

• 药理与临床 •

基于单细胞-空间转录组学探究复方丹参滴丸改善小鼠心肌缺血再灌注损伤的机制

朱思越^{1,2}, 王栋元^{1,2}, 强婷婷^{1,2}, 李琳^{1,2}, 芦瑞霞^{1,2}, 林文勇^{1,2}, 靳琪鹏^{1,2}, 高俊杰^{1,2}, 王肖龙^{1,2*}

1. 上海中医药大学附属曙光医院 国家中医心血管病临床医学研究中心分中心, 上海 201203

2. 上海中医药大学附属曙光医院 心血管病研究所, 上海 201203

摘要: 目的 基于单细胞与空间转录组学探究复方丹参滴丸改善小鼠心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI) 的作用及其潜在机制。方法 C57BL/6 小鼠随机分为假手术组、模型组和复方丹参滴丸低、中、高剂量 (61.43、122.85、245.70 mg/kg) 组, 每组 15 只。给药干预 7 d, 于末次给药 30 min 后采用左前降支结扎-再灌注方法构建小鼠 MIRI 模型。术后 24 h 应用超声心动图评估心功能变化; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 及 Masson 染色观察心肌组织病理学改变。对假手术组、模型组及复方丹参滴丸中剂量组小鼠心脏组织进行单细胞与空间转录组学测序。单细胞转录组学进行细胞类型鉴定、心肌细胞亚群分型、差异基因表达分析、拟时序分析、差异表达基因分析及富集分析。空间转录组学分析识别 MIRI 空间转录组学特征与损伤边界区的特征基因。采用 Western blotting 检测小鼠心肌组织中核受体亚家族 3C 组成员 1 (nuclear receptor subfamily 3 group C member 1, NR3C1)、丙酮酸脱氢酶激酶 4 (pyruvate dehydrogenase kinase 4, PDK4)、长链脂酰辅酶 A 合成酶 4 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4) 和谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 的蛋白表达。结果 与假手术组比较, 模型组小鼠左室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF) 下降 ($P < 0.05$), 病理提示心肌细胞大量坏死, 胶原纤维增多。与模型组比较, 复方丹参滴丸显著改善 MIRI 小鼠心功能 ($P < 0.05$), 心肌损伤减轻, 胶原纤维减少。单细胞转录组学结果表明, 复方丹参滴丸可增加心肌细胞比例, 减少成纤维细胞及炎症细胞比例。空间转录组学揭示了 MIRI 空间转录组学特质和损伤边界区的关键基因。Western blotting 结果显示, 与假手术组比较, 模型组小鼠心肌组织 NR3C1、PDK4 和 ACSL4 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), GPX4 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 复方丹参滴丸组心肌组织 NR3C1、PDK4 和 ACSL4 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), GPX4 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。结论 复方丹参滴丸可能通过减轻铁死亡, 调节心肌代谢, 减轻小鼠 MIRI。

关键词: 复方丹参滴丸; 单细胞转录组学; 空间转录组学; 心肌缺血再灌注损伤; 铁死亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)05-1703-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.05.011

Mechanism of Compound Danshen Dropping Pills in improving myocardial ischemia-reperfusion injury in mice based on single-cell spatial transcriptomics

ZHU Siyue^{1,2}, WANG Dongyuan^{1,2}, QIANG Tingting^{1,2}, LI Lin^{1,2}, LU Ruixia^{1,2}, LIN Wenyong^{1,2}, JIN Qipeng^{1,2}, GAO Junjie^{1,2}, WANG Xiaolong^{1,2}

1. Branch of National Clinical Research Center for Chinese Medicine Cardiovascular Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Institute of Cardiovascular Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To investigate the mechanisms by which Compound Danshen Dropping Pills (复方丹参滴丸) ameliorate

收稿日期: 2025-12-28

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82074222); 国家自然科学基金面上项目 (82374252); 上海市医学创新研究专项-重大专项 (23Y31920200); 上海市中医临床重点实验室项目 (20DZ2272200); 苏州工业园区东方华夏心血管健康研究院力心中药科研创新基金 2024 (2024-CCATCM-052)

作者简介: 朱思越 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中西医结合治疗心血管疾病。E-mail: sue_zhu@163.com

*通信作者: 王肖龙, 博士生导师, 教授。E-mail: wxlqy0214@163.com

myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) in mice using single-cell and spatial transcriptomics. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into sham group, model group, Compound Danshen Dropping Pills low-, medium-, and high-dose (61.43, 122.85, 245.70 mg/kg) groups, with 15 mice in each group. Mice were continuously given drug intervention for 7 d, and a MIRI model was constructed using left anterior descending artery ligation reperfusion method 30 min after the last administration. Cardiac function was assessed by echocardiography 24 h after surgery, and myocardial histopathology was evaluated by hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining. Hearts from sham group, model group, and Compound Danshen Dropping Pills medium-dose group were subjected to single-cell and spatial transcriptomic analyses. Single cell transcriptomics was used for cell type identification, cardiomyocyte subpopulation typing, differential gene expression analysis, pseudo temporal analysis, differential gene expression analysis and enrichment analysis. Spatial transcriptomics analysis was used to identify the spatial transcriptomic features of MIRI and the characteristic genes of injury boundary region. Western blotting was performed to detect the expression levels of nuclear receptor subfamily 3 group C member 1 (NR3C1), pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4), acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) in myocardial tissue of mice. **Results** Compared with sham group, the left ventricular ejection fraction (LVEF) of mice in model group was decreased ($P < 0.05$), pathology showed significant necrosis of myocardial cells and increased collagen fibers. Compared with model group, Compound Danshen Dropping Pills significantly improved the cardiac function of MIRI mice ($P < 0.05$), reduced myocardial injury and decreased collagen fibers. The results of single-cell transcriptomics indicated that Compound Danshen Dropping Pills could increase the proportion of myocardial cells and reduce the proportion of fibroblasts and inflammatory cells. Spatial transcriptomics revealed key genes involved in the spatial transcriptomic characteristics and damage boundary regions of MIRI. Western blotting results showed that compared with sham group, the expression levels of NR3C1, PDK4 and ACSL4 proteins in myocardial tissue of mice in model group mice were significantly increased ($P < 0.05$), while the expression level of GPX4 protein was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, the expression levels of NR3C1, PDK4 and ACSL4 proteins in myocardial tissue of mice in Compound Danshen Dropping Pills group were significantly reduced ($P < 0.05$), while the expression level of GPX4 protein was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Compound Danshen Dropping Pills may alleviate MIRI in mice by modulating myocardial metabolism and attenuating ferroptosis.

Key words: Compound Danshen Dropping Pills; single-cell transcriptomics; spatial transcriptomics; myocardial ischemia-reperfusion injury; ferroptosis

心肌梗死是全球最主要的致病和致死原因。中国已成为每年心肌梗死新发和死亡病例最多的国家之一，其流行率与死亡率仍呈持续上升趋势^[1-3]。急性心肌梗死后早期再灌注治疗至关重要，然而，再灌注过程本身也可能引发氧化应激、钙超载、线粒体功能障碍、能量代谢紊乱、炎症反应与细胞程序性死亡等一系列病理反应^[4]，导致心肌缺血再灌注损伤（myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI），减少了再灌注治疗的获益。复方丹参滴丸由丹参、三七、冰片组成，具有活血化瘀、理气止痛的功效。临床研究表明，与单纯使用化学药相比，复方丹参滴丸能够改善冠心病经皮冠状动脉介入治疗（percutaneous coronary intervention, PCI）术后主要不良心血管事件（major adverse cardiovascular events, MACE）的发生，并且显著改善患者的心功能^[5]。现代药理学研究表明，复方丹参滴丸具有扩张冠脉血管、抗血小板聚集、减轻心肌缺血、抗氧化、抗炎及抗心肌纤维化等多种作用^[6-7]。已有研究表明，复方丹参丸能够通过改善线粒体稳态，有效缓解 MIRI 相关的心肌损伤，提示其在能量代谢与

