

·基础研究·

羟基喜树碱脂质体调节SphK1/S1P信号通路对心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响

李思阳¹, 李更东², 闫宇辉¹

(1. 江苏食品药品职业技术学院药学院, 江苏 淮安 223003; 2. 东北林业大学生命科学学院细胞生物学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:【目的】探讨羟基喜树碱脂质体(LHCPT)调节鞘氨醇激酶1(SphK1)/1-磷酸鞘氨醇(S1P)信号通路对心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响。【方法】SD大鼠分为对照组、模型组、羟基喜树碱(HCPT)组、LHCPT组、卡托普利组、LHCPT+K6PC-5(SphK1激活剂)组,每组12只。除对照组外,其他组大鼠均需通过腹腔注射阿霉素的方法构建心力衰竭大鼠模型,建模成功后,进行给药处理,给药一天一次,持续4周。彩色多普勒超声仪检测大鼠左室收缩末期内径(LVESD)、左室舒张末期内径(LVEDD)、左室射血分数(LVEF);HE、Masson染色分别检测大鼠心肌组织病理损伤、心肌纤维化;ELISA法检测大鼠心肌组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)水平;qRT-PCR检测大鼠心肌组织中转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、I型胶原蛋白(Collagen I)、III型胶原蛋白(Collagen III)表达;Western blot检测大鼠心肌组织中SphK1、S1P蛋白表达。【结果】与对照组比较,模型组大鼠心肌组织病理损伤及纤维化严重,LVESD、LVEDD、TNF- α 、IL-6水平、TGF- β 1、Collagen I、Collagen III mRNA表达及SphK1、S1P蛋白表达升高,LVEF降低($P < 0.05$);与模型组比较,HCPT组、LHCPT组、卡托普利组大鼠心肌组织病理损伤及纤维化减轻,LVESD、LVEDD、TNF- α 、IL-6水平、TGF- β 1、Collagen I、Collagen III mRNA表达及SphK1、S1P蛋白表达降低,LVEF升高($P < 0.05$);与LHCPT组比较,LHCPT+K6PC-5组大鼠心肌组织病理损伤及纤维化加剧,LVESD、LVEDD、TNF- α 、IL-6水平、TGF- β 1、Collagen I、Collagen III mRNA表达及SphK1、S1P蛋白表达升高,LVEF降低($P < 0.05$)。【结论】LHCPT可能通过抑制SphK1/S1P信号通路抑制心力衰竭大鼠心肌纤维化。

关键词:羟基喜树碱脂质体;心力衰竭;鞘氨醇激酶1/1-磷酸鞘氨醇信号通路;心肌纤维化

中图分类号:R285 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2023)05-0801-08

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0511

Effects of Hydroxycamptothecin Liposomes on Myocardial Fibrosis in Heart Failure Rats by Regulating Sphingosine Kinase 1/Sphingosine-1-Phosphate Signaling Pathway

LI Si-yang¹, LI Geng-dong², YAN Yu-hui¹

(1. School of Pharmacy, Jiangsu Food and Pharmaceutical Science College, Huai'an 223003, China;

2. Cell Biology, School of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Correspondence to: LI Si-yang, E-mail: lisy2137@sina.com

Abstract:【Objective】To investigate the effects of hydroxycamptothecin liposomes (LHCPT) on myocardial fibrosis in rats with heart failure by regulating the sphingosine kinase 1 (SphK1)/sphingosine-1-phosphate (S1P) signaling pathway.【Methods】SD rats were divided into control group, model group, hydroxycamptothecin (HCPT) group, LHCPT group, captopril group, and LHCPT+K6PC-5 (SphK1 activator) group, with 12 rats in each group. The heart failure rat models in all groups except the control group were established by intraperitoneal injection of doxorubicin and then the cor-

收稿日期:2023-05-15

基金项目:江苏省高校自然科学研究面上项目(17KJB360002);2022年江苏省高职院校教师专业带头人高端研修项目(2022TDFX004)

作者简介:李思阳,第一作者,通信作者,副教授,研究方向:纳米制剂,E-mail:lisy2137@sina.com

responding drugs were given once a day. After four weeks, we applied color Doppler ultrasound to detect left ventricular end systolic diameter (LVESD), left ventricular end diastolic diameter (LVEDD), and left ventricular ejection fraction (LVEF) in rats; HE and Masson staining for myocardial pathological damage and myocardial fibrosis in rats, respectively; ELISA method for the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in rat myocardial tissues; qRT-PCR for the expression of transforming growth factor- β 1 (*TGF- β 1*), type I collagen (*Collagen I*), and type III collagen (*Collagen III*) in rat myocardial tissues; Western blot for the expression of SphK1 and S1P proteins in rat myocardial tissues.【Results】Compared with the control group, the model group showed severe myocardial pathological damage and myocardial fibrosis, increased LVESD, LVEDD, levels of TNF- α and IL-6, expression of *TGF- β 1*, *Collagen I*, *Collagen III*, SphK1, S1P and decreased LVEF ($P<0.05$). Compared with the model group, the HCPT group, LHCPT group and captopril group showed alleviated myocardial pathological damage and myocardial fibrosis, decreased LVESD, LVEDD, levels of TNF- α and IL-6, expression of *TGF- β 1*, *Collagen I*, *Collagen III*, SphK1, S1P and increased LVEF ($P<0.05$). Compared with the LHCPT group, the LHCPT+K6PC-5 group showed aggravated myocardial pathological damage and myocardial fibrosis, increased LVESD, LVEDD, levels of TNF- α and IL-6, expression of *TGF- β 1*, *Collagen I*, *Collagen III*, SphK1, S1P and decreased LVEF ($P<0.05$).【Conclusion】LHCPT may inhibit myocardial fibrosis in heart failure rats by inhibiting the SphK1/S1P signaling pathway.

