

# 基于UHPLC-MS技术及体内外实验探讨参附注射液对慢性心力衰竭心阳虚证大鼠微管蛋白翻译后修饰表达的影响

李琳<sup>1</sup>, 叶嘉豪<sup>1#</sup>, 赵震宇<sup>1</sup>, 李伟军<sup>1</sup>, 胡志希<sup>2\*</sup>

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

2. 湖南中医药大学中医诊断研究所, 湖南 长沙 410208

**摘要:** 目的 通过UHPLC-MS及分子对接技术筛选参附注射液(Shenfu Injection, SFI)核心有效成分,并通过体内外实验验证SFI对慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)心阳虚证大鼠微管蛋白翻译后修饰表达的影响。方法 应用UHPLC-MS鉴定SFI的主要成分,并对其与微管蛋白相关靶点进行分子对接。SD大鼠随机分为对照组、模型组、秋水仙碱(0.1 mg/kg)组和SFI低、高剂量(3、6 mL/kg)组,每组8只,采用sc异丙肾上腺素复制CHF心阳虚证模型,给予药物干预2周。采用超声心动图检测心功能;ELISA检测血清N末端B型利钠肽原(N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, NT-proBNP)水平;苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色检测心肌组织病理变化;免疫荧光检测心肌组织微管蛋白乙酰化(acetyl  $\alpha$ -tubulin)、微管蛋白谷氨酰化(polyglut  $\alpha$ -tubulin)和微管蛋白去酪氨酸化(detyr  $\alpha$ -tubulin)表达;免疫组化检测心肌组织微管蛋白酪氨酸连接酶(tubulin tyrosine ligase, TTL)和组蛋白去乙酰化酶6(histone deacetylase 6, HDAC6)表达。以异丙肾上腺素处理H9c2心肌细胞建立细胞损伤模型,给予SFI干预后,检测微管蛋白修饰水平。结果 UHPLC-MS筛选获得SFI中12种主要有效成分,分子对接结果显示其与tubulin及修饰相关蛋白结合力较强。动物实验结果显示,与模型组比较,SFI能显著改善大鼠心功能( $P<0.01$ ),降低血清中NT-proBNP水平( $P<0.01$ ),减轻心肌间质纤维化程度,降低心肌组织微管蛋白 $\alpha$ -tubulin表达及微管密度( $P<0.05$ 、 $0.01$ ),减少微管蛋白去酪氨酸化和谷氨酰化表达,增加乙酰化表达,下调HDAC6阳性表达( $P<0.01$ ),上调TTL阳性表达( $P<0.01$ )。细胞实验结果与动物实验一致,进一步验证SFI能够改善微管蛋白翻译后修饰异常。结论 SFI能够有效降低微管蛋白去酪氨酸化、谷氨酰化水平,提高乙酰化水平,纠正微管蛋白翻译后修饰失衡,从而改善CHF心阳虚证大鼠心肌细胞微管网络异常,增强微管稳定性并改善心功能,为SFI治疗CHF心阳虚证的分子机制提供实验依据。

**关键词:** 参附注射液;慢性心力衰竭;微管蛋白;去酪氨酸化;谷氨酰化;乙酰化

中图分类号: R283 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)04-1377-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.04.016

## Effect of Shenfu Injection on tubulin post-translational modifications in rats with chronic heart failure of heart-*yang* deficiency syndrome based on UHPLC-MS and *in vivo*, *in vitro* experiments

LI Lin<sup>1</sup>, YE Jiahao<sup>1</sup>, ZHAO Zhenyu<sup>1</sup>, LI Weijun<sup>1</sup>, HU Zhixi<sup>2</sup>

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Institute of Traditional Chinese Medicine Diagnosis, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

**Abstract: Objective** To screen the core active components of Shenfu Injection (参附注射液, SFI) using UHPLC-MS and molecular docking techniques, and to verify the effects of SFI on expressions of post-translational modifications of tubulin in chronic heart failure of heart-*yang* deficiency syndrome through *in vivo* and *in vitro* experiments. **Methods** UHPLC-MS was applied to identify the main components of SFI, and molecular docking was performed to analyze their interactions with tubulin-related targets. SD rats were

收稿日期: 2025-10-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82305092);国家自然科学基金资助项目(82574922);湖南中医药大学杏林英才支持计划(2025);湖南省科技创新计划资助(2024RC3199);湖南中医药大学优秀青年项目(Z2023XJYQ03)

作者简介: 李琳(1988—),女,博士,副教授,研究方向为心血管疾病证本质与诊治规律。E-mail: lilin@hnuocm.edu.cn

#共同第一作者: 叶嘉豪(1996—),男,博士研究生,研究方向为心血管疾病证本质与诊治规律。E-mail: 1062940906@qq.com

\*通信作者: 胡志希(1962—),男,博士,教授,研究方向为心血管疾病证本质与诊治规律。E-mail: 515800272@qq.com

randomly divided into control group, model group, colchicine (0.1 mg/kg) group, SFI low- and high-dose (3, 6 mL/kg) groups, with eight rats in each group. The CHF heart-*yang* deficiency model was replicated using sc isoproterenol, and drug intervention was given for two weeks. Echocardiography was used to detect cardiac function. ELISA was used to detect *N*-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) level in serum. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect pathological changes in myocardial tissue. Immunofluorescence was used to detect the expressions of acetyl  $\alpha$ -tubulin, polyglut  $\alpha$ -tubulin and detyr  $\alpha$ -tubulin in myocardial tissue. Immunohistochemistry was used to detect the expressions of tubulin tyrosine ligase (TTL) and histone deacetylase 6 (HDAC6) in myocardial tissue. H9c2 cardiomyocytes were treated with isoproterenol to establish a cell injury model, and after intervention with SFI, the level of microtubule protein modification was detected. **Results** A total of 12 main active ingredients in SFI were obtained through UHPLC-MS screening, and molecular docking results showed strong binding affinity with tubulin and modification related proteins. The animal experiment results showed that compared with model group, SFI could significantly improve cardiac function of rats ( $P < 0.01$ ), reduce the level of NT-proBNP in serum ( $P < 0.01$ ), alleviate the degree of myocardial interstitial fibrosis, reduce the expressions of microtubule protein  $\alpha$ -tubulin and microtubule density in myocardial tissue ( $P < 0.05, 0.01$ ), reduce the expressions of microtubule protein tyrosine and glutamate, increase acetylation expression, down-regulate HDAC6 positive expression ( $P < 0.01$ ), and up-regulate TTL positive expression ( $P < 0.01$ ). The results of cell experiments were consistent with animal experiments, further verifying that SFI could improve post-translational modifications of microtubule proteins. **Conclusion** SFI could effectively reduce the levels of tyrosinization and glutamatization of microtubules, increase acetylation levels, correct the imbalance of post-translational modifications of microtubules, thereby improving the abnormal microtubule network in cardiac myocytes of rats with CHF heart-*yang* deficiency, enhancing microtubule stability and improving heart function. This provides experimental evidence for the molecular mechanism of SFI treatment for CHF heart-*yang* deficiency.

**Key words:** Shenfu Injection; chronic heart failure; tubulin; detyrosination; polyglutamylation; acetylation

慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF) 是心室泵血和 (或) 充盈功能低下的一种临床综合征。《中国心力衰竭诊断和治疗指南 2024》<sup>[1]</sup>显示, 目前我国 CHF 患病人数为 1 370 万, 其具有高发病率、高死亡率、预后差的特点, 一直是国内外医学研究的重点和热点。虽然人类在预防和治疗 CHF 疾病方面取得了巨大的进步, 但缺乏对其发生机制的全面了解, 仍是 CHF 全球发病率和死亡率高居不下的主要原因。越来越多的证据表明, 微管 (tubulin) 在 CHF 发病机制中有重要作用<sup>[2]</sup>。靶向调控微管蛋白翻译后修饰, 可能是 CHF 的潜在治疗策略<sup>[3]</sup>。

微管是细胞骨架的重要成分, 是由  $\alpha/\beta$  微管蛋白二聚体首尾相接组成的有极性的中空管状结构。微管在细胞内形成网络结构, 参与细胞形态维持、物质运输、细胞分裂等多种重要生理过程。在心脏细胞中, 微管的主要功能包括维持细胞结构和形态、作为细胞内运输的轨道以确保蛋白质和脂质等关键物质在细胞内的定向运输, 以及参与信号传导, 从而调控心肌细胞的收缩功能和应激反应<sup>[4]</sup>。微管蛋白翻译后修饰是指在微管蛋白合成后, 通过化学修饰改变其功能的过程, 常见的翻译后修饰类型包括乙酰化 (acetylation)、谷氨酰胺化 (glutamylatation)、去酪氨酸化 (detyrosination) 等, 每种修饰在调控微管功能方面发挥独特作用<sup>[5]</sup>。研

究发现, 参附注射液 (Shenfu Injection, SFI) 能显著改善心力衰竭大鼠的心功能<sup>[6]</sup>, 减轻心肌损伤, 且效果优于其他注射液, 根据“方证对应”原理, 通过药物的疗效反向推导中医证型, 证明该模型大鼠为慢性 CHF 心阳虚证大鼠。因此, 本研究旨在进一步探讨 SFI 对慢性 CHF 心阳虚证大鼠微管蛋白翻译后修饰表达的影响, 为其作用机制提供新的实验依据。

## 1 材料

### 1.1 动物与细胞

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只, 6 周龄, 体质量 170~180 g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 实验动物使用许可证号 SYXK (湘) 2019-0009。动物于室温 (22±2) °C、相对湿度 (55±5)%、12 h 昼夜交替的环境中适应性饲养 1 周, 自由进食饮水。动物实验经湖南中医药大学实验动物伦理审查批准 (批准号 SLBH-202311080037)。

大鼠 H9c2 心肌细胞 (批号 CL-0089) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

### 1.2 药品与试剂

参附注射液 (国药准字 Z51020664, 批号 221111AK05) 购自华润三九雅安药业有限公司; *N* 末端 B 型利钠肽原 (*N*-terminal pro-B-type natriuretic peptide, NT-proBNP) 试剂盒 (批号 CSB-E08752r)

