

基于蛋白质组学探讨注射用丹参多酚酸盐对心梗超急性期 保护机制研究

王奥奥¹, 李磊¹, 王紫艳¹, 曹策¹, 李瑛¹, 刘子馨¹, 李玲美¹, 史跃¹,
马彦雷¹, 潘映红², 刘建勋^{1*}

(1. 中国中医科学院西苑医院基础研究所, 中药药理北京市重点实验室, 国家中医心血管病临床医学
研究中心, 北京 100091; 2. 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 心梗超急性期是指心梗发生后 30 min 内, 症状不明显、诊断困难的一段时间, 相关病理生理机制研究关注较少。本研究基于蛋白质组学探讨心梗超急性期蛋白质组改变并针对热休克蛋白 B6 (heat shock protein B6, HSPB6) 探讨注射用丹参多酚酸盐的干预作用与相关机制, 为心梗超急性期病理机制及注射用丹参多酚酸盐的临床合理用药提供实验依据。采用基于质谱的非标记蛋白质组学对比评价大鼠心梗模型造模前后蛋白表达变化后, 使用生物信息学方法分析共有表达蛋白及相关通路。接着运用分子对接技术评价注射用丹参多酚酸盐对共有差异蛋白 HSPB6 的结合作用, 最后通过动物实验进行验证。本实验动物福利和实验过程均遵循中国中医科学院西苑医院实验动物伦理委员会的规定。本实验结果表明, 非标记蛋白质组学结果共定量获得 2 166 个蛋白质, 其中有 194 个共有差异蛋白参与心梗超急性期心肌损伤和机体调节, 主要涉及蛋白质同源二聚活性、氧气结合与运输、丝氨酸型内肽酶抑制剂活性等分子功能。其中, HSPB6 蛋白参与心肌功能的调节作用。分子对接结果表明, 注射用丹参多酚酸盐主成分丹参乙酸钠与 HSPB6 蛋白具有最低的结合能: $-14.53 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。动物实验表明, 与假手术组相比, 模型组大鼠心功能损伤射血分数和短轴缩短率显著降低 ($P < 0.001$), 心脏血流灌注明显下降 ($P < 0.001$), 存在明显心肌纤维紊乱、心肌细胞水肿、间质内小血管充血等病理形态改变; 给药组大鼠心功能损伤减弱, 其中低剂量短轴缩短率明显改善 ($P < 0.05$), 心肌组织病理性损伤明显减轻, HSPB6 蛋白表达不同程度上调 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。基于上述研究结果, 发现注射用丹参多酚酸盐可一定程度改善大鼠心梗超急性期损伤心功能及病理形态, 其作用机制可能与促进 HSPB6 表达有关。

关键词: 心肌梗死; 超急性期; 注射用丹参多酚酸盐; 热休克蛋白 B6; 蛋白质组学; 中药注射剂

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)05-1188-08

Proteomics reveals the protective mechanism of salvianolate injection on early hyperacute myocardial infarction

WANG Ao-ao¹, LI Lei¹, WANG Zi-yan¹, CAO Ce¹, LI Ying¹, LIU Zi-xin¹, LI Ling-mei¹, SHI Yue¹,
MA Yan-lei¹, PAN Ying-hong², LIU Jian-xun^{1*}

(1. Beijing Key Laboratory of Chinese Materia Pharmacology, National Clinical Research Center for Cardiovascular
Diseases of Traditional Chinese Medicine, Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of
Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China; 2. Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural
Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: The hyperacute stage of myocardial infarction refers to a period of time within 30 minutes after the

收稿日期: 2022-10-30; 修回日期: 2023-01-04.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82030124, 82174015); 国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万”人才工程 (岐黄工程) 岐黄学者; 中国中医科学院科技创新工程 (CI2021A04609).

*通讯作者 Tel: 18600169996, E-mail: liujx0324@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1141

occurrence of myocardial infarction, when the symptoms are not obvious and the diagnosis is difficult, and the related pathophysiological mechanism has received less attention. In this study, proteomics was used to investigate the pathological changes in the early hyperacute phase of myocardial infarction, aiming to provide experimental evidence for pathological mechanism of myocardial infarction hyperacute stage. Meanwhile, the intervention effect and related mechanism of salvianolate injection were discussed based on heat shock protein B6 (HSPB6), aiming to benefit the clinical rational use of salvianolate injection. The protein expression changes before and after myocardial infarction model establishment were detected by label-free proteomics *via* mass spectrometry and analyzed by bioinformatics method. Then the binding effect of salvianolate injection on the commonly differential protein HSPB6 was evaluated by molecular docking technology, which was finally verified by animal experiments. All animal experimental protocols were approved by the Ethics Committee of Xiyuan Hospital (2022XLC041). The results of this study showed that a total of 2 166 proteins were quantified by label-free proteomics, of which 194 shared differential proteins were involved in myocardial injury and body regulation in the hyperacute phase of myocardial infarction, mainly involving molecular functions such as protein homodimerization activity, oxygen binding and transport, and serine endopeptidase inhibitor activity. Among them, HSPB6 protein is involved in the regulation of myocardial function. Molecular docking results indicated that magnesium salvianolate acetate, which is the main component of salvianolate injection, had the lowest binding energy with HSPB6 protein: $-14.53 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Animal experiments showed that compared with the Sham group, the model group had significantly lower ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) ($P < 0.001$), cardiac blood perfusion decreased significantly ($P < 0.001$). There were obvious pathological changes such as myocardial fiber disorder, cardiomyocyte edema and interstitial small blood vessel congestion; the injury of cardiac function of rats in the administration group was attenuated, and the FS of rats in the low-dose group was significantly improved ($P < 0.05$), the pathological injury of myocardial tissue was markedly mitigated, and the expression of HSPB6 protein was up-regulated to varying degrees ($P < 0.01$, $P < 0.001$). In conclusion, salvianolate injection could be able to improve the cardiac function and pathological morphology of rats in the early hyperacute stage of myocardial infarction, and its mechanism may be related to the promotion of expression of HSPB6.

