DOI:10.16016/j.1000-5404.202101061

冠心丹参制剂通过 miR-330-3p/ALDH2 保护大鼠心脏免受缺血/再灌注损伤

袁 芳,杨艳华,赵鑫扬,李 磊 430000 武汉,武汉市第四医院,华中科技大学同济医学院附属普爱医院心内科

[摘要] **目的** 探讨冠心丹参(Guanxin Salvia miltiorrhiza, GXDS)的心脏保护作用与肥大细胞脱粒抑制是否有关及其机制。**方法** 使用 miR-330-3p mimics、ALDH2 Vector 转染或者肥大细胞促分泌素化合物 48/80(C48/80)处理心肌细胞,采用 PCR 和 Western blot 检测 miR-330-3p 和 ALDH2 的表达,MTT 和流式细胞仪检测细胞增殖和凋亡,ELISA 检测肥大细胞脱粒和类胰蛋白酶释放,双荧光素酶报告基因检测两者的靶向结合。通过结扎大鼠左前降支冠状动脉 30 min 并再灌注 120 min 建立缺血再灌注(I/R)损伤模型,使用肥大细胞促分泌素化合物 48/80(C48/80)、GXDS 治疗,通过免疫组化检测不同处理组小鼠心肌组织损伤。**结果** C48/80 抑制心肌细胞 H9C2(2-1)和肥大细胞 RBL-2H3 的活力并促进其凋亡($P<0.05$),增加 cTnI 和类胰蛋白酶的释放($P<0.05$),而 GXDS 处理可通过 miR-330-3p/ALDH2 促进心肌细胞的活力并抑制其凋亡,同时抑制肥大细胞脱粒($P<0.05$);进一步的体内实验结果显示:与假手术组相比,I/R 组血流动力学异常,心律不齐,心脏水肿,梗死面积、组织病理学损伤以及 cTnI 和 miR-330-3p 的水平均显著升高($P<0.05$),ALDH2 表达水平下调($P<0.05$),而 GXDS 预处理可以通过抑制肥大细胞脱粒和类胰蛋白酶释放发挥心肌保护作用。**结论** GXDS 通过 miR-330-3p/ALDH2 抑制大鼠心脏肥大细胞脱粒,从而改善缺血/再灌注引起的损伤。

[关键词] 冠心丹参;类胰蛋白酶;肥大细胞;缺血/再灌注;醛脱氢酶 2

[中图法分类号] R285.5; R289.5; R541.5 [文献标志码] A

Guanxin *Salvia Miltiorrhiza* Preparation protects rat cardiomyocytes against ischemia/reperfusion injury through miR-330-3p/ALDH2

YUAN Fang, YANG Yanhua, ZHAO Xinyang, LI Lei Department of Cardiology, Wuhan Fourth Hospital, Pu'ai Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei Province, 430000, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the cardioprotective effectiveness of Guanxin *Salvia miltiorrhiza* (GXDS) Preparation (a prescribed Chinese herbal formula) and its relationship with inhibition of mast cell degranulation, and investigate the underlying mechanism. **Methods** Cardiomyocytes H9C2 (2-1) cocultured with mast RBL-2H3 cells cells were transfected with miR-330-3p mimics or ALDH2 Vector, or treated with GXDS or Compound 48/80, a mast cell degranulator. The expression of miR-330-3p and ALDH2 was detected by PCR and Western blotting, and cell proliferation and apoptosis were detected by MTT assay and flow cytometry. Mast cell degranulation and trypsin release were detected by ELISA, and the targeted binding of mast cell degranulation and trypsin release was detected by double luciferase reporter gene. Then, a rat model of myocardial ischemia/reperfusion injury was established by ligating the left anterior descending coronary artery for 30 min followed by reperfusion for 120 min. Then Compound 48/80 or GXDS was used to treat the rats with myocardial injury or sham operation. The myocardial injury was detected by immunohistochemistry in

[基金项目] 武汉市卫生计生委项目(WZ18Q10)

[通信作者] 李 磊,E-mail 1517836083@qq.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

different treatment groups. **Results** Compound 48/80 inhibited the viability and promoted the apoptosis of H9C2 (2-1) and RBL-2H3 cells, and increased the releases of cTnI and trypsin ($P<0.05$). GXDS treatment could promote the viability and inhibit the apoptosis of cardiomyocytes through miR-330-3p/ALDH2 ($P<0.05$), and inhibit mast cell degranulation ($P<0.05$). Compared with the sham operation rats, the hemodynamic abnormalities, arrhythmia, cardiac edema, infarct size, histopathological damages and levels of cTnI and miR-330-3p were significantly increased and the expression of ALDH2 was down-regulated in the rats of the model group ($P<0.05$). GXDS pretreatment protected myocardium by inhibiting mast cell degranulation and trypsin release. **Conclusion** GXDS inhibits the degranulation of rat cardiac mast cells through miR-330-3p/ALDH2, and thus improves the myocardial ischemia/reperfusion injury.

[**Key words**] Guanxin *Salvia miltiorrhiza*; tryptase; mast cells; ischemia/reperfusion; aldehyde dehydrogenase 2

Supported by the Project of Wuhan Health and Family Planning Commission (WZ18Q10). Corresponding author: LI Lei, E-mail: 1517836083@qq.com

急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)是一种常见的严重心血管疾病,死亡率很高。大约30%接受介入治疗的AMI患者会经历心肌缺血/再灌注损伤(myocardial ischemia/reperfusion injury, MIRI),其并发症会引发一系列不良后果,例如恶性心律不齐、心力衰竭,甚至猝死[1]。I/R损伤可引起氧化应激、炎症反应、免疫功能障碍并诱发先天免疫。心脏肥大细胞(cardiac mast cell, CMC)位于微脉管周围,在I/R发病早期阶段通过脱颗粒和释放介体(包括类胰蛋白酶、肾素、组胺和肝素等)起直接作用,并进行快速内吞以回收颗粒,以在反复损伤刺激期间维持脱粒反应[2]。长期的心肌缺血介导肥大细胞的脱粒和肾素的过度释放,从而激活局部心脏的肾素-血管紧张素系统,导致去甲肾上腺素释放和心律不齐,而缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC)可以通过肥大细胞上的G蛋白偶联受体触发蛋白激酶C-ε/醛脱氢酶2型(PKC-/ALDH2)途径减轻损伤[3-4]。ALDH2基因中的错义单核苷酸多态性(SNP)rs671导致ALDH2蛋白的显性负型表达,携带rs671突变的人表现出过量的乙醛积聚,导致饮酒后出现潮红综合征[5],此外,据报道,Rs671还与多种疾病有关[6],例如肌肉萎缩、骨质疏松症、髋部骨折、阿尔茨海默病和食道癌。

中药用于治疗和预防疾病已有数千年的历史,被证明对治疗心血管疾病有效且安全。《中国药典》记载的中药“冠心丹参”(Guanxin *Salvia Miltiorrhiza*, GXDS)配方是中国缺血性心脏病临床治疗的主要处方之一,配方由丹参、三七和黄檀组成[7]。研究表明GXDS制剂可通过PI3K/Akt信号转导上调雌激素受体β来防止心肌缺血再灌注损伤引起的心肌重塑[8]。此外,研究显示GXDS的心脏保护作用与其抗炎、抗氧化、抑制压力、负性变力和变时作用以及通过中枢和外周靶点引起的副交感神经调节有关[9],但是其对于CMC的作用和机制尚少见研究。因此,本研究旨在探讨GXDS对于CMC的作用及其潜在机制。