购自武汉华美生物工程有限公司；盐酸异丙肾上腺素(isoproterenol hydrochloride, ISO, 批号 F2215417) 购自上海阿拉丁生化技术有限公司；秋水仙碱(批号 GC13261) 购自美国 GLP BIO 公司；微管蛋白乙酰化(acetyl  $\alpha$ -tubulin) 一抗(批号 ab179484)、微管蛋白谷氨酸化(polyglut  $\alpha$ -tubulin) 一抗(批号 AG-20B-0020B-C100)、微管蛋白去酪氨酸化(detyr  $\alpha$ -tubulin) 一抗(批号 ab255906) 购自英国 Abcam 公司；微管蛋白酪氨酸连接酶(tubulin tyrosine ligase, TTL) 一抗(批号 AWA70630)、组蛋白去乙酰化酶 6(histone deacetylase 6, HDAC6) 一抗(批号 AWA69565)、三标多重免疫荧光试剂(批号 AWI0693)、PBS(批号 AWI0129a)、枸橼酸盐缓冲液(批号 AWI0113a)、Tris-EDTA 抗原修复液(批号 AWI0153a)、缓冲甘油(批号 AWT0124a)、PBS-BSA(批号 AWI0120a)、DAPI 染色液(批号 AWC0293a)、二抗试剂盒(批号 AWI0629)、4%多聚甲醛(批号 AWI0603a)、免疫染色通透液(批号 AWI0603a)、Alexa Fluor 488 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗(批号 AWS0003) 购自长沙艾碧维生物科技有限公司；无水乙醇(批号 W990001-1) 购自天津致远化学试剂有限公司；二甲苯(批号 10023418) 购自上海国药集团化学试剂有限公司；石蜡(批号 Q/YSQN40-91) 购自上海卫永制药机械有限公司；防脱载玻片(批号 188105W) 购自江苏世泰实验器械有限公司。

### 1.3 仪器

VINNO 6 LAB 型便携式数字化彩色超声诊断仪(苏州飞依诺科技有限公司)；Vanquish 型超高效液相色谱仪、Q Exactive HFX 型高分辨质谱仪(美国 Thermo 公司)；5417R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)；MB-530 型多功能酶标仪(深圳汇松科技发展有限公司)；YD-315 型切片机(浙江金华益迪医疗设备有限公司)；BMJ-A 型包埋机(常州中威电子仪器有限公司)；BA410T 型光学显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 SFI 成分分析

**2.1.1 样本处理** 取 0.5 mL SFI 样品，置于离心管中，加入 2 倍体积的甲醇-乙腈溶液(1:1)，涡旋 60 s 后，于低温下超声提取 30 min，提取液于 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min，收集上清液。将上清液在 -20  $^{\circ}$ C 的条件下静置 1 h 沉淀蛋白，随后于 4  $^{\circ}$ C、

12 000 r/min 离心 10 min，取上清液进行真空干燥，加入 100  $\mu$ L 50%乙腈溶液复溶，涡旋混匀后于 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min，取上清液，采用超高效液相色谱仪和高分辨质谱仪进行检测<sup>[7-8]</sup>。

**2.1.2 色谱条件** Waters HSS T3 色谱柱(100 mm  $\times$  2.1 mm, 1.8  $\mu$ m)，流动相为 0.1%甲酸水溶液(A) - 含 0.1%甲酸的乙腈溶液(B)，梯度洗脱：0~1.0 min, 100% A；1.0~12.0 min, 100%~5% A；12.0~13.0 min, 5% A；13.0~13.1 min, 5%~100% A；13.1~17.0 min, 100% A。体积流量 0.3 mL/min；柱温 40  $^{\circ}$ C；进样体积 2  $\mu$ L。所有样品均置于 4  $^{\circ}$ C 自动进样器中，采用随机序列进样，并定期插入 QC 样品确保系统稳定性。

**2.1.3 质谱条件** 采用配备电喷雾离子源(electron spray ionization, ESI)的 Q Exactive HFX 高分辨系统。鞘气和辅助气体积流量分别为 40、10 arb；离子传输管温度 320  $^{\circ}$ C；蒸发温度 350  $^{\circ}$ C。在正、负离子模式下，喷雾电压分别为 +3 000 V 和 -2 800 V。数据采集时，一级全扫描质荷比范围设定为 70~1 050，分辨率为 70 000；二级质谱分析的分辨率为 17 500。

**2.1.4 数据处理** 原始色谱-质谱数据首先通过 Progenesis QI 软件进行预处理，包括基线校正、峰匹配与保留时间对齐，最终构建 1 个由保留时间、质荷比及峰强度组成的三维数据矩阵。对于采集到二级质谱( $MS^2$ )信号的色谱峰，利用三泰生物构建的中草药专属数据库及裂解规律进行化合物鉴定。鉴定结果的可靠性通过二级碎片匹配 Score 值进行评估，该评分满分为 1 分，通常认为 Score 值高于 0.7 时，鉴定结果可信。

### 2.2 SFI 主要成分与微管蛋白翻译后修饰相关蛋白的分子对接实验

在 PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/>) 查找并下载微管翻译后修饰相关蛋白 tubulin、微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein 2, Map2)、微管相关蛋白 4(microtubule-associated protein 4, Map4)、 $\alpha$ -微管蛋白乙酰转移酶 1( $\alpha$ -tubulin acetyltransferase 1, ATAT1)、胞质羧基肽酶(cytosolic carboxypeptidase, CCP)、TTL、小血管结合蛋白(small vasohibin-binding protein, SVBP)、血管抑制蛋白-1(vasohibin-1, VASH1)、HDAC6、微管亲和力调节激酶 4(microtubule affinity-regulating kinase 4, Mark4) 的蛋白结构，保存其 PDB 格式结

构。选取 SFI 中的 12 个主要成分（人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、苯甲酰次乌头碱、苯甲酰新乌头碱、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rf、人参皂苷 Rg<sub>2</sub>、人参皂苷 Ro、人参皂苷 F<sub>1</sub>、人参皂苷 Re、竹节参皂苷 IVa、6-姜酚、人参皂苷 Rg<sub>3</sub>），采用 AutoDock Vina 1.1.212 软件进行分子对接实验。一般认为配体与受体结合的构象稳定时能量越低，发生作用的可能性越大。根据对接结合能  $\leq -5$  kcal/mol（1 kcal/mol = 4.182 kJ/mol）作为筛选标准选取活性成分，利用 Pymol 软件对分子对接结果进行可视化处理。

### 2.3 体内实验

**2.3.1 造模、分组与给药** 40 只大鼠随机分为对照组、模型组、秋水仙碱（0.1 mg/kg，临床等效剂量）<sup>[9]</sup>组和 SFI 低、高剂量（3、6 mL/kg，分别相当于临床剂量的 0.5、1.0 倍）<sup>[10-11]</sup>组，每组 8 只。除对照组外，其余各组大鼠通过皮下多点注射 ISO 构建 CHF 心阳虚证大鼠模型，具体操作为：每日在大鼠背部两侧肩胛骨间和腰部区域，选取 2、3 个不同部位进行 sc，每日注射总量为 5 mg/kg，连续注射 7 d，以增加药物吸收面积并减少局部刺激。注射结束后，大鼠适应性喂养 2 周后开始给药<sup>[12]</sup>。秋水仙碱组 ig 秋水仙碱，同时 ip 生理盐水（6.0 mL/kg）；SFI 各剂量组 ip SFI，同时 ig 等体积的生理盐水；对照组和模型组 ig 生理盐水，同时 ip 生理盐水（6.0 mL/kg），1 次/d，连续给药 15 d<sup>[13-14]</sup>。

**2.3.2 样本采集** 给药结束后，大鼠吸入异氟烷麻醉，腹主动脉采血，于室温静置 2 h，3 000 r/min 离心 15 min，吸取上清液，存放于 -80 °C 冰箱。心脏组织部分置于 4% 多聚甲醛固定 24 h 后进行苏木素-伊红（hematoxylin-eosin, HE）染色，部分放入冻存管中，于 -80 °C 冰箱保存。

**2.3.3 超声心动图检测** 采用便携式数字化彩色超声诊断仪评估心功能，大鼠去除胸部毛发后，将 M 型超声探头经胸骨左心室长轴切面测量左心室射血分数（left ventricle ejection fraction, LVEF）、左心室缩短分数（left ventricle fractional shortening, LVFS）共计 3 个心动周期，取平均值。

**2.3.4 血清 NT-proBNP 水平检测** 给药结束后，用异氟烷对大鼠进行麻醉，眼眶取血，4 °C、3 000 r/min 离心 15 min（离心半径 10 cm），保留上清液，按照 ELISA 试剂盒说明书测定 NT-proBNP 水平。

**2.3.5 心肌组织病理形态观察** 用多聚甲醛固定

心脏后，石蜡包埋，切片厚度为 3 μm。切片脱蜡至水，苏木素染色 3~5 min，盐酸水溶液分化后用氨水返蓝，乙醇梯度脱水，伊红染色液染色 5 min，脱水封片，用数字切片扫描仪采集图像，观察心肌组织的炎症、变性、坏死情况。

**2.3.6 免疫荧光法检测心肌组织  $\alpha$ -tubulin、acetyl  $\alpha$ -tubulin、polyglut  $\alpha$ -tubulin 和 detyr  $\alpha$ -tubulin 的表达** 心肌组织石蜡切片于 60 °C 烘烤 12 h 后，依次经二甲苯脱蜡、乙醇梯度脱水及蒸馏水洗后，置于柠檬酸钠（pH 6.0）抗原修复液中，微波加热至沸后断电，继续煮 24 min，冷却 24 min 至室温，PBS 洗涤 3 次。随后切片置于硼氢化钠 30 min，自来水冲洗 5 min，再以 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液封闭 15 min，PBS 洗涤 3 次，用 5% 牛血清白蛋白封闭 1 h。滴加 acetyl  $\alpha$ -tubulin、polyglut  $\alpha$ -tubulin、detyr  $\alpha$ -tubulin 一抗于 4 °C 孵育过夜，PBS 洗涤后，滴加二抗，37 °C 孵育 30 min；PBS 洗涤 3 次，滴加 TYP-520 荧光染料，于 37 °C 避光孵育 5~10 min，PBS 洗净。重复 1 次热修复、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液封闭、5% 牛血清白蛋白封闭后，滴加  $\alpha$ -tubulin 一抗于 4 °C 孵育过夜，再滴加二抗孵育；滴加 TYP-620 荧光染料于 37 °C 避光孵育 5 min，PBS 洗涤后，滴加 DAPI 染核 10~20 min，PBS 洗涤 3 次，最后以缓冲甘油封片，于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

