

复方丹参滴丸减少心肌微血管内皮-间质转化保护缺血-再灌注大鼠的心功能

马有刚¹, 康峰光², 徐如林¹, 徐 兰³, 蔡安平³, 曾繁芳⁴, 黎励文³, 麦炜颐¹

(1. 中山大学附属第一医院心血管内科//国家卫生健康委员会辅助循环重点实验室(中山大学), 广东 广州 510080;

2. 广州中医药大学顺德医院心血管内科, 广东 佛山 528300; 3. 广东省人民医院心血管内科, 广东 广州 510080;

4. 中国医学科学院阜外医院深圳医院心血管内科, 广东 深圳 518057)

摘要:【目的】本研究旨在探讨不同剂量复方丹参滴丸对缺血-再灌注大鼠心功能的作用及可能机制。【方法】32只雄性SD大鼠经结扎左冠状动脉前降支,45min后进行再灌注以构建大鼠心肌缺血-再灌注模型,之后随机分为以下4组(每组8只):不同剂量复方丹参滴丸组(以40、80、120 mg·kg⁻¹·d⁻¹剂量灌胃给药)及空白对照组(给予等量生理盐水)。另8只大鼠进行相似的操作但不结扎左前降支为假手术组(给予等量生理盐水灌胃)。灌胃给药持续4周。以超声心动图检查评估心功能,HE和Masson三色染色以观察组织形态学变化,CD31/ α -SMA免疫荧光以分析鼠心微血管的内皮-间质转化情况,Western blot以检测梗死周边心室组织CD31/ α -SMA的表达。用单因素方差分析或Kruskal-Wallis *H*非参数检验比较各组实验结果。【结果】与空白对照组比,不同剂量复方丹参滴丸治疗可显著增加左室射血分数和左室短轴缩短率($P<0.05$),降低左室舒张末期容积和E/A比值($P<0.05$),减少心肌胶原容积分数(均 $P<0.05$),抑制鼠心微血管间质标记物 α -SMA的表达($P<0.05$),降低梗死周边心室组织 α -SMA的表达并增加CD31的表达。【结论】复方丹参滴丸40/80/120 mg·kg⁻¹·d⁻¹治疗可改善大鼠心肌缺血再灌注后的心功能,机制之一可能是通过抑制心肌内血管内皮-间质过度转化,减少缺血再灌注后心肌纤维化。

关键词: 复方丹参滴丸; 心肌梗死; 缺血-再灌注; 内皮-间质转化

中图分类号: R541 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2021)03-0355-09

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2021.0105

Treatment with Compound Danshen Dripping Pills Improves Cardiac Function in Rats following Ischemia-Reperfusion through Reducing Endothelial to Mesenchymal Transition in Microvessels within Heart Tissue

MA You-gang¹, KANG Feng-guang², XU Ru-lin¹, XU Lan³, CAI An-ping³, ZENG Fan-fang⁴,
LI Li-wen³, MAI Wei-yi¹

(1. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University // NHC Key Laboratory of Assisted Circulation (Sun Yat-sen University), Guangzhou 510080, China; 2. Department of Cardiology, Shunde Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Foshan 528300, China; 3. Department of Cardiology, People's Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510080, China; 4. Department of Cardiology, Shenzhen Branch of Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Shenzhen 518057, China)

Correspondence to: MAI Wei-yi, E-mail: maiweiyi@mail.sysu.edu.cn; LI Li-wen, E-mail: gdghllw@163.com

Abstract:【Objective】The present study was conducted to investigate the protective effect on cardiac function and potential mechanism of Compound Danshen Dripping Pills (CDDPs) on myocardial ischemia reperfusion in rats.【Methods】

收稿日期: 2021-03-07

基金项目: 天士力心血管药基金(k0601192); 广东省自然科学基金(2016A030313794)

作者简介: 马有刚, 硕士生, 研究方向: 心肌缺血, E-mail: mayg3@mail2.sysu.edu.cn; 麦炜颐, 教授, 通信作者, E-mail: maiweiyi@mail.sysu.edu.cn; 黎励文, 教授, 通信作者, E-mail: gdghllw@163.com

Thirty two male SD rats were underwent cardiac reperfusion following 45 minutes of left anterior descending coronary artery ligation, and randomly divided into 4 groups ($n=8$), rats in each group were given different doses of CDDPs (40, 80, 120 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), or normal saline (control group) by gavage. Another 8 rats underwent similar procedure but without LAD ligation were set as sham group (were also given same volume of normal saline by gavage). The treatment lasted for 4 weeks. Then echocardiography was conducted to evaluate the end-point cardiac function. HE and Masson's trichrome staining were performed to observe the change of histomorphology and fibrosis. CD31/ α -SMA immunofluorescence was implemented to investigate the endothelial to mesenchymal transition in cardiac microvessels. Western Blot was used to analyze the expression of α -SMA and CD31 in ventricular tissue of infarcted border zone. Data were analyzed by one-way ANOVA or Kruskal-Wallis H non-parametric test. 【Results】 Compared with normal saline group, treatment with different doses of CDDP could increase ejection fraction and fractional shortening significantly ($P<0.05$ at least), decrease left ventricular end-diastolic volume and the E/A ratio significantly ($P<0.05$ at least), reduce the cardiac collagen volume fraction (both $P<0.05$), and suppress the expression of mesenchymal marker α -SMA in cardiac microvessels detected by immunofluorescent staining ($P<0.05$ at least), and decrease the expression of α -SMA and increase the expression of CD31 in ventricular tissue of infarcted border zone detected by Western blot. 【Conclusion】 Treatment with 40/80/120 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ doses of CDDPs for 4 weeks could improve cardiac function in rats underwent ischemia-reperfusion, this might be through reducing the occurrence of endothelial to mesenchymal transition in microvessels within heart tissue, and subsequently decreasing the cardiac fibrosis.

