

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.13.003

## 丹参多酚酸盐通过调控肿瘤坏死因子促进大鼠心肌修复的机制研究\*

李海荣<sup>1</sup> 田小溪<sup>1</sup> 校建波<sup>1</sup> 王琦<sup>1</sup> 黄潭<sup>1</sup> 张明明<sup>2</sup> 华瑞<sup>1Δ</sup>

(1 中国人民解放军空军军医大学第二附属医院急诊科 陕西 西安 710032;

2 中国人民解放军空军军医大学第二附属医院心内科 陕西 西安 710032)

**摘要 目的:**探讨丹参多酚酸盐(Sal B)对大鼠损伤后心肌修复的机制。**方法:**构建新生大鼠心肌细胞H9c2体外缺氧/复氧(H/R)模型,并分组为空白对照组、缺氧/复氧组(模型组)、缺氧/复氧+TNF- $\alpha$ 表达质粒组(TNF- $\alpha$ 组)和缺氧/复氧+Sal B处理组(Sal B组)。为检测细胞迁移实验,分组为对照组、模型组、H/R+DMSO+Vector组、H/R+Sal B+Vector组、H/R+DMSO+TNF- $\alpha$ 组和H/R+Sal B+TNF- $\alpha$ 组。通过MTT实验检测各组H9c2细胞活力;免疫荧光检测H9c2心肌细胞中TNF- $\alpha$ 细胞表面受体TNFR-1和TNFR-2的表达水平;Western-blot和RT-qPCR检测TNF- $\alpha$ 的mRNA和蛋白表达水平以及血管生成蛋白表达水平的影响;Transwell实验检测Sal B对缺氧/复氧处理的H9c2细胞迁移的影响。**结果:**与对照组相比,模型组H9c2心肌细胞的活力显著下降( $P<0.05$ );与模型组相比,Sal B组中H9c2心肌细胞的活力显著升高( $P<0.05$ )。免疫荧光检测结果显示,H9c2心肌细胞质膜上TNFR-1和TNFR2均有表达。Western-blot和RT-qPCR结果显示,与模型组相比,Sal B组中H9c2心肌细胞的TNF- $\alpha$ 的mRNA和蛋白表达水平均显著升高( $P<0.01$ ),TNF- $\alpha$ 组H9c2心肌细胞的TNF- $\alpha$ 、Ang-2和VEGF-1蛋白的表达水平均显著升高( $P<0.01$ ),Ang-1蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ )。细胞迁移结果显示,与对照组相比,模型组和H/R+DMSO+Vector组H9c2细胞迁移能力显著下降( $P<0.01$ );与H/R组和H/R+DMSO+Vector组相比,H/R+Sal B+Vector组、H/R+DMSO+TNF- $\alpha$ 组和H/R+Sal B+TNF- $\alpha$ 组H9c2细胞迁移能力显著升高( $P<0.05$ )。**结论:**Sal B能够通过上调TNF- $\alpha$ 调控血管生成蛋白表达和促进H/R H9c2心肌细胞迁移,从而促进血管生成。

**关键词:**丹参多酚酸盐;TNF- $\alpha$ ;血管生成蛋白;细胞迁移

中图分类号:R-33;R542.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2022)13-2416-06

## Study on the Mechanism of Salvia Miltiorrhiza Polyphenols Promoting Myocardial Repair by Regulating Tumor Necrosis Factor\*

LI Hai-rong<sup>1</sup>, TIAN Xiao-xi<sup>1</sup>, XIAO Jian-bo<sup>1</sup>, WANG Qi<sup>1</sup>, HUANG Tan<sup>1</sup>, ZHANG Ming-ming<sup>2</sup>, HUA Rui<sup>1Δ</sup>

(1 Department of Emergency, The Second Affiliated Hospital, Air Force Medical University of PLA, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital, Air Force Medical University of PLA, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