**2.3.7 免疫组化法检测心肌组织 TTL 和 HDAC6 的表达** 心肌组织石蜡切片于 60 °C 烘烤 12 h 后，依次经二甲苯中脱蜡、乙醇梯度脱水及蒸馏水洗后，置于 0.01 mol/L 柠檬酸钠缓冲液中，微波加热沸腾后断电，加热 20 min，冷却至室温后用 PBS 洗涤 3 次。滴加 1% 高碘酸室温处理 15 min 灭活内源性酶，PBS 洗涤 3 次。滴加 TTL、HDAC6 一抗，4 °C 孵育过夜，PBS 洗涤 3 次；滴加 HRP 标记的二抗，37 °C 孵育 30 min，PBS 洗涤 3 次。随后 DAB 显色 1~5 min，蒸馏水洗净，苏木素复染 5~10 min，PBS 返蓝。最后经 60%~100% 乙醇梯度脱水，每级 5 min，二甲苯透明 2 次（每次 10 min），中性树胶封片，于显微镜下观察并拍照。

### 2.4 体外实验

**2.4.1 ISO 诱导的细胞损伤模型的建立** H9c2 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基，于 37 °C 和 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。将处于对数生长期的 H9c2 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 96 孔板，待细胞贴壁后，分别加入不同浓度（10、20、30、40、50、

60、70、80、90、100、110、120 μmol/L) 的 ISO, 对照组加入不含药物的培养基, 另设置不接种细胞不给药的空白孔, 分别培养 24、48 h, 加入 CCK-8 试剂, 用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率, 筛选 ISO 最佳造模浓度及时间。

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

**2.4.2 SFI 给药浓度的筛选** 将处于对数生长期的 H9c2 细胞以  $5 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板, 待细胞贴壁后, 分别加入不同浓度 (2%、4%、8%、12%、16%) 的 SFI, 对照组加入不含药物的培养基, 另设置不接种细胞不给药的空白孔, 分别处理 24、48 h, 采用 CCK-8 法检测细胞存活率, 筛选 SFI 给药浓度和时间。

**2.4.3 SFI 对 ISO 诱导的 H9c2 细胞活力的影响** 将处于对数生长期的 H9c2 细胞以  $5 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板, 设置对照组、模型组和 SFI 组, 待细胞贴壁后对照组加入不含药物的培养基, 模型组加入 100 μmol/L ISO 培养 48 h; SFI 组加入 100 μmol/L ISO 培养 48 h 后, 加入不同浓度 (2%、4%、8%、12%、16%) 的 SFI 干预 48 h。另设置不接种细胞不给药的空白孔。采用 CCK-8 检测细胞存活率。

**2.4.4 免疫荧光法检测 α-tubulin、acetyl α-tubulin、**

polyglut α-tubulin 和 detyr α-tubulin 的表达 设置对照组、模型组和 2% SFI 组, 按“2.4.3”项下方法处理。弃去上清, 用 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 冲洗 6 次, 每次 5 min; 加入 0.3% TritonX-100 于 37 °C 通透 30 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 3 min; 滴加 5% 牛血清白蛋白于 37 °C 封闭 60 min, PBS 漂洗 3 次后滴加一抗, 于 4 °C 孵育过夜; PBS 漂洗 3 次后滴加二抗, 37 °C 孵育 60 min; PBS 漂洗 3 次后, 滴加 DAPI 工作液染核, 37 °C 孵育 10 min, PBS 漂洗 3 次后, 以缓冲甘油封片, 于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

### 2.5 统计学分析

采用 Image J 软件进行图像分析, SPSS 19.0 软件进行统计分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较使用 One-Way ANOVA 检验和 Tukey 检验。

## 3 结果

### 3.1 SFI 成分分析

采用 UHPLC-MS 进行 SFI 的质量控制, 图 1 为同一批次的 3 次重复样品的总离子流图, 由图可以看出该批次的 3 次重复样品成分稳定且一致, 在正、负离子模式下有效分离和检测了 SFI 的主要成分 (表 1)。

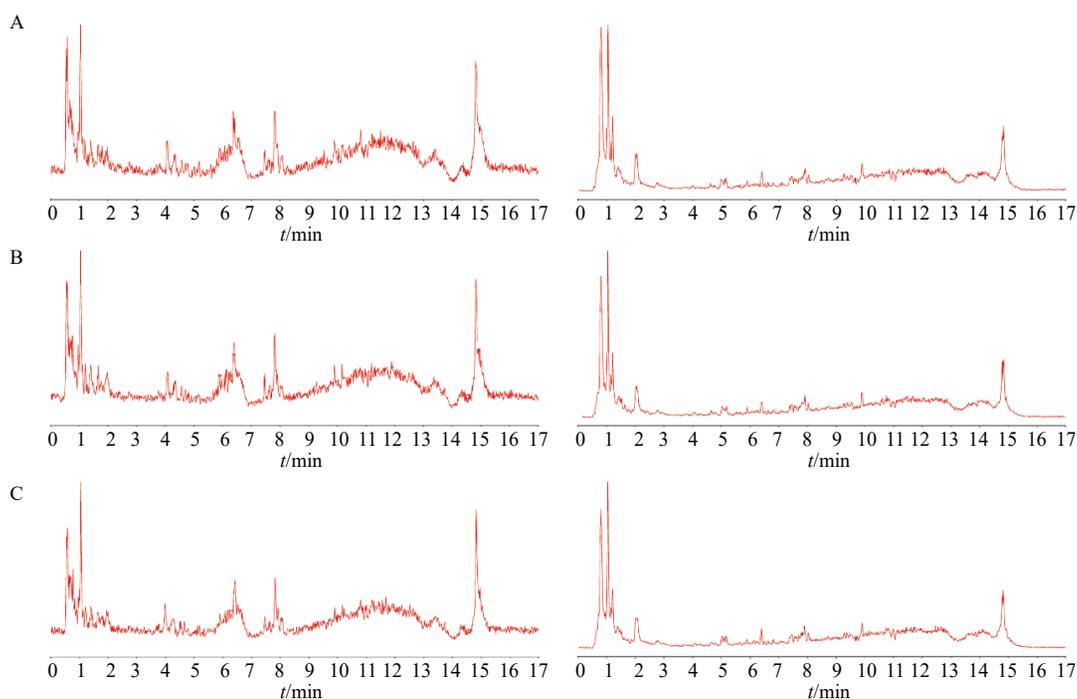


图 1 正、负离子模式下同一批次 SFI 的 3 次重复样品 (A~C) 的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of three repeated samples (A—C) from same batch of SFI in positive and negative ion modes

表 1 SFI 主要成分

Table 1 Main chemical components of SFI

序号	成分	分子式	$t_R/min$	误差 ( $\times 10^{-6}$ )	$m/z$	离子模式	加合物
1	人参皂苷Rb <sub>1</sub> <sup>[15]</sup>	C <sub>54</sub> H <sub>92</sub> O <sub>23</sub>	14.571	6.862	555.313	正离子	M+2H
2	苯甲酰次乌头碱 <sup>[16]</sup>	C <sub>31</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>10</sub>	5.901	-0.807	590.295	正离子	M+H, M+Na
3	苯甲酰新乌头碱 <sup>[16]</sup>	C <sub>31</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>9</sub>	6.294	-0.710	574.301	正离子	M+H
4	人参皂苷Rg <sub>1</sub> <sup>[15]</sup>	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	6.428	-1.137	823.481	正离子	M+Na
5	人参皂苷Rf <sup>[15]</sup>	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	7.466	-0.064	799.485	负离子	M-H, M+Cl, M+FA-H
6	人参皂苷Rg <sub>2</sub> <sup>[17]</sup>	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>13</sub>	7.794	0.149	819.467	负离子	M+Cl
7	人参皂苷Ro <sup>[15]</sup>	C <sub>48</sub> H <sub>76</sub> O <sub>19</sub>	7.831	-0.773	979.487	正离子	M+NH <sub>4</sub> , M+Na
8	人参皂苷F <sub>1</sub> <sup>[17]</sup>	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>9</sub>	7.906	0.129	673.409	负离子	M+Cl, M+FA-H, M-H
9	人参皂苷Re <sup>[17]</sup>	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>18</sub>	8.069	-0.746	969.539	正离子	M+H-H <sub>2</sub> O, M+Na, M+H-2H <sub>2</sub> O
10	竹节参皂苷IVa <sup>[18]</sup>	C <sub>42</sub> H <sub>66</sub> O <sub>14</sub>	8.303	0.244	793.438	负离子	M-2H, M-H
11	6-姜酚 <sup>[19]</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	8.567	-1.210	295.190	正离子	M+H-2H <sub>2</sub> O, M+H
12	人参皂苷Rg <sub>3</sub> <sup>[17]</sup>	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>13</sub>	9.681	0.283	819.467	负离子	M+Cl

