

·实验研究·

本文引用: 郭瑾, 王梓仪, 张倩, 孟骊冲, 胡志希. 基于 miR-139/Wnt/ β -catenin 信号通路探讨参附注射液对慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化的保护作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(2): 197-205.

基于 miR-139/Wnt/ β -catenin 信号通路探讨参附注射液对慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化的保护作用

郭瑾, 王梓仪, 张倩, 孟骊冲, 胡志希*

湖南中医药大学, 湖南长沙 410208

[摘要] **目的** 探讨参附注射液对盐酸异丙肾上腺素(isoprenaline hydrochloride, ISO)诱导的慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)大鼠心肌纤维化的作用与机制。**方法** 采用随机数字表法将 45 只 SD 大鼠随机分为正常组 9 只, 造模组 36 只, 采用 ISO 背部皮下多点注射 14 天制备 CHF 大鼠模型, 再正常饲养 14 d 通过模型验证和评价, 期间死亡大鼠 5 只, 未成模大鼠 4 只。将造模成功的 27 只大鼠按随机数字表法分为 3 组: 模型组(腹腔注射 6 mL·kg⁻¹ 氯化钠注射液+灌胃 10 mL·kg⁻¹ 蒸馏水)、参附注射液组(腹腔注射 6 mL·kg⁻¹ 参附注射液+灌胃 10 mL·kg⁻¹ 蒸馏水)、卡托普利组(腹腔注射 6 mL·kg⁻¹ 生理盐水+灌胃 10 mL·kg⁻¹ 蒸馏水, 蒸馏水含 8.8 mg·kg⁻¹ 卡托普利, 相当于临床等效量)。药物干预 15 d 后, 检测各组大鼠心功能及心肌纤维化的相关指标: 超声心动图、体质量、心脏质量指数及左心室质量指数; ELISA 法检测氨基末端脑钠肽前体(N-terminal pro brain natriuretic peptide, NT-proBNP); HE 染色、Masson 染色检测心肌组织病理形态及纤维化状态; RT-qPCR 检测心肌组织中 miR-139、Wnt 家族成员 3a(Wnt family member 3a, Wnt3a)、 β -连环蛋白(β -catenin)、糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β)、I 型胶原蛋白(type I collagen, Col-I)、III 型胶原蛋白(type III collagen, Col-III)及 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)mRNA 的表达; Western blot 检测心肌组织中 Wnt3a、 β -catenin、GSK3 β 、Col-I、Col-III、 α -SMA、MMP-2、MMP-9 蛋白表达。**结果** 与正常组比较, 模型组左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室短轴缩短率(left ventricular fraction shortening, LVFS)、体质量降低($P < 0.01$), 左室舒张末期内径(left ventricular end diastolic diameter, LVEDD)、左室收缩末期内径(left ventricular end systolic diameter, LVESD)、NT-proBNP、心脏质量指数、左心室质量指数升高($P < 0.01$), miR-139 表达量下降($P < 0.01$), Wnt3a、 β -catenin、GSK3 β 、Col-I、Col-III、 α -SMA、MMP-2、MMP-9 蛋白和 mRNA 表达升高($P < 0.01$); 细胞排列紊乱, 心肌纤维化明显, 伴有明显的炎症浸润。与模型组比较, 参附注射液组 LVEF、LVFS、体质量升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), LVEDD、LVESD、NT-proBNP、心脏质量指数、左心室质量指数降低($P < 0.01$), miR-139 表达量升高($P < 0.01$), Wnt3a、 β -catenin、GSK3 β 、Col-I、Col-III、 α -SMA、MMP-2、MMP-9 蛋白和 mRNA 表达降低($P < 0.01$); 细胞排列趋于整齐, 纤维结缔组织增生及炎症细胞浸润现象减少, 胶原纤维沉积减少, 纤维化程度减轻。**结论** 参附注射液能改善 CHF 大鼠心功能及心肌纤维化状态, 其机制可能与调控 miR-139/Wnt/ β -catenin 信号通路有关。

[关键词] 慢性心力衰竭; 参附注射液; miR-139; Wnt/ β -catenin; 心肌纤维化

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.02.004

Protective effects of Shenfu Injection on myocardial fibrosis in rats with chronic heart failure based on miR-139/Wnt/ β -catenin signaling pathway

GUO Jin, WANG Ziyi, ZHANG Qian, MENG Lichong, HU Zhixi*

Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[收稿日期] 2023-07-12

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82274412); 广东省重点领域研发项目(2020B1111100001); 湖南省教育厅项目(21A0230, 21B0361)。

[通信作者] * 胡志希, 男, 医学博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: 515800272@qq.com。