Key words: hydroxycamptothecin liposomes (LHCPT); heart failure; sphingosine kinase 1 (SphK1)/sphingosine-1-phosphate (S1P) signaling pathway; myocardial fibrosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2023, 44(5): 801-808]

心力衰竭是一种慢性进行性心血管疾病,其特征是心脏功能异常,心肌肥大和由于心脏收缩或舒张功能受损引起的心肌重塑^[1-2]。其与全球发病率和死亡率的增加密切相关,且严重影响患者的生活质量、心脏功能^[3-4]。目前用于治疗心力衰竭的药物主要有血管紧张素转换酶抑制剂、 β 阻滞剂、盐皮质类固醇受体拮抗剂、醛固酮受体拮抗剂和利尿剂。然而,长期使用这些药物可导致低血压、电解质紊乱等不良反应^[5]。大量研究表明,炎症和纤维化在心力衰竭的病理生理学中起着至关重要的作用^[6]。因此,开发新的抗炎和抗纤维化疗法对于改善心力衰竭具有重要意义。羟基喜树碱(hydroxycamptothecin, HCPT)是一种内皮抑素生物碱和喜树碱的羟基衍生物,其具有免疫抑制和抗纤维化的作用^[7]。据报道,HCPT可抑制人角膜成纤维细胞纤维化^[8];HCPT可抑制肝纤维化大鼠肝纤维化^[9]。以上研究表明HCPT具有抑制纤维化的作用。然而由于HCPT半衰期短,靶向性差,临床用药时常需要延长用药疗程,最终导致消化道毒性^[10]。脂质体是目前研究较为广泛的药物递送系统,与游离药物相比,脂质体制剂通过增强细胞通透性,延长血液循环时间,降低药物毒性,在病理区域实现更多的药物积累来发挥更优越的治疗效果^[11]。但羟基喜树碱脂质体(hydroxycamptothecin liposomes, LHCPT)对心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响鲜有报

道。相关研究报道,心肌梗死是导致心力衰竭最常见的原因,而鞘氨醇激酶1(sphingosine kinase 1, SphK1)/1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate, S1P)信号通路的上调是导致心肌梗死大鼠心肌纤维化和炎症的重要机制^[12]。但LHCPT能否通过调控SphK1/S1P信号通路影响心力衰竭大鼠心肌纤维化尚不明确。因此,本研究主要探究LHCPT对心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响以及其作用机制。

1 材料与amp;方法

1.1 动物

114只,体质量为200~210 g,6周龄的SPF级雄性SD大鼠购自广州市旭生生物科技有限公司,生产许可证号为SCXK(粤)2019-0045。所有动物实验均获得本院动物伦理委员会的批准(批准号:2022034)。饲养条件:温度22~24℃、湿度50%~55%、光照12 h/黑暗12 h,可自由饮水及摄食。

1.2 主要试剂

羟基喜树碱购自上海韵泰信息科技有限公司;羟基喜树碱脂质体购自南京思科药业有限公司;阿霉素、卡托普利购自上海广锐生物科技有限公司;SphK1激活剂K6PC-5购自美国MCE公司;大鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白

细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)ELISA 试剂盒购自上海恒斐生物科技有限公司;兔源一抗 SphK1、S1P、GAPDH、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗均购自英国 Abcam 公司。

1.3 心力衰竭大鼠模型的构建

将大鼠按照前3周每周腹腔注射一次3 mg/kg 阿霉素,后3周每周腹腔注射一次2 mg/kg 阿霉素的方式复制心力衰竭大鼠模型^[13],根据大鼠心功能及心肌组织病理变化来评估造模是否成功。

1.4 HCPT、LHCPT 最佳药物浓度的确定

随机选取21只SD大鼠,分别腹腔注射0、0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 mg/kg HCPT,每个药物剂量设置3个重复,每天注射一次,持续4周后,通过彩色多普勒超声仪检测大鼠左室收缩末期内径(left ventricular end systolic diameter, LVESD)、左室舒张末期内径(left ventricular end diastolic diameter, LVEDD)、左室射血分数(left ventricular ejection fractions, LVEF)的变化。

随机选取21只SD大鼠,分别腹腔注射0、0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 mg/kg LHCPT,每个药物剂量设置3个重复,每天注射一次,持续4周后,通过彩色多普勒超声仪检测大鼠 LVESD、LVEDD、LVEF 的变化。

1.5 动物分组及处理

按照随机数字表法将SD大鼠随机分为对照组、模型组、HCPT组、LHCPT组、卡托普利组、LHCPT+K6PC-5组,每组12只。对照组大鼠需以生理盐水代替阿霉素,其他操作同造模过程,除对照组外,其他组大鼠均需按照1.3所述方法构建心力衰竭大鼠模型,建模成功后,进行给药处理,HCPT、LHCPT的给药剂量是基于参考文献及前期预实验确定的,该剂量对正常SD大鼠心功能无明显影响。HCPT组^[9]、LHCPT组、卡托普利组^[14]大鼠分别需腹腔注射1 mg/kg HCPT、1 mg/kg LHCPT、9.322 mg/kg 卡托普利;LHCPT+K6PC-5组^[15]大鼠需同时腹腔注射1 mg/kg LHCPT和0.05 mg/kg K6PC-5;对照组、模型组大鼠腹腔注射等体积的生理盐水;各组大鼠给药每天一次,持续4周。

