

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research丹参酮 II A 调控 PI3K/AKT/mTOR 通路对
放射性心脏损伤作用及机制研究Research of effects on radiation - induced cardiac injury of Tanshinone II A
modulating the PI3K/AKT/mTOR pathway舒艳彪^{1,2}, 王 刚³, 李燕玲^{1,2},
王博雯^{1,2}, 谢 萍^{1,2}(1. 甘肃中医药大学 第一临床医学院, 甘肃
兰州 730000; 2. 甘肃省人民医院 心内一科, 甘
肃 兰州 730000; 3. 兰州大学 第一临床医学院,
甘肃 兰州 730000)SHU Yan - biao^{1,2}, WANG Gang³,
LI Yan - ling^{1,2}, WANG Bo - wen^{1,2},
XIE Ping^{1,2}(1. The First Clinical Medical School,
Gansu University of Chinese Medicine,
Lanzhou 730000, Gansu Province,
China; 2. Department of Cardiology I,
Gansu Provincial Hospital, Lanzhou
730000, Gansu Province, China; 3. The
First Clinical Medical School, Lanzhou
University, Lanzhou 730000, Gansu
Province, China)**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目
(82460051); 甘肃省联合科研基金
重大项目基金资助项目
(24JRRA886); 2025 年度甘肃省研
究生“创新之星”项目基金资助项目
(2025CXZX - 949)**作者简介:** 舒艳彪(1998 -), 男, 主治医师, 主要
从事肿瘤心脏病学和心血管疾病流
行病学方面的研究**通信作者:** 谢萍, 教授, 博士生导师

MP: 13919761522

E - mail: pingxie66@163. com

摘要:目的 探讨丹参酮 II A(Tanshinone II A)通过调控磷酸肌醇 3 - 激酶/蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白(PI3K/AKT/mTOR)信号通路对放射性心损伤(RIHD)的防治作用,并基于动物及细胞实验揭示其保守机制,为临床开发靶向防治策略提供理论依据。**方法** 动物实验部分将 SPF 大鼠和小鼠分别分为空白对照组、模型组和实验组。通过单次 X 射线照射(大鼠 25 Gy,小鼠 20 Gy)建立放射性心损伤模型。空白对照组正常喂养,模型组造模后正常喂养,实验组造模后给予连续每天腹腔注射丹参酮 II A 磺酸钠注射液(1 mg/10 g)1 周。细胞实验部分将 H9C2 心肌细胞分为正常细胞组、诱导损伤组和药物处理组,通过辐射构建 RIHD 细胞模型。正常细胞组正常培养,诱导损伤组造模后正常培养,药物处理组造模后立即给予 $1 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 丹参酮 II A 磺酸钠。动态监测体质量变化及心肌组织病理学特征;用转录组测序对大鼠和小鼠心尖组织进行联合分析,筛选共同差异表达基因及富集通路。用细胞计数试剂盒 - 8(CCK - 8)检测细胞活力,用乳酸脱氢酶(LDH)释放实验法评估细胞膜损伤,用实时定量聚合酶链式反应(RT - qPCR)法和蛋白质印记法(WB)检测 PI3K/AKT/mTOR 通路关键基因血管生成素 2(ANGPT2)、细胞周期蛋白 D1(CCND1)及磷酸化磷酸肌醇 3 - 激酶(P - PI3K)和磷酸化 AKT 丝氨酸(P - AKT)的表达水平。**结果** 动物实验显示,干预后,空白对照组、模型组和实验组大鼠的体质量分别为 (434.37 ± 8.52) 、 (341.61 ± 8.73) 和 (410.13 ± 10.05) g;小鼠的体质量分别为 (30.97 ± 0.89) 、 (26.24 ± 0.86) 和 (30.96 ± 0.87) g;AST 分别为 (159.92 ± 3.83) 、 (171.04 ± 2.63) 和 (149.63 ± 10.55) U · L⁻¹;CK - MB 分别为 (219.00 ± 5.83) 、 (455.42 ± 32.76) 和 (248.36 ± 15.25) U · L⁻¹;LDH 分别为 (677.20 ± 21.22) 、 (864.63 ± 6.39) 和 (635.77 ± 22.72) U · L⁻¹;BNP 分别为 (29.37 ± 6.04) 、 (241.69 ± 12.75) 和 (134.23 ± 13.57) pg · mL⁻¹;GSH 分别为 (160.73 ± 4.65) 、 (330.38 ± 9.41) 和 (116.71 ± 11.29) U · L⁻¹,模型组的上述指标与空白对照组比较;丹参酮 II A 实验组的上述指标与模型组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)。在细胞实验中,转录组联合分析发现,72% 的同源差异基因(大鼠 624 个,小鼠 341 个)在 2 种物种中表达趋势一致,京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析显示 ANGPT2, CCND1, THBS1, COL4A1, FN1, COL4A2 主要富集于 PI3K/AKT/mTOR 通路(均 $P < 0.05$),PCR 验证表明了趋势一致性。体外实验证实,正常细胞组、诱导损伤组和药物干预组的细胞活力百分比分别为 $(118.40 \pm 8.63)\%$ 、 $(73.10 \pm 6.12)\%$ 和 $(91.57 \pm 8.08)\%$,诱导损伤组与正常细胞组比较;药物干预组与诱导损伤组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)。诱导损伤组和药物干预组的 LDH 释放水平分别为正常细胞组的 (1.03 ± 0.02) 和 (0.77 ± 0.01) 倍,药物干预组与诱导损伤组比较,在统计学上差异有统计学意义($P < 0.001$)。正常细胞组、诱导损伤组和药物干预组的 P - PI3K 相对表达水平分别为 0.92 ± 0.07 、 0.76 ± 0.01 和 0.85 ± 0.02 ;P - AKT 相对表达水平分别为 0.79 ± 0.01 、 0.70 ± 0.01 和 0.76 ± 0.01 ,诱导损伤组与正常细胞组比较;药物干预组与诱导损伤组比较,在统计学上差异均有统计

