【 实验研究 】

丹参有效成分改善斑马鱼急性心力衰竭的药效评价及作用机制

阎金峰[1,2]，刘延奥[3]，张姗姗[3]，江小华[1*]，靳　梦[2*]

1. 华北理工大学　基础医学院&公共卫生学院，河北 唐山　063210
2. 山东第一医科大学（山东省医学科学院）脑科学与类脑研究院，山东 济南　250117
3. 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　评价丹参醇提物（SMEE）对维拉帕米诱导斑马鱼急性心力衰竭的保护作用，筛选活性单体并探讨其作用机制。**方法**　以 2 dpf 野生型 AB 斑马鱼和心脏荧光转基因斑马鱼 *Tg*（*cmlc2*：*EGFP*）为研究对象，采用维拉帕米诱导急性心力衰竭，检测静脉窦-动脉球（SV-BA）距离、心包水肿、静脉淤血、心室短轴缩短率、每搏输出量、射血分数、心率、血流速度及 *nppa*、*nppb* mRNA 表达，评价 SMEE（10、20、40 μg·mL^{-1}）的心脏保护作用。采用 UPLC-Q-TOF/MS 表征 SMEE 主要化学成分，结合网络药理学、Lipinski 规则及结构相似性分析优选候选活性单体，并利用斑马鱼心力衰竭模型进行验证。采用 H_2O_2 诱导 AC16 心肌细胞损伤，给予迷迭香酸（10、20、40 μg·mL^{-1}）处理 24 h，检测细胞活力、B 型钠尿肽（BNP）、心房钠尿肽（ANP）含量及总超氧化物歧化酶（T-SOD）活性；结合蛋白质组学筛选相关通路及蛋白，采用 Western blotting 检测 PDZ 和 LIM 结构域蛋白 2（PDLIM2）、核因子-κB p65（NF-κB p65）及 p-NF-κB p65 蛋白表达。**结果**　与对照组相比，模型组 SV-BA 距离、心包水肿面积、静脉瘀血面积及 *nppa*、*nppb* mRNA 相对表达量升高，心室短轴缩短率、每搏输出量、射血分数、心率和血流速度降低（P＜0.001）；与模型组相比，高浓度 SMEE 组上述指标均显著改善（P＜0.001）。UPLC-Q-TOF/MS 共获得 50 个主要成分的质谱表征结果，其中相对峰面积占比约 1%及以上的成分 15 个，综合筛选后确定迷迭香酸为优先进行实验验证的候选活性单体。与模型组相比，各浓度迷迭香酸组 SV-BA 距离、心包水肿面积、静脉瘀血面积及 *nppa*、*nppb* mRNA 相对表达量均显著降低（P＜0.001）。在 H_2O_2 诱导的 AC16 细胞损伤模型中，模型组细胞活力和 T-SOD 活性降低，BNP、ANP 含量升高（P＜0.001）；与模型组相比，迷迭香酸组上述指标均显著改善（P＜0.01、0.001）。蛋白质组学结果显示心肌细胞骨架相关通路富集，并筛选出 PDLIM2 作为后续验证蛋白；Western blotting 结果显示，模型组 PDLIM2 蛋白表达升高，NF-κB p65 和 p-NF-κB p65 蛋白表达降低（P＜0.01、0.001）；与模型组相比，迷迭香酸处理后 NF-κB p65 表达升高、PDLIM2 表达降低（P＜0.001），p-NF-κB p65 表达升高（P＜0.05）。**结论**　迷迭香酸可在体内外模型中发挥心脏保护作用，其机制可能与调节 PDLIM2/NF-κB p65 信号、减轻氧化应激性心肌细胞损伤有关。

关键词：丹参；心力衰竭；迷迭香酸；细胞骨架；LIM 结构域蛋白 2（PDLIM2）

中图分类号：R965　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674 - 6376(2026)11 - 3807 - 17

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.11.002

Pharmacodynamic evaluation and mechanism of action of active constituents from *Salvia miltiorrhiza* in ameliorating acute heart failure in zebrafish

YAN Jinfeng[1,2], LIU Yan'ao[3], ZHANG Shanshan[3], JIANG Xiaohua[1], JIN Meng[2]

1. School of Basic Medical Sciences and School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China
2 Institute of Brain Science and Brain-Inspired Research, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250117, China
3. Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China

收稿日期：2026-06-26

基金项目：国家重点研发计划“战略性科技创新合作”重点专项（2026YFE0201900）；国家自然基金面上基金（82574783）；泰山学者青年专家项目（tsqn202312233）；山东第一医科大学（山东省医学科学院）临床-基础联合创新团队项目（202404）

作者简介：阎金峰，男，硕士研究生，研究方向为中药活性物质研究。E-mail: jinfengyan999@163.com

***通信作者：**江小华，女，教授，研究方向为神经系统退行性疾病研究。E-mail: jiangxiaohua@ncst.edu.cn

靳　梦，女，教授，研究方向为药理学研究。E-mail: mjin1985@hotmail.com

Abstract: Objective To evaluate the protective effect of the ethanol extract of *Salvia miltiorrhiza* (SMEE) against verapamil-induced acute heart failure in zebrafish, screen candidate active constituents, and investigate the underlying mechanism. **Methods** Wild-type AB zebrafish and cardiac fluorescent transgenic zebrafish *Tg* (*cmlc2*:*EGFP*) at 2 days post-fertilization (dpf) were used. Acute heart failure was induced by verapamil, and sinus venosus-bulbus arteriosus (SV-BA) distance, pericardial edema, venous congestion, ventricular fractional shortening, stroke volume, ejection fraction, heart rate, blood flow velocity, and *nppa* and *nppb* mRNA expression were measured to evaluate the cardioprotective effect of the SMEE (10, 20, and 40 μg·mL^{-1}). UPLC-Q-TOF/MS was used to characterize the major chemical constituents of the extract. Candidate active constituents were prioritized by integrating network pharmacology, Lipinski's rule, and structural similarity analysis, followed by validation in the zebrafish heart failure model. H_2O_2-induced injury was established in AC16 cardiomyocytes, after being treated with rosmarinic acid (10, 20, 40 μg·mL^{-1}) for 24 h, and cell viability, B-type natriuretic peptide (BNP) and atrial natriuretic peptide (ANP) contents, and total superoxide dismutase (T-SOD) activity were determined. Proteomics was performed to screen relevant pathways and proteins, and Western blotting was used to determine the protein expression of PDZ and LIM domain protein 2 (PDLIM2), nuclear factor-κB p65 (NF-κB p65), and phosphorylated NF-κB p65 (p-NF-κB p65). **Results** Compared with the control group, the model group showed increased SV-BA distance, pericardial edema area, venous congestion area, and *nppa* and *nppb* mRNA expression, together with decreased ventricular fractional shortening, stroke volume, ejection fraction, heart rate, and blood flow velocity ($P < 0.001$). Compared with the model group, all of the above indices were significantly improved in the high-concentration SMEE group ($P < 0.001$). A total of 52 major constituents were characterized by UPLC-Q-TOF/MS, of which 15 had relative peak areas of approximately 1% or higher. Integrated screening prioritized rosmarinic acid as the candidate active constituent for experimental validation. Compared with the model group, all concentrations of rosmarinic acid significantly reduced SV-BA distance, pericardial edema area, venous congestion area, and *nppa* and *nppb* mRNA expression in zebrafish ($P < 0.001$). In the H_2O_2-induced AC16 cell injury model, the model group exhibited decreased cell viability and T-SOD activity and increased BNP and ANP contents ($P < 0.001$). Compared with the model group, all of these indices were significantly improved by the medium-concentration rosmarinic acid treatment ($P < 0.001$) and by the high-concentration treatment ($P < 0.01$). Proteomic analysis showed enrichment of cardiomyocyte cytoskeleton-related pathways and identified PDLIM2 as a protein for subsequent validation. WB analysis showed that PDLIM2 protein expression was increased, whereas NF-κB p65 and p-NF-κB p65 protein expression was decreased in the model group. Compared with the model group, rosmarinic acid treatment increased NF-κB p65 expression and decreased PDLIM2 expression ($P < 0.001$), while increasing p-NF-κB p65 expression ($P < 0.05$). **Conclusion** Rosmarinic acid exerts cardioprotective effects in both *in vivo* and *in vitro* models, and its mechanism may be associated with regulation of PDLIM2/NF-κB p65 signaling and attenuation of oxidative stress-induced cardiomyocyte injury.

Key words: *Salvia miltiorrhiza*; heart failure; rosmarinic acid; cytoskeleton; PDLIM2

心力衰竭是由心脏结构和（或）功能异常引起的一组复杂临床综合征，具有较高的死亡和再住院风险[1]。随着人口老龄化及心血管危险因素增加，我国心力衰竭疾病负担持续上升[2]。目前治疗已由单纯改善血流动力学转向抑制神经内分泌异常激活并延缓心肌重构，但患者总体预后仍有进一步改善空间[3]，因此有必要探索新的心脏保护活性成分及作用靶点。

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 是心血管疾病常用中药，其化学成分主要包括丹参酮类、酚酸类及多糖等[4]，相关活性成分可通过调节氧化应激、炎症反应、心肌细胞凋亡和心肌重构等途径发挥心脏保护作用[5]。现有研究多集中于丹参酮II_A、丹酚酸 B 等代表性成分，对提取物中其他潜在活性成分的系统筛选和药效验证相对较少。

斑马鱼繁殖周期短、幼鱼透明且心脏表型易于观察，其与人类心脏发育和功能相关基因具有较高保守性[6]，已广泛用于药物筛选及安全性评价[7-8]。本研究以维拉帕米诱导的斑马鱼急性心力衰竭模型评价 SMEE 药效，结合化学成分表征、网络药理学、类药性和结构相似性分析筛选候选单体，并在斑马鱼和 H_2O_2 诱导的 AC16 细胞损伤模型中验证迷迭香酸的作用；蛋白质组学和 Western blotting 用于分析相关通路及蛋白变化。

1 材料

1.1 仪器

斑马鱼淡水养殖系统，北京爱生科技有限公司；HPG280BX 型光照培养箱，哈尔滨东联电子技术开发有限公司；FSX16 型体视荧光显微镜，日本 Olympus 公司；RM2245 型切片机，德国 Leica 公司；KDBMII 型生物组织自动包埋机、KD-TS3D 型生物组织自动脱水机，浙江科迪仪器设备有限公

司；KZPG-1A 型摊片烤片机，天津天利航空机电有限公司；PCRSCIENTZ-II D 型超声破碎机，浙江新芝生物科技股份有限公司；Allegra X-30R Centrifuge 型离心机，美国 Beckman Coulter 公司；Touch C1000 型实时荧光定量 PCR 仪，美国 Bio-Rad 公司；SPECTRO star Nano 酶标仪，德国 BMG LABTECH 公司；Chameleon3 工业相机，美国 Teledyne FLIR 公司；Waters H-Class 超高效液相色谱仪，沃特世科技有限公司；AB Sciex Triple TOF® 4600 高分辨质谱仪，SCIEX 公司；Odyssey FC 型多功能成像分析系统，香港基因有限公司。

1.2　药材及处理

丹参（批号 241009）购自河北大中药业有限公司，经齐鲁工业大学（山东省科学院）张姗姗研究员鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge.干燥根及根茎。将干燥的丹参粉末加入 70%乙醇，加热回流后抽滤去除杂质，经过旋蒸和真空冷冻后获得丹参醇提取（SMEE）粉末。本研究中采用超高效液相色谱-高分辨质谱联用鉴定其主要成分，并采用峰面积归一化法表征各成分相对丰度。

