

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.22.004

丹参酮 IIA 缓解大鼠心肌梗死后左心室重构的作用及其机制研究 *

杨玉春 周晓欢 王 姣 张 雷 何鹏义 木胡牙提[△]

(新疆医科大学第一附属医院综合心脏内科 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要 目的:探讨丹参酮 IIA(T-IIA)对于缓解大鼠心肌梗死(MI)后左心室重构(LVR)的作用及其机制。**方法:**选取 SD 雄性大鼠 80 只,通过结扎左前降支(LAD)建立 MI 大鼠模型。将大鼠随机分为 8 组,假手术组未结扎 LAD,其余各组均结扎 LAD;除假手术组和 MI 组腹腔注射生理盐水外,其余各组分别给予 T-IIA、脂多糖(LPS)和 TAK-242 治疗。HE 和马松(Masson)三色染色评估 MI 大小、组织病理改变和纤维化程度。末端 dUTP 镍末端标记(TUNEL)染色观察心肌细胞凋亡情况。采用反转录定量聚合酶链反应(RT-qPCR)和蛋白免疫印迹试验检测 Toll 样受体 4(TLR4)、髓样分化蛋白 88(MyD88)和核因子 κ B(NF- κ B)的表达水平。**结果:**T-IIA 能改善 MI 大鼠心功能,可降低 MI 大鼠心脏体积,改善心脏形态,减轻 MI 大鼠的组织病理学改变,并有效减轻 MI 和心肌纤维化。T-IIA 抑制 MI 大鼠的 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路,且能有效减少 MI 大鼠梗死边缘区心肌细胞凋亡。**结论:**T-IIA 通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的激活,改善心脏形态、功能和病理组织学变化,有效减轻 MI 的严重程度,预防 LVR。

关键词:丹参酮 IIA;心肌梗死;左心室重构;信号通路

中图分类号:R-33;R542.22 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)22-4217-06

Effects of Tanshinone IIA on Alleviating Left Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction in Rats and its Mechanism*

YANG Yu-chun, ZHOU Xiao-huan, WANG Jiao, ZHANG Lei, HE Peng-yi, Muhuyati[△]

(Department of Comprehensive Cardiology, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830054, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of Tanshinone IIA (T-IIA) on alleviating left ventricular remodeling (LVR) after myocardial infarction (MI) in rats and its Mechanism. **Methods:** 80 male SD rats were selected to establish the MI rat model by ligation of the left anterior descending branch (LAD). The rats were randomly divided into 8 groups. Sham operation group was not ligated LAD, and the other groups were all ligated LAD. Except for the sham operation group and the MI group by intraperitoneal injection of normal saline, the other groups were treated with T-IIA, lipopolysaccharide (LPS) and TAK-242 respectively. MI size, histopathological changes, and fibrosis degree were assessed by HE and Masson trichromatic staining. The apoptosis of cardiomyocytes was observed by TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). The expression levels of Toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation factor (MyD88) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) were detected by reverse transcriptional quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot. **Results:** T-IIA can improve the heart function of MI rats, reduce the volume of the heart of MI rats, improve the shape of the heart, reduce the histopathological changes in MI rats, and effectively reduce MI and myocardial fibrosis. T-IIA inhibits the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in MI rats, and can effectively reduce cardiomyocyte apoptosis in the marginal zone of infarction in MI rats. **Conclusion:** T-IIA inhibits the activation of the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway, improves cardiac morphology, function and histopathological changes, effectively reduces the severity of MI, and prevents LVR.

Key words: Tanshinone IIA; Myocardial infarction; Left ventricular remodeling; Signaling pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R542.22 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)22-4217-06

前言

左室重构(LVR)表现为急性心肌梗死(MI)后左室的大小、形态、结构和功能发生改变的过程,梗死区心肌坏死膨出形成室壁瘤,非梗死区心肌代偿性肥大、纤维化、室壁增厚等导致左心室增大、变形和收缩功能障碍^[1-3]。MI 后 LVR 可导致心力

衰竭和心脏破裂等严重并发症,LVR 发生在整个病程中,是影响 MI 预后的重要因素^[4,5]。丹参酮 IIA(T-IIA)为醇溶性萘醌类化合物,是丹参的主要化学成分,研究表明其可通过降低纤维化程度、抑制心肌细胞凋亡来改善心功能,同时具有减炎、增血管、改善血流动力学、扩张冠状动脉增加灌注、增强心肌收缩力等作用^[6-9]。激活 Toll 样受体 4/ 髓样分化蛋白 88/ 核因子 κ B

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81860066)

作者简介:杨玉春(1982-),男,硕士,主治医师,从事冠心病与心律失常的基础与临床研究,E-mail: yuchun820321@163.com

[△] 通讯作者:木胡牙提(1970-),男,博士,主任医师,从事冠心病与心律失常的基础与临床研究,E-mail: muhutati@163.com

(收稿日期:2021-04-06 接受日期:2021-04-30)

(TLR4/MyD88/NF- κ B) 信号通路参与冠状动脉微栓塞诱导的心肌炎症, 而使用 TLR4 特异性抑制剂 TAK-242 阻断 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路有助于减少心血管疾病诱导的心肌炎症的发生, 从而显著保护心肌细胞免受损伤, 改善心功能障碍^[9,10]。通过调节 TLR4/NF- κ B 信号通路, 可减少心肌细胞凋亡, 有效改善心功能障碍^[11]。已有研究证实 T-IIA 在减少 MI 大鼠梗死面积、改善心功能、提高 MI 大鼠存活率方面具有显著作用, 在急性 MI 动物模型中可以防止 LVR^[12,13]。但 T-IIA 是否通过 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路对 MI 后 LVR 有保护作用尚不清楚。因此, 本研究旨在探讨 T-IIA 对于缓解大鼠 MI 后 LVR 的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 雄性大鼠 80 只, 体重 250-350 g, 平均(296 $\pm$ 15)g, 年龄 6-8 周, 平均(7.1 $\pm$ 0.3)周, 购自江苏艾菱菲生物科技有限公司。实验开始前, 将所有大鼠置于环境温度为(22-25) $^{\circ}$ C、光照/黑暗周期为 12 h、食物和饮用水充足、干净的房间内饲养 1 周。