**ABSTRACT Objective:** To explore the mechanism of Salvia miltiorrhiza polyphenolate (Sal B) on myocardial repair after injury in rats. **Methods:** To construct the H9c2 hypoxia/reoxygenation (H/R) model of neonatal rat cardiomyocytes in vitro, and dividing them into blank control group (control group), hypoxia/reoxygenation group (model group), hypoxia/reoxygenation + TNF- $\alpha$  expression plasmid group (TNF- $\alpha$  group) and hypoxia/reoxygenation+Sal B treatment group (Sal B group). To detect cell migration experiments, the cells were divided into control group, model group, H/R+DMSO+Vector group, H/R+Sal B+Vector group, H/R+DMSO+TNF- $\alpha$  group and H/R+Sal B+TNF- $\alpha$  group. The viability of H9c2 cells in each group were detected by MTT experiment. The expression levels of TNF- $\alpha$  cell surface receptors TNFR-1 and TNFR-2 in H9c2 cardiomyocytes were detected by immunofluorescence. The mRNA and protein expression level of TNF- $\alpha$  and angiogenic protein were detected by Western-blot and RT-qPCR. The effect of Sal B on the migration of H/R H9c2 cells were detected by Transwell experiment. **Results:** Compared with the control group, the vitality of H9c2 cardiomyocytes in the model group was significantly decreased ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the vitality of H9c2 cardiomyocytes in the Sal B group was significantly increased ( $P<0.05$ ). The results of immunofluorescence showed that both TNFR-1 and TNFR2 were expressed on the plasma membrane of H9c2 cardiomyocytes. The results of Western-blot and RT-qPCR showed that compared with model group, the mRNA and protein expression level of TNF- $\alpha$  in H9c2 cell of Sal B group were significantly increased ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the protein expression levels of TNF- $\alpha$ , Ang-2 and VEGF-1 in H9c2 cell of TNF- $\alpha$  group were significantly increased ( $P<0.01$ ), the protein expression level of Ang-1 was significantly reduced ( $P<0.01$ ). The cell migration results showed that compared with the control group, the model group and H/R+DMSO+Vector group H9c2 cell migration ability was significantly weakened ( $P<0.01$ ). Compared with the model group and H/R+DMSO+Vector group, the migration ability of H9c2 cells in

\* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81900338)

作者简介:李海荣(1982-),女,硕士,主治医师,E-mail: HairongL@163.com,电话:15319493426

Δ 通讯作者:华瑞(1986-),男,主治医师,E-mail: 371661262@qq.com

(收稿日期:2021-11-28 接受日期:2021-12-24)

H/R+Sal B+Vector group, H/R+DMSO+TNF- $\alpha$  group and H/R+Sal B+TNF- $\alpha$  group were significantly increased ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Sal B promotes angiogenesis by upregulating TNF- $\alpha$  to regulate angiogenic protein expression and promote H/R H9c2 cardiomyocyte migration.

**Key words:** Salvianolate; TNF- $\alpha$ ; Angiogenic protein; Cell migration

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R542.2 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2022)13-2416-06

## 前言

丹酚酸 B(Salvianolic acid B, Sal B)是从丹参中提取的 16a 小酚羧酸水溶性提取物,具有多种生物活性。它能抑制线粒体脂质过氧化,维持 ATPase 活性,消除超氧酶活性,具有较强的抗氧化活性和神经保护作用。有研究报导丹酚酸 B 能够显著促进血管内皮细胞的增殖,发挥丝裂原活化蛋白激酶的作用而促进心肌修复<sup>[1-3]</sup>。然而,目前还没有研究明确 Sal B 促进心肌修复的机制。肿瘤坏死因子(Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )是一种响应缺血诱导梗死而产生的促炎细胞因子,它积极参与触发炎症和心脏伤口愈合过程<sup>[4,5]</sup>。

然而, TNF- $\alpha$  在心脏修复中发挥的最终作用尚不清楚。研究表明缺氧会触发 TNF- $\alpha$  的表达,在啮齿动物模型的梗死组织中, TNF- $\alpha$  含量增加 8-10 倍<sup>[6,7]</sup>。TNF- $\alpha$  的生物学活性通过两种不同的细胞表面受体介导,即肿瘤坏死因子受体 TNFR-1 和 -2。TNFR1 启动 caspase 级联反应,通过凋亡触发细胞死亡,而 TNFR-2 被认为通过蛋白激酶 B 转录途径启动细胞存活和血管生成<sup>[8-10]</sup>。Sal B 和 TNF- $\alpha$  均能够调控 caspase 级联通路,也都在心脏修复中发挥作用<sup>[11]</sup>。因此,用 Sal B 预处理缺氧复氧的 H9c2 心肌细胞可能有有益的影响 TNF- $\alpha$  及其分泌因子的组成,以促进缺氧后心肌修复。本研究旨在阐明 Sal B 诱导血管生成和心肌修复的作用机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

胰蛋白酶、DH5 $\alpha$  感受态细胞、牛血清白蛋白和多聚甲醛购于上海生物技术有限公司;抗兔 TNFR1 或 TNFR2 及二抗均购于 Abcam 公司(英国);PureLink™ Genomic DNA Mini Kit 试剂盒、Oligofectamine 购于 Invitgen 公司(美国);Lipofectamine 2000 购于碧云天生物技术有限公司;有机玻璃小室购于 Billups-Rothenberg 公司(美国);心肌细胞 H9c2 购于 ATCC 菌株保藏中心(美国);DMEM 培养基购于东芝生物股份有限公司;聚赖氨酸购于 Sigma 公司(美国);玻璃盖玻片购于 Fisher 公司(美国);荧光显微镜购于 Bio-Rad 公司(美国);FuGENE 6 购于 Roche 公司(美国);Trizol 裂解液购于 Thermo 公司(美国);Moloney 小鼠白血病病毒逆转录酶、随机六聚体购于 Gibco 公司(美国)。