1.6 标本收集

末次处理24 h后,检测大鼠心功能指标 LVESD、LVEDD、LVEF 的变化;心功能指标检测结束后,20 g/L 戊巴比妥钠麻醉并处死大鼠,收集大鼠的心肌组织,分为两部分(每部分包含6只大鼠的心肌组织),一部分固定于40 g/L 多聚甲醛中用

于HE和Masson染色,另一部分冻存于-80℃中用于ELISA、qRT-PCR和Western blot检测。

1.7 LVESD、LVEDD、LVEF 的检测

通过彩色多普勒超声仪检测大鼠 LVESD、LVEDD、LVEF 的变化。

1.8 心肌组织的HE和Masson 染色检测

将用40 g/L 多聚甲醛固定的心肌组织包埋在石蜡中并切成5 μm厚的切片。用二甲苯脱蜡并通过不同等级的乙醇再水化后,将切片用苏木素和伊红染色,经脱水、封片后,使用HE染色图像通过炎症细胞浸润区域评估心肌组织病理损伤。

将切片常规脱蜡至水后,用Weiger氏铁苏木素染10 min,10 g/L 磷钼酸分化5 min,苯胺蓝液染5 min后,经脱水、透明、封片后,观察组织纤维化程度,并使用Image Pro Plus软件分析心力衰竭区的胶原面积分数以评估心肌纤维化程度,胶原面积分数=蓝染胶原面积/总可视面积×100%。

1.9 ELISA 法检测大鼠心肌组织中TNF-α、IL-6 水平

严格按照试剂盒说明书检测大鼠心肌组织匀浆中TNF-α、IL-6水平。

1.10 qRT-PCR 检测大鼠心肌组织中TGF-β1、Collagen I、Collagen III mRNA 表达

取1.5中各组大鼠的心肌组织,将组织匀浆后利用TRIzol试剂提取组织匀浆总RNA。将RNA逆转录为cDNA后,以cDNA为模板进行荧光定量PCR反应。以GAPDH为内参,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)、I型胶原蛋白(Collagen I)、III型胶原蛋白(Collagen III) mRNA的相对表达量,具体引物序列见表1。

1.11 Western blot 检测大鼠心肌组织中SphK1、S1P 蛋白表达

取1.9中的心肌组织匀浆用RIPA裂解缓冲液裂解并提取总蛋白,12 000 r/min($r=10$ cm)离心20 min后取上清,经定量后,将40 μg蛋白经电泳、转膜、封闭后,将膜与一抗SphK1(1:4 000)、S1P(1:5 000)、GAPDH(1:3 000)在4℃下孵育过夜,然后将膜与二抗(1:3 000)共同孵育1 h。加入ECL试剂观察蛋白条带印迹。利用Image J软件评估目的蛋白的灰度值。

1.12 统计学分析

采用SPSS 25.0软件进行统计学分析,符合正态分布和方差齐性的计量数据以平均值±标准差

表1 *TGF-β1*、*Collagen I*、*Collagen III* mRNA引物序列
Table 1 mRNA primer sequences of *TGF-β1*, *Collagen I* and *Collagen III*

Gene name	Forward primer (F)	Reverse primer (R)
GAPDH	CATTCTTCCACCTTTGAT	CTGTAGCCATATTCATTGT
<i>TGF-β1</i>	ATGGTGGACCGCAACAAC	ACAGCAATGGGGGTTCTG
<i>Collagen I</i>	GACCTAGACAGAGATGAACT	AATACACCACAGATAACAAC
<i>Collagen III</i>	CGATGAGATTATGACTTC	ATTACAGAATACCTTGATAG

TGF-β1: transforming growth factor-β1.

($\bar{x} \pm s$)表示。单因素方差分析用于多组间的差异比较,进一步两组间比较采用SNK-*q*检验。 $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度HCPT、LHCPT对大鼠心功能指标LVESD、LVEDD、LVEF变化的影响

单因素方差分析显示,不同浓度HCPT大鼠心功能指标LVESD、LVEDD、LVEF比较,差异有统计学意义($F=253.556, 143.742, 174.118, P < 0.001$)。组间两两比较显示:与0 mg/kg HCPT组比较,0.25、0.50、0.75、1.00 mg/kg HCPT组大鼠LVESD、LVEDD、LVEF变化的影响差异无统计学意义($P > 0.05$),1.25、1.50 mg/kg HCPT组大鼠LVESD、LVEDD升高,LVEF降低($P < 0.001$,表2)。

单因素方差分析显示,不同浓度LHCPT大鼠心功能指标LVESD、LVEDD、LVEF比较,差异有统计学意义($F=401.185, 130.018, 122.512, P < 0.001$)。组间两两比较显示:与0 mg/kg LHCPT组比较,0.25、0.50、0.75、1.00 mg/kg LHCPT组大鼠LVESD、LVEDD、LVEF变化的影响差异无统计学意义($P > 0.05$),1.25、1.50 mg/kg LHCPT组大鼠LVESD、LVEDD升高,LVEF降低($P < 0.001$,表3)。