1.3　药品与主要试剂

维拉帕米（批号 268925）、地高辛（批号 39668）、迷迭香酸（批号 247526）、细胞计数试剂盒-8（批号 825061）购自美国 MCE 公司；三卡因（批号 1003532745）购自德国 Sigma-Aldrich 公司；拍照用固定羧甲基纤维素钠（批号 JS262412）购自上海源叶生物科技有限公司；多聚甲醛（批号 23333866）购自北京兰杰柯生物科技有限公司；组织细胞 RNA 快速提取试剂盒（批号 WPHBS）购自思科捷（山东）生物技术有限公司；NovoStart SYBR qPCR SuperMix Plus（批号 05283404）购自近岸（上海）蛋白质科技有限公司；石蜡（批号 2301081CN）购自德国 Leica Biosystems Nussloch 公司；30%过氧化氢（批号 20120105）购自国药集团化学试剂有限公司；基本培养基（批号 WHB825C048）购自武汉普诺赛生命科技有限公司；胰蛋白酶（批号 2436340）、胎牛血清（批号 2405414）、磷酸盐缓冲液（PBS）（批号 2446463）购自上海达特希尔生物科技有限公司；人脑钠素（BNP）酶联免疫吸附测定试剂盒（批号 WE06JHJHDD4B5539）、人心钠肽（ANP）酶联免疫吸附测定试剂盒（批号 WE0566RB22265）、总超氧化物歧化酶（T-SOD）比色法测试盒（批号 WE0882N4R1270）购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司；PVDF 膜（批号 0000370459）购自美国 Millipore 公司；TBST 缓冲液（批号 GC2410015）购自武汉赛维尔生物科技有限公司；抗体特异性结合液、电泳/转膜通用缓冲液、细胞裂解液、Marker（批号 X1024LZM001）购自苏州艾伯朗克生命科技有限公司；ECL 超敏发光试剂盒（批号 N02DEZC）、辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗兔 IgG 抗体（批号 P03JA82）、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体（批号 N30DE76）购自中国成都正能生物；Vinculin 抗体（批号 F011001）购自美国 Selleck 生物科技有限公司；核因子（NF）-κB p65 抗体（批号 1056362-18）购自英国 Abcam 公司；PDZ 和 LIM 结构域蛋白 2（PDLIM2）抗体（批号 3F81DA12）、p-NF-κB p65 抗体（批号 ZL4559592）购自美国 Invitrogen 公司。

1.4　细胞

AC16 人心肌细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司，货号 CL-0790，经 STR 鉴定正确；细胞采用 DMEM/F12 培养基培养，培养基中添加 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素双抗，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。细胞融合度达 80%～90%时，采用 0.25%胰蛋白酶消化传代，实验采用对数生长期细胞。

1.5　动物

野生型斑马鱼和心脏带有绿色荧光标记的转基因斑马鱼 *Tg*（*cmlc2*：*EGFP*）由山东省科学院生物研究所斑马鱼药物筛选平台提供。本研究动物实验遵循实验动物福利伦理要求，并经齐鲁工业大学生物研究所动物伦理委员会审查批准（实验动物伦理批准号 SWS20220929）。

2　方法

2.1　最小致死浓度（LC_1）、半数致死浓度（LC_{50}）的确定

随机选用受精后 4 h（4 hpf）的野生型斑马鱼，置于 24 孔细胞培养板中，每孔 15 尾，每组 4 个重复，分别给予质量浓度为 0、5、10、20、40、50、100、200 μg·mL^{-1} 的 SMEE/迷迭香酸，培养温度为 28 ℃，每 24 小时更换 1 次药液，每孔加 2 mL 药液，每天统计每孔死亡率，直至第 6 天。应用 GraphPad Prism 10.2.0 中的回归分析计算 LC_1、LC_{50}。

死亡率＝斑马鱼死亡个数/斑马鱼总数

2.2　斑马鱼心脏结构与功能评价

2.2.1　白光　随机选受精后 2 d（2 dpf）正常发育

的野生型斑马鱼于孔板中，每孔体系为 5 mL，设置对照组、单给 SMEE（40 μg·mL^{-1}，不造模）组、模型组、地高辛（阳性药，0.5 μg·mL^{-1}）组、SMEE/迷迭香酸（10、20、40 μg·mL^{-1}）组，使用药物预处理 4 h，后向模型组、阳性药组及药物组加入维拉帕米，使最终浓度为 200 μmol·L^{-1}，共孵育 0.5 h[9]，使用纯净水清洗 3 次，加入适量三卡因麻醉，置于涂有亚甲基纤维素的载玻片上，在体视显微镜下侧拍观察。

2.2.2 荧光 选取 2 dpf 正常发育的心脏带有绿色荧光标记的转基因斑马鱼 *Tg*（*cmlc2*：*EGFP*），给药和分组方式同“2.2.1”项下。处理结束后用纯净水清洗 3 次，加入适量三卡因麻醉，置于涂有羧甲基纤维素钠的载玻片上，在荧光显微镜下俯拍观察。指标计算公式如下：

心室体积（心室容积）＝0.523×短轴长度^2×长轴长度

心室短轴缩短率＝（舒张末期宽度－收缩末期宽度）/舒张末期宽度

每搏输出量＝舒张末期体积－收缩末期体积

射血分数＝每搏输出量/心室舒张末期体积

心率＝20 s 心跳次数×3

2.3 斑马鱼心脏组织评价

分组、给药、造模方式同“2.2.1”项下，用药结束后使用纯净水清洗 3 次，将斑马鱼置于 15 mL 离心管中，加入 4%多聚甲醛固定 24 h，进行苏木精-伊红（HE）染色，切片，在显微镜下观察拍照。

2.4 斑马鱼心力衰竭标志物表达评价

分组、给药、造模方式同“2.2.1”项下，用药结束后使用纯净水清洗 3 次，将斑马鱼置于 1.5 mL 离心管中，使用试剂盒提取 RNA 后逆转录合成 cDNA，使用 C1000 Touch PCR 仪将得到的 cDNA 作为模板进行扩增，依据 C_t 值计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$，以 *rpl13a* 为内参基因计算 *nppa*、*nppa* mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5′→3′)
rpl13a	F-CTGGAGGACTGTAAGAGGTATG
	R-AGACGCACAATCTTGAGAGC
nppa	F-ACAGCTCTGACAGCAACATGG
	R-CTGATGCCTCTTCTGTTGCCA
nppb	F-ACTACACAGAGAGCACAGAAG
	R-CTTCAGTTCTTCTTGGGACCT

2.5 SMEE 主要成分鉴定

称取 SMEE 0.2 g，置于 10 mL 离心管中，加入 70%甲醇 5 mL 使其溶解，摇匀后以 12 000 r·min^{-1} 离心 5 min，取上清液作为供试品溶液。色谱分析采用 Waters H-Class 超高效液相色谱系统和 CORTECS UPLC T3 色谱柱（150 mm×2.1 mm，1.6 μm），柱温 30 ℃，体积流量 0.3 mL·min^{-1}，进样体积 2 μL，检测波长 286 nm，同时采集 190～400 nm 全波长光谱。流动相 A 为乙腈，流动相 B 为 0.1%甲酸溶液，梯度洗脱程序为：0～3 min，3% A；3～8 min，3%→18% A；8～22 min，18%→22% A；22～44 min，22%→95% A；44～48 min，95% A；48.0～48.1 min，95%→3% A；48.1～50.0 min，3% A。

质谱检测采用 AB Sciex Triple TOF® 4600 高分辨质谱仪，电喷雾电离（ESI）正、负离子模式采集数据。TOF 质量扫描范围为 *m*/*z* 50～1 700，MS/MS 扫描范围为 *m*/*z* 50～1 250；Ion Source Gas 1 和 Ion Source Gas 2 均为 344.74 kPa，Curtain Gas 为 241.32 kPa，离子源温度 500 ℃，Ion Spray Voltage Floating 在负、正离子模式下分别为−4 500 V 和 5 000 V，去簇电压 100 V；MS 碰撞能量为 10 eV，MS/MS 碰撞能量为±40 eV，碰撞能量摆幅 20 eV，Ion Release Delay 为 30 ms，Ion Release Width 为 15 ms。

原始质谱数据采用 Analyst TF 1.7.1 采集，使用 PeakView 1.2 进行数据处理。化合物鉴定参考丹参化学成分质谱解析的相关研究[10-11]，化合物鉴定时优先将质谱数据与诗丹德天然产物高分辨质谱数据库（Natural Products HR-MS/MS Spectral Library 1.0）进行匹配，根据谱库匹配得分进行初步筛选，并结合各色谱峰的一级精确质量、二级质谱碎片信息进行确认；谱库未收载的化合物则结合相关文献及质谱裂解规律进行推定，共获得 52 个主要成分的质谱表征结果。采用峰面积归一化法表征各成分相对丰度，并选取相对峰面积占比约 1%及以上的成分作为候选成分，纳入后续网络药理学分析。

2.6 基于网络药理学等方法优选丹参候选活性单体

使用 PubChem 获取 SMEE 中相对峰面积占比约 1%及以上成分的 SMILES。采用 SwissTarget Prediction 预测成分潜在靶点，使用 OMIM 和 GeneCards Suite 数据库检索心力衰竭相关靶点并取交集。对各成分的交集靶点数量和预测概率分别归一化，按“综合得分＝0.20×归一化交集靶点数＋0.80×归一化预测概率”计算得分并由高至低排

序，选取综合得分排名前 7 位的成分进一步进行类药性和与临床常用心力衰竭治疗药物的结构相似性评价，以确定优先进行实验验证的候选单体。

2.7　类药性和临床药物相似性分析

参照《中国心力衰竭诊断和治疗指南 2024》[1]并兼顾血管扩张、肾素-血管紧张素-醛固酮系统抑制、利尿、正性肌力和 β 受体阻滞等主要用药类别，选取曲美他嗪、硝酸异山梨酯、依那普利、缬沙坦、氢氯噻嗪、螺内酯、地高辛、呋塞米、美托洛尔、多巴胺和米力农作为比较药物。通过 RDKit 库（Python）生成半径为 2 的 ECFP4 分子指纹[12]，采用 Tanimoto 系数评价候选成分与上述药物的结构相似性[13]。通过 SwissADME 平台（https://www.swissadme.ch/）获得相对分子质量（M_W）、脂水分配系数（lg$P$）、氢键受体数（HBA）、氢键供体数（HBD）和摩尔折射率（MR）[14]；其中 M_W、lg$P$、HBA 和 HBD 按照 Lipinski 规则评价（M_W≤500、lg$P$≤5、HBA≤10、HBD≤5）[15]，同时比较 MR。综合网络药理学得分、Lipinski 规则符合情况和 Tanimoto 系数对候选成分进行综合排序，确定后续实验验证的优先顺序，结果采用 R 软件 ggplot2 包可视化。

2.8　细胞活力及生化指标测定

2.8.1　细胞活力测定　取对数生长期 AC16 细胞，以每孔 8×10^4 个接种于 6 孔板，培养 24 h 后分为对照组、单给迷迭香酸（40 μg·mL^{-1}）组、模型组、迷迭香酸（10、20、40 μg·mL^{-1}）组，另设空白组，空白组不接种细胞。各给药组加入相应质量浓度迷迭香酸孵育 24 h，吸去药液后，模型组、迷迭香酸组加入 200 μmol·L^{-1} H_2O_2 处理 2 h[16]；随后每孔加入 10 μL CCK-8 溶液，于 37 ℃、5% CO_2 条件下孵育 2 h，在 450 nm 处测定吸光度（A）值并计算细胞存活率。另设置不同浓度（0、5.0、7.5、10.0、20.0、40.0、80.0、120.0、160.0 μg·mL^{-1}）迷迭香酸单独处理正常 AC16 细胞 24 h，用于评价其细胞安全浓度。