Key words: myocardial infarction; early hyperacute injury phase; salvianolate injection; heat shock protein B6; proteomics; traditional Chinese medicine injection

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是全球最常见的死亡原因之一^[1]。心梗超急性期 (可逆时相) 是指心梗发生后 30 min 内的一段时间^[2]。通常认为该时期症状表现不明显, 持续时间较短, 诊断困难, 且出现的心肌损伤具有可逆性, 因此相关病理生理机制研究关注较少。但是心梗超急性期极易出现心室颤动, 增加心肌梗死患者猝死风险, 造成严重不良后果^[3]。本课题组前期动物实验发现, 动物心肌梗死 30 min 内同样具有易发生心室颤动, 抢救无效导致模型动物死亡的高危风险, 这与临床情况高度吻合^[4-6]。目前, 对于心肌梗死超急性期的相关研究较少, 相关病理机制与药物作用机制尚不明确。临床上心肌梗死治疗常见的药物主要包括: 钙离子拮抗剂、 β 受体拮抗剂、血管紧张素转换酶抑制剂 (angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)、抗凝剂、抗血小板药和降脂药等^[7], 其多应用于梗死发生后或介入手术后维持心脏和血管功能、改善血液状态、调节血压。然而, 针对预防心梗与心梗超急性期内的药物作用研究报道较少, 相关研究亟待开展。

丹参是治疗心肌梗死的常用中药, 在药效物质基础和药物作用机制方面已有较为深入的研究^[8]。一些丹参制剂如复方丹参滴丸、丹参酮 II A 磺酸钠注射液和丹参多酚酸盐注射液等, 已经广泛应用于临床缺血性心脏病的治疗中。注射用丹参多酚酸盐 (salvianolate injection, SI) 是上市制剂, 现有研究表明其对于心肌梗死的主要作用机制包括: 清除缺血部位的自由基、保护血管内皮损伤、改善微循环、抗血小板聚集及黏附、扩张冠状动脉、增加冠脉流量、减轻心肌缺血损伤、改善心脏功能等^[9,10]。本课题组基于注射用丹参多酚酸盐的药理作用, 推测其可能对心梗超急性期损伤亦有保护作用。因此, 本实验基于蛋白质组学技术探讨了心梗超急性期损伤的病理改变及注射用丹参多酚酸盐的保护作用及其潜在的分子机制。

材料与方法

实验动物 健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量 (280 ± 20) g, 由北京维通利华生物技术有限公司 [SCXK (京) 2021-0006] 提供。动物实验操作及饲养

均在中国中医科学院西苑医院实验动物中心进行[SYXK(京)2018-0018]。实验动物及实验步骤符合国家实验动物管理条例。该研究经中国中医科学院西苑医院动物管理委员会批准实验(2022XLC041),实验动物处置均符合国家科委2011年修订的《实验动物管理条例》。

主要试剂与仪器 地尔硫卓注射剂购于日本三菱公司(F030);注射用丹参多酚酸盐购于上海绿谷公司(国药准字:Z20050247);肌酸激酶同工酶(creatin kinase-MB, CK-MB)测定试剂盒(ml059533V)及乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)测定试剂盒(ml003416V)购于上海酶联生物科技有限公司;RIPA裂解液、磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、碘乙酰胺(iodoacetamide, IAA)、尿素、 NH_4HCO_3 购自上海碧云天生物技术有限公司。肝素钠注射液购于常州千红生化制药股份有限公司;封闭专用脱脂奶粉购于美国BD公司,胰蛋白酶购于Promega公司,BCA蛋白测定试剂盒和热休克蛋白B6(heat shock protein B6, HSPB6)抗体购于Thermo公司, β -actin抗体、山羊抗兔二抗购于Origene公司。

Easy nLC 1000nL液相色谱仪、Q-Exactive plus型高分辨质谱仪、IEC-CL31R型离心机(美国Thermo公司);冷冻研磨机(上海净信实业发展有限公司);DW-3000S型双通道小动物呼吸机(安徽正华生物仪器设备有限公司);Visual Sonics Vevo2100系高分辨率小动物超声影像系统、MS-201高频线阵探头(日本Fujifilm公司);电泳及电转系统、凝胶成像仪及图像分析系统(美国Bio-Rad公司);Synergy4型全功能酶标仪(美国Bio Tek公司);本实验其他药物及器材均为实验室常规器材。