[Abstract] Objective To investigate the mechanism of action of Shenfu Injection (SFI) on myocardial fibrosis in rats with chronic heart failure (CHF) induced by isoprenaline (ISO). **Methods** Forty-five SD rats were divided into normal group ($n=9$) and modeling group ($n=36$) by random number table method. CHF rat model was prepared by 14-day subcutaneous multi-point injection of ISO on the back, followed by 14-day normal feeding to validate and evaluate the model. During this period, five rats died and four rats were not modeled. Then the 27 successfully modeled rats were subdivided into three groups by the random number table method: model group (intraperitoneal injection of $6 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ sodium chloride injection+gavage of $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ distilled water), SFI group (intraperitoneal injection of $6 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ SFI+gavage of $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ distilled water), and captopril group (intraperitoneal injection of $6.0 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ normal saline+gavage of $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ distilled water containing $8.8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ captopril which was clinically equivalent). After 15 d of drug intervention, the related indicators of cardiac function and myocardial fibrosis in each group were examined, including echocardiogram, body mass, heart mass index, and left ventricular mass index. ELISA was used to determine N-terminal pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP) content; HE staining and Masson staining were performed to observe the histopathological morphology and fibrosis of the myocardial tissue; RT-qPCR was conducted to examine the mRNA expressions of miR-139, Wnt family member 3a (Wnt3a), β -catenin, glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), type I collagen (Col-I), type III collagen (Col-III), α -smooth muscle actin (α -SMA), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in the myocardial tissue; Western blot was used to examine the protein expressions of Wnt3a, β -catenin, GSK3 β , Col-I, Col-III, α -SMA, MMP-2, and MMP-9 in it. **Results** Compared with normal group, the left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular fraction shortening (LVFS) and body mass of rats in model group decreased ($P<0.01$), while the left ventricular end diastolic diameter (LVEDD), left ventricular end systolic diameter (LVESD), NT-proBNP content, heart mass index, and left ventricular mass index increased ($P<0.01$); the miR-139 expression decreased ($P<0.01$), and the protein and mRNA expressions of Wnt3a, β -catenin, GSK3 β , Col-I, Col-III, α -SMA, MMP-2, and MMP-9 increased ($P<0.01$); the myocardial tissue showed disordered cell arrangement and significant fibrosis, accompanied by obvious inflammatory infiltration. Compared with model group, the LVEF, LVFS, and body mass of rats in SFI group were higher ($P<0.01$ or $P<0.05$), while the LVEDD, LVESD, NT-proBNP content, heart mass index, and left ventricular mass index were lower ($P<0.01$); the miR-139 expression increased ($P<0.01$), and the protein and mRNA expressions of Wnt3a, β -catenin, GSK3 β , Col-I, Col-III, α -SMA, MMP-2, and MMP-9 decreased ($P<0.01$); cell arrangement tended to be neat in the myocardial tissue, with reduced fibrous connective tissue hyperplasia, inflammatory cell infiltration, collagen fiber deposition, and fibrosis degree. **Conclusion** SFI can improve cardiac function and alleviate myocardial fibrosis in rats with CHF, and its mechanism may be related to the regulation of miR-139/Wnt/ β -catenin signaling pathway.

[Keywords] chronic heart failure; Shenfu Injection; miR-139; Wnt/ β -catenin; myocardial fibrosis

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是由于心脏结构或功能异常导致心室充盈或射血能力受损而引起的一组复杂的临床综合征^[1]。CHF是心脏疾病的终末期,病机复杂,主要临床表现为呼吸困难、体力活动受限、体液潴留。根据中国心力衰竭患者注册登记研究我国有近890万CHF患者,其中心力衰竭住院患者病死率为4.1%^[2]。心力衰竭发生后,左心室可发生结构、电生理和信号转导重构,称为病理性重构,是心力衰竭的关键发病机制^[3]。心肌纤维化是心脏重构最重要的形态学改变,是重构发生发展的驱动因素,也是心力衰竭的独立、预测性危险因素。因此,治疗和改善心肌纤维化是预防心力衰竭的重要手段^[4-5]。

微小RNA分子(microRNA, miRNA)是一种短

链非编码RNA,长度为18~22个核苷酸,常以细胞内介质参与转录后基因调控^[6]。miRNA在心血管系统中异常表达,是调节心脏重构和纤维化的关键成分^[7-9]。研究表明,miR-139具有抗心肌损伤作用,可调节细胞凋亡和自噬,防止心肌缺血和再灌注损伤,miR-139过表达可抑制氧化应激诱导的心肌细胞损伤^[10-12]。Wnt信号通路是调控组织器官发育,参与细胞增殖、分化和转移的重要信号转导通路。Wnt/ β -catenin是其中最典型的通路之一,是该通路的核心蛋白,在调控心肌纤维化过程中起重要作用^[13-14]。盐酸异丙肾上腺素(isoprenaline hydrochloride, ISO)是一种 β 受体激动剂,作用于心脏 β_1 受体,可使心肌产生持续剧烈收缩,引起心肌纤维化和心室重构,最终导致CHF^[15]。参附注射液源自传统名方参附汤,

其药物仅由人参和附子组成,广泛应用于临床治疗心力衰竭等心血管疾病^[16-17]。现代药理学研究表明,参附注射液作用机制主要包括抗纤维化、抗炎、抗氧化、抗细胞凋亡等^[18-20]。本课题组前期研究证实,参附注射液可改善 CHF 大鼠心功能,降低心肌纤维化程度^[19,21],然而对 CHF 的发病机制和药物作用靶点尚未完全阐明。因此,本研究拟建立 ISO 致 CHF 大鼠模型,并用参附注射液进行干预,通过动物实验研究,初步探讨 miR-139 调控 Wnt/ β -catenin 信号通路在 CHF 心肌纤维化过程中的作用,以及参附注射液改善心功能的具体作用机制和有效靶点,为今后 CHF 的精准辨证和靶点治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

45 只 5 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,大鼠体质量为(180±20) g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号为 SCXK(湘)2019-0004,动物合格证号 430727221101891171、430727221101836883,在湖南中医药大学实验动物中心 SPF 级实验室内饲养。研究方案经湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准号:LL2022072705。

1.2 药物

盐酸异丙肾上腺素(MedChemExpress 公司,批号:HY-B0468/CS-2582);参附注射液(华润三九雅安药业有限公司,批号:Z51020664,国药准字 Z51020664,规格 10 mL/支);卡托普利(重庆科瑞制药有限公司,批号:641003,国药准字 H50020362,规格 25 mg/片);乌拉坦(上海源叶生物科技有限公司,批号:MFC0-00007966)。

1.3 主要试剂

NT-proBNP 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号:W210349115);苏木精、伊红(Wellbio 公司,批号分别为 02A230427、02B230519);I 型胶原蛋白(type I collagen,Col-I)(三鹰公司,批号:00102069)、GSK3 β 、MMP-9、Wnt3a、 β -catenin 抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 GR3258308-20、GR3384704-13、GR-3358334-9、GR3368970-1);III 型胶原蛋白(type III collagen,Col-III)抗体(博奥森公司,批号:BJ11098955);MMP-2、 α -SMA、GAPDH 抗体(美国 Proteintech 公司,

