅或空泡样改变,细胞核模糊或消失;丹参素组心肌纤维排列紊乱程度

较模型组减轻,心肌细胞坏死情况减少,红色的心肌细胞区域相对更规整,细胞核形态和染色情况有所改善;与丹参素组相比,丹参素+erastin 组损伤较严重;与丹参素+erastin 组相比,erastin 组损伤更严重。

与假手术组相比,模型组  $\alpha$ -SMA 和 Collagen II 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组相比,丹参素组  $\alpha$ -SMA 和 Collagen II 表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ );与丹参素组相比,丹参素+erastin 组  $\alpha$ -SMA 和 Collagen II 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ );与丹参素+erastin 组相比,erastin 组  $\alpha$ -SMA 和 Collagen II 表达水平升高更多 ( $P < 0.01$ ),见图 6。

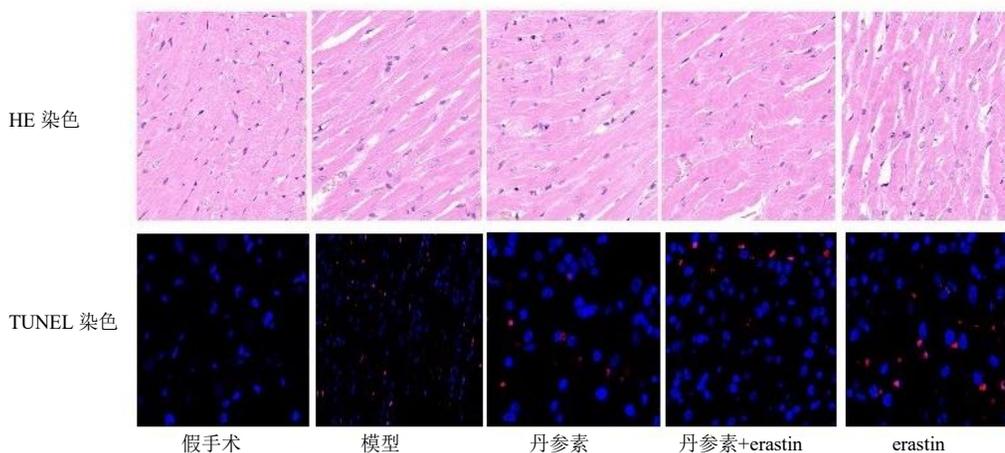
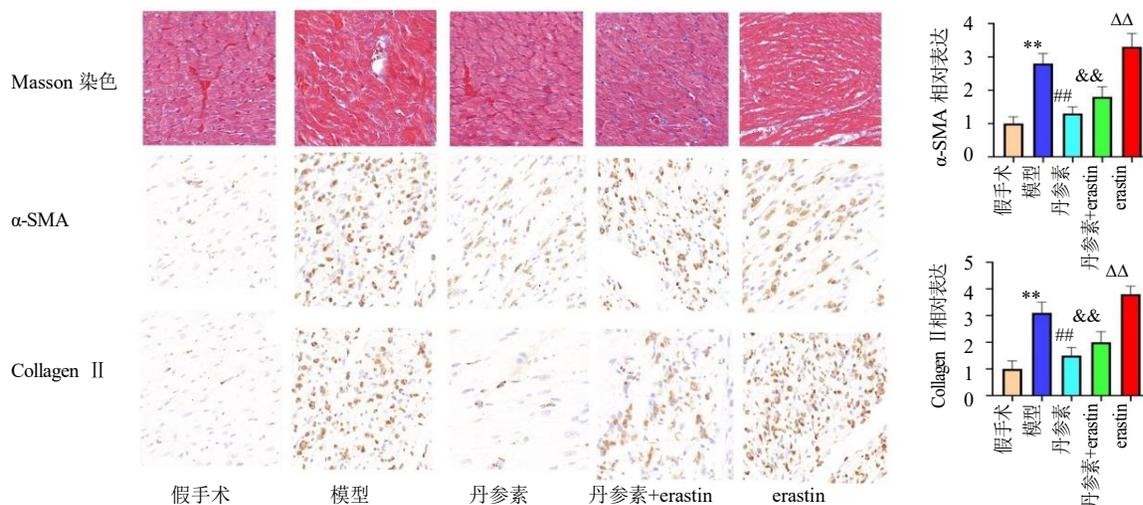


图 5 各组心肌组织 HE/TUNEL 染色比较 (×200)

Fig. 5 Comparison on HE/TUNEL staining in myocardial tissues of each group (×200)



与假手术组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ ; 与丹参素组比较: && $P < 0.01$ ; 与丹参素+erastin 组比较:  $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

\*\* $P < 0.01$  vs control group; ## $P < 0.01$  vs model group; && $P < 0.01$  vs danshen素 group;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs danshen素 + erastin group.