心肌保护中发挥关键作用^[8]。

单细胞转录组测序与空间转录组学是当前转录组学研究领域的重要前沿技术，能够在单细胞分辨率下解析不同细胞类型及其亚群的基因表达特征，揭示细胞组成、功能状态及其转录动态变化。在 MIRI 过程中，损伤区域呈现显著的空间异质性与细胞组成重塑，使得传统转录组难以准确识别再灌注损伤区域内的关键调控基因及其细胞来源。本研究旨在通过结合单细胞与空间转录组学，识别缺血再灌注损伤区域中具有空间特异性的关键基因及其潜在调控网络，并探究复方丹参滴丸改善 MIRI 的作用机制，有助于进一步挖掘 MIRI 的潜在治疗靶点。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 75 只，8 周龄，体重 22~25 g，购自上海中医药大学动物实验中心，动物许可证号 SYXK（沪）2020-0009。动物饲养环境为室温 22~25 °C，相对湿度 45%~55%，12 h 昼夜循环照明，自由进食饮水。动物实验经上海中医药大学动物伦理委员会批准（批准号 PZSHUTCM220725024）。

1.2 药品与试剂

复方丹参滴丸(国药准字 Z10950111, 批号 211147)购自天津天士力医药集团股份有限公司; 戊巴比妥钠(批号 P3761)购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 4%多聚甲醛(批号 BL539A)购自 Biosharp 公司; 环保型脱蜡透明液(批号 G1128)、通用型组织固定液(批号 G1101)、苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染液套装(批号 G1076)、Masson 染液套装(批号 G1006)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 GB12001)购自武汉赛维尔生物科技有限公司; RIPA 裂解液(批号 ST505)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 P0012S)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(批号 P0012A)、蛋白上样缓冲液(批号 P0015)、ECL 化学发光试剂(批号 P0018S)购自上海碧云天生物技术有限公司; 蛋白 Marker(批号 26616)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 核受体亚家族 3C 组成员 1(nuclear receptor subfamily 3 group C member 1, NR3C1)抗体(批号 A19583)、丙酮酸脱氢酶激酶 4(pyruvate dehydrogenase kinase 4, PDK4)抗体(批号 A3069)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)抗体(批号 A11243)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 长链脂酰辅酶 A 合成酶 4(acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4)抗体(批号 sc-365230)购自美国 Santa 公司; HRP 标记的抗兔 IgG 二抗(批号 7074)、HRP 标记的抗鼠 IgG 二抗(批号 7076)购自美国 CST 公司。

1.3 仪器

SiliconWave 30 型小动物超声成像系统(苏州珂纳医疗科技有限公司); Centrifuge 5430R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); Synergy H1 型酶标仪(美国 BioTek 公司); TM-2V45-B9L 型体视解剖显微镜(上海丙林电子科技有限公司); ZS-MV-HXB 型双通道小动物呼吸机(北京众实迪创科技发展有限公司); JXFSTPRP-32 型全自动样品快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司); ChemiScope6100 型化学发光成像仪(上海勤翔科学仪器有限公司); Mini-PROTEAN tetra 电泳仪、Mini Trans-Blot 湿转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 分组、给药与造模

将 C57BL/6J 小鼠随机分为假手术组、模型组

和复方丹参滴丸低、中、高剂量(61.43、122.85、245.70 mg/kg, 分别相当于临床剂量的 0.5、1、2 倍)组, 每组 15 只。各给药组 ig 相应药物, 假手术组和模型组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续给药 7 d。末次给药后 30 min, 采用左前降支结扎-再灌注方法构建小鼠 MIRI 模型, 具体操作如下: 小鼠采用异氟烷麻醉并行呼吸机辅助通气, 脱毛后于第 3~4 肋间开胸暴露心脏, 在左冠状动脉前置入无菌 PE-10 管, 以 10-0 尼龙线结扎左冠状动脉, 捆绑 PE-10 管形成缺血阻断。缺血 30 min 后抽出管材实现再灌注。假手术组小鼠仅行开胸及穿线, 不进行结扎。术后 24 h 应用超声心动图评估心功能变化, 并取材。

2.2 超声心动图检测

脱毛后在异氟烷麻醉状态下使用小动物超声成像系统评估心脏结构和功能, 测量左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)的变化。

2.3 心脏组织病理学观察

2.3.1 HE 染色 取心脏组织, 于 4%多聚甲醛固定 24 h, 经 PBS 清洗后石蜡包埋、切片并行 HE 染色, 脱水封片后, 于显微镜下观察并拍照, 使用病理图像分析仪观察心肌结构及组织学改变。

2.3.2 Masson 染色 取心脏组织石蜡切片, 进行 Masson 染色, 脱水透明后封片, 于显微镜下观察并拍照, 使用病理图像分析仪观察心肌纤维化情况。

2.4 单细胞转录组测序分析

取假手术组、模型组、复方丹参滴丸中剂量组各 3 只小鼠的心脏组织, 使用 10×Genomics 平台进行单细胞转录组测序。过滤单细胞转录组测序数据以排除受损或死亡细胞和细胞双联体($500 < nCount_RNA < 15\ 000$, $300 < nFeature_RNA < 5\ 000$, $percent.mt < 20\%$)。对测序深度和线粒体读取计数进行基因表达标准化, 根据测序细胞中高度可变表达的基因应用主成分分析(principal component analysis, PCA)。利用 Harmony 算法整合不同组别数据以纠正批次效应, 并基于校正后的主成分构建统一的 UMAP 低维嵌入空间。根据经典标记基因对聚类进行注释, 并进一步开展差异基因分析、通路富集分析及拟时序分析。

2.5 空间转录组学测序分析

取假手术组、模型组、复方丹参滴丸中剂量组各 1 只小鼠的心脏组织, 使用 10×Genomics 平台进行空间转录组学测序。对测序数据进行质量控制

和标准化处理, 识别高变异特征基因并构建空间表达图谱, 用以解析 MIRI 边界区的基因特征。

2.6 Western blotting 检测心脏组织相关蛋白表达

取心脏组织, 加入裂解液提取蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。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, 封闭后依次孵育一抗和二抗, ECL 显色后, 于凝胶成像系统中获取图像, 采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.7 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合正态分布后, 使用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 比较各组差异。

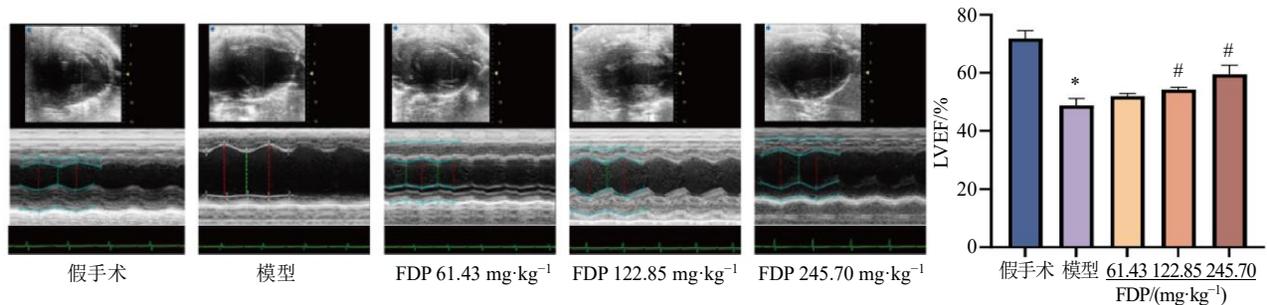
3 结果

3.1 复方丹参滴丸改善小鼠 MIRI 损伤

通过超声心动图、HE 染色和 Masson 染色验证

复方丹参滴丸对 MIRI 小鼠的心脏保护作用。如图 1 所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠表现出显著的心脏收缩功能障碍, 其特征为 LVEF 降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 复方丹参滴丸中、高剂量组 LVEF 升高 ($P < 0.05$), 提示复方丹参滴丸可改善 MIRI 小鼠心功能。

HE 染色结果 (图 2) 显示, 与假手术组比较, 模型组心肌组织中可见大量心肌细胞坏死, 并伴随明显的坏死区炎症细胞浸润; 与模型组比较, 复方丹参滴丸中、高剂量组心肌细胞坏死程度减轻, 炎症细胞浸润减少。Masson 染色结果 (图 2) 显示, 与假手术组比较, 模型组心肌组织中胶原纤维沉积明显增加; 与模型组比较, 复方丹参滴丸各剂量组胶原纤维含量均有所降低, 提示复方丹参滴丸可减轻心肌缺血再灌注后的纤维化。



FDP-复方丹参滴丸; 与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, 图 9 同。
FDP-Compound Danshen Dropping Pills; * $P < 0.05$ vs sham group; # $P < 0.05$ vs model group, same as Fig. 9.

