

## 丹参酮 II<sub>A</sub> 通过抑制 *miR-376b-5p* 降低急性心肌梗死大鼠致炎细胞因子分泌并减轻心肌损伤研究

胡月华<sup>1</sup>, 陈 强<sup>2\*</sup>, 邢海生<sup>3</sup>, 陈丽珠<sup>2</sup>, 郭晓华<sup>2</sup>, 任星星<sup>2</sup>

1. 内蒙古科技大学包头医学院, 内蒙古 包头 014000

2. 内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院 心血管内科, 内蒙古 包头 014000

3. 内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院 急诊科, 内蒙古 包头 014000

**摘 要:** 目的 研究丹参酮 II<sub>A</sub> 改善大鼠急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 作用机制。方法 将 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、丹参酮 II<sub>A</sub> (5 mL/kg) 组、*miR-376b-5p* mimics+丹参酮 II<sub>A</sub> 组和 *miR-376b-5p* inhibitor+丹参酮 II<sub>A</sub> 组, 每组 10 只。除假手术组外, 其他各组采用大鼠冠状动脉前降支结扎法建立 AMI 模型, 给予药物干预 12 周后, qRT-PCR 检测大鼠心肌组织中 *miR-376b-5p* 基因表达; 采用苏木素-伊红 (HE) 和 Masson 染色观察心肌组织病理变化和纤维化程度; ELISA 检测血清炎症因子水平; 免疫组化检测心肌组织中 I 型胶原蛋白 (collagen type I, Col1)、III 型胶原蛋白 (collagen type III, Col3) 和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 表达; Western blotting 检测心肌组织中转化生长因子- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)/Smad 和同源基因家族成员 A (Ras homolog gene family member A, RhoA)/Rho 相关螺旋卷曲蛋白激酶 (Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase, ROCK) 信号通路相关蛋白表达。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌组织中 *miR-376b-5p* 表达和血清中白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 水平及磷酸肌酸激酶同工酶 (creatine kinase-myocardial band, CK-MB)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 活性均显著升高 ( $P<0.05$ ); 心肌细胞排列不齐, 间隙大, 可见明显胶原纤维沉积; 心肌组织 Col1、Col3、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、磷酸化 Smad2/3 (phosphorylated Smad2/3, p-Smad2/3)、RhoA、ROCK1/2 和纤连蛋白 (fibronectin, FN) 蛋白表达均显著升高 ( $P<0.05$ ), Smad7 蛋白表达显著降低 ( $P<0.05$ )。与模型组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> 组和 *miR-376b-5p* 抑制剂+丹参酮 II<sub>A</sub> 组心肌组织细胞形态及纤维化程度得到明显改善, 血清中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平和 CK-MB、LDH 活性显著降低 ( $P<0.05$ ), 心肌组织 Col1、Col3、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、p-Smad2/3、RhoA、ROCK1/2 和 FN 蛋白表达显著降低 ( $P<0.05$ ), Smad7 蛋白表达显著升高 ( $P<0.05$ )。结论 丹参酮 II<sub>A</sub> 可能通过抑制心肌组织中 *miR-376b-5p* 表达和 TGF- $\beta$ 1/Smad、RhoA/ROCK 信号通路活化, 从而对 AMI 模型大鼠心室重构起到保护作用。

**关键词:** 丹参酮 II<sub>A</sub>; 急性心肌梗死; *miR-376b-5p*; 转化生长因子- $\beta$ 1/Smad 信号通路; RhoA/ROCK 信号通路; 炎症反应; 心室重构

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)12-3887-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.12.015

## Tanshinone II<sub>A</sub> reduces secretion of inflammatory cytokines and alleviates myocardial injury in rats with acute myocardial infarction by inhibiting *miR-376b-5p*

HU Yue-hua<sup>1</sup>, CHEN Qiang<sup>2</sup>, XING Hai-sheng<sup>3</sup>, CHEN Li-zhu<sup>2</sup>, GUO Xiao-hua<sup>2</sup>, REN Xing-xing<sup>2</sup>

1. Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014000, China

2. Department of Cardiovascular Medicine, the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014000, China

3. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014000, China

收稿日期: 2023-03-14

基金项目: 包头医学院科学研究基金资助项目 (BYJJ-ZRQM202226)

作者简介: 胡月华 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为冠心病的基础研究。E-mail: 1362147495@qq.com