动物模型制备 20只SD雄性大鼠,随机分为假手术组和模型组,每组10只动物。采用左冠状动脉前降支结扎的方法,对大鼠行气管插管,连接小动物呼吸机,在左侧第三、四肋间切开皮肤,钝性分离肌层,打开胸腔,充分暴露心脏,用6-0线结扎冠状动脉左前降支,然后缝合胸腔。结扎部位以下心肌变灰白,心电图肢体导联出现ST段弓背向上明显抬高即为造模成功。假手术组手术过程相同,仅绕过左冠状动脉,打松结。手术后20 min取材,打开腹腔,肝脏开口,自腹主动脉逆行灌注生理盐水至心脏无残血。取结扎位置下2 mm左心室组织至液氮速冻后转移至 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冻存,用于蛋白质组学实验。

药效学及机制探究部分实验采用60只SD雄性大鼠,随机分为假手术组(Sham)、模型组(Model)、地尔硫卓组(Diltiazem)和注射用丹参多酚酸盐(SI)高剂

量、低剂量组,每组12只动物。用3.5%戊巴比妥钠腹腔注射($35\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)麻醉后,仰卧位固定,按分组尾静脉注射给药地尔硫卓组($1.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和注射用丹参多酚酸盐高剂量组($42\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、低剂量组($21\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),给药后15 min进行手术。结扎20 min后,取血,静置后分离血清($4\text{ }^\circ\text{C}$, $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min),取缺血区左心室组织至液氮,后转移至 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冻存。

非标记蛋白质组学组织样品制备与质谱条件

心肌组织样品制备 每组3只动物的冻存组织冰上称取50 mg,加入1 mL蛋白提取混合溶液[RIPA裂解缓冲液、 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMSF、酶抑制剂(1:50)]后用冷冻匀浆机匀浆。然后将匀浆高速离心($4\text{ }^\circ\text{C}$, $15\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 20 min),取上清,采用Bradford法定量蛋白浓度。取含有500 μg 蛋白的样品溶液加入10 kDa超滤管中,加入400 μL $8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素,高速离心($4\text{ }^\circ\text{C}$, $15\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 20 min)后弃去外管废液,重复3次。加入10 mL $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 还原30 min。加入400 μL $8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素,高速离心($4\text{ }^\circ\text{C}$, $15\ 000\text{ } \times\text{g}$, 20 min)后弃去外管废液,重复3次。加入10 μL $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碘乙酰胺,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 避光还原30 min。然后用 $8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素洗涤3次,50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵洗涤3次。将胰蛋白酶添加到最终底物中,蛋白与酶的质量比为50:1(w/w)。在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育12 h。最后,加入10 μL 0.1%甲酸终止反应,获得肽段溶液用于进一步的质谱分析。

质谱条件 使用Q-Exactive plus质谱仪进行分析。二元溶剂体系由99.9%水和0.1%甲酸(溶剂A)、99%乙腈和0.1%甲酸(溶剂B)组成,流动相梯度为:0~25 min, 5%~9% B; 25~65 min, 9%~23% B; 65~75 min, 23%~32% B; 75~76 min, 32%~95% B; 76~90 min, 95%~95% B。流量: $420\text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。洗脱肽采用DDA法和PRM法进行分析。为了校正仪器误差,每个实验样品进行3次重复分析。初级质谱检测为70 000分辨率,并从质量分析仪中使用全离子扫描模式收集, m/z 范围为400~1 600。自动增益控制设置为3E6;注射时间设置为50 ms。二次质谱的分辨率设置为17 500;自动增益控制值设置为1E5;注射时间设置为45 ms。碰撞能量设置为27 NCE。

蛋白质鉴定与定量分析 获取原始数据后,利用Proteome Discoverer软件检索蛋白质类型,蛋白质信息检索UniProt数据库(<http://www.uniprot.org/>)中大鼠蛋白质序列(参数设置为:肽置信度高,最大遗漏蛋白位点数为2个,肽检测长度为6~144个氨基酸,母离子质量偏差 ± 10 ,片段离子质量偏差0.02 Da,固定修饰:半胱氨酸(Cys),变量修饰:蛋氨酸(Met)氧化。允许的最大假阳性率为1%。利用Maxquant软件对蛋白

进行定量,从UniProt数据库中获取蛋白序列。参数设置为最多2个缺失蛋白位点;固定修饰:半胱氨酸和碘对乙酰酰胺化;变量修饰:甲硫氨酸氧化和N-乙酰化;碎片离子质量偏差0.02 D;肽最小检出值:7个氨基酸。允许的最大假阳性率为1%。

生物信息学分析 对定量获得的蛋白质数据进行初始分析,将差异倍数(fold change, FC) > 1.2 或 < 0.83,且P值 < 0.05的蛋白质纳入分析范围。利用基因本体数据库(<http://geneontology.org/>)和UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)对蛋白质分类、功能、细胞定位和生物途径进行分析。利用DAVID(<https://david.ncifcrf.gov>)数据库、KEGG(www.genome.jp/kegg/)数据库和STRING(<http://www.string-db.org/>)数据库丰富蛋白质的生物学功能及互作网络,采用R语言ggplot工具、GraphPad Prism 6.0.1及BioLadder网站(<https://www.bioladder.cn/web/#/pro/index>)绘制分析结果。