2.2 LHCPT对各组大鼠心功能的影响

单因素方差分析显示,6组大鼠心功能指标LVESD、LVEDD、LVEF比较,差异有统计学意义($F=364.831, 59.893, 313.702, P < 0.001$)。组间两两比较显示:与对照组比较,模型组大鼠LVESD、LVEDD升高,LVEF降低($P < 0.001$);与模型组比较,HCPT组、LHCPT组、卡托普利组大鼠LVESD、LVEDD降低,LVEF升高($P < 0.001$);与HCPT组比

表2 不同浓度HCPT对大鼠心功能指标LVESD、LVEDD、LVEF变化的影响

Table 2 Effects of different concentrations of HCPT on LVESD, LVEDD and LVEF in rats

($\bar{x} \pm s, n=12$)

Groups	LVESD/cm	LVEDD/cm	LVEF/%
0 mg/kg HCPT	0.22±0.01	0.48±0.04	76.65±3.06
0.25 mg/kg HCPT	0.21±0.02	0.50±0.03	78.12±3.11
0.50 mg/kg HCPT	0.21±0.01	0.49±0.03	77.26±2.98
0.75 mg/kg HCPT	0.22±0.02	0.50±0.04	78.06±3.01
1.00 mg/kg HCPT	0.20±0.01	0.48±0.03	76.65±3.02
1.25 mg/kg HCPT	0.36±0.03 ¹⁾	0.65±0.05 ¹⁾	61.62±2.54 ¹⁾
1.50 mg/kg HCPT	0.47±0.04 ¹⁾	0.81±0.03 ¹⁾	49.95±2.55 ¹⁾

HCPT: hydroxycamptothecin; LVESD: left ventricular end systolic diameter; LVEDD: left ventricular end diastolic diameter; LVEF: left ventricular ejection fractions. Compared with 0 mg/kg HCPT, ¹⁾ $P < 0.05$.

较,LHCPT组、卡托普利组大鼠LVESD、LVEDD降低,LVEF升高($P < 0.001$);与LHCPT组比较,LHCPT+K6PC-5组大鼠LVESD、LVEDD升高,LVEF降低($P < 0.001$,表4)。

2.3 LHCPT对各组大鼠心肌组织病理损伤及纤维化的影响

HE染色结果显示,对照组大鼠心肌纤维排列整齐,心肌间质间隙无炎性细胞浸润;模型组大鼠的心肌组织中存在显著增加的炎症细胞浸润;与模型组比较,HCPT组、LHCPT组、卡托普利组大鼠心肌组织病理损伤有所改善;与LHCPT组比较,LHCPT+K6PC-5组大鼠心肌组织病理损伤严重,见图1A。

Masson染色结果经单因素方差分析显示,6组大鼠心肌胶原面积分数比较,差异有统计学意义($F=214.476, P < 0.001$)。组间两两比较显示:与对

表3 不同浓度LHCPT对大鼠心功能指标LVESD、LVEDD、LVEF变化的影响

Table 3 Effects of different concentrations of LHCPT on LVESD, LVEDD and LVEF in rats

($\bar{x} \pm s, n=12$)

Groups	LVESD/cm	LVEDD/cm	LVEF/%
0 mg/kg LHCPT	0.21±0.02	0.46±0.03	75.58±3.15
0.25 mg/kg LHCPT	0.22±0.02	0.47±0.04	76.13±3.14
0.50 mg/kg LHCPT	0.20±0.01	0.48±0.04	74.95±3.05
0.75 mg/kg LHCPT	0.21±0.02	0.47±0.03	75.83±3.12
1.00 mg/kg LHCPT	0.22±0.01	0.46±0.03	76.05±3.11
1.25 mg/kg LHCPT	0.38±0.02 ¹⁾	0.66±0.04 ¹⁾	60.67±2.59 ¹⁾
1.50 mg/kg LHCPT	0.49±0.03 ¹⁾	0.79±0.06 ¹⁾	52.53±2.88 ¹⁾

LHCPT: hydroxycamptothecin liposomes; LVESD: left ventricular end systolic diameter; LVEDD: left ventricular end diastolic diameter; LVEF: left ventricular ejection fractions. Compared with 0 mg/kg LHCPT, ¹⁾ $P < 0.05$.

表4 各组大鼠心功能指标LVESD、LVEDD、LVEF变化比较

Table 4 Comparison of changes of LVESD, LVEDD and LVEF in cardiac function indexes of rats in each group

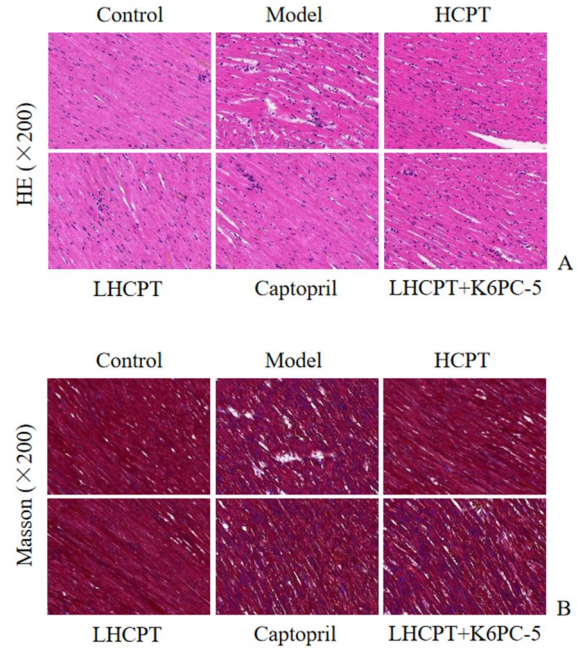
($\bar{x} \pm s, n=12$)

