

麝香通心滴丸改善心衰大鼠心脏冠脉微血管重构作用

姚骏凯^{1,3}, 郭抒娟^{1,3}, 黄明月^{1,3}, 李春^{1,3}, 王勇^{1,3}, 王伟^{1,2,3*}

1. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029

2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

3. 北京中医药大学 证候与方剂基础研究教育部重点实验室, 北京 100029

摘要: 目的 研究麝香通心滴丸 (Shexiang Tongxin dropping pills, STDP) 通过缓解心肌成纤维细胞的增殖和迁移, 从而改善心衰冠脉微血管重构的作用机制。方法 采用大鼠冠脉左前降支结扎建立心衰模型, 分为假手术组、模型组、STDP 组、替米沙坦 (telmisartan, TLM) 组, ig 给药 14 d, 通过心脏超声检测心功能, 马松染色、天狼猩红染色检测心肌冠脉微血管重构; 采用血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 诱导心肌成纤维细胞建立纤维化模型, 将细胞分为对照 (空白 DMEM 培养基) 组、Ang II (1 $\mu\text{mol/L}$) 组、Ang II (1 $\mu\text{mol/L}$) + STDP 各剂量组 (1.08、2.16、4.32、8.64 mg/kg) 和 Ang II (1 $\mu\text{mol/L}$) + 血管紧张素转化酶 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2) 抑制剂 MLN-4760 (1 $\mu\text{mol/L}$) 组。通过 CCK-8 法检测心肌成纤维细胞增殖情况, 划痕实验检测心肌成纤维细胞迁移情况; 免疫印迹 (Western blotting, WB) 法检测 ACE2、血管紧张素 II 受体 2 (angiotensin II receptor 2, AT2)、AT1、MAS1 癌基因 (MAS1 oncogene, MAS1)、血清应答因子 (serum response factor, SRF)、胶原蛋白 1 (collagen 1, COL1)、基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 的表达。结果 心脏超声显示 STDP 可提高心衰大鼠左心室射血分数 (left ventricular ejection fraction, EF)、左心室短轴缩短率 (left ventricular fractional shortening, FS) 和心输出量 ($P < 0.05$); 马松染色、天狼猩红染色结果显示 STDP 抑制心脏冠脉微血管纤维化 ($P < 0.05$); CCK-8 结果显示 STDP 可显著降低心肌成纤维细胞增殖 ($P < 0.05$), 划痕实验表明 STDP 可显著抑制心肌成纤维细胞迁移 ($P < 0.05$)。WB 结果显示 STDP 可提高 ACE2、AT2 和 MAS1 蛋白表达, 抑制 AT1、SRF 蛋白表达 ($P < 0.05$); 同时, STDP 抑制 COL1、MMP2 和 OPN 的蛋白表达 ($P < 0.05$), 而 ACE2 抑制剂逆转了 STDP 的调控作用。结论 STDP 通过调控 ACE2-AT2/MAS1 信号通路和 AT1-SRF 信号通路抑制心脏冠脉微血管重构, 改善心功能异常, 防治心梗后心衰。

关键词: 麝香通心滴丸; 心力衰竭; 冠脉微血管重构; 心肌成纤维细胞功能紊乱; 血管紧张素 II 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)23-8091-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.23.016

Effect of Shexiang Tongxin Dropping Pills on coronary microvascular remodeling in heart failure rats

YAO Junkai^{1,3}, GUO Shujuan^{1,3}, HUANG Mingyue^{1,3}, LI Chun^{1,3}, WANG Yong^{1,3}, WANG Wei^{1,2,3}

1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. College of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

3. Key Laboratory of Basic Research on Syndromes and Prescriptions, Ministry of Education, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To investigate mechanism of Shexiang Tongxin dropping pills (麝香通心滴丸, STDP) to improve coronary microvascular remodeling in heart failure by alleviating proliferation and migration of myocardial fibroblasts. **Methods** A heart failure model was established by ligating the left anterior descending coronary artery in rats, which were divided into sham surgery group, model group, STDP group, and telmisartan (TLM) group for 14 d of treatment. Cardiac function was evaluated by echocardiography, and myocardial coronary microvascular remodeling was detected by Masson and Sirius red staining. Myocardial

收稿日期: 2024-05-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81930113, 82305216); 中国博士后科学基金项目 (2023M730345)

作者简介: 姚骏凯, 博士, 从事中西医结合防治心血管疾病研究。E-mail: bucmyjk@163.com

*通信作者: 王伟, 博士, 教授, 从事中西医结合防治心血管疾病研究。E-mail: wangwei26960@126.com

fibroblasts were induced by angiotensin II (Ang II) to establish fibrosis model. The cells were divided into control (blank DMEM medium) group, Ang II (1 $\mu\text{mol/L}$) group, Ang II (1 $\mu\text{mol/L}$) + STDP groups (1.08, 2.16, 4.32, 8.64 mg/kg) and Ang II (1 $\mu\text{mol/L}$) + angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) inhibitor MLN-4760 (1 $\mu\text{mol/L}$) groups. The proliferation of myocardial fibroblasts was detected by CCK-8, and the migration of myocardial fibroblasts was detected by scratch assay. Western blotting (WB) was used to detect the expression levels of pathway proteins such as ACE2, angiotensin II receptor 2 (AT2), AT1, MAS1 oncogene (MAS1), serum response factor (SRF) and migration proteins such as collagen (COL1), matrix metalloproteinase 2 (MMP2), and osteopontin (OPN).

Results Echocardiography showed that STDP increased left ventricular ejection fraction (EF), left ventricular fractional shortening (FS) and cardiac output in heart failure rats ($P < 0.05$). The results of Masson and Sirius red staining showed that STDP inhibited the area of microvascular fibrosis in the coronary arteries of the heart ($P < 0.05$). The CCK-8 result showed that STDP inhibited the proliferation of myocardial fibroblasts ($P < 0.05$), and scratch assay showed that STDP inhibited the migration of myocardial fibroblasts ($P < 0.05$). WB showed that STDP increased the expression levels of ACE2, AT2, and MAS1, while inhibiting the expression levels of AT1 and SRF proteins ($P < 0.05$). Meanwhile, STDP inhibited the expression levels of COL1, MMP2, OPN and other proteins ($P < 0.05$), while ACE2 inhibitors reversed the regulatory effect of STDP.

Conclusion STDP inhibits coronary microvascular remodeling by regulating ACE2-AT2/MAS1 signaling pathway and AT1-SRF signaling pathway, improves cardiac function, and prevents heart failure after myocardial infarction.