分子对接 利用对接程序AutoDock 4.2进行分子对接研究。化合物结构下载自PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>),HSPB6的X射线晶体结构来自RCSB蛋白数据库(<http://www.rcsb.org>)与UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)。将小分子配体化合物去水、加氢,计算Gasteiger电荷,设定配体柔性键为可旋转。受体蛋白设置为刚性对接,选择Genetic Algorithm。通过运行autogrid4和autodock4得到对接结果,获得结合能。利用PyMOL 4.5软件对分子对接分析结果进行可视化,得到三维图像。

超声心动图检测心功能 于手术完成后15 min,采用Vevo2100系高分辨率小动物超声影像系统,选用MS-201探头行超声心动图检查。受检大鼠于左侧胸骨旁获取左室乳头肌水平短轴切面,测量左心室舒张末期前壁厚度与后壁厚度、舒张末期和收缩末期左室内径,计算射血分数(ejection fraction, EF)、短轴缩窄率(fractional shortening, FS)、心输出量(cardiac output, CO)、每搏输出量(stroke volume, SV)。所有超声测值均取3个连续心动周期的平均值。

声学造影 超声图像采集结束后,在大鼠右侧后腿处剪开小口,分离股静脉。按照每只0.4 mL的给药体积,在5 s内匀速注射11.8 g·L⁻¹六氟化硫微泡注射液。将感兴趣区置于左心室前壁灌注异常区,从注射造影剂前5 s开始记录造影剂在心肌灌注的视频(共16 s),统计左室造影剂灌注达峰时间。

血清CK-MB和LDH活性检测 大鼠完成超声心动图与声学造影检测后,于结扎术后20 min行腹主动脉穿刺取血,室温静置1 h后,4 °C、3 000 r·min⁻¹离心

10 min,分离血清-80 °C冻存。测试时取血清解冻后冰上操作,严格按照试剂盒说明书进行。采用酶标仪读取A值,绘制标准曲线,计算血清中CK-MB和LDH含量。

病理苏木精-伊红(HE)染色 取材时,并取大鼠心脏组织,用生理盐水洗去残血后,放于4%多聚甲醛中固定24 h,石蜡包埋,连续切片(5 μm),HE染色,光镜下观察心肌组织改变。

心肌组织HSPB6蛋白表达测定 取大鼠心脏组织经RIPA蛋白裂解液提取后,离心(12 000 r·min⁻¹, 15 min, 4 °C)取上清,Bradford法进行蛋白含量测定,调整蛋白浓度至同一水平,加入等体积上样缓冲液(5×),100 °C加热5 min后,冷却至室温,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),湿转法进行转膜,5%脱脂牛奶封闭,加入HSPB6一抗(稀释倍数1:1 000),于4 °C冰箱孵育过夜,次日加入相应二抗(二抗稀释倍数1:20 000),室温孵育60 min,增强化学发光法显色,ImageJ软件(版本:2.06)分析相应条带灰度值。

统计学方法 实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 18.0软件进行统计分析,采用oneway ANOVA(单因素方差分析)方法,方差齐符合正态分布应用最小显著性差异法(LSD)检验,另外采用Tamhane's T2检验补充分析。P < 0.05为有统计学意义。

结果

1 基于蛋白质组学评价

非标记定量蛋白质组学共定量到2 166个蛋白质。图1A显示假手术组与模型组距离较远,分离度好,表明心梗超急性期蛋白质表达发生显著的改变。将FC > 1.2或 < 0.83,且P值 < 0.05的蛋白质纳入分析范围,其中有194个共有差异蛋白参与心梗超急性期心肌损伤和机体调节,主要涉及蛋白质同源二聚活性、氧气结合与运输、丝氨酸型内肽酶抑制剂活性等分子功能。

在共有差异蛋白中,下调蛋白有124个,上调蛋白有68个(图2)。通过蛋白质注释与相关文献检索,发现HSPB6蛋白参与心肌功能的调节作用。心梗超急性期差异蛋白质组学表明HSPB6参与心梗超急性期心肌损伤和机体调节过程,且参与心肌功能的调节,提示其具有成为药物作用靶点的潜力。

2 分子对接验证注射用丹参多酚酸盐活性成分与靶蛋白HSPB6之间的结合活性

注射用丹参多酚酸盐的主要成分是丹参乙酸镁(magnesium lithospermate B, MLB, 80%~90%)、紫草酸盐(lithospermic acid, LA)和迷迭香酸盐(rosmarinic