Key words: compound Danshen dripping pills; myocardial infarction; ischemia reperfusion; endothelial to mesenchymal transition

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2021, 42(3):355-363]

冠状动脉阻塞引起的持续性缺血可引起心肌梗死(myocardial infarction, MI),进而导致心肌纤维化(cardiac fibrosis, CF)并最终进展为心力衰竭(heart failure, HF)。尽管通过溶栓治疗或直接经皮冠状动脉介入治疗(primary percutaneous coronary intervention, PPCI)及时进行再灌注,但仍有相当多的患者进展为HF甚至死亡^[1]。因此,涉及再灌注预后相关的研究可以进一步使这些人群受益。先前的研究表明心肌组织内血管的内皮间质转化(endothelial-mesenchymal transition, EndMT)可能参与MI及CF的发生、发展^[2-4]。当缺血性微环境改变后,心组织内的血管内皮细胞可能会经历EndMT并离开微血管床进入间质,在那里它们分化为成纤维细胞,从而在血管周围区域产生大量的细胞外基质,导致心脏微血管功能障碍,进而减少其血液供应。尽管适度的EndMT有助于MI后肉芽组织的形成参与心脏修复,但过量的纤维疤痕也会导致心室重构和HF。在EndMT期间,血管内皮细胞会失去其特定的内皮标记物,如血小板内皮细胞粘附分子(platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM/CD31),获得包括平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)在内的间质标记物^[5-6]。中医药

在心血管疾病防治中具有一定作用,其中复方丹参滴丸(compound Danshen dripping pills, CDDP)于1994年获得中国食品药品监督管理局批准用于治疗缺血性心绞痛。研究表明,CDDP可以通过改善心功能、预防心肌缺血和凋亡、减少心肌损伤和纤维化从而产生心血管保护作用^[7]。在体内心肌缺血-再灌注(myocardial ischemia reperfusion, MIR)模型中,CDDP可以减轻心的微循环障碍和心肌损伤、减少MIR损伤并改善心肌纤维化^[8-10]。早期的研究发现CDDP可以保护血管内皮细胞^[11-12]。由于EndMT参与MI及CF的发生发展过程,因此,我们推测在冠状动脉阻塞导致的MIR中,CDDP可能通过保护心组织内的血管内皮细胞进而抑制过度EndMT的发生而发挥上述心血管保护作用。因此,在这项研究中,我们探讨了MIR后不同剂量CDDP对心功能的影响,进而研究其对CF的作用,及在心肌微血管EndMT这一病理过程的作用。

1 材料与amp;方法

1.1 主要仪器、试剂及材料

小动物呼吸机(上海继德器械),生理信号采集

和处理系统(四川成都仪器),体温维持仪(上海玉研仪器),动物手术器械包(深圳瑞沃德生命科技),小动物气体麻醉机(深圳瑞沃德生命科技),小动物超声成像系统(加拿大FUJIFILM VisualSonics),组织处理系统(美国Thermo Scientific),石蜡包埋系统及切片系统(德国Leica Biosystems),荧光及明场扫描系统(奥地利Taborstrasse),化学发光成像系统(美国ProteinSimple),复方丹参滴丸(天津天士力医药集团有限公司提供),戊巴比妥钠(山东西亚试剂),Western细胞裂解液及PMSF、SDS-PAGE试剂盒(上海碧云天生物),ECL底物(美国Thermo Scientific),HE染色及Masson三色染色试剂盒(武汉赛维尔生物),PVDF膜(德国Merck KGaA),兔抗大鼠 α -SMA(英国Abcam),兔抗大鼠CD31(英国Abcam),兔抗大鼠GAPDH(杭州华安生物),山羊抗兔二抗(美国Jackson ImmunoResearch),山羊抗小鼠二抗(美国ThermoFisher),免疫荧光抗体 α -SMA(美国Affinity),免疫荧光抗体CD31(英国Abcam),Alexa Fluor 488偶联二抗(美国Life Technologies)。

1.2 实验动物及分组

本研究已获得广州永诺生物动物中心实验动物福利与伦理委员会的批准,伦理编号为IACUC-G16033。所有实验动物均按照National Research Council实验动物养护和使用指南(2011版)进行相应处置。40只8周龄雄性SD大鼠,体质量(250±20)g,购自济南朋悦实验动物育种有限公司。所有实验动物均在温度为(25±2)°C、昼夜周期为12h、相对湿度为(50±10)%的SPF动物房饲养。将CDDPs药丸溶于生理盐水中配制成不同剂量溶液,使用前充分混匀。大鼠在手术前被随机分为以下5组:假手术组(等量生理盐水灌胃),心肌缺血-再灌注模型组分为对照组(等量生理盐水灌胃)及CDDP低、中、高剂量组(分别给予40、80、120 mg·kg⁻¹·d⁻¹ CDDP灌胃)。所有动物从术后第2天灌胃给药,持续4周。

1.3 心肌缺血-再灌注模型

按照我们既往的方法建立MIR模型^[13]。大鼠在7d的适应性饲养和检疫后,腹腔注射戊巴比妥钠(40~50 mg/kg)进行麻醉。夹趾反应确保麻醉后进行气管插管,设置呼吸机参数使其与麻醉大鼠的呼吸频率同步,然后将气管插管连接至呼吸机。手术前,使用生理信号收集和处理系统记录大鼠心电图。

经胸骨左缘第3肋间隙开胸,7-0丝线结扎左冠状动脉前降支(LAD)。45 min后,松开结扎线进行再灌注。假手术组仅开胸,并在相应部位穿线但不结扎LAD。手术后,继续对大鼠进行15 min的心电监测,并将其置于30°C的加热垫上直至苏醒。

1.4 超声心动图

5%异氟烷吸入预麻醉大鼠,待动物麻醉后迅速转移到Vevo®3100小动物超声成像系统的加热垫,并以1~2%的异氟烷维持麻醉。剃除左前胸的皮毛,涂抹少量超声耦合剂,然后使用MX250超声探头(频率18~25 MHz)测量胸骨旁左心室短轴切面(乳头肌水平)和心室长轴切面的M模式图像。通过多普勒超声测量二尖瓣E波及A波的峰流速(单位cm/s)和其比值(E/A ratio)评估心脏舒张功能。所有图像均以原始格式(DICOM)进行保存,并使用FUJIFILM VisualSonics的配套软件包VevoLAB 3.0获取超声数据。