批号分别为 00045454、00082753、00110344);山羊抗兔 IgG (H+L)二抗 HRP(中国艾碧维公司,批号:01C230530);mRNA 逆转录试剂盒、miRNA 逆转录试剂盒、UltraSYBR Mixture(中国北京康为世纪公司,批号分别为 09623、25722、29122)。

1.4 主要仪器

VINNO 6 LAB 型便携式数字化彩色超声诊断仪(飞依诺科技苏州有限公司);H1650 R 型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);PW-812 型全自动酶标洗板机、MB-530 多功能酶标分析仪(深圳市汇松科技发展有限公司);DHP-500 型电热恒温培养箱(北京市永光明医疗仪器有限公司);YD-315 型切片机(浙江金华益迪试验器材);BMJ-A 型包埋机(常州中威电子仪器);DYY-6 C 型电泳仪、DYCZ-24 DN 型电泳槽、DYCZ-40 D 型转膜仪(北京六一生物科技有限公司);BioPrep-24 型生物样品均质仪(杭州奥盛仪器有限公司);PIKOREAL96 型荧光定量 RCP 仪、SPL0960 型荧光 PCR 板(美国 Thermo 公司);QuantStudio1 型荧光定量 RCP 仪(美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 造模和模型评价标准

依据本课题组前期研究、预实验及相关文献,复制 ISO 诱导的 CHF 大鼠模型^[19,22-23]。模型组大鼠背部皮下多点注射 ISO,剂量为 5 mg·kg⁻¹,注射浓度为 1.67 mg·mL⁻¹,正常组大鼠在背部皮下多点注射等量生理盐水,连续注射 14 d,再正常饲养 14 d。造模期间观察大鼠的一般情况和宏观指标,用专用照相机记录各项宏观指标变化。通过超声心动图检测大鼠心室结构,包括左室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic diameter,LVEDD)、左室收缩末期内径(left ventricular end systolic diameter,LVESD)及左室射血分数(left ventricular ejection fraction,LVEF)、左室短轴缩短率(left ventricular fraction shortening,LVFS),ELISA 检测大鼠血清指标氨基末端脑钠肽前体(N-terminal pro brain natriuretic peptide,NT-proBNP),与正常组大鼠比较有统计学意义则判断 CHF 疾病模型是否制备成功。

2.2 分组与给药

采用随机数字表法从 45 只大鼠随机选 9 只作

为正常组,其余36只为造模组。造模结束时,死亡大鼠5只,造模未成功大鼠4只。将造模成功的27只大鼠采用随机数字表法分为:模型组(腹腔注射6 mL·kg⁻¹氯化钠注射液+灌胃10 mL·kg⁻¹蒸馏水)、参附注射组(腹腔注射6 mL·kg⁻¹参附注射液+灌胃10 mL·kg⁻¹蒸馏水)、卡托普利组(腹腔注射6 mL·kg⁻¹生理盐水+灌胃10 mL·kg⁻¹蒸馏水(蒸馏水含8.8 mg·kg⁻¹卡托普利,相当于临床等效量)。各组大鼠给药剂量通过人与动物等效剂量换算确定,参照本课题组前期研究及预实验,确定大鼠给药时间为15 d^[19,23]。考虑操作难度及给药剂量,故选择药物吸收与静脉给药相似、生物利用度稍差于静脉给药,但操作更简便的腹腔注射。

2.3 标本采集

于末次给药第2日早上取材,乌拉坦麻醉(0.2 g·mL⁻¹, 6.5 mL·kg⁻¹腹腔注射),暴露腹主动脉,采血5 mL以上。采集的血样于室温静置2 h后离心以3 000 r·min⁻¹运行15 min(离心半径为17.8 cm),取上清液,-80 °C冰箱中保存备用。腹主动脉采血后,剪开肋骨,暴露胸腔,生理盐水反复灌洗心脏后迅速剥离心脏,剪去周围结缔组织和血管,滤纸吸干后,用电子天平称量心脏质量,沿冠状沟走行分离心尖与左心室,再次称重后用4%多聚甲醛溶液固定心尖组织,左心室放入冻存管,-80 °C冰箱中保存备用。

2.4 指标检测与方法

2.4.1 心功能检测 将大鼠麻醉固定于鼠板后脱毛,应用小动物超声系统,将M型超声探头放置在大鼠左胸部与胸骨中线成10°~30°处,在左室长轴切面连续测量3个心动周期的LVEDD和LVESD,连续测量3次取平均值,计算LVEF及LVFS。

2.4.2 大鼠心脏质量指数及左心室质量指数测定 称量全心重量,剪去心房和右心室游离壁,分离左心室并称重,分别计算心脏质量指数(心脏质量/体质量)和左心室质量指数(左心室质量/体质量)。

2.4.3 ELISA法测定血清NT-proBNP水平 大鼠麻醉后腹主动脉采血5 mL,室温下静置2 h后3 000 r·min⁻¹离心15 min,保留上清液,严格按ELISA试剂盒说明书,采用ELISA法测定血清NT-proBNP含量。

2.4.4 病理组织学观察 大鼠心尖组织放置于4%多聚甲醛中固定,按包埋切片、脱蜡至水、染色、脱水、封片、采像步骤,行常规HE、Masson染色。

2.4.5 RT-qPCR检测大鼠心肌组织miR-139、Wnt/β-catenin及心肌纤维化相关因子mRNA的表达 Trizol提取组织总RNA后以组织总mRNA为模板,逆转录cDNA。在NCBI上搜索目的基因的序列,应用primer 5软件设计引物,引物由北京擎科合成,引物序列见表1。通过各目的因子基因片段的扩增曲线,确定Ct,逐渐增加温度,同时监测每一步的荧光信号产生溶解曲线,验证反应无非特异性产物,提示定量准确。