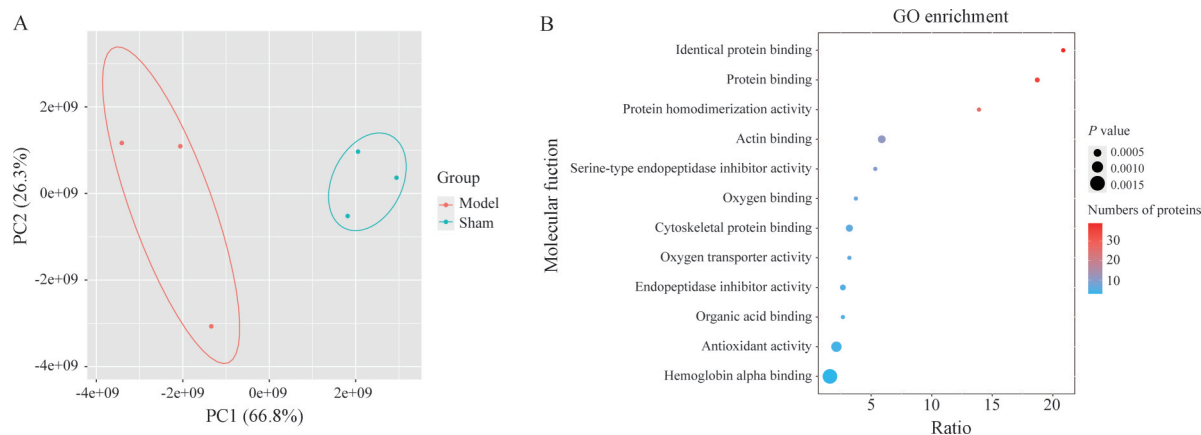


Figure 1 The proteomic analysis of early hyperacute myocardial infarction in rats. A: The principal component analysis (PCA) of all detected proteins of sham group and model group; B: The enriched GO terms for the differentially abundant proteins (DEPs) of sham : model using molecular function

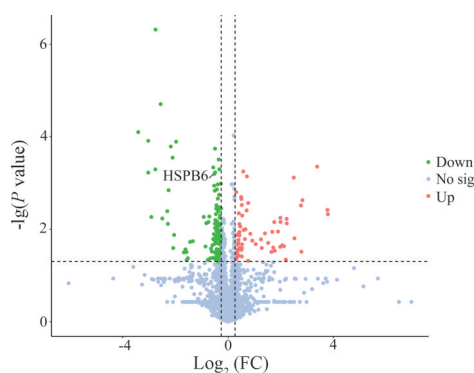


Figure 2 The volcano plot of DEPs of sham : model

acid, RA) (10%~20%)。配体与受体的结合能越低, 两者的结合越稳定, 丹参乙酸镁、紫草酸盐、迷迭香酸盐与 HSPB6 的结合能分别为-14.53、-7.2、-4.92 kcal·mol⁻¹。一般认为, 结合能低于-7 kcal·mol⁻¹可被认为是稳定结合。进一步分析其相互作用可以发现, 丹参乙酸镁可与 HSPB6 的 39 位组氨酸、41 位精氨酸和 43 位谷氨酸结合形成 8 个氢键, 发生稳固的结合 (图 3)。

3 注射用丹参多酚酸盐可改善心梗超急性期大鼠的心脏功能

超声心动图可无创、连续、动态地评价心脏功能。本研究心脏 M 型超声心动图结果显示, 与假手术组比较, 模型组左室前壁收缩异常, 给药组有不同程度的保护作用。相比于假手术组, 模型组大鼠 EF、FS 和 SV 显著降低。与模型组比较, SI 低剂量组 EF、FS 显著升高, 其他给药组有上升趋势 (图 4A、B)。

声学造影 (MCE) 可显示动物左心室心肌局部血流灌注情况。相比假手术组, 模型组造影达峰时间显著延长; 与模型组比较, 各给药组显示出减少达峰时间趋势, 但未见统计学差异 ($P > 0.05$, 图 4C、D)。以上结

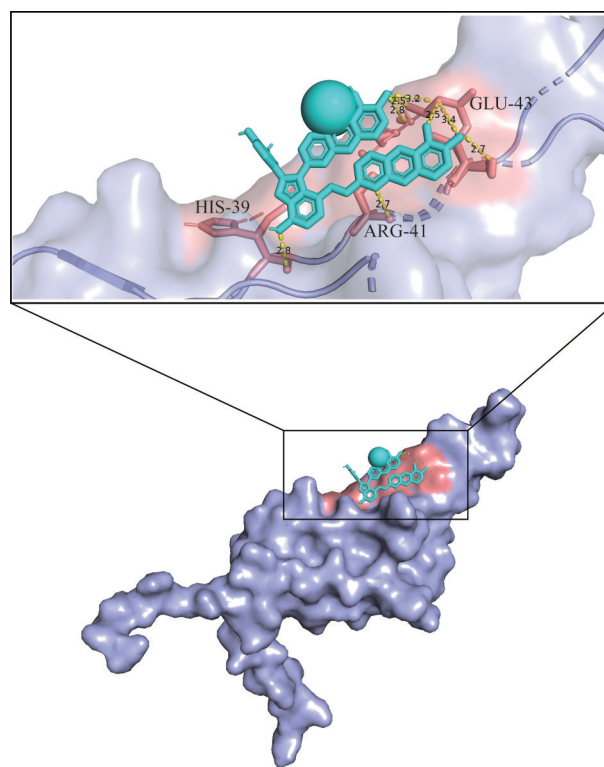


Figure 3 The 3D structure of the promising interactions between heat shock protein B6 (HSPB6) and magnesium lithospermate B (MLB). The key residues that contact the chemical compound are labeled in pink. Chemical compound is shown in cyan

