

牛舌草水提物调控氧化磷酸化、糖酵解/糖异生、钠尿肽系统改善维拉帕米诱导的斑马鱼心力衰竭

铁晓璐¹, 霍仕霞^{1,2,3*}, 李治建^{1,2,3}, 祖力皮卡尔·吾斯曼^{2,3}, 张云^{4*}

1. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830011

2. 新疆维吾尔自治区维吾尔医医院, 新疆 乌鲁木齐 830049

3. 新疆中药医院制剂循证与转化重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830049

4. 齐鲁工业大学(山东省科学院), 山东省科学院生物研究所, 山东 济南 250103

摘要:目的 探讨牛舌草水提物(AIAE)抗心力衰竭作用及作用机制。方法 以AB野生型及Tg(*cmlc2:EGFP*)斑马鱼为研究对象,设置对照组、模型(200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸维拉帕米)组、地高辛(阳性药, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组、AIAE(0.1、0.5、2.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)组。给药后检测各组斑马鱼心包面积、静脉淤血面积、静脉窦-动脉球(SV-BA)距离、心率、短轴缩短率(FS)、射血分数(LVEF)、血流速度变化;吖啶橙染色观察心肌细胞凋亡,苏木素-伊红(HE)染色观察心脏组织病理变化;试剂盒法检测钠尿肽系统中N末端脑钠肽前体(NT-proBNP)含量;实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测脑钠肽(*bnp*)及心钠肽(*anp*) mRNA表达水平。通过转录组测序(RNA-seq)预测AIAE抗心力衰竭的相关信号通路,并利用qRT-PCR检测信号通路相关基因的表达水平。**结果** 与模型组相比,AIAE组斑马鱼心包面积、静脉淤血面积、SV-BA距离均显著减小($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),心肌细胞凋亡数减少,心率、FS、LVEF、血流速度显著升高($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),心脏壁厚度有不同程度恢复,NT-proBNP含量、*bnp*、*anp* mRNA表达水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。RNA-seq结果提示AIAE可能通过调控氧化磷酸化、糖酵解/糖异生等能量代谢相关通路发挥作用。qRT-PCR验证结果表明AIAE可调控上述通路*cox6a1*、*pck1*等基因的异常表达($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。**结论** AIAE通过调节氧化磷酸化、糖酵解/糖异生等信号通路,抑制钠尿肽系统激活,抑制心肌细胞凋亡发挥抗心力衰竭作用。

关键词: 牛舌草;心力衰竭;斑马鱼;氧化磷酸化;糖酵解/糖异生;钠尿肽

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)03-0627-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.03.009

Effect of aqueous extract of *Anchusa italica* on heart failure induced by verapamil in zebrafish by regulating oxidative phosphorylation, glycolysis/gluconogenesis and natriuretic peptide system

TIE Xiaolu¹, HUO Shixia^{1,2,3}, LI Zhijian^{1,2,3}, ZULIPIKAER Wusiman^{2,3}, ZHANG Yun⁴

1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

2. Uygur Medical Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi Xinjiang Uygur Autonomous Region 830049, China

3. Key Laboratory of Evidence-Based and Translation, Xinjiang Hospital preparation of Traditional Chinese Medicine., Urumqi Xinjiang Uygur Autonomous Region 830049, China

4. Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China

Abstract: Objective To investigate the effect and possible mechanism of aqueous extract of *Anchusa italica* (AIAE) on heart failure in zebrafish. **Methods** Zebrafish of AB wild type and Tg(*cmlc2:EGFP*) were used as research subjects. The control group, model group (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ verapamil hydrochloride), digoxin group (positive drug, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), and AIAE groups (0.1, 0.5, 2.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) were set

收稿日期: 2024-09-15

基金项目: 中央引导地方科技发展专项资金项目(ZYYD2024JD06); 天山创新团队项目(2024D14018); 新疆维吾尔自治区重点实验室开放课题(KLUMH-202404)

作者简介: 铁晓璐, 女, 硕士研究生, 研究方向为药理学。E-mail: txl211048@163.com

*通信作者: 霍仕霞, 女, 研究员, 硕士生导师, 主要从事中药民族药物物质基础及新药研发。E-mail: huoshixia1983@163.com

张云, 女, 研究员, 主要从事药理学研究。E-mail: xiaohan_0818@163.com

up. After administration, the pericardial area, venous congestion area, distance between sinus venosus and bulbus arteriosus (SV-BA), heart rate, fractional shortening (FS), left ventricular ejection fraction (LVEF), and blood flow velocity changes of zebrafish in each group were detected. Acridine orange staining was used to observe myocardial cell apoptosis, and hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in cardiac tissue. The content of *N*-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) in the natriuretic peptide system was detected by kit method. The mRNA expression levels of brain natriuretic peptide (*bnp*) and atrial natriuretic peptide (*anp*) were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). The related signaling pathways of AIAE in anti-heart failure were predicted by transcriptome sequencing (RNA-seq), and the expression levels of related genes in the signaling pathways were detected by qRT-PCR. **Results** Compared with the model group, the pericardial area, venous congestion area, SV-BA distance, NT-proBNP content, *bnp* and *anp* mRNA expression levels were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), the number of cardiomyocyte apoptosis was reduced, the heart rate, FS, LVEF and blood flow velocity were significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and the heart wall thickness was restored to different degrees in the AIAE groups. RNA-seq results suggested that AIAE may play a role in regulating oxidative phosphorylation, glycolysis/gluconeogenesis and other energy metabolism-related pathways. qRT-PCR results showed that AIAE could regulate the abnormal expression of *cox6a1*, *pck1* and other genes in this pathway ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** The AIAE plays an anti-heart failure role by regulating oxidative phosphorylation, glycolysis/gluconeogenesis and other signaling pathways, inhibiting the activation of NP system and inhibiting cardiomyocyte apoptosis.

Key words: *Anchusa italica* Retz.; heart failure; zebrafish; oxidative phosphorylation; glycolysis/gluconeogenesis; natriuretic peptides

心力衰竭是一种复杂的临床综合征,是各种心脏疾病的终末期表现且为多种疾病的并发症,可导致较高的死亡率^[1]。近年来,随着人口老龄化程度加重,心力衰竭患者的数量大幅增加^[2]。目前,临床治疗心力衰竭的常用药物有地高辛、“沙坦”类药物、芪参益气滴丸、芪蒴强心胶囊等^[3]。近年来,现代医学已经证明中药具有多组分、多靶点、多环节综合调控的特点,中药在临床实践中的有效性和安全性在一系列循证医学研究中被充分证明^[4]。维吾尔药是中药的重要组成部分,对心血管疾病有独特的预防和治疗效果。牛舌草为紫草科植物牛舌草 *Anchusa italica* Retz.或琉璃苣 *Orage officinales* L.的干燥地上部分,又名高孜万、高孜班,收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·维吾尔药分册》。维吾尔医认为牛舌草具有生湿生热、爽身悦志、增强支配器官及感觉器官的功能,用于治疗心悸、失眠、神志不安、头痛等。牛舌草在艾热克高孜班蒸露、合米日高孜班糖膏、谢日比提高孜班糖浆等具有心血管保护作用的经典复方制剂中被普遍应用,是维吾尔医用于治疗心血管疾病的常用药材之一^[5-7]。