### 1.2 方法

**1.2.1 H9c2 细胞 H/R 模型的构建及分组** 为建立体外缺氧/复氧(H/R)细胞模型,将新生大鼠心肌细胞 H9c2 置于含 95% N<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 的厌氧有机玻璃小室中,37℃ 培养 6 h;缺氧前用无糖无血清 DMEM 代替培养液。为了复氧,在正常条件下将细

胞转移到含有 FBS 的 DMEM 中培养 24 h。并将细胞进行以下分组:空白对照组(control 组,H9c2 细胞不经缺氧/复氧处理)、模型组(H/R 组,H9c2 细胞经缺氧/复氧处理)、Sal B 组(H9c2 细胞经缺氧/复氧处理后,使用不同浓度 Sal B 处理)和 TNF- $\alpha$  组(H9c2 细胞经缺氧/复氧处理后,转染 2  $\mu$ g TNF- $\alpha$  表达质粒)。

**1.2.2 MTT 法检测细胞活力** 首先用 0.25%胰蛋白酶消化单层培养细胞,用含血清的培养液配成单个细胞悬液,以每孔 2000 个细胞接种于 96 孔培养板中,每孔体积 90  $\mu$ L,边缘孔用 PBS 或空白培养基填充。将培养板移入 CO<sub>2</sub> 孵箱中,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下培养,至细胞单层铺满孔底,加入浓度梯度的药物。原则上,细胞贴壁后即可加药,每孔加药 10  $\mu$ L,设 5 个重复孔。5% CO<sub>2</sub>,37℃ 孵育分别孵育 24 h 后,倒置显微镜下观察。每孔加入 10  $\mu$ L MTT 溶液(5 mg/mL,即 0.5% MTT),继续培养 4 h。若药物与 MTT 能够反应,可先离心后弃去培养液,小心用 PBS 冲 2-3 次后,再加入含 MTT 的培养液。终止培养,小心吸去孔内培养液。每孔加入 100  $\mu$ L 二甲基亚砜,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 OD490 nm 处测量各孔的吸光值。

**1.2.3 免疫荧光** 将 H9c2 细胞接种于涂有聚赖氨酸的无菌 24 mm $\times$  40 mm 显微镜玻璃盖玻片上,放在二氧化碳恒温培养箱中 37℃ 培养 12 h。随后用 3.7%的多聚甲醛固定并用 3%的牛血清白蛋白封闭。将玻片与抗兔 TNFR1(1:1000)或一抗 TNFR2(1:200)孵育,然后将玻片与用 Alexa Fluor 488 标记的驴-抗兔二抗孵育(1:250),用 4,6-二氨基-2-苯基吡啶染色细胞核。然后通过荧光显微镜在 200 倍放大率下观察盖玻片。

**1.2.4 细胞转染** 编码全长 TNF- $\alpha$  的 pET28a(+)-TNF- $\alpha$  质粒由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。将载体转入 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,通过 PureLink™ Genomic DNA Mini Kit 试剂盒提取质粒,用 Lipofectamine 2000、FuGENE 6 和 Oligofectamine 根据使用说明书的方法进行细胞培养转染。

**1.2.5 实时逆转录 PCR** 收集各组 H9c2 细胞,使用 Trizol 裂解液分别细胞中提取总 RNA。RNA 通过 Moloney 小鼠白血病病毒逆转录酶和随机六聚体逆转录。使用引物如下:TNF-N-F: 5'-TTCGTTGCCCGTCCCAC-3'; TNF-N-R: 5'-GCCCGGCGA-TATCG-3'。在 PE Biosystems 5700 热循环器中使用 AmpliTaq Gold 聚合酶进行实时 PCR,反应体系包括 12 ng 总 cDNA,50 ng 上下游引物,1 $\times$  SYBR Green 混合物,反应体积 25  $\mu$ L。并将  $\beta$ -肌动蛋白作为内参基因;PCR 程序:95℃ 预变性 30 s,95℃ 变性 5 s,60℃ 延伸 35 s,循环 40 次。用 ITS 解离曲线检测引物序列的特异性,用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 法计算相对基因表达量。

**1.2.6 Western blot 检测 TNF- $\alpha$ 、Ang 和 VEGF-1 蛋白表达水平**

收集的细胞最初被超声裂解,用 12% SDS-PAGE 电泳,并转移到免疫印迹聚偏氟乙烯二氟化膜上,用 3%的牛血清白蛋白室温封闭 1 h。将 PVDF 膜与一抗 GAPDH (1:5000)、TNF- $\alpha$  (1:500)、Ang-1 (1:50)、Ang-2 (1:50) 和 VEGF-1 (1:1000) 在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜,然后与对应的二抗 (1:5000) 于室温孵育 2 h。使用增强的化学发光 (ECL) 试剂盒可视化反应条带。然后使用 Image Quantum LAS 4000 对膜进行成像。并使用 ImageJ 对 West-ern-blot 数据进行量化。