\*通信作者: 陈 强, 硕士生导师, 副主任医师, 主要从事心血管相关研究。E-mail: 619016248@qq.com

**Abstract: Objective** To study the mechanism of tanshinone II<sub>A</sub> in improving acute myocardial infarction (AMI) in rats. **Methods** SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, tanshinone II<sub>A</sub> (5 mL/kg) group, miR-376b-5p mimics + tanshinone II<sub>A</sub> group and miR-376b-5p inhibitor + tanshinone II<sub>A</sub> group, with 10 rats in each group. Except sham operation group, AMI models were established by ligating the anterior descending coronary artery in rats in other groups. After 12 weeks of drug intervention, the expression of *miR-376b-5p* gene in myocardial tissue of rats was detected by qRT-PCR. HE and Masson staining were used to observe the pathological changes and fibrosis degree of myocardial tissue. Levels of inflammatory factors in serum were detected by ELISA. The expressions of collagen type I (Col1), collagen type III (Col3) and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) in myocardial tissue were detected by immunohistochemistry. Western blotting was used to detect transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)/Smad and Ras homolog gene family member A (RhoA)/Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase (ROCK) signal pathway related protein expressions in myocardial tissue. **Results** Compared with sham operation group, the expression of *miR-376b-5p* in myocardial tissue and levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , activities of creatine kinase isoenzyme (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH) were significantly increased ( $P < 0.05$ ), myocardial cells were arranged irregularly, with large gaps, and obvious collagen fiber deposition could be seen; The expressions of Col1, Col3,  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 1, phosphorylated Smad2/3 (p-Smad2/3), RhoA, ROCK1/2 and fibronectin (FN) in myocardial tissues were significantly increased ( $P < 0.05$ ), and Smad7 protein expression was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, tanshinone II<sub>A</sub> group and miR-376b-5p inhibitor + tanshinone II<sub>A</sub> group significantly improved the cellular morphology and fibrosis degree of myocardial tissue, levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and activities of CK-MB, LDH in serum were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), Col1, Col3,  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 1, p-Smad2/3, RhoA, ROCK1/2 and FN protein expressions in myocardial tissues were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), p-Smad7 protein expression was significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Tanshinone II<sub>A</sub> may protect the ventricular remodeling in AMI model rats by inhibiting the expression of *miR-376b-5p* and the activation of TGF- $\beta$ 1/Smad and RhoA/ROCK signal pathways in myocardial tissue.

**Key words:** tanshinone II<sub>A</sub>; acute myocardial infarction; miR-376b-5p; TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathways; RhoA/ROCK signaling pathways; inflammation response; ventricular remodeling

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是由遗传因素和环境因素共同作用引起的一种常见的心血管疾病, 具有高患病率、高死亡率和高致残率的特点, 已超过癌症成为威胁人类健康和生命最大的疾病<sup>[1-3]</sup>。目前临床治疗 AMI 方法虽取得一定疗效, 但 AMI 致死率和致残率仍然很高, 治疗结果仍不理想。究其主要原因是 AMI 患者心室重构导致患者心脏功能不可逆损害<sup>[4-5]</sup>。因此, 目前迫切需要寻找抑制 AMI 患者心室重构的新靶点及其药物, 为治疗 AMI 提供新的临床策略和思路。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类非编码小分子 RNA, 是转录后水平基因表达调控过程中重要的调节因子。miRNA 参与生物多种生理过程的调节, 如细胞增殖、分化、凋亡等, 且广泛参与生命过程与疾病发生和发展<sup>[6-7]</sup>。miRNA 还可参与心肌纤维化、心肌肥厚等心血管疾病的病理生理变化过程, 促进或抑制心肌细胞死亡, 调节缺血后新血管形成。目前大量的 miRNA 被发现参与了心室重构的发生发展过程, 包括 miR-144、miR-133、miR-99a、miR-30 及 miR-34 等<sup>[8-9]</sup>。Pan 等<sup>[10]</sup>发现 M3 亚型乙酰胆碱受体可通过抑制 miR-376b-5p 来发挥心肌保护作用。研究报道, iv miR-144 能够调控细胞

自噬, 降低纤维化, 进而对 AMI 小鼠心室重构具有促进作用<sup>[11]</sup>。炎症反应能引起 AMI 病理过程中的心室重构。炎症是 AMI 患者的心室重构和心肌纤维化的主要病理机制之一。研究表明, 心肌梗死后会导致内源性免疫系统激活, 导致炎性介质的大量释放, 进而促使炎性细胞的迁移, 加速心肌细胞的再次损伤, 释放大量的炎性物质, 加速心肌组织纤维化和心肌细胞凋亡<sup>[12-13]</sup>。这为其他 miRNA 缓解或防治 AMI 小鼠心室重构提供了理论和实验基础。

丹参酮 II<sub>A</sub><sup>[14-15]</sup>靶向 miRNA 对多种心血管疾病颇具疗效, 这为治疗 AMI 心室重构提供了新的视角和机遇。本课题组前期研究发现, miR-376b-5p 在逆转老年自发性高血压大鼠大鼠左室重构中发挥重要作用, 且已证实过表达 miR-376b-5p 可消除丹参酮对自发性高血压大鼠大鼠心室重构的改善效果, 表明 miR-376b-5p 表达是大鼠心室重构重要途径, 这为 miR-376b-5p 在 AMI 大鼠心室重构提供了研究基础<sup>[16]</sup>。因此, miR-376b-5p 可作为治疗 AMI 大鼠心室重构重要靶点。但 miR-376b-5p 调控 AMI 大鼠心室重构具体机制尚不清楚。因此, 本研究拟探究丹参酮 II<sub>A</sub> 以及 miR-376b-5p 在改善 AMI 大鼠心室重构中的作用及其作用机制。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只, 8 周龄, 体质量 220~240 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 合格证号 SCXK(沪) 2020-0007。SD 大鼠于内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院动物实验中心 SPF 级实验动物室饲养, 每笼 5 只, 温度 22~25 °C, 相对湿度 60%~70%, 自由进食饮水。动物实验经内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院医学伦理委员会批准(批准号 BYYFY-2022-0008)。