1.2 动物建模

手术前, 大鼠在 12 h 内禁食但饮水充足。采用 3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(30 mg/kg)。将针电极皮下插入四肢, 并通过四肢导联进行心电图监测。在第三和第四肋间隙左开胸后, 给大鼠插管并连接到呼吸机。沿大鼠皮肤、浅筋膜、深筋膜切口, 暴露左侧胸腔, 打开心包。然后对左前降支(LAD)进行结扎。心电图的变化(I 导联和 aVL 导联 ST 段抬高)、心脏表面立即变为深红色是冠脉结扎成功的表现。随后对大鼠缝合。大鼠手术后肌肉注射 80 万单位青霉素, 以防止感染。术后第一天开始给予药物干预。脂多糖(LPS)作为 TLR4/NF- κ B 信号通路的激活剂, TAK-242 作为 TLR4 信号通路的抑制剂。T-IIA 购于上海生物试剂有限公司。

1.3 动物分组

将大鼠随机分为 8 组(n=10), 给予不同的治疗方案: ① 假手术组: 未结扎 LAD, 腹腔注射生理盐水; ② MI 组: LAD 结扎, 腹腔注射生理盐水; ③ 低剂量 T-IIA(LDT-IIA)组: LAD 结扎, 腹腔注射 T-IIA(5 mg/kg); ④ 高剂量 T-IIA(HDT-IIA)组: LAD 结扎, 腹腔注射 T-IIA(20 mg/kg); ⑤ LPS 组: LAD 结扎, LPS 腹腔注射(5 mg/kg); ⑥ TAK-242+LPS 组: LAD 结扎, 腹腔注射 TAK-242(10 mg/kg)和 LPS(5 mg/kg); ⑦ LDT-IIA+LPS 组: LAD 结扎, 腹腔注射 LDT-IIA(5 mg/kg)和 LPS(5 mg/kg); ⑧ HDT-IIA+LPS 组: LAD 结扎, 腹腔注射 HDT-IIA(20 mg/kg)和 LPS(5 mg/kg)。

1.4 超声心动图

建模成功并给予药物干预 4 周后采用心电图监测大鼠心功能。用 3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉, 大鼠在室内自然呼吸后, 采用 GE Vivid 7 超声诊断仪进行心脏功能超声心动图检测, 探头频率 3.5-12MHz, 配备带耦合剂的 S4 换能器。收集大鼠二维和 M 型超声心动图。采用 TM 模式测量左室参数, 如左室收缩末期内径(LVESD)、左室收缩末期体积(LVESV)、左室舒张末期内径(LVEDD)、左室舒张末期体积(LVEDV)。左室短轴缩短率(LVFS)和左室射血分数(LVEF)分

别根据以下公式计算: $LVFS = (LVEDD - LVESD) / LVEDD \times 100\%$; $LVEF = [(LVEDD)^3 - (LVESD)^3] / (LVEDD)^3 \times 100\%$ 。

1.5 苏木精-伊红(HE)和马松(Masson)三色染色

心脏从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中取出, 沿着 LAD 结扎分为两半, 以保留结扎和心尖之间的区域。海马组织用 4%聚甲醛固定, 梯度醇脱水, 石蜡包埋, 制成 5 μ m 厚的组织玻片。每组取 5 片, 取平均值。HE 染色: 石蜡包埋切片二甲苯脱蜡, 苏木精染色 3 min, 伊红反染 3 min; 封片, 光镜下观察病理变化及心肌梗死情况。Masson 三色染色: 使用 Masson 试剂盒石蜡包埋切片(上海江来生物科技有限公司)染色, 取心片去蜡; 这些切片在孚子酸品红中孵育 10 min, 然后用蒸馏水冲洗。心脏样品分别在 1%磷酸中孵育 2 min 和苯胺蓝中孵育 10 min, 并在蒸馏水中洗涤。用无水乙醇对样品进行鉴别 2 min, 90 $^{\circ}$ C 烘干, 二甲苯净化, 装片, 显微镜下拍照。每个组织随机选取四个区域进行观察, 取平均值。

1.6 心肌梗死面积的测量

根据 HE 染色结果测量心肌组织左室壁厚度(LVWT)、室间隔厚度(IVST)、内外膜弧长、瘢痕内外围, 并计算心肌梗死面积。采用 Image Pro Plus 6.0 软件对 HE 检测结果取平均值。心肌梗死面积(%)=(内膜弧长+外膜弧长)/(瘢痕内围+瘢痕外围) $\times$ 100%。

1.7 末端 dUTP 镍末端标记(TUNEL)检测

取大鼠心脏乳头肌石蜡切片进行常规脱蜡、抗原修复处理, 并用封闭液封闭。切片在 37 $^{\circ}$ C 混合工作液(20 μ g/mL 蛋白酶 K 溶于 10 mmol/L Tris-HCl, pH: 7.4-8) 中孵育修复 15 min。加入 50 μ L TUNEL 反应溶液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 然后用 PBST 洗涤切片。切片用 100 μ L 二氨基联苯胺(DAB)在转炉过氧化物酶(POD)中孵育 30 min(50 μ L, 37 $^{\circ}$ C), 用 PBST 洗涤。最后在显微镜下对样品进行观察。本实验使用的 TUNEL 试剂盒购自翌圣生物科技(上海)有限公司。每个组织随机抽取 4 个区域进行计算, 取平均值。棕褐色核的出现被认为是一种阳性反应。凋亡细胞标准: 细胞核染色后呈阳性反应, 并具有凋亡细胞的形态特征。凋亡指数(AI)= 凋亡核数/(凋亡核数+正常细胞核数) $\times$ 100%。