图 1 复方丹参滴丸对 MIRI 小鼠心功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Effect of Compound Danshen Dropping Pills on cardiac function in MIRI mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

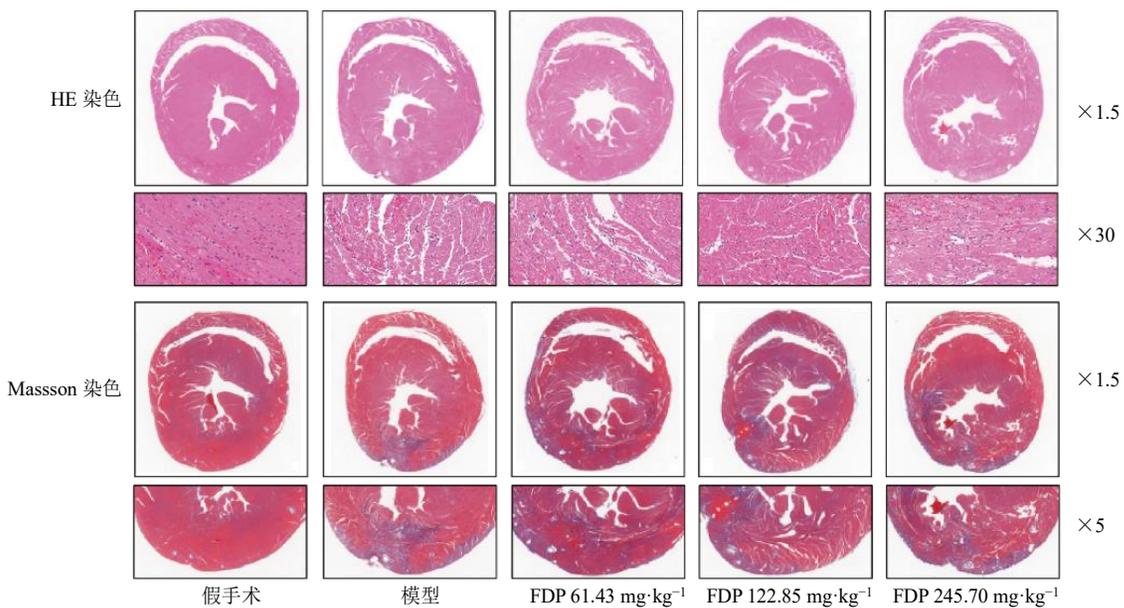


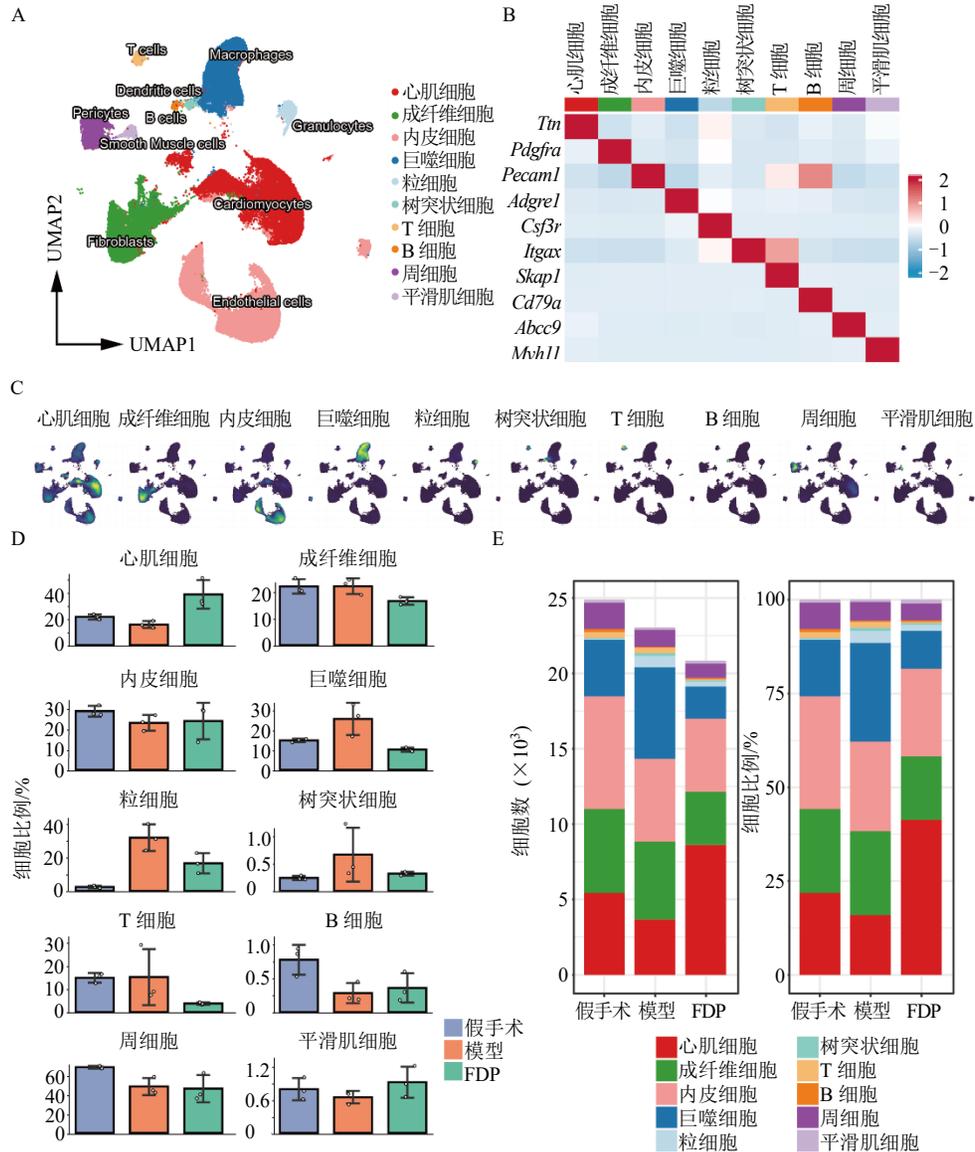
图 2 复方丹参滴丸对 MIRI 小鼠心肌组织病理学的影响

Fig. 2 Effect of Compound Danshen Dropping Pills on myocardial histopathology in mice with MIRI

3.2 单细胞转录组学揭示复方丹参滴丸通过减少心肌细胞死亡及抑制免疫浸润减轻 MIRI

构建 MIRI 小鼠的心脏单细胞转录组图谱，经过严格的质量控制，共获得 68 769 个高质量细胞，其中假手术组、模型组和复方丹参滴丸组分别包含 24 881、23 048 和 20 840 个细胞。对质控后的单细胞转录组数据进行归一化和尺度化处理，并基于 2 000 个高变基因进行 PCA。以 PCA 结果作为输入，采用 Harmony 算法对不同样本间的批次效应进