1 材料与方法

1.1 大鼠冠状动脉结扎MIRI模型

72只健康成年雄性Sprague-Dawley大鼠,体质量(300±20)g,10~12周龄,购自湖南省SJA实验动物有限公司(编号SYXK-2020-004,伦理审批号JN.No20191030),并饲养在温度25~28 ℃、湿度40%~50%的SPF级环境中。

通过结扎冠状动脉左前降支(LAD)缺血处理30 min,然后释放结扎再灌注120 min,建立大鼠MIRI模型:将大鼠用1%的戊巴比妥钠(50 mg/kg,腹膜内注射;Sigma-Aldrich,美国)麻醉,在气管切开术后通过导管通气,进行开胸手术,使用6-0丝线(科辉医疗技术有限公司,中国)结扎LAD冠状动脉,通过RM6240BD多通道生理信号系统(成都仪器厂)记录视紫绀、壁运动异常和ST段抬高以验证心肌缺血损伤,30 min后松开结扎,然后缝合胸腔并再灌注120 min。MIRI模型标准:视紫绀、壁运动减少且ST段恢复50%以上。

1.2 大鼠处理与分组

将72大鼠分为6组,每组12只:①对照组,进行假手术;②I/R组(按照1.1说明建立MIRI模型);③GXDS组,MIRI手术前30 min,使用5 mg/kg GXDS[10]腹腔注射预处理;④肥大细胞脱粒剂组(MCD组),假手术前30 min,使用肥大细胞脱粒剂C48/80(0.5 mg/kg,静脉内注射,Sigma-Aldrich,83856-13-7,美国)预处理;⑤MCD-I/R组,MIRI造模前30 min,使用C48/80预处理;⑥GXDS-MCD组,MIRI造模前

30 min,使用 GXDS 和 C48/80 处理。

1.3 HE 染色

石蜡包埋后,将大鼠心脏的左心室标本切成 4 μm 的切片,用苏木精、碳酸锂和曙红染色,以梯度酒精系列脱水,用二甲苯透明,并用中性胶密封。用光子显微镜(BH-Z,奥林巴斯公司,日本)对切片进行观察和拍照。心肌组织学评分的严重程度如下:正常(0),轻度(1),中度(2),重度(3)和极重度损伤(4)。

1.4 透射电子显微镜观察

从大鼠心脏中分离出 LAD 冠状动脉(2 mm)和左心室心肌(1 mm×1 mm×1 mm),分别在室温下于 2.5%戊二醛中保存 1 h,在 4 ℃中保存 12 h。将心脏标本包埋在树脂中,制作 50~80 nm 切片,然后用醋酸铀和柠檬酸铅双重染色。在透射电子显微镜(TEM,MORADA G2,德国)下评价冠状动脉和心肌的形态特征。

1.5 甲苯胺蓝染色

制作心肌和冠状动脉切片后,使用甲苯胺蓝染色观察切片中完整(IMC)和脱粒(DMC)肥大细胞的数目,并在 BH-Z 显微镜(Olympus Corporation,日本)下计数,然后计算肥大细胞脱粒率:MCD = DMCs/(IMCs)+DMCs×100%。

1.6 RNA 分离和 qRT-PCR 检测

通过 TRIzol 试剂盒(GenStar,北京)从心脏组织中提取总 RNA,并通过反转录合成 cDNA。使用一步 SYBR Green 定量实时聚合酶链反应(qRT-PCR)试剂盒(GenStar,中国)进行定量分析,每个反应进行 3 次。引物序列由 Sangon BiGXDSech(中国)合成,通过比较阈值循环(Ct)方法以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算倍数变化,靶基因的相对水平通过管家基因 GAPDH 进行标准化。GAPDH 正向:5′-TGAGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3′,反向 5′-AAGAAGGAAGGCTGGAAAAGAG-3′; miR-330-3p 正向:5′-ACCTGCTGGTGGAAAACATCATT-3′,反向 5′-AGGAGCAAGTAGGCACCTCACAC-3′;ALDH2 正向:5′-CAAGCAAACCTTCGATTGATCTCT-3′,反向 5′-ATAG-GCTCAATCCCGTCCTTAAAA-3′。

1.7 Western blot 检测

通过商业试剂盒(默克蛋白快速提取试剂盒,中国)从心脏组织中提取蛋白质,并使用 BCA 试剂盒(GenStar,中国)测定蛋白质含量,将提取的蛋白质通过 10%SDS-PAGE 凝胶电泳分离,并转移至 PVDF 膜(苏州康润)。抗 ALDH2 抗体(稀释度 1∶2 000,Abcam,美国)和抗 GAPDH 抗体(稀释度 1∶5 000,Abcam,美国)在 4 ℃下孵育膜过夜,然后将山羊抗小鼠多克隆抗体(稀释度 1∶5 000,Affinity,美国)室温孵育 1 h,通过 ECL 化学发光法(GenStar,中国)可视化,并通过凝胶分析系统(Bio-Rad,Hercules,美国)成像。ALDH2 的相对表达通过 Image J 2X(NIH,美国)进行分析,通过目的蛋白条带与内参 GAPDH 条带光密度值比值量化。

1.8 细胞培养

心肌细胞 H9C2(2-1)和肥大细胞 RBL-2H3 购自国家细胞资源中心(中国科学院,上海),用添加 10%胎牛血清(FBS,Gibco,美国)和含乙醇的 DMEM(BioInd,以色列)中培养。培养条件为 5%CO2 和 95%湿度的恒温箱中。

将 1×10^6/mL 的 H9C2 与相等数量的 RBL-2H3 在 96 孔板中共培养(Millipore,美国)12 h。用 GXDS(2 μmol/L)或 C48/80(1 μmol/L)处理细胞,并分为:①对照组,未经处理的培养基培养;②MCD 组,1 μmol/L C48/80 处理 30 min;③GXDS 组,以 2 μmol/L GXDS 预处理 60 min 后,以 1 μmol/L C48/80 预处理 30 min;④ALDH2 vector 组,使用 ALDH2 vector 转染 24 h 后,以 1 μmol/L C48/80 预处理 30 min。

1.9 双重荧光素酶报告基因实验

克隆 miR-330-3p 与 ALDH2 基因 3’UTR 的结合序列,同时由睿凯细胞生物科技有限公司(中国)合成结合位点的突变序列,并将两种序列各自剪接至 pYr-MirTarget 载体中海肾荧光素酶基因下游的 *Xho* Ⅰ和 NGXDSI 限制位点。

将 RBL-2H3 细胞以每孔 2×10^5 个细胞接种到 12 孔板中。使用 Lipofectamine 2000(Invitrogen,美国),将细胞与 2 μg pYr-MirTarget-ALDH2-3′UTR(野生型或突变体)和 50 nmol/L miR-330-3p mimics(模拟物)/mimics NC 共转染,48 h 后收获细胞,使用双重荧光素酶报告基因检测试剂盒(BeyGXDSime,中国)进行检测,用化学发光免疫分析仪(Kpsontech,中国)检测相对光单位(RLU),通过萤火虫荧光素酶与海肾荧光素酶(Rluv/Fluc)活性荧光单位比值量化。