**1.2.7 细胞迁移实验** 通过细胞迁移实验确定 Sal B 具有诱导缺氧 / 复氧 H9c2 细胞迁移的趋化特性。将细胞分组为: H/R+DMSO+Vector 组, H9c2 细胞经缺氧 / 复氧处理后转染 2  $\mu$ g/mL Vector 质粒并使用 DMSO 处理 12 h; H/R+DMSO+TNF- $\alpha$  组, H9c2 细胞经缺氧 / 复氧处理后转染 2  $\mu$ g/mL 的 TNF- $\alpha$  表达质粒并使用 DMSO 处理 12 h; H/R+Sal B+Vector 组, H9c2 细胞经缺氧 / 复氧处理后转染 2  $\mu$ g/mL Vector 质粒并采用 5  $\mu$ g/mL Sal B 处理 12 h; H/R+Sal B+TNF- $\alpha$  组, H9c2 细胞经缺氧 / 复氧处理后转染 2  $\mu$ g/mL 的 TNF- $\alpha$  质粒并采用 5  $\mu$ g/mL Sal B 处理 12 h。用 BD 公司的 Matrigel 按照 1:8 稀释,包被 Transwell 小室底部膜的上室面,置于底部膜的上室面使 Matrigel 聚合成凝胶,使用前进行基底膜水化。将上述各组

细胞分别接种到 transwell 小室中,于二氧化碳恒温培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。取出 Transwell 小室,弃去孔中培养液,用无钙的 PBS 洗 2 遍,甲醇固定 30 分钟,将小室适当风干。0.1%结晶紫染色 20 min,用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞,用 PBS 洗 3 遍。400 倍显微镜下随即 5 个视野观察细胞,计数。并使用 ImageJ 对细胞迁移进行量化。确定每种条件下迁移细胞的平均数量。

### 1.3 统计分析

使用 ImageJ 和 GraphPad Prism 7.0 软件进行数据的统计学分析。数值以均值 $\pm$ SD 表示,所有数据使用 t 检验或单向方差分析检验进行统计分析, $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 丹酚酸 B 对 H/R 处理的 H9c2 心肌细胞的影响

结果显示,0-24 h 随着复氧时间的增加,H9c2 心肌细胞活力逐渐下降( $P<0.01$ )。检测不同浓度的 Sal B 对缺氧 / 复氧诱导的 H9c2 心肌细胞的影响,结果显示:与对照组相比,模型组的 H9c2 心肌细胞的活力显著下降 ( $P<0.05$ );与模型组相比,Sal B 组中 H9c2 心肌细胞的活力随着浓度升高而显著增加 ( $P<0.05$ ),同时选择后续实验 Sal B 的给药浓度为 5  $\mu$ g/mL。见图 1。

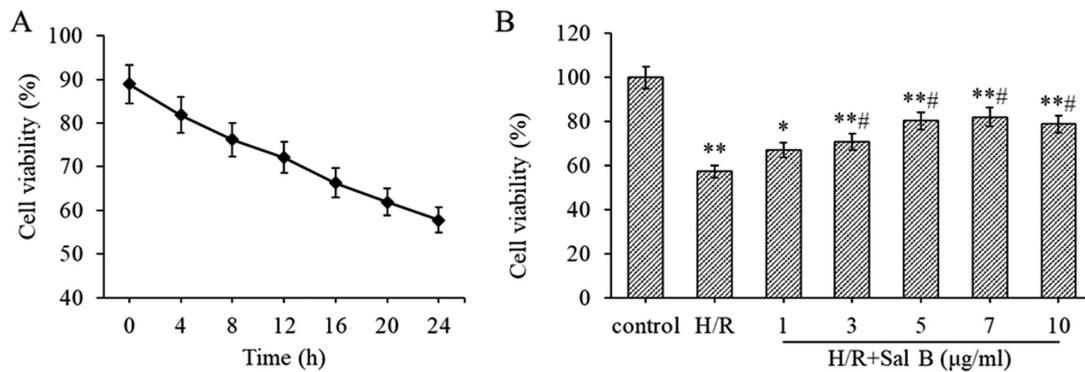


图 1 缺氧 / 复氧和 Sal B 对 H9c2 心肌细胞活性的影响

Fig. 1 Effect of H/R and Sal B on the activity of H9c2 cardiomyocytes

Note: A: effect of H/R on the activity of H9c2 cardiomyocytes; B: effects of different concentrations of Sal B on the activity of H9c2 cardiomyocytes; compared with the control group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