Groups	LVESD/cm	LVEDD/cm	LVEF/%
Control	0.22±0.01	0.49±0.04	77.36±3.19
Model	0.70±0.06 ¹⁾	0.77±0.06 ¹⁾	38.85±1.73 ¹⁾
HCPT	0.57±0.04 ²⁾	0.64±0.05 ²⁾	49.96±2.42 ²⁾
LHCPT	0.29±0.02 ²⁾³⁾	0.53±0.04 ²⁾³⁾	68.85±3.25 ²⁾³⁾
Captopril	0.26±0.02 ²⁾³⁾	0.54±0.04 ²⁾³⁾	69.93±3.28 ²⁾³⁾
LHCPT+K6PC-5	0.53±0.04 ⁴⁾	0.67±0.05 ⁴⁾	55.56±2.77 ⁴⁾

HCPT: hydroxycamptothecin; LHCPT: hydroxycamptothecin liposomes; LVESD: left ventricular end systolic diameter; LVEDD: left ventricular end diastolic diameter; LVEF: left ventricular ejection fractions. Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with Model group, ²⁾ $P < 0.05$; compared with HCPT group, ³⁾ $P < 0.05$; compared with LHCPT group, ⁴⁾ $P < 0.05$.

对照组比较,模型组大鼠心肌胶原面积分数升高($P < 0.001$);与模型组比较,HCPT组、LHCPT组、卡托普利组大鼠心肌胶原面积分数降低($P < 0.001$);与HCPT组比较,LHCPT组、卡托普利组大鼠心肌胶原面积分数降低($P < 0.001$);与LHCPT组比较,

LHCPT+K6PC-5组大鼠心肌胶原面积分数升高($P < 0.001$),见图1B和表5。



A: HE staining of myocardial tissue in each group of rats; B: Masson staining of myocardial tissue in each group of rats. HCPT: hydroxycamptothecin; LHCPT: hydroxycamptothecin liposomes. $\times 200$

图1 各组大鼠心肌组织的HE染色和Masson染色结果图
Fig. 1 HE staining and Masson staining of myocardial tissue of rats in each group

2.4 LHCPT对各组大鼠心肌组织中TNF- α 、IL-6水平的影响

单因素方差分析显示,6组大鼠心肌组织中TNF- α 、IL-6水平比较,差异有统计学意义($F = 890.790, 471.465, P < 0.001$)。组间两两比较显示:与对照组比较,模型组大鼠心肌组织中TNF- α 、IL-6水平升高($P < 0.001$);与模型组比较,HCPT组、LHCPT组、卡托普利组大鼠心肌组织中TNF- α 、IL-6水平降低($P < 0.001$);与HCPT组比较,LHCPT组、卡托普利组大鼠心肌组织中TNF- α 、IL-6水平降低($P < 0.001$);与LHCPT组比较,LHCPT+K6PC-5组大鼠组织中TNF- α 、IL-6水平升高($P < 0.001$,表6)。

2.5 LHCPT对各组大鼠心肌组织中TGF- $\beta 1$ 、Collagen I、Collagen III mRNA表达的影响

单因素方差分析显示,6组大鼠心肌组织中TGF- $\beta 1$ 、Collagen I、Collagen III mRNA表达比较,

表5 各组大鼠心肌胶原面积分数变化比较
Table 5 Comparison of myocardial collagen area fraction in all groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	Myocardial collagen area fraction/%
Control	0.61±0.01
Model	1.92±0.09 ¹⁾
HCPT	1.36±0.12 ²⁾
LHCPT	0.89±0.04 ²⁾³⁾
Captopril	0.88±0.06 ²⁾³⁾
LHCPT+K6PC-5	1.18±0.09 ⁴⁾

HCPT: hydroxycamptothecin; LHCPT: hydroxycamptothecin liposomes. Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with Model group, ²⁾ $P < 0.05$; compared with HCPT group, ³⁾ $P < 0.05$; compared with LHCPT group, ⁴⁾ $P < 0.05$.

表6 各组大鼠心肌组织中TNF- α 、IL-6水平变化比较
Table 6 Comparison of the levels of TNF- α and IL-6 in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	TNF- α /(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)
Control	32.25±2.03	68.22±2.79
Model	246.67±9.88 ¹⁾	179.93±6.25 ¹⁾
HCPT	166.54±7.61 ²⁾	143.37±5.88 ²⁾
LHCPT	94.46±3.95 ²⁾³⁾	85.55±3.77 ²⁾³⁾
Captopril	93.39±3.87 ²⁾³⁾	84.92±3.81 ²⁾³⁾
LHCPT+K6PC-5	126.67±5.33 ⁴⁾	151.52±6.78 ⁴⁾

HCPT: hydroxycamptothecin; LHCPT: hydroxycamptothecin liposomes; IL-6: interleukin-6; TNF- α : tumor necrosis factor- α . Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with Model group, ²⁾ $P < 0.05$; compared with HCPT group, ³⁾ $P < 0.05$; compared with LHCPT group, ⁴⁾ $P < 0.05$.