1.10 流式细胞仪分析

在室温下,将各组心肌细胞或肥大细胞悬液(100 μL 中 4×10^5 个细胞)与 10 μL 的 Annexin V 和 5 μL 的 PI 孵育 15 min,然后通过 Flowjo 10(BD Biosciences,美国)检测和分析细胞凋亡率。

1.11 MTT 测定

将每组心肌细胞或肥大细胞分别接种于 96 孔板(1×10^3/孔),将 10 μL 噻唑基蓝(Sigma-Aldrich,美国)添加到每个孔中,并在 37 ℃下孵育 4 h,然后用 150 μL 二甲基亚砜(DMSO,Sigma-Aldrich,美国)置换溶液,用

多光谱微板分光光度计(Thermo Scientific,美国)在490 nm处测量光密度值D(490)。

1.12 酶联免疫吸附测定(ELISA)

收集每组细胞上清液和大鼠血清,通过ELISA试剂盒检测cTnI和类胰蛋白酶的浓度。

1.13 统计学分析

采用SPSS 25.0统计软件,所有数据表示为$\bar{x}\pm s$。通过单向方差分析和χ^2检验比较平均值和百分比值。Bonferroni检验和Wilcoxon秩和检验用于组间比较,$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 GXDS通过miR-330-3p/ALDH2抑制肥大细胞脱粒和心肌细胞凋亡

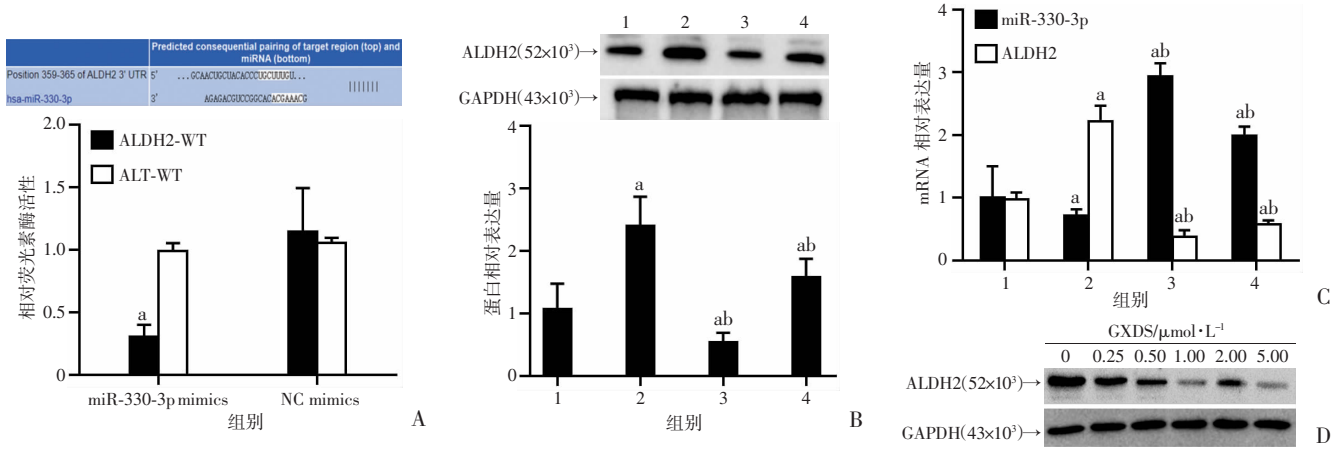
双荧光素酶报告基因和Western blot分析显示:miR-330-3p可通过靶向ALDH2的3'UTR而抑制其表达,PCR和Western blot分析显示:与对照组相比,MCD组miR-330-3p转录水平明显降低($P<0.05$),ALDH2的mRNA和蛋白水平显著升高;GXDS预处理则能明显上调miR-330-3p水平($P<0.05$),促进ALDH2的表达($P<0.05$),且呈现剂量依赖性(图1)。

流式细胞仪分析显示:与对照组相比,MCD组H9C2(2-1)和RBL-2H3细胞的凋亡率明显升高($P<0.05$),细胞活力被显著抑制($P<0.05$),而GXDS预处理或ALDH2 Vector转染可抑制C48/80诱导的细胞凋亡,促进细胞活力($P<0.05$,图2A~C);ELISA分析显示:与对照组相比,MCD组cTnI和类胰蛋白酶水平明显升高($P<0.05$),而GXDS和ALDH2 Vector组cTnI和类胰蛋白酶水平与MCD组相比显著降低($P<0.05$,图2D、E)。

2.2 GXDS通过抑制肥大细胞脱粒缓解心脏损伤

与对照组相比,MCD和I/R组大鼠的收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、平均动脉压(MAP)、心率(HR)、心率收缩压乘积(RPP)、左室射血分数(LVEF)和左室缩短分数(LVFS)降低($P<0.05$),与I/R组相比,MCD-I/R组中SBP、DBP、MAP、HR、RPP、LVEF和LVFS明显更低($P<0.05$);与I/R组或MCD-I/R组相比,GXDS组与GXDS-MCD组大鼠SBP、DBP、MAP、HR、RPP、每搏输出量指数(SI)、LVEF和LVFS值均显著升高($P<0.05$),而HR水平差异无统计学意义(图3、图4A~C)。