学意义(均 $P < 0.05$)。结论 丹参酮 II A 通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,上调关键磷酸化蛋白(P-PI3K、P-AKT),降低辐射毒性,提升细胞活力,从而防治放射性心脏损伤。

关键词:丹参酮 II A;放射性心损伤;磷酸肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白通路;转录组

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.01.012

中图分类号:R28 文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2026)01-0072-09

Abstract: Objective To investigate the preventive and therapeutic effects of Tanshinone II A on radiation-induced heart disease (RIHD) through the regulation of the phosphoinositide 3-kinase/AKT/mechanistic target of rapamycin (PI3K/AKT/mTOR) signaling pathway, and to elucidate its underlying mechanisms based on animal and cellular experiments, thereby providing a theoretical foundation for developing targeted clinical prevention and treatment strategies. **Methods** In animal experiments, SPF-grade rats and mice were respectively divided into blank control group, model group and experimental group. A single dose of X-ray irradiation (25 Gy for rats, 20 Gy for mice) was administered to establish the RIHD model. The blank control group received normal feeding. The model group received normal feeding after modeling. The experimental group received daily intraperitoneal injections of Tanshinone II A sulfonate sodium injection (1 mg/10 g body weight) for one week following modeling. In cell experiments, H9C2 cardiomyocytes were divided into normal cell group, injury-induced group and a drug-treated group. A radiation-induced RIHD cell model was established. The normal cell group was cultured under standard conditions. The injury-induced group was cultured normally after modeling. The drug-treated group was administered Tanshinone II A sulfonate sodium ($1 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ culture medium) immediately after modeling. Body weight changes and myocardial histopathological characteristics were dynamically monitored. Transcriptome sequencing was performed on cardiac apex tissues from both rats and mice for joint analysis, aiming to screen for common differentially expressed genes and enriched pathways. Cell viability was assessed using the cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Cell membrane damage was evaluated by the lactate dehydrogenase (LDH) release assay. The expression levels of key genes in PI3K/AKT/mTOR pathway, including angiopoietin-2 (ANGPT2) and cyclin D1 (CCND1), as well as the protein levels of phosphorylated phosphoinositide 3-kinase (P-PI3K) and phosphorylated AKT serine/threonine kinase (P-AKT) were detected using real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blotting, respectively. **Results** Animal experiments showed that after the intervention, the body weights of rats in the blank control group, model group and experimental group were (434.37 ± 8.52), (341.61 ± 8.73) and (410.13 ± 10.05) g, respectively; the body weights of mice were (30.97 ± 0.89), (26.24 ± 0.86) and (30.96 ± 0.87) g, respectively; AST levels were (159.92 ± 3.83), (171.04 ± 2.63) and (149.63 ± 10.55) $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; CK-MB levels were (219.00 ± 5.83), (455.42 ± 32.76) and (248.36 ± 15.25) $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; LDH levels were (677.20 ± 21.22), (864.63 ± 6.39) and (635.77 ± 22.72) $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; BNP levels were (29.37 ± 6.04), (241.69 ± 12.75) and (134.23 ± 13.57) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; GSH levels were (160.73 ± 4.65), (330.38 ± 9.41) and (116.71 ± 11.29) $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. All the aforementioned indicators in model group showed statistically significant differences compared to blank control group, and all indicators in the experimental group showed statistically significant differences compared to model group (all $P < 0.001$). In the cell experiments, joint transcriptome analysis revealed that 72% of homologous differentially expressed genes (624 in rats, 341 in mice) exhibited consistent expression trends in both species. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis indicated that *ANGPT2*, *CCND1*, *THBS1*, *COL4A1*, *FN1* and *COL4A2* were primarily enriched in the PI3K/AKT/mTOR pathway (all $P < 0.05$), and PCR validation confirmed this consistent trend. *In vitro* experiments confirmed that the cell viabilities in normal cell group, injury-induced group and drug-treated group were (118.40 ± 8.63)%, (73.10 ± 6.12)% and (91.57 ± 8.08)%, respectively. The differences between injury-induced group and normal cell group, as well as between drug-treated group and injury-induced group, were statistically significant (both $P < 0.001$). The LDH release levels in injury-induced group and drug-treated group

were (1.03 ± 0.02) and (0.77 ± 0.01) - fold that of normal cell group, respectively. The difference between the drug - treated group and the injury - induced group was statistically significant ($P < 0.001$). The relative expression levels of P - PI3K in normal cell group, injury - induced group and drug - treated group were 0.92 ± 0 , 0.76 ± 0.01 and 0.85 ± 0.02 , respectively; the relative expression levels of P - AKT were 0.79 ± 0.01 , 0.70 ± 0.01 and 0.76 ± 0.01 , respectively. The differences between the injury - induced group and the normal cell group, as well as between the drug - treated group and the injury - induced group were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** Tanshinone II A mitigates radiation - induced cardiac injury by activating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, upregulating key phosphorylated proteins (p - PI3K and p - AKT), reducing radiation toxicity and enhancing cellular viability.

Key words: Tanshinone II A; radiation - induced heart disease; phosphoinositide 3 - kinase/AKT/mechanistic target of rapamycin signaling pathway; transcriptome