行校正，并在第 4 次迭代时达到收敛。随后基于 Harmony 空间前 25 个维度构建邻近图并进行细胞聚类分析，聚类分辨率参数设置为 0.8，共获得 34 个细胞聚类；同时基于 Harmony 空间进行 UMAP 降维可视化。差异表达基因分析采用 Wilcoxon 秩和检验，筛选标准为基因在至少 25% 的细胞中表达 (min.pct=0.25) 且 $|\log_2FC| > 0.25$ 。基于各细胞亚群的特异性标记基因，对细胞类型进行注释，最终鉴定出 10 种主要的细胞类群 (图 3-A~C)，包括心肌



A-UMAP 降维图；B-各细胞类型特异性标志基因的表达热图；C-不同细胞类型在 UMAP 空间中的分布特征；D-各组不同细胞类型的相对比例柱状图；E-各组不同细胞类型的绝对数量及相对比例柱状图。

A-UMAP dimensionality reduction map; B-expression heatmap of cell type specific marker genes; C-distribution characteristics of different cell types in UMAP space; D-bar chart showing the relative proportions of different cell type in each group; E-absolute number and relative proportion bar chart of different cell type in each group.

图 3 MIRI 小鼠心脏单细胞转录组学图谱

Fig. 3 Single-cell transcriptomic landscapes of heart in mice with MIRI

细胞 (cardiomyocytes)、成纤维细胞 (fibroblasts)、内皮细胞 (endothelial cells)、巨噬细胞 (macrophages)、粒细胞 (granulocytes)、树突状细胞 (dendritic cells)、T 细胞 (T cells)、B 细胞 (B cells)、周细胞 (pericytes) 和平滑肌细胞 (smooth muscle cells)。

细胞组成比例分析 (图 3-D、E) 结果显示, 与假手术组比较, 模型组心肌细胞的绝对数量和比例均下降, 而成纤维细胞、巨噬细胞、粒细胞和树突状细胞比例上升。这一结果表明 MIRI 伴随着心肌细胞损伤、急性炎症反应和病理性心脏重构。相比之下, 复方丹参滴丸组心肌细胞比例回升, 同时成纤维细胞和炎症性免疫细胞 (巨噬细胞、粒细胞、树突状细胞) 的浸润程度均降低。这提示复方丹参滴丸可能通过双重机制, 即减少心肌细胞死亡并抑制病理性的炎症反应, 从而有效缓解缺血再灌注所致的组织损伤。

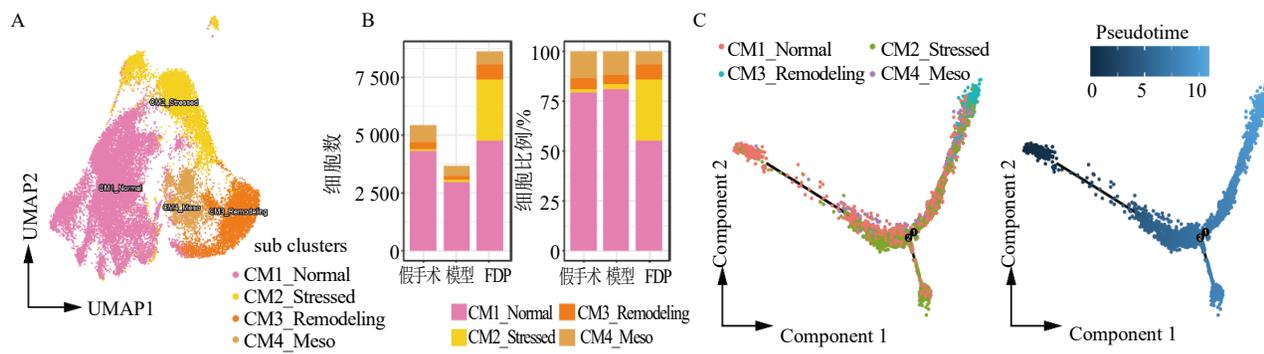
3.3 单细胞心肌亚群分析揭示复方丹参滴丸对心肌细胞的保护机制

基于单细胞数据提取心肌细胞并进行二次聚类。心肌细胞被鉴定为 4 个主要亚群, 分别为稳态心肌细胞 (CM1_Normal)、应激心肌细胞 (CM2_Stressed)、重构型心肌细胞 (CM3_Remodeling) 及间质样心肌细胞 (CM4_Meso) (图 4-A)。细胞数量和比例分析显示, 相较于假手术组, 模型组的心肌细胞绝对数量减少, 而复方丹参滴丸组有效地阻止了这一病理性丢失, 心肌细胞数量恢复。值得注意的是, 在复方丹参滴丸干预组中, CM2_Stressed 亚

群占比超过 25%, 这表明复方丹参滴丸可能挽救部分坏死的心肌细胞, 体现了其心肌细胞保护潜力 (图 4-B)。拟时序分析 (图 4-C) 描绘了心肌细胞在缺血再灌注损伤过程中的命运转变轨迹。损伤驱动 CM1_Normal 亚群沿拟时序方向逐步向 CM2_Stressed 亚群及 CM3_Remodeling 亚群转化, 反映了心肌细胞在损伤条件下重编程的过程。

基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析解析了各亚群的功能特异性, CM1_Normal 亚群主要富集于心肌分化、收缩和发育相关通路, 代表其功能完整性; CM2_Stressed 亚群则与蛋白质合成、翻译及代谢应激相关, 体现了细胞对损伤的急性反应; CM3_Remodeling 亚群富集于有氧呼吸、氧化磷酸化、能量代谢及细胞凋亡通路, 揭示了其在损伤修复和能量重编程中的核心功能; 而 CM4_Meso 亚群则与干细胞发育和间充质特征相关 (图 5-A)。

差异表达基因分析结果 (图 5-B) 表明, 不同组间存在显著的转录组差异。模型组上调差异基因数量最多, 而复方丹参滴丸干预后差异基因数量减少, 表明药物有效纠正了 MIRI 诱导的心肌细胞病理性基因表达谱。针对复方丹参滴丸组与模型组的差异基因通路分析, KEGG 结果 (图 5-C) 显示复方丹参滴丸显著上调了心肌收缩、能量代谢相关通路, 同时下调了自噬、心衰、胰岛素抵抗等病理相关通路; GO 结果 (图 5-D) 进一步证实了复方丹参滴丸对能量代谢、呼吸链相关通路的正向调控作用。



A-心肌细胞的 UMAP 降维图; B-各组心肌细胞亚群的细胞数与比例; C-基于 Monocle2 的拟时序分析。
A-UMAP dimensionality reduction map of cardiomyocytes; B-number and proportion of subgroups of cardiomyocytes in each group; C-pseudotime analysis based on Monocle2.