斑马鱼小而透明,能够对其体内器官和生物过程进行高分辨率非侵入性的可视化分析^[8]。斑马鱼的心脏在结构、功能、信号通路和离子通道等方面与人类心脏高度相似^[9]。心脏是斑马鱼体内第一个发挥作用的器官,其心脏在受精后 2 天 (2 dpf) 完全形成。斑马鱼心脏中具有人类心脏离子通道的直系同源物,表现为心肌细胞动作电位与人类心肌细

胞动作电位相似的特征^[10]。斑马鱼具有与人类相似的心率 (120~140 次·min⁻¹)^[11],并且斑马鱼的心电图也与人类的心电图相似,具有明显的 P 波、QRS 波群和 T 波^[12]。近年来,斑马鱼已作为心血管疾病动物模型,被广泛用于心血管药物筛选。Zhu 等^[13]采用维拉帕米建立和优化斑马鱼心力衰竭模型,并利用 6 种治疗心力衰竭药物验证了该模型的可靠性。在本研究中,采用维拉帕米诱导建立斑马鱼心力衰竭模型,探究牛舌草水提物 (AIAE) 对斑马鱼心力衰竭的治疗效果,并阐明其作用机制。

1 材料

1.1 药材

牛舌草 (批号 C202403001) 购自河北嘉恒冷背药业有限公司,经新疆维吾尔自治区维吾尔医医院买买提依力·努尔买买提主任药师定为紫草科舌兰草属牛舌草 *Anchusa italica* Retz.干燥全草。

1.2 实验动物

本实验采用野生型 AB 品系斑马鱼和心脏标记绿色荧光转基因斑马鱼 *Tg (cmcl2: EGFP)*,均由山东省科学院生物研究所斑马鱼药物筛选平台提供。成鱼饲养在斑马鱼养殖系统,明暗周期为黑暗 10 h/光照 14 h,温度为 (28.0±0.5) °C。在实验前 1 d 15:30 时取健康性成熟的雌、雄斑马鱼,以雌雄 1:1 或者 1:2 的比例放入产卵缸,并将雌雄斑马鱼用隔板分开。次日 8:30 移去隔板,9:30 收集受精卵。收集好的受精卵清洗后移入含有亚甲基

蓝的斑马鱼胚胎培养用水中, 放于 28 °C 恒温培养箱中控光培养, 以备使用。

1.3 试剂

盐酸维拉帕米 (质量分数 99.0%, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号 D23231227); 地高辛 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号 G2318838); 吖啶橙染料 (上海源叶生物科技有限公司, 批号 A18HS186460); 斑马鱼 *N* 末端脑钠肽前体 (NT-proBNP) ELISA 科研试剂盒 (江苏酶免实业有限公司, 货号 MM-1142F2); HiScript III RT DuperMix for qPCR[诺唯赞 (南京) 生物科技有限公司, 批号 R323-01]; 实验用水为斑马鱼胚胎培养用水 (5.0 mmol·L⁻¹ NaCl、0.17 mmol·L⁻¹ KCl、0.4 mmol·L⁻¹ CaCl₂、0.16 mmol·L⁻¹ MgSO₄)。

1.4 仪器

斑马鱼养殖系统 (北京爱生科技有限公司); SZX16 型体视荧光显微镜 (日本 Olympus 有限公司); AXIO-V16 型蔡司荧光显微镜 (德国 Carl Zeiss 股份有限公司); Donatello 型脱水机 (DIAPATHA 公司); JB-P5 型包埋机 (武汉俊杰电子有限公司); RM2016 型病理切片机 (上海徕卡仪器有限公司); KD-P 型组织摊片机 (浙江省金华市科迪仪器设备有限公司); MDF-U54V 型超低温冰箱 (日本 Panasonic 股份有限公司); BIO-RAD C100 型梯度 PCR 仪[仪生仪世(上海)生物科技有限公司]; Bullet Blender 型荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司); Infinite F50 型酶标仪[帝肯(上海)实验器材有限公司]; TG16-W 型微量高速离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司)。

2 方法

2.1 AIAE 的制备

称取牛舌草干燥全草 2000 g, 加入 8 倍质量纯净水煮沸, 提取 2 次, 滤过浓缩。将所得浓缩液干燥并粉碎, 得到 AIAE 粉末, 称质量并计算后得到干膏率为 9.49%。经 HPLC 检测 AIAE 含迷迭香酸 9.48 mg·g⁻¹、烟花苷 1.27 mg·g⁻¹。

2.2 药物溶液的配制

将 AIAE 用斑马鱼胚胎培养用水稀释成相应给药浓度。精密称取盐酸维拉帕米 0.02 g 溶于 509 mL 斑马鱼胚胎培养用水中, 振荡混匀得浓度为 80 mmol·L⁻¹ 的盐酸维拉帕米母液, 吸取 5 μL 于 2 mL 斑马鱼胚胎培养用水中即得 200 μmol·L⁻¹ 盐酸维拉帕米溶液, 现配现用。地高辛临用时用

二甲基亚砜(DMSO)配制质量浓度为 10 mg·mL⁻¹ 母液, 吸取 2 μL 于 2 mL 斑马鱼胚胎培养用水中即得 10 μg·mL⁻¹ 地高辛溶液。

2.3 AIAE 给药质量浓度的确定

挑选发育正常的 2 dpf 的野生型 AB 品系斑马鱼, 放入 24 孔板中, 每孔 10 尾。设置对照组、不同质量浓度 AIAE 组。对照组给予斑马鱼胚胎培养用水, AIAE 组用斑马鱼胚胎培养用水稀释至不同质量浓度 (0.1、0.5、2.5、5.0、25.0、50.0 mg·mL⁻¹), 置于 28 °C 恒温培养箱 4.5 h。统计各组斑马鱼死亡、畸形情况, 将 AIAE 对斑马鱼的最大安全浓度确定为 AIAE 给药组的高浓度。

2.4 AIAE 对心力衰竭斑马鱼心包面积、静脉瘀血面积、静脉窦-动脉球 (SV-BA) 距离的影响

挑选发育正常的 2 dpf 野生型 AB 品系斑马鱼放入 24 孔板中, 每孔 10 尾, 设置对照组、模型组、地高辛 (阳性药, 10 μg·mL⁻¹) 组、AIAE (0.1、0.5、2.5 mg·mL⁻¹) 组。地高辛组和 AIAE 组给予相应质量浓度药物置于 28 °C 恒温培养箱预处理 4.5 h 后洗去药物, 并用斑马鱼胚胎培养用水洗涤 2~3 遍。随后模型组、地高辛组和 AIAE 组加入盐酸维拉帕米 (200 μmol·L⁻¹), 作用 30 min。处理结束后将斑马鱼用质量浓度为 0.3% 的三卡因麻醉 1 min, 显微镜下观察斑马鱼心脏形态并拍照, 使用 Image J 软件测量各组斑马鱼心包面积、静脉瘀血面积、SV-BA 距离。