放射性心损伤(radiation - induced heart disease, RIHD)是胸部肿瘤放射治疗产生的一种严重的心脏药物不良反应,据统计,乳腺癌患者 RIHD 的发病率从 0.5% 到 37% 不等;淋巴瘤患者发生 RIHD 可以达到 49.5% ~ 54.6%^[1]。随着放疗技术的进步,患者的生存时间也随之增加,而放疗的慢性作用增加了患者发生心血管疾病的风险以及原有心血管疾病程度,加重了患者的经济负担与生存负担。已成为多学科医师关注的焦点^[2]。磷酸肌醇 3 - 激酶/蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白(phosphoinositide 3 - kinase/AKT/mechanistic target of rapamycin, PI3K/AKT/mTOR)信号通路在调节心肌损伤中起着至关重要的作用,通过促进心肌细胞存活、抑制凋亡、减少氧化应激和炎症反应、促进血管生成和调节心肌重塑及能量代谢,来保护心脏免受损伤或促进损伤后的修复,该通路的功能状态直接影响到心损伤的发展和恢复过程^[3]。丹参酮 II A 是从传统中药材 - 丹参中提取的脂溶性二萜醌类化合物之一。现代药理学研究证明,丹参酮 II A 具有抗炎、抗氧化、抗凋亡的作用,在临床上治疗心血管疾病中的应用较为广泛^[4]。本课题组前期研究证实,丹参酮 II A 通过抗炎、抗氧化应激、抗凋亡以及改善心肌纤维化发挥防治 RIHD 作用^[5-7]。本研究旨在从大鼠、小鼠转录组联合分析出发,探究关键靶点及丹参酮 II A 在其中的防治作用及其机制。

材料与方法

1 材料

动物 SFP 级雄性 SD 大鼠,鼠龄 6 周龄,体质量 80 ~ 220 g;SFP 级雄性 C57BL/6 小鼠,鼠龄 6 周龄,体质量 17 ~ 23 g,均购自中国农业科学院兰州兽医研究所。动物许可证号:SCXK(甘)2020 - 0002。本研究经甘肃省人民医院伦理委员会批准(伦理批号:2024 - 842)。

细胞 H9C2 心肌细胞,购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

药品与试剂 丹参酮 II A 磺酸钠注射液,规格:每支 10 mg/2 mL,批号:2302113,批准文号:国药准字 H31022558,上海上药第一生化药业有限公司生产;苏木精伊红(hematoxylin eosin, HE)染色试剂盒、放射免疫沉淀分析裂解液(radio immune precipitation assay lysis buffer, RIPA)、蛋白酶抑制剂(protease inhibitors)和十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶制备试剂盒(sodium dodecyl sulfate - poly acrylamide gel electrophoresis gel preparation kit, SDS - PAGE),均由北京索莱宝科技公司生产;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)测定试剂盒,深圳雷杜生命科学股份有限公司生产;二喹啉甲酸蛋白定量试剂盒(bicinchoninic acid protein assay kit)和 EasyQuick RT MasterMaxRNA 逆转录试剂盒,均由江苏康为世纪生物科技股份有限公司生产;细胞计数试剂盒 - 8(cell counting kit - 8, CCK - 8),上海碧云天生物技术有限公司生产;杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、青霉素 - 链霉素双抗溶液(penicillin - streptomycin solution)、胰蛋白酶 - EDTA 消化液(trypsin - EDTA solution)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS),均由上海源培生物科技股份有限公司生产;PageRuler 预染蛋白分子量标准品、PARIS™试剂盒,均由赛默飞世尔科技公司生产。

仪器 X - RAD - 225 生物辐照仪,美国 Precision X - Ray Inc 公司产品;N12639 - 03 酶标仪,美国赛默飞世尔科技公司产品;WIX - miniRPO4 电泳仪、WIX - miniRPO4 转膜仪,均为北京威克斯生物医药有限公司产品;QuickChemi5200 化学发光凝胶成像分析系统,苏州莫纳生物科技有限公司产品;CX33 显微拍照系统、CKX53 倒置显微镜,均为日本奥林巴斯有限公司

产品;LightCycler Nano PCR 扩增仪,上海罗氏制药有限公司产品。

2 实验方法

2.1 动物实验

2.1.1 构建动物模型^[5-6]

大鼠 SPF 级 6~8 周龄雄性 SD 大鼠适应性饲养 1 周,鼠板固定后充分暴露大鼠前胸壁,以心脏搏动最明显处直径 2.5~3.0 cm 的区域为照射野;用铅板遮挡除照射野外的其余身体部位,设置生物辐射仪参数为电压 225 kV、电流 13.3 mA、源皮距 30 cm、剂量率 5 Gy·min⁻¹,向心脏给予总剂量为 25 Gy 的 X 射线单次照射。

小鼠 SPF 级 6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠适应性饲养 1 周,鼠板固定后充分暴露小鼠前胸壁,以心脏搏动最明显处直径 1.5~2.0 cm 的区域为照射野;用铅板遮挡除照射野外的其余身体部位,设置生物辐射仪参数为电压 225 kV、电流 13.3 mA、源皮距 30 cm、剂量率 5 Gy·min⁻¹,向心脏给予总剂量为 20 Gy 的 X 射线单次照射。

2.1.2 动物分组与处理方法^[5-6]

随机选取 9 只小鼠作为空白对照组,其余小鼠按照“2.1.1”中方法造模,造模成功后随机分为模型组和实验组,实验组小鼠在造模结束后连续每天腹腔注射丹参酮 II A 磺酸钠注射液(1 mg·10 g⁻¹) 1 周,大鼠分组方法同上,所有实验动物在实验周期中均给予普通饲料。造模 3 月后禁食过夜,取血清样本检测生化指标,同时取心室环切组织进行后续实验。

2.1.3 样本收集方法^[5,8]

采样前,所有实验鼠禁食(不禁水)过夜。随后,使用 1.5% 异氟烷吸入进行深度麻醉。通过夹捏脚趾无反应确认麻醉深度。小鼠达到深度麻醉状态后,固定在仰卧位。用 1 mL 无菌注射器,在胸骨左侧心跳最明显处进针,缓慢抽取血液约 0.5~0.8 mL。将全血轻柔注入抗凝管中。采血后,通过颈椎脱臼法确认动物死亡。迅速打开胸腔,完整取出心脏。立即将心脏置于预冷的生理盐水中,轻轻漂洗以去除残留血液。心室环切分离心室组织,一部分立即投入 4% 多聚甲醛中,在 4℃ 下固定 24~48 h,随后进行石蜡包埋。另一部分分装至无酶冻存管中,放入液氮瓶速冻,随后转移至 -80℃ 冰箱长期保存,用于后续蛋白质或 RNA 提取。采集的抗凝血在 4℃,以 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min。小心吸取上层血浆,分装至 1.5 mL 离心管中,于 -80℃ 冰箱保存,避免反复冻融。