图 4 复方丹参滴丸作用下 MIRI 小鼠心肌细胞亚群的动态转变

Fig. 4 Dynamic transitions of cardiomyocyte subpopulations in mice with MIRI under Compound Danshen Dropping Pills treatment

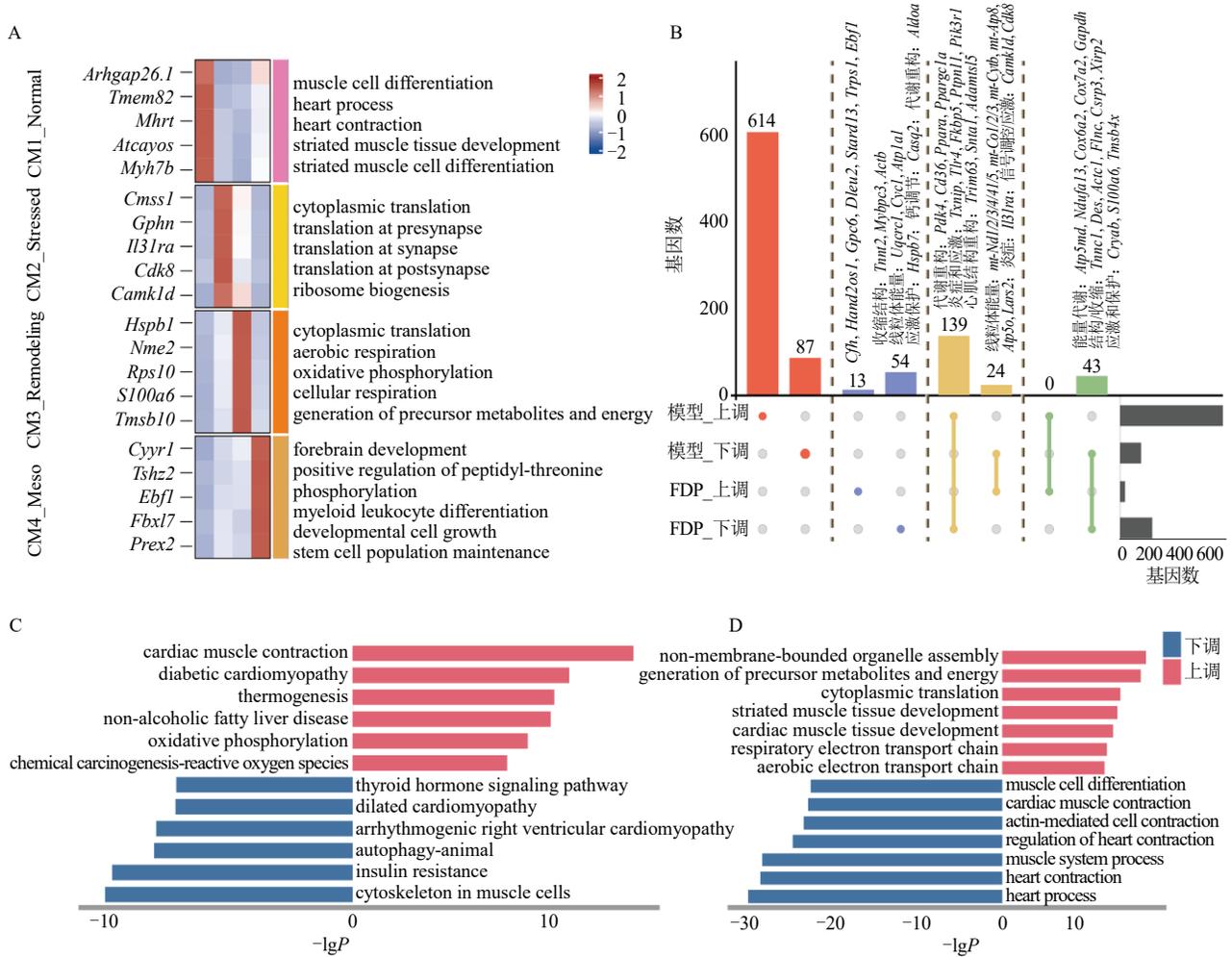


图 5 复方丹参滴丸作用下 MIRI 小鼠心肌细胞亚群的差异转录特征与功能富集分析

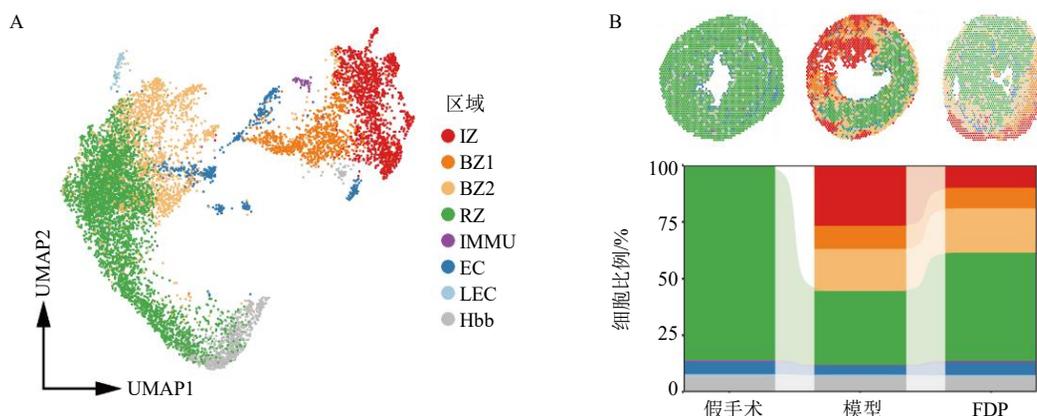
A-各心肌细胞亚群差异表达基因与 GO 功能富集分析; B-各心肌细胞亚群中差异表达基因的数量统计, 其中模型_上调、模型_下调表示模型组相较假手术组的上调、下调基因, FDP_上调、FDP_下调表示复方丹参滴丸组相较模型组的上调、下调基因; C、D-复方丹参滴丸组相较模型组的差异表达基因的 KEGG 与 GO 富集分析。

Fig. 5 Differential transcriptional signatures and functional enrichment analysis of cardiomyocyte subpopulations in mice with MIRI under Compound Danshen Dropping Pills treatment

3.4 空间转录组描绘 MIRI 的空间转录特征与损伤边界关键基因

对假手术组、模型组和复方丹参滴丸组小鼠的心脏组织进行空间转录组测序分析。经严格的质量控制后, 空间转录组测序数据显示, 假手术组、模型组和复方丹参滴丸组的组织区 spot 数分别为 2 237、2 083、2 257, 单点基因检出数中位数分别为 2 040、2 616、3 233, 单点 UMI 计数中位数分别为 10 642、14 670、20 318, reads 映射到基因组的比例分别为 90.1%、

94.5%、98.5%, 最终共保留 6 577 个空间位点用于后续分析。通过 UMAP 聚类, 共得到 8 个主要空间区域, 包括缺血区 (ischemic zone, IZ)、边界区 (border zone, BZ1/BZ2)、远端区 (remote zone, RZ)、免疫细胞富集区 (IMMU)、内皮细胞区 (EC)、淋巴内皮细胞区 (LEC) 及红细胞相关区域 (Hbb) (图 6-A)。各组的比例分析显示, 与模型组比较, 复方丹参滴丸组小鼠心脏 IZ 区域比例减少, 而 RZ 区域比例上升, 提示复方丹参滴丸对 MIRI 小鼠的心肌损伤具有保护作用 (图 6-B)。



A-基于空间转录组的 UMAP 降维结果；B-空间转录组切片图展示上述不同损伤区域在心脏组织中的空间定位特征，下方柱状图对比了假手术组、模型组及复方丹参滴丸组各损伤区域所占比例的变化。

A-UMAP dimensionality reduction results based on spatial transcriptome; B-space transcriptome slices show the spatial localization characteristics of the different injury areas in cardiac tissue, the bar chart below compares the changes in proportion of each injury area in sham group, model group and Compound Danshen Dropping Pills group.