表1 引物序列信息

基因	序列(5'-3')	片段长度/bp
GAPDH	正向:ACAGCAACAGGGTGGTGAC	252
	反向:TTTGAGGCTGCAGCGAACTT	
miR-139	正向:TATTCTACAGTGCACGTGTCTCCA	76
	反向:GCTGTCAACGATACGCTACGTA	
Wnt3a	正向:GACTCTCGTGGCTGGGTGGA	108
	反向:GGGCTCGCAGAAGTTAGGTG	
β-catenin	正向:AAGCCACAGGACTACAAGAAACGG	87
	反向:AGCAGTCTCATTCCAAGCCAT	
GSK3β	正向:CTGCCATCGAGACATTAAACCAC	228
	反向:CCTAGCAACAATTTCAGCCAACACA	
Col-I	正向:CTGGCTCTCCTGGTACCCCT	160
	反向:GGACCACGTTACCACTTGCT	
Col-III	正向:CCCCTCTTTATTTTGGCACAG	119
	反向:CGCAGACACATATTTGACATGG	
α-SMA	正向:ATCACCATCGGGAATGAACGC	79
	反向:TGCCCGCCGACTCCATTCCA	
MMP-2	正向:AGAAGGCTGTGTTCTTCGCA	128
	反向:AAAGGCAGCGTCTACTTGCT	
MMP-9	正向:CCCCGAGACCTGAAAACCTCCAAC	189
	反向:GGCCTTTAGTGTCTCGCTGTCCA	
5S	正向:GCCTACAGCCATACCACCCGGAA	116
	反向:CCTACAGCACCCGGTATCCCA	

2.4.6 Western blot检测大鼠心肌组织Wnt/β-catenin信号通路及心肌纤维化相关蛋白表达 提取心肌组织中蛋白,参照BCA试剂盒说明书测得蛋白浓度。经过制胶、电泳、转膜、封闭后,用1×PBST将一抗按照一定比例稀释[Wnt3a(1:1 000)、β-catenin(1 μg/mL)、GSK3β(1:5 000)、Col-I(1:1 000)、Col-III(1:1 000)、α-SMA(1:2 000)、MMP-2(1:1 000)、MMP-9(1:2 000)、GAPDH(1:5 000)],将膜与一抗一起孵育,室温放置90 min,孵育结束,1×PBST洗3次,每次15 min。用1×PBST稀释HRP标记的二抗[山羊抗兔IgG(H+L)二抗HRP(1:5 000)],将稀释后的二抗与膜共同室温孵育90 min。孵育结束,1×PBST洗3次,

每次 10 min。使用 ECL 化学发光液与膜孵育 1 min, 滤纸吸干液体, 用塑封膜将膜包裹杂交膜, 凝胶成像系统成像。

2.5 统计分析

运用 SPSS 24.0 软件进行分析, 计量数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。两组间比较符合正态分布采用两独立样本 *t* 检验, 不符合正态分布采用秩和检验。多组间比较进行单因素方差分析 (*One-way ANOVA*), 满足方差齐性采用最小显著差异法 (*LSD*), 不满足方差齐性时采用 *Tamhane's T2* 法; 若不符合正态分布, 则采用多个独立样本均数比较的非参数 *Kruskal-Wallis* 秩和检验 (*H* 检验)。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行绘图操作。

3 结果

3.1 各组大鼠一般情况

ISO 造模期间共死亡 5 只大鼠, 观察各组大鼠情况, 正常组大鼠无死亡, 毛发光泽, 精神状态、行为活动、饮食饮水均正常。造模组大鼠精神萎靡, 毛发稀疏, 蜷缩抱团, 不欲饮食, 体质量减轻, 部分大鼠出现腹水。与模型组对比, 参附注射液组及卡托普利组大鼠精神状态、行为活动、饮食饮水均明显改善, 毛发光泽明显恢复, 体质量明显增加, 说明参附注射液可改善 CHF 大鼠症状。

3.2 各组大鼠超声心动图情况

药物干预结束后, 与正常组比较, 模型组 LVEDD、LVESD 显著上升 ($P < 0.01$), LVEF、LVFS 显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 参附注射液组及卡托普利组 LVEDD、LVESD 显著下降 ($P < 0.01$), LVEF、LVFS 显著上升 ($P < 0.01$)。详见表 2。

3.3 各组大鼠血清 NT-proBNP 水平、体质量、心脏质量指数及左心室质量指数比较

药物干预结束后, 与正常组比较, 模型组血清

表 2 各组大鼠超声心动图比较 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	LVEDD/mm	LVESD/mm	LVEF/%	LVFS/%
正常组	4.69±0.78	1.85±0.54	93.66±4.41	66.24±7.22
模型组	6.35±0.62**	4.51±0.57**	61.37±7.34**	29.02±4.91**
参附注射液组	5.02±0.60 [#]	2.91±0.72 [#]	88.49±7.13 [#]	54.02±9.15 [#]
卡托普利组	4.91±0.53 [#]	2.95±0.37 [#]	87.18±4.96 [#]	52.11±6.73 [#]

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.01$ 。

NT-proBNP 水平显著上升 ($P < 0.01$), 体质量显著下降 ($P < 0.01$), 心脏质量指数及左心室质量指数显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 参附注射液组及卡托普利组血清 NT-proBNP 水平显著下降 ($P < 0.01$), 体质量显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 心脏质量指数以及左心室质量指数显著降低 ($P < 0.01$)。详见表 3。

3.4 各组大鼠心肌组织病理学观察

药物干预结束后, 大鼠心肌组织 HE 染色结果提示正常组心肌细胞排列整齐、形态正常、横截面清晰, 未见明显纤维组织增生; 与正常组相比, 模型组大鼠细胞排列明显紊乱不齐, 心肌细胞出现肥大、坏死现象, 纤维结缔组织增生严重, 伴有明显炎症浸润; 与模型组相比, 参附注射液组及卡托普利组细胞结构完整, 细胞排列趋于整齐, 纤维结缔组织增生及炎症细胞浸润现象明显减少。详见图 1。

Masson 染色结果提示, 正常组心肌细胞排列整齐, 血管周围仅有少量结缔组织, 间质仅有少量血管及结缔组织, 未见明显胶原纤维沉积; 与正常组相比, 模型组心肌细胞及血管周围可见大量蓝色胶原纤维沉积, 大面积纤维化组织取代正常心肌组织, 心肌纤维化程度明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 参附注射液组及卡托普利组胶原纤维沉积和纤维化程度明显降低 ($P < 0.01$)。详见图 2—3。

