

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.02.003

芪丹通脉片对阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠 lncRNA XIST 表达的影响*

薛松妍¹ 薛强² 余楠楠¹ 王雪颖¹ 王睿琪¹ 马静^{1Δ}

(1 空军军医大学第一附属医院中医科 陕西 西安 710032; 2 空军军医大学第一附属医院心内科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探究芪丹通脉片(QDTM)对阿霉素诱导扩张型心肌病(DCM)大鼠的治疗作用及其对长链非编码 RNA(lncRNA) X-无活性特异性转录物(XIST)表达的影响。**方法:**将大鼠分为 Con 组($n=12$)、DCM 组($n=13$)、L-QDTM 组($n=13$)、M-QDTM 组($n=13$)、H-QDTM 组($n=13$)。Con 组大鼠为正常对照大鼠,其他组大鼠均为阿霉素诱导的扩张型心肌病模型大鼠。Con 组和 DCM 组大鼠灌胃生理盐水,L-QDTM 组、M-QDTM 组和 H-QDTM 组大鼠分别灌胃 500、1000 和 2000 mg/kg/d 的芪丹通脉片浸膏干粉,每日给药 1 次,共 4 周。治疗结束后,分别检测各组大鼠的心功能参数,血清心肌损伤指标和心肌组织氧化应激指标。通过心肌组织苏木素伊红(HE)染色、Masson 三色染色和 TUNEL 染色观察心肌形态变化、纤维化和细胞凋亡情况。通过 RT-qPCR 检测心肌组织中 XIST、collagen I、collagen III、TGF- β 1、Bax 和 Bcl-2 的转录水平。**结果:**与 Con 组比较,DCM 组大鼠的左室射血分数(LVEF)和左室短轴缩短率(FS)降低,左室舒张末期内径(LVIDd)和左室收缩末期内径(LVIDs)升高,乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)和心肌肌钙蛋白 I(cTnI)升高;心肌出现明显损伤,纤维化面积升高;collagen I、collagen III 和 TGF- β 1 的 mRNA 水平均升高,TUNEL 阳性率升高;Bax mRNA 水平升高,Bcl-2 mRNA 水平降低,超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)水平降低,丙二醛(MDA)水平升高,XIST 水平升高(均 $P<0.05$)。与 DCM 组比较,L-QDTM 组、M-QDTM 组和 H-QDTM 组的 LVEF 和 FS 均升高,LVIDd 和 LVIDs 均降低,LDH、CK 和 cTnI 均降低;心肌损伤减轻,纤维化面积降低;collagen I、collagen III 和 TGF- β 1 的 mRNA 水平均降低,TUNEL 阳性率降低;Bax mRNA 水平降低,Bcl-2 mRNA 水平升高,SOD 和 CAT 水平升高,MDA 水平均降低,XIST 水平降低(均 $P<0.05$)。**结论:**本研究表明芪丹通脉片在治疗阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠中效果显著,其机制可能与抑制 lncRNA XIST 有关。

关键词:芪丹通脉片;阿霉素;扩张型心肌病;lncRNA XIST;细胞凋亡;纤维化

中图分类号:R-33;R542.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)02-211-08

Effect of Qidantongmai Tablet on lncRNA XIST Expression in Rats with Adriamycin Induced Dilated Cardiomyopathy*

XUE Song-yan¹, XUE Qiang², YU Nan-nan¹, WANG Xue-ying¹, WANG Rui-qi¹, MA Jing^{1Δ}

(1 Department of Traditional Chinese Medicine, The First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 2 Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the therapeutic effect of Qidantongmai tablet (QDTM) on adriamycin-induced dilated cardiomyopathy (DCM) in rats and its effect on the expression of long non-coding RNA (lncRNA) X-inactive specific transcript (XIST). **Methods:** Rats were divided into Con group ($n=12$), DCM group ($n=13$), L-QDTM group ($n=13$), M-QDTM group ($n=13$), and H-QDTM group ($n=13$). Rats in Con group rats were normal control, and rats in other groups were doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy model rats. Rats in Con group and DCM group were given normal saline, rats in L-QDTM group, M-QDTM group and H-QDTM group were given QDTM extractum powder of 500, 1000 and 2000 mg/kg/d, respectively. The rats of each group were given the drug once a day for 4 weeks. After treatment, The cardiac function parameters, serum myocardial injury indexes and myocardium tissue oxidative stress indicators of each group were detected, respectively. Myocardial morphology, fibrosis and apoptosis were observed by hematoxylin eosin (HE), Masson tricolor and TUNEL staining. The transcription levels of XIST, collagen I, collagen III, TGF- β 1, Bax and Bcl-2 in myocardial tissue were detected by RT-qPCR. **Results:** Compared with Con group, left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular short-axis shortening rate (FS) in DCM group decreased, left ventricular end-diastolic diameter (LVIDd) and left ventricular end-systolic diameter (LVIDs) increased, lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK) and cardiac troponin I (cTnI) increased, myocardial injury was obvious, fibrosis area increased, collagen I, collagen III and TGF- β 1 mRNA levels increased, TUNEL positive rate

* 基金项目: 陕西省中医药管理局科研立项课题 (2021-ZZ-JC015); 西安交通大学机械制造系统工程国家重点实验室开放课题 (sklms2021013)

作者简介:薛松妍(1983-),女,硕士研究生,主治医师,主要研究方向:中西医结合治疗心血管疾病,E-mail: XueSoYa20JD@163.com

Δ 通讯作者:马静(1966-),女,博士研究生,博士生导师,教授,主任医师,主要研究方向:中西医结合治疗心血管疾病的基础与临床研究,

E-mail: jingma@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2023-07-19 接受日期:2023-08-16)

increased, Bax mRNA level increased, Bcl-2 mRNA level decreased, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) levels decreased, malondialdehyde (MDA) level increased, and XIST level increased (all $P < 0.05$). Compared with DCM group, LVEF and FS in L-QDTM group, M-QDTM group and H-QDTM group increased, LVIDd and LVIDs decreased, LDH, CK and cTnI decreased, myocardial injury was alleviated, fibrosis area decreased, collagen I, collagen III and TGF- β 1 mRNA levels decreased, TUNEL positive rate decreased, Bax mRNA level decreased, Bcl-2 mRNA level increased, SOD and CAT levels increased, MDA level decreased, and XIST level decreased (all $P < 0.05$). **Conclusion:** This study indicates that Qidantongmai tablet is effective in the treatment of doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy in rats, and the mechanism may be related to the inhibition of lncRNA XIST.