Key words: Shexiang Tongxin dropping pills; heart failure; coronary microvascular remodeling; dysfunction of myocardial fibroblasts; Ang II signaling pathway

《中国心血管健康与疾病报告 2020》^[1]数据显示,近年我国 20 岁以上的成年人中出现心血管疾病的比例高达 26%,基于我国人口总数推测我国心血管病患者数量将超过 3 亿。研究表明,血管活性物质,如血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II),引起的血管损伤是心血管病常见的病理变化^[2]。Ang II 能够激活心肌成纤维细胞增殖和迁移,诱发血管壁结构紊乱,引起血管重构,进而导致血管管腔狭窄,甚至血管阻塞,严重威胁患者的生命安全^[3-4]。因此,缓解心肌成纤维细胞功能紊乱引起的血管重构对防治心血管疾病防治至关重要。

麝香通心滴丸 (Shexiang Tongxin Dropping Pills, STDP) 由人工麝香、人参茎叶总皂苷、蟾酥、丹参、人工牛黄、熊胆粉和冰片组成,具有“芳香益气通脉,活血化瘀止痛”的功效。研究表明,STDP 可以改善血管重构,降低循环中 Ang II 的含量^[4]。依据《冠状动脉微血管疾病诊断和治疗的中国专家共识》^[5],冠脉微血管主要由血管内径小于 0.5 mm 的前小动脉以及小动脉构成,冠脉微血管重构是心梗后冠脉微血管功能障碍的重要诱因。研究表明,STDP 能够改善心梗后冠脉微血管功能紊乱和微血管功能,提示 STDP 可以调控血管的功能,改善血管结构^[6]。据此,本研究通过构建心梗后心衰大鼠模型及 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞功能紊乱模型,探讨 STDP 通过抑制心肌

成纤维细胞的增殖和迁移改善心衰冠脉微血管重构的作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠,雄性,体质量 180~200 g,8 周龄,由斯贝福(北京)动物科技有限公司提供,实验动物许可证号 SCXK(京)2019-0010。动物饲养于北京中医药大学屏障环境动物实验室,温度(20±2)℃、湿度(60±5)%、12 h 光照/黑暗循环的环境,常规饲料喂养,饲养期间动物自由饮用水。本研究动物实验经北京中医药大学伦理委员会批准(批准号 BUCM-4-2021113002-4048)。

1.2 药品与试剂

STDP(国药准字 Z20080018,批号 221214)由内蒙古康恩贝药业有限公司圣龙分公司提供;替米沙坦(telmisartan, TLM,批号 C44729)购自上海勃林格殷格翰药业有限公司;肌酸激酶(creatine kinase, CK,批号 221009)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH,批号 221017)、脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP,批号 RGB-60076R)、N-末端脑利钠肽前体(N-terminalpro-brainnatriureticpeptide, NT-proBNP,批号 RGB-60686R)购自北京瑞格博科技发展有限公司;5×SDS 蛋白样品处理液(批号 B1007-5),Triton X-100(批号 A1009-100);100×蛋白磷酸酶抑制剂混合物(批号 P1275-1)、100×蛋白酶抑制剂混

合物(批号 P1260-1)、BCA 蛋白定量试剂盒(批号 P1517)、10×电泳缓冲液(批号 B2006)、10×电转缓冲液(批号 B1005)、膜再生液(批号 P1605)、一抗抗体稀释液(批号 C1240)、二抗抗体稀释液(批号 C1241)、脱脂奶粉(批号 P1622)、二抗抗体(批号 C1390)均购自北京普利莱基因技术有限公司; ECL 超敏发光液(批号 SQ201)、蛋白相对分子质量 Marker(批号 P1103)购自上海雅酶生物医药科技有限公司; DMEM 基础培养基(含 FBS, 批号 07084)、0.25%胰酶-EDTA 消化液(批号 G4202)购自美国 CORNING 公司; Ang II(批号 4474-91-3)购自美国 Sigma 公司; Masson 染色试剂盒(批号 G1006)、Sirius red 染色试剂盒(批号 GP1138)购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 血管紧张素转化酶 2(angiotensin converting enzyme 2, ACE2)抑制剂 MLN-4760(批号 HY-19441)购自美国 MedChemexpress 生物科技有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, 批号 AB2000)、 β -肌动蛋白(β -actin, 批号 AB2001)、ACE2(批号 CY5787)、血管紧张素 II 受体 1(angiotensin II receptor 1, AT1, 批号 CY6681)、AT2(批号 CY5718)抗体均购自上海泊湾生物科技有限公司; 基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2, MMP2, 批号 bs-0412R)、MMP9(批号 bs-0397R)、MAS1 癌基因(MAS1 oncogene, MAS1, 批号 bs-5925R)抗体均购自北京博奥森生物技术有限公司; Rho 相关蛋白激酶 1(Rock 1, 批号 bs-1166R)、Rock 2(批号 bs-1205R)、血清应答因子(serum response factor, SRF, 批号 bs-1401R)、胶原蛋白 1(collagen 1, COL1, 批号 bs-0578R)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN, 批号 bs-0026R)抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 仪器

ALC-V8S 型小动物呼吸机(上海奥尔科特生物科技有限公司); Vevo TM 2100 型小动物超声影像系统(加拿大 Visual Sonics 公司); 5242R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司); HITACHI7080 型全自动生化仪(日本日立公司); TS200 型智能摇床(江苏海门其林贝尔仪器制造公司); PowerPac basic 型凝胶成像仪及图像分析系统(美国 BIO-RAD 公司); ICC50HD 型光学显微镜(德国 Leica 公司);

SIM-F140AY65 型制冰机、CMCO-18AIC(UV)型培养箱(日本 SANYO 公司)。

2. 方法

2.1 动物造模、分组及给药

研究根据文献方法^[6]造模,大鼠禁食不禁水 12 h,于实验开始前称大鼠体质量,进行麻醉、固定、备皮、气管插管,采用小动物呼吸机进行辅助呼吸(呼吸频率 80 次/min、潮气量 6 mL、吸呼比率 2:1)。将第 3、4 根肋骨作为边界,止血钳钝性分离胸前肌肉层至肋间肌,钝性分离第 3、4 肋骨,暴露心脏。撕开心包膜,棉球垫压肺叶与胸腺,观察左心耳下缘与肺动脉圆锥间的左冠状静脉丛,用 2-0 缝合线在左冠状静脉丛下穿针,进针深度 2 mm,宽度静脉丛 2 mm。穿线后进行打结,肉眼可见左心室前壁变紫或苍白后,逐层闭合胸腔和胸前肌肉层,挤压胸腔完全排出胸腔内气体避免气胸,缝合。