### 1.2 药品与试剂

丹参酮 II<sub>A</sub> 磺酸钠注射液(批号 H31022558)购自上海上药第一生化药业有限公司; 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )试剂盒(批号 H052-1-1)、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )试剂盒(批号 H002-1-1)、磷酸肌酸激酶同工酶(creatine kinase-myocardial band, CK-MB)试剂盒(批号 H197-1-1)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒(批号 A020-2-2)均购自南京建成生物科技有限公司; 兔抗 I 型胶原蛋白(collagen type I, Col1)抗体(批号 YT6135)、兔抗  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)抗体(批号 YT5053)、兔抗 SMAD 家族成员 2 (SMAD family member 2, Smad2)抗体(批号 YM3364)、兔抗 Smad3 抗体(批号 YT4334)、兔抗磷酸化 SMAD2 (phosphorylated Smad2, p-Smad2)抗体(批号 YP0362)、兔抗 p-Smad3 抗体(批号 YP0585)、兔抗 Smad7 抗体(批号 YN2330)、兔抗 Rho 相关螺旋卷曲蛋白激酶 1 (Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase 1, ROCK1)抗体(批号 YT4162)、兔抗 ROCK2 抗体(批号 YT4163)、兔抗纤连蛋白(fibronectin, FN)抗体(批号 YM3137)、兔抗转化生长因子- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)抗体(批号 YT4632)、兔抗同源基因家族成员 A (Ras homolog gene family member A, RhoA)抗体(批号 YT4077)、鼠抗 III 型胶原蛋白(collagen type III, Col3)抗体(批号 YM6374)、鼠抗  $\beta$ -actin 抗体(批号 YM3028)均购自 ImmunoWay Biotechnology 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 D110058)、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体(批号 D110087)、HRP 标记的链霉卵白素工作液(批号 D111054)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA, 批号 B600036)、BCA 蛋白测定试剂盒(批号 C503021)、

二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)试剂盒(批号 C520017)均购自上海生工生物工程(上海)股份有限公司; 高表达 miR-376b-5p 的慢病毒载体购自上海誉宴生物技术服务公司; miR-376b-5p 模拟物(miR-376b-5p mimics: F: 5'-GGGTGGATATTCC-TTCTA-3', R: 5'-TTTGGCACTAGCACATT-3')、miR-376b-5p 抑制物(miR-376b-5p inhibitor: 5'-AAACAUAAGAAGGAAUAUCCACG-3')由上海吉凯基因公司合成。

### 1.3 仪器

BH-2 型光学显微镜(日本 Olympus 公司); QuantStudio 6 Flex qRT-PCR 仪(美国 ABI 公司); MultiskanGo 1510 型全波段酶标仪(美国 Thermo 公司); Power Pac 1645050 型免疫印迹组件、TransBlotSD 1703940 型垂直电泳转印系统、Universal Hood-II 型凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

### 2.1 AMI 大鼠模型建立、分组和给药

SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分成假手术组、模型组、丹参酮 II<sub>A</sub> (5 mL/kg) 组、miR-376b-5p mimics+丹参酮 II<sub>A</sub> 组和 miR-376b-5p inhibitor+丹参酮 II<sub>A</sub> 组, 每组 10 只。采用大鼠冠状动脉前降支结扎法构建 AMI 大鼠模型, 假手术组除不结扎外其余步骤均同造模组。AMI 心室重构模型成功后, 丹参酮 II<sub>A</sub> 组 ig 丹参酮 II<sub>A</sub> 磺酸钠注射液, 1 次/d, 连续 12 周; miR-376b-5p mimics+丹参酮 II<sub>A</sub> 组和 miR-376b-5p inhibitor+丹参酮 II<sub>A</sub> 组分别先将大鼠转染 miR-376b-5p mimics 载体和 miR-376b-5p inhibitor 载体, 按上述造模方法构建动物模型, 以标准饲料喂养, 造模成功后 ig 丹参酮 II<sub>A</sub> 磺酸钠注射液, 同时尾 iv 0.1 mL miR-376b-5p mimics 载体或 miR-376b-5p inhibitor 载体, 1 次/d, 连续 12 周<sup>[16]</sup>。

### 2.2 ELISA 检测大鼠血清中炎症因子水平

给药结束后, 按照 Hou 等<sup>[17]</sup>方法收集各组大鼠腹主动脉血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平和 LDH、CK-MB 活力。

### 2.3 大鼠心脏组织病理及纤维化程度观察

处死大鼠, 每组随机选取 5 只大鼠摘取左心室, 用 4%多聚甲醛固定后分离并包埋在石蜡中, 4  $\mu$ m 切片。随后按照 Shi 等<sup>[18]</sup>方法将心脏样本分别进行苏木素-伊红(HE)染色和 Masson 染色, 于显微镜下观察并拍照, 评估心脏组织病理变化和心肌细胞纤维化程度。

## 2.4 免疫组化检测心肌组织 Col1、Col3 和 $\alpha$ -SMA 蛋白表达

取心肌组织切片,脱蜡、水化,滴加 30 mol/L 过氧化氢于室温下孵育 10 min;切片置于枸橼酸盐缓冲液中,95 °C 加热 10 min 后室温冷却;用 3% 双氧水孵育 30 min,1% BSA 孵育 30 min,分别滴加兔抗 Col1 抗体(1:300)、兔抗 Col3 抗体(1:200)和兔抗  $\alpha$ -SMA 抗体(1:200),37 °C 孵育 1 h;然后在 37 °C 下加入 HRP 标记的二抗孵育 1 h,利用 DAB 检测免疫反应活性。切片用苏木素染色,利用光学显微镜进行拍照,采用 Image J 13.0 软件测定染色阳性细胞吸光度(A)值。