Key words: Qidantongmai tablet; Adriamycin; Dilated cardiomyopathy; LncRNA XIST; Apoptosis; Fibrosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R542.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)02-211-08

前言

扩张型心肌病(Dilated cardiomyopathy, DCM)是一种常见的心肌疾病,主要表现为心室扩大、心室收缩功能减退,约占心力衰竭主要发病原因的三分之一^[1]。扩张型心肌病的猝死率高,病因不明,临床缺少针对性治疗方法。芪丹通脉片(Qidantongmai tablet, QDTM)是一种治疗缺血性心脏病的常用药物,在治疗冠心病心绞痛方面疗效显著,主要成分包括黄芪、丹参和当归等,具有益气活血,通脉止痛等功效,但芪丹通脉片治疗扩张型心肌病的疗效尚不明确。长链非编码 RNA(lncRNA)是指长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA, lncRNA 参与调控细胞周期、转录、转录后修饰、表观遗传学和细胞内运输等各种关键分子过程^[2]。lncRNA 在扩张型心肌病的发病机制中发挥重要作用,参与调节心室肥厚、收缩功能障碍等病理表现,因此, lncRNA 可能是治疗扩张型心肌病的新方向^[3-4]。X- 无活性特异性转录物(X-inactive specific transcript, XIST)是一种 lncRNA, 先前的研究表明, XIST 调节 X 染色体失活, 可导致女性细胞发育过程中一条 X 染色体的遗传沉默。XIST 已被证明参与多种肿瘤的发生, 包括乳腺癌、脑瘤、白血病、肺癌、乳腺癌和肝癌等^[5]。XIST 还参与调节肺纤维化、炎症、神经性疼痛、心肌细胞肥大和骨关节炎等疾病的发展^[6]。最新研究表明, lncRNA XIST 与扩张型心肌病、缺血性心脏病的发生发展密切相关^[6,7]。为了揭示芪丹通脉片治疗扩张型心肌病的效果及其可能的分子机制, 本研究探讨了芪丹通脉片治疗阿霉素诱导的扩张型心肌病大鼠模型的效果, 并分析了其对 lncRNA XIST 表达的影响。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验试剂 芪丹通脉片(批准文号: 国药准字 Z20090252)购自山西太行药业股份有限公司。阿霉素(批准文号: 国药准字 H44024359)购自深圳万乐药业有限公司。乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)(货号: A020-1-2)、肌酸激酶(Creatine kinase, CK)(货号: A032-1-1)和心肌肌钙蛋白 I(Cardiac troponin I, cTnI)(货号: E019-1-1)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。苏木素伊红(Hematoxylin-eosin staining, HE)染色试剂盒(货号: G1120)、Masson 三色染色试剂盒(货号: G1340)、SF594 TUNEL 细胞凋亡试剂盒(红色荧光)(货号: T2195)购自北京索莱宝科技有限公司。超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)(货号: S0101S)、过氧化氢酶(Cata-

lase, CAT)(货号: S0051)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)(货号: S0131S)、Trizol(货号: R0016)试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。PrimerScript RT 试剂盒(货号: RR047A)、SYBR Green Master Kit(货号: QPK-201)购自日本 TaKaRa 公司。

1.1.2 实验动物 SPF 级 7~8 周龄雄性 SD 大鼠(体重 260~320 g)购自陕西中医药大学[生产许可证: SCXK(陕)2021-001], 大鼠均在屏障环境中饲养(24~26℃, 湿度 50~60%, 12 h 循环照明)。

1.2 方法

1.2.1 阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠模型 参考文献^[8]建立阿霉素诱导的扩张型心肌病大鼠模型, 阿霉素用生理盐水配成 1 mg/mL 的溶液, 对 60 只大鼠腹腔注射剂量为 2.5 mg/kg/ 周的阿霉素溶液, 每周注射 1 次, 共注射 6 周。末次注射阿霉素溶液 4 周后行超声检查, 判定造模成功与否。本研究中共有 54 只大鼠建模成功, 建模成功率为 90%, 跟国内外权威文献报道的成功率基本一致。随机选择 52 只入组实验。

1.2.2 动物分组和给药处理 将大鼠分为 Con 组($n=12$)、DCM 组($n=13$)、L-QDTM 组($n=13$)、M-QDTM 组($n=13$)、H-QDTM 组($n=13$)。Con 组和 DCM 组大鼠灌胃 2 mL 生理盐水, L-QDTM 组、M-QDTM 组和 H-QDTM 组大鼠分别灌胃 2 mL 的剂量为 500、1000 和 2000 mg/kg/d 的芪丹通脉片浸膏干粉(生理盐水配置), 均为每日给药 1 次, 共给药 4 周。参考文献^[9,10]设置芪丹通脉片给药剂量。

1.2.3 心功能参数测定 末次灌胃芪丹通脉片 24 h 后, 使用 VisualSonics VIVO 3100 小动物超声影像系统检测大鼠左室射血分数(Left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室舒张末期内径(Left ventricular end diastolic diameter, LVIDd)、左室收缩末期内径(Left ventricular end systolic diameter, LVIDs)和左室短轴缩短率(Fractional shortening, FS)。

1.2.4 血清心肌损伤指标检测 末次灌胃芪丹通脉片 24 h 后, 采集大鼠腹主动脉血, 离心取血清(4℃, 3000 r/min, 10 min)。按照试剂盒说明, 通过比色法检测 LDH 和 CK, 通过增强免疫比浊法检测 cTnI。