根据中国中西医结合学会心血管病专业委员会公布的《急性心肌梗死中西医结合诊疗指南》^[7],本研究以 TLM 作为阳性药。将 40 只大鼠随机分为假手术组 6 只与手术组 34 只,假手术组大鼠只穿线不结扎,手术组进行结扎造模。本研究造模未成功大鼠 6 只,造模期间大鼠死亡 7 只(急性心衰 5 只、气胸 2 只)。将 21 只造模成功大鼠随机分为模型组、STDP(21.6 mg/kg)组和 TLM(8.23 mg/kg)组,每组 7 只。给药组大鼠 ig 相应药物(10 mL/kg),假手术组和模型组大鼠 ig 等体积娃哈哈纯净水,连续 ig 给药 2 周,给药期间共死亡 4 只(模型组 2 只、STDP 组 1 只、TLM 组 1 只)。

2.2 血清指标含量的检测

待超声检测后,麻醉大鼠,进行腹主动脉取血,4 ℃静置 2 h,4 ℃、3 000 r/min 离心 10 min,取上清,于-80 ℃保存。利用全自动生化分析仪测定血清中心肌损伤标志物 CK、LDH 的含量,具体实验操作参照试剂盒说明书进行。采用 ELISA 检测大鼠血清中 BNP、NT-proBNP 的含量,以及成纤维细胞中 Ang(1-7)的含量。

2.3 心脏组织分离取样及马松(Masson)、天狼猩红(Sirius red)染色

取血后,立即摘取大鼠心脏,用生理盐水洗除心脏内残血,剔除多余的心房、心耳等非心肌部分及结缔组织。随后采用手术刀片沿心脏结扎点以下 1 mm 处进行横切,固定于 4%多聚甲醛中。将固定的心肌组织进行石蜡包埋,进行 Masson、Sirius red

染色。

2.3.1 Masson 染色 石蜡切片脱蜡，Masson A 溶液浸泡过夜，纯水洗涤，浸入 Masson B、Masson C 等比混合染液，纯水洗涤，浸入 Masson D 染液，纯水洗涤，浸入 Masson E 染液，沥干，浸入 Masson F 液染，用 1% 的冰醋酸漂洗分化，脱水，透明封片，镜检，采集图像，计算血管纤维化区域占比、相对纤维化程度。

血管纤维化区域占比 = (胶原面积/视野内心肌组织总面积)

相对纤维化程度 = 各组纤维化区域占比/假手术组纤维化区域占比平均值

2.3.2 Sirius red 染色 石蜡切片脱蜡水化，PBS 洗涤 2 次。吸去多余水分，滴加天狼猩红染液，室温染色 1 h。PBS 缓冲液洗涤 2 次后，去离子水洗净染色液。切片脱水透明，中性树胶封片，镜检，采集图像，计算血管纤维化区域占比、相对纤维化程度。

2.4 STDP 含药血清制备

SD 大鼠适应性喂养 1 周，STDP 水溶液 ig 给药 (1.62 mg/kg) 制备含药血清，2 次/d，连续给药 7 d，腹主动脉取血，4 °C 静置 2 h，4 °C、3 500 r/min 离心 15 min，取上清于 56 °C 水浴灭活 30 min，经 0.22 μm 滤器滤过^[8]，-80 °C 保存。

2.5 心肌成纤维细胞的培养及分组

采用酶消化法分离心肌成纤维细胞。

(1) SD 大鼠乳鼠 (SPF 级，1~3 日龄)，冷冻麻醉 15 min，75%乙醇消毒。在超净工作台内剖取心脏，分离心室，置于 4 °C 预冷的 D-hanks 溶液中，去除残留血液，剪碎心脏组织并转移至无菌离心管中，采用 0.25% 胰酶消化液进行初步消化，移入 4 °C 冰箱放置过夜 (10~11 h)。

(2) 去除胰酶，1:1 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基，37 °C 水浴 5 min，终止消化，保留组织，重新加胶原酶 II 溶液，37 °C 水浴消化 8 min，分离消化液，加含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化，剩余组织重复步骤 (2) 进行再次消化。

(3) 收集消化液过筛 (40 μm) 1 000 r/min 离心 5 min，去上清，用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬，接种于 10 cm 培养皿，差速贴壁分离 1.5 h，贴壁为心肌成纤维细胞。将心肌成纤维细胞培养至密度 80%~90%，消化重悬计数，于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞贴壁 24 h 后，进行细胞造模及给药干预。

选用终浓度为 0.1 μmol/L 的血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 刺激心肌成纤维细胞 24 h，制备心肌成纤维细胞纤维化模型^[7]。采用无血清 DMEM 培养基均一化细胞 24 h，将细胞分为对照 (空白 DMEM 培养基) 组、Ang II (1 μmol/L) 组、Ang II (1 μmol/L) + STDP 各剂量组 (1.08、2.16、4.32、8.64 mg/kg) 和 Ang II (1 μmol/L) + ACE2 抑制剂 MLN-4760 (1 μmol/L) 组，分别于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中常规培养，进行后续相关指标的检测^[9]。

2.6 细胞划痕实验

待心肌成纤维细胞长到 80% 的密度，利用无血清 DMEM 培养基培养 24 h 进行细胞均一化，以高压灭菌钢尺为参照物，采用 200 μL 黄枪头垂直进行划痕并标记，PBS 洗涤细胞 3 次，加入 2 mL 无酚红 DMEM，完成第 1 次划痕，显微镜下记录为 0 h 图像。随后进行各组心肌成纤维细胞给药处理 24 h 后，PBS 洗涤细胞 3 次，加入无酚红 DMEM，显微镜下记录为 24 h 图像，采用 Image-J 软件分析细胞迁移面积。

迁移面积 = 0 h 图像面积 - 24 h 图像面积

相对迁移面积 = 各组迁移面积/对照组迁移面积平均值

2.7 Western blotting 检测相关蛋白表达

RIPA 蛋白裂解液提取总蛋白，采用 BCA 法计算蛋白浓度。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，采用 5% 的脱脂牛奶室温封闭 2 h。一抗 4 °C 孵育过夜，次日取出，室温孵育 30 min，TBST 洗涤 10 min，重复 3 次，二抗室温孵育 45 min，TBST 洗涤 10 min，重复 3 次。ECL 发光显影曝光并采集图像。GAPDH、β-actin 稀释比例为 1:5 000，ACE2、AT1、AT2、MMP2、MMP9、MAS1、Rock1、Rock2、SRF、COL1、OPN 稀释比例为 1:1 000。采用 Image Lab 软件进行分析。