差异有统计学意义($F=309.847, 180.349, 168.341, P < 0.001$)。组间两两比较显示:与对照组比较,模型组大鼠心肌组织中TGF- $\beta 1$ 、Collagen I、Collagen III mRNA表达升高($P < 0.001$);与模型组比较,HCPT组、LHCPT组、卡托普利组大鼠心肌组织中TGF- $\beta 1$ 、Collagen I、Collagen III mRNA表达降低($P < 0.001$);与HCPT组比较,LHCPT组、卡托普利组大鼠心肌组织中TGF- $\beta 1$ 、Collagen I、Collagen III mRNA表达降低($P < 0.001$);与LHCPT组比较,LHCPT+K6PC-5组大鼠组织中TGF- $\beta 1$ 、Collagen I、Collagen III mRNA表达升高($P < 0.001$;表7)。

表7 各组大鼠心肌组织中TGF- $\beta 1$ 、Collagen I、Collagen III mRNA表达变化比较

Table 7 Comparison of mRNA expressions of TGF- $\beta 1$, Collagen I and Collagen III in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	TGF- $\beta 1$ mRNA	Collagen I mRNA	Collagen III mRNA
Control	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
Model	2.84±0.13 ¹⁾	2.39±0.12 ¹⁾	2.11±0.10 ¹⁾
HCPT	2.21±0.11 ²⁾	1.88±0.11 ²⁾	1.65±0.08 ²⁾
LHCPT	1.42±0.08 ²⁾³⁾	1.33±0.07 ²⁾³⁾	1.21±0.06 ²⁾³⁾
Captopril	1.43±0.09 ²⁾³⁾	1.31±0.08 ²⁾³⁾	1.20±0.07 ²⁾³⁾
LHCPT+K6PC-5	2.18±0.10 ⁴⁾	1.91±0.12 ⁴⁾	1.72±0.11 ⁴⁾

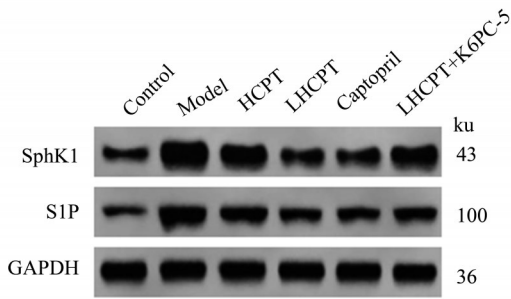
HCPT: hydroxycamptothecin; LHCPT: hydroxycamptothecin liposomes; TGF- $\beta 1$: transforming growth factor- $\beta 1$. Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with Model group, ²⁾ $P < 0.05$; compared with HCPT group, ³⁾ $P < 0.05$; compared with LHCPT group, ⁴⁾ $P < 0.05$.

2.6 LHCPT对各组大鼠心肌组织中SphK1/S1P信号通路相关蛋白表达的影响

单因素方差分析显示,6组大鼠心肌组织中SphK1、S1P蛋白表达比较,差异有统计学意义($F=318.245, 332.537, P < 0.001$)。组间两两比较显示:与对照组比较,模型组大鼠心肌组织中SphK1、S1P蛋白表达升高($P < 0.001$);与模型组比较,HCPT组、LHCPT组、卡托普利组大鼠心肌组织中SphK1、S1P蛋白表达降低($P < 0.001$);与HCPT组比较,LHCPT组、卡托普利组大鼠心肌组织中SphK1、S1P蛋白表达降低($P < 0.001$);与LHCPT组比较,LHCPT+K6PC-5组大鼠组织中SphK1、S1P蛋白表达升高($P < 0.001$;图2、表8)。

3 讨论

在本研究中,我们首先通过腹腔注射阿霉素的方法构建心力衰竭大鼠模型,结果显示,与对照组比较,模型组大鼠LVESD、LVEDD升高,LVEF降低,心肌组织病理损伤及纤维化严重,表明心力衰竭大鼠模型构建成功。心力衰竭通常与炎症有关,炎症反应的激活和随后炎症细胞因子(如TNF- α 、IL-6)的分泌有助于将更多炎症细胞募集和激活到病变的组织中,激活成纤维细胞,导致纤维化疤痕



HCPT: hydroxycamptothecin; LHCPT: hydroxycamptothecin liposomes; SphK1: sphingosine kinase 1; S1P: sphingosine-1-phosphate.

图2 Western blot 检测大鼠心肌组织中 SphK1、S1P 蛋白表达

Fig. 2 Western blot analysis of SphK1 and S1P protein expression in rat myocardium

表8 各组大鼠心肌组织中 SphK1、S1P 蛋白表达变化比较

Table 8 Comparison of SphK1 and S1P protein expression in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	SphK1/GAPDH	S1P/GAPDH
Control	0.46±0.03	0.21±0.02
Model	2.15±0.12 ¹⁾	1.56±0.11 ¹⁾
HCPT	1.54±0.10 ²⁾	0.93±0.08 ²⁾
LHCPT	0.76±0.06 ²⁾³⁾	0.41±0.03 ²⁾³⁾
Captopril	0.75±0.06 ²⁾³⁾	0.42±0.04 ²⁾³⁾
LHCPT+K6PC-5	1.33±0.11 ⁴⁾	0.86±0.07 ⁴⁾

HCPT: hydroxycamptothecin; LHCPT: hydroxycamptothecin liposomes; SphK1: sphingosine kinase 1; S1P: sphingosine-1-phosphate. Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with Model group, ²⁾ $P < 0.05$; compared with HCPT group, ³⁾ $P < 0.05$; compared with LHCPT group, ⁴⁾ $P < 0.05$.