1.2.5 心肌组织学染色检测 异氟醚吸入麻醉并处死大鼠, 分离心脏, 4%多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 使用切片机制取 4 μ m 厚的切片, 按照试剂盒说明书进行 HE 染色、Masson 三色染色和 TUNEL 染色, 显微镜下观察心肌形态变化、纤维化程度和 TUNEL 阳性细胞。

1.2.6 心肌组织氧化应激指标检测 将心肌组织与样品制备

液混合,匀浆器研磨,离心取上清(4℃,12000 r/min,5 min)。按照试剂盒说明,通过 WST-8 法检测 SOD,通过紫外分光光度计法检测 CAT,通过硫代巴比妥酸法检测 MDA。

1.2.7 RT-qPCR 检测 mRNA 表达水平 心肌组织总 RNA 使用 TRIzol 试剂提取,获得的总 RNA 纯度和浓度使用 NanoDrop2000 分光光度计进行检测。逆转录方法严格按照 PrimeScript RT 试剂盒方法进行。然后在 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪上使用 SYBR Green Master Kit 进行 PCR 扩增。扩增程序如下:95℃ 5 min,95℃ 30 s,62℃ 20 s,72℃ 30 s,40 个循环。GAPDH 作为内参基因,采用 2^{-ΔΔCt} 方法计算 mRNA 相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

Gene	Sequence (5'-3')
XIST	F: 5'-CCCTCCACATACCTCAGT-3' R: 5'-ACATAATCACACGCATACCA-3'
collagen I	F: 5'- TGGTCTTGGAGGAACTTTGC-3' R: 5'-CTGTGTCCTTCATTCCGG-3'
collagen III	F: 5'-ACCTGAAATTCTGCCACCCT-3' R: 5'-GCCTTGAATTCTCCCTCATTG-3'
TGF-β1	F: 5'-TGCGCTGCAGAGATTCAAG-3' R: 5'-AGGTAACGCAGGAATTGTTGCTA-3'
Bax	F: 5'-GGTCCCGAAGTAGGAAAGGA-3' R: 5'-GAATTGGCGATGAACTGGAC-3'
Bcl-2	F: 5'-GACGGTAGCGACGAGAGAAAG-3' R: 5'-ATAACCGGGAGATCGTGATG-3'
GAPDH	F: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' R: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'

1.3 统计学分析

使用 SPSS21.0 软件分析数据,采用 t 检验进行两组间差

表 2 芪丹通脉片对阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠心功能参数的影响

Table 2 Effects of QDTM on cardiac function parameters in rats with adriamycin induced dilated cardiomyopathy

Groups	LVEF(%)	LVIDd (mm)	LVIDs (mm)	FS (%)
Con	89.26±4.47	4.52±0.47	2.30±0.26	48.28±9.56
DCM	65.83±1.76 *	6.37±0.26 *	3.55±0.30 *	44.12±5.98 *
L-QDTM	70.58±3.69 **	6.09±0.32 **	3.23±0.30 **	46.73±6.20 **
M-QDTM	74.04±4.40 ** ^Δ	5.50±0.39 ** ^Δ	2.78±0.26 ** ^Δ	49.27±5.60 ** ^Δ
H-QDTM	78.95±2.95 ** ^Δ ^Δ	5.11±0.33 ** ^Δ ^Δ	2.52±0.23 ** ^Δ ^Δ	50.43±6.21 ** ^Δ ^Δ
F	77.696	36.790	58.515	4.146
P	<0.001	<0.001	<0.001	0.005

Note: Compared with Con group, *P<0.05; Compared with DCM group, #P<0.05; Compared with L-QDTM group, ΔP<0.05; Compared with M-QDTM group, Δ P<0.05.

2.4 芪丹通脉片对阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠心肌纤维化的影响

各组大鼠心肌纤维化面积差异有统计学意义(F=182.203, P<0.001)。与 Con 组比较,DCM 组大鼠的心肌纤维化面积升高

异比较,采用单因素方差分析进行组间差异比较,采用 LSD 检验进行事后比较。显著性水平为 P<0.05。

2 结果

2.1 芪丹通脉片对阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠一般状态和心功能参数的影响

Con 组大鼠的一般状态良好,无明显外观和行为异常。DCM 组出现消瘦、毛色发黄、脱毛、水肿等外观异常,并出现进食进水减少、精神萎靡、反应迟钝、站立行走不稳等行为异常。与 DCM 组比较,L-QDTM 组、M-QDTM 组和 H-QDTM 组大鼠的一般状态呈芪丹通脉片剂量依赖性明显改善。各组大鼠心功能参数差异有统计学意义(P<0.05)。与 Con 组比较,DCM 组大鼠的 LVEF 和 FS 降低,LVIDd 和 LVIDs 升高 (P<0.05)。与 DCM 组比较,L-QDTM 组、M-QDTM 组和 H-QDTM 组大鼠的 LVEF 和 FS 呈芪丹通脉片剂量依赖性升高,LVIDd 和 LVIDs 呈芪丹通脉片剂量依赖性降低(P<0.05)。见表 2。

2.2 芪丹通脉片对阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠血清心肌损伤指标的影响

各组大鼠血清心肌损伤指标差异有统计学意义(P<0.001)。与 Con 组比较,DCM 组大鼠的 LDH、CK 和 cTnI 升高 (P<0.05)。与 DCM 组比较,L-QDTM 组、M-QDTM 组和 H-QDTM 组大鼠的 LDH、CK 和 cTnI 呈芪丹通脉片剂量依赖性降低(P<0.05)。见表 3。

2.3 芪丹通脉片对阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠心肌组织形态的影响

Con 组大鼠心肌组织形态正常,DCM 组大鼠心肌纤维排列不规则,间隙增宽,部分断裂,肌细胞变形肿胀,伴有炎性细胞浸润。与 DCM 组比较,L-QDTM 组、M-QDTM 组和 H-QDTM 组大鼠的心肌组织形态呈芪丹通脉片剂量依赖性良好改善。见图 1。