### 3.2 分子对接结果

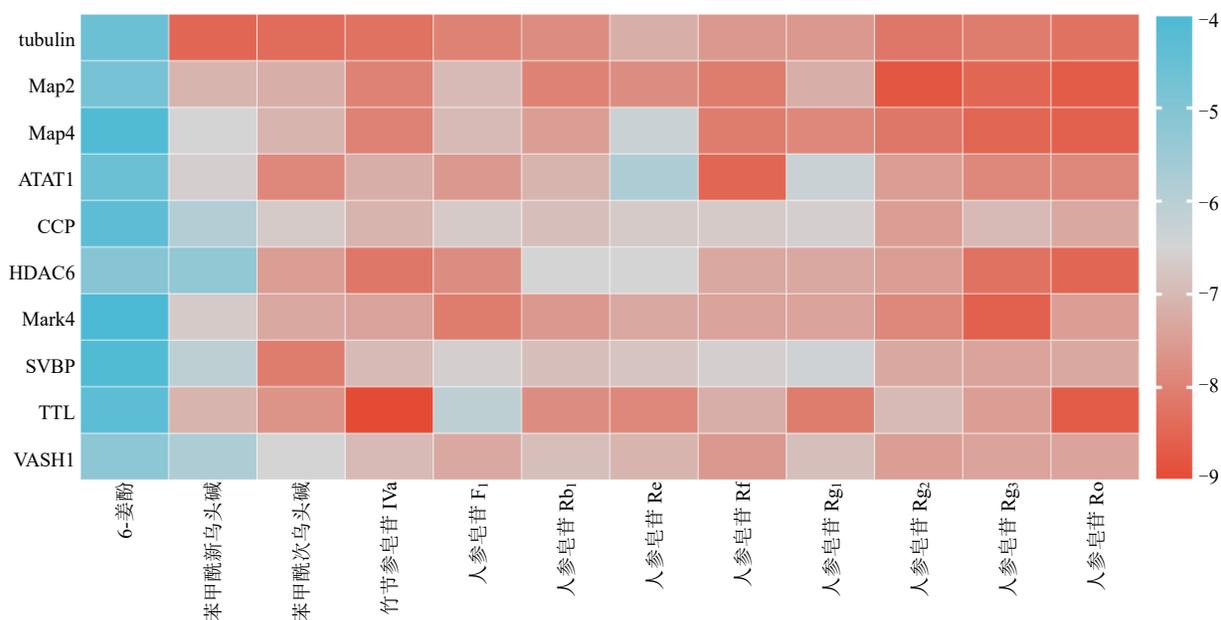
如图 2 所示, SFI 的主要成分与微管相关蛋白均具有良好的结合能力, 其中对接分数最优的为 TTL-竹节参皂苷 IVa (-9.0 kcal/mol)、Map2-人参皂苷 Rg<sub>2</sub> (-8.8 kcal/mol)、Map2-人参皂苷 Ro (-8.7 kcal/mol) 和 TTL-人参皂苷 Ro (-8.7 kcal/mol), 分子对接图见图 3。

### 3.3 体内实验结果

**3.3.1 各组大鼠心功能比较** 如图 4 和表 2 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠 LVEF 和 LVFS 显著降低 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组大鼠 LVEF 和 LVFS 显著升高 ( $P<0.01$ )。

**3.3.2 各组大鼠血清 NT-proBNP 水平** 如表 3 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清 NT-proBNP 水平显著升高 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组大鼠血清 NT-proBNP 水平显著降低 ( $P<0.01$ )。

**3.3.3 各组大鼠心肌组织病理变化** 如图 5 所示, 对照组大鼠心肌细胞形态正常, 排列整齐, 结构清晰, 间质未见明显纤维化。与对照组比较, 模型组大鼠心肌细胞排列紊乱, 间质增宽, 可见大量胶原纤维沉积, 提示心肌纤维化形成。与模型组比较, 各给药组心肌间质纤维化程度均有所减轻, 其中以 SFI 高剂量组和秋水仙碱组的改善作用最为显著, 心肌纤维排列更趋整齐, 间质胶原沉积明显减少。



1 kcal·mol<sup>-1</sup> = 4.182 kJ·mol<sup>-1</sup>

图 2 分子对接结果热图

Fig. 2 Heatmap of molecular docking results

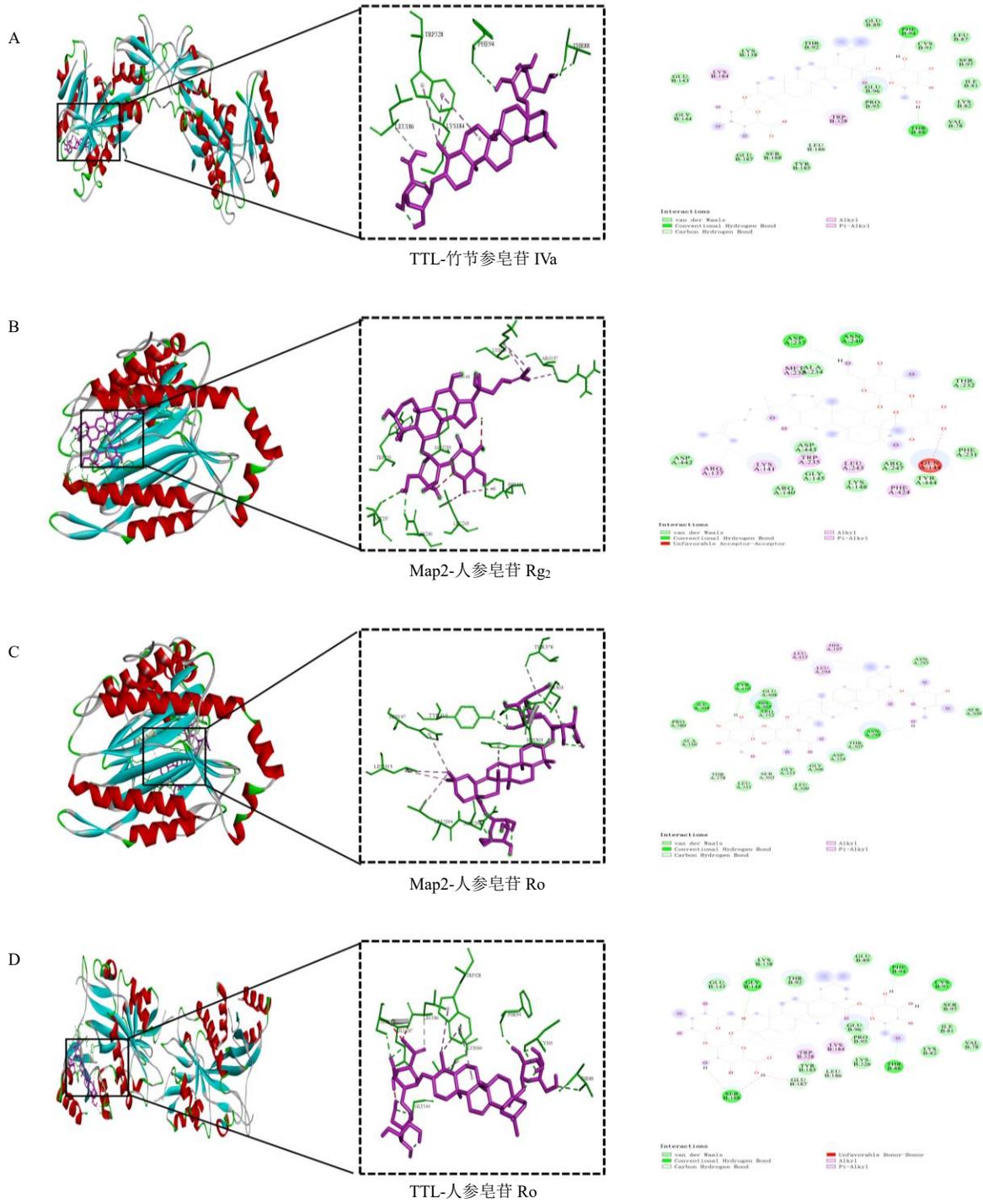


图3 代表性分子对接图

Fig. 3 Representative molecular docking diagram

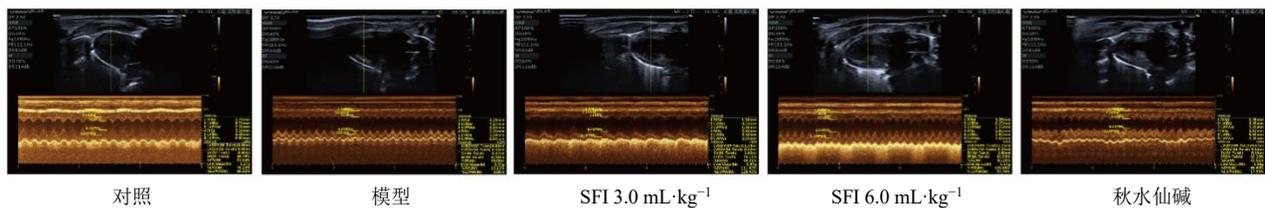


图4 各组大鼠超声心动图

Fig. 4 Echocardiograms of rats in each group

表2 各组大鼠心功能比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Comparison of cardiac function of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量	LVEF/%	LVFS/%
对照	—	86.63 ± 3.33	51.26 ± 4.46
模型	—	64.86 ± 4.21 <sup>##</sup>	31.37 ± 2.88 <sup>##</sup>
SFI	3.0 mL·kg <sup>-1</sup>	74.11 ± 2.90 <sup>**</sup>	38.41 ± 2.36 <sup>**</sup>
	6.0 mL·kg <sup>-1</sup>	82.97 ± 4.35 <sup>**</sup>	47.03 ± 4.50 <sup>**</sup>
秋水仙碱	0.1 mg·kg <sup>-1</sup>	79.38 ± 5.71 <sup>**</sup>	43.43 ± 5.42 <sup>**</sup>

与对照组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , 下表同。

<sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group, same as below tables.