果提示, 注射用丹参多酚酸盐能改善心梗超急性期损伤大鼠的心功能与心肌局部血流灌注。

4 注射用丹参多酚酸盐对心梗超急性期大鼠的血清生化干预作用

CK-MB 和 LDH 是常用的心肌损伤血清标志物。结果表明, 与假手术组比较, 模型组大鼠血清 CK-MB

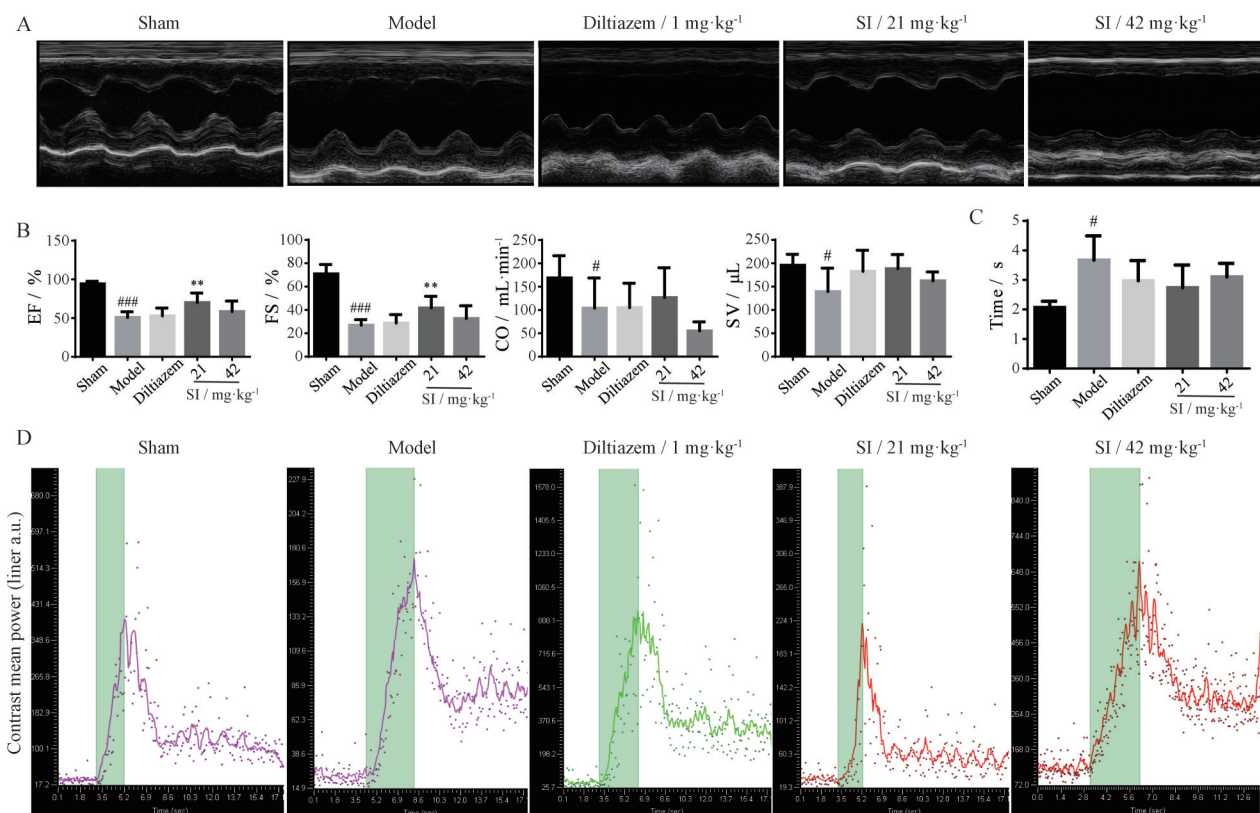


Figure 4 The effect of salvianolate injection (SI) on cardiac function and myocardial contrast echocardiography (MCE) in acute myocardial infarction (AMI) rat in 20 min. A: Representative echocardiograph from the various groups; B: The value of ejection fraction (EF), fractional shortening (FS), cardiac output (CO), and stroke volume (SV); C: T to P value; D: Representative MCE. $n = 6, \bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs sham; ** $P < 0.01$ vs model

和LDH水平显著升高($P < 0.001$),提示造模成功,在心肌梗死超急性期时CK-MB和LDH水平会显著升高。与模型组比较,各给药组大鼠血清CK-MB和LDH水平显著下降($P < 0.001$)(图5)。

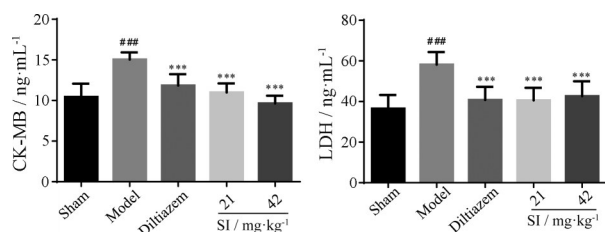


Figure 5 Effect of salvianolate injection on serum creatine kinase-MB (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH) in AMI rat in 20 min. $n = 6, \bar{x} \pm s$. ### $P < 0.001$ vs sham; *** $P < 0.001$ vs model