细胞存活率＝（$A_{实验}-A_{空白}$）/（$A_{对照}-A_{空白}$）

2.8.2　生化指标测定　给药和分组方式同“2.8.1”项下。H_2O_2 处理结束后，收集细胞培养上清液，离心后取上清，按照 ELISA 试剂盒说明书测定 BNP 含量；另收集细胞，制备细胞匀浆液，离心后取上清，按照相应试剂盒说明书测定 ANP 含量及 T-SOD 活性。

2.9　蛋白组学分析

设置对照组、模型组和迷迭香酸 20 μg·mL^{-1} 组，给药方式同“2.8.1”项下。弃去培养基后用预冷 PBS 清洗 3 次，置于冰上并用胰酶使贴壁细胞脱落；再次用预冷 PBS 清洗 3 次后转移至 1.5 mL 离心管。加入 DB 蛋白溶解液，超声破碎，于 4 ℃、12 000×g 离心 15 min；取上清加入二硫苏糖醇，56 ℃反应 1 h，冰浴后加入足量碘代乙酰胺，于室温避光反应 1 h。采用 Bradford 法进行蛋白定量。取蛋白样品，以 DB 蛋白溶解液补足至 100 μL，加入胰酶和三乙基碳酸氢铵缓冲液，于 37 ℃反应 4 h；12 000×g 离心 5 min，取上清经 C_{18} 柱除盐，洗脱液冻干。冻干样品以 10 μL 流动相 A（水-甲酸，99.9∶0.1）复溶，于 4 ℃、14 000×g 离心 20 min，取上清 200 ng 进样。采用 InterProScan 进行 InterPro（IPR）功能注释，采用京都基因与基因组百科全书（KEGG）数据库进行通路富集分析。

2.10　氧化应激下心肌细胞骨架相关蛋白表达情况测定

设置对照组、模型组和迷迭香酸（20 μg·mL^{-1}）组，给药方式同“2.8.1”项下。取细胞样品，用 PBS 清洗 3 次，每个 T25 培养瓶加入 400 μL 裂解液，冰浴 15 min 后离心取上清；加入 5×Loading Buffer，100 ℃水浴 10 min。蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜，分别加入 Vinculin 抗体（1∶5 000）、NF-κB p65 抗体（1∶1 000）、p-NF-κB p65 抗体（1∶1 000）和 PDLIM2 抗体（1∶1 000），4 ℃摇床孵育过夜。TBST 清洗 3 次（每次 10 min）后，加入相应 HRP 标记二抗（1∶10 000），室温孵育 1 h；TBST 清洗后显影，采用 Image Studio Ver 5.2 进行灰度分析，以 Vinculin 为内参。

2.11　统计学分析

斑马鱼个体表型和心功能指标中的 n 表示独立斑马鱼个体数，每组 n≥6；实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）、细胞实验和 Western blotting 定量中的 n 表示独立生物学重复次数，各实验至少独立重复 3 次。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示；小提琴图显示中位数和四分位数。符合正态分布且方差齐性的多组数据采用单因素方差分析（one-way ANOVA），组间多重比较采用 Dunnett 检验。采用 GraphPad Prism 10.2.0 进行统计分析和绘图。

3　结果

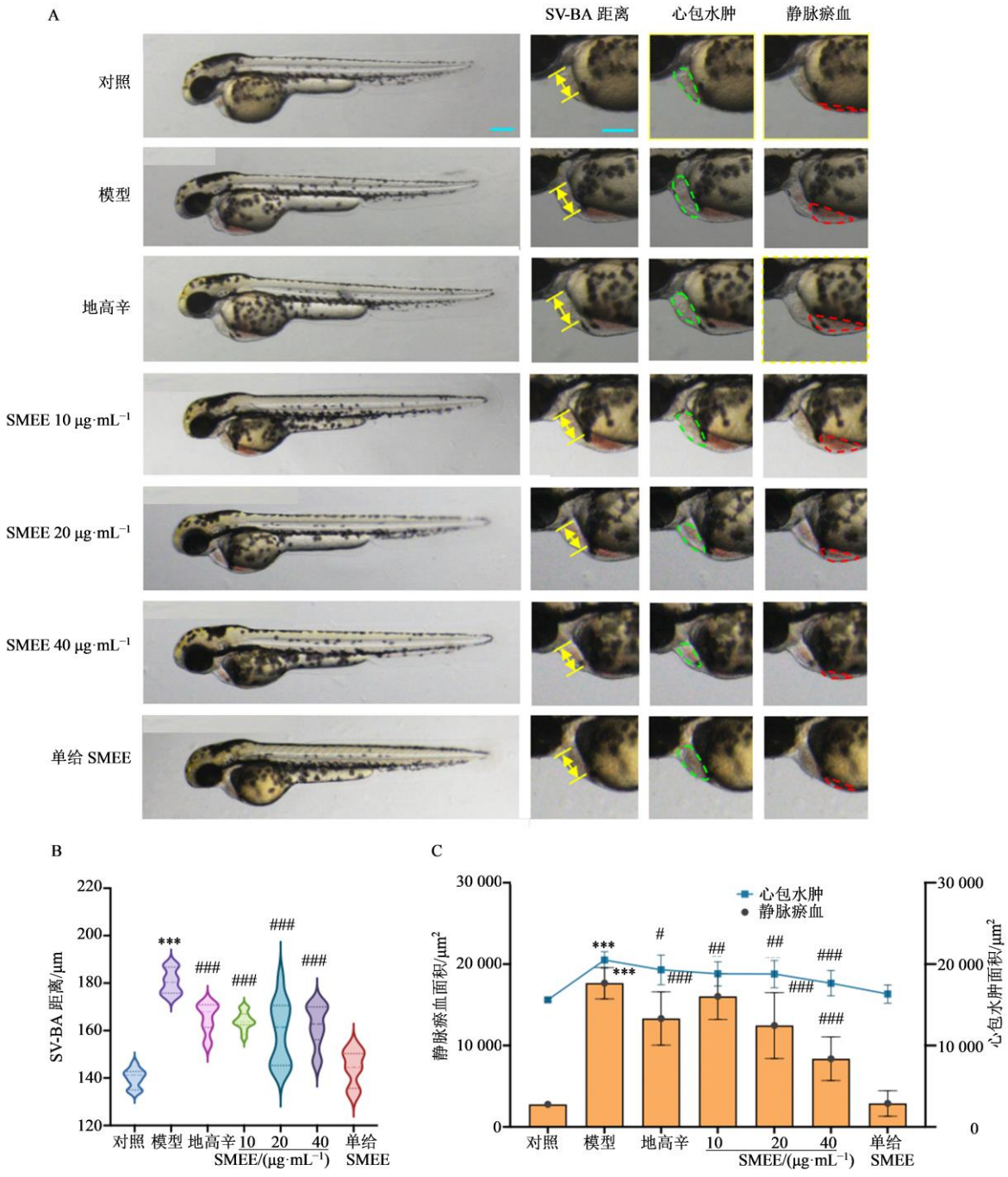
3.1　SMEE 和地高辛对斑马鱼幼鱼 LC_1 和 LC_{50} 的影响

SMEE 在斑马鱼中 LC_{50} 为 67.96 μg·mL^{-1}，LC_1

为 51.45 μg·mL^{-1}；阳性药地高辛在斑马鱼中 LC_{50} 为 6.12 μg·mL^{-1}，LC_1 为 0.56 μg·mL^{-1}。

3.2 斑马鱼幼鱼心脏结构和功能评价

3.2.1 SMEE 改善野生型斑马鱼幼鱼心脏结构 如图 1 所示，与对照组比较，模型组 SV-BA 距离、心包水肿面积和静脉瘀血面积均显著升高（P＜0.001），表明模型建立成功。与模型组比较，地高辛和 SMEE 可降低 SV-BA 距离（P＜0.001）；SMEE



A-各组代表性图像（第 1 列为×3.2，后 3 列为×6.4；比例尺分别为 500、200 μm）；B-SV-BA 距离（n≥6）；C-静脉淤血和心包水肿面积（n≥6）。n 为独立斑马鱼个体数；小提琴图显示中位数和四分位数，折线图和柱状图以 $\bar{x} \pm s$ 表示。与对照组比较：$^{***}P$＜0.001；与模型组比较：$^{\#}P$＜0.05 $^{\#\#}P$＜0.01 $^{\#\#\#}P$＜0.001。

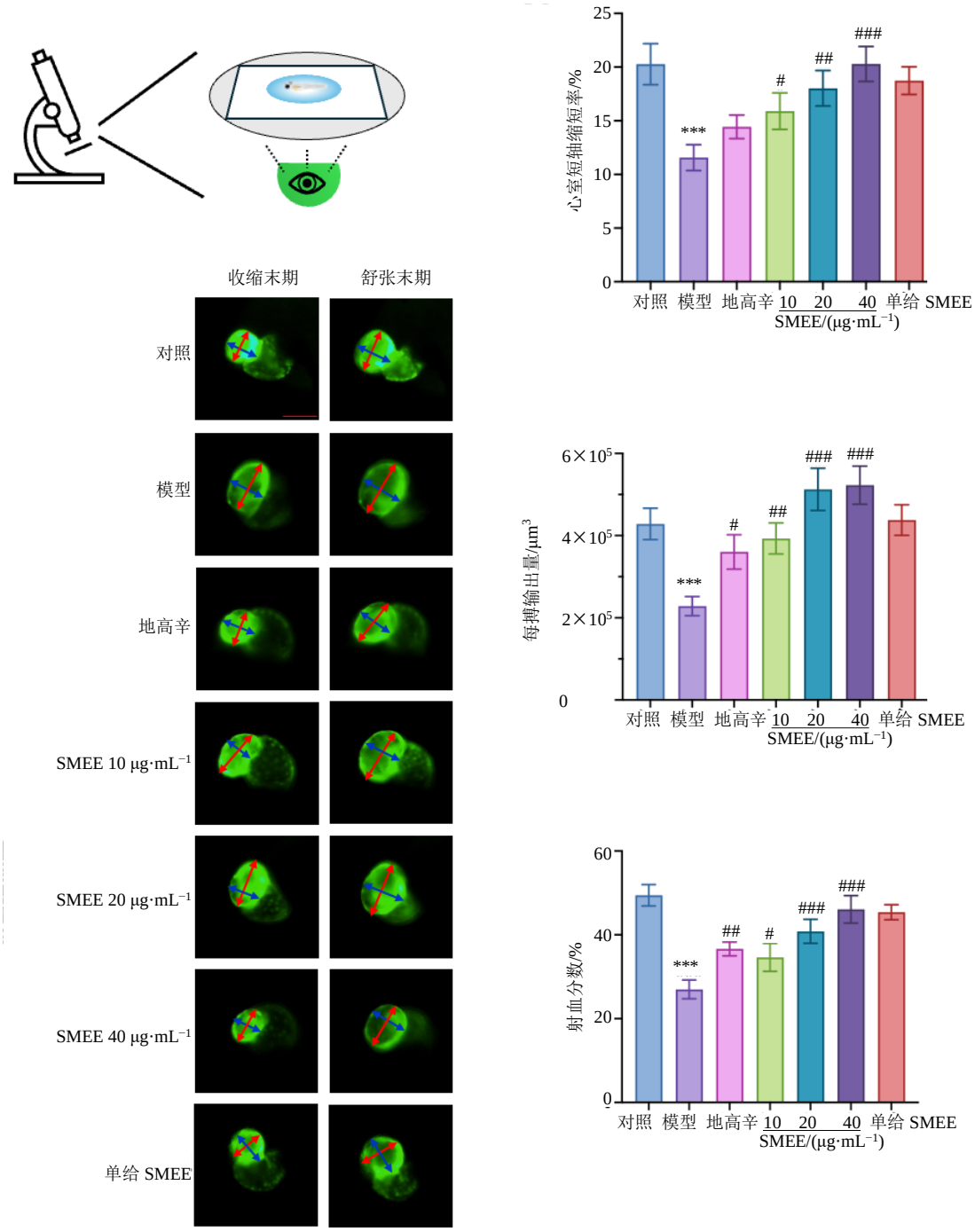
A-Representative images of each group (magnifications: ×3.2 for the first column and ×6.4 for the remaining three columns; scale bars: 500 μm and 200 μm, respectively); B-SV-BA distance ($n \geq 6$); C-Areas of venous congestion and pericardial edema ($n \geq 6$ per group). n represents individual zebrafish. Violin plots show the median and quartiles; line and bar graphs are presented as $\bar{x} \pm s$; $^{***}P < 0.001$ *vs* control group; $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ $^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* model group.