## 2.5 qRT-PCR 检测心肌组织 miR-376b-5p 表达

按照试剂盒说明书提取心肌组织总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。引物序列:miR-376b-5p 上游引物 5'-GGGTGGATATTCCTTCTA-3',下游引物 5'-TTTGGCACTAGCACATT-3';GAPDH 上游引物 5'-ACGGCAAGTTCAACGGCACAG-3',下游引物 5'-GACGCCAGTAGACTCCACGACA-3'。

## 2.6 Western blotting 检测心肌组织 TGF- $\beta$ 1/Smad 和 RhoA/ROCK 信号通路相关蛋白表达

取各组大鼠心肌组织,加入 RIPA 裂解液提取蛋白,采用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,加入一抗 4 °C 孵育过夜后,孵育二抗,采用凝胶成像仪拍照。

## 2.7 统计学分析

采用 SPSS 22.0 进行数据处理和统计学分析,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)法进行多组间差异分析。

## 3 结果

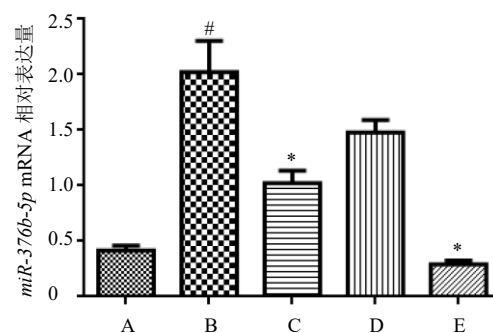
### 3.1 丹参酮 II<sub>A</sub> 抑制 AMI 大鼠心肌组织中 miR-376b-5p 表达

如图 1 所示,与假手术组比较,模型组大鼠心

肌组织中 miR-376b-5p mRNA 表达显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,丹参酮 II<sub>A</sub> 组和 miR-376b-5p inhibitor+丹参酮 II<sub>A</sub> 组心肌组织中 miR-376b-5p mRNA 表达水平显著降低( $P < 0.05$ ),且 miR-376b-5p inhibitor+丹参酮 II<sub>A</sub> 组 miR-376b-5p mRNA 表达量接近假手术组,miR-376b-5p mimics+丹参酮 II<sub>A</sub> 组 miR-376b-5p mRNA 表达水平无显著差异,表明丹参酮 II<sub>A</sub> 能够显著抑制 AMI 大鼠心肌组织中 miR-376b-5p mRNA 表达。

### 3.2 丹参酮 II<sub>A</sub> 抑制 AMI 大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平和 CK-MB、LDH 活性

如图 2 所示,与假手术组比较,模型组大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平和 CK-MB、LDH 活性均显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,丹参酮 II<sub>A</sub> 组和 miR-376b-5p inhibitor+丹参酮 II<sub>A</sub> 组血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平和 CK-MB、LDH 活性均显著降低( $P < 0.05$ )。



A-假手术组 B-模型组 C-丹参酮 II<sub>A</sub> 组 D-miR-376b-5p mimics+丹参酮 II<sub>A</sub> 组 E-miR-376b-5p inhibitor+丹参酮 II<sub>A</sub> 组 与假手术组比较: # $P < 0.05$ ;与模型组比较: \* $P < 0.05$ , 下同  
A-sham operation group B-model group C-tanshinone II<sub>A</sub> group D-miR-376b-5p mimics + tanshinone II<sub>A</sub> group E-miR-376b-5p inhibitor + tanshinone II<sub>A</sub> group  $P < 0.05$  vs sham operation group;  $P < 0.05$  vs model group, same as below figures

图 1 丹参酮 II<sub>A</sub> 对 AMI 大鼠心肌组织中 miR-376b-5p 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 1 Effect of tanshinone II<sub>A</sub> on miR-376b-5p expression in myocardial tissue of AMI rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

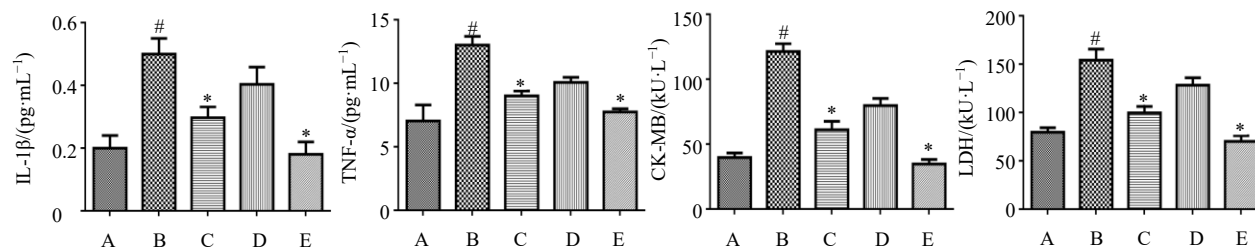


图 2 丹参酮 II<sub>A</sub> 对 AMI 大鼠血清中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平和 CK-MB、LDH 活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 2 Effect of tanshinone II<sub>A</sub> on levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and activities of CK-MB and LDH in serum of AMI rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

0.05), 且 miR-376b-5p inhibitor+丹参酮 II<sub>A</sub> 组接近假手术组, miR-376b-5p mimics+丹参酮 II<sub>A</sub> 组以上指标无显著差异。