图 6 空间转录组学揭示 MIRI 不同损伤区域的空间划分及复方丹参滴丸干预后的变化

Fig. 6 Spatial transcriptomics reveals spatial division of different injury areas in MIRI and its alteration following Compound Danshen Dropping Pills treatment

空间差异表达热图分析（图 7）揭示了不同空间区域独特的转录谱特征。缺血区中显著上调多种典型的心脏损伤相关基因，主要涉及炎症反应及纤维化过程，包括炎症相关因子 C-C 趋化因子受体 2 (C-C chemokine receptor type 2, *Ccr2*)、C-C 基序趋化因子配体 2 (C-C motif chemokine ligand 2, *Ccl2*) 和 S100 钙结合蛋白 A9 (S100 calcium-binding protein A9, *S100a9*)，纤维化相关因子 I 型胶原 $\alpha 1$ 链 (collagen type I alpha 1 chain, *Col1a1*)、III 型胶原 $\alpha 1$ 链 (collagen type III alpha 1 chain, *Col3a1*)、骨膜蛋白 (periostin, *Postn*) 以及转化生长因子- β 诱导蛋白 (transforming growth factor- β -induced protein, *Tgfb1*)，提示 IZ 区处于强烈的炎症-重构微环境中。远端区则主要高表达与能量代谢、细胞结构维持及基础生理功能相关的稳态基因，整体呈现相对保守的转录特征。

边界区 1 与边界区 2 表现出不同于缺血区和远端区的特异性高表达基因模块，提示该区域在缺血再灌注过程中具有独特的转录响应特征。其中，边界区 1 的转录异质性最为显著，分子响应最为强烈，特征基因包括锚蛋白重复结构域蛋白 1 (ankyrin repeat domain 1, *Ankrd1*)、簇集蛋白 (clusterin, *Clu*)、B 型利钠肽 (B-type natriuretic peptide, *Nppb*) 和 A 型利钠肽 (A-type natriuretic peptide, *Nppa*) 等。表明边界区 1 可能是 MIRI 发生发展过程中的关键调

控区域。

3.5 空间轨迹分析识别 MIRI 边界区的关键特征基因及其对复方丹参滴丸干预的响应

为进一步识别 BZ 的关键基因，基于病理分区，构建了由 IZ 向 BZ 再至 RZ 的空间轨迹推断模型，并对沿轨迹变化的基因表达模式进行了连续性解析。结果显示，多个基因在空间轨迹中呈现出明显的 BZ 区高表达特征，表现为与空间位置高度相关的峰值式表达模式，其中包括 *Ankrd1*、*Nppb*、*Gpx4* 以及 *Pdk4* (图 8-A)。上述基因共同构成 MIRI 边界区的核心转录特征，提示其可能参与心肌应激响应、损伤防御及损伤信号传递等关键生物学过程。

为验证 BZ 区的空间定位与转录表达模式，选择 *Nppb* 与 *Ankrd1* 作为经典的心肌应激与重构标志基因构建空间热图^[9-10]。结果显示，上述基因在 BZ 区域高表达 (图 8-B)。提琴图显示在 BZ1 区域具有最高的整体转录水平 (图 8-C)。同时，模型组中高表达的 *Nppb* 与 *Ankrd1* 在复方丹参滴丸组出现一致下调趋势 (图 8-D)，提示复方丹参滴丸预处理减少了心肌损伤相关的重构信号的过度激活，可能是复方丹参滴丸减轻心肌损伤与重构，并保护心肌细胞免于 MIRI 的潜在机制。

进一步的单细胞转录组学提琴图分析结果 (图 8-E) 显示，与模型组比较，复方丹参滴丸干预显著上调了心肌细胞亚群中 *Ankrd1* 与 *Gpx4* 的表达水

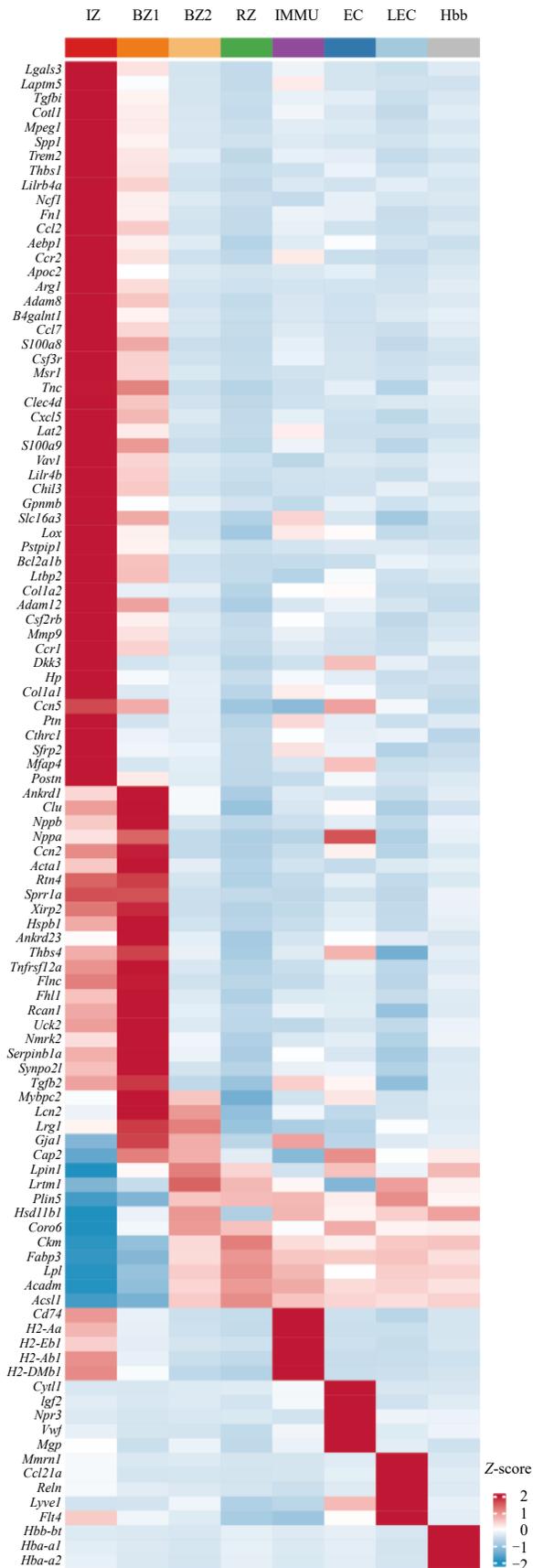


图7 空间转录组学揭示 MIRI 边界特征基因

Fig. 7 Spatial transcriptomics reveals boundary signature genes of MIRI

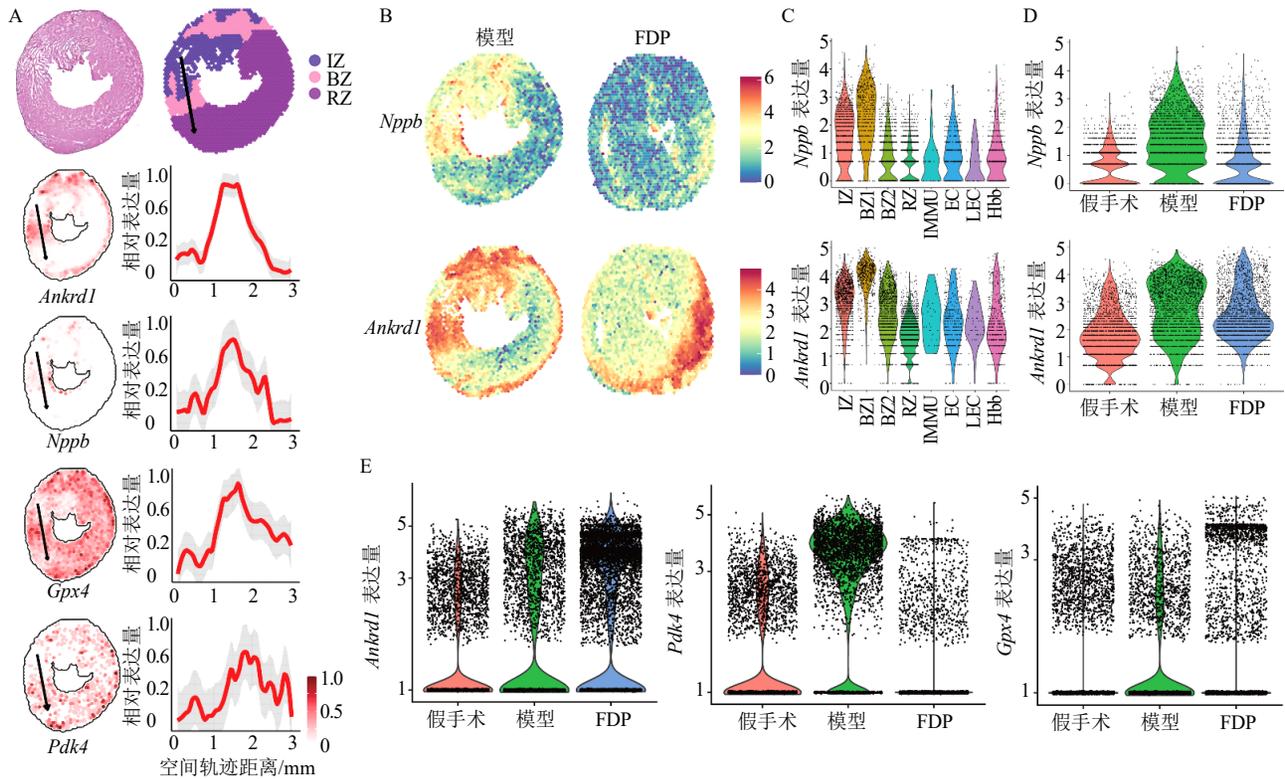
平，并下调了 *Pdk4* 的表达水平。*Ankrd1* 的升高与复方丹参滴丸干预后 CM2_Stressed 亚群比例提高一致，体现了复方丹参滴丸对濒死心肌的挽救作用。*Gpx4* 与 *Pdk4* 的表达变化则提示，复方丹参滴丸可能通过协同调控心肌细胞的代谢重编程及铁死亡相关通路，参与改善缺血再灌注后心脏损伤过程。