2.5 AIAE 对心力衰竭斑马鱼心率、短轴缩短率 (FS)、射血分数 (LVEF) 及血流速度的影响

挑选发育正常的 2 dpf 心脏标记绿色荧光转基因斑马鱼 *Tg (cmlc2: EGFP)* 放入 24 孔板中, 每孔 10 尾, 同“2.4”项下方法分组、给药、造模 30 min 后将斑马鱼用斑马鱼胚胎培养用水洗涤 2~3 遍, 记录心率, 荧光显微镜下观察斑马鱼心脏形态并拍照, 使用 Image J 软件测量各个组斑马鱼短轴、长轴距离, 并计算 FS、LVEF; 使用显微镜和 Blood Flow v5.18.0.0、MicroZebraLab BloodFlow v 3.4.6 软件记录并分析血流速度。

$$\text{舒张/收缩末期心室体积} (\mu\text{m}^3) = 0.523 \times \text{短轴长度}^2 (\mu\text{m}^2) \times \text{长轴长度} (\mu\text{m})$$

$$\text{FS} = (\text{舒张末期短轴长度} - \text{收缩末期短轴长度}) / \text{舒张末期短轴长度}$$

$$\text{LVEF} = \text{每搏输出量} / \text{心室舒张末期体积} (\text{每搏输出量} = \text{舒张末期体积} - \text{收缩末期体积})$$

2.6 AIAE 对心力衰竭斑马鱼心肌细胞凋亡的影响

挑选发育正常的 2 dpf 野生型 AB 品系斑马鱼放入 24 孔板中, 每孔 10 尾, 同“2.4”项下方法分组、给药、造模 30 min 后, 用斑马鱼胚胎培养用水洗涤 3 次。去除斑马鱼胚胎培养用水后每孔加入 2 mL 吖啶橙染色溶液 ($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 避光, 放置培养箱中孵育 30 min, 用斑马鱼胚胎培养用水洗涤 3 次, 加入 0.3% 的三卡因麻醉 1 min, 在荧光显微镜下观察并拍照。

2.7 AIAE 对心力衰竭斑马鱼心脏组织病理的影响

挑选发育正常的 2 dpf 野生型 AB 品系斑马鱼放入 24 孔板中, 每孔 10 尾, 设置对照组、模型组、AIAE (0.1 、 0.5 、 $2.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组, 同“2.4”项下方法给药、造模 30 min 后, 用斑马鱼胚胎培养用水洗涤 3 次。取 5~10 条于适量三卡因中麻醉, 再转入 4% 多聚甲醛对斑马鱼进行固定 96 h 后用梯度乙醇、醇苯、二甲苯脱水, 在包埋机中以石蜡包埋后 $4 \mu\text{m}$ 切片, 脱蜡至水, 纯净水冲洗后进行苏木素-伊红 (HE) 染色, 洗净切片放入梯度乙醇; 二甲苯中脱水至透明, 晾干, 用中性树胶封片, 在显微镜下观察并拍照。

2.8 利钠肽系统中 NT-proBNP 含量、*bnp* 及 *anp* mRNA 表达变化情况

挑选发育正常的 2 dpf 野生型 AB 品系斑马鱼放入 24 孔板中, 每孔 10 尾, 同“2.7”项下方法分组、给药、造模 30 min 后, 收集对照组、模型组、AIAE 组斑马鱼于 1.5 mL 无酶灭菌 EP 管中, 先用斑马鱼胚胎培养用水洗涤 2~3 次, 再用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次, 接着向 EP 管中加入 PBS 后进行匀浆并离心后收集上清液。分别设空白孔、标准孔、样品孔, 在酶标包被板上准确上样标准品 $50 \mu\text{L}$, 样品孔加入已稀释样品 $50 \mu\text{L}$ 。接着用封板膜封板后于 37°C 温育 30 min, 30 min 后揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 s 后弃去, 重复 5 次, 拍干。每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 酶标试剂, 温育洗涤后加入显色剂避光显色 10 min, 每孔再加入 $50 \mu\text{L}$ 终止液, 于 450 nm 波长下依次检测各孔吸光度。

挑选发育正常的 2 dpf 野生型 AB 品系斑马鱼放入 24 孔板中, 每孔 10 尾, 同“2.7”项下方法分组、给药、造模 30 min 后, 收集对照组、模型组、AIAE 组斑马鱼于 1.5 mL 无酶灭菌 EP 管中,

先用斑马鱼胚胎培养用水洗涤 2~3 次, 再用 PBS 洗涤 3 次, 利用 RNA 提取试剂盒提取各组样品总 RNA 后进行逆转录合成 cDNA, 进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 反应。逆转录过程如下: 首先在 RNase-free 离心管中配制含有 RNase-free ddH_2O 、 $4\times\text{g DNA wiper Mix}$ 、模板 RNA 的混合液, 吹打混匀后在 42°C 中加热 2 min; 然后向管中加入 $5\times\text{No RT Control Mix}$, 吹打混匀后先在 37°C 中加热 15 min, 继续在 85°C 中加热 5 s。qRT-PCR 反应过程如下: 95°C 预变性 1 min, 每个循环变性为 95°C 、20 s, 共 40 个循环, 55°C 、20 s 的退火和 72°C 、30 s 的延伸。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相对于内参基因 *rpl13a* 的 mRNA 表达水平。引物序列见表 1。

2.9 转录组测序

挑选发育正常的 2 dpf 野生型 AB 品系斑马鱼放入 24 孔板中, 每孔 10 尾, 设置对照组、模型组、AIAE ($2.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组, 同“2.4”项下方法给药、造模 30 min 后, 收集各组斑马鱼于 1.5 mL 无酶灭菌 EP 管中, 先用斑马鱼胚胎培养用水洗涤 2~3 次, 再用 PBS 洗涤 3 次, 去除 PBS 后将 EP 管放在液氮中。使用 Trizol 法提取总 RNA, 基因测序及原始数据分析由上海欧易生物医学科技有限公司完成。根据 RNA-seq 结果, 以 KEGG 数据库为背景, 进行基因集富集分析 (GSEA), 根据标准化富集得分 (NES) 对对照组、模型组、AIAE ($2.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组进行排序并作出气泡图, 根据差异基因绘制热图和富集分数 (ES) 折线图。

2.10 qRT-PCR 验证关键基因表达

利用“2.9”项下已提取总 RNA 进行逆转录合成 cDNA 进行 qRT-PCR 反应, 同“2.8”项下方法。引物序列见表 1。

2.11 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0.2 对数据进行统计学分析, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据经正态性检验和方差齐性检验, 数据符合正态性和方差齐性选择 *t* 检验; 否则选择秩和检验。多组比较选择单因素方差分析。

3 结果

3.1 AIAE 给药质量浓度的确定

如表 2 所示, 当 AIAE 质量浓度为 50、25、 $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 斑马鱼畸形率分别为 100%、100%、20%。当 AIAE 质量浓度为 $2.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 斑马鱼