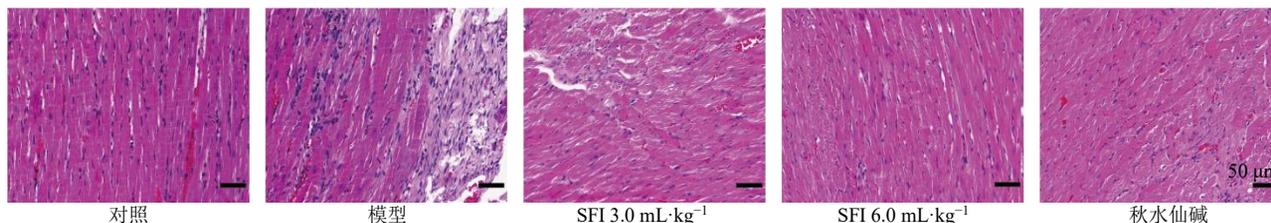


图5 各组大鼠心肌组织 HE 染色结果 (×400)

Fig. 5 HE staining results of myocardial tissue of rats in each group (× 400)

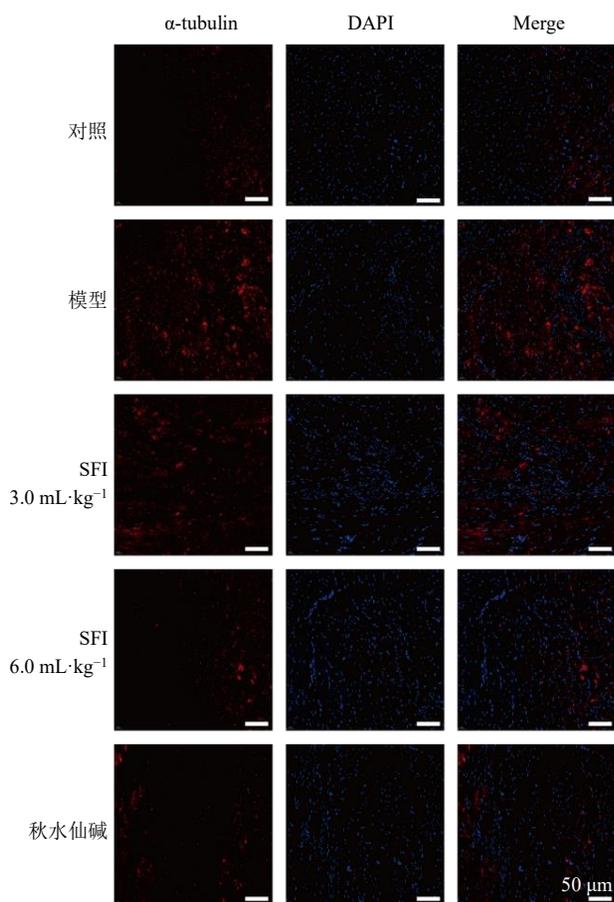


图6 各组大鼠心肌组织 α-tubulin 免疫荧光染色图 (×400)

Fig. 6 Immunofluorescence staining of α-tubulin in myocardial tissue of rats in each group (× 400)

表3 各组大鼠血清 NT-proBNP 水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Comparison of NT-proBNP level in serum of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量	NT-proBNP/(pg·mL <sup>-1</sup> )
对照	—	81.51 ± 24.11
模型	—	381.80 ± 19.05 <sup>##</sup>
SFI	3.0 mL·kg <sup>-1</sup>	207.30 ± 16.20 <sup>**</sup>
	6.0 mL·kg <sup>-1</sup>	147.70 ± 30.16 <sup>**</sup>
秋水仙碱	0.1 mg·kg <sup>-1</sup>	135.40 ± 21.80 <sup>**</sup>

3.3.4 各组大鼠心肌组织微管形态比较 如图6和表4所示,与对照组比较,模型组心肌组织 α-tubulin

表4 各组大鼠心肌组织 α-tubulin 表达比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Comparison of α-tubulin expression in myocardial tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量	α-tubulin 荧光强度
对照	—	954.7 ± 38.4
模型	—	6 198.4 ± 1 223.1 <sup>##</sup>
SFI	3.0 mL·kg <sup>-1</sup>	3 597.4 ± 1 409.3 <sup>*</sup>
	6.0 mL·kg <sup>-1</sup>	2 028.8 ± 1 268.6 <sup>**</sup>
秋水仙碱	0.1 mg·kg <sup>-1</sup>	779.7 ± 61.7 <sup>**</sup>

表达显著升高 ( $P < 0.01$ ), 微管网络致密; 与模型组比较, 各给药组心肌组织 α-tubulin 表达显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 微管网络密度降低。

3.3.5 各组大鼠心肌组织微管蛋白翻译后修饰表达的变化 采用免疫荧光检测各组大鼠心肌组织微管蛋白翻译后修饰表达的变化, 结果如图7~9所示, 与对照组比较, 模型组大鼠心肌组织微管蛋白去酪氨酸化表达和谷氨酸化增加, 乙酰化表达减少; 与模型组比较, SFI 和秋水仙碱干预后可改善微管蛋白翻译后修饰表达的变化。

3.3.6 各组大鼠心肌组织 HDAC6 和 TTL 表达 如图10和表5所示, 与对照组比较, 模型组大鼠心肌组织 HDAC6 阳性表达显著增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组 HDAC6 阳性表达显著减少 ( $P < 0.01$ ), 表明 SFI 可通过抑制 HDAC6 表达, 增加乙酰化, 从而增加微管稳定性。与对照组比较,

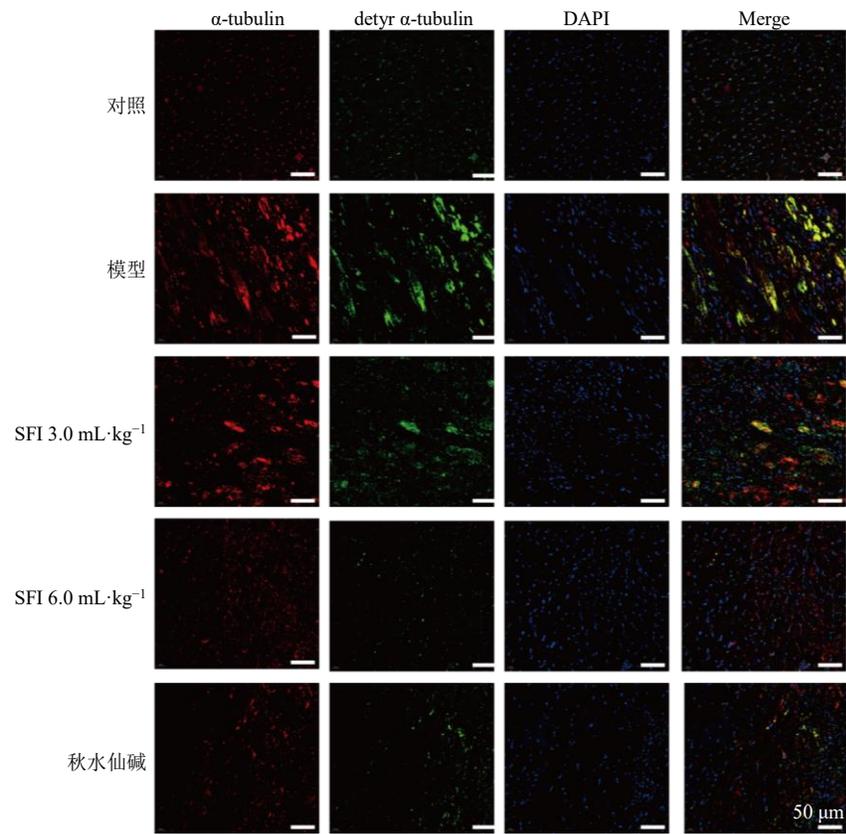


图 7 各组大鼠心肌组织微管蛋白去酪氨酸化修饰免疫荧光图 (×400)

Fig. 7 Immunofluorescence of detyrosinated tubulin in myocardial tissue of rats in each group (× 400)

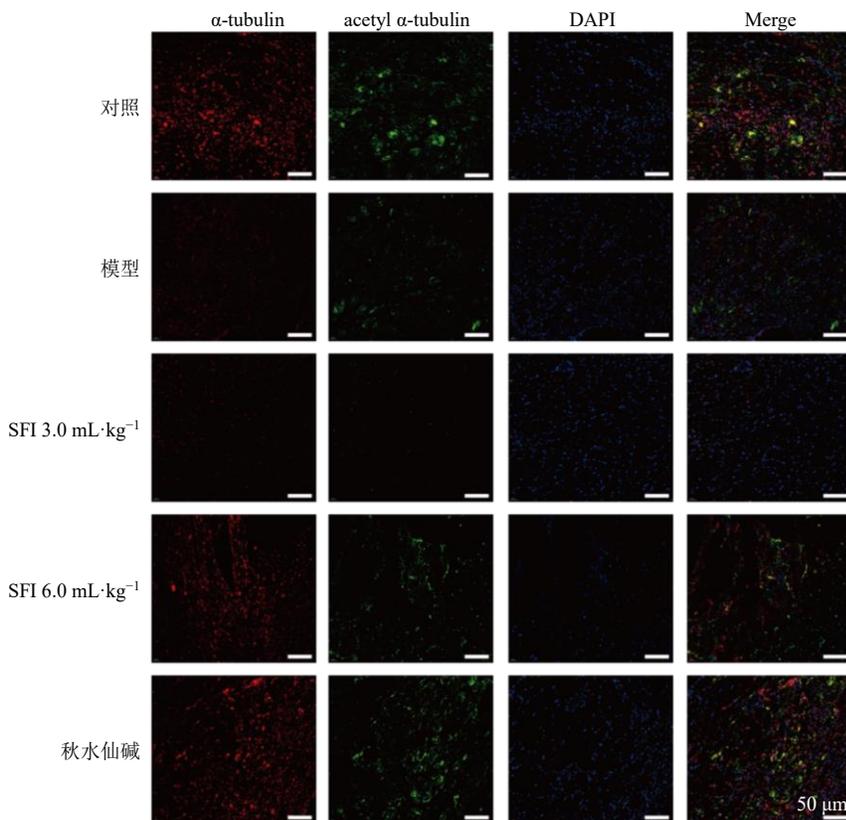


图 8 各组大鼠心肌组织微管蛋白乙酰化修饰免疫荧光图 (×400)

Fig. 8 Immunofluorescence of acetylated tubulin in myocardial tissue of rats in each group (× 400)