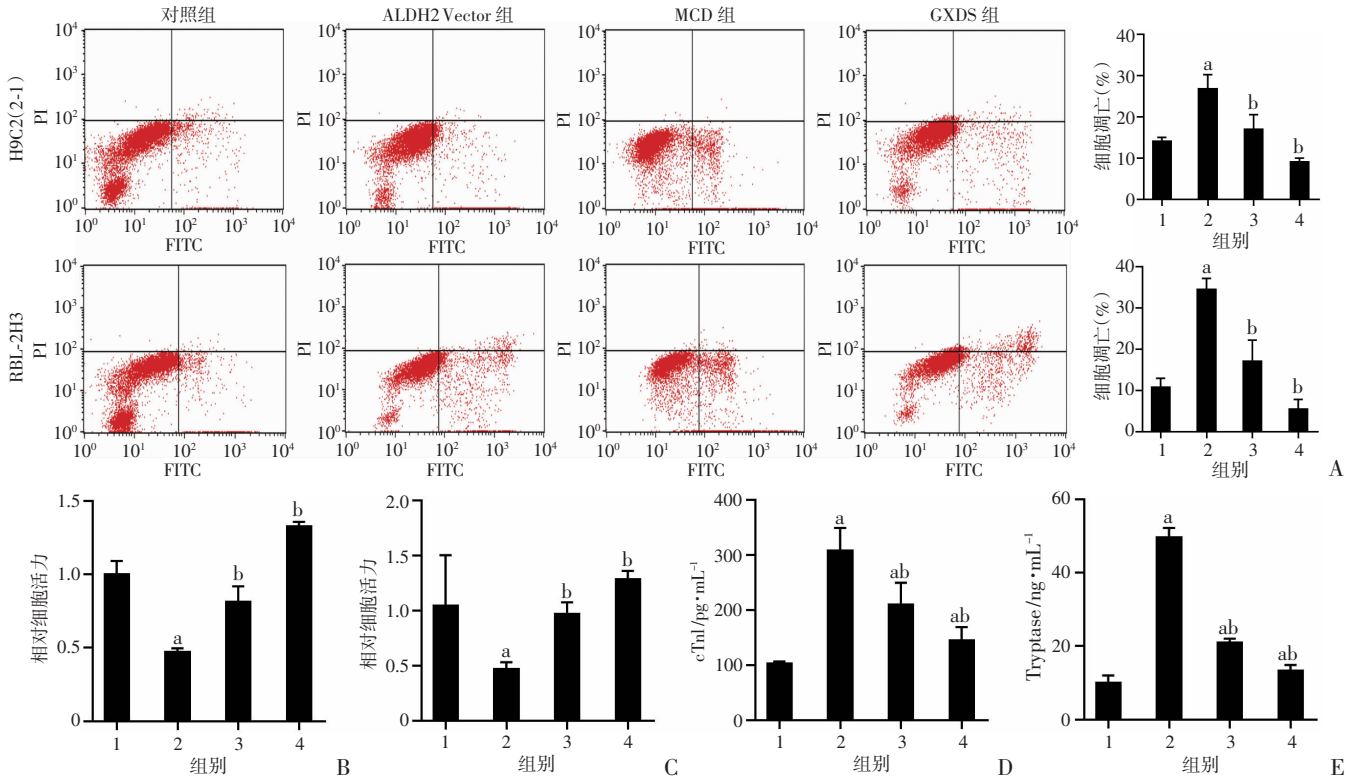
与对照组相比,I/R组的心律失常严重程度评分、心脏含水量和梗死面积显著增加($P<0.05$),MCD组的心律失常严重程度评分和心脏含水量明显增加($P<0.05$),但两组之间的梗死面积无明显变化;与I/R组相比,MCD-I/R组心律失常严重程度评分、心脏含水量和梗死面积明显加重($P<0.05$),与I/R组或MCD-I/R组相比,GXDS组与GXDS-MCD组大鼠心律失常严重程度评分、心脏含水量和梗死面积明显降低($P<0.05$,图4D~F)。



1:对照组;2:MCD组;3:miR-330-3p mimics组;4:GXDS组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与MCD组比较

A:双荧光素酶报告基因验证miR-330-3p与ALDH2结合;B:不同处理后各组细胞ALDH2表达水平;C:不同处理后各组细胞ALDH2和miR-330-3p转录水平;D:不同浓度GXDS处理后各组细胞ALDH2表达水平

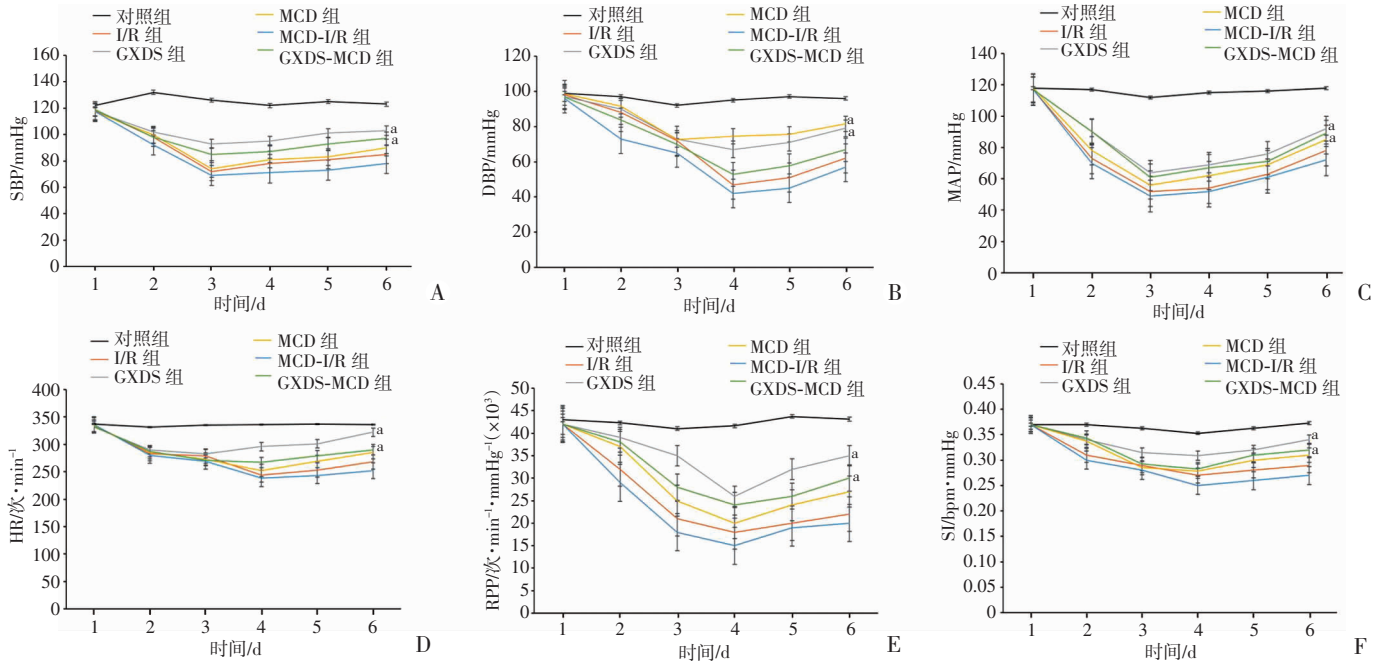
图1 GXDS通过miR-330-3p抑制ALDH2的表达



1:对照组;2:MCD 组;3:GXDS 组;4:ALDH2 Vector 组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 MCD 组比较

A:流式细胞仪分析 H9C2(2-1)和 RBL-2H3 细胞凋亡率;B、C:MTT 检测 H9C2(2-1)和 RBL-2H3 细胞活力;D、E:ELISA 检测 cTnI 和类胰蛋白酶(Tryptase)的释放