1.5 样本采集与制备

10%水合氯醛麻醉大鼠,固定四肢后开胸,获取鼠心,去除心耳及血管组织,并将其横切为两部分。心底1/2组织使用液氮速冻,随后转移至-80°C冰箱进行后续实验。心尖1/2组织固定于40 g/L多聚甲醛,第2天转移至70%乙醇溶液中,然后使用组织处理系统Excelsior™AS进行梯度乙醇脱水、二甲苯透明及液体石蜡浸蜡,随后通过石蜡包埋系统HistoCore Arcadia进行包埋留待后续形态学及病理学实验。动物尸体按照中山大学动物伦理及福利规定统一进行无害化处理。

1.6 组织学及形态学分析

将包埋的鼠心组织在石蜡切片系统以5 μm连续切片,然后按照试剂盒说明进行HE染色及Masson三色染色。石蜡切片脱蜡至水,HE染色依次进行苏木素染色3~5 min,自来水冲洗,分化液分化3 s,自来水冲洗,返蓝液返蓝约3 s,自来水冲洗,85%和95%乙醇依次脱水各4 min,伊红染液4~5 min,无水乙醇脱水3次每次4~5 min,正丁醇透明4~5 min,二甲苯透明两次每次2~4 min,中性树脂胶封片。Masson染色依次进行Masson A液15 h,65°C烤箱加热30 min,自来水冲洗,Masson B液及C液混合染色1 min,自来水冲洗,1%盐酸酒精分化1 min,自来水冲洗,Masson D液浸染6 min,快速水洗,Masson E液浸染约1 min,Masson F液浸染8 s~15 s,1%冰醋酸漂洗分化3次每次8 s,无水乙醇脱

水3次每次4~5 min,二甲苯透明两次每次2~4 min,中性树胶封片。所有玻片均通过荧光及明场扫描系统 TissueFAXS PLUS 以 200× 进行扫描。Masson 三色染色的胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)通过 ImageJ(版本 1.8.0)插件进行计算^[14]。

1.7 免疫荧光检测

石蜡切片脱蜡至水,二甲苯透明3次,每次5 min,梯度酒精(无水、95%、75%)分别脱水5 min, TBS 冲洗3次每次3 min。pH9.0 EDTA 高压锅抗原修复2 min,蒸馏水浸洗3 min。3% H₂O₂ 阻断30 min,蒸馏水浸洗3 min,组画笔画圈后置于TBST, 10%山羊血清室温封闭30 min。弃去血清,每张玻片滴加 CD31(1:800)约 50 μL, 4℃ 孵育过夜。次日, TBST 冲洗3次玻片,每张玻片滴加 50 μL HRP 偶联的山羊抗兔二抗(1:4 000), 37℃ 孵育45 min, TBST 冲洗3次每次5 min。滴加 50 μL CY3 工作液(1:200), 室温孵育10 min, TBST 浸洗3次,每次5 min。pH6.0 柠檬酸抗原修复5 min,蒸馏水浸洗3 min。组画笔画圈后置于TBST, 10%山羊血清室温封闭30 min。弃去血清,每张玻片滴加 α-SMA(1:200)约 50 μL, 4℃ 孵育过夜。第3天, TBST 冲洗3次玻片,每张玻片滴加 50 μL Alexa Fluor488 偶联的驴抗兔二抗(1:400), 37℃ 孵育45 min, TBST 浸洗3次每次5 min。每张玻片滴加 50 μL DAPI 工作液(1:500), 避光染核5 min, TBST 冲洗。荧光封片剂封片,避光保存。所有玻片均通过荧光和明场扫描系统 TissueFAXS PLUS 进行扫描,随机采集 CD31/α-SMA 阳性染色鼠心组织微血管的 400× 放大照片。使用 ImageJ(版本 1.8.0)测量 α-SMA 的平均灰度值进行统计分析。

1.8 蛋白质印迹分析

按照试剂说明书,使用细胞裂解液从约 150 mg 的梗死周边心室组织中提取组织总蛋白。14 000×g 离心取上清,混合加样缓冲液,100℃ 煮沸10 min 变性蛋白质。将约 50 μg 蛋白质在 5%~15% 的 SDS-PAGE 中进行电泳,然后转移到 0.22 μm PVDF 膜上,并在 4℃ 下与 CD31(1:1 000)、α-SMA(1:1 000)及 GAPDH(1:5 000)孵育过夜。次日,使用 TBST 清洗膜并与 HRP 偶联二抗(1:10 000)室温孵育1 h,然后在膜上滴加 ECL 底物并在化学发光成像系统 FluorChem™ E 中进行曝光。蛋白质条带的积分光密度(Integrated Density, IntDen)使用 ImageJ 软件(版本 1.8.0)进行测量,计算靶蛋白/内参蛋白的

IntDen 比值,然后将其余4组比值/NS组比值获得 IntDen 比值的倍数。每个靶蛋白均进行3次重复实验。

1.9 统计分析

所有数据均以 Mean±SEM 或 Mean±SD 表示(在图注中有详细说明)。数据在 Shapiro-Wilk 正态性检验后,各组定量资料都呈正态分布并且作方差齐性检验。方差齐资料用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行分析;反之用多组独立样本 Kruskal-Wallis *H* 非参数检验进行统计分析,有统计学意义时使用 Bonferroni 法进行多重比较。 $P<0.05$ 的被认为有统计学差异。所有统计分析均使用 SPSS 26.0 进行。