2.1.4 苏木精-伊红染色法(hematoxylin and eosin staining, HE) 观察组织形态结构变化^[9]

脱蜡水化:60℃ 电热鼓风干燥箱烘烤切片 1 h,在二甲苯 I、II 中各浸泡 15 min 脱蜡,依次入 100%、95%、85%、75% 浓度的乙醇溶液浸泡 5 min,蒸馏水冲洗 3 遍。染色:苏木精染色 5 min,自来水冲洗 2 min,1% 盐酸乙醇分化 2 s,自来水洗涤返蓝;0.5% 伊红染色 1 min,自来水冲洗 2 min,去除伊红浮色。脱水透明:将切片依次置于 75%、85%、95% 和 100% 浓度的乙醇中脱水 5 min 后,在二甲苯 I、II 中各浸泡 5 min。封片观察:切片上滴加中性树胶,用盖玻片覆盖封片,用光镜观察拍照分析。

2.1.5 动物转录组测序及联合分析^[10]

于造模后第 3 月,取心尖组织进行转录组测序。将测序结果进行联合分析,明确放射性心损伤中共同的体内差异基因。识别大鼠和小鼠之间的同源基因,并建立相应的映射关系,对大鼠和小鼠的同源基因进行差异表达分析,通过比较大鼠和小鼠在放射模型组中的差异表达基因,进行联合差异表达分析,识别出在 2 种物种中共同上调或下调的基因。

2.2 细胞实验

2.2.1 细胞培养^[5-6]

用含有 89% 高糖 DMEM、10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和 1% 双抗的完全培养基,在条件为 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 H9C2 心肌细胞。每 2 日更换 1 次新鲜培养基。

2.2.2 细胞分组与处理方法^[5]

实验细胞分为 3 组,正常细胞组、诱导损伤组、药物干预组。当细胞生长密度达到 80%~90% 时,随机选取 3 瓶细胞作为正常细胞组。其余细胞用生物辐射仪构建模型,设置生物辐射仪参数为电压 225 kV、电流 13.3 mA、源皮距 48 cm、剂量率 2 Gy·min⁻¹,向细胞给予总剂量为 6 Gy 的 X 射线单次照射。造模结束后随机选取 3 瓶作为药物干预组,单次给与丹参酮 II A 磺酸钠注射液(10 μL·mL⁻¹)。继续培养 48 h。用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞后,进行细胞传代或用于实验。

2.2.3 细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8) 法检测细胞活性^[11]

取生长状态良好的细胞,消化后制备成单细胞悬液,用细胞计数板计数。每组设置 6 个复孔,按照每孔 5 000 个的细胞量,计算所需细胞数,用完全培养基稀释成单细胞悬液。每孔加入 100 μL 稀释后的单细胞悬液,“8”字法晃动 96 孔板铺匀细

胞,孔板周围用 PBS 200 μL 封边来防止液体蒸发,放入培养箱中培养过夜。培养 24 h 后按照分组给予孔板中不同组别的细胞相应处理后,放入培养箱中继续培养 48 h。向每孔中加入 CCK-8 试剂 10 μL ,培养箱中孵育 1~4 h。用酶标仪检测各孔在 450 nm 处的光密度,每组取 6 个复孔的平均值,利用公式计算各组细胞的增殖率。最终表示为细胞活力百分比(%)。

2.2.4 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)试剂盒实验法检测 LDH 含量^[12]

收集各组细胞的培养上清于 1.5 mL EP 管中,室温以下 1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min。按照说明书在 96 孔板添加各试剂后,室温放置 5 min,用酶标仪测定 450 nm 处的光密度,每组取 3 个复孔的平均值。根据公式计算各组细胞培养上清中 LDH 的含量。最终以相对于正常细胞组的倍数变化(fold change)表示。

2.2.5 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction,RT-qPCR)法测定关键基因的相对表达水平^[13]

用 Trizol 法提取总 RNA。提取完成后,取 RNA 样品 2 μL 检测其纯度和浓度。以总 RNA 作为模板,逆转录 cDNA 进行扩增。实验所需引物由上海吉玛制药技术有限公司设计、合成。以 β -actin 为内参进行标准化,基因表达量的计算方法用相对定量法($2^{-\Delta\Delta C_t}$)。扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min,35~40 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min。

表 1 大鼠体质量变化的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of rat body weight changes($\bar{x} \pm s$)

Time(month)	0	1	2	3
Control(g)	232.98 $\pm$ 6.82	279.91 $\pm$ 10.91	365.22 $\pm$ 13.1	434.37 $\pm$ 8.52
Model(g)	241.6 $\pm$ 4.38	248.19 $\pm$ 6.95***	283.05 $\pm$ 9.67***	341.61 $\pm$ 8.73***
Experimental(g)	239.22 $\pm$ 8.78	282.27 $\pm$ 10.36###	350.69 $\pm$ 8.47###	410.13 $\pm$ 10.05###

Control group: Normal feeding; Model group: Normal feeding after irradiation; Experimental group: Administer Tan II A continuously for one week after irradiation; Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, ### $P < 0.001$.

表 2 小鼠体质量变化的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of mouse body weight changes($\bar{x} \pm s$)

Time(month)	0	1	2	3
Control(g)	20.37 $\pm$ 0.78	25.2 $\pm$ 1.27	28.24 $\pm$ 0.81	30.97 $\pm$ 0.89
Model(g)	21.39 $\pm$ 0.77	22.65 $\pm$ 0.97***	24.97 $\pm$ 0.85***	26.24 $\pm$ 0.86***
Experimental(g)	21.25 $\pm$ 0.75	24.77 $\pm$ 1.06###	27.44 $\pm$ 1.24###	30.96 $\pm$ 0.87###

Control group: Normal feeding; Model group: Normal feeding after irradiation; Experimental group: Administer Tan II A continuously for one week after irradiation; Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, ### $P < 0.001$.