### 3.3 丹参酮 II<sub>A</sub> 改善 AMI 大鼠心肌组织形态变化

如图 3 所示, HE 染色可见假手术组大鼠心肌组织形态正常, 心肌细胞排列规则、整齐、细胞间隙小; 模型组大鼠心肌组织中心肌细胞排列紊乱, 心肌纤维断裂、细胞间隙大; 丹参酮 II<sub>A</sub> 组心肌组织的病理学变化得到了显著改善; miR-376b-5p+丹参酮 II<sub>A</sub> 组心肌组织的病理改变较模型组并没有明显变化; miR-376b-5p 抑制剂+丹参酮 II<sub>A</sub> 组心肌组织的病理改变接近假手术组, 且较丹参酮 II<sub>A</sub> 组的改善效果更佳, 表明丹参酮 II<sub>A</sub> 能够抑制 AMI 大鼠心肌组织的病理改变。

Masson 染色可见, 假手术组大鼠心肌组织未见胶原纤维增多; 模型组大鼠心肌组织有明显的胶原纤维增生、沉积; 丹参酮 II<sub>A</sub> 组心肌组织胶原沉积明

显减少, 显示出丹参酮 II<sub>A</sub> 对 AMI 大鼠心肌组织的保护作用。miR-376b-5p mimics+丹参酮 II<sub>A</sub> 组心肌组织胶原纤维沉积较模型组无明显变化; miR-376b-5p 抑制剂+丹参酮 II<sub>A</sub> 组心肌组织胶原纤维沉积接近假手术组, 且较丹参酮 II<sub>A</sub> 组的改善效果更佳, 表明丹参酮 II<sub>A</sub> 能够抑制 AMI 大鼠心肌组织胶原纤维沉积形成。

### 3.4 丹参酮 II<sub>A</sub> 降低 AMI 大鼠心肌组织 Col1、Col3 和 $\alpha$ -SMA 蛋白表达

如图 4 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌组织中 Col1、Col3 和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达均显著升高 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> 组和 miR-376b-5p inhibitor+丹参酮 II<sub>A</sub> 组心肌组织中 Col1、Col3 和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达均显著降低 ( $P<0.05$ ), 且 miR-376b-5p inhibitor+丹参酮 II<sub>A</sub> 组接近假手术组, miR-376b-5p mimics+丹参酮 II<sub>A</sub> 组以上蛋白表达无显著差异。

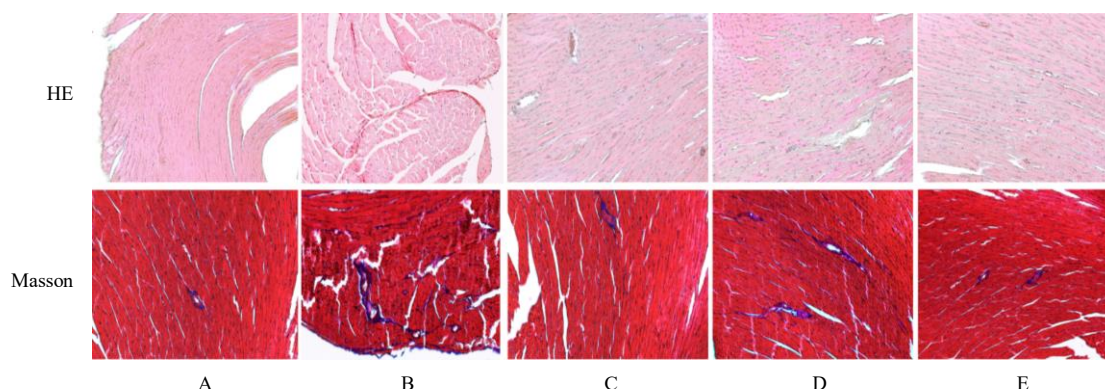


图 3 丹参酮 II<sub>A</sub> 对 AMI 大鼠心肌组织的病理改变和纤维化程度的影响 (×400)

Fig. 3 Effect of tanshinone II<sub>A</sub> on pathological changes and degree of fibrosis in myocardial tissue of AMI rats (×400)

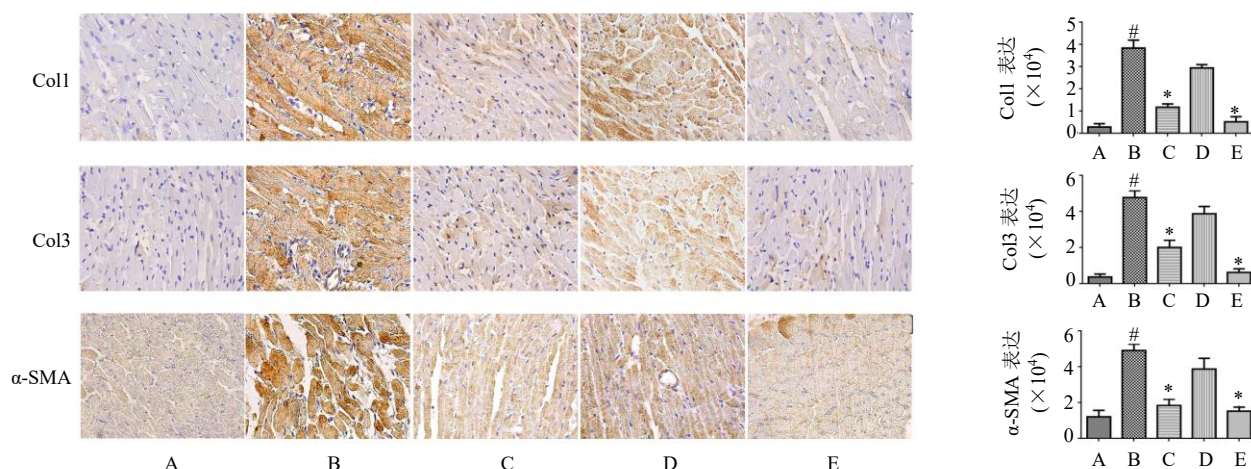


图 4 丹参酮 II<sub>A</sub> 对 AMI 大鼠心肌组织中 Col1、Col3 和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达的影响 (×400;  $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 4 Effect of tanshinone II<sub>A</sub> on Col1, Col3 and  $\alpha$ -SMA protein expressions in myocardial tissue of AMI rats (×400;  $\bar{x} \pm s, n=6$ )