3.6 复方丹参滴丸通过调控 NR3C1、PDK4、ACSL4 和 GPX4 蛋白的表达改善小鼠 MIRI

如图 9 所示，与假手术组比较，模型组小鼠心脏组织中促铁死亡蛋白 NR3C1、PDK4、ACSL4 的表达水平均显著升高 ($P < 0.05$)，而抑制铁死亡蛋白 GPX4 的表达则显著降低 ($P < 0.05$)；与模型组比较，复方丹参滴丸中、高剂量组 ACSL4 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)，复方丹参滴丸各剂量组 NR3C1 和 PDK4 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)，GPX4 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)，表明复方丹参滴丸可能通过上调关键的抑制铁死亡蛋白 GPX4 表达，并抑制 NR3C1、PDK4 和 ACSL4 等促铁死亡蛋白的表达，从而有效减轻小鼠 MIRI 后的心肌铁死亡损伤。

4 讨论

心脏再灌注治疗导致的 MIRI 一直是心血管疾病领域的研究热点和难点，其发生发展的病理生理机制复杂。基于空间转录组学与单细胞转录组学，得以从时空观察不同损伤区域的转录组学特征，明确不同空间区域在 MIRI 损伤反应中的差异性角色，识别出损伤边界区域特征性基因，这些基因与代谢、重构、细胞程序性死亡紧密相关，是 MIRI 潜在的关键调控基因。本研究发现，复方丹参滴丸能显著改善 MIRI 小鼠的心肌损伤，其作用可能基于复方丹参滴丸促进心肌细胞能量稳态恢复并抑制铁死亡。缺血条件下，心肌细胞氧化磷酸化受限并转向以糖酵解为主的供能方式^[11]，PDK4 通过抑制丙酮酸氧化，促进糖酵解与乳酸生成，在缺血期发挥一定代偿作用^[12]。然而，再灌注后 PDK4 未能及时恢复稳态水平，阻碍线粒体功能重建，导致氧化磷酸化受抑、乳酸蓄积及氧化应激加剧，从而推动心肌代谢失衡^[13]。NR3C1 作为 PDK4 的关键转录调控因子，可以上调 PDK4 表达^[14]。研究表明，通过下调 NR3C1 的磷酸化水平并抑制 PDK4 活性，可抑制糖酵解通路的异常激活，减少乳酸生成，从而改善 MIRI 后的线粒体功能障碍^[15]。基于上述研究并结合本研究结果，推测复方丹参滴丸可能通过调



A-基于心脏病理切片对心肌组织进行空间分区，划分为缺血区（IZ）、边界区（BZ）和远端区（RZ），并沿损伤梯度构建空间轨迹；B-代表性特征基因 *Nppb* 与 *Ankrd1* 在模型组与复方丹参滴丸组心脏切片中的空间表达热图，显示其在边界区呈现显著的空间富集特征；C-不同空间损伤区域（IZ、BZ、RZ）中 *Nppb* 与 *Ankrd1* 的表达分布提琴图，定量展示其区域特异性的转录表达差异；D-假手术组、模型组及复方丹参滴丸组 *Nppb* 与 *Ankrd1* 的表达水平比较；E-单细胞转录组数据中心肌细胞中 *Ankrd1*、*Nppb*、*Gpx4* 与 *Pdk4* 的表达分布提琴图，用于验证上述关键特征基因在心肌细胞中的表达特征及其对复方丹参滴丸干预的响应。

A-myocardial tissue is spatially partitioned into ischemic zone (IZ), boundary zone (BZ) and distal zone (RZ) based on cardiac pathology slices, and a spatial trajectory is constructed along the injury gradient; B-spatial expression heatmaps of representative feature genes *Nppb* and *Ankrd1* in heart slices of model group and Compound Danshen Dropping Pills group show significant spatial enrichment features in boundary region; C-violin plot of expression distribution of *Nppb* and *Ankrd1* in different spatial damage areas (IZ, BZ, RZ), quantitatively demonstrating their region specific transcriptional expression differences; D-comparison of expression levels of *Nppb* and *Ankrd1* in sham group, model group and Compound Danshen Dropping Pills group; E-violin plot of expression distribution of *Ankrd1*, *Nppb*, *Gpx4* and *Pdk4* in cardiomyocytes in single-cell transcriptome data center was used to verify the expression characteristics of key feature genes in cardiomyocytes and their response to the intervention of Compound Danshen Dropping Pills.

图 8 空间联合单细胞转录组学揭示 MIRI 边界区关键特征基因及其在复方丹参滴丸作用下的表达特征

Fig. 8 Integrated spatial and single-cell transcriptomics reveal key boundary-zone signature genes of MIRI and their expression patterns under Compound Danshen Dropping Pills treatment

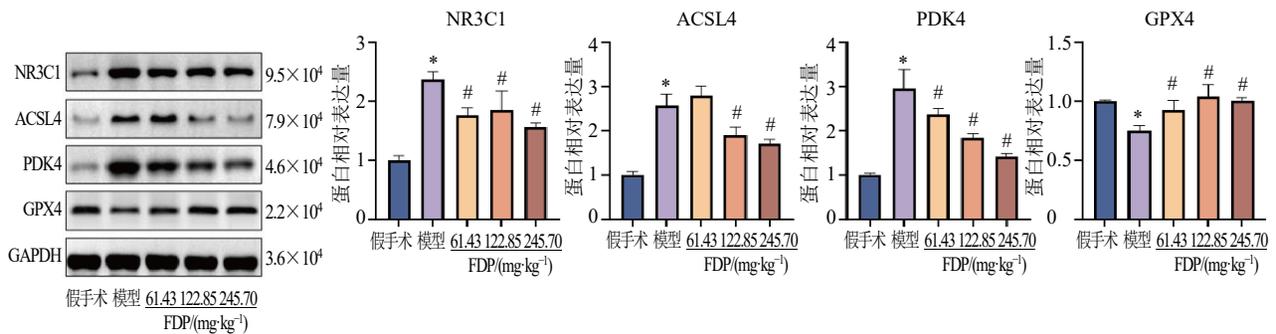


图 9 复方丹参滴丸对 MIRI 小鼠心脏组织中 NR3C1、PDK4、ACSL4 和 GPX4 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 9 Effect of Compound Danshen Dropping Pills on protein expressions of NR3C1, PDK4, ACSL4 and GPX4 in cardiac tissue of MIRI mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