2.2.6 蛋白质印迹法检测关键蛋白表达^[5]

提取细胞总蛋白并计算蛋白浓度,上样,蛋白经电泳分离后转移到 PVDF 膜,脱脂奶粉液封闭 1.5 h 后加入一抗(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,随后二抗(1:3 000)孵育 1 h;配置适量超敏发光液,在化学发光仪中曝光采集图像。用 Image J 软件分析条带灰度值,以 GAPDH 为内参,对数据进行归一化处理。

3 统计学处理

用 SPSS 23.0 及 R 4.3.3 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用独立样本 t 检验。转录组数据分析中,通过 biomaRt 包将大鼠基因 ID 转换为小鼠直系同源基因,用 DESeq2 包筛选差异表达基因[筛选标准: $\log_2(\text{FC}) > 1$ 且 $\text{FDR} < 0.05$],并通过 clusterProfiler 包进行 KEGG 通路富集分析。数据可视化用 ggplot2 包。

结 果

1 X 射线和丹参酮 II A 对实验鼠体质量的影响

造模后次日起,模型组大鼠及小鼠出现精神萎靡、活动减少、摄食和饮水量下降等表现;模型组中有 1 只小鼠在实验观察期内自发死亡,空白组大鼠及小鼠生长正常,活动自如,无自发伤亡情况。造模后约第 3~4 周,各模型组鼠胸部毛发脱落,照射野中局部皮肤出现发炎、渗液、破溃病变。动态跟踪组长达 3 个月的体质量变化情况,发现模型组体质量增幅显著低于空白组($P < 0.001$),实验组体质量增幅显著高于模型组($P < 0.001$),见表 1 和表 2。

2 X 线导致心肌组织损伤,丹参酮 II A 能够改善损伤

于造模后第 3 月,取小鼠血清检测心肌损伤标志物,发现与空白对照组相比,模型组 CK - MB、LDH、BNP、GSH 水平均显著升高,实验组上述指标均显著下降(均 $P < 0.001$),见表 3。取小鼠心肌组织行 HE 染色,观察电离辐射对心肌组织形态的影响。HE 染色显示,心肌细胞核被苏木精染液染为紫蓝色,细胞质被伊红染液染成红色;空白对照组的心肌纤维呈现长条状或横纹状有序排列,细胞大小相似,轮廓清晰可见,细胞质均匀着色,无细胞核增大、萎缩,无染色质凝聚、颗粒状等改变;模型组出现不同程度的心肌纤维排列紊乱、细胞肿胀、胞浆疏松等病理特征,少数心肌细胞发生坏死、降解、空泡化,并伴随心肌间质炎细胞浸润;给与丹参酮 II A 组细胞坏死,肿胀情况有一定缓解,见图 1。

3 转录组联合分析发现

对大鼠、小鼠进行同源基因匹配后发现,72% 的大鼠基因成功映射到小鼠直系同源物,随后对同源差异基因进行分析,大鼠组显示,与对照组相比,模型组中有 624 个(上调 340 个,下调 284 个)同源差异表达 mRNA;小鼠组显示,与对照组相比,模型组中有 341 个(上调 233 个,下调 108 个)差异表达 mRNA。通过基因组百科全书(Kyoto encyclo-

pedia genes and genomes, KEGG) 通路分析,结果显示交集的差异基因主要富集在 PI3K/AKT/mTOR 等信号通路。

4 丹参酮 II A 改善 X 线辐射导致的细胞毒性

用 CCK - 8 实验和 LDH 释放水平评估 X 射线对 H9C2 心肌细胞的辐射毒性,以及给与丹参酮 II A 后的效应。CCK - 8 实验显示,模型组的细胞活力较空白组显著下降($P < 0.001$),给与丹参酮 II A 后较模型组可以恢复照射后 H9C2 心肌细胞的活力($P < 0.001$)。从 LDH 释放水平来看,模型组细胞培养上清中的 LDH 与空白组比较,在统计学上差异无统计学意义($P > 0.05$),给与丹参酮 II A 后 LDH 释放量较模型组显著下降($P < 0.001$)。

表 4 细胞辐射毒性检测的比较

Table 4 Comparison of cell radiation toxicity testing

Group	CCK - 8 (%)	LDH (fold change)
Normal control	118.40 ± 8.63	1.00
Injury model	73.19 ± 6.12 ***	1.03 ± 0.02
Drug administration	91.57 ± 8.08 ###	0.77 ± 0.01 ###

CCK - 8: Cell counting kit - 8; Normal control group: Cultured under normal conditions; Injury model group: X - ray damage; Drug administration: Administer Tan II A treatment immediately after X - ray damage; Compared with normal control group, *** $P < 0.001$; Compared with injury model group, ### $P < 0.001$.

表 3 3 组小鼠血清指标水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of serum indicators in mice among three groups($\bar{x} \pm s$)

Group	AST	CK - MB	LDH	BNP	GSH
Control	159.92 ± 3.83	219.00 ± 5.83	677.20 ± 21.22	29.37 ± 6.04	160.73 ± 4.65
Model	171.04 ± 2.63	455.42 ± 32.76 ***	864.63 ± 6.39 ***	241.69 ± 12.75 ***	330.38 ± 9.41 ***
Experimental	149.63 ± 10.55	248.36 ± 15.25 ###	635.77 ± 22.72 ###	134.23 ± 13.57 ###	116.71 ± 11.29 ###

AST: Aspartate aminotransferase; CK - MB: Creatine kinase - MB; LDH: Lactate dehydrogenase; BNP: B - type natriuretic peptide; GSH: Glutathione; Compared with control group, *** $P < 0.001$, Compared with radiation group, ### $P < 0.001$.