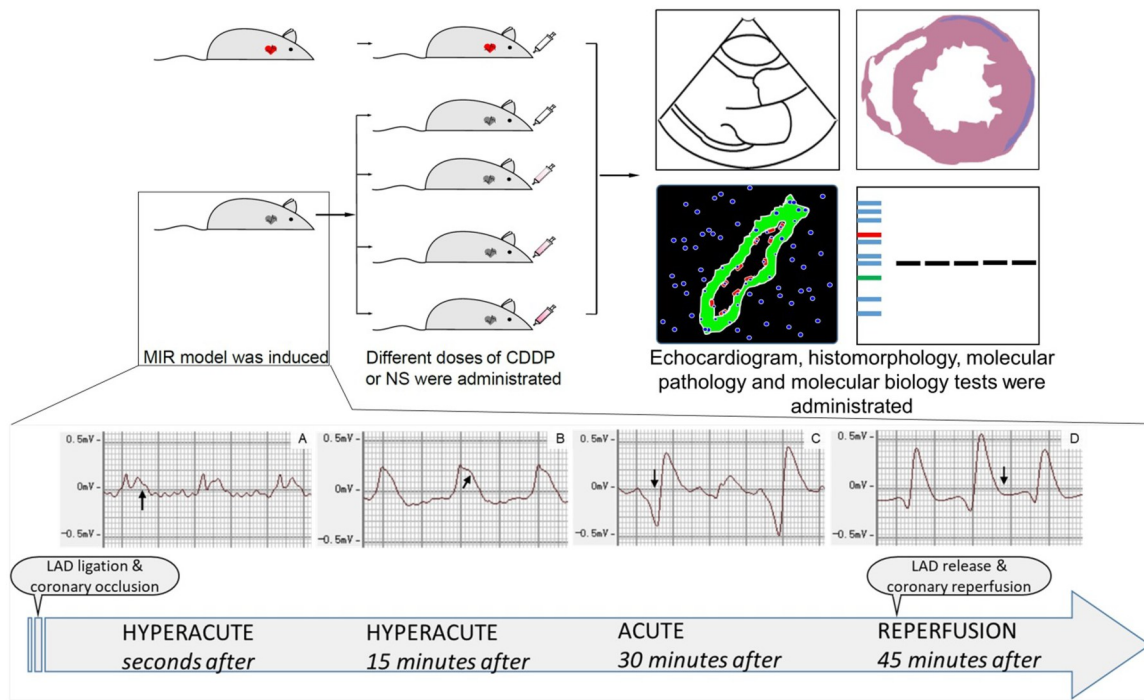
2 结果

2.1 术中心电图监测结果

为了确保缺血-再灌注模型的稳定性,所有动物均在术中进行心电监测。如图1所示,心电监测显示结扎左冠状动脉前降支后出现超急性期心肌梗死心电图表现,即 T 波逐渐升高;数分钟后出现急性期心肌梗死心电图表现,即 ST 段抬高直至弓背向上;结扎 30 min 时,心电图出现宽而大的 Q 波(即病理性 Q 波)。45 min 后,松开结扎线进行再灌注,抬高的 ST 段逐渐恢复正常。

2.2 复方丹参滴丸对缺血-再灌注大鼠心功能的作用

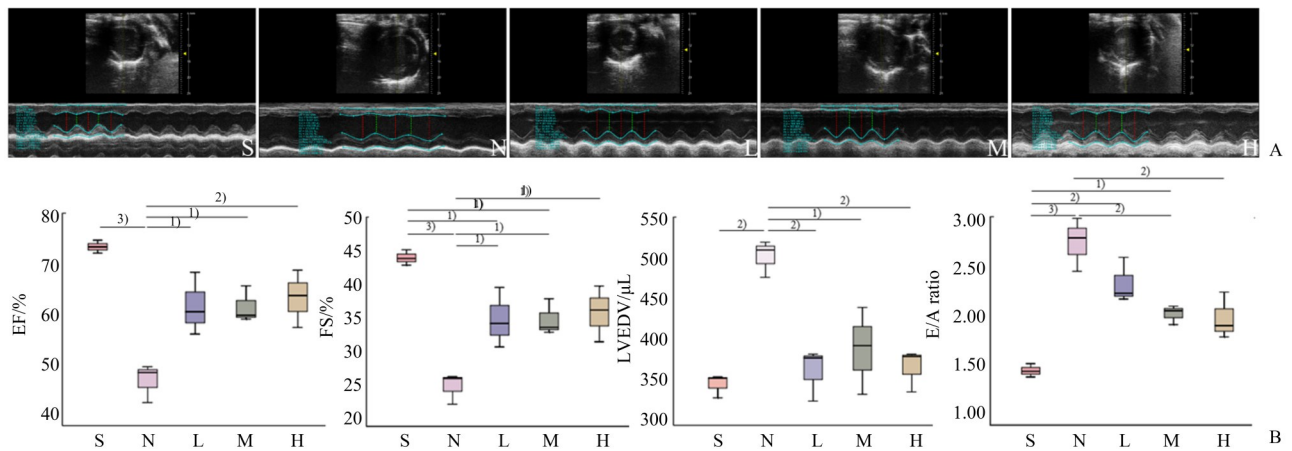
为了研究 CDDP 对缺血-再灌注大鼠心功能的作用,在干预终点进行了超声心动图。如图 2B 所示,超声结果表明,与假手术组比较,NS 组左室射血分数(ejection fraction, EF)和短轴缩短率(fractional shortening, FS)显著降低(分别为 $F=13.467$ 、 $P=0.000$; $F=13.587$ 、 $P=0.000$),而左室舒张末期容积(left ventricular end-diastolic volume, LVEDV)及 E/A 比率显著升高(分别为 $F=11.333$ 、 $P=0.001$; $F=17.590$ 、 $P=0.000$),差异有统计学意义(分别为 $P_{EF}=0.000$ 、 $P_{FS}=0.000$ 、 $P_{LVEDV}=0.001$ 及 $P_{E/A}=0.000$)。而与 NS 组相比,低、中、高剂量 CDDP 可改善 EF(分别为 $P_L=0.015$ 、 $P_M=0.016$ 、 $P_H=0.008$)及 FS(分别为 $P_L=0.022$ 、 $P_M=0.022$ 、 $P_H=0.012$),减少了 LVEDV(分别为 $P_L=0.002$ 、 $P_M=0.011$ 、 $P_H=0.003$)并降低了 E/A 比率(分别为 $P_L=0.154$ 、 $P_M=0.008$ 、 $P_H=0.005$),差异有统计学意义。然而,不同剂量 CDDP 组间差异没有统计学意义($P>0.05$)。



Flow diagram and representative electrocardiograms of seconds after (A), 15 minutes after (B), 30 minutes after (C) LAD ligation and coronary occlusion, and LAD release and coronary reperfusion following 45 minutes' ligation (D); MIR: myocardial ischemia reperfusion; LAD: left anterior descending coronary artery.