(P<0.05)。与 DCM 组比较,L-QDTM 组、M-QDTM 组和 H-QDTM 组大鼠的心肌纤维化面积呈芪丹通脉片剂量依赖性降低(P<0.05)。见图 2。

各组大鼠心肌 collagen I、collagen III 和 TGF-β1 对的

表 3 芪丹通脉片对阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠血清心肌损伤指标的影响

Table 3 Effects of QDTM on serum myocardial damage indexes in rats with adriamycin induced dilated cardiomyopathy

Groups	LDH (U/L)	CK (U/L)	cTnI (pg/mL)
Con	1006.34±82.75	1138.66±96.84	99.12±3.29
DCM	2987.26±202.07 *	2707.96±183.39 *	262.96±16.22 *
L-QDTM	2296.49±152.04 *#	2159.55±145.05 *#	214.47±20.88 *#
M-QDTM	1924.64±167.60 *#&	1523.69±223.29 *#&	175.61±17.37 *#&
H-QDTM	1365.61±106.52 *#&△	1256.02±130.31 *#&△	144.37±12.82 *#&△
<i>F</i>	104.355	167.261	280.459
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compared with Con group, **P*<0.05; Compared with DCM group, #*P*<0.05; Compared with L-QDTM group, &*P*<0.05; Compared with M-QDTM group, △*P*<0.05.

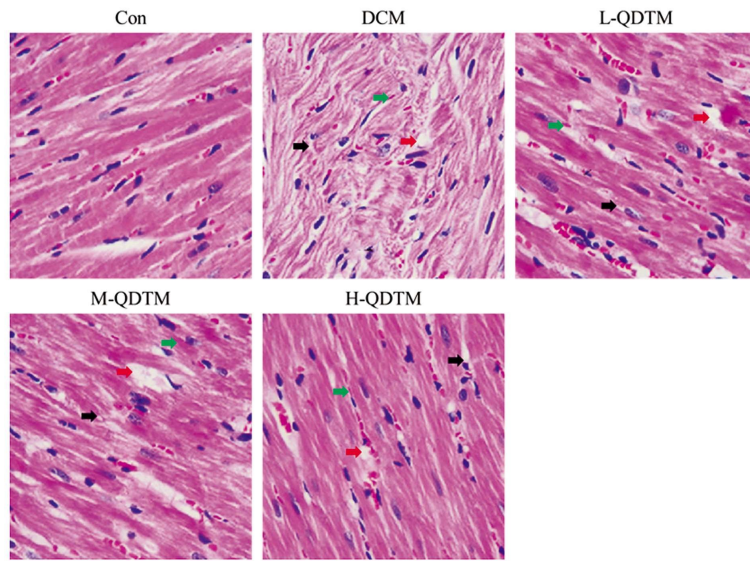


图 1 芪丹通脉片对阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠心肌组织形态的影响

Fig. 1 Effect of QDTM on myocardium morphology in rats with adriamycin induced dilated cardiomyopathy

Note: Myocardial tissue morphology was detected by HE staining (×200); Black arrow: broken muscle fibers; Red arrow: cell vacuolation; Green arrow: myocyte deformation.

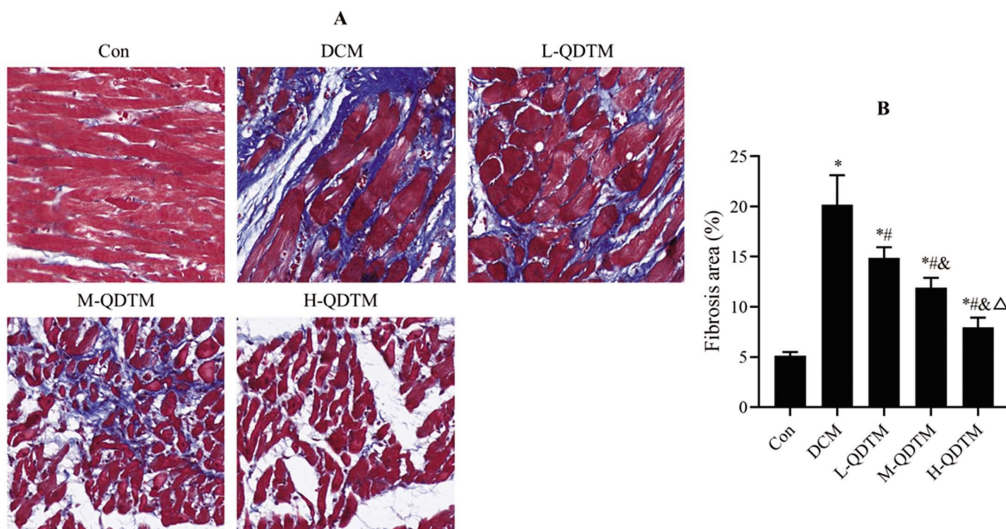


图 2 芪丹通脉片对阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠心肌纤维化的影响

Fig. 2 Effect of QDTM on myocardial fibrosis in rats with adriamycin induced dilated cardiomyopathy

Note: A: Masson three-color dyeing image (×200); B: fibrosis area percentage; Compared with Con group, **P*<0.05; Compared with DCM group, #*P*<0.05; Compared with L-QDTM group, &*P*<0.05; Compared with M-QDTM group, △*P*<0.05

mRNA 水平差异有统计学意义 ($F=375.845, P<0.001; F=625.309, P<0.001; F=869.027, P<0.001$)。与 Con 组比较,DCM 组大鼠心肌组织中 collagen I、collagen III 和 TGF- β 1 的 mRNA 水平均升高 ($P<0.05$)。与 DCM 组比较,L-QDTM 组、M-QDTM 组和 H-QDTM 组心肌组织中 collagen I、collagen III 和 TGF- β 1 的 mRNA 水平呈芪丹通脉片剂量依赖性降低 ($P<0.05$)。见图 3。