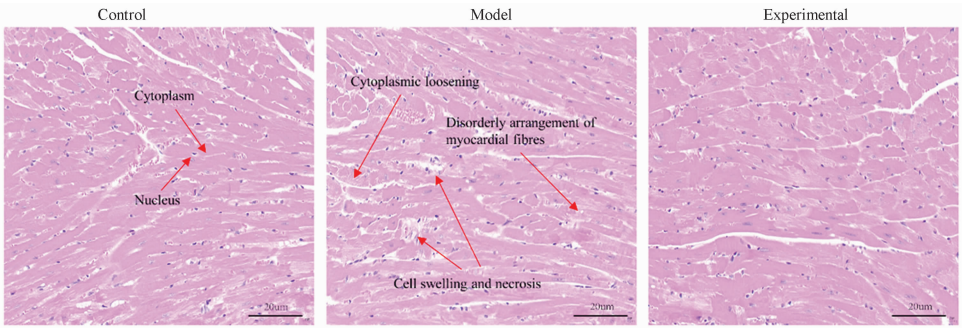


图 1 苏木精 - 伊红 (HE) 法进行心脏病理切片染色分析(400 ×)

Figure 1 Heart pathological section staining analysis detected by hematoxylin eosin (HE) (400 ×)

5 X 线辐射导致 *ANGPT2*, *CCND1* 等基因表达上调

通过 KEGG 富集分析发现,差异基因显著富集在 PI3K/AKT/mTOR 通路,针对富集在该通路上的 9 个关键基因 (*ANGPT2*, *CSF1*, *CCND1*, *THBS1*, *COL4A1*, *FN1*, *NRTN*, *COL4A2*, *CREB5*) 设计引物,其中 *ANGPT2*, *CCND1*, *THBS1*, *COL4A1*, *FN1* 和 *COL4A2* 6 个基因的引物稳定可用,对这部分基因进行 PCR 验证以及趋势一致性检验,结果表明,候选基因的表达水平与生物信息学分析结果一致,相关系数 R 为 0.72 ($P < 0.001$),见图 2。

6 丹参酮 II A 调控 PI3K/AKT/mTOR 通路相关蛋白保护 RIHD

对 PI3K/AKT/mTOR 通路的关键蛋白 PI3K、P-PI3K、AKT、P-AKT、mTOR、磷酸肌醇依赖性激酶 1 (phosphoinositide - dependent kinase - 1, PDK1) 进行验证,蛋白质印迹法表明,与正常细胞组相比,诱导损伤组中关键磷酸化蛋白(P-PI3K、P-AKT)及 PDK1 总蛋白的相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.05$)。与诱导损伤组相比,给与丹参酮 II A 后 P-PI3K、P-AKT 相对表达水平均升高(均 $P < 0.05$),见图 3 和表 5。

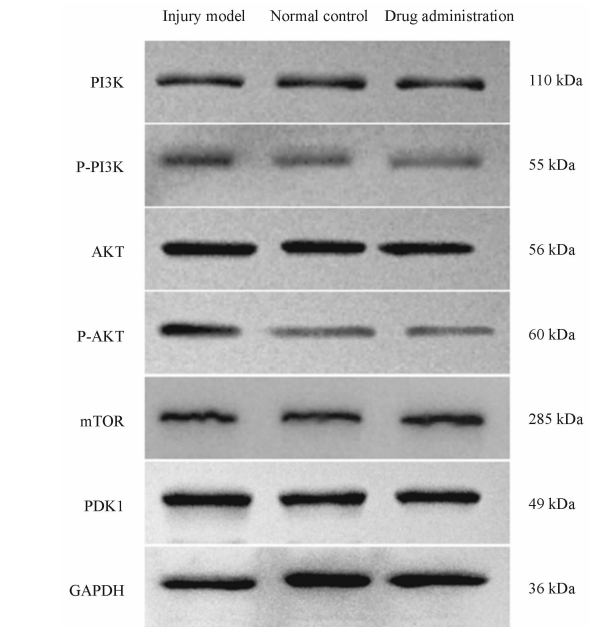


图3 蛋白质印迹法检测磷酸肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白(PI3K/AKT/mTOR)通路相关蛋白相对表达水平

Figure 3 Relative expression levels of phosphoinositide 3-kinase/AKT/mechanistic target of rapamycin(PI3K/AKT/mTOR) related protein detected by Western blot

P-:Phosphorylated-.

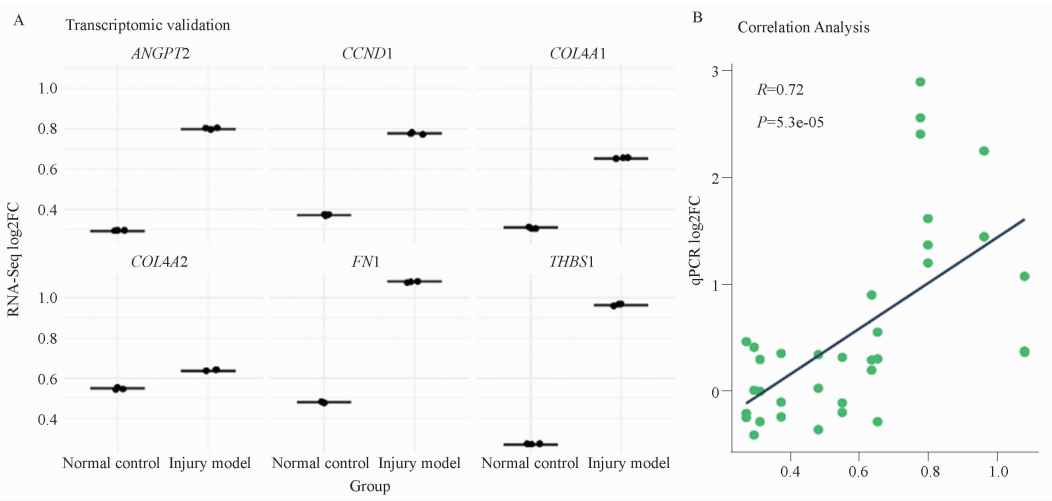


图2 测序结果验证

Figure 2 Validation of sequencing results

A:PCR verification of key gene expression; B:Trend consistency analysis.