区域的扩张,从而增加心肌僵硬并促进舒张功能障碍^[16]。本研究检测了心肌组织中 TNF- α 、IL-6 水平变化,结果显示,模型组大鼠心肌组织中 TNF- α 、IL-6 水平明显高于对照组,表明心力衰竭大鼠心肌组织存在炎症反应。而 HCPT、LHCPT 均可抑制大鼠心肌组织炎症反应,且 LHCPT 的抑制效果优于 HCPT。

此外,心肌纤维化与心力衰竭密切相关。心肌纤维化与多种纤维化因子的分泌有关, TGF- β 1 作为最重要的促纤维化生长因子,其可促进 Collagen I、Collagen III 的合成以及沉积,进而促进心肌纤维化的发生与发展^[17]。本研究检测了心肌组织中 TGF- β 1、Collagen I、Collagen III mRNA 表达变化,

结果显示,模型组大鼠心肌组织中 TGF- β 1、Collagen I、Collagen III mRNA 表达明显高于对照组,表明心力衰竭大鼠心肌组织纤维化严重。而 HCPT、LHCPT 均可抑制大鼠心肌组织纤维化,且 LHCPT 的抑制效果优于 HCPT,这可能与 HCPT 的脂质体剂型有关,将 HCPT 制成脂质体剂型后,稳定了 HCPT 在体内的内酯环结构,减缓了 HCPT 在体内的消耗,维持其在血液和心肌中较大的药物浓度,同时 LHCPT 也更容易进入心肌组织,提高了抗心肌组织纤维化的作用。卡托普利是常用于改善心力衰竭过程中心肌纤维化的常用药物^[18],本研究以该药物作为阳性药物,结果显示,卡托普利与 LHCPT 对心力衰竭大鼠心肌组织纤维化的抑制作用差异无统计学意义,提示 LHCPT 可能成为改善心力衰竭大鼠心肌纤维化的潜在有效药物。

SphK1/S1P 信号通路涉及多种病理生理反应,其可参与肿瘤、炎症性疾病等多种疾病的发生发展^[19]。据报道,激活 SphK1/S1P 信号通路可促进博来霉素诱导的小鼠肺纤维化^[20];敲除 SphK1 可减轻单侧输尿管梗阻模型小鼠肾纤维化^[21]。本研究显示, LHCPT 可抑制心力衰竭大鼠心肌组织中 SphK1、S1P 蛋白表达,推测 LHCPT 可能通过抑制 SphK1/S1P 信号通路抑制心力衰竭大鼠心肌纤维化。为了验证该推测,本研究在 LHCPT 作用的基础上再加上 SphK1 激活剂 K6PC-5 来干预心力衰竭大鼠,结果显示, K6PC-5 减弱了 LHCPT 对心力衰竭大鼠心肌纤维化的抑制作用。证实了 LHCPT 可能通过抑制 SphK1/S1P 信号通路抑制心力衰竭大鼠心肌纤维化。此外,有研究报道,在糖尿病肾病中 SphK1/S1P 可介导 TGF- β 1 过量产生^[22];在高脂饮食诱导的肥胖小鼠中,转移性病变组织中的 SphK1/S1P 通路被激活,同时促炎细胞因子 IL-6 和 TNF- α 水平升高^[23]。然而, LHCPT 抑制 SphK1/S1P 信号通路抑制心力衰竭大鼠心肌纤维化过程中的具体机制是否涉及到对 IL-6、TNF- α 及 TGF- β 1 的调控,有待进一步实验验证。

综上所述, LHCPT 可能通过抑制 SphK1/S1P 信号通路抑制心力衰竭大鼠心肌纤维化。该研究以脂质体为载药系统制备 LHCPT,避免了传统静脉注射 HCPT 等带来的药物毒副作用大、药物利用率低等问题,可能为临床上心力衰竭过程中心肌纤维化的治疗提供新的实验依据。