2.5 芪丹通脉片对阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠心肌细胞凋

亡的影响

各组大鼠心肌 TUNEL 阳性率差异有统计学意义 ($F=628.027, P<0.001$)。与 Con 组比较,DCM 组大鼠心肌细胞 TUNEL 阳性率升高 ($P<0.05$)。与 DCM 组比较,L-QDTM 组、M-QDTM 组和 H-QDTM 组大鼠心肌细胞 TUNEL 阳性率呈芪丹通脉片剂量依赖性降低 ($P<0.05$)。见图 4。

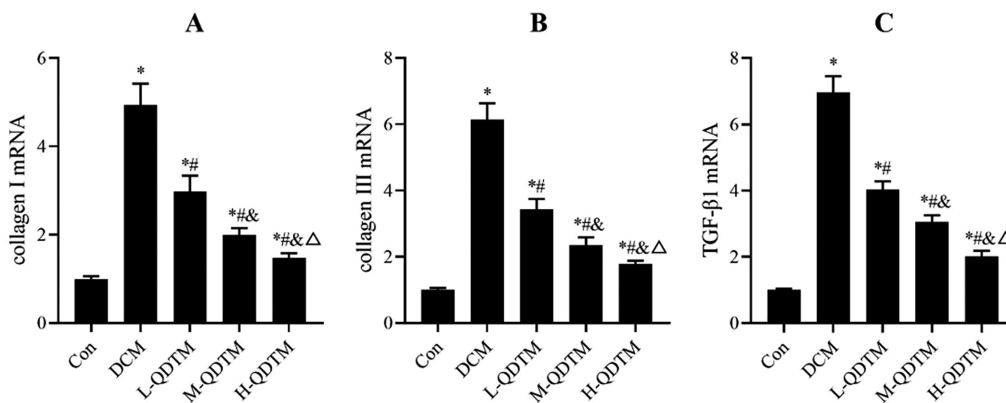


图3 芪丹通脉片对阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠心肌组织 collagen I、collagen III 和 TGF- β 1 转录的影响

Fig. 3 Effects of QDTM on the transcription of collagen I, collagen III and TGF- β 1 in myocardium of adriamycin-induced dilated cardiomyopathy rats
Note: A-C: Relative expression levels of collagen I, collagen III and TGF- β 1 mRNA; Compared with Con group, * $P<0.05$; Compared with DCM group, # $P<0.05$; Compared with L-QDTM group, & $P<0.05$; Compared with M-QDTM group, $\Delta P<0.05$.

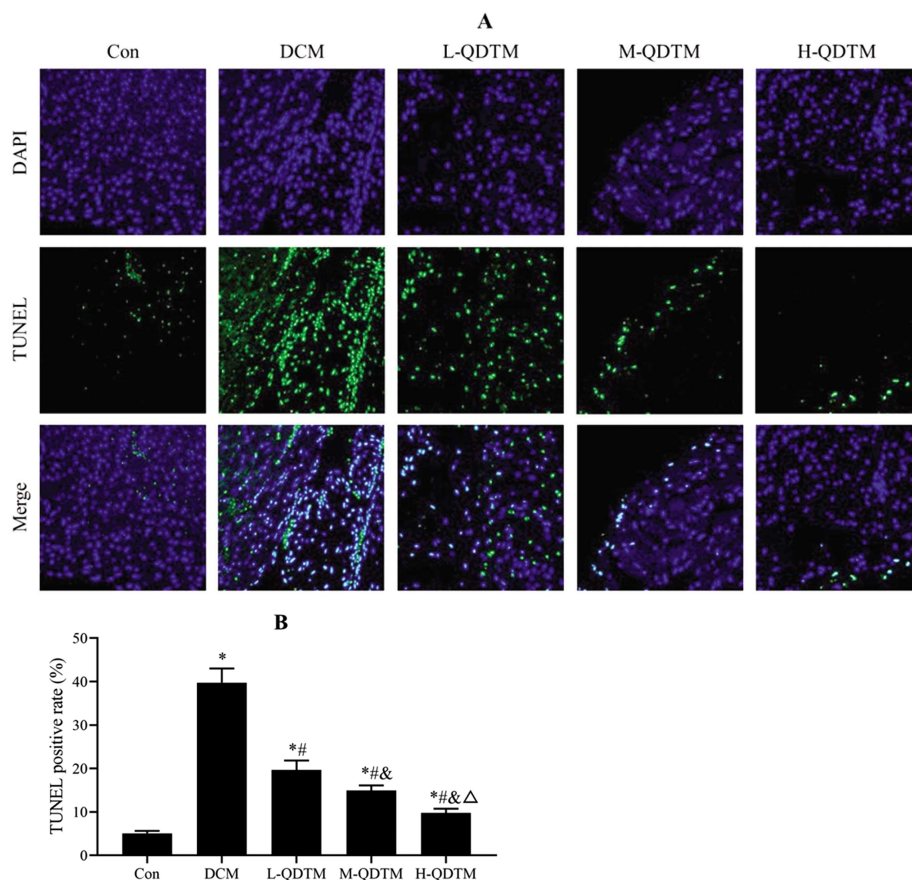


图4 芪丹通脉片对阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠心肌细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effect of QDTM on cardiomyocyte apoptosis induced by adriamycin in rats with dilated cardiomyopathy
Note: A: TUNEL staining (x200); B: TUNEL positive rate; Compared with Con group, * $P<0.05$; Compared with DCM group, # $P<0.05$; Compared with L-QDTM group, & $P<0.05$; Compared with M-QDTM group, $\Delta P<0.05$.