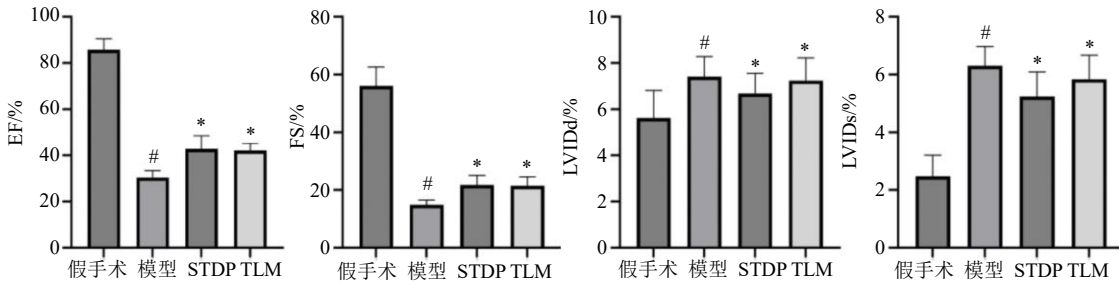
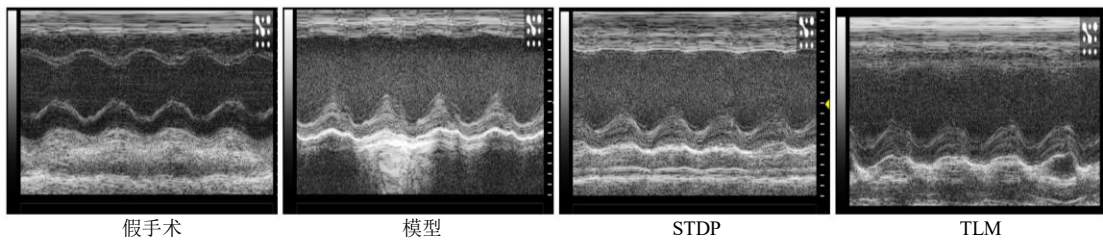
2.8 统计学分析

使用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行统计分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。若符合正态分布，采用单因素方差分析或 *t* 检验；不符合正态分布则采用非参数检验；计数数据采用等级资料的非参数检验。

3 结果

3.1 对心衰大鼠心功能的影响

如图 1 所示，超声心动图结果显示，与假手术组比较，模型组大鼠射血分数值 (ejection fraction, EF)、短轴缩短率 (fractional shortening,



与假手术组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$, 下图同。
[#] $P < 0.05$ vs sham group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group, same as below figures.

图1 麝香通心滴丸对心衰大鼠心功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 6$)

Fig. 1 Effects of STDP on cardiac function in heart failure rats ($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 6$)

FS) 明显降低 ($P < 0.05$), 表明大鼠心输出量显著下降, 出现严重的心衰情况; 同时大鼠左室舒张末期径值 (left ventricular end-diastolic internal diameter, LVIDd)、左室收缩末期径值 (left ventricular end-systolic internal diameter, LVIDs) 显著升高 ($P < 0.05$), 表明心衰大鼠出现心室重构。与模型组比较, STDP 组大鼠 EF、FS 显著升高 ($P < 0.05$), 表明 STDP 能够提高心输出量, 改善心衰情况; LVIDd 值、LVIDs 值显著降低 ($P < 0.05$), 提示 STDP 可提高心衰大鼠心输出量、改善心功能、抑制心脏重构, 与阳性药 TLM 作用一致。

3.2 对心衰大鼠心肌损伤标志物的影响

如表 1 所示, 与假手术组大鼠比较, 模型组

大鼠血清 CK、LDH、BNP 和 NT-proBNP 活性显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组大鼠比较, STDP 组大鼠血清 CK、LDH、BNP 和 NT-proBNP 活性显著降低 ($P < 0.05$), 提示 STDP 降低血清中心肌损伤标志物的含量, 具有缓解心肌损伤的作用。

3.3 对心衰大鼠心脏冠脉微血管重构的影响

如图 2 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠心脏冠脉血管周围的纤维蛋白含量显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, STDP 给药组冠脉血管周围的胶原含量显著降低 ($P < 0.05$), 提示 STDP 抑制冠脉微血管胶原沉积, 改善冠脉微血管纤维化重构。

3.4 对心肌成纤维细胞增殖迁移的影响

如图 3 所示, CCK-8 结果表明, 与对照组比较,

表 1 麝香通心滴丸对心衰大鼠心肌损伤标志物的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 6$)

Table 1 Effects of STDP on myocardial damage markers in heart failure rats

($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 6$)

组别	剂量/(mg·g ⁻¹)	CK/(U·L ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)	BNP/(U·L ⁻¹)	NT-proBNP/(U·L ⁻¹)
假手术	—	790.96 ± 195.65	855.39 ± 285.07	276.90 ± 31.51	151.55 ± 22.91
模型	—	1 452.10 ± 178.60 [#]	1 835.50 ± 530.78 [#]	402.30 ± 31.93 [#]	216.73 ± 21.47 [#]
STDP	21.60	885.55 ± 105.70 [*]	1 482.73 ± 584.13 [*]	246.54 ± 34.15 [*]	170.23 ± 9.98 [*]
TLM	8.23	897.73 ± 269.67 [*]	1 343.42 ± 426.87 [*]	292.99 ± 48.37 [*]	165.83 ± 17.44 [*]

与假手术组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ 。

[#] $P < 0.05$ vs sham group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group.