1.8 反转录定量聚合酶链反应(RT-qPCR)

从梗死边缘区提取心肌组织, 用组织匀浆机均匀研磨。用 Trizol 提取总 RNA。采用 Nano Drop2000 检测提取 RNA 的浓度和纯度。根据基因数据库公布的基因序列, 采用引物 5.0 设计法设计合成 PCR 引物(上海圣工生物科技有限公司)。引物: TLR4: 正向引物: GGACTCTGCCCTGCCACCATTTA; 反向引物: CTTGTGCCCTGTGAGGTCGTTGA; NF- κ B-p65: 正向引物: GTGCAGAAAGAAGACATTGA; 反向引物: AGGC-TAGGGTCAGCGTATGG; MyD88: 正向引物: ATAG-GCACCAGCATGCAC; 反向引物: TAGGGTCCTTACCAGG-TA; β -actin: 正向引物: ACTGGCATTGTGATGGACTC; 反向引物: CAGCACTGTGTTGGCATAGA。按照厂家说明配置反应溶液和反应条件。 β -actin 作为内参。用溶解曲线验证 PCR 结果。计算周期阈值(CT, 扩增功率曲线的拐点), Δ CT = CT(靶基因) - CT(内部对照), Δ Δ Ct = Δ Ct(实验组) - Δ Ct(对照组), 计算靶基因的相对表达值为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.9 蛋白免疫印迹试验

取梗死边缘区心肌组织,用组织匀浆机均匀研磨。用 BCA 试剂盒(武汉博斯特生物科技)测定蛋白浓度。将提取的蛋白质加入缓冲液变性,在 95℃ 下煮沸 10 min。每孔加入 40 μg 样品后在 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)(武汉博斯特生物科技)进行蛋白分离。PAGE 的条件如下:80V 的浓缩凝胶和 120V 的分离凝胶电压;在 100 mv 恒定电压下用聚偏氟乙烯(PVDF)进行 90-120 min 的湿转移。封闭分离的蛋白,在 5%牛血清白蛋白(BSA)室温孵育 1 h。将一抗加入分离的蛋白(TLR4、MyD88、NF-κB-p65 和 β-actin),以 1:1000 的比例稀释,在 4℃ 孵育过夜。孵化后,蛋白质样本用三羟甲基氨基甲烷缓冲液盐水和渐变 20 (TBST)冲洗 3 次(5 分钟 / 次),在室温下与二级抗体孵育 1 h 后再次用 TBST 冲洗(5 分钟 / 次),添加化学发光试剂。利用 Image J 软件对目标波段的灰度值进行分析。

1.10 统计学方法

采用 SPSS22.0 统计分析软件。多组间比较采用单因素方差分析。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示及 t 检验。计数资料以频数和百分率表示及 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学

意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心功能改变情况

如表 1 所示,与假手术组比较,MI 组 LVEDD、LVESD、LVESV、LVEDV 明显升高,心脏体积增大,差异有统计学意义($P < 0.05$);LVEF、LVFS 明显降低,心室收缩功能明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 MI 组比较,LDT-IIA 组和 HDT-IIA 组 LVEDD、LVESD、LVESV、LVEDV 均显著降低,LVEF、LVFS 及心室收缩功能均显著升高和改善,差异均有统计学意义($P < 0.05$);LPS 组 LVEDD、LVESD、LVESV、LVEDV 明显升高,LVEF、LVFS 及心室收缩功能明显下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与 LPS 组比较,TAK-242+LPS 组、LDT-IIA+LPS 组和 HDT-IIA+LPS 组 LVEDD、LVESD、LVESV、LVEDV 显著降低,LVEF、LVFS、心室收缩功能均显著升高和改善,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。上述结果表明,T-IIA 能改善 MI 大鼠心功能。

表 1 各组大鼠超声心动图测量指标($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Echocardiographic indexes of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	LVESD(mm)	LVEDD(mm)	LVESV(mL)	LVEDV(mL)	LVEF(%)	LVFS(%)
Sham operation group	3.41± 0.34	7.65± 0.52	0.33± 0.04	0.47± 0.08	52.67± 4.44	90.15± 6.05
MI group	9.02± 0.53*	11.12± 1.03*	0.72± 0.21*	1.24± 0.30	17.03± 3.00*	55.26± 3.34*
LDT-IIA group	6.65± 0.62@	9.01± 0.85@	0.61± 0.17@	0.88± 0.25	33.50± 3.91@	71.34± 3.05@
HDT-IIA group	5.70± 0.74@	8.97± 0.73@	0.53± 0.14@	0.51± 0.12	36.90± 4.02@	77.03± 3.22@
LPS group	10.67± 0.62@	12.24± 0.42@	0.69± 0.20@	1.17± 0.28	11.28± 1.24@	30.25± 2.15@
TAK-242+LPS group	6.08± 0.42*	8.86± 0.54*	0.50± 0.13*	0.51± 0.09	38.60± 2.95*	74.14± 4.64*
LDT-IIA+LPS group	8.73± 0.70*	10.35± 0.82*	0.62± 0.17*	0.90± 0.24	24.54± 3.42*	59.74± 3.47*
HDT-IIA+LPS group	7.33± 0.84*	9.14± 0.87*	0.55± 0.16*	0.53± 0.11	32.35± 3.06*	63.51± 3.83*
F value	21.063	18.642	8.915	12.063	38.061	17.334
P value	0.000	0.000	0.014	0.002	0.000	0.000

Note: Compared with sham operation group, * $P < 0.05$; Compared with MI group, @ $P < 0.05$; Compared with LPS group, * $P < 0.05$.