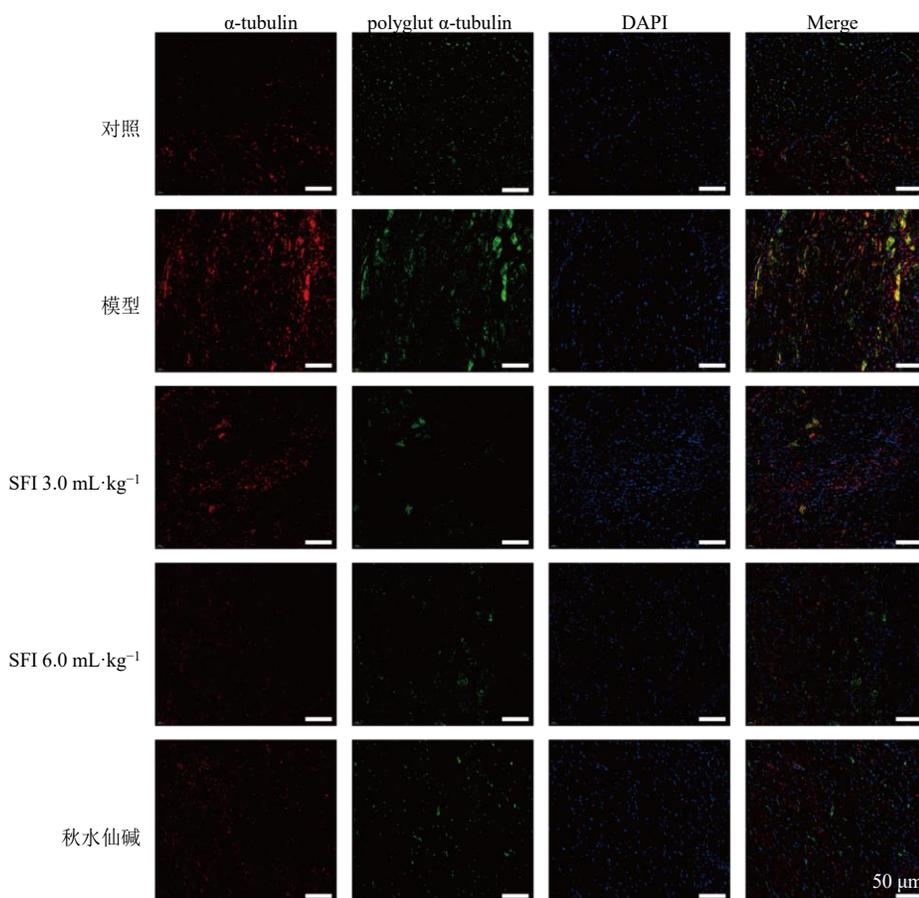


图9 各组大鼠心肌组织微管蛋白谷氨酸化修饰免疫荧光图 (×400)

Fig. 9 Immunofluorescence of polyglutamylated tubulin in myocardial tissue of rats in each group (× 400)

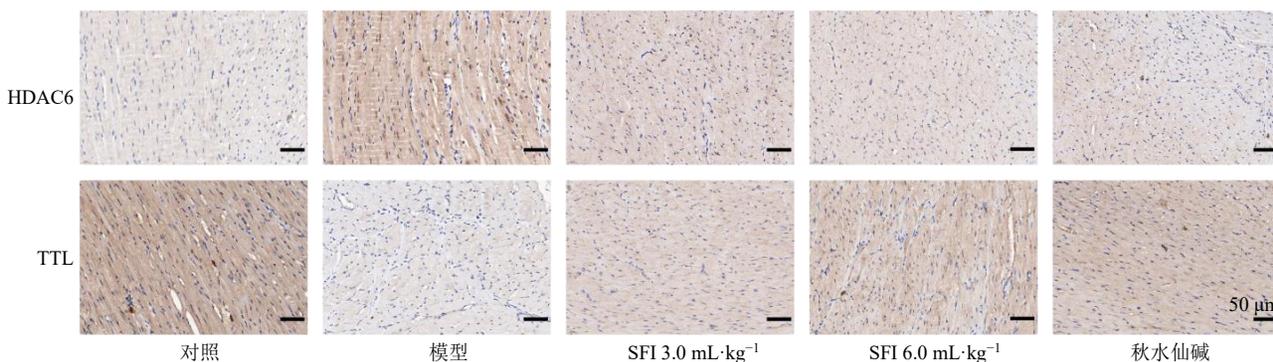


图10 各组大鼠心肌组织 HDAC6 和 TTL 表达的免疫组化图 (×400)

Fig. 10 Immunohistochemistry of HDAC6 and TTL expressions in myocardial tissue of rats in each group (× 400)

表5 各组大鼠心肌组织 HDAC6 和 TTL 表达水平  
( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 5 HDAC6 and TTL expressions in myocardial tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量	平均A值	
		HDAC6	TTL
对照	—	3 793.1±787.4	90 187.2±4 943.3
模型	—	73 008.1±5 267.0 <sup>###</sup>	4 180.4±1 747.0 <sup>##</sup>
SFI	3.0 mL·kg <sup>-1</sup>	12 108.4±810.1 <sup>**</sup>	43 119.0±6 087.0 <sup>**</sup>
	6.0 mL·kg <sup>-1</sup>	7 646.3±1 172.1 <sup>**</sup>	98 763.0±6 525.1 <sup>**</sup>
秋水仙碱	0.1 mg·kg <sup>-1</sup>	9 164.1±999.2 <sup>**</sup>	90 328.1±9 847.2 <sup>**</sup>

模型组大鼠心肌组织 TTL 阳性表达显著减少 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组 TTL 阳性表达显著增加 ( $P < 0.01$ ), 表明 SFI 可促进 TTL 的过表达, 降低微管蛋白去酪氨酸化, 从而改善 CHF 心阳虚证大鼠心肌细胞收缩性。

### 3.4 体外实验结果

3.4.1 SFI 对 ISO 诱导的 H9c2 细胞存活率的影响如表 6 所示, 采用不同浓度的 ISO 处理 H9c2 细胞 24、48 h 后, 细胞存活率显著降低 ( $P < 0.01$ ), 呈

表 6 不同浓度的 ISO 作用不同时间对 H9c2 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 6 Effect of ISO exposure at different concentrations for different durations on survival rate of H9c2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	细胞存活率/%	
		24 h	48 h
对照	—	100.00±0.00	100.00±0.00
ISO	10	97.21±0.22 <sup>##</sup>	91.34±0.82 <sup>##</sup>
	20	95.55±0.15 <sup>##</sup>	85.79±0.36 <sup>##</sup>
	30	94.00±0.13 <sup>##</sup>	82.08±0.44 <sup>##</sup>
	40	91.59±0.22 <sup>##</sup>	79.05±0.32 <sup>##</sup>
	50	90.00±0.18 <sup>##</sup>	75.86±0.31 <sup>##</sup>
	60	87.71±0.20 <sup>##</sup>	73.42±0.17 <sup>##</sup>
	70	86.01±0.15 <sup>##</sup>	70.55±0.28 <sup>##</sup>
	80	84.21±0.09 <sup>##</sup>	67.77±0.15 <sup>##</sup>
	90	82.62±0.09 <sup>##</sup>	63.57±0.23 <sup>##</sup>
	100	80.50±0.09 <sup>##</sup>	60.78±0.26 <sup>##</sup>
	110	78.77±0.06 <sup>##</sup>	48.58±0.62 <sup>##</sup>
	120	76.97±0.12 <sup>##</sup>	45.87±0.36 <sup>##</sup>

剂量和时间相关性。ISO 作用于 H9c2 细胞 24、48 h 的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ ) 为 108.92  $\mu\text{mol/L}$ , 因此选择 100  $\mu\text{mol/L}$  ISO 干预 48 h 诱导细胞损伤。如表 7 所示, 2% SFI 干预细胞 48 h, 细胞存活率较作用 24 h 升高 ( $P < 0.05$ ), 而 4% 及以上浓度的 SFI 显著抑制细胞活力 ( $P < 0.01$ ), 表明 SFI 中的活性成分对 H9c2 细胞具有剂量相关性的毒性效应。如表 8 所示, 采用 ISO 诱导细胞损伤后, 给予 2% SFI 干预 48 h, 细胞存活率显著升高 ( $P < 0.01$ ), 表明 2% SFI 能明显改善 ISO 诱导的细胞损伤, 因此采用 2% SFI 进行后续实验。

### 3.4.2 SFI 对 ISO 诱导的 H9c2 细胞微管网络的影响

表 7 不同浓度的 SFI 作用不同时间的 H9c2 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 7 Effect of SFI exposure at different concentrations for different durations on survival rate of H9c2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/%	细胞存活率/%	
		24 h	48 h
对照	—	100.00±0.00	100.00±0.00
SFI	2	96.41±0.35 <sup>##</sup>	98.78±0.27 <sup>▲</sup>
	4	87.55±0.59 <sup>##</sup>	81.98±0.64 <sup>##▲▲</sup>
	8	82.96±0.98 <sup>##</sup>	74.08±0.23 <sup>##▲▲</sup>
	12	79.41±0.80 <sup>##</sup>	66.53±0.34 <sup>##▲▲</sup>
	16	63.97±0.69 <sup>##</sup>	54.05±0.36 <sup>##▲▲</sup>

与 24 h 相应组别比较: <sup>▲</sup> $P < 0.01$  <sup>▲▲</sup> $P < 0.05$ 。

<sup>▲</sup> $P < 0.05$  <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$  vs corresponding group of 24 h.