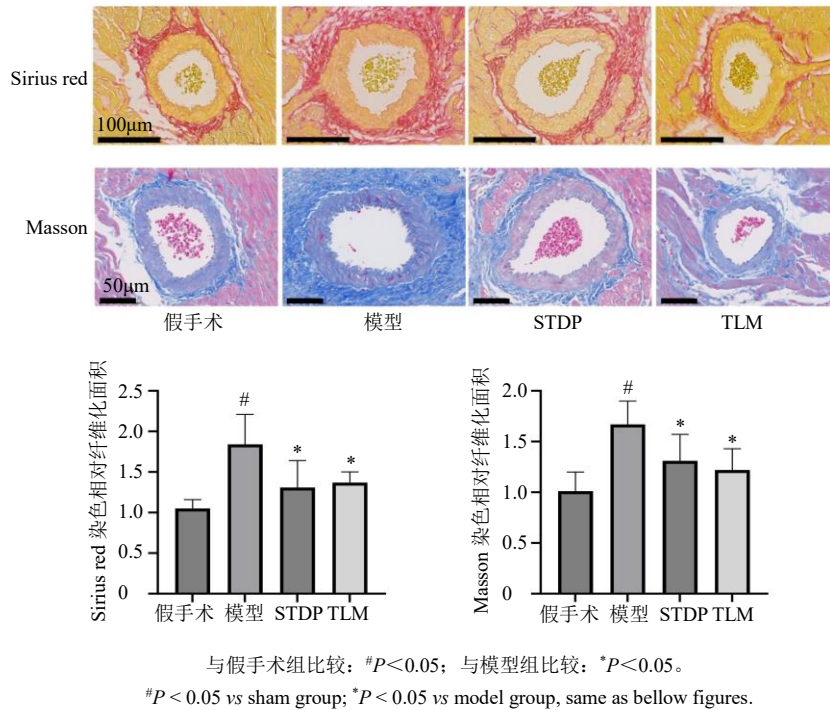


图 2 麝香通心滴丸对心衰大鼠心脏冠脉微血管重构影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 6$)

Fig. 2 Effects of STDP on coronary microvessel remodeling in heart failure rats ($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 6$)

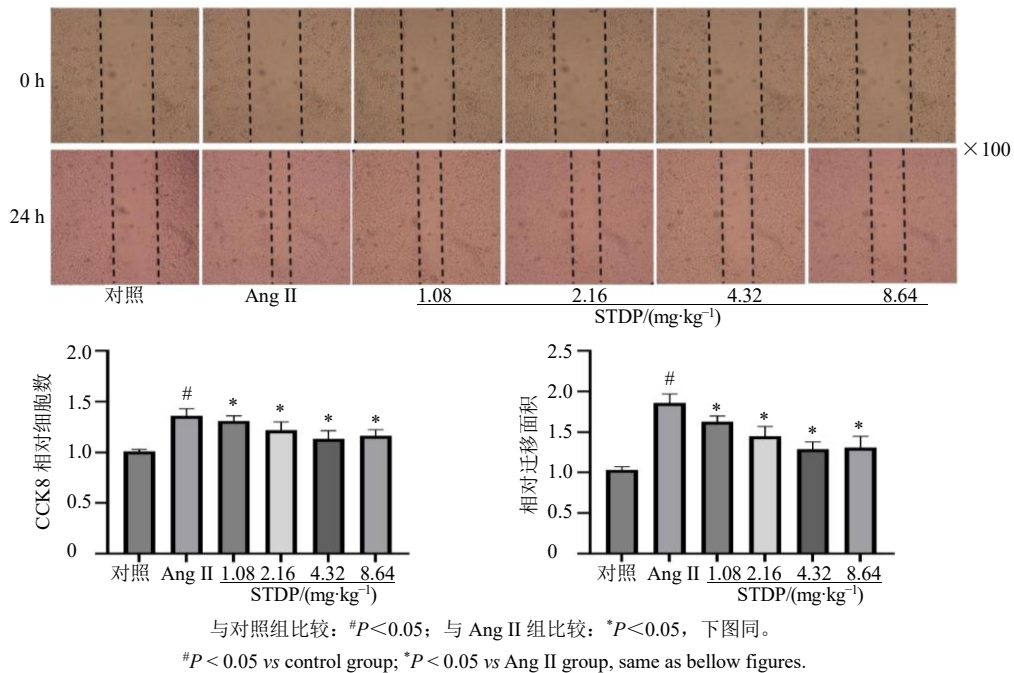


图 3 麝香通心滴丸对心肌成纤维细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of STDP on proliferation of myocardial fibroblasts ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Ang II 组心肌成纤维细胞的相对细胞数显著升高 ($P < 0.05$), 与 Ang II 组比较, STDP 各剂量 (1.08、2.16、4.32、8.64 mg/kg) 组显著抑制心肌成纤维细胞异常增殖 ($P < 0.05$)。划痕实验结果表明, 与对

照组比较, Ang II 组心肌成纤维细胞迁移面积比例增加 ($P < 0.05$)。与 Ang II 组比较, STDP 各剂量组细胞迁移面积显著降低 ($P < 0.05$), 提示 STDP 能够抑制 Ang II 诱导的心肌成纤维细胞迁移。

3.5 对心肌成纤维细胞 COL1、MMP2、OPN 蛋白的影响

如图 4 所示,与对照组比较,Ang II 组心肌成纤维细胞中 COL1、MMP2、OPN 的蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$)。与 Ang II 组比较,STDP 组心肌成纤维细胞中 COL1、MMP2、OPN 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$),提示 STDP 可抑制调控心肌成纤维细胞增殖迁移相关蛋白的表达。

3.6 对心肌成纤维细胞 ACE2-AT2/MAS 信号通路的影响

如图 5 所示,与对照组比较,Ang II 组心肌成纤维细胞中 ACE2、AT2、MAS1 和 Ang (1-7) 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.05$)。与 Ang II 组比较,STDP 组

心肌成纤维细胞中 ACE2、AT2、MAS1 和 Ang (1-7) 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$),提示 STDP 调控心肌成纤维细胞 Ang II 信号通路蛋白的表达。与 STDP 组比较,STDP+抑制剂组心肌成纤维细胞中 ACE2、AT2、MAS1 和 Ang (1-7) 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。

3.7 对心肌成纤维细胞 AT1-SRF 信号通路的影响

如图 6 所示,与对照组比较,Ang II 组心肌成纤维细胞中 AT1、Rock1、Rock2、SRF 的蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$)。与 Ang II 组比较,STDP 组心肌成纤维细胞中 AT1、Rock1、Rock2、SRF 的蛋白表达量显著降低 ($P < 0.05$),提示 STDP 可以抑制 AT1、Rock1、Rock2、SRF 的蛋白表达。与 STDP