2.2 各组大鼠 MI 后心脏形态学观察

如图 1 所示,假手术组心脏表面光滑,形态特征正常,心室容量正常,心室壁厚度均匀有弹性,心外膜有炎性增生,颜色稍淡,其他心脏表面呈鲜红色。MI 组心肌表面不光滑,心脏体积及左室腔明显增大,梗死区心肌苍白、变薄,形成室内动脉瘤;心室形态呈球形,收缩至心室内;心室壁不具有弹性和韧性;心肌可见瘢痕组织,非梗死区可见心室壁增厚。与假手术组相比,LDT-IIA 组和 HDT-IIA 组心脏表面不光滑,心脏体积增加,颜色更深,心室壁变厚,弹性和韧性均降低。与 MI 组比较,LDT-IIA 组和 HDT-IIA 组心脏保持正常形态,心容量减少,心室壁弹性和韧性改善;心室扩张程度、室壁瘤发生率和梗死面积也减少。与 LPS 组比较,TAK-242+LPS 组、LDT-IIA+LPS 组和 HDT-IIA+LPS 组心脏表面光滑,心脏体积减小,心室壁弹性和韧性减弱,梗死面积减小;此外,与 MI 组比较,TAK-242+LPS 组、LDT-IIA+LPS 组和 HDT-IIA+LPS 组室壁瘤

发生率和梗死面积均减少。上述结果表明,T-IIA 可降低 MI 大鼠心脏体积,改善心脏形态。

2.3 各组大鼠 MI 后组织病理学改变及 MI 和心肌纤维化变化情况

假手术组心肌细胞 HE 染色均匀,心肌细胞横纹肌丝排列整齐,细胞边界清晰,无中断现象,为正常心肌细胞形态。MI 组心肌纤维变粗、变长、紊乱,条纹断裂,变得模糊,梗死面积增加,梗死区心室壁薄,细胞变大、肿胀,形状混乱,细胞间隙充满大量纤维组织;梗死区及边缘区炎性细胞浸润增多,纤维化紊乱。如表 2 所示,与假手术组(无 MI)比较,MI 组 MI 和心肌纤维化范围显著增加,LVWT 和 IVST 显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 MI 组比较,LPS 组炎症细胞浸润较多,纤维组织明显增多,细胞紊乱更为明显,MI 和心肌纤维化范围增加,LVWT 和 IVST 升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 MI 组比较,LDT-IIA 组和 HDT-IIA 组 MI 和心肌纤维化范围减

少, LVWT 和 IVST 明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 LPS 组比较, TAK-242+LPS 组、LDT-IIA+LPS 组和 HDT-IIA+LPS 组心肌细胞排列整齐, 肿胀和纤维化明显减少; MI 和

心肌纤维化范围减少, LVWT 和 IVST 明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。上述结果表明, T-IIA 能减轻 MI 大鼠的组织病理学改变, 有效减轻 MI 和心肌纤维化。

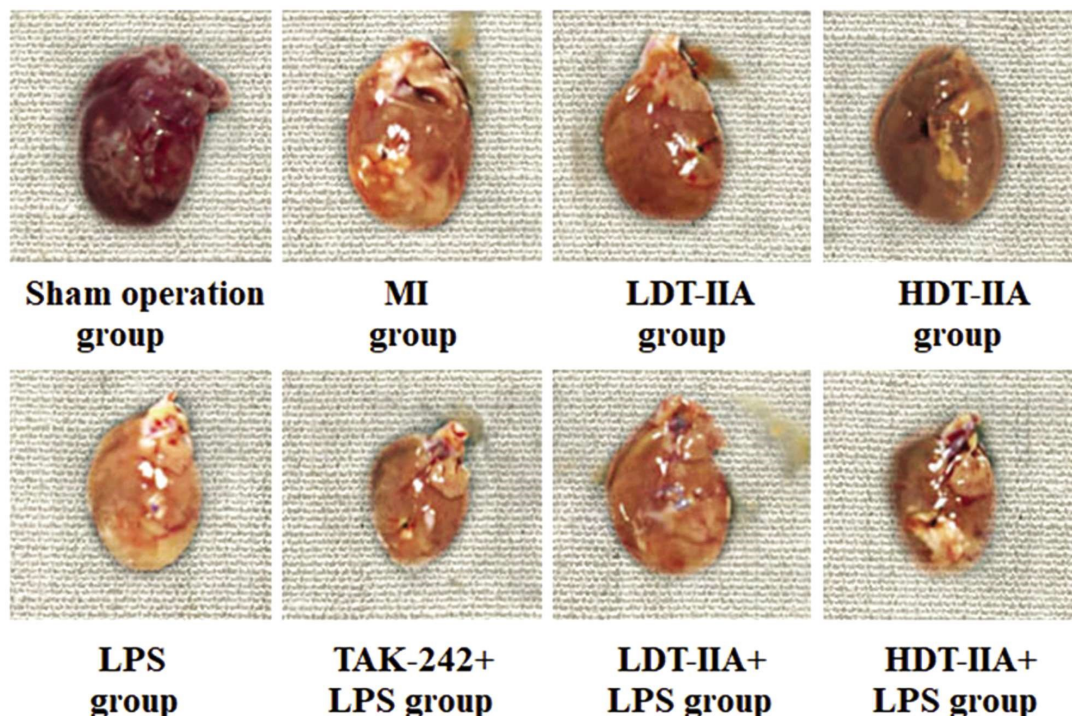


图 1 各组大鼠 MI 后心脏形态学观察
Fig.1 Morphological Observation of rat heart after MI

表 2 各组大鼠 MI 后 MI 大小、LVWT、IVST 及心肌纤维化大小情况 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 MI size, LVWT, IVST and myocardial fibrosis after MI in each group of rats ($\bar{x} \pm s$)