3.5 各组大鼠心肌组织 miR-139、Wnt/β-catenin 信号通路、心肌纤维化相关因子 mRNA 比较

药物干预结束后, 与正常组相比, 模型组心肌组

表 3 各组大鼠 NT-proBNP 水平、体质量、心脏质量指数及左心室质量指数比较 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	NT-proBNP/(pg·mL ⁻¹)	体质量/g	心脏质量指数/(mg·g ⁻¹)	左心室质量指数/(mg·g ⁻¹)
正常组	350.95±16.35	444.22±25.02	2.34±0.09	0.41±0.02
模型组	587.23±30.47**	353.33±25.84**	3.07±0.11**	0.70±0.06**
参附注射液组	416.54±27.55 [#]	426.78±36.55 [#]	2.56±0.06 [#]	0.48±0.03 [#]
卡托普利组	465.58±31.23 [#]	387.33±38.04 [#]	2.47±0.06 [#]	0.50±0.05 [#]

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$ 。

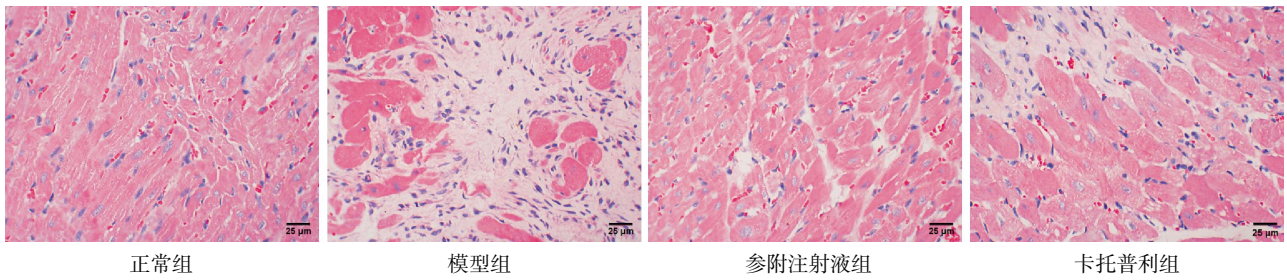


图1 各组大鼠心肌组织结构观察(HE, ×400)

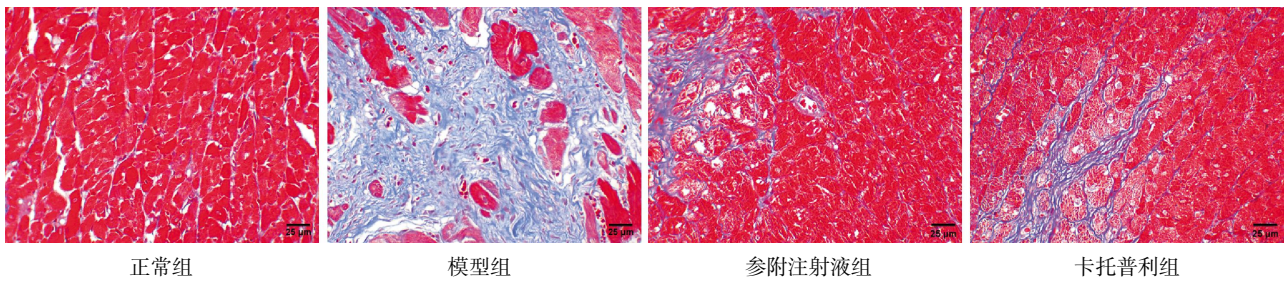
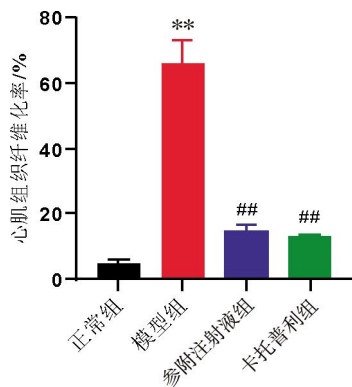


图2 各组大鼠心肌组织纤维化情况(Masson 染色, ×400)

图3 各组大鼠心肌组织纤维化率情况($\bar{x} \pm s, n=3$)注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。表4 各组大鼠心肌组织 miR-139、Wnt/ β -catenin 信号通路相关因子 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	miR-139	Wnt3a	β -catenin	GSK3 β
正常组	1.26±0.22	1.00±0.29	1.07±0.21	0.85±0.27
模型组	0.37±0.11**	2.83±0.41**	2.92±0.45**	4.67±0.72**
参附注射液组	0.93±0.07###	1.64±0.28###	1.60±0.29###	1.86±0.25###
卡托普利组	0.83±0.04###	2.08±0.38###	2.15±0.32###	2.77±0.60###

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,### $P<0.01$ 。表5 各组大鼠心肌纤维化相关因子 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Col-I	Col-III	α -SMA	MMP-2	MMP-9
正常组	1.15±0.56	3.34±1.70	2.50±0.94	1.25±0.38	1.40±0.38
模型组	10.37±1.59**	17.89±4.67**	9.89±1.79**	5.30±1.35**	6.48±1.55**
参附注射液组	2.98±0.57###	7.77±1.40###	5.60±0.98###	2.17±0.49###	2.54±0.46###
卡托普利组	6.95±0.90###	12.67±2.25###	6.97±0.91###	3.73±0.44###	4.36±0.70###

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,### $P<0.01$ 。

织中 miR-139 相对表达量显著降低($P<0.01$), Wnt/ β -catenin 信号通路中 Wnt3a、 β -catenin、GSK3 β mRNA 相对表达量显著升高($P<0.01$), 心肌纤维化相关因子 Col-I、Col-III、 α -SMA、MMP-2、MMP-9 mRNA 相对表达量显著升高($P<0.01$); 与模型组相比, 参附注射液组和卡托普利组心肌组织中 miR-139 相对表达量显著升高($P<0.01$), Wnt/ β -catenin 信号通路中 Wnt3a、 β -catenin、GSK3 β mRNA 相对表达量显著降低($P<0.01$), 心肌纤维化相关因子 Col-I、Col-III、 α -SMA、MMP-2、MMP-9 mRNA 相对表达量显著降低($P<0.01$)。详见表 4—5。