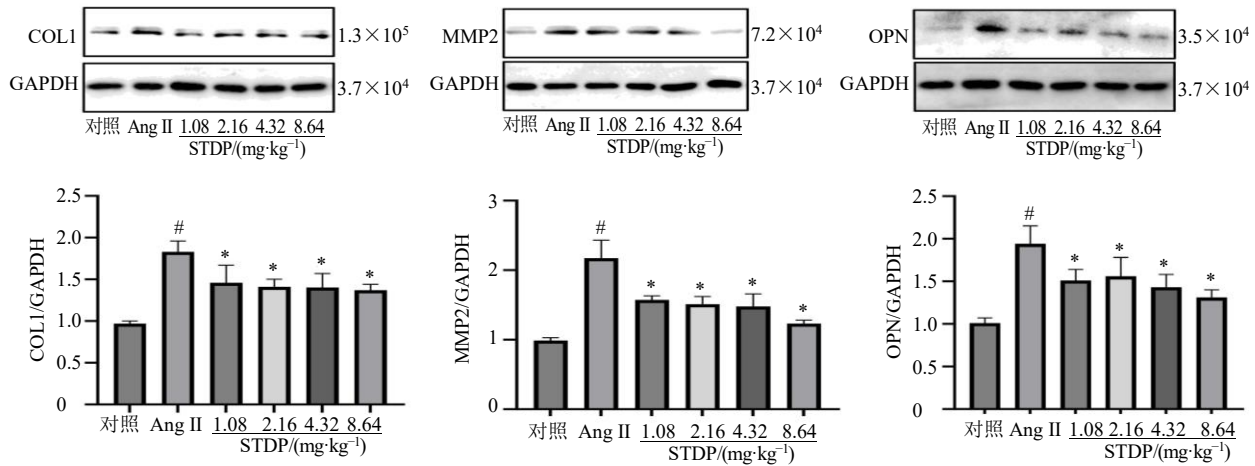
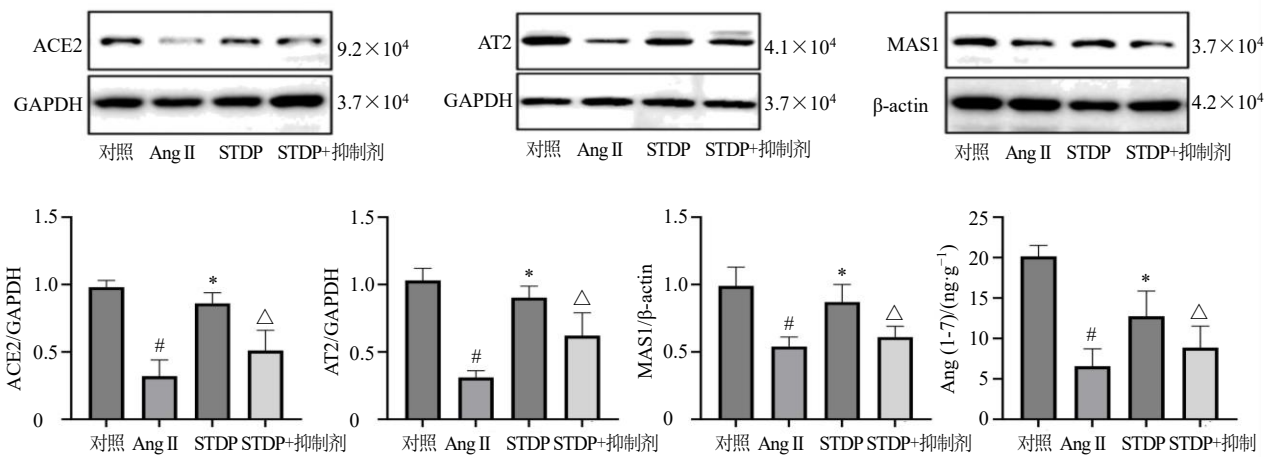


图 4 麝香通心滴丸对心肌成纤维细胞 COL1、MMP2、OPN 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of STDP on COL1, MMP9, OPN proteins of myocardial fibroblasts ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与 Ang II 组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 STDP 组比较: [^] $P < 0.05$, 下图同。

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs Ang II group, [^] $P < 0.05$ vs STDP group, same as bellow figures.

图 5 麝香通心滴丸对心肌成纤维细胞 ACE2、AT2、MAS1 和 Ang (1-7) 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of STDP on ACE2, AT2, MAS1 and Ang (1-7) proteins of myocardial fibroblasts ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组比较, STDP+抑制剂组心肌成纤维细胞中 AT1、Rock1、Rock2、SRF 的蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$)。

3.8 STDP 调控 ACE2 抑制心肌成纤维细胞 COL1、MMP2、OPN 的表达

如图 7 所示, 与对照组比较, Ang II 组心肌成纤维细胞中 COL1、MMP2、OPN 的蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$)。与 Ang II 组比较, STDP 组心肌成纤维细胞中 COL1、MMP2、OPN 的蛋白表达量显著降低 ($P < 0.05$), 提示 STDP 抑制 COL1、MMP2、OPN 的蛋白表达量, 调控心肌成纤维细胞

增殖迁移。与 STDP 组比较, STDP+抑制剂组心肌成纤维细胞中 COL1、MMP2、OPN 的蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$)。

4 讨论

目前, 全球心血管疾病死亡患者人数达到 1 800 多万, 我国是心血管疾病死亡人数最多的国家^[10]。研究表明, 血管重构是心血管病发生发展过程中关键的病理变化, 血管重构引起血管壁结构紊乱, 诱发心肌梗死、腹主动脉瘤等疾病^[11]。因此, 阻断或延缓血管重构成为心血管疾病的重要防治方法。