Groups	MI (%)	LVWT (mm)	IVST (mm)	Myocardial fibrosis (%)
Sham operation group	0	1.6 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.3	0
MI group	49.5 $\pm$ 4.7*	2.4 $\pm$ 0.4*	2.4 $\pm$ 0.5*	47.5 $\pm$ 4.8*
LDT-IIA group	37.1 $\pm$ 3.6@	1.8 $\pm$ 0.3@	1.7 $\pm$ 0.4@	38.3 $\pm$ 4.1@
HDT-IIA group	32.0 $\pm$ 3.2@	1.7 $\pm$ 0.3@	1.6 $\pm$ 0.3@	35.4 $\pm$ 3.5@
LPS group	55.7 $\pm$ 5.1@	2.9 $\pm$ 0.6@	3.0 $\pm$ 0.6@	56.7 $\pm$ 5.6@
TAK-242+LPS group	35.9 $\pm$ 3.5&	1.7 $\pm$ 0.3&	1.7 $\pm$ 0.4&	37.9 $\pm$ 3.8&
LDT-IIA+LPS group	48.2 $\pm$ 4.6&	2.1 $\pm$ 0.4&	2.3 $\pm$ 0.5&	42.5 $\pm$ 4.1&
HDT-IIA+LPS group	44.0 $\pm$ 4.2&	1.9 $\pm$ 0.3&	2.1 $\pm$ 0.4&	40.8 $\pm$ 4.0&
F value	36.009	27.150	39.462	15.642
P value	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with sham operation group, * $P < 0.05$; Compared with MI group, @ $P < 0.05$; Compared with LPS group, & $P < 0.05$.

2.4 各组大鼠 TLR4、MyD88、NF- κ B mRNA 和蛋白表达水平

如表 3 所示, 假手术组大鼠心肌组织中 TLR4、NF- κ B-P65、MyD88 mRNA 表达水平显著低于 MI 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 MI 组比较, LDT-IIA 组和 HDT-IIA 组 TLR4、NF- κ B-P65、MyD88 mRNA 表达显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 LPS 组 TLR4、NF- κ B-P65、MyD88 mRNA 表达显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 LPS 组比较, TAK-242+LPS 组、LDT-IIA+LPS 组和 HDT-IIA+LPS 组 TLR4、NF- κ B-P65、MyD88 mRNA 表达均显著降低, 差异有统计学意义

($P < 0.05$)。如图 2 所示, 心肌组织中 TLR4、NF- κ B-P65、MyD88 蛋白表达与 TLR4、NF- κ B-P65、MyD88 mRNA 表达一致。上述结果表明, LPS 可激活 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路, T-IIA 可抑制 MI 大鼠的 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路。

2.5 各组大鼠梗死边缘区心肌细胞凋亡

如表 4 所示, MI 组梗死边缘区细胞凋亡程度明显高于假手术组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。LDT-IIA 组和 HDT-IIA 组细胞凋亡程度均显著低于 MI 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。LDT-IIA 组细胞凋亡程度明显低于 LDT-IIA+LPS 组, 差异有统

计学意义($P<0.05$)。与 MI 组比较,LPS 组凋亡细胞明显增多,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 LPS 组比较,TAK-242+LPS 组、LDT-IIA+LPS 组和 HDT-IIA+LPS 组凋亡细胞明显减少,差

异有统计学意义($P<0.05$)。上述结果表明,T-IIA 可减少 MI 边缘区心肌细胞凋亡。

表 3 各组大鼠 TLR4、NF- κ B-P65、MyD88 mRNA 表达水平($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Expression levels of TLR4, NF- κ B-P65, MyD88 mRNA in each group of rats($\bar{x}\pm s$)

Groups	TLR4	NF- κ B-P65	MyD88
Sham operation group	0.30 $\pm$ 0.05	0.50 $\pm$ 0.08	0.20 $\pm$ 0.04
MI group	1.46 $\pm$ 0.27*	2.04 $\pm$ 0.41*	1.36 $\pm$ 0.25*
LDT-IIA group	0.87 $\pm$ 0.13@	0.96 $\pm$ 0.15@	0.71 $\pm$ 0.14@
HDT-IIA group	0.74 $\pm$ 0.10@	0.83 $\pm$ 0.13@	0.52 $\pm$ 0.10@
LPS group	1.78 $\pm$ 0.32@	2.38 $\pm$ 0.36@	1.64 $\pm$ 0.36@
TAK-242+LPS group	0.85 $\pm$ 0.14 [§]	0.89 $\pm$ 0.14 [§]	0.66 $\pm$ 0.12 [§]
LDT-IIA+LPS group	1.40 $\pm$ 0.25 [§]	1.79 $\pm$ 0.25 [§]	1.17 $\pm$ 0.20 [§]
HDT-IIA+ LPS group	1.32 $\pm$ 0.23 [§]	1.70 $\pm$ 0.24 [§]	0.88 $\pm$ 0.13 [§]
F value	42.637	30.152	35.462
P value	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with sham operation group, * $P<0.05$; Compared with MI group, @ $P<0.05$; Compared with LPS group, [§] $P<0.05$.