图 1 SMEE 改善野生型斑马鱼幼鱼心脏结构

Fig. 1 SMEE improves cardiac structure in wild-type zebrafish larvae

还可降低心包水肿和静脉淤血面积，且总体呈浓度相关趋势（P＜0.05、0.01、0.001）。单给药组与对照组比较差异无统计学意义，提示 40 μg·mL^{-1} SMEE 未见明显心脏结构毒性。

3.2.2　SMEE 改善转基因斑马鱼幼鱼心脏功能　如图 2 所示，与对照组比较，模型组心室短轴缩短率、每搏输出量和射血分数均显著降低（P＜0.001）；与模型组比较，地高辛和 SMEE 可不同程



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.

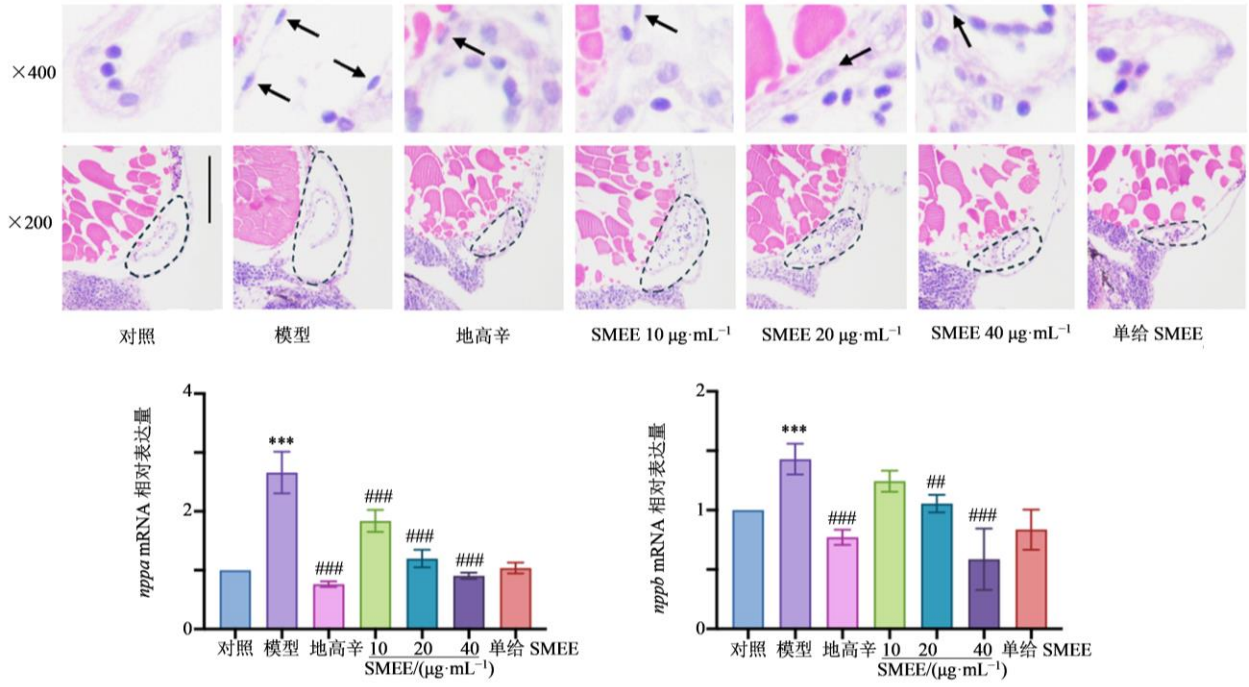
图 2　SMEE 改善转基因斑马鱼幼鱼心脏功能（$\bar{x}\pm s$, $n\geqslant 6$）

Fig. 2　SMEE improves cardiac function in transgenic zebrafish larvae ($\bar{x}\pm s$, $n\geqslant 6$)

度提高上述指标（P＜0.05、0.01、0.001），且 SMEE 总体呈浓度相关趋势。单给药组未见明显异常，提示 40 μg·mL^{-1} SMEE 在本实验条件下未引起明显心功能损伤。

3.2.3 斑马鱼心脏组织切片分析 如图 3 所示，对照组和 SME 单给药组心脏组织结构较完整；模型组可见心脏组织结构紊乱及细胞形态异常；与模型组比较，地高辛和 SMEE 处理后上述组织学损伤不同程度减轻。

3.2.4 SMEE 减少心力衰竭标志物的表达 如图 3 所示，与对照组比较，模型组 *nppa* 和 *nppb* mRNA 相对表达量升高（P＜0.001）；与模型组比较，地高辛和 SMEE 可不同程度降低 *nppa* 和 *nppb* mRNA 相对表达量（P＜0.01、0.001）。



与对照组比较：$^{***}P$＜0.001；与模型组比较：$^{\#\#}P$＜0.01 $^{\#\#\#}P$＜0.001。

$^{***}P$ < 0.001 *vs* control group; $^{\#\#}P$ < 0.01 $^{\#\#\#}P$ < 0.001 *vs* model group.

图 3 斑马鱼心脏组织切片 HE 染色及心力衰竭标志物的表达（$\bar{x}\pm s$, $n\geqslant 3$）

Fig. 3 HE staining of zebrafish heart tissue sections and expression of heart failure markers ($\bar{x}\pm s$, $n\geqslant 3$)

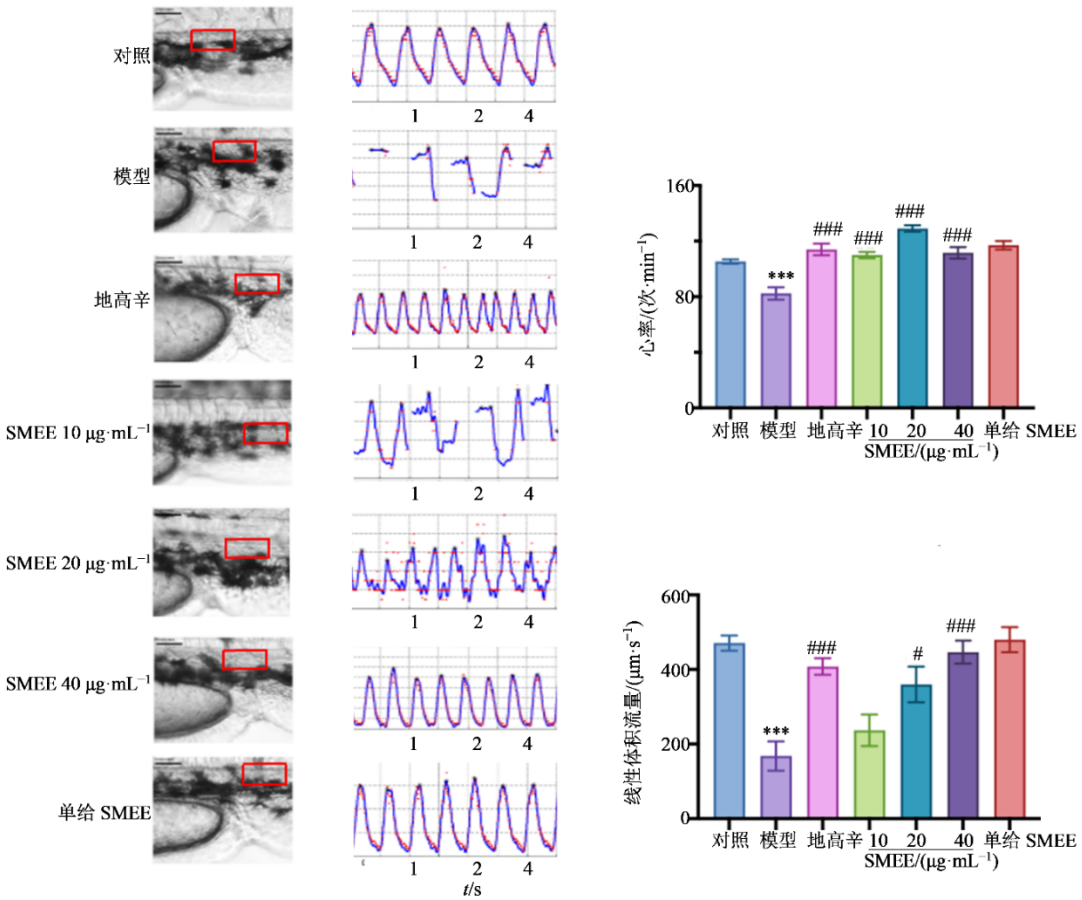
3.2.5 SMEE 改善斑马鱼幼鱼心率和血流速度 如图 4 所示，与对照组比较，模型组心率和血流速度均降低，血流节律紊乱（P＜0.001）；与模型组比较，地高辛和 SMEE 可提高心率和血流速度，并不同程度改善血流节律（P＜0.05、0.001）。

3.3 SMEE 活性成分分析

正、负离子模式下的基峰色谱图分别见图 5。根据一级质谱精确质量、MS/MS 碎片信息及 Natural Products HR-MS/MS Spectral Library 1.0 谱库匹配结果，并结合相关文献和质谱裂解规律进行分析，共获得主要成分的质谱表征结果，详细鉴定信息见表 2。采用峰面积归一化法计算各成分的相对峰面积占比，相对峰面积占比约 1%及以上的成分共 15 个，分别为丹酚酸 B、隐丹参酮、迷迭香酸、丹参酮II_A、丹酚酸 Y、紫草酸甲酯、紫苏酮、紫草酸、丹酚酸 I、丹参新酮、丹参酮I、丹酚酸 B-CH_2O_2、柠檬酸、二氢丹参酮I、异迷迭香酸苷（0.998%），其中丹酚酸 B 的相对峰面积占比最高，为 57.545%。后续选取上述 15 个相对峰面积占比约 1%及以上的成分进行网络药理学分析。

3.4 基于网络药理学等方法优选丹参候选活性单体

如图 6-A 所示，心力衰竭相关靶点与丹参候选成分预测靶点共有 111 个交集靶点。图 6-B 为成分-靶点网络，节点大小与对应靶点数呈正相关。根据归一化交集靶点数和预测概率计算综合得分，各候选成分均参与该轮排序，丹酚酸 B 亦纳入计算，排序结果见图 6-C，并选取综合得分排名前 7 位的成分进行后续类药性和结构相似性比较。在所选 11 种临床常用心力衰竭治疗药物中，迷迭香酸与多巴胺的 Tanimoto 系数最高（0.22，图 6-D）。理化性质比



与对照组比较：$^{***}P<0.001$；与模型组比较：$^{\#}P<0.05$　$^{\#\#\#}P<0.001$。

$^{***}P<0.001$ *vs* control group; $^{\#}P<0.05$　$^{\#\#\#}P<0.001$ *vs* model group.