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'→3')	
核糖体蛋白 L13A (<i>rpl13a</i>)	F: TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC	R: AGACGCACAATCTTGAGAGCAG
<i>bnp</i>	F: TTCAGCACCAGACCG	R: AGGCTGGAAACACTCAC
心房钠尿肽 (<i>anp</i>)	F: TGCTGCTCCTGGTTTGGC	R: GCTGTCTTCATAATCTACGGCTC
细胞色素 c 氧化酶亚基 6A1 (<i>cox6a1</i>)	F: GGTGAAAATGCAGCCAAGACC	R: GAGCGTCTTGTTGCCATCAC
泛醌氧化还原酶核心亚基 V1 (<i>ndufv1</i>)	F: ACGTTATCCGAGCTATCGCC	R: AGTGACGAATCAAGCCCTGAA
ATPase H ⁺ 转运 V0 亚基 c (<i>atp6v0ca</i>)	F: CAGCCTCCTGTCGGTTTTAGT	R: ACCCATCACTGCGAAGAAGG
细胞色素 c 氧化酶亚基 5B1 (<i>cox5b1</i>)	F: GAGCTGTGGTTTTGCGTCAC	R: TGTGGGAATACCCCCGGA
<i>neola</i>	F: GCTATCTGGGCAAAGGTGTCT	R: CTGGCTAACCAGACCAGGTG
<i>pkma</i>	F: GCCAGCGGCATCATCATACTC	R: CCACGAGCTTTACCGACATCC
磷脂酰肌醇酰化酶 a (<i>gpi</i> a)	F: TATCGGCTTGTCATCGCTC	R: GACTCCATGTCCCCCTGTTG
甘油醛-3 磷酸脱氢酶 (<i>gadh</i>)	F: TCCTGAGCTCAATGGCAAGC	R: GGCAGGTTTCTCAAGACGGA
磷酸果糖激酶 1a (<i>pfk1</i> a)	F: AGGTATGAACGCAGCCATCC	R: CCAGCCCTTGATAACCCTCG
<i>pk1r</i>	F: TGTCAGGATGGGTGCTCGTAT	R: GGACCGATGGTGCAGATGAT
<i>aldoaa</i>	F: TTAACGTGGTCGAGGCTGAT	R: CGTGAGGCATCTTGACTCAGTT
<i>pgm2</i>	F: AGCACTGCTTTCACAGGGAG	R: TTATCTGCAAGCGCGAAGGA
乙醛脱氢酶 3a2a (<i>aldh3a2</i> a)	F: TATCTCAGCGTTCAGCTCATT	R: AACTGTGTTGAGTTTGCCTC
磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 1 (<i>pck1</i>)	F: CCTCTGCCACTCAAGAAGCC	R: CCTCCTCTTTAGCGATGCGT

表 2 AIAE 不同给药质量浓度对斑马鱼死亡率和畸形率的影响
Table 2 Effect of different concentrations of AIAE on mortality and malformation rate of zebrafish

组别	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	死亡率/%	畸形率/%
对照	—	0	0
AIAE	0.1	0	0
	0.5	0	0
	2.5	0	0
	5.0	0	20
	25.0	0	100
	50.0	100	100

死亡率和畸形率均为 0，表明 2.5 mg·mL⁻¹ 为 AIAE 对斑马鱼的最大安全质量浓度。因此本实验选择 2.5、0.5、0.1 mg·mL⁻¹ 作为给药质量浓度。

3.2 AIAE 对心力衰竭斑马鱼心包面积、静脉瘀血面积、SV-BA 距离的影响

如图 1 所示，与对照组相比，心力衰竭模型组心包面积、静脉瘀血面积及 SV-BA 距离均显著增加 ($P<0.001$)。与模型组相比，地高辛组和 AIAE 组心包面积、静脉瘀血面积及 SV-BA 距离均显著减小

($P<0.05$ 、0.01、0.001)。

3.3 AIAE 对心力衰竭斑马鱼心率、FS、LVEF 及血流速度的影响

如图 2 所示，与对照组相比，心力衰竭模型组心率、FS、LVEF、血流速度显著降低 ($P<0.001$)；与模型组相比，除 0.5 mg·mL⁻¹ AIAE 组的心率指标外，其他 AIAE 组的心率、FS、LVEF、血流速度均显著增加 ($P<0.05$ 、0.01、0.001)。

3.4 AIAE 对心力衰竭斑马鱼心肌细胞凋亡的影响

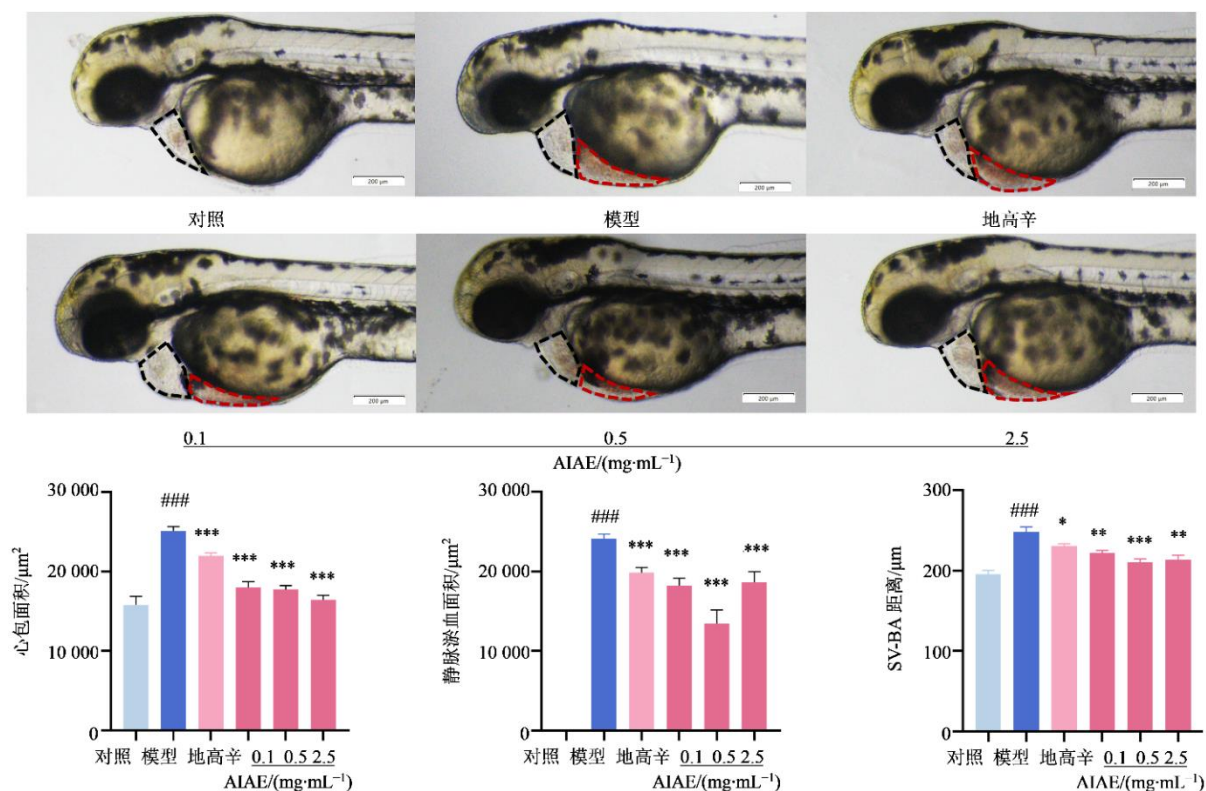
如图 3 所示，与对照组相比，心力衰竭模型组心肌细胞凋亡数目明显增加；与模型组相比，地高辛组和 AIAE 组心肌细胞凋亡数据明显减少。