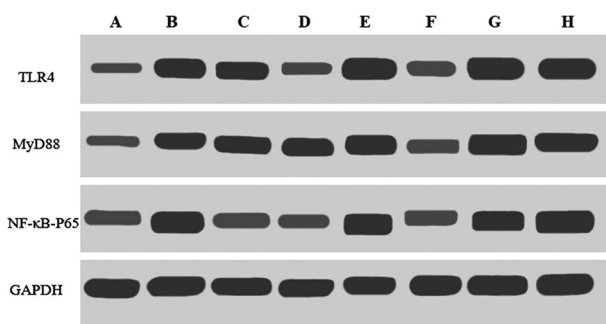


图 2 TLR4、NF- κ B-P65、MyD88 蛋白表达

Fig.2 TLR4, NF- κ B-P65, MyD88 protein expression

Note: A: Sham operation group; B: MI group; C: LDT-IIA group; D: HDT-IIA group; E: LPS group; F: TAK-242+LPS group; G: LDT-IIA+LPS group; H: HDT-IIA+ LPS group.

表 4 各组大鼠梗死边缘区心肌细胞凋亡指数($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Cardiomyocyte apoptosis index in the marginal zone of infarction in each group($\bar{x}\pm s$)

Groups	Cardiomyocyte apoptosis index (%)
Sham operation group	1.8 $\pm$ 0.5
MI group	14.2 $\pm$ 2.6*
LDT-IIA group	7.4 $\pm$ 1.5@
HDT-IIA group	5.3 $\pm$ 1.0@
LPS group	18.6 $\pm$ 3.1@
TAK-242+LPS group	6.8 $\pm$ 1.5 [§]
LDT-IIA+LPS group	13.7 $\pm$ 2.4 [§]
HDT-IIA+ LPS group	10.3 $\pm$ 1.8 [§]
F value	120.642
P value	0.000

Note: Compared with sham operation group, * $P<0.05$; Compared with MI group, @ $P<0.05$; Compared with LPS group, [§] $P<0.05$.

3 讨论

MI 通常是由于血流不足导致心肌细胞缺血引起的死亡,会诱发 LVR,即 MI 后 LVR,导致心功能障碍和室性心律失常^[14,15]。同时,炎症在 MI 后 LVR 中起着重要作用,LVR 的特征为炎症的初始阶段,促进细胞外基质变化,导致心肌纤维化^[16]。MI 伴有坏死的心脏组织清除和炎症细胞浸润,虽然炎症是修复受损组织和促进愈合所必需的,但持续的炎症会加剧心脏组织的有害重塑,引起心力衰竭^[17]。因此,MI 早期的急性炎症反应可能是治疗 MI 患者的一个潜在靶点。MI 后 LVR 是早期梗死导致心脏扩张,随后出现非梗死性肥厚和进行性左心室扩张的过程,与不良的临床结果相关^[18]。与所有其他有助于确定 MI 患者预后的因素一样,减小 MI 面积仍然是帮助改善患者预后的重要途径。本研究显示,MI 组 LVEDD、LVESD、LVESV、LVEDV 明显升高,心脏体积增大,LVEF、LVFS 明显降低,心室收缩功能明显下降;LDT-IIA 组、HDT-IIA 组、TAK-242+LPS

组、LDT-IIA+LPS 组和 HDT-IIA+LPS 组 LVEDD、LVESD、LVESV、LVEDV 均显著降低,LVEF、LVFS 及心室收缩功能均显著升高和改善。提示 T-IIA 能改善 MI 大鼠心功能。

TLR4 是一种炎症因子,在心肌损伤中发挥作用,TLR4 及其相关信号转导通路参与心力衰竭的发生和发展,可被革兰氏阴性菌的一种成分 LPS 激活,诱导产生促炎介质以消灭细菌^[19]。MyD88 被认为是"巨噬细胞分化标记物",是 TLR4 信号途径中起重要作用的分子,其依赖性途径主要是通过介导 NF- κ B 信号通路的活化及相关细胞因子所产生,其 mRNA 过表达通过抑制 MyD88/NF- κ B 通路的活化来减弱心肌损伤^[20,21]。NF- κ B 已经被认为是一个重要的转录因子,几乎在所有的动物细胞中均能发现,是炎症和免疫稳态的主要调节因子,因此在炎症性

疾病中发挥着核心作用,其靶基因包括促炎细胞因子如 IL-6 和 TNF- α 等^[22]。本研究显示,与 MI 组比较,T-IIA 治疗的大鼠 MI 严重程度有所降低;蛋白免疫印迹试验和 RT-qPCR 结果显示,LDT-IIA 组和 HDT-IIA 组 TLR4、NF- κ B-P65 和 MyD88 蛋白和 mRNA 表达明显低于 MI 组。表明 T-IIA 可能通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路相关基因的激活来预防 MI。卜雕雕等^[23]研究显示,复方龙脉宁通过调控 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通过相关因子的表达从而对 MI 其保护作用,与本研究 T-IIA 调控信号通路相同。TLRs 通常与适配器分子 MyD88 结合,随后激活 NF- κ B,产生多种促炎因子,包括 IL-1 β 、IL-18 和 TNF- α 等^[24]。炎症反应的发生与 TLR4/NF- κ B 信号通路密切相关,抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路的激活可以减少多种促炎因子的分泌,缓解心肌缺血损伤^[25]。抑制心肌细胞炎性因子 TNF- α 、IL-6 等表达,减轻心肌细胞凋亡和心肌结构损伤,其抗炎、抗凋亡作用可能与其抑制 TLR4/NF- κ B 信号转导通路有关^[26]。TLR4 激活 NF- κ B 信号通路,从而增加下游促炎细胞因子 IL-1、IL-18、TNF- α 的表达,导致纤维化和收缩功能障碍^[27]。MyD88 作为 TLR4 的一个关键的适配器蛋白,可以激活下游的 NF- κ B,并导致促炎细胞因子的增加^[28]。TLR4 也是一种重要的膜受体,介导先天免疫,经刺激激活后可上调 NF- κ B^[29]。