图1 流程图及代表性术中心电图

Fig. 1 Flow diagram and representative electrocardiograms



A: Representative echocardiogram images of different groups; data was collected from 3 random cardiac cycle of a relatively constant section. B: Data of EF ($F=13.467, P=0.000; P_S=0.000, P_L=0.015, P_M=0.016, P_H=0.008$ versus NS), FS ($F=13.587, P=0.000; P_S=0.000, P_L=0.022, P_M=0.022, P_H=0.012$ versus NS), LVEDV ($F=11.333, P=0.001; P_S=0.001, P_L=0.002, P_M=0.011, P_H=0.003$ versus NS), and E/A ratio ($F=17.590, P=0.000; P_S=0.000, P_L=0.154, P_M=0.008, P_H=0.005$ versus NS) from each group ($n=5$), data is presented by box-plot after tested by one-way-ANOVA with Tukey's post-hoc test. S: sham operated, N: normal saline (NS) control, L: low dose (CDDP in $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), M: medium dose (CDDP in $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), H: high dose (CDDP in $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). EF: ejection fraction, FS: fractional shortening, LVEDV: left ventricular end diastolic volume, E/A ratio: the ratio of peak velocity in early diastole to peak velocity in atrial contraction. 1): $P < 0.05$; 2): $P < 0.01$; 3) $P < 0.001$.

图2 不同剂量复方丹参滴丸对缺血再灌注大鼠心功能的作用

Fig. 2 Effect of different doses of compound Danshen dripping pills on cardiac function in rats with ischemia-reperfusion

2.3 复方丹参滴丸对缺血-再灌注鼠心微环境及纤维化的作用

为了评估CDDP对缺血-再灌注鼠心组织形态的作用,在干预终点进行了鼠心组织的HE及Masson染色。HE染色结果表明,假手术组心肌纤维规律排列,无断裂及坏死性间隙,细胞核梭形或椭圆形。各模型组可见心肌坏死,肌纤维断裂、溶解,肌间隙增大。如图3C所示,Masson染色结果表明,与假手术组比较,各试验组均出现不同程度纤维化($F=22.753$, $P=0.000$),差异有统计学意义(NS组 $P=0.000$,低、中、高剂量组分别 $P=0.003$ 、 0.002 、 0.001)。且不同剂量CDDP组纤维化程度均较NS组降低,差异有统计学意义(低、中、高剂量组分别 $P=0.014$ 、 0.022 、 0.036)。然而,不同剂量CDDP组间差异没有统计学意义($P>0.05$)。