图 6 各组心肌组织 Masson 染色比较及  $\alpha$ -SMA、Collagen II 水平比较 (×200,  $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

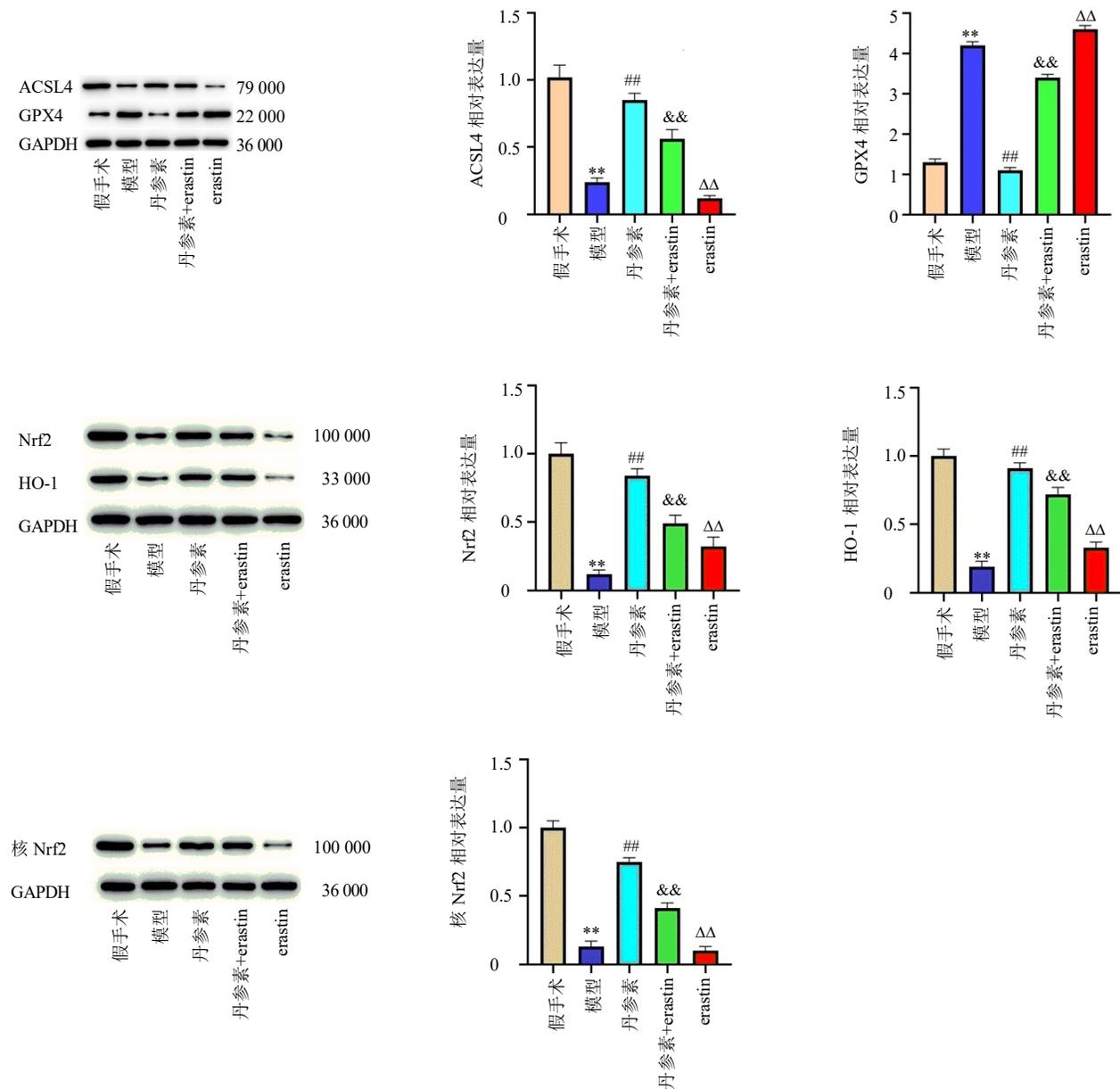
Fig. 6 Comparison on masson staining and  $\alpha$ -SMA and collagen II levels in myocardial tissues of each group (×200,  $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