治疗心肌损伤的理想疗法是抑制反应性纤维化(和其他重塑过程)以及在非梗死区域的再生^[30]。心肌纤维化不仅可引起心室重构,还可能导致心室区域性异常运动及心功能代谢的异常,且重度、广泛的心肌纤维化具有不可逆性,因此心肌纤维化的严重程度可决定患者的预后情况。本研究结果显示,与 MI 组比较,LDT-IIA 组和 HDT-IIA 组 MI 和心肌纤维化范围减少,LVWT 和 IVST 明显下降;与 LPS 组比较,TAK-242+LPS 组、LDT-IIA+LPS 组和 HDT-IIA+LPS 组心肌细胞排列整齐,肿胀和纤维化明显减少;MI 和心肌纤维化范围减少,LVWT 和 IVST 明显下降。表明 T-IIA 可能通过减少心肌纤维化面积来预防 LVR。同时本研究还显示,与 MI 组比较,LPS 组凋亡细胞明显增多。与 LPS 组比较,TAK-242+LPS 组、LDT-IIA+LPS 组和 HDT-IIA+LPS 组凋亡细胞明显减少,表明 T-IIA 可减少 MI 边缘区心肌细胞凋亡。以上结果表明 T-IIA 可通过多种分子生物学机制,如抑制纤维化程度、抑制心肌细胞肥大及心肌细胞凋亡等,在体内外抑制 LVR 过程。

综上所述,T-IIA 通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的激活,改善心脏形态、功能和病理组织学变化,有效减轻 MI 的严重程度,预防 LVR。

参考文献(References)

- [1] Singh JSS, Mordi IR, Vickneson K, et al. Dapagliflozin Versus Placebo on Left Ventricular Remodeling in Patients With Diabetes and Heart Failure: The REFORM Trial [J]. *Diabetes Care*, 2020, 43(6): 1356-1359
- [2] Zhang YM, Lu Y, Tang Y, et al. The effects of different initiation time of exercise training on left ventricular remodeling and cardiopulmonary rehabilitation in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction[J]. *Disabil Rehabil*, 2016, 38(3): 268-276
- [3] Haque ZK, Wang DZ. How cardiomyocytes sense pathophysiological stresses for cardiac remodeling [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(6): 983-1000
- [4] 李赛赛,杨阳,李家立,等.连夏宁心方对心肌梗死大鼠左室重构及 JAK1/STAT3 信号通路的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2020, 27(12): 48-52
- [5] 刘红军,王国庆,邱春光. 血浆微小核糖核酸对急性心肌梗死患者左心室重构及预后的相关性分析 [J]. *心肺血管病杂志*, 2019, 38(12): 1221-1225
- [6] Jiang C, Zhu W, Shao Q, et al. Tanshinone IIA Protects Against Folic Acid-Induced Acute Kidney Injury [J]. *Am J Chin Med*, 2016, 44(4): 737-53
- [7] 李研. 丹参酮 IIA 对急性心肌梗死患者心功能及炎性因子的影响 [J]. *海南医学院学报*, 2016, 22(17): 1933-1935
- [8] 王诗才,陈太军,黄美松,等.丹参酮 IIA 对自发性高血压大鼠左室心肌肥厚及心肌细胞凋亡的影响 [J]. *中国循环杂志*, 2015, (7): 694-698
- [9] Su Q, Lv X, Sun Y, et al. Role of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in coronary microembolization-induced myocardial injury prevented and treated with nicorandil [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 776-784
- [10] 李云鹏,杨玉丹.萝卜硫素预处理通过 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路对缺氧/复氧大鼠心肌细胞的保护作用[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2021, 56(2): 188-191
- [11] Wang XT, Lu YX, Sun YH, et al. TAK-242 Protects Against Apoptosis in Coronary Microembolization-Induced Myocardial Injury in Rats by Suppressing TLR4/NF- κ B Signaling Pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(4): 1675-1683
- [12] Wu P, Du Y, Xu Z, et al. Protective effects of sodium tanshinone IIA sulfonate on cardiac function after myocardial infarction in mice[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(1): 351-360
- [13] Mao S, Li X, Wang L, et al. Rationale and Design of Sodium Tanshinone IIA Sulfonate in Left Ventricular Remodeling Secondary to Acute Myocardial Infarction (STAMP-REMODELING) Trial: A Randomized Controlled Study [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2015, 29(6): 535-542
- [14] 李朵,唐琦,华蕾.急性心肌梗死患者血清可溶性信号素 4D 和趋化素水平与左室重构的关系[J]. *中国医药*, 2021, 16(5): 646-650
- [15] Ma S, Ma J, Zhou Y, et al. Tongguan capsule derived-herb ameliorates remodeling at infarcted border zone and reduces ventricular arrhythmias in rats after myocardial infarction [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109514
- [16] Arrieta V, Martinez-Martinez E, Ibarrola J, et al. A role for galectin-3 in the development of early molecular alterations in short-term aortic stenosis[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131(10): 935-949
- [17] Parizadeh SM, Ghandehari M, Heydari-Majd M, et al. Toll-like Receptors Signaling Pathways as a Potential Therapeutic Target in Cardiovascular Disease[J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(17): 1887-1898
- [18] 吴彩凤,徐日新,张强,等.微循环阻力指数评估急性前壁 ST 段抬高型心肌梗死患者急诊冠状动脉介入治疗预后的价值及相关影响因素[J]. *实用临床医药杂志*, 2019, 23(16): 65-69, 75
- [19] Yu L, Feng Z. The Role of Toll-Like Receptor Signaling in the Progression of Heart Failure[J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 8: 9874109
- [20] 陈文丽,郑芳,干学东. 过表达微小 RNA-132-3p 通过抑制 MyD88/NF- κ B 通路减弱脓毒症介导的心肌损伤[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2021, 42(2): 262-266