### 2.2 TNFR-1 和 TNFR-2 在 H9c2 心肌细胞质膜表达

结果显示, TNFR-1 和 TNFR-2 在 H9c2 心肌细胞质膜上均有表达,见图 2。

### 2.3 Sal B 上调缺氧 / 复氧处理的 H9c2 细胞中 TNF- $\alpha$ 蛋白的表达水平

结果显示,与对照组相比,模型组 H9c2 心肌细胞的 TNF- $\alpha$  的 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低( $P<0.01$ );与模型组相比,Sal B 组中 H9c2 心肌细胞的 TNF- $\alpha$  的 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高( $P<0.01$ ),但没有明显的剂量依赖性。该结果说明 Sal B 对心肌细胞的修复作用有可能依赖于其对缺氧损伤的心肌细胞中 TNF- $\alpha$  的调控,见图 3。

### 2.4 Sal B 通过上调 TNF- $\alpha$ 调控缺氧 / 复氧处理的 H9c2 心肌细胞中的血管生成蛋白的表达水平

结果显示,与对照组相比,模型组的 H9c2 心肌细胞中

TNF- $\alpha$ 、Ang-1、Ang-2 和 VEGF-1 蛋白的表达水平均显著降低 ( $P<0.01$ );与模型组相比,TNF- $\alpha$  组的 H9c2 心肌细胞的 TNF- $\alpha$ 、Ang-2 和 VEGF-1 蛋白的表达水平均显著升高 ( $P<0.01$ ),Ang-1 蛋白表达水平显著降低 ( $P<0.01$ )。见图 4。

### 2.5 Sal B 通过调控 TNF- $\alpha$ 诱导缺氧 / 复氧处理的 H9c2 细胞迁移

结果显示,与对照组相比,模型组和 H/R+DMSO+Vector 组 H9c2 细胞迁移能力显著减弱 ( $P<0.01$ );与模型组和 H/R+DMSO+Vector 组相比,H/R+Sal B+Vector 组、H/R+DMSO+TNF- $\alpha$  组和 H/R+Sal B+TNF- $\alpha$  组 H9c2 细胞迁移能力显著增强 ( $P<0.05$ )。该结果表明 TNF- $\alpha$  对损伤后修复的心肌细胞的迁移中起主要作用,并且 Sal B 能够通过调控 TNF- $\alpha$  诱导缺氧 / 复氧处理的 H9c2 细胞的迁移。见图 5。

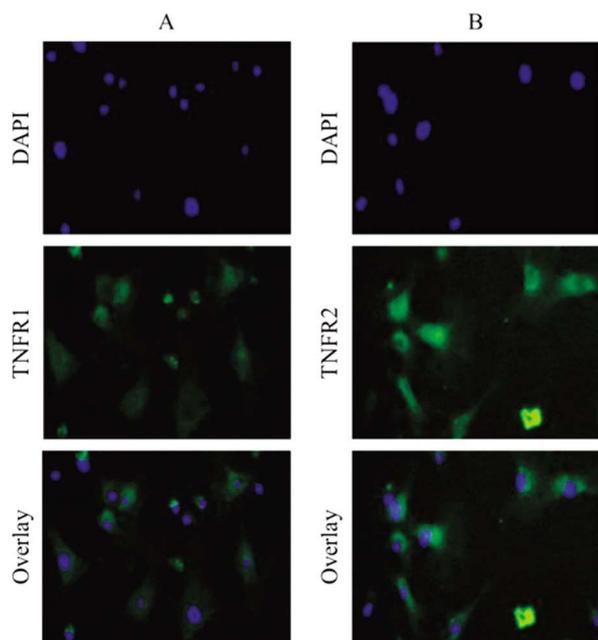


图2 TNFR-1 和 TNFR-2 在 H9c2 心肌细胞上的定位(× 20 倍)  
Fig2 Localization of TNFR-1 and TNFR-2 on H9c2 cardiomyocytes (× 20)

### 3 讨论

在中国, 缺血性心脏病是导致死亡的主要慢性病之一, 持续性缺血缺氧容易引发心肌梗死 (myocardial infarction, MI)<sup>[12,13]</sup>。MI 对心肌的永久性损伤会导致不可逆的心肌坏死和非收缩性瘢痕组织的产生<sup>[14,15]</sup>。心肌梗死后, 心肌的慢性炎症和进行性变性可能最终导致心力衰竭<sup>[16]</sup>。目前, 传统的 MI 治疗仅侧重于恢复心肌组织的血流并治疗心肌梗死引起的并发症<sup>[17]</sup>。然而, 由于哺乳动物心脏的再生能力有限, 想要保护和修复 MI 后的心肌, 发现可促进心肌修复的新药物和新机制变得至关重要。H9c2 心肌细胞株是一种从大鼠胚胎心脏中分离出的永生化的心肌细胞系, 最初来源于胚胎大鼠心室组织<sup>[18]</sup>。虽然 H9c2 细胞不能够再分化, 但它们仍然显示出与原代心肌细胞的许多相似之处, 包括 MEMS、膜形态学、G- 信号蛋白表达和电生理特性<sup>[19]</sup>。