3.5 AIAE 对心力衰竭斑马鱼心脏组织病理的影响

如图 4 所示，与对照组相比，心力衰竭模型组心脏壁厚度明显变薄；与模型组相比，AIAE 组心脏壁厚度明显变厚。

3.6 利钠肽系统中 NT-proBNP 含量、*bnp* 及 *anp* mRNA 表达变化情况

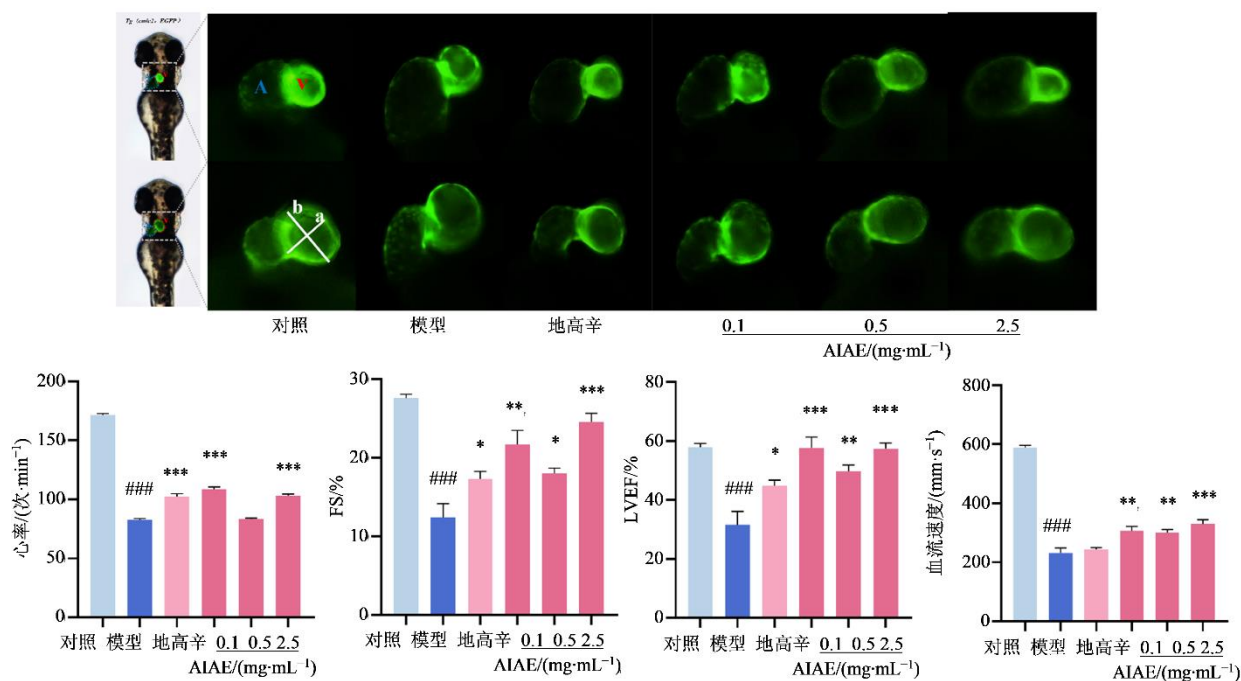
如图 5 所示，与对照组相比，心力衰竭模型组 NT-proBNP 含量显著增加 ($P<0.001$)，*bnp* 及 *anp* mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.001$)。与心力衰竭



黑色虚线面积为斑马鱼心包面积, 红色虚线面积为静脉淤血面积; 与对照组比较: $###P < 0.001$; 与模型组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ $***P < 0.001$ 。
Black dashed line represents pericardial area of zebrafish, red dashed line represents the area of venous congestion; $###P < 0.001$ vs control group; $*P < 0.05$ $*P < 0.01$ $***P < 0.001$ vs model group.

图 1 AIAE 对心包面积、静脉淤血面积、SV-BA 距离的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Fig. 1 Effect of AIAE on pericardial area, venous congestion area, and SV-BA distance ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)



A-心房, V-心室; a-心室短轴, b-心室长轴; 与对照组比较: $###P < 0.001$; 与模型组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ $***P < 0.001$ 。
A-atrium, V-ventricle; a-short axis of ventricle, b-long axis of ventricle; $###P < 0.001$ vs control group; $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ $***P < 0.001$ vs model group.

图 2 AIAE 对心力衰竭斑马鱼心率、FS、LVEF 及血流速度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

Fig. 2 Effects of AIAE on heart rate, FS, LVEF and blood flow velocity in heart failure zebrafish ($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

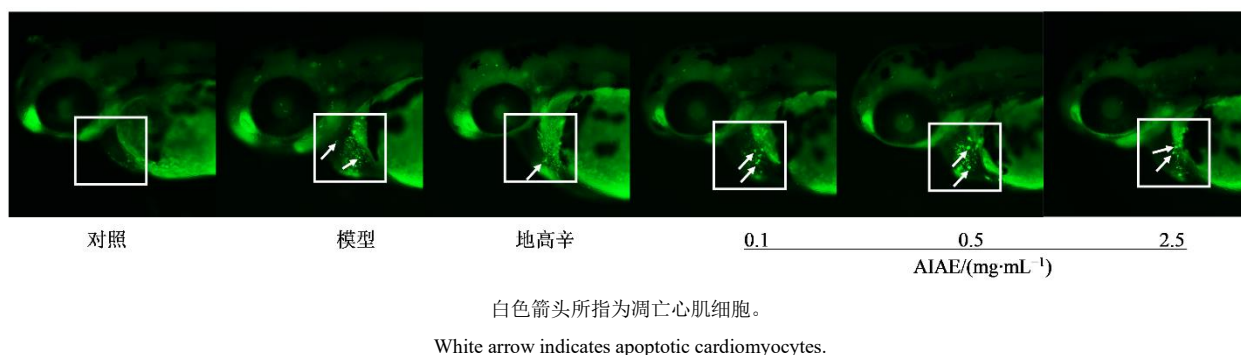


图 3 AIAE 对心力衰竭斑马鱼心肌细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of AIAE on apoptosis of heart failure zebrafish cardiomyocytes

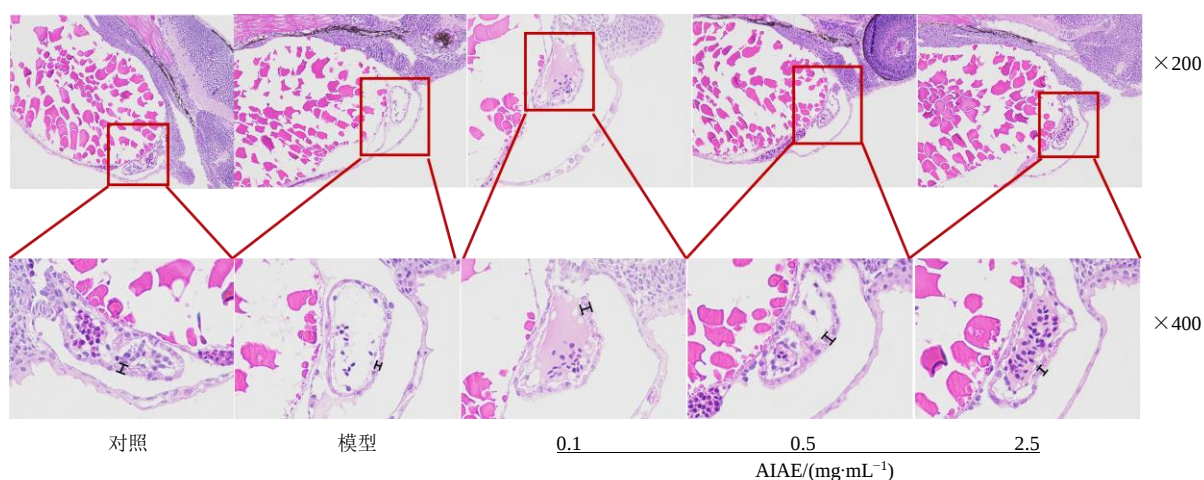
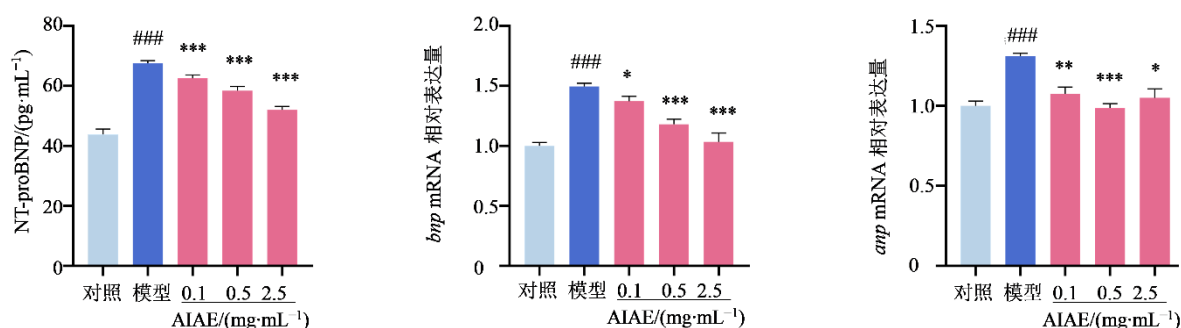