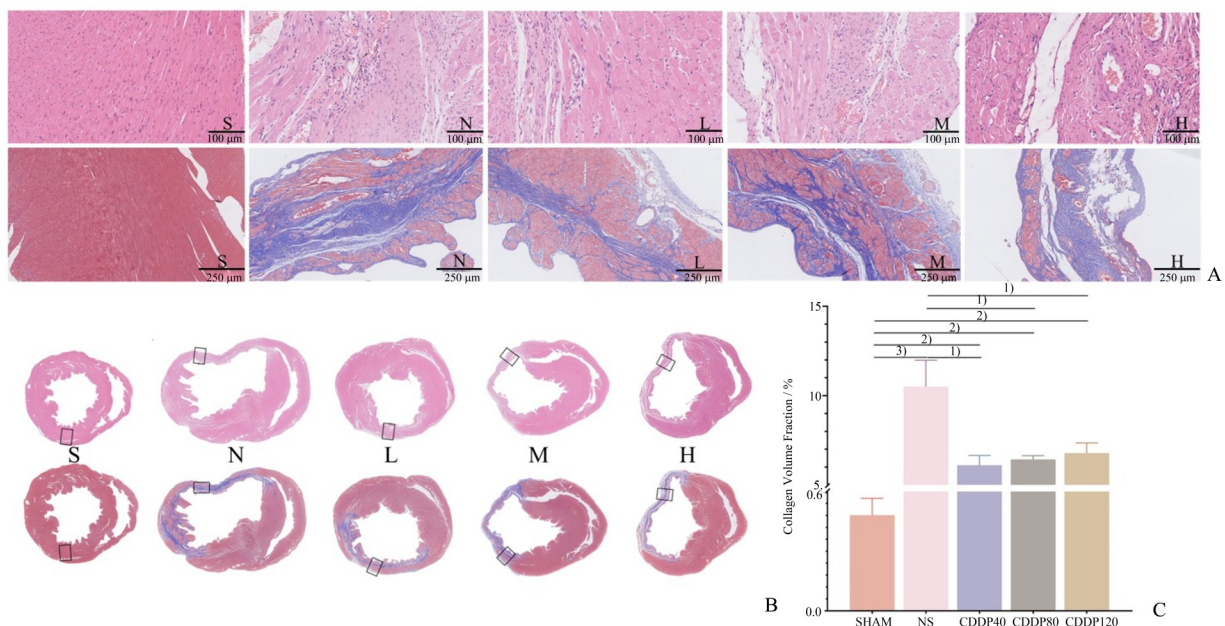
2.4 复方丹参滴丸对缺血-再灌注鼠心微血管内皮-间质转化的作用

为了评估CDDP对缺血-再灌注鼠心微血管内皮-间质转化的作用,在干预终点进行了鼠心微血管的CD31/ α -SMA免疫荧光染色。如图4A所示,

CY3标记的CD31(红色荧光)作为血管内皮细胞的标记物,而Alexa Fluor488标记的 α -SMA(绿色荧光)作为血管平滑肌细胞的标记物。图4B的 α -SMA免疫荧光半定量结果显示,与假手术组比较,各实验组间质标记物 α -SMA的平均荧光强度(mean gray value, MGV)均显著增强($F=88.232$, $P=0.000$),差异有统计学意义(NS组、中和高剂量组调整的显著性分别 $P_N=0.000$ 、 $P_M=0.000$ 、 $P_H=0.000$)。而3个CDDP组MGV均较NS组显著减弱(调整的显著性分别 $P_L=0.000$ 、 $P_M=0.001$ 、 $P_H=0.041$),差异有统计学意义。组间比较结果显示,高剂量组MGV较低剂量组略增强($P=0.009$),而另两个CDDP组间MGV差异无统计学意义。

2.5 复方丹参滴丸对缺血-再灌注大鼠心室组织内皮-间质转化的作用

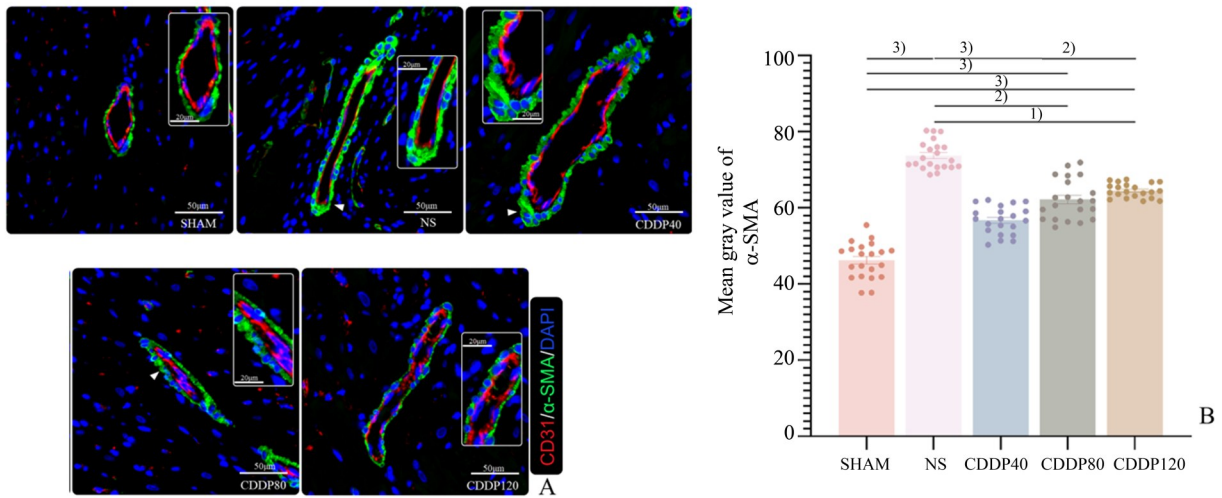
为了评估CDDP对缺血-再灌注大鼠心室组织内皮-间质转化的作用,进行了梗死周边心室组织总蛋白的Western Blot。如图5所示,数据以倍数表示,与假手术组比较,NS组的CD31表达显著降低(0.76 ± 0.02),而不同剂量CDDP较NS组显著增加



A: Representative HE and Masson's trichrome staining images of different groups (200 \times magnification for HE, 100 \times magnification for Masson). B: Representative thumbnails of HE and Masson's trichrome staining images of different groups. C: Data of collagen volume fraction ($F=22.753$, $P=0.000$; $P_S=0.000$, $P_L=0.014$, $P_M=0.022$, $P_H=0.036$ versus NS) from Masson's trichrome staining ($n=3$ for each group), data is presented in mean \pm SEM after tested by one way-ANOVA with Tukey's post-hoc test. S: sham operated; N: normal saline (NS) control; L: low dose (CDDP in $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$); M: medium dose (CDDP in $80 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$); H: high dose (CDDP in $120 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$, 3) $P < 0.001$.

图3 不同剂量复方丹参滴丸对缺血再灌注鼠心微环境及纤维化的作用

Fig. 3 Effect of different doses of compound Danshen dripping pills on cardiac microenvironment and fibrosis in rats with ischemia-reperfusion



A: Representative CD31/ α -SMA double staining immunofluorescence images of cardiac microvessels of different groups (400 \times magnification). B: The mean gray value data ($F=88.232, P=0.000; P_s=0.000, P_L=0.000, P_M=0.001, P_H=0.041$ versus NS) of α -SMA of 20 random cardiac microvessels of different groups ($n=3$ for each group). Data is presented in mean \pm SEM after tested by two-sided independent samples Kruskal-Wallis H non-parametric test with Bonferroni correction of multiple tests. 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$, 3) $P < 0.001$.