### 2.5 丹参素对大鼠心肌组织 ACSL4、GPX4、Nrf2、HO-1 和核 Nrf2 表达水平的影响

与假手术组相比，模型组 ACSL4 表达水平显著降低，GPX4 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ )；与模型组相比，丹参素组 ACSL4 表达水平显著升高，GPX4 表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ )；与丹参素组相比，丹参素+erastin 组 ACSL4 水平显著降低，GPX4 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ )；与丹参素+erastin 组相比，erastin 组 ACSL4 水平显著降低，GPX4 表达

水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。

与假手术组相比，模型组 Nrf2、HO-1 和核 Nrf2 表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ )；与模型组相比，丹参素组 Nrf2、HO-1 和核 Nrf2 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ )；与丹参素组相比，丹参素+erastin 组 Nrf2、HO-1 和核 Nrf2 表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ )；与丹参素+erastin 组相比，erastin 组 Nrf2、HO-1 和核 Nrf2 表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ )，见图 7。



与假手术组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ ; 与丹参素组比较: && $P < 0.01$ ; 与丹参素+erastin 组比较:  $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

\*\* $P < 0.01$  vs control group; ## $P < 0.01$  vs model group; && $P < 0.01$  vs danshensu group;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs danshensu + erastin group.

图 7 各组心肌组织 ACSL4、GPX4、Nrf2、HO-1 和 Nrf2 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Fig. 7 Comparison on ACSL4, GPX4, Nrf2, HO-1, and Nrf2 expression levels in myocardial tissues of each group ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

### 3 讨论

铁死亡是一种程序性死亡形式，其特征是强烈的氧化应激和铁的参与。这种新的细胞死亡表型不同于其他细胞死亡过程，如凋亡、自噬和焦亡。当前，抑制铁死亡被认为是改善 MIRI 的一种策略。有研究在 MIRI 大鼠中发现，随着再灌注的增加，铁含量和 MDA 水平升高，GPX 水平降低<sup>[7]</sup>。同时，去铁胺可以通过减少铁死亡来改善心肌损伤。研究提出，通过靶向铁死亡并抑制铁依赖的脂质过氧化形成来保护心肌损伤是一种可行的选择。

丹参素是丹参中的有效水溶性成分<sup>[8]</sup>。临床研究表明，丹参素可以有效地维持骨折 IR 损伤后的血清 SOD 活性。丹参素对人淋巴细胞细胞毒性的减轻与其抗氧化应激作用有关。在视神经横断损伤模型中，丹参素可以通过激活抗氧化应激反应来保护视网膜神经节细胞。本研究中，丹参素治疗增加了 MIRI 大鼠心肌组织中 SOD 和 GSH 水平，同时降低了 MDA 水平，表明丹参素具有抗氧化作用。同时，丹参素还降低了 ACSL4 水平，同时增加了 GPX4 的表达。基于以上研究结果，本研究推测丹参素对 MIRI 大鼠心肌损伤的作用可能与铁死亡有关。

为了验证这一假设，本研究使用 erastin（一种公认的铁死亡诱导剂），它可以通过干扰 xCT 转运体来抑制胱氨酸的摄取。结果显示，erastin 诱导的铁死亡可以被丹参素有效抑制，并改善心肌损伤状态。此外，铁死亡已被证明在介导纤维化和炎症中起重要作用。通过减少心肌纤维化和炎症浸润，可以对心室重构发挥保护作用。本研究也证实，erastin 诱导铁死亡导致的心肌纤维化和炎症，能够被丹参素抑制。因此，本研究结果表明，丹参素对 MIRI 的保护作用可能是通过抑制铁死亡实现的。