5 注射用丹参多酚酸盐对梗超急性期大鼠的心肌组织病理形态的影响

如图6所示,假手术组心肌细胞排列规则,紧密、整齐,大小正常,未见变性、出血、水肿和中性粒细胞浸润。模型组出现心肌细胞水肿,空泡变性,排列紊乱,细胞间隙增宽,可见微量炎性细胞浸润。地尔硫卓

组与模型组比较,心肌细胞排列较均匀,水肿减轻,空泡变性减少。注射用丹参多酚酸盐各剂量组病变的范围和程度与地尔硫卓组相似,比模型组明显减小。

6 注射用丹参多酚酸盐对HSPB6表达水平的影响

如图7所示,与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织HSPB6蛋白表达显著升高($P < 0.001$),与模型组比较,地尔硫卓可以显著升高大鼠心肌组织HSPB6蛋白表达($P < 0.01$);注射用丹参多酚酸盐各剂量组大鼠左心室心肌组织HSPB6蛋白表达较模型组有不同程度的升高,其中低剂量组与模型组比较有统计学差异($P < 0.001$)。

讨论

心肌梗死超急性期是心肌梗死病理过程中重要的代偿阶段,了解该时期病理变化及机体自身调节有助于临床早期诊断、改善预后和预防不良结果发生。目前学者普遍认为,在心梗超急性期过程中机体自身调节的心内代偿表现为心率加快、心肌收缩性增强和心脏紧张源性扩张等^[2],而对于该应激性调节的深入机制及相关药物干预目前还尚待研究。随着质谱技术的

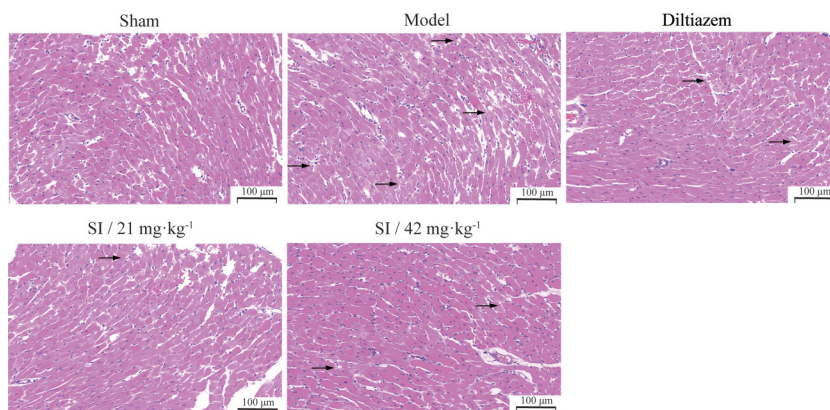


Figure 6 The effect of salvianolate injection on myocardial histology in AMI rat in 20 min ($\times 200$)

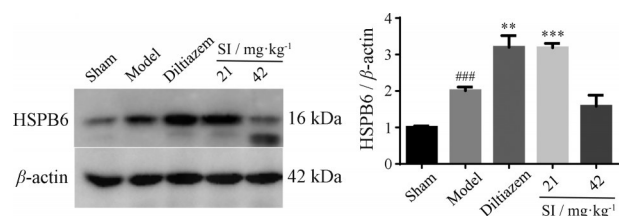


Figure 7 The effect of salvianolate injection on expression of HSPB6 in the left ventricle. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ^{###} $P < 0.001$ vs sham; ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ vs model

发展, 蛋白质组学被广泛用于疾病发生发展机制和探索治疗靶点的相关研究中。本研究基于蛋白质组学对大鼠心肌参与心肌梗死超急性期的蛋白质进行探讨。结果显示, 共有 194 个差异蛋白参与心肌梗超急性期心肌损伤和机体调节, 主要涉及蛋白质同源二聚活性、氧气结合与运输和丝氨酸型内肽酶抑制剂活性等相关通路。

HSPB6 (HSP20) 是热休克蛋白家族成员之一, 广泛分布于平滑肌组织, 包括心脏、血管、骨骼肌、膀胱和子宫等, 另外还能在血液和星形胶质细胞中被检测到^[11]。在人体中, HSPB6 表现分子伴侣活性, 在对各种细胞应激或损伤的反应中被上调, 并保护细胞免受其他致命条件的影响^[12]。前期有文献^[13-15]表明, HSPB6 是心脏保护信号的主要介质。HSPB6 的心脏保护作用通过调节心肌细胞收缩功能、抗凋亡、抗 I/R 损伤和抗心室重构等多种复杂机制协同作用^[16,17]。

注射用丹参多酚酸盐是一种临床应用广泛的注射用丹参制剂, 主要用于心脑血管疾病的治疗, 可明显地改善冠心病、心绞痛患者的临床症状, 减轻心肌缺血, 明显地改善患者心电图表现^[18]。其中, 主成分丹参乙酸钠的含量大于 80%, 次要成分为紫草酸盐和迷迭香酸盐等^[19]。其对于心肌缺血的主要作用包括扩张冠状动脉、增加冠脉搏血流量、改善微循环和减轻心肌缺血损伤等。这与心肌梗超急性期机体病理改变和 HSPB6