图4 不同剂量复方丹参滴丸对缺血再灌注鼠心微血管内皮-间质转化的作用

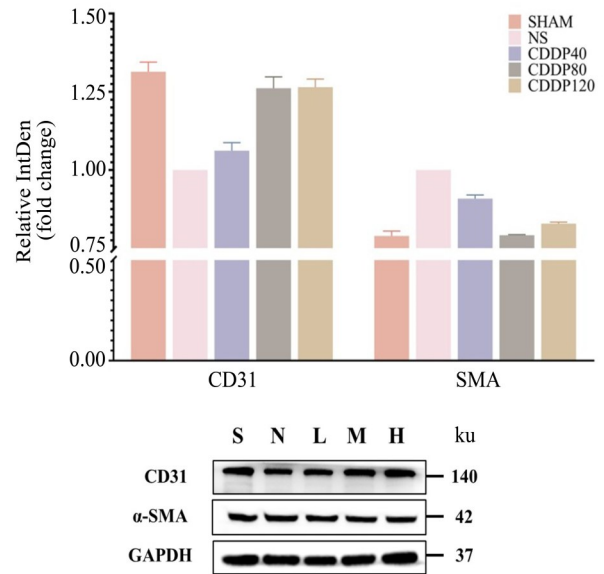
Fig. 4 Effect of compound Danshen dripping pills on EndMT of cardiac microvessels in rats with ischemia-reperfusion

了CD31的表达(低剂量组: 1.06 ± 0.03 、中剂量组: 1.26 ± 0.04 、高剂量组: 1.26 ± 0.03)。NS组的 α -SMA表达比假手术组显著升高(1.25 ± 0.01),而不同剂量CDDP较NS组显著降低了 α -SMA的表达(低剂量组: 0.91 ± 0.01 、中剂量组: 0.79 ± 0.01 、高剂量组: 0.83 ± 0.01)。

3 讨论

本研究通过45min的LAD结扎随后开放建立MIR大鼠模型,然后给予不同剂量CDDP灌胃治疗4周。结果表明,CDDP可以改善大鼠再灌注后的心功能,改善再灌注后的鼠心微环境,减少心肌纤维化。

解剖学上,心主要有两种内皮细胞:心内膜内皮细胞(endocardial endothelial cells, EECs)和心脏血管的内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs),心脏中的VECs主要存在于心室肌的致密层^[15],构成小、微血管的内皮。在病理生理上,稳定功能的血管对于维持和恢复缺血心肌的心功能是必不可少的^[3]。当冠状动脉阻塞导致心肌缺血后,VECs脱离血管内皮层,然后经EndMT转化为肌成纤维细胞,导致在血管周围区域的间质中生成大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM),从而产生内皮



Representative Western Blot bands of CD31 and α -SMA of different groups, and the relative IntDen data. Data are presented in fold change (NS=1) by mean \pm SD from 3 samples of each group. S: sham operated; N: normal saline (NS) control; L: low dose (CDDP in 40 mg \cdot kg $^{-1}$ \cdot d $^{-1}$); M: medium dose (CDDP in 80 mg \cdot kg $^{-1}$ \cdot d $^{-1}$); H: high dose (CDDP in 120 mg \cdot kg $^{-1}$ \cdot d $^{-1}$). IntDen: integrated density.

图5 不同剂量复方丹参滴丸对缺血再灌注大鼠心室组织内血管内皮-间质转化的作用

Fig. 5 Effect of compound Danshen dripping pills on EndMT in micro vessels within cardiac tissue in rats that underwent ischemia-reperfusion

功能显著减弱的间质细胞^[16]。最后,微环境被破坏,这又进一步减少了已经缺血心肌的血液供应。因此,保护 VECs 并减轻 EndMT 的程度可能对缺血再灌注的心脏有益。我们的研究结果表明,不同剂量的 CDDP 均可以在一定程度上抑制鼠心微血管 EndMT 的发生,这表现为在鼠心微血管免疫荧光染色中间质标记物 α -SMA 表达的降低,和 Western blot 检测到梗死周边心室组织中 α -SMA 表达降低以及内皮标记物 CD31 表达增加。EndMT 本质上参与了心肌纤维化的发展过程^[17],因此纤维化程度也可以反映 EndMT 的状态。我们的数据表明,不同剂量 CDDP 均可减少 MIR 后的心肌纤维化,提示 CDDP 可能通过减少心组织内血管的 EndMT 而减轻了 MIR 心脏的纤维化。

心肌发生梗死时,收缩性肌纤维丢失,导致收缩功能发生障碍。因心肌梗死引起的间质水肿和心肌纤维化,使左室顺应性受损进而影响其舒张功能。而过度的 EndMT 导致大量 ECM 在心肌细胞外沉积,破坏了正常的心组织结构,这也加剧了心肌纤维化的程度。我们的研究中,对照组的左室收缩功能障碍表现为 EF 及 FS 的显著降低和 LVEDV 的显著升高,而舒张功能受损表现为 E/A 的显著升高。E/A 是体现舒张功能的指标,其在急性心肌缺血及心肌梗死模型中均升高^[18]。CDDP 治疗结果表明,其不同剂量在改善鼠心收缩功能的同时对舒张功能也具有一定的作用。因此,通过减少心组织内血管的 EndMT 及减轻由此导致的心肌纤维化,可在一定程度上改善缺血及梗死后心功能。

CDDP 是一种由丹参、三七和冰片组成的复方中成药,它在中国已有 20 多年的用药历史。2016 年, Dantonic[®](CDDP 的胶囊制剂)完成了美国食品药品监督管理局的 III 期临床试验(ID: NCT01659580), Top-Line 分析报告显示, Dantonic[®] 可以显著增加慢性稳定型心绞痛患者的总体运动持续时间,并呈现剂量-效应关系。临床上, CDDP

的剂量为 270mg 每日 3 次。在本研究中,我们参考多项研究^[9,19],同时根据 Dantonic[®] II 期临床试验的每日剂量(低剂量组: 250 mg/d,高剂量组: 375 mg/d),然后计算人与大鼠之间的体表面积差异得出动物的剂量 40、80、120 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 3 种剂量。我们的数据表明, CDDP 产生保护作用不完全呈现剂量依赖性。可能原因之一是由于其复杂的成分以及其在体内多功能多靶标的特点。最近的一项研究对 CD-DP 组分丹参的主要成分丹酚酸 A (salvianolic acid, SAA) 进行了研究,结果表明 SAA 具有保护作用并减弱了缺氧诱导的人肺动脉内皮细胞的 EndMT^[20]。这与我们研究的结果类似,提示 CDDP 抑制心组织内血管 EndMT 作用的主要成分可能是 SAA。