参考文献

- [1] Rao M, Wang X, Guo G, et al. Resolving the intertwining of inflammation and fibrosis in human heart failure at single-cell level[J]. *Basic Res Cardiol*, 2021, 116(1): 55.
- [2] Luo Y, Jiang N, May H, et al. Cooperative binding of ETS2 and NFAT links erk1/2 and calcineurin signaling in the pathogenesis of cardiac hypertrophy [J]. *Circulation*, 2021, 144(1): 34-51.
- [3] Rashki Kemmak A, Dolatshahi Z, Mezginejad F, et al. Economic evaluation of ivabradine in treatment of patients with heart failure: a systematic review [J]. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*, 2022, 22(1): 37-44.
- [4] He Y, Huang W, Zhang C, et al. Energy metabolism disorders and potential therapeutic drugs in heart failure [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(5): 1098-1116.
- [5] Miao X, Chen J, Su Y, et al. Plasma metabolomic analysis reveals the therapeutic effects of Jiashen tablets on heart failure [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9(1): 1047322-1047336.
- [6] Bacmeister L, Schwarzl M, Warnke S, et al. Inflammation and fibrosis in murine models of heart failure [J]. *Basic Res Cardiol*, 2019, 114(3): 19-53.
- [7] Gu H, Liang Y, Shen Y, et al. Hydroxycamptothecin regulates scar formation of the filtration channel under scleral flap by inhibiting the proliferation of scleral fibroblasts [J]. *PLoS One*, 2023, 18(4): e0284618.
- [8] Chen J, Mo Q, Long Q, et al. Hydroxycamptothecin and substratum stiffness synergistically regulate fibrosis of human corneal fibroblasts [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2023, 9(2): 959-967.
- [9] 邵佳亮, 胡国信, 郑洁, 等. 羟基喜树碱对肝纤维化大鼠肝组织 Bax、Bcl-2 基因和 α -SMA 蛋白表达及肝纤维化的影响 [J]. *第二军医大学学报*, 2014, 35(4): 399-405.
Shao JL, Hu GX, Zheng J, et al. Effects of hydroxycamptothecin on the expression of Bax, Bcl-2 gene and α -SMA protein in liver fibrosis in rats [J]. *Acad J Second Military Med Univ*, 2014, 35(4): 399-405.
- [10] 陈文忠, 丘晓丹, 肖杭, 等. 羟基喜树碱脂质体多次静脉滴注对 Beagle 犬的毒性 [J]. *生物加工过程*, 2022, 20(3): 316-324.
Chen WZ, Qiu XD, Xiao H, et al. Toxicity of hydroxycamptothecin liposome to Beagle dogs by multiple intravenous infusion [J]. *Chin J Bioprocess Engineering*, 2022, 20(3): 316-324.
- [11] Zhou T, Tang X, Zhang W, et al. Preparation and in vitro and in vivo evaluations of 10-hydroxycamptothecin liposomes modified with stearyl glycyrrhetinate [J]. *Drug Deliv*, 2019, 26(1): 673-679.
- [12] Wu X, Xu J, Li X, et al. Inhibition of SphK1/S1P signaling pathway alleviates fibrosis and inflammation of rat myocardium after myocardial infarction [J]. *Comput Math Methods Med*, 2022, 2022(1): 5985375-5985385.
- [13] 庄金龙, 陈华, 刘莉, 等. 参芪利心汤对心力衰竭大鼠血浆 N 端 B 型利钠肽原、血管紧张素 II 水平及心肌纤维化的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2021, 28(1): 73-80.
Zhuang JL, Chen H, Liu L, et al. Effects of Shenqilixin Decoction on N-terminal B-type natriuretic peptide and angiotensin II levels in plasma and myocardial fibrosis in rats with heart failure [J]. *Chin J Info on Traditional Chin Med*, 2021, 28(1): 73-80.
- [14] 马丽霞, 罗辉, 傅广. 丹参多酚酸通过调节激活素 A/卵泡抑素系统对心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响 [J]. *中药材*, 2021, 44(6): 1457-1462.
Ma LX, Luo H, Fu G. Effects of salvianolic acid on myocardial fibrosis in rats with heart failure after myocardial infarction by regulating activin A/ folliclestatin system [J]. *J Chin Med Materials*, 2021, 44(6): 1457-1462.
- [15] Heydari AH, Fathi M, Heydari S, et al. Advanced glycation end product blocker drugs have a great potential to prevent diabetic cardiomyopathy in an animal model of diabetes mellitus type-2 [J]. *Cardiovasc Ther*, 2022, 2022(1): 7014680-7014690.
- [16] Wang X, Li W, Zhang Y, et al. Calycosin as a novel PI3K activator reduces inflammation and fibrosis in heart failure through AKT-IKK/STAT3 axis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13(1): 828061-828074.
- [17] 殷云杰, 陈燕春, 杨松. 心肌纤维化机制研究进展 [J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2019, 18(7): 540-543.
Yin YJ, Chen YC, Yang S. Research progress of myocardial fibrosis mechanism [J]. *Chin J Multiple Organ Dis in the Elderly*, 2019, 18(7): 540-543.
- [18] 邵会敏, 曹新营, 刘志亮, 等. 紫云英苷对慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化及 AMPK/Nrf2 通路的影响 [J]. *疑难病杂志*, 2021, 20(9): 883-888.
Shao HM, Cao XY, Liu ZL, et al. Effect of Piperin on myocardial fibrosis and AMPK/Nrf2 pathway in chronic heart failure rats [J]. *Chin J Difficult and Complicated Cases*, 2021, 20(9): 883-888.
- [19] Yin S, Miao Z, Tan Y, et al. SPHK1-induced autophagy in peritoneal mesothelial cell enhances gastric cancer peritoneal dissemination [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(4): 1731-1743.
- [20] Huang LS, Sudhadevi T, Fu P, et al. Sphingosine kinase 1/S1P signaling contributes to pulmonary fibrosis by activating Hippo/YAP pathway and mitochondrial reactive oxygen species in lung fibroblasts [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6): 2064-2086.
- [21] Zhang X, Wang W, Ji XY, et al. Knockout of sphingosine kinase 1 attenuates renal fibrosis in unilateral ureteral obstruction model [J]. *Am J Nephrol*, 2019, 50(3): 196-203.
- [22] Huang J, Huang K, Lan T, et al. Curcumin ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting the activation of the SphK1-S1P signaling pathway [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 365(2): 231-240.
- [23] Nagahashi M, Yamada A, Katsuta E, et al. Targeting the SphK1/S1P/S1PR1 axis that links obesity, chronic inflammation, and breast cancer metastasis [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(7): 1713-1725.