- betes Res Care, 2021, 9(1): e001433
- [16] Sun Q, Chen GQ, Wang XB, et al. Alterations of White Matter Integrity and Hippocampal Functional Connectivity in Type 2 Diabetes Without Mild Cognitive Impairment[J]. Front Neuroanat, 2018, 12: 21
- [17] Li M, Huang L, Yang D, et al. Atrophy patterns of hippocampal subfields in T2DM patients with cognitive impairment [J]. Endocrine, 2020, 68(3): 536-548
- [18] Wennberg AMV, Hagen CE, Gottesman RF, et al. Longitudinal association between diabetes and cognitive decline: The National Health and Aging Trends Study[J]. Arch Gerontol Geriatr, 2017, 72: 39-44
- [19] Yuan XY, Wang XG. Mild cognitive impairment in type 2 diabetes mellitus and related risk factors: a review [J]. Rev Neurosci, 2017, 28(7): 715-723
- [20] Dyer AH, McKenna L, Gamage G, et al. Cognitive performance in midlife type 2 diabetes: results from the ENBIND study [J]. Diabet Med, 2020, e14412
- [21] Spauwen PJ, Kohler S, Verhey FR, et al. Effects of type 2 diabetes on 12-year cognitive change: results from the Maastricht Aging Study [J]. Diabetes Care, 2013, 36(6): 1554-1561
- [22] Vincent AM, McLean LL, Backus C, et al. Short-term hyperglycemia produces oxidative damage and apoptosis in neurons [J]. FASEB J, 2005, 19(6): 638-640
- [23] Luchsinger JA, Palmas W, Teresi JA, et al. Improved diabetes control in the elderly delays global cognitive decline[J]. J Nutr Health Aging, 2011, 15(6): 445-449
- [24] 张玲,木亚斯沙尔,蓓里·加帕尔,等. 2型糖尿病血糖控制水平及其相关因素与维族老年人认知功能障碍的关系[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2017, 19(4): 353-357
- [25] Wang M, Liu Y, Liang Y, et al. Systematic Understanding of Pathophysiological Mechanisms of Oxidative Stress-Related Conditions-Diabetes Mellitus, Cardiovascular Diseases, and Ischemia-Reperfusion Injury[J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 649785
- [26] 王晴,杨淑娜,胡文立. 2型糖尿病对脑白质高信号影响的研究进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2021, 23(3): 335-336
- [27] Nurrika D, Zhang S, Tomata Y, et al. Education level and incident functional disability in elderly Japanese: The Ohsaki Cohort 2006 study[J]. PLoS One, 2019, 14(3): e0213386
- [28] Sattler C, Toro P, Schonknecht P, et al. Cognitive activity, education and socioeconomic status as preventive factors for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease [J]. Psychiatry Res, 2012, 196(1): 90-95
- [29] Winkler A, Dlugaj M, Weimar C, et al. Association of Diabetes Mellitus and Mild Cognitive Impairment in Middle-Aged Men and Women [J]. J Alzheimers Dis, 2014, 42(4): 1269-1277
- [30] Gurvich C, Le J, Thomas N, et al. Sex hormones and cognition in aging[J]. Vitam Horm, 2021, 115: 511-533

(上接第 4222 页)

- [21] 雷升萍,王靛,龙子江,等. 黄精多糖通过 TLR4-MyD88-NF- κ B 通路抑制缺氧/复氧 H9c2 心肌细胞炎症因子释放 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(2): 255-259, 260
- [22] 吉芳,伊合山·艾尼瓦尔,张静静,等. NF- κ B 信号通路在大鼠肾缺血再灌注损伤致心肌损伤中的作用[J]. 新疆医科大学学报, 2019, 42(11): 1404-1408, 1413
- [23] 卜雕雕, 苏卓, 柏希慧, 等. 复方龙脉宁对急性心肌梗死模型大鼠 TLR4/MyD88/NF- κ B p65 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(9): 67-73
- [24] 杨丹阳,姜涛,周径. 基于 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路探讨大蒜素对大鼠冠状动脉微栓塞的影响及作用机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(12): 1252-1258
- [25] Su Q, Li L, Sun Y, et al. Effects of the TLR4/Myd88/NF- κ B Signaling Pathway on NLRP3 Inflammasome in Coronary Microembolization-Induced Myocardial Injury [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(4): 1497-1508
- [26] 黄政,方存明,马小林,等. 芪苈强心胶囊通过 TLR4/NF- κ B 通路减轻心力衰竭大鼠心肌炎症反应的研究 [J]. 重庆医学, 2020, 49(2): 183-187
- [27] Mitchell JP, Carmody RJ. NF- κ B and the Transcriptional Control of Inflammation[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2018, 335: 41-84
- [28] 张红利,贾春新,李海鹏,等. 参芍口服液调控 TLR4/MyD88 通路改善糖尿病大鼠心肌炎症损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(8): 28-33
- [29] 朱怡,李毅,张楠,等. 电针预处理对心肌缺血再灌注损伤大鼠 "内关" 穴区 Toll 样受体 4、髓样分化因子 88 及核转录因子 - κ B 基因表达的影响[J]. 针刺研究, 2018, 43(5): 302-306, 329
- [30] Talman V, Ruskoaho H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration [J]. Cell Tissue Res, 2016, 365(3): 563-581