当前冠状动脉疾病是最常见的心血管疾病。对于急性 MI 患者,至关重要的是尽快开通梗死的罪犯血管。但是,在血运重建后,MI 的一些并发症(例如“无复流”现象)仍然存在^[21]。2018 年 ESC/EACTS 指南建议,在血运重建后,应采取药物治疗和其他二级预防措施以及心脏康复策略,以降低心力衰竭来的发病率、死亡率并进一步改善症状。一项早期的中国临床研究用心肌声学造影检查了 120 例接受或不接受 2 个月 CDDP 的 PCI 患者的心脏微循环,发现 CDDP 可有效改善急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)患者 PCI 后心脏的微循环^[22]。结合我们的研究,在 ACS 患者进行再灌注治疗之后给予 CDDP 可能进一步减少 HF 的发生并改善长期预后。未来仍需要进行大规模的临床研究和更多的体外研究,以探索再灌注后其对缺血心脏保护的方案 and 可能机制。

综上所述,复方丹参滴丸 40、80、120 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 治疗可改善大鼠心肌缺血-再灌注后的心功能,机制之一可能是通过抑制心组织内血管内皮-间质过度转化,进而减少缺血-再灌注后心肌纤维化。

参考文献

- [1] Bulluck H, Yellon DM, Hausenloy DJ. Reducing myocardial infarct size: challenges and future opportunities [J]. *Heart*, 2016, 102(5): 341-348.
- [2] Aisagbonhi O, Rai M, Ryzhov S, et al. Experimental myocardial infarction triggers canonical Wnt signaling and endothelial-to-mesenchymal transition [J]. *Dis Model Mech*, 2011, 4(4): 469-483.
- [3] Zhang H, Hui H, Li Z, et al. Pigment epithelium-de-

- rived factor attenuates myocardial fibrosis via inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition in rats with acute myocardial infarction [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41932.
- [4] Zhang Z, Wang J, Xu Y, et al. Menstrual blood derived mesenchymal cells ameliorate cardiac fibrosis via inhibition of endothelial to mesenchymal transition in myocardial infarction [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168 (2): 1711-1714.
- [5] Sanchez-Duffhues G, Orlova V, Ten Dijke P. In brief: Endothelial-to-mesenchymal transition [J]. *J Pathol*, 2016, 238(3): 378-380.
- [6] Jackson AO, Zhang J, Jiang Z, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition: A novel therapeutic target for cardiovascular diseases [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2017, 27(6): 383-393.
- [7] Liao W, Ma X, Li J, et al. A review of the mechanism of action of Dantonic[®] for the treatment of chronic stable angina [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 690-700.
- [8] Zhao N, Liu YY, Wang F, et al. Cardiotonic pills, a compound Chinese medicine, protects ischemia-reperfusion-induced microcirculatory disturbance and myocardial damage in rats [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 298(4): H1166-H1176.
- [9] Xu M, Hao H, Jiang L, et al. Cardiotonic pill reduces myocardial ischemia-reperfusion injury via increasing EET concentrations in rats [J]. *Drug Metab Dispos*, 2016, 44(7): 878-887.
- [10] Wei XH, Liu YY, Li Q, et al. Treatment with cardiotonic pills[®] after ischemia - reperfusion ameliorates myocardial fibrosis in rats [J]. *Microcirculation*, 2013, 20(1): 17-29.
- [11] 王东霞,王孝铭,许晶兰.复方丹参滴丸对人血管内皮细胞功能及形态保护作用的研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2006(05):933-937.
Wang DX, Wang XM, Xu JL. The protective effect of composite salviae dropping pills on human umbilical vein endothelial cells injured by lipopolysaccharide [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2006, 22 (5): 933-937: 05.
- [12] Ling S, Dai A, Guo Z, et al. Effects of a Chinese herbal preparation on vascular cells in culture: mechanisms of cardiovascular protection [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2005, 32(7): 571-578.
- [13] Cai A, Qiu R, Li L, et al. Atorvastatin treatment of rats with ischemia-reperfusion injury improves adipose-derived mesenchymal stem cell migration and survival via the SDF-1 α /CXCR-4 axis [J]. *PLoS one*, 2013, 8(12): e79100.
- [14] Landini G, Martinelli G, Piccinini F. Colour deconvolution: stain unmixing in histological imaging [J/OL]. *Bioinformatics*. (2020-09-30) [2021-03-02]. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa847>.
- [15] Li Y, Lui KO, Zhou B. Reassessing endothelial-to-mesenchymal transition in cardiovascular diseases. *Nat Rev Cardiol*. 2018, 15(8):445-456.
- [16] Bischoff J. Endothelial-to-Mesenchymal Transition [J]. *Circ Res*, 2019, 124(8): 1163-1165.
- [17] Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis [J]. *Nat Med*, 2007, 13(8): 952-961.
- [18] Sanchez P, Lancaster JJ, Weigand K, et al. Doppler assessment of diastolic function reflect the severity of injury in rats with chronic heart failure [J]. *J Card Fail*, 2017, 23(10): 753-761.
- [19] Guo J, Yong Y, Aa J, et al. Compound danshen dripping pills modulate the perturbed energy metabolism in a rat model of acute myocardial ischemia [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 1-13.
- [20] Yuan T, Chen Y, Zhang H, et al. Salvianolic acid A, a component of salvia miltiorrhiza, attenuates endothelial-mesenchymal transition of HPAECs induced by hypoxia [J]. *Am J Chin Med*, 2017, 45(06): 1185-1200.
- [21] Van de Werf F, Bax J, Betriu A, et al. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the task force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology [J]. *Eur Heart J*, 2008, 29(23): 2909-2945.
- [22] 范宝晶,赵学忠.复方丹参滴丸对急性冠脉综合征患者经皮冠脉介入治疗后心肌微循环的研究[J]. *中国新药杂志*, 2009, 18(10):903-906.
Fan BJ, Zhao XZ. Effect of compound Danshen dropping pills on myocardial microcirculation after percutaneous coronary intervention in patients with acute coronary syndrome [J]. *Chin New Drug J*, 2009, 18(10):903-906.