表 8 SFI 对 ISO 诱导的 H9c2 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 8 Effect of SFI on survival rate of ISO-induced H9c2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/%	细胞存活率/%
对照	—	100.00±0.00
模型	—	61.17±0.49 <sup>##</sup>
SFI	2	75.33±0.81 <sup>**</sup>
	4	64.14±0.60 <sup>**</sup>
	8	59.15±0.15 <sup>*</sup>
	12	46.68±0.75 <sup>**</sup>
	16	40.36±0.70 <sup>**</sup>

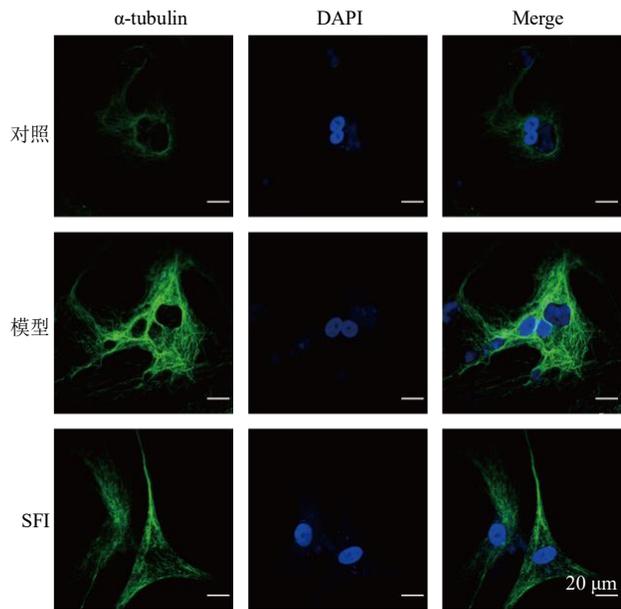


图 11 SFI 对 ISO 诱导的 H9c2 细胞微管网络的影响 (×400)

Fig. 11 Effect of SFI on the microtubule network in cardiomyocytes (×400)

表 9 各组心肌细胞中  $\alpha$ -tubulin 表达的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 9 Comparison of  $\alpha$ -tubulin expression in cardiomyocytes of each group ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/%	$\alpha$ -tubulin 荧光强度
对照	—	7 555±1 209
模型	—	23 746±1 680 <sup>##</sup>
SFI	2	18 089±2 685 <sup>**</sup>

$\alpha$ -tubulin 表达显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, SFI 组  $\alpha$ -tubulin 表达显著降低 ( $P < 0.01$ )。

3.4.3 SFI 对 ISO 诱导的 H9c2 细胞微管蛋白翻译后修饰表达的影响 如图 12~14 和表 10 所示, 与对照组比较, 模型组去酪氨酸化和谷氨酸化表达增加 ( $P < 0.01$ ), 乙酰化表达减少 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, SFI 干预后可显著改善翻译后修饰表达变化 ( $P < 0.01$ )。

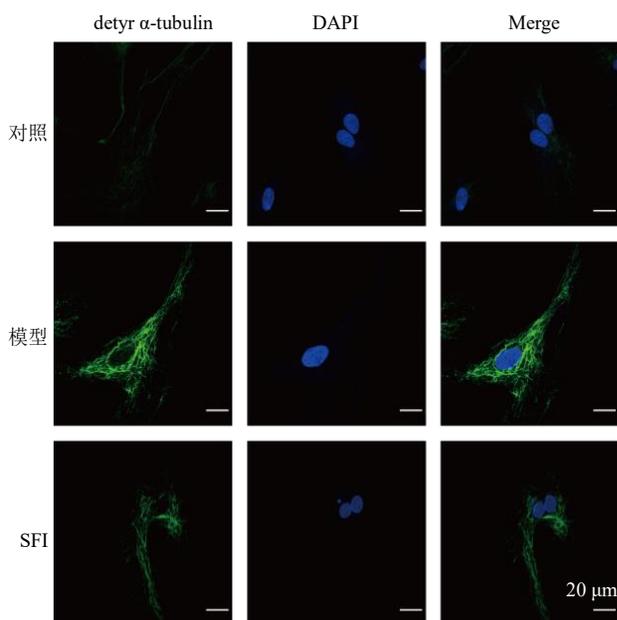


图 12 各组心肌细胞中微管蛋白去酪氨酸化修饰免疫荧光图 (×400)

Fig. 12 Immunofluorescence image of detyrosinated tubulin in cardiomyocytes of each group (× 400)

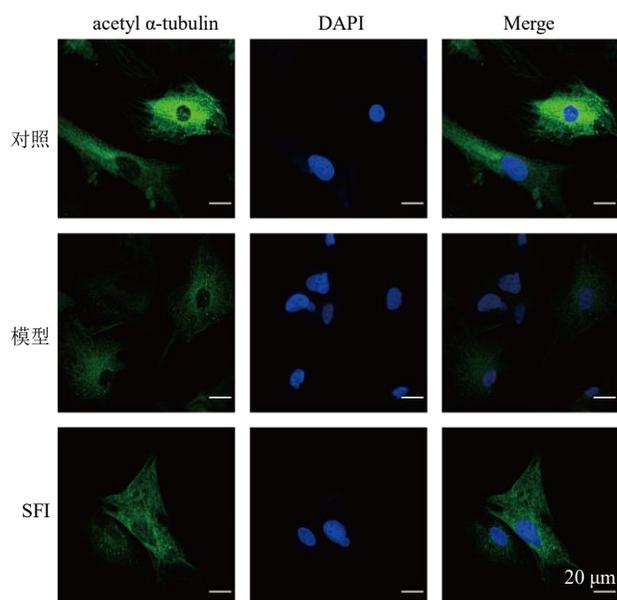


图 13 各组心肌细胞中微管蛋白乙酰化修饰免疫荧光图 (×400)

Fig. 13 Immunofluorescence image of tubulin acetylation in cardiomyocytes of each group (× 400)

#### 4 讨论

CHF 是一种复杂的临床综合征,近年来研究表明心肌细胞内微管网络异常重塑在 CHF 病程中发挥重要作用<sup>[20]</sup>。在正常状态下,微管作为细胞骨架,既维持结构,又提供物质运输轨道,其动态稳定性

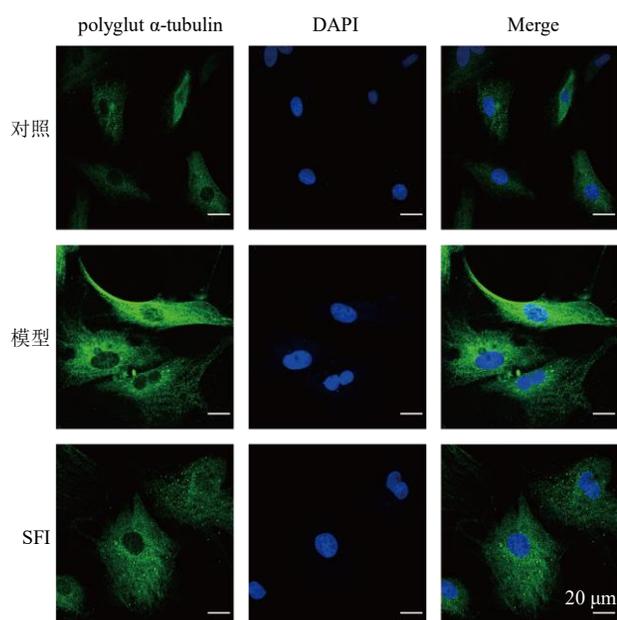


图 14 各组心肌细胞中谷氨酸化修饰免疫荧光图 (×400)

Fig.14 Immunofluorescence image of glutamylation in cardiomyocytes of each group (× 400)

表 10 各组心肌细胞中微管蛋白翻译后修饰表达的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 10 Comparison of post-translationally modified tubulin expressions in cardiomyocytes of each group ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/%	荧光强度		
		detyr α-tubulin	acetyl α-tubulin	polyglut α-tubulin
对照	—	9 260.2±404.1	23 794.3±562.4	18 340.7±703.2
模型	—	17 153.2±1 139.0 <sup>##</sup>	10 624.9±768.1 <sup>##</sup>	25 953.2±714.6 <sup>##</sup>
SFI	2	12 696.8±700.2 <sup>**</sup>	16 035.9±531.0 <sup>**</sup>	21 706.3±644.3 <sup>**</sup>

对心肌收缩与舒张功能至关重要。然而在 CHF 状态下,心肌细胞内微管过度聚集和稳定化,形成致密僵硬的网络结构,直接增加心肌舒缩阻力,降低心肌收缩效率<sup>[21-25]</sup>。本研究观察到 CHF 心阳虚证模型大鼠心肌组织 α-tubulin 表达升高、微管网络密集,伴随心功能下降,与既往报道的微管过度聚集增加心肌舒缩阻力、降低收缩效率的结果一致,提示微管异常稳态在 CHF 心阳虚证的发生发展中具有重要作用。

乙酰化是调控微管稳定性的关键修饰。HDAC6 作为主要的 α-tubulin 去乙酰化酶,其高表达可导致微管乙酰化水平下降,微管稳定性减弱,使心肌细胞对应激反应更敏感<sup>[26-28]</sup>。研究表明,HDAC6 抑制剂可改善心肌功能,缓解 CHF 重构<sup>[29-33]</sup>。本研究发现,模型组大鼠心肌组织 HDAC6 蛋白表达显著升高,伴随 acetyl α-tubulin 表达下降;而 SFI 干预后

HDAC6 表达显著下调,乙酰化水平恢复。去酪氨酸化是心衰微管异常稳态的另一重要标记。TTL 是维持  $\alpha$ -tubulin 去酪氨酸化的关键酶,当 TTL 表达下调时,去酪氨酸化  $\alpha$ -tubulin 大量累积,导致微管僵硬,损害心肌收缩功能<sup>[34-37]</sup>。相关研究表明,CHF 心肌细胞中去酪氨酸化微管显著增多,而恢复 TTL 表达可逆转心肌收缩障碍<sup>[38-39]</sup>。除乙酰化与去酪氨酸化外,谷氨酸化在调控微管中发挥重要作用<sup>[40]</sup>。过度谷氨酸化会破坏分子马达的结合与物质运输,导致细胞内信号传导及能量分布障碍。本研究通过 UHPLC-MS 技术共鉴定出 12 种 SFI 的有效成分,随后将其与微管蛋白相关蛋白进行分子对接,结果显示 12 种活性成分与 tubulin、Map2、Map4、ATAT1、CCP、TTL、SVBP、VASH1、HDAC6、Mark4 均有较强的结合力,说明 SFI 中的有效成分能作用于微管蛋白。