### 3.5 丹参酮 II<sub>A</sub> 调控 AMI 大鼠心肌组织中 TGF- $\beta$ 1/SMAD 和 RhoA/ROCK 信号通路相关蛋白表达

如图 5 所示,与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织中 TGF- $\beta$ 1、p-Smad2/3、RhoA、ROCK1、ROCK2 和 FN 蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.05$ ), Smad7 蛋白表达水平显著降低( $P < 0.05$ );与模型

组比较,丹参酮 II<sub>A</sub> 组和 miR-376b-5p inhibitor+丹参酮 II<sub>A</sub> 组心肌组织中 TGF- $\beta$ 1、p-Smad2/3、RhoA、ROCK1、ROCK2 和 FN 蛋白表达水平均显著降低( $P < 0.05$ ), Smad7 蛋白表达水平显著升高( $P < 0.05$ ), miR-376b-5p mimics+丹参酮 II<sub>A</sub> 组以上蛋白表达无显著差异。

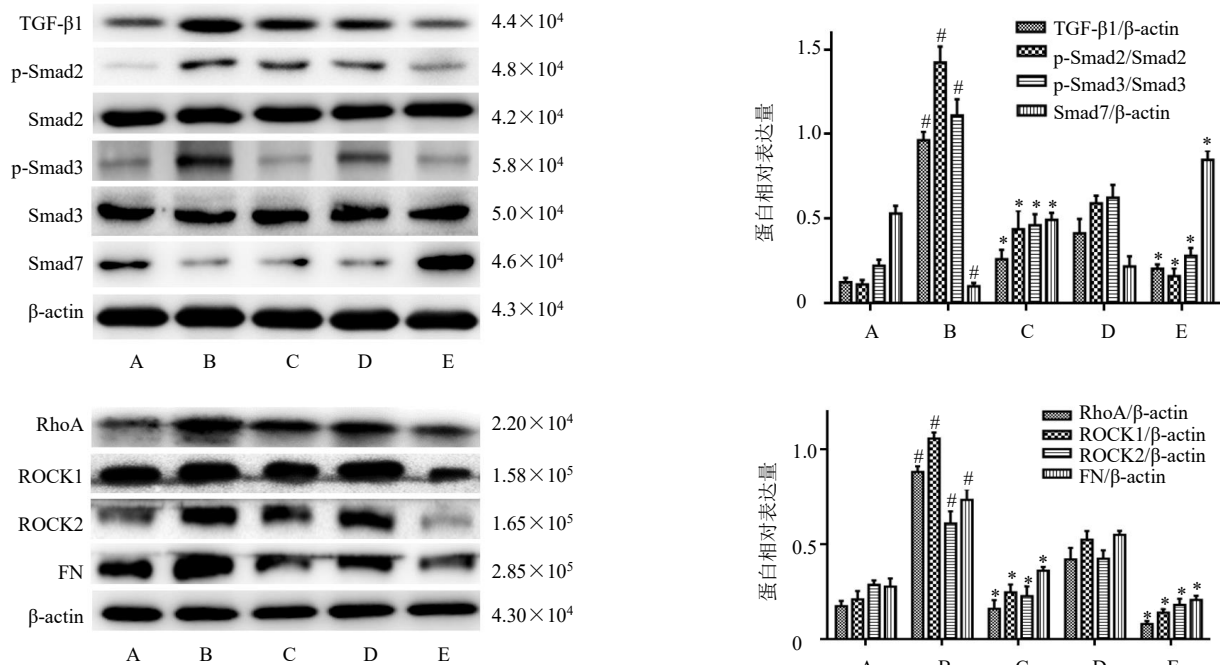


图 5 丹参酮 II<sub>A</sub> 对 AMI 大鼠心肌组织中 TGF- $\beta$ 1/Smad 和 RhoA/ROCK 相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 5 Effect of tanshinone II<sub>A</sub> on expressions of TGF- $\beta$ 1/Smad and RhoA/ROCK related proteins in myocardial tissue of AMI rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 4 讨论

AMI 是一种严重的冠状动脉心脏病,每年死亡人数约占全球死亡人数的 1/3;而心室重构是 AMI 基本病理过程,会造成大量心肌细胞纤维化,导致心脏功能障碍,最终导致患者死亡<sup>[19-20]</sup>。研究表明,丹参酮 II<sub>A</sub> 能够可降低心肌细胞凋亡,逆转 AMI 心肌细胞损伤<sup>[21-22]</sup>。本研究发现,丹参酮 II<sub>A</sub> 能够改善 AMI 模型大鼠心肌组织病理形态,减轻心肌组织纤维化程度的发生。心肌细胞凋亡和纤维化是心室重构的一种重要病理改变,表明丹参酮 II<sub>A</sub> 可以改善心肌纤维化和心肌损伤进而抑制心室重构。然而,当同时给予 AMI 模型大鼠 miR-376b-5p 抑制剂时,AMI 模型大鼠心肌组织 miR-376b-5p 表达显著降低,心肌细胞凋亡和纤维化程度明显改善,表明丹参酮 II<sub>A</sub> 与 miR-376b-5p 抑制剂联合应用能够明显改善 AMI 模型大鼠心肌组织病理性改变。