各组大鼠心肌 Bax 和 Bcl-2 的 mRNA 水平差异有统计学意义 ($F=478.358, P<0.001; F=582.390, P<0.001$)。与 Con 组比较, DCM 组大鼠的心肌组织中 Bax mRNA 水平升高, Bcl-2 的 mRNA 水平降低 ($P<0.05$)。与 DCM 组比较, L-QDTM 组、

M-QDTM 组和 H-QDTM 组大鼠的心肌组织中 Bax 的 mRNA 水平呈芪丹通脉片剂量依赖性降低, Bcl-2 的 mRNA 水平呈芪丹通脉片剂量依赖性升高 ($P<0.05$)。见图 5。

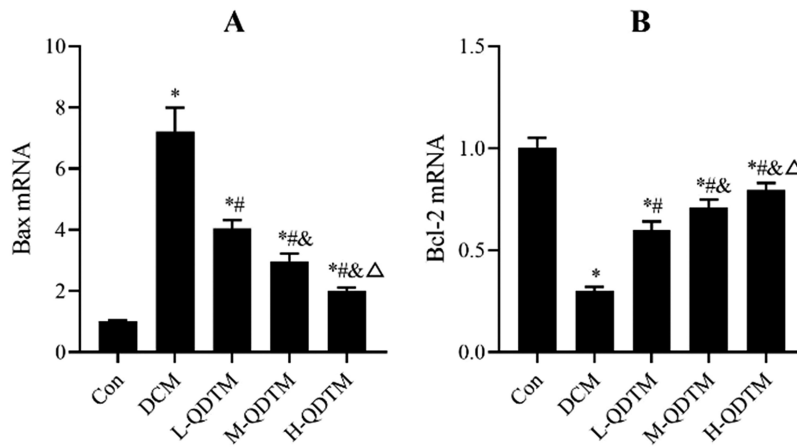


图 5 芪丹通脉片对阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠心肌组织 Bax 和 Bcl-2 转录的影响

Fig. 5 Effect of QDTM on the transcription of Bax and Bcl-2 in myocardium of rats with adriamycin-induced dilated cardiomyopathy

Note: A and B: relative expression levels of Bax and Bcl-2 mRNA; Compared with Con group, * $P<0.05$; Compared with DCM group, # $P<0.05$; Compared with L-QDTM group, & $P<0.05$; Compared with M-QDTM group, Δ $P<0.05$.

2.6 芪丹通脉片对阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠心肌组织氧化应激指标的影响

各组大鼠心肌组织氧化应激指标差异有统计学意义 ($P<0.001$)。与 Con 组比较, DCM 组大鼠心肌组织中 SOD 和 CAT 水

平降低, MDA 水平升高 ($P<0.05$)。与 DCM 组比较, L-QDTM 组、M-QDTM 组和 H-QDTM 组大鼠心肌组织中 SOD 和 CAT 水平呈芪丹通脉片剂量依赖性升高, MDA 水平呈芪丹通脉片剂量依赖性降低 ($P<0.05$)。见表 4。

表 4 芪丹通脉片对阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠心肌组织氧化应激指标的影响

Table 4 Effects of QDTM on oxidative stress indexes of myocardium in rats with adriamycin induced dilated cardiomyopathy

Groups	SOD (U/mg prot)	CAT (U/g prot)	MDA (nmol/mg prot)
Con	100.83±6.57	91.11±3.04	14.73±1.25
DCM	60.87±4.89 *	49.57±4.10 *	40.15±2.98 *
L-QDTM	75.08±3.45 *#	71.92±4.28 *#	28.68±2.88 *#
M-QDTM	79.68±3.97 *#&	80.70±4.66 *#&	22.58±1.90 *#&
H-QDTM	86.92±6.10 *#&Δ	84.83±5.71 *#&Δ	18.00±0.56 *#&Δ
F	343.622	211.761	209.357
P	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compared with Con group, * $P<0.05$; Compared with DCM group, # $P<0.05$; Compared with L-QDTM group, & $P<0.05$; Compared with M-QDTM group, Δ $P<0.05$.

2.7 芪丹通脉片对阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠心肌组织 XIST 的影响

各组大鼠心肌 XIST 水平差异有统计学意义 ($F=393.450, P<0.001$)。与 Con 组比较, DCM 组大鼠心肌组织中 XIST 水平升高 ($P<0.05$)。与 DCM 组比较, L-QDTM 组、M-QDTM 组和 H-QDTM 组大鼠心肌组织中 XIST 水平呈芪丹通脉片剂量依赖性降低 ($P<0.05$)。见图 6。

3 讨论

阿霉素是最常用的广谱抗肿瘤化疗药物之一, 在临床中,

阿霉素可引起 LVEF 下降甚至心力衰竭, 诱导不可逆的心肌细胞凋亡、活性氧产生和线粒体功能障碍^[11-13]。阿霉素已被广泛应用于扩张型心肌病的造模^[11-13]。目前, 临床中缺乏治疗阿霉素诱导的心肌毒性的特异性方法。芪丹通脉片是一种治疗缺血性心脏病的中药, 具有悠久的应用历史, 然而, 目前尚无学者报道芪丹通脉片在阿霉素诱导扩张型心肌病中的治疗效果。本研究表明, 芪丹通脉片剂量依赖性地升高了阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠的 LVEF 和 FS, 降低了 LVIDd 和 LVIDs, 降低了血清 LDH、CK 和 cTnI 水平, 改善了心肌形态。这些结果表明芪丹通脉片在治疗阿霉素诱导扩张型心肌病方面具有应用前景。

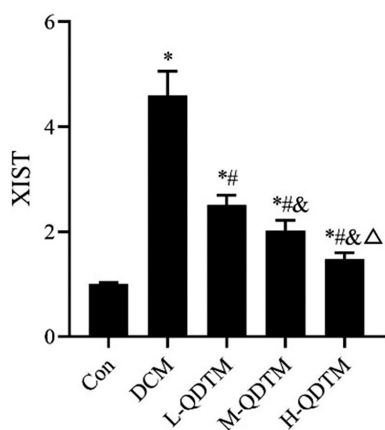


图 6 芪丹通脉片对阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠心肌组织 XIST 的影响

Fig. 6 Effect of QDTM on myocardial XIST in rats with adriamycin-induced dilated cardiomyopathy

Note: Compared with Con group, * $P < 0.05$; Compared with DCM group, # $P < 0.05$; Compared with L-QDTM group, & $P < 0.05$; Compared with M-QDTM group, △ $P < 0.05$.