成纤维细胞功能紊乱是血管重构的重要环节,

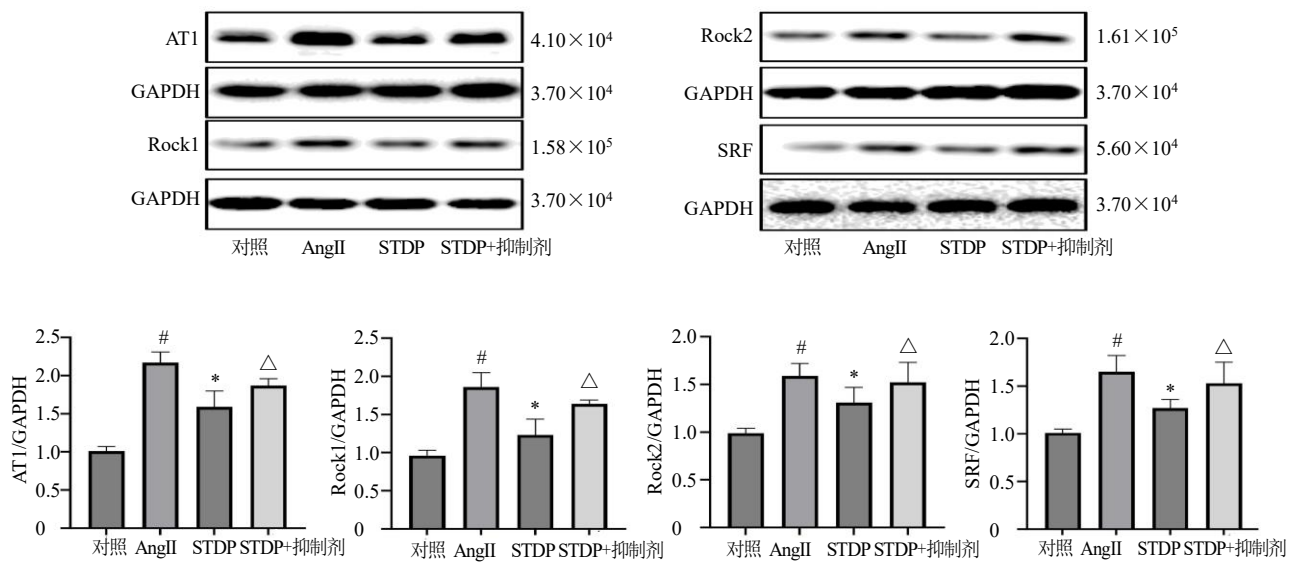


图 6 麝香通心滴丸对心肌成纤维细胞 AT、Rock1、Rock2、SRF 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 6 Effects of STDP on AT,Rock1, Rock2, SRF proteins of myocardial fibroblasts ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

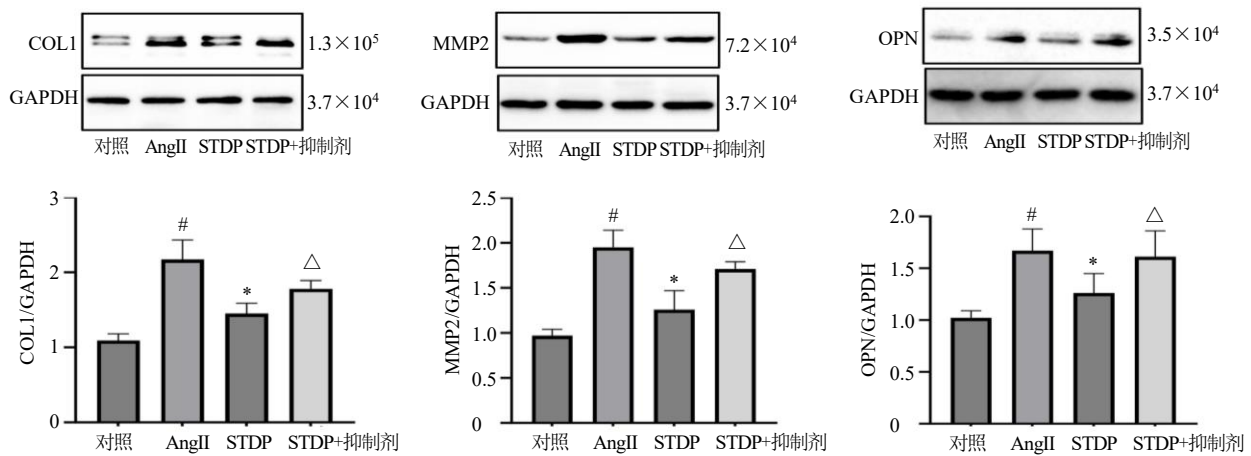


图 7 麝香通心滴丸对心肌成纤维细胞 COL1、MMP9、OPN 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 7 Effects of STDP on COL1, MMP9, OPN proteins of myocardial fibroblasts ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

包括成纤维细胞表型转化、成纤维细胞异常增殖以及成纤维细胞迁移等多种病理改变^[12]。研究表明^[13-15]，细胞外周基质蛋白 COL1、OPN 含量异常升高，提示成纤维细胞释放大量的细胞外基质蛋白，加快血管纤维化。同时，MMP2 蛋白介导心肌成纤维细胞迁移，其含量异常升高加快成纤维细胞的不规则迁移，引起血管结构紊乱。既往研究表明，RAAS 通路功能紊乱介导 Ang II 生成和释放异常，Ang II 作为最强的血管活性物质，激活 AT1 受体，活化下游 ROCK、SRF 蛋白的高表达，介导 COL1、OPN、MMP2 等迁移蛋白的分泌诱发迁移，引起血管纤维化、血管壁增厚，血管管腔狭窄，最终导致血管重构^[16-17]。ACE2 是 RAAS 系统关键的调控蛋白，将细胞膜表面的 Ang II 截切成为 Ang (1-7) 激活 AT2、MAS1 受体，拮抗 AT1 活化，抑制 Ang II 介导的 AT1 下游 SRF 通路的活化及相关蛋白的表达，具有调控心肌成纤维细胞功能紊乱的作用^[18-20]。

既往研究表明，STDP 促进血管新生、改善心功能，具有防治心梗后心衰的作用^[21-22]。STDP 中的人参皂苷、丹参改善血管细胞功能紊乱，抑制血管重构^[23-24]。STDP 对血管重构相关的 RAAS 通路以及 Rho/ROCK 通路具有调控作用^[4,25]，但是其具体的作用机制尚不明确，还有待进一步研究。本研究采用冠脉结扎术建立心梗后心衰大鼠模型，大鼠 EF 值、FS 值显著降低，血清中 CK、LDH、NT-proBNP 等心衰标志物活性显著升高，提示心衰模型造模成功，大鼠心脏冠脉微血管周围纤维蛋白含量显著升高，提示冠脉微血管发生重构；STDP 给药治疗后，治疗组大鼠 EF 值、FS 值显著升高，血清中 CK、LDH、NT-proBNP 等心衰标志物含量显著降低，冠脉微血管周围纤维蛋白含量显著降低，表明 STDP 缓解心衰大鼠心功能异常及心肌损伤，改善心脏冠脉微血管重构。

同时，本研究采用 Ang II 刺激心肌成纤维细胞建立纤维化模型。实验结果表明，Ang II 诱导心肌成纤维细胞活力异常升高，细胞迁移增加。WB 实验结果显示，AT1-SRF 通路蛋白表达升高，ACE2-MAS1 通路蛋白表达降低，提示 Ang II 活化 AT1 受体，提高下游 ROCK、SRF 蛋白的高表达，介导 COL1、OPN、MMP2 释放，引起心肌成纤维细胞表型转化、增殖迁移，诱发心肌成纤维细胞功能紊乱。在给与 STDP 干预后，STDP 抑制 Ang II 诱导的细胞活力异常升高，缓解心肌成纤维细胞表型转化、