图 4 AIAE 对心力衰竭斑马鱼心脏组织病理的影响

Fig. 4 Effect of AIAE on cardiology in heart failure zebrafish

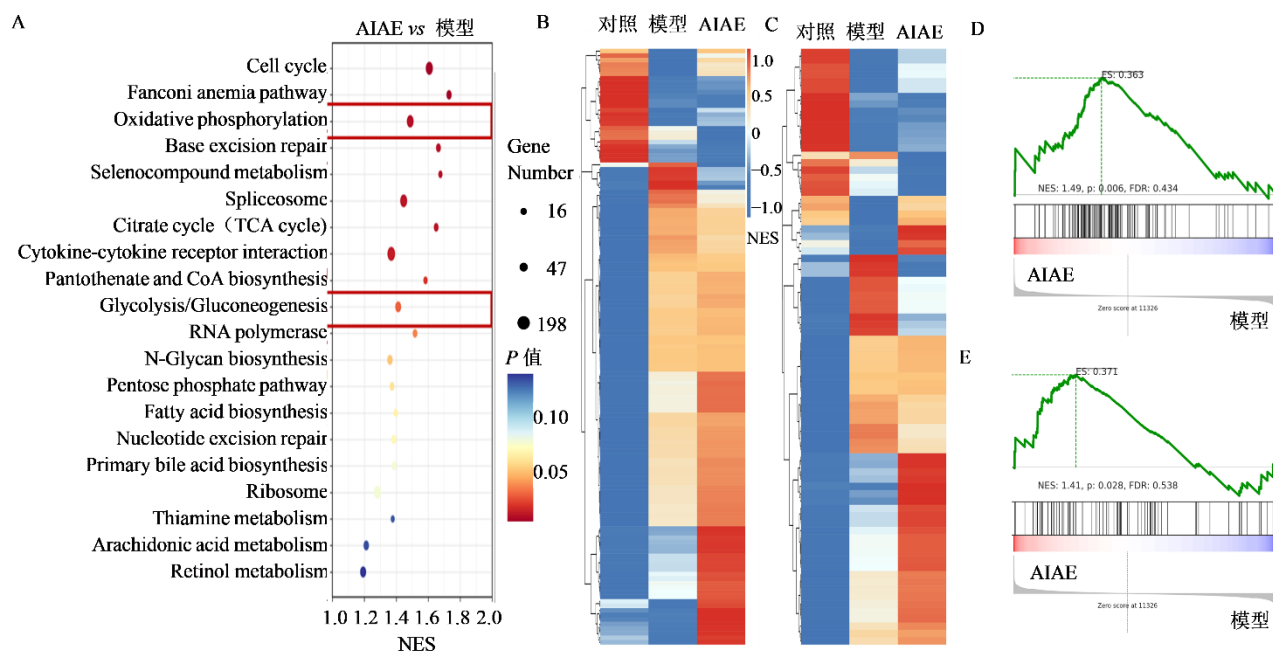
与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ 。^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group.图 5 各组 NT-proBNP 含量、*bnp* 及 *anp* mRNA 表达水平变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=30$)Fig. 5 Changes in content of NT-proBNP and mRNA expression level of *bnp* and *anp* in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=30$)

模型组相比, AIAE 组 NT-proBNP 含量显著减少并呈剂量相关性降低 ($P < 0.001$), *bnp* 及 *anp* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 且 *bnp*

的 mRNA 表达水平呈剂量相关性降低。

3.7 GSEA 结果

如图 6 所示, GSEA 结果显示, 心力衰竭模型



A-模型组和 AIAE 组 GSEA 分析中 KEGG 差异基因注释气泡图; B、C-氧化磷酸化和糖酵解/糖异生差异基因热图; D、E-氧化磷酸化和糖酵解/糖异生差异基因 ES 折线图。

A-KEGG differential gene annotation bubble plot in GSEA analysis of model group and AIAE group; B, C-oxidation phosphorylation and glycolysis/gluconeogenesis differential gene heatmap; D, E-oxidation phosphorylation and glycolysis/gluconeogenesis differential gene ES line chart.

图 6 GSEA 结果

Fig. 6 Results of GSEA

组与 AIAE 组差异基因主要富集在细胞周期 (Cell cycle)、范可尼修复途径 (Fanconi anemia pathway)、氧化磷酸化 (Oxidative phosphorylation)、剪接体 (Spliceosome)、细胞因子-细胞因子受体相互作用 (Cytokine-cytokine receptor interaction)、糖酵解/糖异生 (Glycolysis/Gluconeogenesis) 等信号通路。

3.8 qRT-PCR 验证 GSEA 分析差异基因表达结果

如图 7 所示, 在氧化磷酸化通路中, 与对照组相比, 心力衰竭模型组 *ndufv1*、*atp6v0ca* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), *cox5b1* 和 *cox6a1* mRNA 表达水平虽无统计学差异, 但有升高和降低趋势。与模型组比较, AIAE 组 *cox6a1*、*atp6v0ca* mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), *cox5b1* 和 *ndufv1* mRNA 表达水平虽无统计学差异, 但有降低和升高趋势。