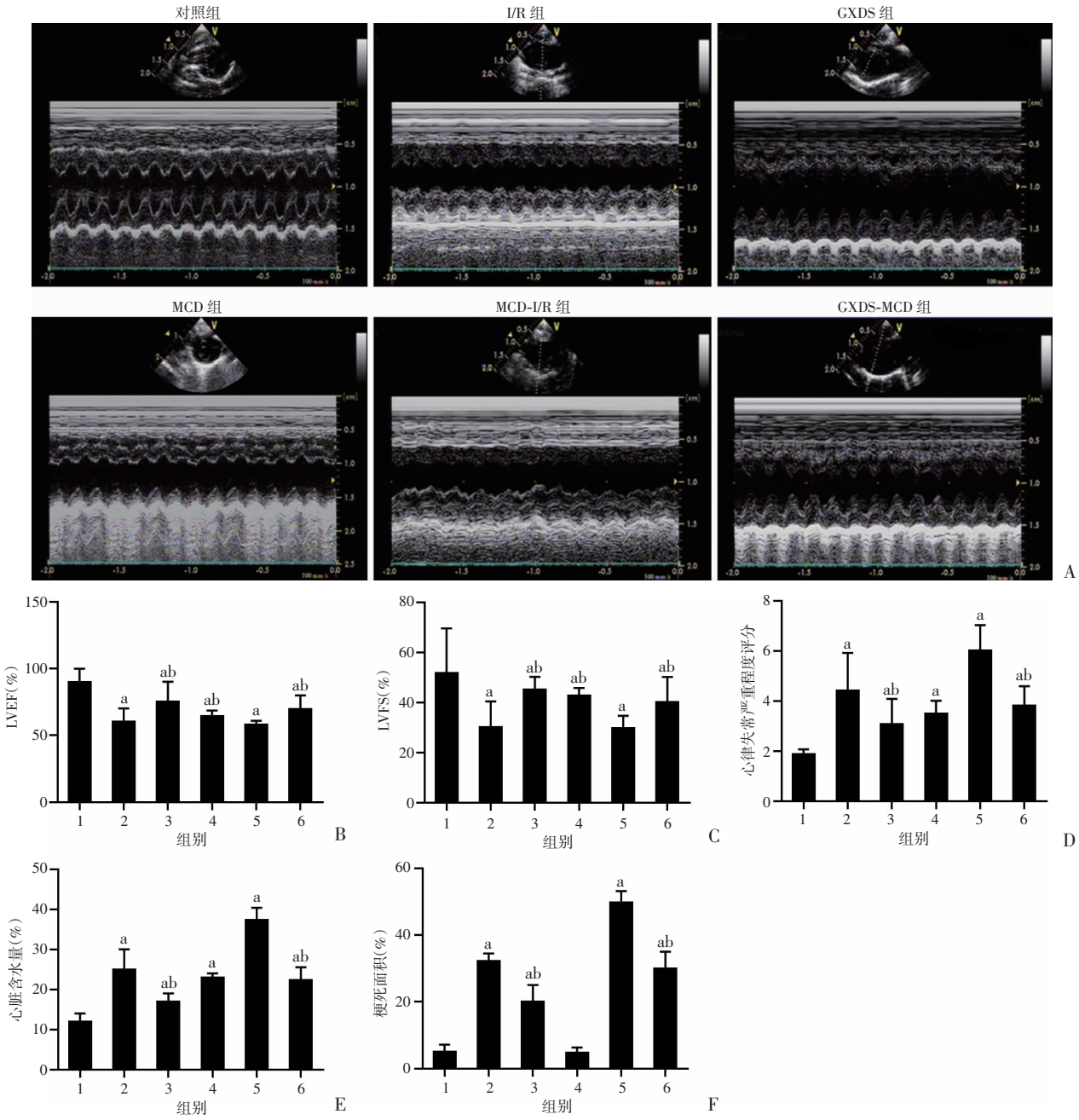
图 2 GXDS 改善 C48/80 诱导的细胞损伤



a:$P<0.05$,与 MCD-I/R 或 I/R 组比较

A~F:各组大鼠 SBP、DBP、MAP、HR、RPP 和 SI

图 3 各组大鼠心肌损伤相关指标的比较



1:对照组;2:I/R 组;3:GXDS 组;4:MCD 组;5:MCD-I/R 组;6:GXDS-MCD 组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 MCD-I/R 或 I/R 组比较