图 4　SMEE 改善斑马鱼幼鱼心率和血流速度（$\bar{x}\pm s$, $n\geqslant 6$）

Fig. 4　SMEE improves heart rate and blood-flow velocity in zebrafish larvae ($\bar{x}\pm s$, $n\geqslant 6$)

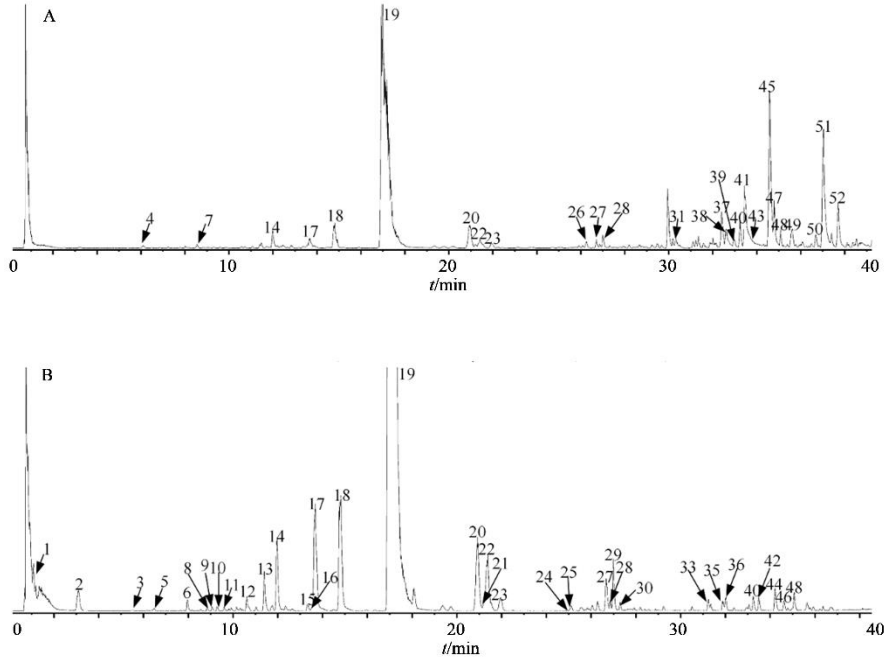


图 5　SMEE 正（A）、负（B）离子模式基峰离子流图

Fig. 5　Positive (A) and negative (B) -ion base peak chromatogram of SMEE

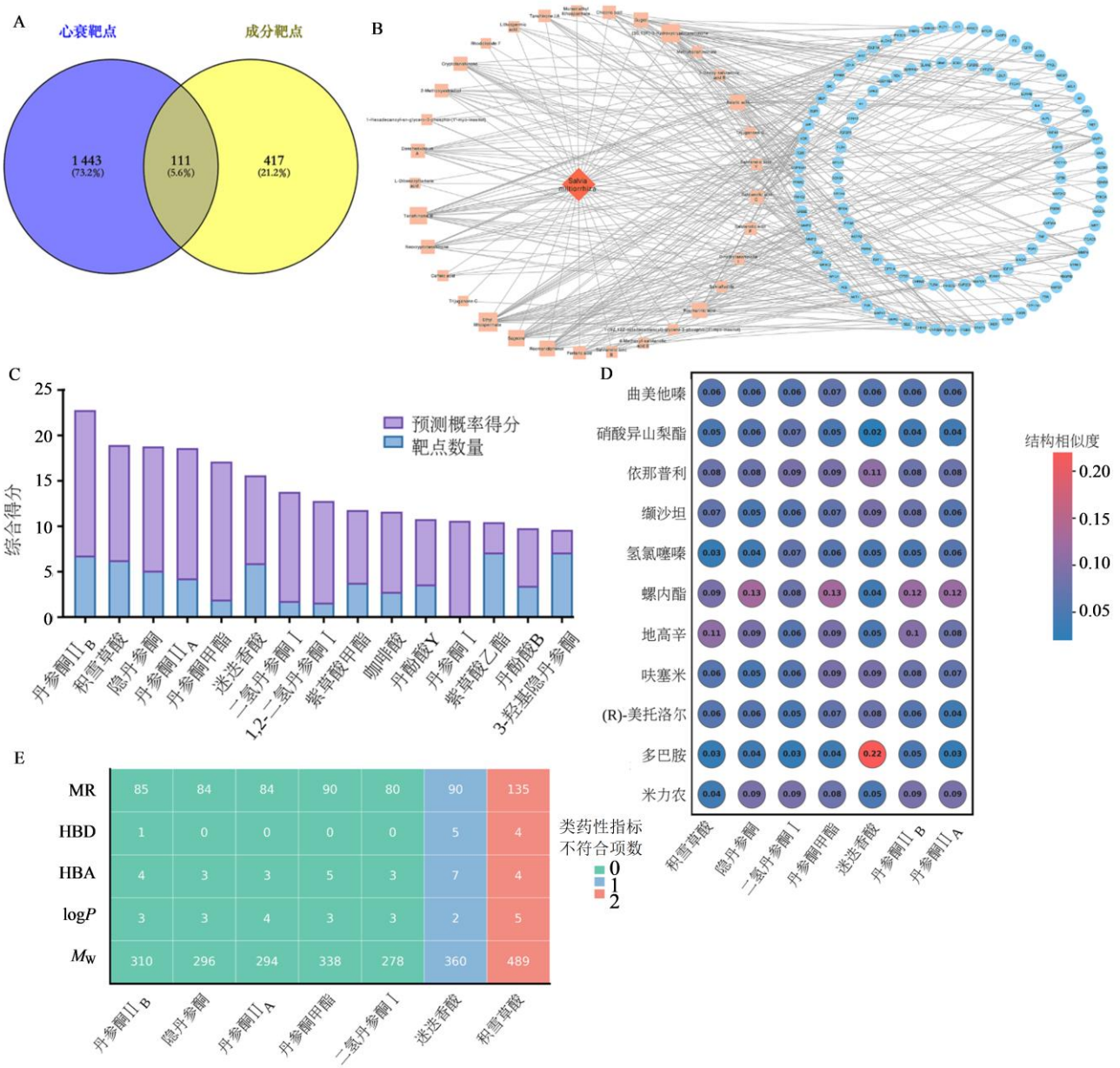
表 2 SMEE 52 个主要成分 UPLC-Q-TOF/MS 质谱表征信息

Table 2 UPLC-Q-TOF/MS characterization of 52 major constituents in SMEE

序号	t_R/min	离子形式	m/z 实测值/m/z 理论值	误差/($\times 10^{-6}$)	分子式	化合物	相对峰面积/%
1	1.08	$[M-H]^-$	191.020 1/191.019 7	2.0	$C_6H_8O_7$	柠檬酸[a]	1.148
2	3.09	$[M-H]^-$	197.046 3/197.046 9	−3.0	$C_9H_{10}O_5$	丹参素[a]	0.776
3	5.46	$[M-H]^-$	447.115 5/447.114 4	2.4	$C_{18}H_{24}O_{13}$	leaf movement factor I[b]	0.060
4	6.11	$[M+H]^+$	205.096 8/205.097 2	−1.7	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	*L*-色氨酸[a]	0.013
5	6.47	$[M-H]^-$	447.117 2/447.114 4	6.2	$C_{18}H_{24}O_{13}$	2-[(2-*O*-*D*-apio-β-*D*-furanosyl-β-*D*-glucopyranosyl) oxy]-6-hydroxybenzoic acid[b]	0.098
6	7.96	$[M-H]^-$	179.034 7/179.035 0	−1.8	$C_9H_8O_4$	咖啡酸[a]	0.252
7	8.55	$[M+H]^+$	540.147 8/540.150 0	−4.1	$C_{27}H_{25}NO_{11}$	—	0.101
8	8.85	$[M-H]^-$	325.056 9/325.056 0	2.8	$C_{14}H_{14}O_9$	单阿魏酰酒石酸酯[b]	0.098
9	9.07	$[M+FA-H]^-$	509.223 5/509.224 0	−0.9	$C_{21}H_{36}O_{11}$	rhodioloside F[b]	0.107
10	9.29	$[M-H]^-$	375.073 4/375.072 2	3.3	$C_{18}H_{16}O_9$	2,3-二脱氧 3-(3,4-联苯双酯)-2-[(3,4-二羟基苯)亚甲基]异柠檬酸[b]	0.113
11	9.61	$[M-H]^-$	357.062 3/357.061 6	2.0	$C_{18}H_{14}O_8$	*L*-二苯甲酰酒石酸[b]	0.097
12	10.61	$[M-H]^-$	473.074 4/473.072 5	1.4	$C_{22}H_{18}O_{12}$	菊苣酸[a]	0.357
13	11.4	$[M-H]^-$	521.130 2/521.130 1	0.3	$C_{24}H_{26}O_{13}$	异迷迭香酸苷[a]	0.988
14	11.96	$[M-H]^-$	537.100 9/537.103 9	−5.5	$C_{27}H_{22}O_{12}$	丹酚酸 I[b]	1.772
15	13.33	$[M-H]^-$	537.104 0/537.103 9	0.3	$C_{27}H_{22}O_{12}$	丹酚酸 H[b]	0.151
16	13.56	$[M-H]^-$	717.149 1/717.146 1	4.2	$C_{36}H_{30}O_{16}$	丹酚酸 E[a]	0.325
17	13.66	$[M-H]^-$	359.075 8/359.077 2	−4.0	$C_{18}H_{16}O_8$	迷迭香酸[a]	3.899
18	14.79	$[M-H]^-$	537.101 7/537.103 9	−4.0	$C_{27}H_{22}O_{12}$	紫草酸[a]	2.051
19	17.03	$[M-H]^-$	717.145 5/717.146 1	−0.8	$C_{36}H_{30}O_{16}$	丹酚酸 B[a]	57.545
20	20.92	$[M-H]^-$	717.146 3/717.146 1	0.3	$C_{36}H_{30}O_{16}$	丹酚酸 Y[a]	3.094
21	21.22	$[M-H]^-$	701.155 6/701.151 2	6.3	$C_{36}H_{30}O_{15}$	3'''-deoxy-salvianolic acid B[b]	0.415
22	21.36	$[M-H]^-$	551.121 6/551.119 5	3.8	$C_{28}H_{24}O_{12}$	紫草酸甲酯[b]	2.517
23	21.96	$[M-H]^-$	731.164 3/731.161 8	3.5	$C_{37}H_{32}O_{16}$	4-methoxyl-salvianolic acid B[b]	0.666
24	25.03	$[M-H]^-$	491.102 0/491.098 4	7.4	$C_{26}H_{20}O_{10}$	丹酚酸 C[b]	0.062
25	25.10	$[M-H]^-$	565.136 1/565.135 2	1.7	$C_{29}H_{26}O_{12}$	紫草酸乙酯[b]	0.185
26	26.25	$[M+H]^+$	313.143 3/313.143 4	−0.4	$C_{19}H_{20}O_4$	羟基隐丹参酮[b]	0.194
27	26.71	$[M+H]^+$	315.086 2/315.086 3	−0.4	$C_{17}H_{14}O_6$	丹酚酸 F[b]	0.222
28	26.85	$[M-H]^-$	671.145 0/671.140 6	6.6	$C_{35}H_{28}O_{14}$	丹酚酸 B-CH_2O_2[b]	0.215
29	26.99	$[M-H]^-$	671.144 8/671.140 6	6.3	$C_{35}H_{28}O_{14}$	丹酚酸 B-CH_2O_2[b]	1.170
30	27.29	$[M-H]^-$	671.143 6/671.140 6	4.5	$C_{35}H_{28}O_{14}$	丹酚酸 B-CH_2O_2[b]	0.221
31	30.33	$[M+H]^+$	311.127 4/311.127 8	−1.2	$C_{19}H_{18}O_4$	(−)-丹参酮II_B[b]	0.306
32	31.10	$[M+H]^+$	341.138 7/341.138 4	1.0	$C_{20}H_{20}O_5$	trijuganone C[b]	0.185
33	31.23	$[M-H]^-$	295.097 5/295.097 6	−0.3	$C_{18}H_{16}O_4$	丹参新醌 A[b]	0.305
34	31.35	$[M-H_2O+H]^+$	309.111 9/309.112 1	−0.8	$C_{19}H_{18}O_5$	3-hydroxytanshinone II_B[b]	0.259
35	31.89	$[M-H]^-$	487.341 3/487.342 9	−3.3	$C_{30}H_{48}O_5$	积雪草酸[a]	0.311
36	32.02	$[M-H]^-$	313.146 4/313.144 5	6.1	$C_{19}H_{22}O_4$	新隐丹参酮异构体[b]	0.344
37	32.41	$[M+H]^+$	279.103 7/279.102 1	5.7	$C_{18}H_{14}O_3$	二氢丹参酮I[a]	1.061
38	32.61	$[M+H]^+$	303.196 2/303.195 5	4.1	$C_{19}H_{26}O_3$	2-methoxyestradiol[b]	0.834
39	32.97	$[M+H]^+$	281.117 8/281.117 2	2.1	$C_{18}H_{16}O_3$	小红参醌乙[b]	0.324
40	33.24	$[M+H]^+$	315.159 2/315.159 1	0.4	$C_{19}H_{22}O_4$	新隐丹参酮[b]	0.650
41	33.46	$[M+H]^+$	301.180 5/301.179 8	2.3	$C_{19}H_{24}O_3$	紫苏酮[b]	2.110
42	33.49	$[M-H]^-$	595.293 6/595.288 9	7.9	$C_{27}H_{49}O_{12}P$	1-(9*Z*,12*Z*-octadecadienoyl)-glycero-3-phospho-(1'-myo-inositol)[b]	0.372
43	33.57	$[M+H]^+$	339.122 5/339.122 7	−0.6	$C_{20}H_{18}O_5$	丹参酮甲酯[b]	0.452
44	34.22	$[M-H]^-$	571.292 2/571.288 9	5.8	$C_{25}H_{49}O_{12}P$	1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-myo-inositol)[b]	0.677
45	34.59	$[M+H]^+$	297.148 0/297.148 5	−5.1	$C_{19}H_{20}O_3$	隐丹参酮[a]	4.797
46	34.62	$[M-H]^-$	315.194 8/315.196 6	−5.6	$C_{20}H_{28}O_3$	迷迭香二酚[b]	0.285
47	34.80	$[M+H]^+$	277.086 5/277.085 9	2.1	$C_{18}H_{12}O_3$	丹参酮 I[a]	1.323
48	35.08	$[M-H]^-$	299.202 5/299.201 7	2.8	$C_{20}H_{28}O_2$	柳杉酚[b]	0.458
49	35.60	$[M+H]^+$	279.100 9/279.102 1	−2.4	$C_{18}H_{14}O_3$	1, 2-二氢丹参酮 I[b]	0.444
50	36.69	$[M+H]^+$	281.152 9/281.153 6	−2.5	$C_{19}H_{20}O_2$	轮叶婆婆纳对醌 A[b]	0.377
51	37.03	$[M+H]^+$	295.131 0/295.132 9	−7.0	$C_{19}H_{18}O_3$	丹参酮 II_A[a]	3.848
52	37.70	$[M+H]^+$	283.169 0/283.169 3	−0.9	$C_{19}H_{22}O_2$	丹参新酮[a]	1.364