扩张型心肌病以心室扩大和心脏纤维化为特征^[14]。间质纤维化和胶原沉积是扩张型心肌病的关键指标,可以预测猝死和充血性心力衰竭的发生^[14]。抑制心脏纤维化在临床上可降低扩张型心脏病患者的死亡率。TGF- β 1 通过控制 Smads 介导的胶原蛋白基因转录来促进纤维化^[15]。抑制 TGF- β 1 已成为抑制扩张型心脏病中心肌纤维化的有效方法之一^[16]。collagen I 和 collagen III 是心肌组织中的主要胶原蛋白,阿霉素诱导扩张型心肌病中 collagen I 和 collagen III 显著高表达,促进心肌纤维化的进展^[17,18]。本研究表明,芪丹通脉片剂量依赖性地抑制了阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠的心肌纤维化,并降低了心肌 collagen I、collagen III 和 TGF- β 1 mRNA 水平。芪丹通脉片的抗心肌纤维化的作用已被报道^[19],本研究推测芪丹通脉片可能通过调控胶原蛋白合成相关基因的转录来影响心肌纤维化进程。

阿霉素暴露可增加心肌细胞凋亡的敏感性,随着时间的推移,心肌细胞凋亡率增加,从而引起心肌功能丧失和代偿性心肌重塑^[20]。减弱心肌细胞凋亡的敏感性是防治扩张型心肌病心肌重塑的关键。本研究中,芪丹通脉片剂量依赖性地降低了阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠的心肌 TUNEL 阳性率,降低了心肌 Bax mRNA 水平,升高了 Bcl-2 mRNA 水平,抑制了心肌细胞凋亡。上述结果与缺血/再灌注大鼠中的结果类似,芪丹通脉片通过调节 Bcl-2 与 Bax 基因表达减轻缺血/再灌注大鼠心肌细胞凋亡^[21]。阿霉素可诱导心肌组织中活性氧的形成,引起氧化应激反应,进而引起线粒体功能障碍和细胞凋亡^[11,22]。本研究中,芪丹通脉片剂量依赖性地升高了阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠的心肌 SOD 和 CAT 水平,降低了 MDA 水平,抑制了氧化应激。其他学者报道,芪丹通脉片可降低海马 MDA 含量,提高 SOD 活性,从而发挥神经保护作用^[23]。因此,芪丹通脉片的抗心肌细胞凋亡作用与抑制氧化应激密切相关。

XIST 是一种与扩张型心肌病发病相关的关键 lncRNA。Charles 等人利用高通量下一代测序数据鉴定了与扩张型心肌病相关的关键基因,其中 XIST 是主要的枢纽 lncRNA^[6]。Liu 等

人通过生物信息学鉴定了扩张型心肌病中与免疫相关的 ceRNA 网络,XIST 处于 ceRNA 网络的中心模块之中^[7]。Luo 等人应用生物信息学法鉴定了与扩张型心肌病相关的差异表达 lncRNA,结果显示,XIST 在 DCM 患者中差异表达。ROC 曲线分析表明,XIST 诊断扩张型心肌病的 AUC 值为 0.733 (95% CI:0.646~0.809),有较好的诊断价值^[24]。本研究显示阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠心肌组织中 XIST 的表达上调,芪丹通脉片剂量依赖性地降低了心肌 XIST 水平。其他学者报道,XIST 具有调控心肌细胞凋亡、心肌肥厚、心脏和肾脏纤维化等多种功能。XIST 在心肌梗死后心肌细胞中过表达,过表达的 XIST 能促进心肌细胞凋亡,抑制心肌细胞增殖,XIST 通过靶向 miR-130a-3p 促进心肌细胞死亡^[25]。敲除 XIST 可抑制缺氧/复氧诱导的 H9C2 细胞凋亡^[26]。XIST 在慢性心力衰竭患者中升高,对心肌细胞功能具有调节作用^[27]。XIST 在苯肾上腺素诱导的心肌肥厚小鼠的心脏中上调,抑制 XIST 的表达减轻了心肌肥大^[28]。XIST 通过上调 miR-106a-5p 介导的 RUNX 家族转录因子 1 促进糖尿病肾病小鼠的心脏纤维化^[29]。敲除 XIST 减少了糖尿病肾病小鼠的心肌损伤和胶原沉积,同时降低了 collagen I、collagen III 和 TGF- β 1 的水平^[29]。敲除 XIST 通过 miR-19b 介导的 SRY-box 转录因子 6 下调来抑制肾纤维化和炎症^[30]。敲除 XIST 通过 miR-93-5p 介导的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A 抑制糖尿病肾病中的肾间质纤维化^[31]。结合前人研究结果,本研究推测芪丹通脉片治疗阿霉素诱导扩张型心肌病的机制与抑制 lncRNA XIST 有关。

综上所述,本研究表明芪丹通脉片在治疗阿霉素诱导扩张型心肌病大鼠中效果显著,其机制可能与抑制 lncRNA XIST 有关。芪丹通脉片可能是一种治疗阿霉素诱导的心肌毒性的候选药物,lncRNA XIST 可能是扩张型心肌病的新型分子靶标。

参考文献(References)