3.6 各组大鼠心肌组织 Wnt/ β -catenin 信号通路及心肌纤维化相关蛋白表达比较

药物干预结束后, 与正常组相比, 模型组心肌组织 Wnt3a、 β -catenin、GSK3 β 、Col-I、Col-III、 α -SMA、MMP-2、MMP-9 蛋白表达明显升高($P<0.01$); 与模型组比较, 参附注射液组、卡托普利组心肌组织 Wnt3a、 β -catenin、GSK3 β 、Col-I、Col-III、 α -SMA、MMP-2、MMP-9 蛋白表达明显降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。详见表 6、图 4。

表6 各组大鼠心肌组织 Wnt/ β -catenin 信号通路及心肌纤维化相关因子蛋白表达比较($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	Wnt3a/GAPDH	β -catenin/GAPDH	GSK3 β /GAPDH	Col-I/GAPDH	Col-III/GAPDH	β -SMA/GAPDH	MMP-2/GAPDH	MMP-9/GAPDH
正常	0.18 \pm 0.08	0.11 \pm 0.03	0.14 \pm 0.05	0.10 \pm 0.06	0.13 \pm 0.04	0.10 \pm 0.03	0.10 \pm 0.03	0.15 \pm 0.04
模型	0.50 \pm 0.06**	0.49 \pm 0.05**	0.49 \pm 0.08**	0.47 \pm 0.11**	0.58 \pm 0.09**	0.50 \pm 0.13**	0.49 \pm 0.09**	0.48 \pm 0.05**
参附	0.27 \pm 0.11 [#]	0.23 \pm 0.06 [#]	0.24 \pm 0.06 [#]	0.23 \pm 0.10 [#]	0.20 \pm 0.03 [#]	0.16 \pm 0.03 [#]	0.18 \pm 0.06 [#]	0.25 \pm 0.08 [#]
卡托	0.38 \pm 0.06 [#]	0.35 \pm 0.09 [#]	0.35 \pm 0.07 [#]	0.34 \pm 0.07 [#]	0.36 \pm 0.06 [#]	0.33 \pm 0.07 [#]	0.30 \pm 0.10 [#]	0.37 \pm 0.04 [#]

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。

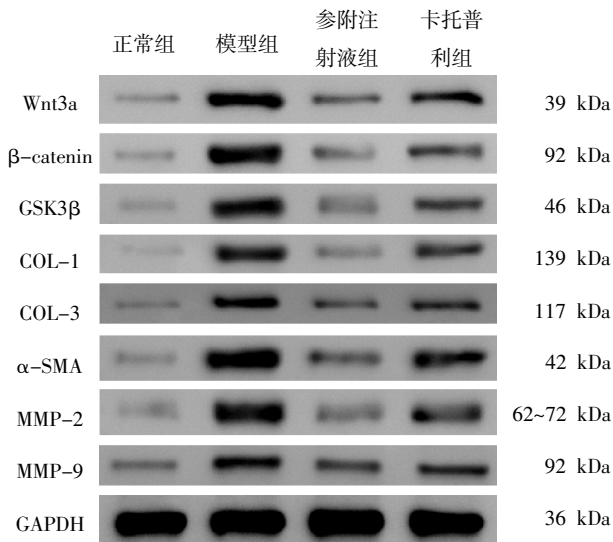


图4 各组大鼠心肌组织 Wnt/ β -catenin 信号通路及心肌纤维化相关因子蛋白条带图

4 讨论

CHF 的患病率呈持续上升趋势,心力衰竭发生后,心肌细胞受损,心脏应对损伤的响应机制主要表现为心肌纤维化。心肌纤维化是心血管疾病中最重要的形态学改变,其病理过程主要表现为心脏成纤维细胞异常增加,心肌细胞外基质过度沉积, I 型和 III 型胶原比例失衡,导致瘢痕形成,限制损伤,从而继续维持心脏结构的病态完整性^[24]。这本身是一种对病理刺激的生理反应,然而这一过程的长期激活会导致不良的心肌组织重构,最终影响心脏的结构和功能,导致心力衰竭^[25]。因此,探索 CHF 过程中心肌纤维化的分子靶点具有重要意义。

ISO 是一种非选择性 β 肾上腺素受体激动剂,可加快心率,增强心肌收缩力,诱发心肌细胞坏死,引起心肌纤维化,最终导致 CHF^[26]。基于此,本研究采用皮下多点注射 ISO 诱导大鼠 CHF 心肌纤维化的发生。本研究结果提示:从一般行为体征分析,与正常组相比,模型组大鼠精神萎靡,不欲饮食,毛发稀疏,腹水严重,体质量显著下降,心脏质量指数以

及左心室质量指数显著升高;从超声心动图结果分析,模型组大鼠的 LVEDD、LVESD 显著上升,LVEF、LVFS 显著下降;从生物标志物分析,模型组血清 NT-proBNP 水平显著上升;从病理结果分析,模型组心肌细胞排列紊乱,蓝色胶原纤维大量沉积,心肌纤维化明显,伴有明显炎症浸润;从蛋白、基因角度分析,模型组大鼠心肌组织中心肌纤维化相关因子 Col-I、Col-III、 α -SMA、MMP-2、MMP-9 蛋白和 mRNA 的相对表达量均显著升高,miR-139 表达量下降,Wnt/ β -catenin 信号通路相关因子 Wnt3a、 β -catenin、GSK3 β 蛋白和 mRNA 的相对表达量均显著升高。可见,ISO 诱导的 CHF 大鼠存在明显的心肌纤维化损伤,同时心肌组织中 miR-139 表达量显著下降,Wnt/ β -catenin 信号通路被激活。