a-与 Natural Products HR-MS/MS Spectral Library 1.0 谱库匹配，并结合一级质谱精确质量及 MS/MS 碎片信息鉴定；b-依据相关文献及 MS/MS 裂解规律推定。

a-Identified by matching with the Natural Products HR-MS/MS Spectral Library 1.0 and combining accurate mass from MS and MS/MS fragment information; b-Tentatively identified based on relevant literature and MS/MS fragmentation patterns.



A-丹参候选成分靶点与心力衰竭相关靶点的交集；B-成分-靶点网络；C-候选成分综合得分；D-与临床常用心力衰竭治疗药物的结构相似性；E-预设类药性指标比较结果。

A-intersection of predicted constituent targets and heart-failure-related targets; B-constituent-target network; C-integrated scores of candidate constituents; D-structural similarity to commonly used heart-failure drugs; E-comparison of predefined drug-likeness descriptors.

图 6　基于网络药理学方法筛选丹参候选活性单体

Fig. 6　Prioritization of a candidate active constituent from *Salvia miltiorrhiza*

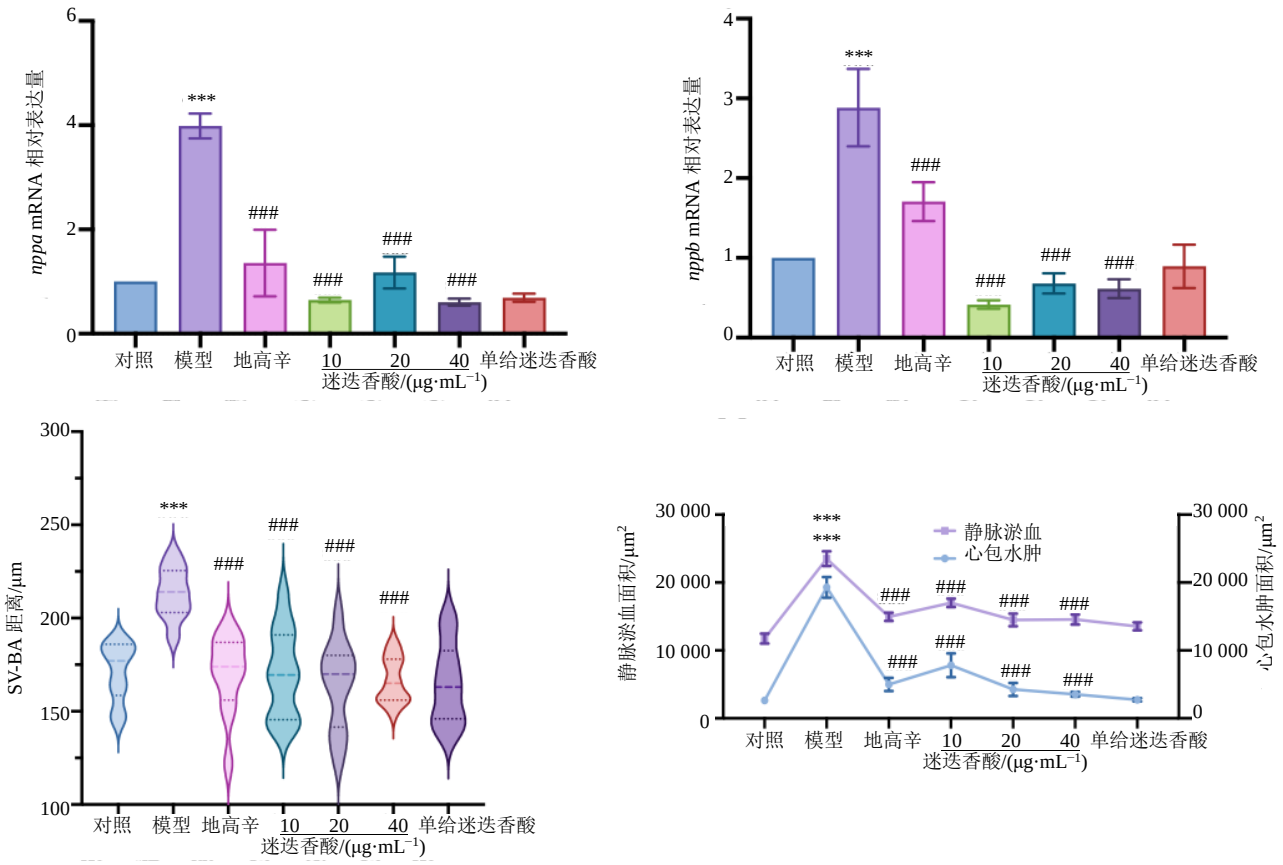
较结果显示，迷迭香酸的 MW、LogP、HBA 和 HBD 均符合 Lipinski 规则（图 6-E）。综合网络药理学得分、类药性和结构相似性结果，确定迷迭香酸为优先进行后续实验验证的候选活性单体。

3.5　迷迭香酸斑马鱼毒性测试

迷迭香酸作用于斑马鱼幼鱼的 LC_{50} 为 67.92 μg·mL^{-1}，LC_1 为 41.98 μg·mL^{-1}。

3.6　迷迭香酸于斑马鱼幼鱼关键指标验证

如图 7 所示，与对照组比较，模型组 *nppa*、*nppb* mRNA 相对表达量，SV-BA 距离，静脉淤血面积和心包水肿面积均显著升高（$P<0.001$）。与模型组比较，地高辛和各浓度迷迭香酸均可不同程度降低上述指标（$P<0.001$），表明迷迭香酸可改善维拉帕米诱导的斑马鱼急性心力衰竭表型。



mRNA 相对表达量 $n \geqslant 3$；SV-BA 距离 $n \geqslant 6$；静脉淤血和心包水肿面积 $n \geqslant 6$。qRT-PCR 中 n 为独立生物学重复次数，斑马鱼个体指标中 n 为独立斑马鱼个体数；柱状图和折线图以 $\bar{x} \pm s$ 表示，小提琴图显示中位数和四分位数。与对照组比较：$^{***}P<0.001$；与模型组比较：$^{\#\#\#}P<0.001$。mRNA expression $n \geqslant 3$; SV-BA distance $n \geqslant 6$; Areas of venous congestion and pericardial edema $n \geqslant 6$; For qRT-PCR, n represents independent biological replicates; For individual endpoints, n represents individual zebrafish; Bar and line graphs are presented as $\bar{x} \pm s$; Violin plots show the median and quartiles. $^{***}P < 0.001$ *vs* control group; $^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* model group.