的心脏保护作用机制较为吻合。分子对接实验的结果表明, 注射用丹参多酚酸盐主成分丹参乙酸钠与 HSPB6 的结合能为 $-14.53 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 有较好的结合活性, 显示 HSPB6 是注射用丹参多酚酸盐的潜在作用靶点。因此, 本研究进一步探讨了注射用丹参多酚酸盐干预 HSPB6 介导的对心肌梗超急性期的保护作用。在体实验表明, 该药可以显著改善心肌梗超急性期损伤大鼠心功能, 改善心脏血流灌注, 降低血清 CK-MB 和 LDH 的水平, 减轻心肌组织病理损伤。在应激性心肌损伤状态下, 可以促进保护性蛋白 HSPB6 进一步高表达, 进而发挥更好的保护心肌梗超急性期损伤的作用。

本研究结合蛋白质组学和分子对接技术探讨了 HSPB6 参与心肌梗超急性期机体病理过程及自我调节作用, 注射用丹参多酚酸盐的保护作用机制可能与促进保护性蛋白 HSPB6 的表达有关。

作者贡献: 王奥奥负责研究设计、实验操作、结果分析及文章撰写; 李磊参与实验设计、论文修改; 王紫艳、曹策、刘子馨和李玲美参与动物实验操作与数据采集; 李瑛负责蛋白质组学部分实验操作与数据采集; 史跃和马彦雷参与实验操作并提供实验技术; 潘映红负责实验设备的提供; 刘建勋负责研究设计、实验监督及论文审阅。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Cubedo J, Padró T, Vilahur G, et al. Glycosylated apolipoprotein J in cardiac ischaemia: molecular processing and circulating levels in patients with acute ischaemic events [J]. *Eur Heart J*, 2022, 43: 153-163.
- [2] Mann DL, Zipes DP, Libby P, et al. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine [M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 1072.
- [3] Aljakna Khan A, Bararpour N, Gorka M, et al. Detecting early myocardial ischemia in rat heart by MALDI imaging mass spectrometry [J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 5135.

- [4] Ren JX, Shi YH, Yang B, et al. Ultrasound cardiogram assessment of cardiac structure and function in rats with acute ischemic myocardial injury [J]. *Chin J Comp Med (中国比较医学杂志)*, 2019, 29: 17-23.
- [5] Li LM, Li L, Fu JH, et al. Effect of Tianlong Tongxin Tablet on acute myocardial ischemia injury in dogs [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2020, 23: 92-98.
- [6] Miao L, Liu JX, Li XZ, et al. Proteomics research on myocardial tissues of Chinese experimental mini-pig model with coronary heart disease [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2009, 25: 880-883.
- [7] The Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health and Diseases in China. Report on cardiovascular health and diseases in China 2019: an updated summary [J]. *Chin Circ J (中国循环杂志)*, 2020, 39: 833-854.
- [8] Liang WY, Chen WJ, Yang GH, et al. Research progress on salvianolic acids of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2016, 41: 806-812.
- [9] Liu YL, Zhou XY, Xuan LJ, et al. Magnesium lithospermate B ameliorates microcirculation perfusion in rats by promoting vascular NO production *via* activating the PI3K/AKT pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40: 1010-1018.
- [10] Chang CZ, Wu SC, Kwan AL, et al. Magnesium lithospermate B alleviates the production of endothelin-1 through an NO-dependent mechanism and reduces experimental vasospasm in rats [J]. *Acta Neurochir*, 2011, 153: 2211-2217.
- [11] Kato K, Goto S, Inaguma Y, et al. Purification and characterization of a 20-kDa protein that is highly homologous to α B crystallin [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 15302-15309.
- [12] Weeks SD, Baranova EV, Heirbaut M, et al. Molecular structure and dynamics of the dimeric human small heat shock protein HSPB6 [J]. *J Struct Biol*, 2013, 185: 342-354.
- [13] Wang X, Zingarelli B, O'Connor M, et al. Overexpression of HSP20 prevents endotoxin-induced myocardial dysfunction and apoptosis *via* inhibition of NF-kappaB activation [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 47: 382-390.
- [14] Boluyt MO, Brevick JL, Rogers DS, et al. Changes in the rat heart proteome induced by exercise training: increased abundance of heat shock protein 20 [J]. *Proteomics*, 2006, 6: 3154-3169.
- [15] Fan G, Zhou X, Wang X, et al. Heat shock protein 20 interacting with phosphorylated Akt reduces doxorubicin-triggered oxidative stress and cardiotoxicity [J]. *Circ Res*, 2009, 103: 1270-1279.
- [16] Li F, Xiao H, Zhou F, et al. Study of HSPB6: insights into the properties of the multifunctional protective agent [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44: 314-332.
- [17] Qian J, Vafiadaki E, Florea SM, et al. Small heat shock protein 20 interacts with protein phosphatase-1 and enhances sarcoplasmic reticulum calcium cycling [J]. *Circ Res*, 2011, 108: 1429-1438.
- [18] Jia JY, Lu YL, Li XC, et al. Pharmacokinetics of depside salts from *Salvia miltiorrhiza* in healthy Chinese volunteers: a randomized, open-label, single-dose study [J]. *Curr Ther Res*, 2010, 71: 260-271.
- [19] Han S, Zhao XZ, Shi LW, et al. Comprehensive pharmacological evaluation of *Salvia Miltiorrhiza* depside salts for injection [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2021, 56: 422-428.