参附注射液由红参和制附子组成,其具有益气回阳、固摄心阳的作用,用于治疗由阳虚引起的各种疾病,其有效成分为人参皂苷、乌头类生物碱和人参多糖等。人参皂苷能促进心脏营养物质代谢,增强心脏收缩力,乌头类生物碱能促进心室收缩,优化心肌血流量,改善心功能^[27-28]。研究证实,参附注射液具有改善心肌纤维化、减轻左心室纤维化程度、减轻心肌损伤、促使心肌修复的作用,可从多方面治疗心力衰竭等疾病^[29-30]。

miRNA 通过多种途径参与心室病理性重构,在纤维性疾病中发挥着重要作用^[31]。miR-139 具有抗心肌损伤作用,可调节细胞凋亡和自噬,拮抗 ISO 诱导的心肌细胞肥大和 ANP、BNP 上调,从而预防心肌缺血和再灌注损伤^[10,12,32]。Wnt/ β -catenin 信号通路在调控心肌纤维化方面起到了重要作用^[13-14]。正常成人心脏中 Wnt 信号是静止的,在心脏损伤后,该信号被激活并促进纤维化,而 Wnt 拮抗剂可减轻受损心脏的纤维化状态^[33-36]。 β -catenin 是 Wnt 信号通路的关键蛋白之一,与组织纤维化密切相关^[37]。而

Wnt3a 蛋白是 β -catenin 的有效刺激物,可阻止 β -catenin 被磷酸化,阻止其被蛋白酶体识别和降解^[33]。含有 Wnt3a 的外泌体可激活心脏成纤维细胞中的 Wnt/ β -catenin 信号,抑制 GSK3 β 的活性,使 β -catenin 进入细胞核,最终促进心肌纤维化^[38]。研究表明,miR-139-5p 通过 Wnt/ β -catenin 通路在心脏疾病中发挥重要作用^[39]。

本研究结果显示:与模型组相比,参附注射液组大鼠精神状态、行为活动、饮食饮水情况明显改善,毛发光泽恢复,体质量明显增加,心脏质量指数以及左心室质量指数显著降低;从超声心动图结果分析,心功能指标 LVEDD、LVESD 显著下降,LVEF、LVFS 显著上升;从生物标志物分析,血清 NT-proBNP 水平显著下降;从病理结果分析,心肌细胞结构完整,细胞排列趋于整齐,纤维结缔组织增生和炎症细胞浸润明显减少,胶原纤维沉积明显减少,纤维化程度明显减轻;从蛋白、基因角度分析,参附注射液组大鼠心肌组织中 miR-139 相对表达量显著升高,Wnt/ β -catenin 信号通路相关因子 Wnt3a、 β -catenin、GSK3 β 蛋白和 mRNA 相对表达量均显著降低,心肌组织中心肌纤维化相关因子 Col-I、Col-III、 α -SMA、MMP-2、MMP-9 蛋白和 mRNA 相对表达量均显著降低。上述结果说明参附注射液能有效改善 CHF 大鼠的心肌纤维化损伤情况,且治疗效果较卡托普利组更为显著。可见,参附注射液可能通过抑制 miR-139/Wnt/ β -catenin 信号通路,发挥改善 CHF 大鼠心功能及心肌纤维化的作用。

综上,本研究通过 ISO 诱导构建 CHF 大鼠模型,探讨参附注射液对 CHF 大鼠心肌纤维化的改善机制。研究结果表明,参附注射液能够改善 CHF 大鼠的心功能,减轻心肌纤维化程度,降低心肌组织中的纤维化相关蛋白及 mRNA 的表达,其机制可能与上调心肌组织中的 miR-139 表达,进而抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。为了进一步验证该结果,后续计划在细胞实验中进一步探索 miR-139 与 Wnt/ β -catenin 信号通路之间的具体作用位点,探索参附注射液对 CHF 心肌纤维化的保护机制,为 CHF 的临床应用和药物研发提供更充分的科学实验依据。

参考文献

- [1] ADAMO L, ROCHA-RESENDE C, PRABHU S D, et al. Reappraising the role of inflammation in heart failure[J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2020, 17(5): 269-285.
- [2] 中国心血管健康与疾病报告 2022 概要[J]. *中国循环杂志*, 2023, 38(6): 583-612.
- [3] BURCHFIELD J S, XIE M, HILL J A. Pathological ventricular remodeling: Mechanisms: Part 1 of 2[J]. *Circulation*, 2013, 128(4): 388-400.
- [4] DWECK M R, JOSHI S, MURIGU T, et al. Midwall fibrosis is an independent predictor of mortality in patients with aortic stenosis[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2011, 58(12): 1271-1279.
- [5] 王浩, 张振贤. 心室重构发病机制及中医药防治的研究概述[J]. *中医药信息*, 2021, 38(8): 70-75.
- [6] WANG H J, CAI J. The role of microRNAs in heart failure[J]. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease*, 2017, 1863(8): 2019-2030.
- [7] VERJANS R, PETERS T, BEAUMONT F J, et al. microRNA-221/222 family counteracts myocardial fibrosis in pressure overload-induced heart failure[J]. *Hypertension*, 2018, 71(2): 280-288.
- [8] ZHANG J C, LANG Y, GUO L H, et al. microRNA-323a-3p promotes pressure overload-induced cardiac fibrosis by targeting TIMP3[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 50(6): 2176-2187.
- [9] GARCÍA R, SALIDO-MEDINA A B, GIL A, et al. Sex-specific regulation of miR-29b in the myocardium under pressure overload is associated with differential molecular, structural and functional remodeling patterns in mice and patients with aortic Stenosis[J]. *Cells*, 2020, 9(4): 833.
- [10] 杨子瑶, 陈彦丽, 苏明, 等. miR-139-5p 与心力衰竭的相关性研究[J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2022, 22(1): 4475-4480.
- [11] LI T, LIANG S M, ZHANG Y X, et al. Effects of microRNA-139 on myocardial cell injury induced by oxidative stress[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2015, 8(11): 19994-20001.
- [12] WANG Y C, SUN H, SONG J, et al. miR-139-5p protect against myocardial ischemia and reperfusion (I/R) injury by targeting autophagy-related 4D and inhibiting AMPK/mTOR/ULK1 pathway[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2017, 10(9): 10140-10151.
- [13] 张翥, 陶亮亮, 刘品刚, 等. Wnt/ β -catenin 抑制剂 XAV939 对心肌梗死大鼠心肌纤维化的影响[J]. *岭南心血管病杂志*, 2021, 27(2): 214-218.
- [14] 刘舜禹, 李巧稚, 芮浩森, 等. 抗纤益心方对扩张型心肌病模型大鼠心肌纤维化相关因子及心肌组织 β -catenin/PPAR γ 信号通路的影响[J]. *中医杂志*, 2021, 62(3): 259-265.
- [15] 郑安财. 异丙肾上腺素诱导的心衰大鼠的肠道菌群结构和功能