- [1] Meder B, Rühle F, Weis T, et al. A genome-wide association study identifies 6p21 as novel risk locus for dilated cardiomyopathy[J]. Eur Heart J, 2014, 35(16): 1069-1077.
- [2] Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(3): 155-159.
- [3] Fan J, Li H, Xie R, et al. LncRNA ZNF593-AS alleviates contractile dysfunction in dilated cardiomyopathy [J]. Circ Res, 2021, 128(11): 1708-1723.
- [4] Martens L, Rühle F, Witten A, et al. A genetic variant alters the secondary structure of the lncRNA H19 and is associated with dilated cardiomyopathy[J]. RNA Biol, 2021, 18(1): 409-415.
- [5] Wang W, Min L, Qiu X, et al. Biological function of long non-coding RNA (LncRNA) xist[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 645647.
- [6] Charles S, Natarajan J. Integrated regulatory network based on lncRNA-miRNA-mRNA-TF reveals key genes and sub-networks associated with dilated cardiomyopathy[J]. Comput Biol Chem, 2021, 92: 107500.
- [7] Liu C, Liu J, Wu D, et al. Construction of immune-related ceRNA network in dilated cardiomyopathy: based on sex differences[J]. Front Genet, 2022, 13: 882324.
- [8] 樊华,杨爱玲,王佑华,等. 扩心方对扩张型心肌病大鼠肌浆网 Ca²⁺-ATP 酶及受磷蛋白的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化,

- 2018, 20(2): 233-238.
- [9] 王宗仁, 李晶华, 肖铁卉, 等. 芪丹通脉片预防大鼠急性心肌缺血及对 VEGF, bFGF 表达的影响 [J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(7): 628-630.
- [10] 王南丁, 王文杰, 王新冰, 等. 芪丹通脉片对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化易损斑块 TLR4/NF- κ B 信号转导通路的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(8): 971-977.
- [11] Tomczyk MM, Cheung KG, Xiang B, et al. Mitochondrial sirtuin-3 (SIRT3) prevents doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy by modulating protein acetylation and oxidative stress [J]. *Circ Heart Fail*, 2022, 15(5): e008547.
- [12] Zhang H, Xu A, Sun X, et al. Self-Maintenance of cardiac resident reparative macrophages attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy through the SR-A1-c-Myc axis [J]. *Circ Res*, 2020, 127(5): 610-627.
- [13] Zhu M, Chen Y, Cheng L, et al. Calsyntenin-1 promotes doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy in rats [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2022 [Online ahead of print].
- [14] Assomull RG, Prasad SK, Lyne J, et al. Cardiovascular magnetic resonance, fibrosis, and prognosis in dilated cardiomyopathy[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 48(10): 1977-1985.
- [15] Rahmutula D, Marcus GM, Wilson EE, et al. Molecular basis of selective atrial fibrosis due to overexpression of transforming growth factor- β 1[J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 99(4): 769-779.
- [16] Li L, Takemura G, Li Y, et al. Granulocyte colony-stimulating factor improves left ventricular function of doxorubicin-induced cardiomyopathy[J]. *Lab Invest*, 2007, 87(5): 440-455.
- [17] Sun R, Wang J, Zheng Y, et al. Traditional Chinese medicine baixin decoction improves cardiac fibrosis of rats with dilated cardiomyopathy[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(5): 1900-1906.
- [18] Yu Q, Li Q, Na R, et al. Impact of repeated intravenous bone marrow mesenchymal stem cells infusion on myocardial collagen network remodeling in a rat model of doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 387(1-2): 279-285.
- [19] 衣慧, 历志, 王文, 等. 芪丹通脉片对心肌梗死后大鼠心肌纤维化重构的影响[J]. 心脏杂志, 2012, 24(6): 681-685.
- [20] Kankeu C, Clarke K, Passante E, et al. Doxorubicin-induced chronic dilated cardiomyopathy-the apoptosis hypothesis revisited [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2017, 95(3): 239-248.
- [21] 王宗仁, 李军昌, 王文勇, 等. 芪丹通脉片对缺血/再灌注大鼠心肌细胞凋亡及相关基因 Bcl-2 与 Bax 表达的影响[J]. 中国中医急症, 2007, 16(12): 1506-1508.
- [22] Zhang P, Lu H, Wu Y, et al. COX5A alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity by suppressing oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cardiomyocyte apoptosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(12): 10400.
- [23] 温晓妮, 乔黎焱. 芪丹通脉片对慢性脑缺血大鼠海马 MDA、SOD 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(10): 2343-2345.
- [24] Luo X, Luo P, Zhang Y. Identification of differentially expressed long non-coding RNAs associated with dilated cardiomyopathy using integrated bioinformatics approaches [J]. *Drug Discov Ther*, 2020, 14(4): 181-186.
- [25] Zhou T, Qin G, Yang L, et al. LncRNA XIST regulates myocardial infarction by targeting miR-130a-3p [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 8659-8667.
- [26] Xiao X, He Z, Tong S, et al. LncRNA XIST knockdown suppresses hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced apoptosis of H9C2 cells by regulating miR-545-3p/G3BP2 [J]. *IUBMB Life*, 2021, 73(9): 1103-1114.
- [27] Sun ZL, Chen MH, Guo YN, et al. LncRNA XIST is elevated in patients with chronic heart failure and has a regulatory role in cardiomyocyte function[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2021, 35(2): 677-682.
- [28] Chen Y, Liu X, Chen L, et al. The long noncoding RNA XIST protects cardiomyocyte hypertrophy by targeting miR-330-3p [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(3): 807-815.
- [29] Xu J, Li J, Xu X, et al. LncRNA XIST promotes cardiac fibrosis in mice with diabetic nephropathy via sponging miR-106a-5p to target RUNX1[J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2023, 33(2): 55-66.
- [30] Xia WP, Chen X, Ru F, et al. Knockdown of LncRNA XIST inhibited apoptosis and inflammation in renal fibrosis via microRNA-19b-mediated downregulation of SOX6 [J]. *Mol Immunol*, 2021, 139: 87-96.
- [31] Yang J, Shen Y, Yang X, et al. Silencing of long noncoding RNA XIST protects against renal interstitial fibrosis in diabetic nephropathy via microRNA-93-5p-mediated inhibition of CDKN1A [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2019, 317(5): 1350-1358.