A:各组大鼠经胸超声心动图表现;B~F:各组大鼠 LVEF、LVFS、心律失常严重程度评分、心脏含水量和梗死面积

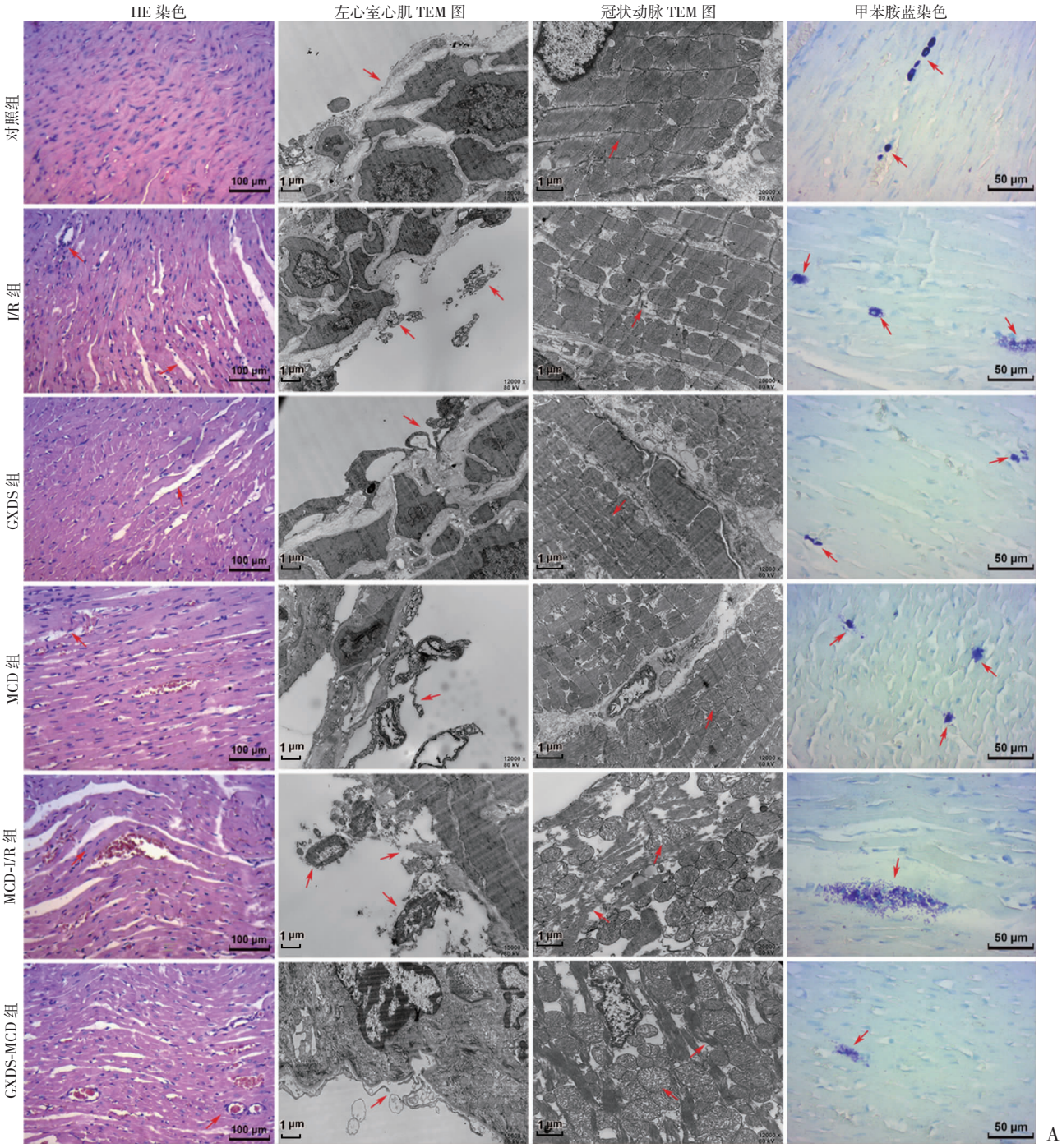
图 4 GXDS 通过抑制大鼠心脏肥大细胞脱粒而改善 I/R 诱导的损伤

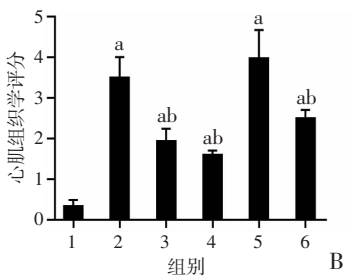
2.3 GXDS 通过抑制肥大细胞脱粒缓解心血管损伤

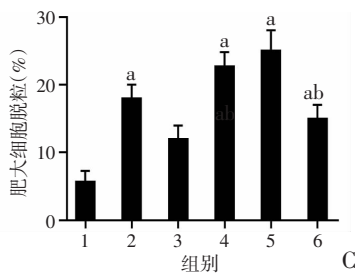
I/R 损伤或 C48/80 预处理可以导致大鼠心肌水肿、心肌间质中胶原蛋白含量增加、肌纤维破坏和少量炎性细胞浸润,GXDS 预处理可缓解 C48/80 或 I/R 损伤引起心肌水肿、肌纤维损伤和炎性细胞浸润(图 5);此外,TEM 观察显示 I/R 组大鼠冠状动脉和左心室心肌的肌原纤维和内皮明显破坏,细胞膜和内皮完整性丧失,C48/80 预处理则引起线粒体超微结构变化和大量胞质液泡的出现,而 GXDS 治疗后可观察到少量肌原纤维和内皮细胞破坏,并且心肌和动脉损伤得到明缓解(图 5)。

与对照组中正常的肥大细胞完整颗粒相比,I/R 组中肥大细胞脱粒并分散在心肌中,部分聚集在血管周围;在 MCD 组中 C48/80 的预处理导致肥大细胞的脱颗粒,并且在 MCD-I/R 组中肥大细胞脱颗粒显著增强而形成弥漫性星云状颗粒;在 GXDS 和 GXDS-

MCD 组中,GXDS 预处理可以显著抑制肥大细胞的脱粒和星云状颗粒的形成(图 5)。定量分析结果显示:与对照组相比,I/R 组的心肌组织病理学评分和肥大细胞脱颗粒率显著增加($P<0.05$),而 GXDS 的预处理可显著降低心肌组织病理学评分和肥大细胞脱颗粒程度($P<0.05$,图 5)。







1:对照组;2:I/R 组;3:GXDS 组;4:MCD 组;5:MCD-I/R 组;6:GXDS-MCD 组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 MCD-I/R 或 I/R 组比较;箭头示肥大细胞脱粒

A:HE 染色检测心肌的组织病理学变化,TEM 检测左心室心肌和冠状动脉的超微结构,甲苯胺蓝染色检测的肥大细胞脱粒;B:心肌组织学评分;C:肥大细胞脱粒(%)

图 5　GXDS、C48/80 处理后大鼠心肌和冠状动脉形态及损伤标志物的变化

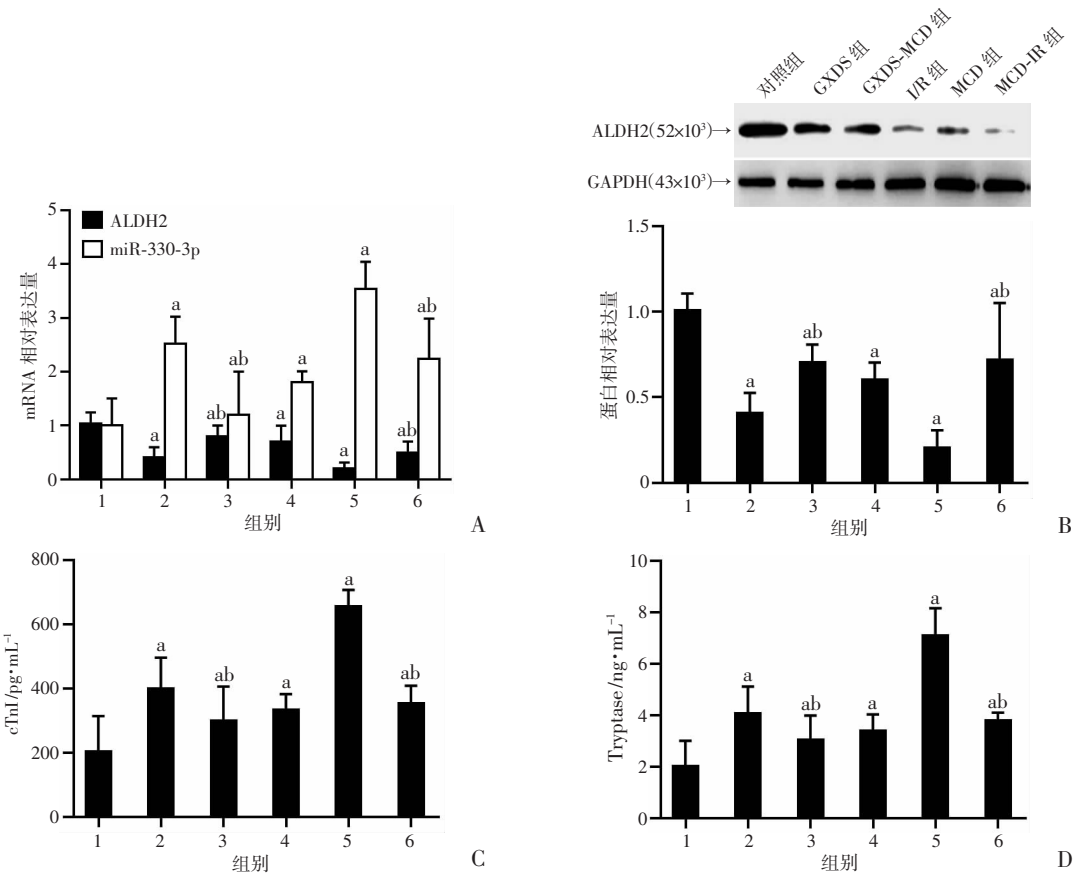
2.4 GXDS 通过 miR-330-3p/ALDH2 抑制体内肥大细胞脱粒

与对照组相比,I/R 和 MCD 组 miR-330-3p 的转录水平明显上调而 ALDH2 表达显著降低($P<0.05$),MCD-IR 组 miR-330-3p 的转录水平相较于 I/R 组明显更高($P<0.05$),而 ALDH2 水平则明显更低($P<0.05$),GXDS 预处理则可下调 miR-330-3p 的转录水平,促进 ALDH2 的表达($P<0.05$,图 6A、B)。此外,ELISA 分析显示:与对照组相比,I/R 组的 cTnI($P<0.05$)、类胰蛋白酶水平($P<0.05$)显著增加,GXDS 预处理可有效抑制 cTnI、类胰蛋白酶释放($P<0.05$,图 6C、D)。