- 的改变[D]. 南昌: 南昌大学, 2018.
- [16] 裴强, 赵习德, 桑文凤. 参附注射液治疗阳气虚型慢性心力衰竭[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 315-318.
- [17] 陈雨, 徐国良, 刘红宁, 等. 参附汤不同配伍比例及临床应用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 220-225.
- [18] 张圆, 任长虹, 吴晓丹, 等. 参附注射液的临床应用及药理机制研究进展[J]. 药物评价研究, 2018, 41(6): 1141-1146.
- [19] 黄淑敏, 廖晓倩, 范星宇, 等. 基于 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路探讨参附注射液对慢性心力衰竭大鼠的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(20): 5556-5563.
- [20] 唐金莉, 李杰. 参附注射液对缺血性心脏病伴急性心力衰竭患者心功能和心肌纤维化的影响[J]. 世界中医药, 2018, 13(9): 2186-2188, 2192.
- [21] 黄淑敏, 廖晓倩, 范星宇, 等. 基于“以方测证”理论探讨异丙肾上腺素诱导慢性心力衰竭大鼠模型的制备及中医证型[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(3): 368-375.
- [22] NING D, YANG X Q, WANG T, et al. Atorvastatin treatment ameliorates cardiac function and remodeling induced by isoproterenol attack through mitigation of ferroptosis[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 574: 39-47.
- [23] 王梓仪, 张倩, 郭瑾, 等. 基于铁死亡介导的氧化应激探讨慢性心力衰竭大鼠的发病机制及参附注射液的干预作用[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(19): 5285-5293.
- [24] COELHO N M, MCCULLOCH C A. Contribution of collagen adhesion receptors to tissue fibrosis[J]. *Cell and Tissue Research*, 2016, 365(3): 521-538.
- [25] UMBARKAR P, EJANTKAR S, TOUSIF S, et al. Mechanisms of fibroblast activation and myocardial fibrosis: Lessons learned from FB-specific conditional mouse models[J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2412.
- [26] 张瑾, 李秀敏, 苗明三. 基于中西医临床病症特点的心力衰竭动物模型分析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(4): 786-791.
- [27] ZHENG S D, WU H J, YU S P, et al. Shenfu Injection (参附注射液) suppresses inflammation by targeting haptoglobin and pentraxin 3 in rats with chronic ischemic heart failure[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2015, 21(1): 22-28.
- [28] 薛建军, 呼荟茹, 齐兵献, 等. 参附注射液对心肌缺血再灌注老年大鼠 NF- κ B 及 I κ B- α 表达的影响[J]. 西部中医药, 2013, 26(2): 18-21.
- [29] 王一心, 刘鹏, 李彤, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨参麦注射液治疗心房纤颤的活性成分及作用机制[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(17): 4511-4521.
- [30] 苏湾英, 洪芬芳, 杨树龙. 参附注射液对心脑血管疾病防治作用的新进展[J]. 南昌大学学报(医学版), 2018, 58(5): 85-89, 100.
- [31] WANG C, YIN S X, WANG Q, et al. miR-409-3p regulated by GATA2 promotes cardiac fibrosis through targeting Gpd1[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 2022: 8922246.
- [32] SU M, WANG S Y, QIU W, et al. miR-139-5p inhibits isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by targeting c-Jun[J]. *Bioscience Reports*, 2018, 38(2): BSR20171430.
- [33] LAEREMANS H, HACKENG T M, VAN ZANDVOORT M A, et al. Blocking of frizzled signaling with a homologous peptide fragment of wnt3a/wnt5a reduces infarct expansion and prevents the development of heart failure after myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2011, 124(15): 1626-1635.
- [34] BLYSZCZUK P, MÜLLER-EDENBORN B, VALENTA T, et al. Transforming growth factor- β -dependent Wnt secretion controls myofibroblast formation and myocardial fibrosis progression in experimental autoimmune myocarditis[J]. *European Heart Journal*, 2017, 38(18): 1413-1425.
- [35] HE W, ZHANG L N, NI A G, et al. Exogenously administered secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) reduces fibrosis and improves cardiac function in a rat model of myocardial infarction[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(49): 21110-21115.
- [36] SHAO S, CAI W W, SHENG J, et al. Role of SDF-1 and Wnt signaling pathway in the myocardial fibrosis of hypertensive rats[J]. *American Journal of Translational Research*, 2015, 7(8): 1345-1356.
- [37] TAN R J, ZHOU D, ZHOU L L, et al. Wnt/ β -catenin signaling and kidney fibrosis[J]. *Kidney International Supplements*, 2014, 4(1): 84-90.
- [38] DZIAŁO E, RUDNIK M, KONING R I, et al. WNT3a and WNT5a transported by exosomes activate WNT signaling pathways in human cardiac fibroblasts[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(6): 1436.
- [39] ZHANG F, CHENG N X, HAN Y C, et al. miRNA expression profiling uncovers a role of miR-139-5p in regulating the calcification of human aortic valve interstitial cells[J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 722564.

(本文编辑 苏维)