TNF- $\alpha$  通过与细胞表面受体 TNFR-1 和 TNFR-2 结合, 启动炎症、凋亡和修复机制<sup>[20,21]</sup>。本研究通过免疫荧光发现 H9c2 细胞的质膜上存在 TNFR-1 和 TNFR-2。因此, TNF- $\alpha$  能够通过 TNFR-1 和 TNFR-2 与 H9c2 细胞结合。我们的实验结果证明, Sal B 能够促进缺氧 / 复氧处理的 H9c2 细胞的 TNF- $\alpha$  的转录

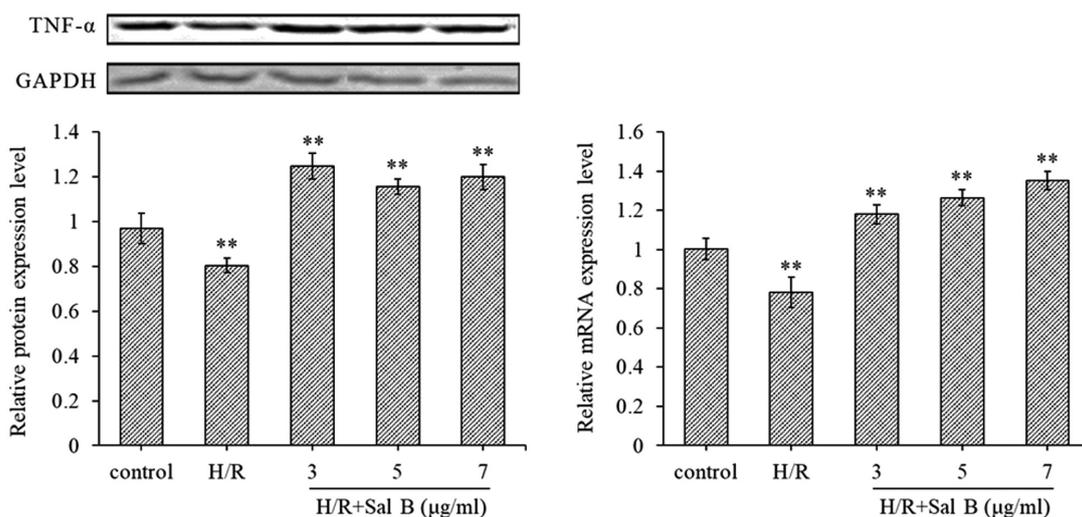


图3 Sal B 对缺氧 / 复氧 H9c2 细胞 TNF- $\alpha$  蛋白表达的调控

Fig. 3 Regulation of TNF- $\alpha$  protein expression in H/R H9c2 cells by Sal B

Note: compared with the control group, \*\* $P < 0.01$ .

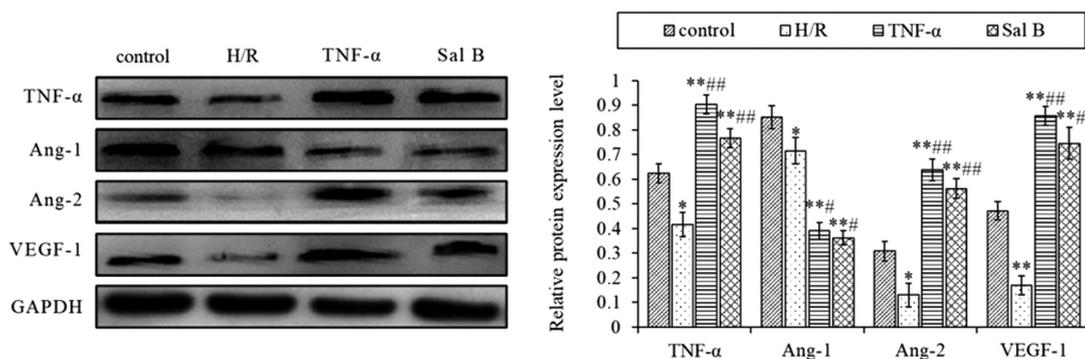


图4 Sal B 通过上调 TNF- $\alpha$  调控血管生成蛋白的表达

Fig. 4 Sal B regulates angiogenic protein expression by up-regulating TNF- $\alpha$

Note: compared with the control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; compared with the H/R group, # $P < 0.01$ .