Nrf2 是细胞内氧化还原稳态的关键调节剂，参与脂质过氧化过程的控制<sup>[9]</sup>。在氧化应激下，分布在细胞质中的 Nrf2 从 Keap1 上解聚，然后转位到细胞核中，上调包括 HO-1、SOD 和谷胱甘肽 S-转移酶在内的几种抗氧化和解毒基因的表达。已经证实 Nrf2 缺失会导致左心室舒张功能障碍和心肌肥大。研究发现 Nrf2/HO-1 参与预防铁死亡、自噬、程序性细胞坏死和凋亡，并且 Nrf2/HO-1 可用于治疗动脉硬化、心律失常和心肌梗死。在本研究中，

丹参素治疗可以上调 MIRI 大鼠心肌组织中 Nrf2 和 HO-1 的表达。本研究还提取了心肌组织中的核蛋白，发现 MIRI 诱导的核 Nrf2 下调可以被丹参素治疗恢复。综上所述，本研究发现丹参素可以通过促进 Nrf2 的核转位来激活 Nrf2 的转录活性，从而调节下游抗氧化应激相关指标（如 HO-1、SOD）的表达。研究也证实了激活 Nrf2 可以防止 erastin 引起的铁死亡<sup>[10-12]</sup>。本研究结果表明，丹参素对 MIRI 铁死亡的抑制作用可能是通过激活 Nrf2 通路实现的。

本研究表明丹参素减轻了 MIRI 诱导的心力衰竭、病理损伤、心肌纤维化和炎症，这可能与抑制铁死亡有关。从机制上讲，丹参素在 MIRI 中的保护作用可能是通过激活 Nrf2 通路实现的。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 张哲, 张翼, 龙文军, 等. QT 间期变异昼夜规律及心率变异性与缺血性心脏病的相关性 [J]. 现代电生理学杂志, 2024, 31(3): 177-179.
- [2] 林思琪, 彭文瑶, 林鑫, 等. 中国缺血性心脏病主要危险因素的系统综述 [J]. 疾病监测, 2024, 39(4): 488-496.
- [3] 李浩甲, 杨文曲, 韩冲芳, 等. 去铁胺对糖尿病大鼠心肌细胞铁死亡通路的影响 [J]. 医学研究杂志, 2020, 49(9): 116-119.
- [4] 廖江龙, 范子祥, 孟秋月, 等. 丹参活性成分抗肿瘤分子机制研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(18): 6402-6415.
- [5] 刘彬, 刘文平, 靳涛. 右美托咪定减轻糖尿病心肌缺血/再灌注大鼠心肌损伤及炎症反应 [J]. 基础医学与临床, 2024, 44(11): 1538-1543.
- [6] 李翔, 赵琴琴, 郑鸣之, 等. 黄芪甲苷和丹参素对大鼠心肌缺血后心功能的保护作用研究 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(18): 2208-2214.
- [7] 潘敏丽, 黄国定, 蔡冠虎, 等. 基于 Nrf2-GPX4 铁死亡途径探讨芒果苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用机制 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2024, 22(4): 646-652.
- [8] 陈璐, 聂永伟, 张燕欣, 等. 丹参单体化合物及丹参类制剂对心脑血管系统信号通路影响的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(11): 2333-2342.
- [9] 张婷, 姚广泽, 陈慧婷, 等. NRF2 介导的还原应激在神经致 HaCaT 细胞恶性转化中的作用 [J]. 卫生研究, 2024, 53(5): 763-770.
- [10] 丁宁静, 李志平, 王海霞. 基于 Nrf2/Gpx4 通路研究右美托咪定对缺血缺氧性脑损伤新生大鼠铁死亡及神经功能的影响 [J]. 河北医药, 2024, 46(17): 2586-2590.
- [11] 张梦, 萧闵, 蔡婷, 等. 三七皂苷 R1 调控 Nrf2 介导的铁死亡途径改善 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化 [J]. 中草药, 2024, 55(15): 5135-5144.
- [12] 许静, 霍康, 郭秦乐, 等. 地黄苷 A 对 CLP 诱导的脓毒症大鼠脑功能障碍和 Nrf2/GPX4 介导的铁死亡通路的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2024, 24(14): 2619-2625.

[责任编辑 金玉洁]