在炎症反应中,IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  等炎性细胞因

子是启动级联炎症反应的关键因素。细胞释放 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  能诱发心肌细胞活力下降和凋亡,加速心肌组织分泌大量胶原蛋白和心肌纤维化,损伤心肌功能,诱发 CK-MB 和 LDH 的过表达,CK-MB 和 LDH 是心肌损伤的重要标志物,进而造成心室重构等<sup>[23-25]</sup>。研究表明,miRNA 参与心室重构的发生发展过程。本课题组前期已经发现 miR-376b-5p 在逆转老年自发性高血压大鼠左室重构中发挥重要作用。本研究发现,丹参酮 II<sub>A</sub> 能够调节 AMI 模型大鼠心肌组织 miR-376b-5p 的表达,并能够改善心肌组织细胞的形态,抑制 AMI 模型大鼠血清中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平及 CK-MB、LDH 活力,减少心肌组织 Col、Col3 和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达。然而,当同时给予 AMI 模型大鼠 miR-376b-5p 抑制剂时,AMI 模型大鼠的炎症因子、心肌损伤标志物、胶原蛋白和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达同时降低,表明丹参酮 II<sub>A</sub> 与 miR-376b-5p 抑制剂具有类似效果。

在心室重构的生理过程和病理过程中, TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路都发挥着重要作用<sup>[26]</sup>。TGF- $\beta$ 1 能够促进组织纤维化, 加速组织损伤。研究表明, Smad7 是 TGF- $\beta$ 1/SMAD 信号通路的关键调节蛋白。TGF- $\beta$ 1 的磷酸化能够促进 Smad2/3 的磷酸化, 进而抑制 SMAD7 参与心室重构<sup>[27-28]</sup>。同样, RhoA/ROCK 信号通路也是调控肌动蛋白骨架的组装、增殖、分化等过程的关键途径。研究表明, 心肌损伤后 RhoA 蛋白能够介导机体 ROS 的产生, 加速机体心肌细胞损伤的恶性循环, 并能够诱导核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 的活化, 进一步激活 TGF- $\beta$ 1、IL-6 等炎症因子的分泌, 又可加速 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路的活化, 加速恶性循环, 导致大量炎症因子堆积<sup>[29-30]</sup>。本研究显示, 丹参酮 II<sub>A</sub> 能够调节 AMI 大鼠心肌组织中 TGF- $\beta$ 1/Smad 和 RhoA/ROCK 2 条信号通路中相关蛋白的表达; 当同时给予 AMI 模型大鼠 miR-376b-5p 抑制剂时, AMI 模型大鼠心肌组织中 TGF- $\beta$ 1/SMAD 信号通路和 RhoA/ROCK 信号通路相关蛋白表达与仅给予丹参酮 II<sub>A</sub> 结果一致。这表明丹参酮 II<sub>A</sub> 改善 AMI 可能是通过调节 miR-376b-5p 的表达, 进而发挥作用的。

综上, 本研究联合丹参酮 II<sub>A</sub> 和 miR-376b-5p 抑制剂治疗发现, 丹参酮 II<sub>A</sub> 和 miR-376b-5p 抑制剂具有类似效果, 能够抑制 miR-376b-5p 表达、心肌细胞损伤和纤维化, 并能够同时抑制机体炎症、TGF- $\beta$ 1/Smad 和 RhoA/ROCK 信号通路活化, 进而改善心室重构。丹参酮 II<sub>A</sub> 可能通过调节 miR-376b-5p, 在改善心室重构过程中发挥重要作用。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Reed G W, Rossi J E, Cannon C P. Acute myocardial infarction [J]. *Lancet*, 2017, 389(10065): 197-210.
- [2] Shah A H, Puri R S, Kalra A. Management of cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction: A review [J]. *Clin Cardiol*, 2019, 42(4): 484-493.
- [3] 孔德慧. 北京地区寒潮—热浪和极端湿度对急性心肌梗死住院的影响研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2020.
- [4] Tamis-Holland J E, Jneid H, Reynolds H R, et al. Contemporary diagnosis and management of patients with myocardial infarction in the absence of obstructive coronary artery disease: A scientific statement from the American heart association [J]. *Circulation*, 2019, 139(18): e891-e908.
- [5] 孙佳艺, 张倩, 赵冬, 等. 北京市 2007—2012 年急性心肌梗死住院患者 30 天病死率变化趋势分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2018, 39(3): 5.
- [6] Saliminejad K, Khorram Khorshid H R, Soleymani Fard S, et al. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5451-5465.
- [7] Cui J, Zhou B Y, Ross S A, et al. Nutrition, microRNAs, and human health [J]. *Adv Nutr*, 2017, 8(1): 105-112.
- [8] Li Q L, Xie J, Li R T, et al. Overexpression of microRNA-99a attenuates heart remodelling and improves cardiac performance after myocardial infarction [J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(5): 919-928.
- [9] Liu X X, Deng Y F, Xu Y F, et al. MicroRNA-223 protects neonatal rat cardiomyocytes and H9c2 cells from hypoxia-induced apoptosis and excessive autophagy via the Akt/mTOR pathway by targeting PARP-1 [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 118: 133-146.
- [10] Pan Z Y, Guo Y P, Qi H P, et al. M3 subtype of muscarinic acetylcholine receptor promotes cardioprotection via the suppression of miR-376b-5p [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32571.
- [11] Li J, Cai S X, He Q, et al. Intravenous miR-144 reduces left ventricular remodeling after myocardial infarction [J]. *Basic Res Cardiol*, 2018, 113(5): 36.
- [12] Fonseca F A, Izar M C. Role of inflammation in cardiac remodeling after acute myocardial infarction [J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 927163.
- [13] Liu Y Y, Guan R C, Yan J Z, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle-shuttled microRNA-302d-3p represses inflammation and cardiac remodeling following acute myocardial infarction [J]. *J of Cardiovasc Trans Res*, 2022, 15(4): 754-771.
- [14] Jia S, Ma W D, Zhang C Y, et al. Tanshinone II<sub>A</sub> attenuates high glucose induced human VSMC proliferation and migration through miR-21-5p-mediated tropomyosin 1 downregulation [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 677: 108154.
- [15] Chen L Y, Wei L L, Yu Q Y, et al. Tanshinone II<sub>A</sub> alleviates hypoxia/reoxygenation induced cardiomyocyte injury via lncRNA AK003290/miR-124-5p signaling [J]. *BMC Mol Cell Biol*, 2020, 21(1): 20.
- [16] 陈强, 陈丽珠, 郭晓华. 丹参酮通过抑制 miR-376b-5p 逆转自发性高血压大鼠左室重构 [J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(22): 5549-5551.
- [17] Hou J Q, Wang C, Ma D, et al. The cardioprotective and anxiolytic effects of Chaihuojialonggumuli Granule on rats with anxiety after acute myocardial infarction is partly mediated by suppression of CXCR4/NF- $\kappa$ B/GSDMD

- pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 111015.
- [18] Shi J Y, Hou J Q, Sun Y Z, *et al*. Chaihujialonggumultang shows psycho-cardiology therapeutic effect on acute myocardial infarction with comorbid anxiety by the activation of Nrf2/HO-1 pathway and suppression of oxidative stress and apoptosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 153: 113437.
- [19] Blas-Valdivia V, Moran-Dorantes D N, Rojas-Franco P, *et al*. C-Phycocyanin prevents acute myocardial infarction-induced oxidative stress, inflammation and cardiac damage [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 755-763.
- [20] Yan J K, Guo J, Wang Y Z, *et al*. Acute myocardial infarction therapy using calycosin and tanshinone co-loaded mitochondria targeted lipid-polymer hybrid nano-system: Preparation, characterization, and anti myocardial infarction activity assessment [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 155: 113650.
- [21] Wang X Y, Wang Y, Jiang M, *et al*. Differential cardioprotective effects of salvianolic acid and tanshinone on acute myocardial infarction are mediated by unique signaling pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 135(3): 662-671.
- [22] 冯军鹏, 梁梅芳, 王有恒, 等. 丹参酮 II<sub>A</sub> 磺酸钠联合重组人脑利钠肽治疗心肌梗死的效果、心功能改善情况和预后 [J]. *药物评价研究*, 2019, 42(8): 1576-1579.
- [23] Song W M, Dai B, Dai Y T. Influence of ginsenoside Rh<sub>2</sub> on cardiomyocyte pyroptosis in rats with acute myocardial infarction [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 5194523.
- [24] Cheng X D, Zhang R Z, Wei S L, *et al*. Dexamethasone alleviates myocardial injury in a rat model of acute myocardial infarction supported by venoarterial extracorporeal membrane oxygenation [J]. *Front Public Health*, 2022, 10: 900751.
- [25] Khalifa A A, El Sokkary N H, Elblehi S S, *et al*. Potential cardioprotective effect of octreotide via NOXs mitigation, mitochondrial biogenesis and MAPK/ERK1/2/STAT3/NF- $\kappa$ B pathway attenuation in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 925: 174978.
- [26] Wei X, Zheng Y, Zhang W L, *et al*. Ultrasound-targeted microbubble destruction-mediated galectin-7-siRNA promotes the homing of bone marrow mesenchymal stem cells to alleviate acute myocardial infarction in rats [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(2): 677-687.
- [27] Zhao W Y, Zhang L Y, Wang Z C, *et al*. The compound losartan cream inhibits scar formation via TGF- $\beta$ /Smad pathway [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 14327.
- [28] Yang S J, Feng X, Wang Y, *et al*. Protective effect of combined moxibustion and decoction therapy on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats under nuclear factor- $\kappa$ B/transforming growth factor- $\beta$ 1/Smads signaling pathway [J]. *Cell Mol Biol*, 2022, 68(6): 48-55.
- [29] Liang J Q, Zeng X W, Halifu Y, *et al*. Blocking RhoA/ROCK inhibits the pathogenesis of *Pemphigus vulgaris* by suppressing oxidative stress and apoptosis through TAK1/NOD2-mediated NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 436(1): 151-158.
- [30] Yan J Y, Tang Y X, Zhong X, *et al*. ROCK inhibitor attenuates carbon blacks-induced pulmonary fibrosis in mice via Rho/ROCK/NF-kappa B pathway [J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36(7): 1476-1484.

[责任编辑 李亚楠]