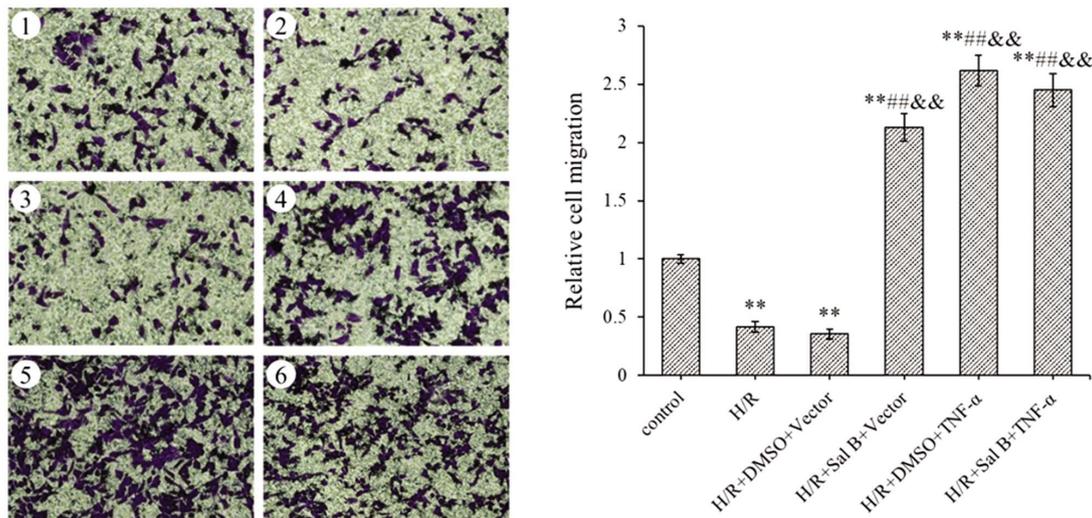


图5 Sal B 通过上调 TNF-α 影响 H/R H9c2 细胞迁移(× 400倍)

Fig.5 Sal B affects H/R H9c2 cell migration by up-regulating TNF-α (× 400)

Note: ① : control group; ② : H/R group; ③ : H/R+DMSO+Vector group; ④ : H/R+Sal B+Vector group; ⑤ : H/R+DMSO+TNF-α group; ⑥ : H/R+Sal B+TNF-α group; compared with the control group, \*\* $P<0.01$ ; compared with the H/R group, ### $P<0.01$ ; compared with the H/R+DMSO+Vector group, && $P<0.01$ .

和表达,因此认为 Sal B 可能通过上调 TNF-α 来发挥其对心肌细胞的损伤修复作用。

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)是已知的内皮细胞增殖、迁移和分化的有效刺激因子<sup>[22]</sup>,可以在大鼠、兔角膜、绒毛膜尿囊膜等动物模型中刺激体内的血管生成。VEGF 与内皮细胞受体的结合也诱导一氧化氮(NO)的产生,NO被认为是 VEGF 诱导的体内血管扩张和血管生成的介质。VEGF-1 通过内皮细胞和血管平滑肌细胞的增殖诱导血管生成,同时刺激内皮细胞从已经存在的血管中萌发。更重要的是,VEGF-1 能够动员骨髓祖细胞并促进向内皮细胞分化<sup>[23-25]</sup>。血管生成和动脉生成在冠状动脉侧支循环形成中发挥作用。血管生成是原始血管的生长、扩张和重组的过程,最终形成复杂和成熟的血管网络。动脉发生是指将已存在的侧支小动脉转化为肌肉侧支动脉。血管生成素是参与血管生成级联发生的血管生成调节因子之一,血管生成素在血管生成和炎症过程中调节血管的发育和重构<sup>[26]</sup>。血管生成素-1(angiotensin-1, Ang-1)从内皮细胞释放,在血管稳定和血管成熟中起重要作用。它通过抑制粘附分子的释放来发挥其与 VEGF 相关的炎症减轻作用<sup>[27]</sup>。Weibel-Palade 小体释放的血管生成素-2(angiotensin-2, Ang-2)是 Ang-1 的竞争性抑制剂,通过与 Tie-2 受体结合而抑制 Ang-1 的作用。它使内皮对炎症因子敏感,并促进 VEGF 介导的血管生成<sup>[27,28]</sup>。本研究的实验结果表明,缺氧/复氧处理能够减少 H9c2 细胞 TNF-α、Ang-2 和 VEGF-1 蛋白的转录表达,但能够增加 Ang-1 蛋白的转录表达。Sal B 能够通过增强 TNF-α 蛋白在缺氧/复氧处理的 H9c2 细胞中的转录表达从而增强 TNF-α 调控的血管生成相关因子 Ang-2 和 VEGF-1 的表达水平,减弱 TNF-α 调控的血管生成相关因子 Ang-1 的表达水平。这些受 Sal B 调控的蛋白表达的增加和减少可能通过多种作用机制在诱导血管生成中发挥重要作用。同时 Sal B 能够促进缺氧/复氧处理的 H9c2 细胞的迁移,这些结果表明 TNF-α 对损伤后修复的心肌细胞的迁移中

起主要作用。因此,我们认为 Sal B 能够通过上调 TNF-α 而促进 TNF-α 调控的血管生成因子的表达,从而促进心肌细胞的迁移和调节血管的发育。

总体而言,本研究发现 Sal B 通过调控 TNF-α 促进血管生成,而血管生成对于促进心肌梗死后的心脏修复至关重要,但是 Sal B 促进心肌修复确切的蛋白调控网络仍需进一步研究。