图 7 迷迭香酸于斑马鱼幼鱼关键指标验证结果

Fig. 7 Verification results of key indicators of rosmarinic acid in zebrafish larvae

3.7 迷迭香酸保护心肌细胞免受氧化应激损伤

3.7.1 迷迭香酸提升氧化应激带来的细胞活力下降 如图 8-A 所示，与对照组比较，H_2O_2 处理后 AC16 细胞由伸展形态变为皱缩、圆形，贴壁细胞减少。迷迭香酸对心肌细胞的安全浓度为 0～40 μg·mL^{-1}（图 8-B）。细胞活力定量结果（图 8-C）显示，与对照组比较，模型组细胞活力降低（$P<0.001$）；与模型组比较，迷迭香酸可提高细胞活力（$P<0.05$、0.01、0.001），提示其可减轻 H_2O_2 诱导的细胞损伤。

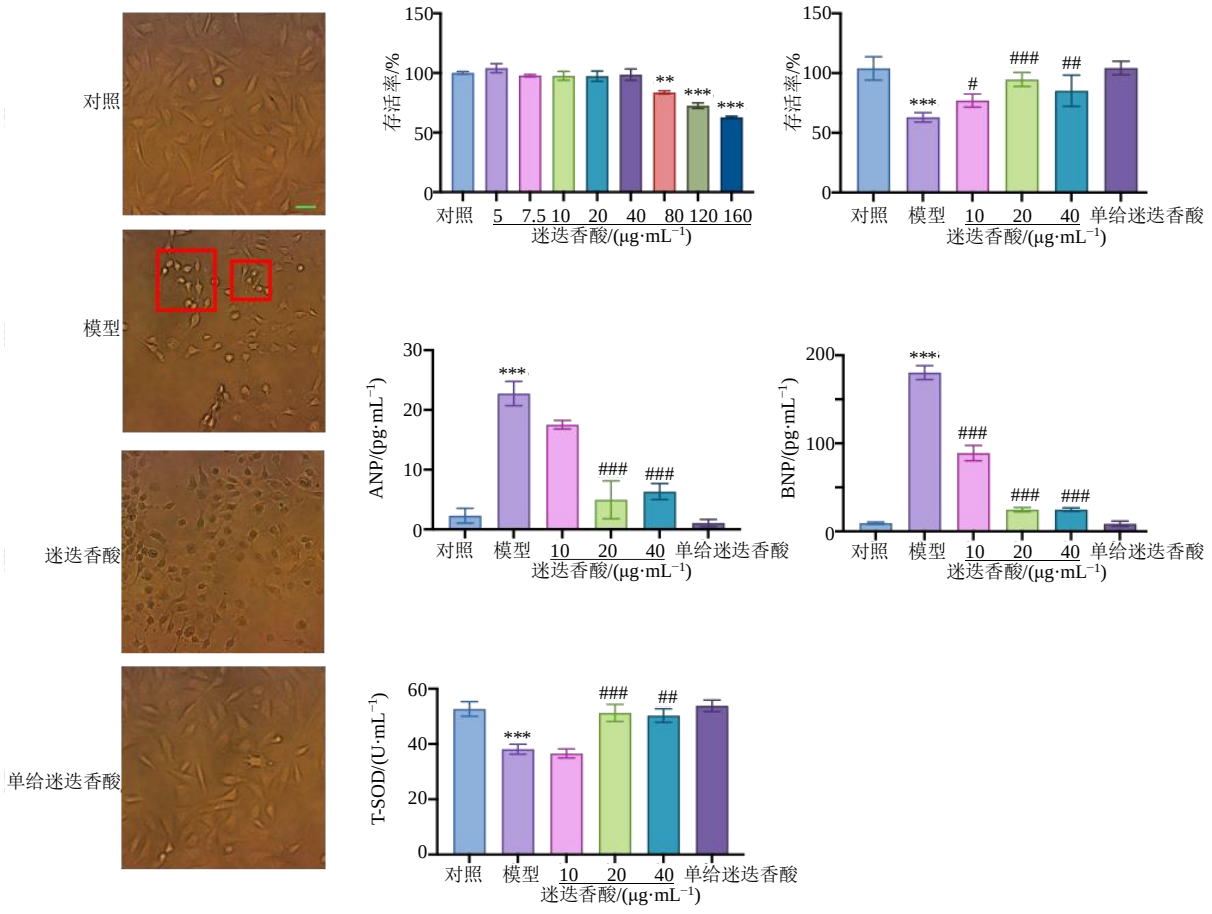
3.7.2 迷迭香酸改善氧化应激状态下心肌损伤相关指标 如图 8-D～F 所示，与对照组比较，模型组 BNP 和 ANP 含量升高，T-SOD 活性降低（$P<0.001$）；与模型组比较，中、高浓度迷迭香酸降低 BNP 和 ANP 含量，并提高 T-SOD 活性（$P<0.01$、0.001），提示迷迭香酸可改善 H_2O_2 诱导的氧化应激损伤。

3.8 细胞蛋白组分析

以 Benjamini-Hochberg 法校正后的 FDR＜0.05 为筛选阈值，共获得 1 215 个差异蛋白。根据各组表达趋势将其分为 5 个簇（图 9-A）；其中第 4 簇表现为模型组升高、迷迭香酸处理后回落，故对该簇进行 KEGG、IPR 及亚细胞定位分析。IPR 结果显示 LIM 型锌指结构域（Pfam 编号 PF00412）显著富集（图 9-C），KEGG 结果显示心肌细胞骨架相关通路富集（图 9-B），相关蛋白主要定位于细胞内（图 9-D）。进一步对 LIM 型锌指结构域相关蛋白与心肌细胞骨架通路蛋白进行 PPI 分析（图 9-E），据此选择 PDLIM2 作为后续验证蛋白。

3.9 关键蛋白验证

如图 10 所示，与对照组比较，模型组 NF-κB p65 和 p-NF-κB p65 蛋白表达降低，PDLIM2 蛋白



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

$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$ *vs* control group; $^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$　$^{\#\#\#}P<0.001$ *vs* model group.

图 8　迷迭香酸减轻 H_2O_2 诱导的 AC16 细胞损伤（$\bar{x}\pm s$, $n=3$）

Fig. 8　Rosmarinic acid attenuates H_2O_2-induced injury in AC16 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

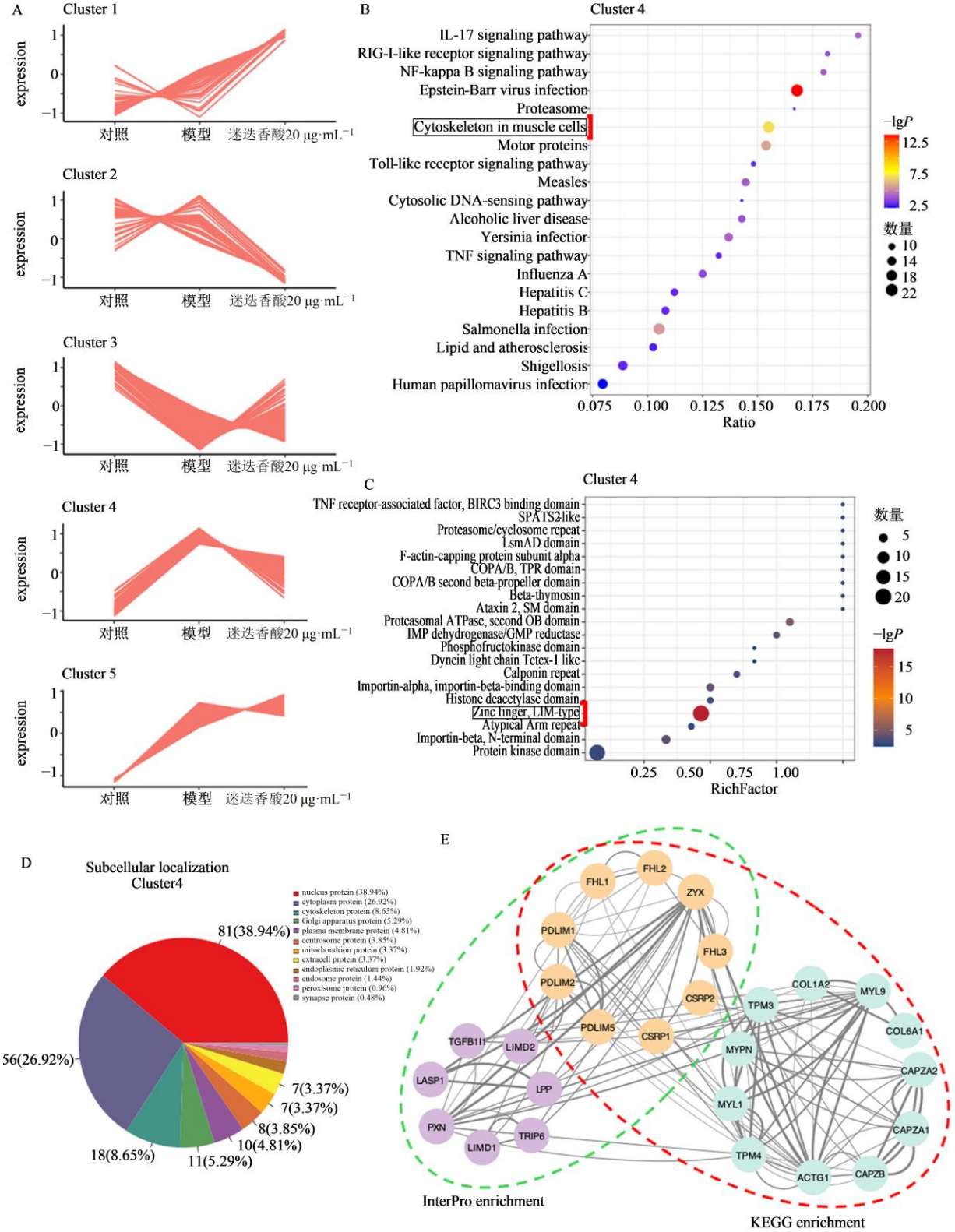
表达升高（$P<0.01$、0.001）；与模型组比较，迷迭香酸处理后 NF-κB p65 和 p-NF-κB p65 蛋白表达升高，PDLIM2 蛋白表达降低（$P<0.05$、0.001）。结果提示迷迭香酸对 H_2O_2 损伤的保护作用可能与调节 PDLIM2/NF-κB p65 信号有关。

4　讨论

心力衰竭病因和病理机制复杂，早期识别并干预心肌结构与功能异常对改善预后具有重要意义[17]。丹参相关制剂可改善心力衰竭患者的 BNP 和多项心功能指标[18]。SMEE 整体药效评价及迷迭香酸验证结果显示，二者均可改善维拉帕米诱导的斑马鱼急性心力衰竭表型。

斑马鱼兼具整体生物学复杂性和较高通量，适用于药物发现与安全性评价[19]，也已用于药物心脏作用研究[20]。维拉帕米可稳定诱导斑马鱼幼鱼出现 SV-BA 距离增大、心包水肿、静脉淤血及心功能下降等表型[21-22]。心力衰竭过程中，心肌收缩功能下降与循环灌注不足、血流动力学异常相互影响[23-24]。SMEE 可降低 SV-BA 距离、心包水肿和静脉淤血面积，并提高心室短轴缩短率、每搏输出量、射血分数、心率和血流速度；进一步采用迷迭香酸进行验证，其可降低 SV-BA 距离、心包水肿和静脉淤血面积，并下调 *nppa*、*nppb* mRNA 相对表达量，表明 SMEE 及其优选活性单体迷迭香酸均具有心脏保护作用。

BNP 和 ANP 是心力衰竭诊断和病情评估的重要生物标志物[1]。在维拉帕米诱导的斑马鱼心力衰竭模型中，*nppb*、*nppa* mRNA 及 NT-proBNP 随心衰表型升高，药物干预后相应下降[24]。SMEE 和迷迭香酸降低模型斑马鱼 *nppa*、*nppb* mRNA 相对表达量；迷迭香酸还降低 AC16 细胞 BNP、ANP 含量并提高 T-SOD 活性。中药活性成分对氧化应激的调节是保护损伤心肌的重要途径[25]。迷迭香酸具有抗氧化、抗炎等药理活性[26]，并在压力负荷模型中显