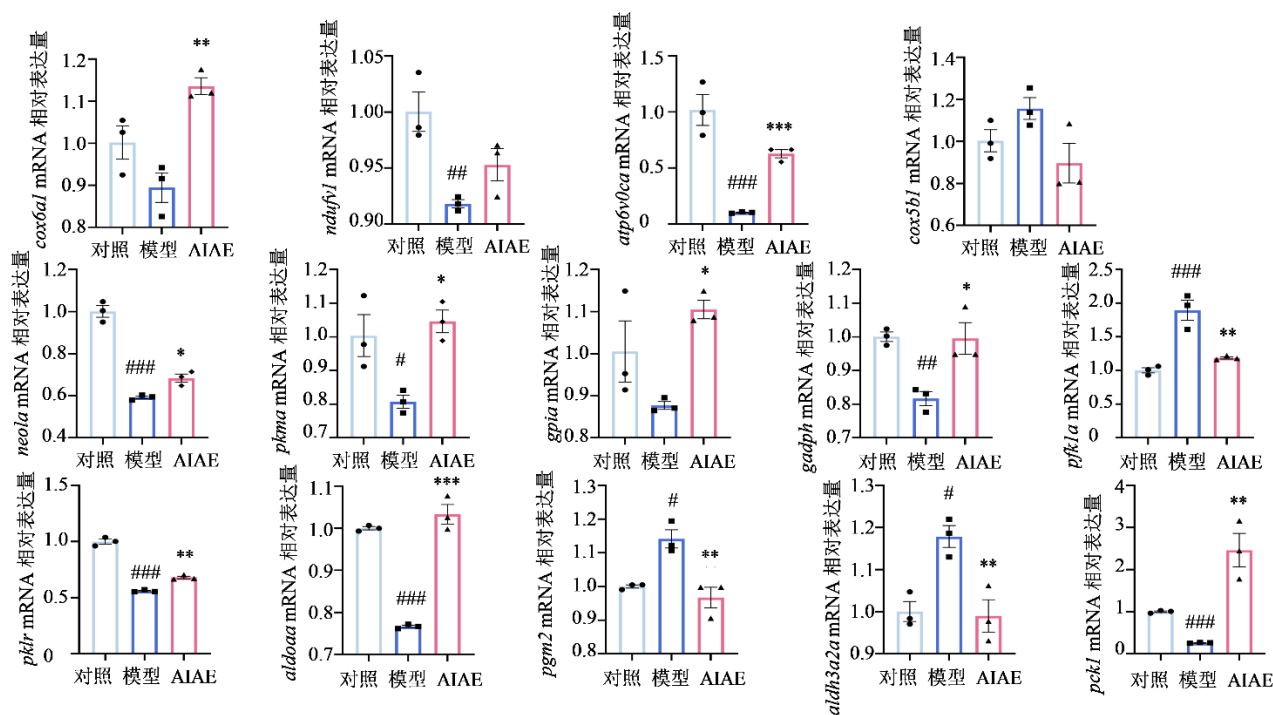
如图 7 所示, 在糖酵解/糖异生通路中, 与对照组相比, 心力衰竭模型组 *neola*、*pkma*、*gadph*、*pklr*、*aldoaa*、*pck1* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), *pfk1a*、*pgm2*、*aldh3a2a* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001)。与模型组比较, AIAE 组 *neola*、*pkma*、*gadph*、*pklr*、*aldoaa*、*pck1*

mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), *pfk1a*、*pgm2*、*aldh3a2a* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。

4 讨论

心力衰竭具有不可逆性^[14], 因此早期干预以防止其发生至关重要, 中药在治疗心力衰竭中发挥着重要作用^[15]。在本研究中, 以维吾尔医治疗心血管疾病常用药材牛舌草为研究对象, 证明 AIAE 可改善维拉帕米诱导的斑马鱼心脏功能异常, 有效治疗心力衰竭, 为临床用药提供参考依据。

维拉帕米是心力衰竭斑马鱼模型常用的造模药, 利用维拉帕米建立的心力衰竭斑马鱼模型具有稳定性高、可重复性高的优势。暴露于一定浓度维拉帕米环境中的斑马鱼出现心包水肿、静脉淤血, 这些症状与人类心力衰竭患者观察到的病理生理学相似^[16]。正常斑马鱼的心房和心室处于并列状态, 在侧视图中基本重叠^[17], 当发生心力衰竭时, 心房和心室发生环化并趋于线性, 导致 SV-BA 距离的增加。在本研究中, 模型组出现了明显的心包水肿和静脉淤血, 且 SV-BA 距离增加, 证明维拉帕米成功诱导斑马鱼心力衰竭。给予 AIAE 后, 心包水



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group。

图 7 qRT-PCR 验证 GSEA 分析差异基因表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 7 qRT-PCR verifies expression of differential genes for GSEA analysis ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

肿、静脉淤血、SV-BA 距离均有所缓解。

LVEF 能直接反映心脏的供血功能,是判断心力衰竭的主要指标之一,LVEF 的降低直接反映心肌收缩异常^[18]。FS 也是评价心肌收缩力的常用指标。当心力衰竭发生时,血液供应发生功能障碍,血流速度变慢,导致心肌收缩力和舒张力下降。且维拉帕米为钙离子通道阻滞剂,过量的维拉帕米会导致心率减慢。在本研究中,模型组的心率、LVEF、FS、血流速度显著减慢,给予 AIAE 治疗后均显著恢复,反映出 AIAE 可明显改善心脏功能。

心力衰竭发生时,心室发生进行性扩张并导致室壁压力增加和壁变薄,而细胞凋亡是心肌细胞损伤的主要原因,进一步导致心力衰竭患者心功能减弱^[19]。利钠肽是发现最早和应用最广的心力衰竭生物标志物,当室壁压力增加时,利钠肽系统被激活,导致 NT-proBNP 含量增加^[20],*bnp*、*anp* mRNA 表达增加^[21],且表达水平越高代表心力衰竭严重程度越大。在本研究中,模型组心脏壁明显变薄,心肌细胞凋亡数目增加,给予 AIAE 治疗后有所缓解,下调 NT-proBNP 含量、*bnp*、*anp* mRNA 表达,且 NT-proBNP、*bnp* 呈浓度相关性,浓度越高,下调效

果越好。

为进一步探究 AIAE 抗心力衰竭的作用机制,本研究利用转录组测序以及 qRT-PCR 寻找并验证其发挥作用的信号通路。正常生理状态下心脏主要通过脂肪酸、葡萄糖代谢供能,维持正常心肌收缩功能的 ATP 主要来源于线粒体氧化磷酸化和糖酵解^[22]。氧化磷酸化是电子传递和 ATP 形成的偶联机制^[23],糖酵解将葡萄糖转化为乳酸,并在厌氧条件下提供 ATP^[24]。心力衰竭发生时,心肌中 ATP 水平降低,心肌细胞中线粒体结构异常,氧化磷酸化过程受损,并且代偿性的糖酵解增加^[25]。*cox6a1* 是一种细胞色素氧化酶,在细胞呼吸过程中,参与电子传递链中的氧化磷酸化反应,将化学能转为 ATP 能量,并且在心力衰竭发生时,其 mRNA 表达水平降低^[26]。*pck1* 是参与糖异生过程的限速酶,当心脏损伤时,其 mRNA 表达水平下降^[27]。本研究中,RT-qPCR 结果表明,模型组 *cox6a1*、*pck1* mRNA 表达水平降低,给予 AIAE 后 *cox6a1*、*pck1* mRNA 表达水平显著增加。*ndufv1* 属于线粒体复合物 I 的一个重要亚基,在线粒体氧化磷酸化系统中起重要作用,在心力衰竭发生时,其 mRNA 表达水平降低^[28]。本

研究中 qRT-PCR 结果表明, 模型组 *ndufv1* mRNA 表达水平显著降低, 给予 AIAE 后该基因的 mRNA 水平与模型组相比虽无统计学差异, 但有上调趋势。本研究中, 转录组测序和 qRT-PCR 结果表明 AIAE 可通过调控氧化磷酸化、糖酵解/糖异生等信号通路发挥抗心力衰竭活性。