细胞迁移，同时 Western blotting 结果显示，STDP 抑制 AT1、Rock1、Rock2、SRF、COL1 等蛋白的表达，提高 ACE2、AT2、MAS1 蛋白的表达。而 ACE2 抑制剂 MLN-4760 逆转了 STDP 对 ACE2、AT2、MAS1 以及 AT1、Rock、SRF 蛋白的干预作用，提示 STDP 可能通过调控 ACE2-AT2/MAS 信号通路和 AT1-SRF 蛋白的表达，抑制增殖迁移相关蛋白的分泌与释放，改善心肌成纤维细胞的表型转化及增殖迁移，调控心肌成纤维细胞功能紊乱，缓解心脏微血管重构，进而改善心梗后心衰心功能异常。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 《中国心血管健康与疾病报告》编写组. 《中国心血管健康与疾病报告 2020》概述 [J]. 中国心血管病研究, 2021, 19(7): 582-590.
- [2] He X, Deng J, Yu X J, *et al.* Activation of M3AChR (type 3 muscarinic acetylcholine receptor) and Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) signaling by choline alleviates vascular smooth muscle cell phenotypic switching and vascular remodeling [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(11): 2649-2664.
- [3] Huang G J, Cong Z L, Wang X Y, *et al.* Targeting HSP90 attenuates angiotensin II-induced adventitial remodelling via suppression of mitochondrial fission [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(5): 1071-1084.
- [4] 吴琪, 俞军海, 曹盛盛, 等. 麝香通心滴丸对高血压患者肾素-血管紧张素-醛固酮系统的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(6): 1351-1353.
- [5] 张运, 陈韵岱, 傅向华, 等. 冠状动脉微血管疾病诊断和治疗的中国专家共识 [J]. 中国循环杂志, 2017, 32(5): 421-430.
- [6] Lu X Y, Yao J K, Li C X, *et al.* Shexiang Tongxin dropping pills promote macrophage polarization-induced angiogenesis against coronary microvascular dysfunction via PI3K/Akt/mTORC1 pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 840521.
- [7] Doctor Society of Integrative Medicine, Chinese Medical Doctor Association. 急性心肌梗死中西医结合诊疗指南 [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(3): 272-284.
- [8] 杨杉杉. 基于 TGF- β 1/ALK1/Smad1/5 信号通路的麝香通心滴丸促血管新生作用机制研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2021.
- [9] 谭桂兰, 彭婧婧, 刘国维, 等. 芪参颗粒对血管紧张素 II 诱导的大鼠心肌成纤维细胞基质代谢的影响 [J]. 世界中医药, 2022, 17(15): 2167-2170.

- [10] Wang L M, Zhou B, Zhao Z P, *et al.* Body-mass index and obesity in urban and rural China: Findings from consecutive nationally representative surveys during 2004-18 [J]. *Lancet*, 2021, 398(10294): 53-63.
- [11] Dierick F, Solinc J, Bignard J, Soubrier F, Nadaud S. Progenitor/stem cells in vascular remodeling during pulmonary arterial hypertension [J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1338.
- [12] Wang X, Khalil R A. Matrix metalloproteinases, vascular remodeling, and vascular disease [J]. *Adv Pharmacol*, 2018, 81: 241-330.
- [13] Talu Erten P, Keser G, Durusoy R, *et al.* Matrix metalloproteinase-2 and-3 levels in patients with behçet's disease and implication for the presence of vascular aneurysm or neurologic involvement [J]. *Eur J Rheumatol*, 2023, 10(3): 101-106.
- [14] Suhail H, Peng H, Matrougui K, *et al.* Ac-SDKP attenuates ER stress-stimulated collagen production in cardiac fibroblasts by inhibiting CHOP-mediated NF-κB expression. *Front Pharmacol*. 2024, 15: 1352222.
- [15] Jin X, Fu G X, Li X D, *et al.* Expression and function of osteopontin in vascular adventitial fibroblasts and pathological vascular remodeling [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e23558.
- [16] Zhang C, Zhao Y X, Zhang Y H, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 attenuates atherosclerotic lesions by targeting vascular cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(36): 15886-15891.
- [17] Dai H L, Jiang L H, Xiao Z C, *et al.* ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis might be a promising therapeutic target for pulmonary arterial hypertension [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2015, 12(6): 374.
- [18] Zou F D, Li Y, Zhang S J, *et al.* DP1 (prostaglandin D₂ receptor 1) activation protects against vascular remodeling and vascular smooth muscle cell transition to myofibroblasts in angiotensin II-induced hypertension in mice [J]. *Hypertension*, 2022, 79(6): 1203-1215.
- [19] Wu N, Zheng F, Li N, *et al.* RND3 attenuates oxidative stress and vascular remodeling in spontaneously hypertensive rat via inhibiting ROCK1 signaling [J]. *Redox Biol*, 2021, 48: 102204.
- [20] Parajuli N, Ramprasath T, Patel V B, *et al.* Targeting angiotensin-converting enzyme 2 as a new therapeutic target for cardiovascular diseases [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2014, 92(7): 558-565.
- [21] 吴刚, 余德龙, 李磊, 等. 麝香通心滴丸对缺血性心力衰竭心肌纤维化和血管再生的影响机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(1): 141-146.
- [22] 吴刚, 宋玉华, 胡立群. 麝香通心滴丸联合盐酸曲美他嗪对缺血性心力衰竭(气虚血瘀证)炎症因子的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(23): 188-193.
- [23] Zhu G X, Zuo J L, Xu L, *et al.* Ginsenosides in vascular remodeling: Cellular and molecular mechanisms of their therapeutic action [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 169: 105647.
- [24] Yang G S, Zheng B, Qin Y, *et al.* *Salvia miltiorrhiza*-derived miRNAs suppress vascular remodeling through regulating OTUD7B/KLF4/NMHC IIA axis. *Theranostics*. 2020, 10(17): 7787-7811.
- [25] 李立杰, 葛华, 陈曦, 等. 麝香通心滴丸对高血压大鼠血管内皮功能及Rho/ROCK信号通路的影响 [J]. *中国医科大学学报*, 2020, 49(6): 485-489.

[责任编辑 罗 曦]