表5 PI3K/AKT/mTOR 通路相关蛋白表达检测

Table 5 Detection of PI3K/AKT/mTOR pathway - related protein expression

Group	PI3K	P - PI3K	AKT	P - AKT	mTOR	PDK1
Normal control	0.93 ± 0.01	0.92 ± 0.00	0.81 ± 0.02	0.79 ± 0.01	1.07 ± 0.01	0.80 ± 0.01
Injury model	0.93 ± 0.01	0.76 ± 0.01 *	0.77 ± 0.02	0.70 ± 0.01 *	1.11 ± 0.02	0.66 ± 0.01 *
Drug administration	0.91 ± 0.01	0.85 ± 0.02 #	0.79 ± 0.01	0.76 ± 0.01 #	1.08 ± 0.03	0.70 ± 0.01

Compared with normal control group, * $P < 0.05$; Compared with injury model group, # $P < 0.05$.

讨 论

既往研究表明,PI3K/AKT/mTOR 通路参与调控细胞增殖和代谢^[14]。诱导损伤组中 P-PI3K、P-AKT 等磷酸化蛋白相对表达水平均显著降低,提示辐射可能通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路活性加剧心肌损伤。给与丹参酮 II A 后,磷酸化蛋白表达水平恢复,表明其通过激活该通路发挥保护作用。这一结果与 LI 等^[15]报道丹参酮 II A 可以通过激活 AKT 磷酸化减轻心肌缺血再灌注损伤的研究一致。值得注意的是,模型组中总 PDK1 蛋白相对表达水平显著降低,但丹参酮 II A 并未能显著提升其水平,表明该通路的功能恢复可能更多依赖于磷酸化修饰而非总蛋白表达。这支持“基因-蛋白表达解耦”现象的存在,即翻译后修饰(磷酸化、泛素化等)在病理调控中起主导作用^[16]。

此外,转录组联合分析发现,放射损伤后大鼠和小鼠心肌组织中共同差异基因显著富集于 PI3K/AKT/mTOR 通路,包括 *ANGPT2*、*CCND1*、*THBS1* 等基因。血管生成素 2 (angiopoietin 2, *ANGPT2*) 作为血管生成素家族成员,参与血管重塑和炎症调节^[17]; 细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1, *CCND1*) 是细胞周期调控的关键基因,其上调可能反映心肌细胞代偿性增殖,有研究发现 *CCND1* 上调是心肌细胞代偿性增殖的标志,丹参酮 II A 通过抑制 *CCND1*/cyclin D1 表达,减少心肌纤维化和炎症因子 (TNF- α 、IL-6)^[18],从而改善心功能。另一项研究表明,丹参酮 II A 通过下调 *CCND1*-CDK4 复合物的活性,抑制病理性心肌细胞增殖和肥厚^[19]。

丹参酮 II A 的抗炎、抗氧化及抗凋亡特性已被广泛报道,在本研究中,丹参酮 II A 显著恢复辐射后 H9C2 心肌细胞活力,并显著降低 LDH 释放。LDH 是细胞膜完整性破坏的标志,其减少提示丹参酮 II A 通过稳定线粒体膜电位或抑制 Caspase 通路减少细胞凋亡^[20]。辐射可以诱导活性氧大量生成,导致 DNA 损伤和脂质过氧化。丹参酮 II A 的酚羟基结构可以清除自由基,并通过激活 Nrf2/ARE 通路增强抗氧化酶表达^[5]。HE 染色显示,模型组心肌组织出现炎性浸润和纤维化,而丹参酮 II A 干预后组织结构趋于正常。这与血小板反应蛋白 1 (thrombospondin 1, *THBS1*)、IV 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链 (collagen type IV alpha 1 chain, *COL4A1*) 等纤维化相关基因的下调密切相关。

大鼠和小鼠对辐射的反应具有物种差异(如小鼠

更易发生急性损伤),但转录组联合分析发现 72% 的同源基因存在一致性表达趋势,表明 PI3K/AKT/mTOR 通路在 RIHD 中的核心作用具有跨物种保守性。

本研究的结果呈现正向调控基因上调而蛋白失活的解耦现象,*ANGPT2*、*COL4A1* 等正向调控基因上调提示可能存在代偿性修复,但 PDK1 蛋白低表达及 P-PI3K、P-AKT 磷酸化抑制导致通路功能丧失。PDK1 是 PI3K/AKT/mTOR 信号通路中的关键激酶,负责磷酸化并激活 AKT。当 PDK1 表达缺失或功能受损时,AKT 的磷酸化 Thr308 位点被抑制,导致其下游抗凋亡和抗氧化功能的丧失^[21]。AKT/mTOR 信号抑制会减少对 TGF- β /Smad 通路的负调控,促进肌成纤维细胞活化及细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 沉积。*COL4A1* 和纤连蛋白 1 (fibronectin 1, *FN1*) 是 ECM 主要成分,其过度表达直接导致心肌纤维化^[22]。此外,*ANGPT2* 在 AKT 抑制下表达升高,可能破坏血管内皮细胞紧密连接,增加血管通透性,促进炎症浸润。*THBS1* 作为抗血管生成因子,可以通过 *CD36* 受体抑制内皮细胞迁移,加剧微循环障碍,可能进一步导致心肌缺血和纤维化^[23]。

KEGG 通路分析表明,差异表达基因显著富集于 PI3K/AKT/mTOR 信号通路。该通路是调控细胞自噬的经典中枢通路,其抑制是启动自噬的关键信号^[24]。这一强有力的生物信息学线索提示,X 射线很可能通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路,从而解除其对自噬的负向调控,进而诱发细胞保护性或损伤性自噬。未来,我们将通过检测自噬标志物(如 LC3-II 的转化、p62 的降解)及使用自噬流报告系统来直接验证这一假说。