动物实验结果显示,与模型组比较,SFI 高剂量组和秋水仙碱干预后大鼠心肌组织微管网络密度降低。为了进一步探讨 SFI 对微管蛋白翻译后修饰的影响,采用双重免疫荧光检测去酪氨酸化、乙酰化和谷氨酸化的表达,同时采用免疫组化检测微管蛋白修饰相关的 HDAC6、TTL 的表达。免疫荧光结果显示,模型组大鼠心肌组织去酪氨酸化和谷氨酸化水平升高,乙酰化水平下降;给予 SFI 干预后蛋白翻译后修饰水平改善。免疫组化结果显示,与对照组比较,模型组大鼠心肌组织 HDAC6 表达升高,TTL 表达降低;给予 SFI 干预后 HDAC6 表达降低,TTL 表达升高,表明 SFI 可抑制 HDAC6 表达,增加乙酰化,同时促进 TTL 过表达以降低微管去酪氨酸化,从而增加微管稳定性。细胞实验结果与动物实验趋势一致,进一步验证了 SFI 对微管蛋白翻译后修饰的影响。

综上,本研究发现 SFI 能够显著改善 ISO 诱导的 CHF 心阳虚证大鼠心功能,降低 NT-proBNP 水平,增加 acetyl  $\alpha$ -tubulin 水平,减少 detyr  $\alpha$ -tubulin 和 polyglut  $\alpha$ -tubulin 水平,从而抑制微管异常重塑、维持微管稳态。本研究揭示了 CHF 心阳虚证大鼠心肌细胞中微管翻译后修饰异常的特点,也为 SFI 通过多靶点调控微管稳态、干预 CHF 病程提供了新的分子学证据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

[1] 许顶立,宋霖.《中国心力衰竭诊断和治疗指南 2024》

解读 [J]. 临床心血管病杂志, 2024, 40(6): 437-439.

- [2] Caporizzo M A, Prosser B L. The microtubule cytoskeleton in cardiac mechanics and heart failure [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2022, 19(6): 364-378.
- [3] Liu C, Chen Y W, Xie Y, et al. Tubulin post-translational modifications: Potential therapeutic approaches to heart failure [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 872058.
- [4] McKenna E D, Sarbanes S L, Cummings S W, et al. The tubulin code, from molecules to health and disease [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2023, 39: 331-361.
- [5] Requena S, Sánchez-Madrid F, Martín-Cófreces N B. Post-translational modifications and stabilization of microtubules regulate transport of viral factors during infections [J]. *Biochem Soc Trans*, 2021, 49(4): 1735-1748.
- [6] 杨妍,李青霞,张丽娜,等. 参附注射液治疗心力衰竭药理作用研究进展 [J]. 现代中医药, 2026, 46(1): 44-48.
- [7] 朱良辉,吴倩颖,陈伟康,等. UHPLC-MS/MS-QAMS 法测定金丹附延颗粒中 4 种生物碱含量 [J]. 化学试剂, 2025, 47(7): 102-107.
- [8] 吕媛媛,赵春霞,何莎莎. 参附黄方通过抑制 GSDMD 介导的细胞焦亡减轻脓毒症诱导的小鼠肠损伤 [J]. 中草药, 2025, 56(16): 5856-5868.
- [9] Shchendrygina A, Rachina S, Cherkasova N, et al. Colchicine in patients with heart failure and preserved left ventricular ejection fraction: Rationale and design of a prospective, randomised, open-label, crossover clinical trial [J]. *Open Heart*, 2023, 10(2): e002360.
- [10] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 164-165.
- [11] Li L, Ye J H, Zhao Z Y, et al. Shenfu Injection improves isoproterenol-induced heart failure in rats by modulating co-metabolism and regulating the trimethylamine-N-oxide-inflammation axis [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1412300.
- [12] 黄淑敏,廖晓倩,范星宇,等. 基于“以方测证”理论探讨异丙肾上腺素诱导慢性心力衰竭大鼠模型的制备及中医证型 [J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(3): 368-375.
- [13] 张倩,周颖,秦思佳,等. 参附注射液对异丙肾上腺素诱导的慢性心衰大鼠肠道菌群及肠道通透性的影响 [J]. 中医药导报, 2025, 31(12): 67-74.
- [14] 黄淑敏,廖晓倩,范星宇,等. 基于 HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路探讨参附注射液对慢性心力衰竭大鼠的保护作用 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(20): 5556-5563.
- [15] 崔议方,王红,张稳稳,等. 基于 UHPLC-HRMS/MS 的鲜人参不同部位中皂苷类成分差异分析 [J]. 中国

- 现代应用药学, 2023, 40(10): 1367-1376.
- [16] 甘佳攀, 徐鑫, 邹佳芬, 等. 基于 QTOF 与 QQQ MS/MS 的樟帮附子(临江片)炮制前后差异性成分分析 [J/OL]. 分析测试学报, (2026-02-03) [2026-02-09]. <https://link.cnki.net/urlid/44.1318.th.20260203.0905.001>.
- [17] 黄琪, 李奕, 葛杉, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-HRMS 鉴定双参扶正散的化学成分及大鼠体内成分分布特征 [J/OL]. 中国中药杂志, (2025-12-12) [2026-02-09]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20251208.201>.
- [18] 龙健, 周昌园, 田力, 等. UPLC-Q/TOF-MS 法同时测定竹节参及其总皂苷中 13 个指标成分 [J]. 湖北民族大学学报: 医学版, 2022, 39(3): 56-61.
- [19] 李懿涵, 梁绿圆, 曹佳蕾, 等. 附子理中丸化学成分、药理作用研究进展及质量标志物(Q-Marker)预测 [J/OL]. 中华中医药学刊, (2025-08-20) [2026-02-09]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20250820.1509.004>.
- [20] Liu C, Chen Y W, Xie Y, *et al.* Tubulin post-translational modifications: Potential therapeutic approaches to heart failure [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 872058.
- [21] Caporizzo M A, Chen C Y, Prosser B L. Cardiac microtubules in health and heart disease [J]. *Exp Biol Med*, 2019, 244(15): 1255-1272.
- [22] Sun S S, Xu Z, He L Y, *et al.* Metabolic regulation of cytoskeleton functions by HDAC6-catalyzed  $\alpha$ -tubulin lactylation [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 8377.
- [23] Yang S K, Kubo S, Black C S, *et al.* Effect of  $\alpha$ -tubulin acetylation on the doublet microtubule structure [J]. *eLife*, 2024, 12: RP92219.
- [24] Viar G A, Pigno G. Tubulin posttranslational modifications through the lens of new technologies [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2024, 88: 102362.
- [25] Alvarez Viar G, Klena N, Martino F, *et al.* Protofilament-specific nanopatterns of tubulin post-translational modifications regulate the mechanics of ciliary beating [J]. *Curr Biol*, 2024, 34(19): 4464-4475.e9.
- [26] Morley S J, Qi Y M, Iovino L, *et al.* Acetylated tubulin is essential for touch sensation in mice [J]. *eLife*, 2016, 5: e20813.
- [27] Girão H, Macário-Monteiro J, Figueiredo A C, *et al.*  $\alpha$ -Tubulin detyrosination fine-tunes kinetochore-microtubule attachments [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 9720.
- [28] Pietsch N, Chen C Y, Kupsch S, *et al.* Chronic activation of tubulin tyrosination improves heart function [J]. *Circ Res*, 2024, 135(9): 910-932.
- [29] Demos-Davies K M, Ferguson B S, Cavasin M A, *et al.* HDAC6 contributes to pathological responses of heart and skeletal muscle to chronic angiotensin-II signaling [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 307(2): H252-H258.
- [30] Jain P K, Mahanty S, Chittora H, *et al.* Tubulin tyrosine ligase variant perturbs microtubule tyrosination, causing hypertrophy in patient-specific and CRISPR gene-edited iPSC-cardiomyocytes [J]. *JCI Insight*, 2025, 10(15): e187942.
- [31] Chhatre A, Stepanek L, Nievergelt A P, *et al.* Tubulin tyrosination/detyrosination regulate the affinity and sorting of intraflagellar transport trains on axonemal microtubule doublets [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 1055.
- [32] Huang Z Q, Li L, Cheng B B, *et al.* Small molecules targeting HDAC6 for cancer treatment: Current progress and novel strategies [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 178: 117218.
- [33] Fu S F, Xu M M, Li J L, *et al.* HDAC6 inhibitor ACY-1215 protects from nonalcoholic fatty liver disease via inhibiting CD14/TLR4/MyD88/MAPK/NF $\kappa$ B signal pathway [J]. *Heliyon*, 2024, 10(13): e33740.
- [34] Janke C. The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, and functions [J]. *J Cell Biol*, 2014, 206(4): 461-472.
- [35] Miura S, Misaka T, Sekine T, *et al.* Detyrosinated  $\alpha$ -tubulin mediates mitochondrial dysfunction and diastolic impairment in heart failure with preserved ejection fraction [J]. *FEBS Lett*, 2025, 599(17): 2474-2490.
- [36] Deshpande A, Brants J, Wasyluk C, *et al.* TTL12 has a potential oncogenic activity, suppression of ligation of nitrotyrosine to the C-terminus of detyrosinated  $\alpha$ -tubulin, that can be overcome by molecules identified by screening a compound library [J]. *PLoS One*, 2024, 19(2): e0296960.
- [37] Sanyal C, Pietsch N, Ramirez Rios S, *et al.* The detyrosination/re-tyrosination cycle of tubulin and its role and dysfunction in neurons and cardiomyocytes [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2023, 137: 46-62.
- [38] Robison P, Caporizzo M A, Ahmadzadeh H, *et al.* Detyrosinated microtubules buckle and bear load in contracting cardiomyocytes [J]. *Science*, 2016, 352(6284): aaf0659.
- [39] Chen C Y, Caporizzo M A, Bedi K, *et al.* Suppression of detyrosinated microtubules improves cardiomyocyte function in human heart failure [J]. *Nat Med*, 2018, 24(8): 1225-1233.
- [40] Carmona B, Marinho H S, Matos C L, *et al.* Tubulin post-translational modifications: The elusive roles of acetylation [J]. *Biology*, 2023, 12(4): 561.