3 讨论

在心肌梗死之前进行 GXDS 预处理或在 MI 之后及时给予 GXDS 可以改善猪模型中 I/R 损伤的长期预后,减少心室功能障碍和不良后果,并且不会下调 ALDH2 受体蛋白的表达[11]。GXDS 治疗 12 周后,糖尿病小鼠的心脏 ALDH2 受体和 5′-单磷酸腺苷(AMP)激活的信号通路正常化,心脏炎症和氧化应激以及心肌细胞的凋亡、肥大和纤维化被明显抑制。近期文献则表明:运动和 GXDS 均对去卵巢雌性大鼠 I/R 诱发的心肌损伤具有有效的保护作用,这与改善心室收缩和舒张功能、抑制炎症因子的释放有关,并且减少心肌纤维的紊乱,从而降低大鼠血压[12-13]。但是 GXDS 对于心脏的保护作用是否与肥大细胞脱粒有关及其分子机制尚未可知。

本研究结果显示:GXDS 以及 ALDH2 过表达质粒预处理均可显著减少心律不齐、心脏含水量和梗死面积组,部分恢复 I/R 损伤引起的 SBP、DBP、MAP、RPP、LVEF 和 LVFS 的下降,使得这些伤害效应得到明显改善。大鼠中 CMC 的分布和密度接近人类,可以作为研究 CMC 的理想模型。大鼠中 CMC 主要分布在心内膜(5%)、心外膜(50%)和心肌(45%,其中 31% 位于脉管系统周围)[14]。肥大细胞可以被 C48/80 激活并促进介质的释放,而 C48/80 可以加速 I/R 损伤诱



1:对照组;2:I/R 组;3:GXDS 组;4:MCD 组;5:MCD-IR 组;6:GXDS-MCD 组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 MCD-I/R 或 I/R 组比较

A:qRT-PCR 检测不同组小鼠组织中 ALDH2 和 miR-330-3p 水平;B:Western blot 检测不同组小鼠组织中 ALDH2 水平;C:ELISA 检测 cTnI 的释放;D:ELISA 检测类胰蛋白酶的释放

图 6 GXDS 通过 miR-330-3p/ALDH2 抑制肥大细胞脱粒

导的肥大细胞的募集和脱粒[15]。在本研究中,C48/80处理可以促进肥大细胞脱粒和类胰蛋白酶释放,并加剧血流动力学异常、心律不齐和心脏水肿。TEM结果表明:C48/80加剧LAD冠状动脉中细胞膜的丧失和内皮完整性,并严重破坏左心室心肌的肌原纤维和线粒体。另外,在C48/80处理组中,心肌水肿、肌纤维不良和炎性细胞浸润明显增加。但是,GXDS预处理可减轻C48/80干预和I/R损伤下肥大细胞脱颗粒和类胰蛋白酶的释放,从而改善心脏功能障碍和有害反应,并保留内皮完整性和线粒体功能。类胰蛋白酶是实验室诊断的潜在标志物,也是临床治疗的潜在靶标[16]。肥大细胞对各种炎性环境的影响与类胰蛋白酶的酶学特性密切相关,后者直接介导过敏、免疫失调和组织器官的重塑[17]。最近的研究表明:心肌I/R损伤通过调节ALDH2通路而促进肥大细胞标志物(类胰蛋白酶和糜酶)的分泌以及促炎因子的产生[18-19]。本研究结果显示:I/R损伤可促进肥大细胞脱粒,并表现为类胰蛋白酶和糜酶的释放增加,C48/80处理可加剧肥大细胞脱粒程度,而GXDS预处理则能逆转I/R损伤或C48/80处理诱导的肥大细胞脱粒。miR-330-3p可促进心肌细胞的凋亡,并加速心肌纤维化和肥大。近期研究则指出:miR-330-3p通过激活TLR4/MyD88/NF-κB信号通路来介导心肌细胞凋亡,并促进炎症细胞因子的级联释放[20]。本研究结果表明:I/R损伤后,心肌中miR-330-3p的水平显著增加而ALDH2表达下降,C48/80可促进miR-330-3p表达而下调ALDH2表达,但GXDS预处理可逆转miR-330-3p/ALDH2的表达改变。组织蛋白酶G(中性粒细胞来源的蛋白酶)和糜蛋白酶(肥大细胞来源的蛋白酶)的双重抑制剂可阻断小鼠梗死心脏的免疫反应,减少心肌胶原蛋白的沉积,并改善心室功能通过局部粘着信号传导调节,抑制心肌细胞凋亡、肌原纤维变性和心脏成纤维细胞分化为成纤维细胞[21-22]。体外实验证实:miR-330-3p通过与ALDH2的3′UTR结合而抑制其表达,最终促进心肌细胞凋亡和肥大细胞脱粒,而GXDS处理可以有效抑制miR-330-3p表达,通过上调ALDH2水平而促进心肌细胞存活并抑制肥大细胞脱粒。

总之,I/R损伤会导致大鼠心脏功能障碍、严重的心律失常、明显的水肿、梗死和组织病理学损害,而GXDS预处理可显著减轻这些变化,从而证实GXDS的心脏保护作用。肥大细胞促分泌素C48/80加剧I/R损伤诱导的肥大细胞脱粒和类胰蛋白酶释放,而GXDS的早期干预则显著降低C48/80的负性作用,机制分析显示:GXDS预处理可通过miR-330-3p/ALDH2抑制I/R损伤诱导的心肌肥大细胞脱颗粒,从而下调糜蛋白酶和类胰蛋白酶的表达,抑制心肌细胞的凋亡。

参考文献:

[1] 刘晓瑜, 顾民华, 徐煜凌, 等. 定心方Ⅰ号方通过调控GSK3β/Nrf2/HO-1通路防治大鼠心肌缺血再灌注损伤的机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(11): 1265-1270. DOI:10.19378/j.issn.1003-9783.2020.11.001.
LIU X Y, GU M H, XU Y L, *et al*. Dingxin recipe Ⅰ prevents myocardial ischemia reperfusion injury through GSK3β/Nrf2/HO-1 pathway[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2020, 31(11): 1265-1270. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2020.11.001.

[2] 蒋佳玲, 李俊, 许鸣, 等. 广枣叶总黄酮对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用及其作用机制[J]. 沈阳药科大学学报, 2020, 37(11): 1009-1014. DOI:10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2020.11.008.
JIANG J L, LI J, XU M, *et al*. Myocardial protective function and mechanism of total flavonoids from Jujube leaves after myocardial ischemia-reperfusion injury in rats[J]. J Shenyang Pharm Univ, 2020, 37(11): 1009-1014. DOI:10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2020.11.008.

[3] SONG S H, LIU F, ZHAO Y Y, *et al*. Bruton's tyrosine kinase inhibitor attenuates warm hepatic ischemia/reperfusion injury *via* modulation of the NLR family pyrin domain containing 3 inflammasome[J]. Transplant Proc, 2020, 52(10): 2947-2954. DOI:10.1016/j.transproceed.2019.10.024.

[4] 王励, 谌小龙, 刘慧玲, 等. β-arrestin-2通过上调PI3K/Akt信号抑制自噬以减轻小鼠肝脏缺血-再灌注损伤[J]. 器官移植, 2020, 11(6): 692-697. DOI:10.3969/j.issn.1674-7445.2020.06.007.
WANG L, CHEN X L, LIU H L, *et al*. Β-arrestin-2 inhibits autophagy by up-regulating PI3K/Akt signal to alleviate liver ischemia-reperfusion injury in mice[J]. Organ Transplant, 2020, 11(6): 692-697. DOI:10.3969/j.issn.1674-7445.2020.06.007.