本研究提示:丹参酮 II A 通过调控 PI3K/AKT/mTOR 通路缓解放射性心损伤,PI3K/AKT/mTOR 通路的基因-蛋白表达解耦现象提示翻译后修饰在病理机制中占主导作用。未来通过靶向恢复 PDK1 表达或干预磷酸化修饰等可能逆转通路抑制,为治疗放射性心脏损伤提供新策略。

参考文献:

- [1] RAI Y, ANITA, KUMARI N, *et al.* Mild mitochondrial uncoupling protects from ionizing radiation induced cell death by attenuating oxidative stress and mitochondrial damage [J]. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 2021, 1862(1):148325.
- [2] WANG K X, YE C, YANG X, *et al.* New insights into the understanding of mechanisms of radiation-induced heart disease [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2023, 24(1):12-29.
- [3] FANG Z, YUSHANJIANG F, WANG G, *et al.* Germacrone

- mitigates cardiac remodeling by regulating PI3K/Akt - mediated oxidative stress, inflammation, and apoptosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 124(Pt A): 110876.
- [4] SCHWEMMLEIN J, MAACK C, BERTERO E. Mitochondria as therapeutic targets in heart failure[J]. *Curr Heart Fail Rep*, 2022, 19(2): 27—37.
- [5] WANG G, MA L, WANG B, *et al*. Tanshinone II A accomplished protection against radiation - induced cardiomyocyte injury by regulating the p38/p53 pathway [J/OL]. 2022 - 08 - 22 [2025 - 05 - 10]. <https://doi.org/10.1155/2022/1478181>.
- [6] MA L, ZHANG T, WANG R, *et al*. Sodium tanshinone II A sulfonate protects primary cardiomyocytes against radiation - induced myocardial injury *via* the p38 pathway[J]. *Int Heart J*, 2024, 65(4): 730—737.
- [7] 马永霞, 马丽, 王刚, 等. 丹参酮 II A 磺酸钠预防和治疗放射性心脏损伤作用的研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(8): 1191—1195.
- [8] NIEDERBERGER E, WILKEN - SCHMITZ A, MANDERSCHIED C, *et al*. Non - reproducibility of oral rotenone as a model for Parkinson' s disease in mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20): 12658.
- [9] WU X, MEIER L, LIU T X, *et al*. Detection, isolation and quantification of myocardial infarct with four different histological staining techniques[J]. *Diagnostics (Basel)*, 2024, 14(20): 2325.
- [10] YIN A, YUAN R, XIAO Q, *et al*. Exercise - derived peptide protects against pathological cardiac remodeling [J/OL]. 2022 - 07 - 15 [2025 - 05 - 10]. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104164>.
- [11] 邵军丽, 李林秋, 戴娟秀, 等. CCK - 8 试剂用于测定活细胞数量的细节研究[J]. *生物技术世界*, 2016, (5): 31—32.
- [12] WU D, WANG S, WANG F, *et al*. Lactate dehydrogenase A (LDHA) - mediated lactate generation promotes pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension[J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 738.
- [13] SVINGEN T, LETTING H, HADRUP N, *et al*. Selection of reference genes for quantitative RT - PCR analysis of rat tissues under physiological and toxicological conditions [J/OL]. *PeerJ*, 3, e855. 2015 - 03 - 24 [2025 - 05 - 10]. <https://doi.org/10.7717/peerj.855>.
- [14] YU L, WEI J, LIU P. Attacking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment in human cancer[J/OL]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 85: 69—94. 2022 - 10 - 31 [2025 - 05 - 10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34175443/>.
- [15] LI Q, SHEN L, WANG Z, *et al*. Tanshinone II A protects against myocardial ischemia reperfusion injury by activating the PI3K/Akt/ mTOR signaling pathway [J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 106—114. 2016 - 12 - 31 [2025 - 05 - 10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27643552/>.
- [16] GUO B, ZHANG F, YIN Y, *et al*. Post - translational modifications of pyruvate dehydrogenase complex in cardiovascular disease[J]. *IScience*, 2024, 27(9): 110633.
- [17] MILAM K E, PARIKH S M. The angiopoietin - TIE2 signaling axis in the vascular leakage of systemic inflammation[J/OL]. *Tissue Barriers*, 2015, 3(1—2): e957508. 2025 - 03 - 05 [2015 - 04 - 03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25838975/>.
- [18] CHEN R, CHEN W, HUANG X, *et al*. Tanshinone II A attenuates heart failure *via* inhibiting oxidative stress in myocardial infarction rats[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(6): 404.
- [19] ZHANG M, CHEN Y, CHEN H, *et al*. Tanshinone II A alleviates cardiac hypertrophy through m6A modification of galectin - 3[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(2): 4260—4270.
- [20] ZHONG J, OUYANG H, SUN M, *et al*. Tanshinone II A attenuates cardiac microvascular ischemia - reperfusion injury *via* regulating the SIRT1 - PGC1 α - mitochondrial apoptosis pathway [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2019, 24(5): 991—1003.
- [21] DANGELMAIER C, MANNE B K, LIVERANI E, *et al*. PDK1 selectively phosphorylates THR (308) on Akt and contributes to human platelet functional responses[J]. *Thromb Haemost*, 2014, 111(3): 508—517.
- [22] LIU M, LOPEZ DE JUAN ABAD B, CHENG K. Cardiac fibrosis: Myofibroblast - mediated pathological regulation and drug delivery strategies[J/OL]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 173: 504—519. 2021 - 06 - 30 [2025 - 05 - 10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33831476/>.
- [23] ZHENG T, YANG R, LI X, *et al*. Integrative transcriptome analysis reveals serpine2 promotes glomerular mesangial cell proliferation and extracellular matrix accumulation *via* activating ERK1/2 signalling pathway in diabetic nephropathy[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2025, 27(2): 750—766.
- [24] RAJENDRAN P, SEKAR R, DHAYASANKAR P S, *et al*. PI3K/ Akt signaling pathway mediated autophagy in oral carcinoma - a comprehensive review [J]. *Int J Med Sci*, 2024, 21(6): 1165—1175. (本文编辑: 马凌云 收稿日期 2025 - 05 - 15)