AIAE 可明显改善心力衰竭斑马鱼心功能, 提高血流速度, 改善心脏壁厚度, 通过调节氧化磷酸化、糖酵解/糖异生等信号通路, 抑制利钠肽系统激活, 抑制心肌细胞凋亡发挥抗心力衰竭活性。本研究可为 AIAE 在心力衰竭药物中的应用提供斑马鱼实验依据。由于心力衰竭发病机制复杂, 仅从基因水平探讨牛舌草的治疗机制尚不全面, 后续将结合靶点预测、蛋白组学等多个层面进一步明确牛舌草发挥抗心力衰竭活性的作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wong C M, Hawkins N M, Ezekowitz J A, et al. Heart failure in young adults is associated with high mortality: A contemporary population-level analysis [J]. *Can J Cardiol*, 2017, 33(11): 1472-1477.
- [2] Jain V, Minhas A M K, Khan S U, et al. Trends in HF hospitalizations among young adults in the United States from 2004 to 2018 [J]. *JACC Heart Fail*, 2022, 10(5): 350-362.
- [3] 吴娟, 龙萍, 曾露, 等. 《中国心力衰竭诊断和治疗指南 2024》药物更新透视 [J/OL]. *医药导报*, 2024: 1-11. Wu J, Long P, Zeng L. Pharmacologic therapy updates of 2024 guidelines for the diagnosis and treatment of heart failure in China [J/OL]. *Her Med*, 2024: 1-11.
- [4] Hao P P, Jiang F, Cheng J, et al. Traditional Chinese medicine for cardiovascular disease: Evidence and potential mechanisms [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 69(24): 2952-2966.
- [5] 付瑾, 刘霞. 维药牛舌草的研究与应用 [J]. *安徽农业科学*, 2015, 43(11): 111-112, 115. Fu J, Liu X. Research and application of Uighur drug *Anchusa italica* Retz. [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2015, 43(11): 111-112, 115.
- [6] 阴苏月, 姜瑜, 王丹姝, 等. 牛舌草总黄酮通过 ROS/TXNIP/NLRP3 抑制炎症小体活化抗心肌缺血再灌注损伤 [J]. *中国药理学杂志*, 2021, 56(14): 1131-1137. Yin S Y, Jiang Y, Wang D S, et al. Total flavonoids of *Anchusa italica* Retz. inhibit activation of inflammasome through ROS/TXNIP/NLRP3 pathway to protect against myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Chin Pharm J*, 2021, 56(14): 1131-1137.
- [7] 中华人民共和国卫生部药品标准 [S]. 维吾尔药分册, 1998. Medicine standard promulgated by Ministry of public health of the People's Republic of China [S]. *Uyghur Medicine Volum*, 1998.
- [8] 张友刚. 基于斑马鱼模型的西洋参抗心衰和抗炎药效物质辨识 [D]. 太原: 山西医科大学, 2021. Zhang Y G. Identification of anti-heart failure and anti-inflammatory substances of *Panax quinquefolium* based on zebrafish model [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2021.
- [9] Bakkers J. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 91(2): 279-288.
- [10] Hecker L, Khait L, Sessions S K, et al. Functional evaluation of isolated zebrafish hearts [J]. *Zebrafish*, 2008, 5(4): 319-322.
- [11] Hassel D, Scholz E P, Trano N, et al. Deficient zebrafish ether-à-go-go-related gene channel gating causes short-QT syndrome in zebrafish reggae mutants [J]. *Circulation*, 2008, 117(7): 866-875.
- [12] Verkerk A O, Remme C A. Zebrafish: A novel research tool for cardiac (patho) electrophysiology and ion channel disorders [J]. *Front Physiol*, 2012, 3: 255.
- [13] Zhu X Y, Wu S Q, Guo S Y, et al. A zebrafish heart failure model for assessing therapeutic agents [J]. *Zebrafish*, 2018, 15(3): 243-253.
- [14] 徐佳慧, 胡世莲. 慢性心力衰竭的流行病学与预防措施 [J]. *中国临床保健杂志*, 2021, 24(6): 721-725. Xu J H, Hu S L. The epidemiology and prevention of chronic heart failure [J]. *Chin J Clin Healthc*, 2021, 24(6): 721-725.
- [15] 孔吉武, 李应宏, 杨旺胜, 等. 中药复方治疗心力衰竭的研究进展分析 [J]. *中国社区医师*, 2023, 39(1): 6-8. Kong J W, Li Y H, Yang W S, et al. Research progress analysis of traditional Chinese medicine compound prescription in treatment of heart failure [J]. *Chin Community Dr*, 2023, 39(1): 6-8.
- [16] Shimoni A, Maor-Kendler Y, Neuman Y. Verapamil-induced acute right heart failure [J]. *Am Heart J*, 1996, 132(1 Pt 1): 193-194.
- [17] Ma J Z, Huang Y, Jiang P, et al. Pyridaben induced cardiotoxicity during the looping stages of zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. *Aquat Toxicol*, 2021, 237: 105870.
- [18] Li T Y, Wei B Z, Cong J Y, et al. Direct estimation of left

- ventricular ejection fraction via a cardiac cycle feature learning architecture [J]. *Comput Biol Med*, 2020, 118: 103659.
- [19] Yan X, Wu H J, Ren J X, et al. Shenfu Formula reduces cardiomyocyte apoptosis in heart failure rats by regulating microRNAs [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 227: 105-112.
- [20] Jering K, Claggett B, Pfeffer M A, et al. Prognostic importance of NT-proBNP following high-risk myocardial infarction in the PARADISE-MI Trial [J]. *Eur Heart J*, 2022, 43(Supplement_2): ehac544.1324.
- [21] Xu C N, Kong L H, Ding P, et al. Melatonin ameliorates pressure overload-induced cardiac hypertrophy by attenuating Atg5-dependent autophagy and activating the Akt/mTOR pathway [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(10): 165848.
- [22] 王家琦, 刘立天. 心力衰竭中心肌能量代谢的研究进展 [J]. *河北医科大学学报*, 2022, 43(8): 962-965.
- Wang J Q, Liu L T. Research progress on energy metabolism in heart failure [J]. *J Hebei Med Univ*, 2022, 43(8): 962-965.
- [23] Wilson D F. Oxidative phosphorylation: Regulation and role in cellular and tissue metabolism [J]. *J Physiol*, 2017, 595(23): 7023-7038.
- [24] Kim Y H, Nakayama T, Nayak J. Glycolysis and the hexosamine biosynthetic pathway as novel targets for upper and lower airway inflammation [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2018, 10(1): 6-11.
- [25] Zhou M, Sun X, Wang C L, et al. PFKM inhibits doxorubicin-induced cardiotoxicity by enhancing oxidative phosphorylation and glycolysis [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 11684.
- [26] Warren J S, Oka S I, Abdellatif M, et al. Abstract 418: Perm1 is a novel regulator of mitochondrial energetics in cardiomyocytes [J]. *Circ Res*, 2018, 123: Suppl_1.
- [27] Zhu Z D, Ye J Y, Niu H, et al. Effects of microRNA-292-5p on myocardial ischemia-reperfusion injury through the peroxisome proliferator-activated receptor- α /- γ signaling pathway [J]. *Gene Ther*, 2018, 25(3): 234-248.
- [28] Shinichi Oka, Amira Sabry, Amanda Horiuchi, et al. Perm1 is a novel regulator of cardiac energetics and function [J]. *Circul Res*, 2020, 127: Suppl_1.

[责任编辑 兰新新]