控 NR3C1 与 PDK4, 改善 MIRI 诱导的心肌代谢紊乱, 进而发挥心肌保护作用。

在此过程中, 心肌细胞线粒体功能障碍诱导的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 过量生成与脂质代谢失衡, 进一步激活铁死亡通路, 加重心肌细胞损伤^[16]。铁死亡是一种以铁依赖性脂质过氧化物致死性积累为主要特征的程序性细胞死亡^[17]。研究表明, 其主要发生在心肌再灌注期而非缺血期, 是心肌缺血再灌注早期心肌细胞死亡的主要形式^[18], 在 MIRI 过程中发挥重要的调控作用^[19]。ACSL4 促进多不饱和脂肪酸脂质过氧化物生成^[20], 而 GPX4 清除脂质过氧化物、维持膜稳定^[17]。PDK4 的持续高表达可间接推动 ACSL4 上调和 GPX4 下调, 加速铁死亡过程并加重心肌细胞损伤。单细胞-空间转录组联合分析结果显示, *Gpx4* 与 *Pdk4* 是 MIRI 损伤边界区域呈现显著的空间特异性表达特征, 是该区域潜在的关键调控分子。结果进一步表明, 复方丹参滴丸干预可抑制 PDK4 蛋白的表达并上调 GPX4 蛋白水平, 提示其可能通过改善损伤边界区的代谢与氧化还原稳态, 调节铁死亡关键分子的表达, 从而发挥心肌保护作用。

既往研究表明, BZ 具有不同于 IZ 与 RZ 的独特转录程序, 提示边界区在 MIRI 中存在相对独立的分子响应特征^[10,21]。本研究进一步揭示 MIRI 损伤边界区的特异性转录基因模块, 其特征基因广泛涉及心肌应激与机械负荷响应、蛋白稳态维持、代谢与氧化还原调控以及促纤维化信号通路。BZ1 可能构成 MIRI 发生发展过程中的关键调控枢纽, 是 MIRI 治疗最具潜力的靶向区域。本研究选择再灌注后 24 h 作为观察时间点, 考虑到小鼠个体间代谢差异, 为获得相对稳定的血药浓度, 采用了预给药设计。既往研究已证实, 预给药策略在 MIRI 模型中可发挥显著的心脏保护作用^[22-23], 因而被广泛应用于相关机制探索。然而, 该实验设计与急性心肌梗死的临床救治流程仍存在差异, 其临床转化意义尚需在后续研究中进一步验证。

综上, 本研究证明复方丹参滴丸能够显著改善 MIRI 小鼠的心肌损伤, 其保护机制可能在于改善心肌细胞代谢, 同时调控铁死亡相关分子, 改善心肌再灌注早期由铁死亡主导的细胞程序性死亡。本研究为复方丹参滴丸的临床应用提供了更深层次的分子药理学依据, 是未来防治 MIRI 极具前景的治疗策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Martin S S, Aday A W, Allen N B, *et al.* 2025 heart disease and stroke statistics: A report of US and global data from the American heart association [J]. *Circulation*, 2025, 151(8): e41-e660.
- [2] 国家心血管病中心, 中国心血管健康与疾病报告编写组, 胡盛寿. 中国心血管健康与疾病报告 2023 概要 [J]. *中国循环杂志*, 2024, 39(7): 625-660.
- [3] Zhang Y, Li H, Chu J H, *et al.* Trends and projections of burden of ischemic heart disease in China versus other G20 countries: A comparative study based on the 2021 global burden of disease database [J]. *Glob Heart*, 2025, 20(1): 37.
- [4] Zhang S, Yan F, Luan F, *et al.* The pathological mechanisms and potential therapeutic drugs for myocardial ischemia reperfusion injury [J]. *Phytomedicine*, 2024, 129: 155649.
- [5] 程碧伟, 易雨萌, 刘强, 等. 复方丹参滴丸联合化学药物治疗冠心病经皮冠状动脉介入术后的 Meta 分析 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(3): 617-631.
- [6] 《复方丹参滴丸临床应用专家共识》编写项目组. 复方丹参滴丸临床应用专家共识 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2025, 45(5): 517-525.
- [7] 曹博雅, 陈家黎, 石晓溪, 等. 复方丹参滴丸调控 LOX-NF- κ B 炎症途径治疗心肌缺血的机制研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(1): 151-159.
- [8] Lu R X, Sun W H, Lin W Y, *et al.* Fufang Danshen Pill improves mitochondrial homeostasis by regulating the S100a9/TLR4 axis to alleviate myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Phytomedicine*, 2025, 148: 157433.
- [9] Xu X S, Wang X X, Li Y, *et al.* Research progress of ankyrin repeat domain 1 protein: An updated review [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2024, 29(1): 131.
- [10] van Duijvenboden K, de Bakker D E M, Man J C K, *et al.* Conserved NPPB⁺ border zone switches from MEF2- to AP-1-driven gene program [J]. *Circulation*, 2019, 140(10): 864-879.
- [11] Zuurbier C J, Bertrand L, Beauloye C R, *et al.* Cardiac metabolism as a driver and therapeutic target of myocardial infarction [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(11): 5937-5954.
- [12] Wang X X, Shen X Y, Yan Y T, *et al.* Pyruvate dehydrogenase kinases (PDKs): An overview toward clinical applications [J]. *Biosci Rep*, 2021, 41(4): BSR20204402.
- [13] Li T T, Xu J, Qin X H, *et al.* Glucose oxidation positively regulates glucose uptake and improves cardiac function

- recovery after myocardial reperfusion [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2017, 313(5): E577-E585.
- [14] Connaughton S, Chowdhury F, Attia R R, *et al.* Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoform 4 (PDK4) gene expression by glucocorticoids and insulin [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 315(1/2): 159-167.
- [15] She H, Hu Y, Zhao G Z, *et al.* Dexmedetomidine ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting MDH2 lactylation via regulating metabolic reprogramming [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(48): 2409499.
- [16] Zhang T T, Han Y, Wang Y C, *et al.* The interaction between ferroptosis and myocardial ischemia-reperfusion injury: Molecular mechanisms and potential therapeutic targets [J]. *Eur J Med Res*, 2025, 30(1): 643.
- [17] Stockwell B R, Friedmann Angeli J P, Bayir H, *et al.* Ferroptosis: A regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. *Cell*, 2017, 171(2): 273-285.
- [18] Tang L J, Luo X J, Tu H, *et al.* Ferroptosis occurs in phase of reperfusion but not ischemia in rat heart following ischemia or ischemia/reperfusion [J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2021, 394(2): 401-410.
- [19] Zhao W K, Zhou Y, Xu T T, *et al.* Ferroptosis: Opportunities and challenges in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 9929687.
- [20] Doll S, Proneth B, Tyurina Y Y, *et al.* ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition [J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1): 91-98.
- [21] Yao L Y, He F N, Zhao Q Y, *et al.* Spatial multiplexed protein profiling of cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. *Circ Res*, 2023, 133(1): 86-103.
- [22] Wu X X, Liu L, Zheng Q L, *et al.* Dihydropantothine I preconditions myocardium against ischemic injury via PKM2 glutathionylation sensitive to ROS [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13(1): 113-127.
- [23] Liu H Q, Liu W, Qiu H L, *et al.* Salvianolic acid B protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury in rats via inhibiting high mobility group box 1 protein expression through the PI3K/Akt signalling pathway [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2020, 393(8): 1527-1539.

[责任编辑 李亚楠]