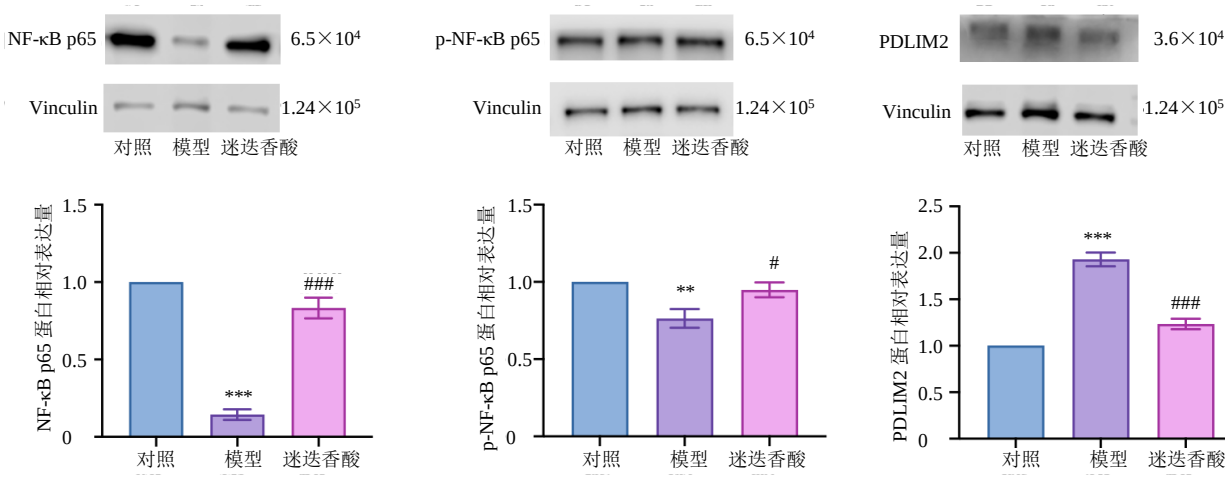


A-差异蛋白表达趋势；B-KEGG 分析结果；C-IPR 分析结果；D-亚细胞定位分析结果；E-KEGG 和 IPR 指定通路交集蛋白。

A-expression trend of differentially expressed proteins; B-results of KEGG enrichment analysis; C-results of IPR domain analysis; D-results of subcellular localization analysis; E-intersection proteins of specified pathways from KEGG and IPR analyses.

图 9 细胞蛋白组学分析

Fig. 9 Cellular proteomic analysis



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

$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$ *vs* control group; $^{\#}P<0.05$　$^{\#\#\#}P<0.001$ *vs* model group.

图 10　关键蛋白验证结果图（$\bar{x}\pm s$, $n=3$）

Fig. 10　Results of key protein validation ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

示出改善心功能、降低 *nppb* mRNA 表达和减轻心肌纤维化的作用[27]。上述体内外结果共同表明迷迭香酸能够抑制利钠肽系统异常激活，并减轻氧化应激性心肌细胞损伤。

为分析迷迭香酸改善心肌细胞损伤的相关通路，对 AC16 细胞开展蛋白质组学分析。心肌细胞骨架参与心肌收缩、细胞结构维持和信号转导，其稳态破坏可导致收缩功能障碍和心肌重构[28-29]；氧化应激还可通过改变微管结构重塑心肌细胞骨架[30]。蛋白质组学和 PPI 分析将 PDLIM2 确定为后续验证蛋白。PDLIM2 可促进 NF-κB p65 在细胞核内隔离并降解，从而调节 NF-κB 信号[31]。Western blotting 结果显示，H_2O_2 处理后 PDLIM2 表达升高，NF-κB p65 及 p-NF-κB p65 表达降低；迷迭香酸可逆转上述变化。

NF-κB p65 在心肌细胞中的作用具有情境依赖性，其适度活化参与压力负荷下的适应性反应，并可增强心肌细胞对缺血损伤的耐受[32-33]。迷迭香酸干预后 PDLIM2 表达降低，同时恢复 NF-κB p65 及 p-NF-κB p65 表达；这一变化与细胞活力、T-SOD 活性以及 BNP、ANP 含量的改善同步。蛋白质组学与 Western blotting 结果相互印证，支持 PDLIM2/NF-κB p65 信号参与迷迭香酸对氧化应激性心肌损伤的保护过程。

SMEE 和迷迭香酸可改善维拉帕米诱导的斑马鱼急性心力衰竭表型及 H_2O_2 诱导的 AC16 细胞氧化应激损伤。结合化学成分分析、网络药理学和斑马鱼药效验证结果，迷迭香酸被确定为丹参抗心力衰竭的优选活性单体。蛋白质组学和 Western blotting 结果表明，其作用与下调 PDLIM2 表达、恢复 NF-κB p65 相关信号及改善氧化应激有关。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中华医学会心血管病学分会, 中国医师协会心血管内科医师分会, 中国医师协会心力衰竭专业委员会, 等. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2024 [J]. 中华心血管病杂志, 2024, 52(3): 235-275.
Chinese Society of Cardiology, Chinese Medical Association, et al. Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of heart failure 2024 [J]. Chin J Cardiol, 2024, 52(3): 235-275.

[2] 中国老年医学学会心电与心功能分会, 等. 心力衰竭早期筛查与一级预防中国专家共识（2024 年） [J]. 中华全科医师杂志, 2024, 23(1): 1-12.
Electrocardiology and Cardiac Function Branch of Chinese Geriatrics Society, et al. Chinese expert consensus on early screening and primary prevention of heart failure (2024) [J]. Chin J General Practit, 2024, 23(1): 1-12.

[3] 黄峻. 慢性心衰治疗的基本理念: 过去、现在和未来 [J]. 天津医药, 2016, 44(8): 929-931.
Huang J. Basic concept of treatment for chronic heart failure: Past, present and future [J]. Tianjin Med J, 2016, 44(8): 929-931.

[4] 单晓晓, 洪帮振, 刘洁, 等. 丹参化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析 [J].

中国中药杂志, 2021, 46(21): 5496-5511.
Shan X X, Hong B Z, Liu J, et al. Review of chemical composition, pharmacological effects, and clinical application of *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma* and prediction of its Q-markers [J]. China J Chin Mater Med, 2021, 46(21): 5496-5511.

[5] 杨荣来, 王凤荣. 丹参及其制剂治疗冠心病的药理及机制研究新进展 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(11): 164-169.
Yang R L, Wang F R. New progress in pharmacological and mechanistic research of *Salvia miltiorrhiza* and its preparations in the treatment of coronary heart disease [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2024, 42(11): 164-169.

[6] Patton E E, Zon L I, Langenau D M. Zebrafish disease models in drug discovery: From preclinical modelling to clinical trials [J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20(8): 611-628.

[7] 赵竟成, 李治建, 霍仕霞, 等. 基于斑马鱼模型的补骨脂不同炮制品水提物急性毒性及肝毒性差异比较 [J]. 中草药, 2024, 55(1): 101-113.
Zhao J C, Li Z J, Huo S X, et al. Comparison of acute toxicity and hepatotoxicity of water extracts from different processed products of *Psoraleae Fructus* based on zebrafish model [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(1): 101-113.

[8] 原杨, 尚悦, 王鹏, 等. 基于斑马鱼模型的中药致肝脏毒性评价的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(5): 933-940.
Yuan Y, Shang Y, Wang P, et al. Research progress on evaluation of hepatotoxicity of traditional Chinese medicine based on zebrafish model [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(5): 933-940.

[9] 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.

[10] Ożarowski M, Piasecka A, Gryszczyńska A, et al. Determination of phenolic compounds and diterpenes in roots of *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia przewalskii* by two LC-MS tools: Multi-stage and high resolution tandem mass spectrometry with assessment of antioxidant capacity [J]. Phytochem Lett, 2017, 20: 331-338.

[11] Ni L J, Zhang F F, Han M Y, et al. Qualitative analysis of the roots of *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia yunnanensis* based on NIR, UHPLC and LC-MS-MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2019, 170: 295-304.

[12] Rogers D, Hahn M. Extended-connectivity fingerprints [J]. J Chem Inf Model, 2010, 50(5): 742-754.

[13] Bajusz D, Rácz A, Héberger K. Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations? [J]. J Cheminform, 2015, 7: 20.

[14] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules [J]. Sci Rep, 2017, 7: 42717.

[15] Lipinski C A, Lombardo F, Dominy B W, et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 46(1/2/3): 3-26.

[16] Benoist L, Chadet S, Genet T, et al. Stimulation of P2Y11 receptor protects human cardiomyocytes against Hypoxia/Reoxygenation injury and involves PKCε signaling pathway [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 11613.

[17] 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.

[18] 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.
Zhang Y, Yang J, Mu L T, et al. Systematic review and trial sequential analysis of efficacy and safety of *Salvia Miltiorrhiza* Polyphenols Injection combined with conventional western medicine in treatment of chronic heart failure [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(19): 6139-6158.

[19] MacRae C A, Peterson R T. Zebrafish as tools for drug discovery [J]. Nat Rev Drug Discov, 2015, 14(10): 721-731.

[20] Maciag M, Wnorowski A, Mierzejewska M, et al. Pharmacological assessment of zebrafish-based cardiotoxicity models [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 148: 112695.

[21] 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.

[22] 铁晓璐, 霍仕霞, 李治建, 等. 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 [J]. 药物评价研究, 2025, 48(3): 627-637.
Tie X L, Huo S X, Li Z J, et al. 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

[J]. Drug Eval Res, 2025, 48(3): 627-637.

[23] Metra M, Teerlink J R. Heart failure [J]. Lancet, 2017, 390(10106): 1981-1995.

[24] Grosman-Rimon L, Billia F, Wright E, et al. Neurohormones, inflammatory mediators, and cardiovascular injury in the setting of heart failure [J]. Heart Fail Rev, 2020, 25(5): 685-701.

[25] 薛慧文, 胡超群, 郑书臣, 等. 中药保护心肌的活性成分(部位)及作用机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(8): 1685-1688.
Xue H W, Hu C Q, Zheng S C, et al. Progress on active ingredients of Chinese materia medica and its mechanism of action for protecting injured myocardium [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(8): 1685-1688.

[26] 龙苗苗, 程贤, 赵振东, 等. 迷迭香酸药理作用及其递送系统的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(11): 3715-3724.
Long M M, Cheng X, Zhao Z D, et al. Research progress on pharmacological effect and delivery system of rosmarinic acid [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(11): 3715-3724.

[27] Zhang X, Ma Z G, Yuan Y P, et al. Rosmarinic acid attenuates cardiac fibrosis following long-term pressure overload via AMPKα/Smad3 signaling [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 102.

[28] Jones T L M, Woulfe K C. Considering impact of age and sex on cardiac cytoskeletal components [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2024, 326(3): H470-H478.

[29] Kilian L S, Voran J, Frank D, et al. RhoA: A dubious molecule in cardiac pathophysiology [J]. J Biomed Sci, 2021, 28(1): 33.

[30] Goldblum R R, McClellan M, White K, et al. Oxidative stress pathogenically remodels the cardiac myocyte cytoskeleton via structural alterations to the microtubule lattice [J]. Dev Cell, 2021, 56(15): 2252-2266.e6.

[31] Tanaka T, Grusby M J, Kaisho T. PDLIM2-mediated termination of transcription factor NF-kappaB activation by intranuclear sequestration and degradation of the p65 subunit [J]. Nat Immunol, 2007, 8(6): 584-591.

[32] Javan H, Szucsik A M, Li L, et al. Cardiomyocyte p65 nuclear factor-κB is necessary for compensatory adaptation to pressure overload [J]. Circ Heart Fail, 2015, 8(1): 109-118.

[33] Misra A, Haudek S B, Knuefermann P, et al. Nuclear factor-kappaB protects the adult cardiac myocyte against ischemia-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction [J]. Circulation, 2003, 108(25): 3075-3078.

[责任编辑　兰新新]