[5] 夏万松, 夏英, 韦四喜, 等. ALDH2基因rs671单核苷酸多态性位点发生(A→G)RNA编辑[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(22): 2693-2696, 2700. DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.22.002.
XIA W S, XIA Y, WEI S X, *et al*. ALDH2 gene rs671 single nucleotide polymorphism site occurs RNA editing (A to G)[J]. Int J Lab Med, 2020, 41(22): 2693-2696, 2700. DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.22.002.

[6] ZHOU L, ISHIZAKI H, SPITZER M, *et al*. ALDH2 mediates 5-nitrofuran activity in multiple species[J]. Chem Biol, 2012, 19(7): 883-892. DOI:10.1016/j.chembiol.2012.05.017.

[7] 宋海英, 王培利, 刘剑刚, 等. 冠心丹参滴丸对缺血心肌AMPK-解偶联蛋白2的调控作用[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(15): 2272-2276.
SONG H Y, WANG P L, LIU J G, *et al*. The modulation of AMPK-uncoupling protein 2 in ischemia myocardium by

Guanxindanshen dropping pills[J]. Chin J Integr Med Cardio-Cerebrovasc Dis, 2019, 17(15): 2272-2276.

[8] 汤世民, 邢小燕, 邓雪红, 等. 冠心丹参方及其有效成分治疗冠心病的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(20): 3721-3726.
TANG S M, XING X Y, DENG X H, *et al*. Research progress of Guanxin Danshen formula and its effective components in treating coronary artery heart disease[J]. China J Chin Mater Med, 2016, 41(20): 3721-3726.

[9] CHENG Y, ZHU H, GAO W. MicroRNA-330-3p represses the proliferation and invasion of laryngeal squamous cell carcinoma through downregulation of Tra2β-mediated Akt signaling[J]. Mol Cell Probes, 2020, 52: 101574. DOI: 10.1016/j.mcp.2020.101574.

[10] 苟小江, 王培利, 王承龙. 冠心丹参滴丸治疗冠心病的系统评价与 Meta 分析[J]. 中药新药与临床药理, 2019,30(10): 1262-1268. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2019.10.018.
GOU X J, WANG P L, WANG C L. Systematic review and meta analysis of Guanxin Danshen dropping pills in the treatment of coronary heart disease[J]. New Drugs Clin Pharmacol Traditional Chin Med, 2019, 30(10): 1262-1268.

[11] SONG K, LI L, QUAN Q, *et al*. Inhibited histone deacetylase 3 ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury in a rat model by elevating microRNA-19a-3p and reducing cyclin-dependent kinase 2[J]. IUBMB Life, 2020, 72(12): 2696-2709. DOI: 10.1002/iub.2402.

[12] MIYAKE H, KOIKE Y, SEO S, *et al*. The effect of pre-and post-remote ischemic conditioning reduces the injury associated with intestinal ischemia/reperfusion[J]. Pediatr Surg Int, 2020, 36(12): 1437-1442. DOI: 10.1007/s00383-020-04762-5.

[13] 何贵新, 肖婷, 秦伟彬, 等. 基于 PI3K/AKT 信号通路探讨芪参益气滴丸改善心肌缺血再灌注损伤的实验研究[J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(9): 762-768. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2020.09.010.
HE G X, XIAO T, QIN W B, *et al*. Experimental study on the effect of Qishen Yiqi Dripping Pill on myocardial ischemia-reperfusion injury *via* PI3K/AKT signaling pathway[J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2020, 43(9): 762-768. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2157.2020.09.010.

[14] WANG H L, LIU F L, LI R Q, *et al*. Electroacupuncture improves learning and memory functions in a rat cerebral ischemia/reperfusion injury model through PI3K/Akt signaling pathway activation[J]. Neural Regen Res, 2021, 16(6): 1011-1016. DOI: 10.4103/1673-5374.300454.

[15] 郭银雪, 葛平玉, 詹继红. 肾茶黄酮预防急性肾缺血模型大鼠再灌注损伤作用及其机制[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(20): 4399-4402.
GUO Y X, GE P Y, ZHAN J H. Preventive effect of renal tea flavonoids on reperfusion injury in rats with acute renal ischemia and its mechanism[J]. Chin J Gerontol, 2020, 40(20): 4399-4402.

[16] 彭兴, 林玲, 周祥群, 等. miR-133b 靶向 YES1 抑制心肌缺血再灌注引起的心肌细胞凋亡和活性氧簇的积累[J]. 南方医科大学学报, 2020, 40(10): 1390-1398. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2020.10.03.
PENG X, LIN L, ZHOU X Q, *et al*. miR-133b inhibits myocardial ischemia-reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis and accumulation of reactive oxygen species in rats by targeting YES1[J]. J South Med Univ, 2020, 40(10): 1390-1398. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2020.10.03.

[17] WEI C H, WU G, CAI Q, *et al*. Retraction Note to: MicroRNA-330-3p promotes cell invasion and metastasis in non-small cell lung cancer through GRIA3 by activating MAPK/ERK signaling pathway[J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 142. DOI: 10.1186/s13045-020-00969-0.

[18] SHAO Z Q, DOU S S, ZHU J G, *et al*. Apelin-13 inhibits apoptosis and excessive autophagy in cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. Neural Regen Res, 2021, 16(6): 1044-1051. DOI: 10.4103/1673-5374.300725.

[19] 王晓丽, 张薇, 张雪侠, 等. 生姜挥发油对脑缺血再灌注大鼠溶酶体-线粒体途径凋亡的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(10): 1153-1157. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2020.10.004.
WANG X L, ZHANG W, ZHANG X X, *et al*. Effect of ginger volatile oil on lysosomal-mitochondrial apoptosis in rats with cerebral ischemia-reperfusion[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2020, 31(10): 1153-1157. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2020.10.004.

[20] 何望安, 王茹, 沈波, 等. CCR5 抗体对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用的机制研究[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2020, 49(4): 419-423,454.
HE W A, WANG R, SHEN B, *et al*. Protective effects of CCR5 antibody on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Acta Med Univ Sci et Technol Huazhong, 2020, 49(4): 419-423,454.

[21] 龚慧琴, 周支香, 刘录山, 等. 淫羊藿次苷Ⅱ通过沉默信息调控子 1-叉头蛋白 O1 通路减轻心肌缺血再灌注损伤[J]. 中华高血压杂志, 2020, 28(8): 744-749. DOI: 10.16439/j.cnki.1673-7245.2020.08.015.
GONG H Q, ZHOU Z X, LIU L S, *et al*. Icariside Ⅱ reduces myocardial ischemia-reperfusion injury through activating silent information regulator 1/acetylated-forkhead box O1 pathway[J]. Chin J Hypertens, 2020, 28(8): 744-749. DOI: 10.16439/j.cnki.1673-7245.2020.08.015.

[22] WEI C H, ZHANG R G, CAI Q, *et al*. MicroRNA-330-3p promotes brain metastasis and epithelial-mesenchymal transition *via* GRIA3 in non-small cell lung cancer[J]. Aging, 2019, 11(17): 6734-6761. DOI: 10.18632/aging.102201.

(**收稿**:2021-01-07;**修回**:2021-03-16)
(编辑 张 维)