#### 参考文献 (References)

- [1] 李鑫辉,王静雯,林丽美,等. 丹参通络解毒汤中羟基红花黄色素 A 和丹酚酸 B 的含量测定[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(4): 166-169
- [2] 王翊遥,张传朋,张会涛,等. 丹酚酸 B 改善糖尿病心肌损伤的机制研究[J]. 山西医科大学学报, 2020, 330(4): 50-56
- [3] 郭博文,冀宇兰,苗俊秋,等. 丹酚酸 B 基于 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路对血管内皮细胞 EA.hy926 氧化损伤的保护作用研究 [J]. 中南药学, 2020, 18(4): 562-567
- [4] Ahmad A, Druzhyna N, Szabo C. Effect of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase deficiency on the development of multiorgan failure, inflammation, and wound healing in mice subjected to burn injury[J]. J Burn Care Res, 2019, 40(2): 148-156
- [5] Liu S, Zhao M, Zhou Y, et al. A self-assembling peptide hydrogel-based drug co-delivery platform to improve tissue repair after ischemia-reperfusion injury [J]. Acta Biomater, 2020, 103(1): 102-114
- [6] Zhang Y, Zhou S, Cai W, et al. Hypoxia/reoxygenation activates the JNK pathway and accelerates synovial senescence [J]. Mol Med Rep, 2020, 22(1): 265-276
- [7] Hundsberger H, Verin A, Wiesner C, et al. TNF: a moonlighting protein at the interface between cancer and infection[J]. Front Biosci, 2008, 13(5): 5374-5386
- [8] 王沁,余叶,陈伟钱,等. 肿瘤坏死因子样凋亡微弱诱导剂在类风湿关节炎中的研究进展[J]. 中华风湿病学杂志, 2019, 23(4): 266-269
- [9] Lafont E, Draber P, Rieser E, et al. TBK1 and IKKε prevent TNF-induced cell death by RIPK1 phosphorylation [J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(10): 1257-1267

- 2018, 20(12): 1389-1399
- [10] Borghi A, Verstrepen L, Beyaert R. TRAF2 multitasking in TNF receptor-induced signaling to NF- $\kappa$ B, MAP kinases and cell death[J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 116(1): 1-10
- [11] Zheng Z, Wang Y, Yu H, et al. Salvianolic acid B inhibits ototoxic drug-induced ototoxicity by suppression of the mitochondrial apoptosis pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(12): 6883-6897
- [12] 吴丹. 急性心肌梗死后缺血再灌注性心律失常发病机制及预防的研究进展[J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2019, 7(8): 42-43
- [13] 曲艺南, 房绍红, 李呼伦, 等. 血管新生的形成及其与疾病的相关性研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(23): 4593-4596
- [14] Sandoval Y, Jaffe AS. Type 2 myocardial infarction: jacc review topic of the week[J]. *J Am Coll Cardiol*. 2019, 73(14): 1846-1860
- [15] Nudi F, Di Belardino N, Pinto A, et al. Assessment of the fate of myocardial necrosis by serial myocardial perfusion imaging[J]. *J Nucl Cardiol*, 2018, 25(2): 496-505
- [16] Jenča D, Melenovský V, Stehlik J, et al. Heart failure after myocardial infarction: incidence and predictors [J]. *ESC Heart Fail*, 2021, 8(1): 222-237
- [17] 王天博, 刘婷婷, 孙芳玲, 等. 治疗性血管新生在心肌梗死后的应用进展[J]. *心脏杂志*, 2019, 156(2): 99-103
- [18] Gu M, Wang J, Wang Y, et al. MiR-147b inhibits cell viability and promotes apoptosis of rat H9c2 cardiomyocytes via down-regulating KLF13 expression [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2018, 50(3): 288-297
- [19] Watkins SJ, Arthur BHM. The H9c2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 2011, 47(2): 125-131
- [20] Greene JA, Portillo JAC, Corcino YL, et al. CD40-TRAF signaling upregulates CX3CL1 and TNF- $\alpha$  in human aortic endothelial cells but not in retinal endothelial cells [J]. *PLOS ONE*, 2015, 10(12): e0144133
- [21] 何成. tmTNF-m 通过 TNFR2 使 TRAF2 泛素化降解杀伤肿瘤细胞 [D]. 华中科技大学, 武汉, 2019
- [22] Karaman S, Leppänen VM, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease [J]. *Development*, 2018, 145(14): 151019-151031
- [23] 陈亦菲, 邹江, 王念, 等. ZNF667 调节 VEGF-VASH1 通路促进血管新生[J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(8): 1515-1515
- [24] Vivienne CH, Fong GH. Vasculogenesis and angiogenesis in VEGF receptor-1 deficient mice[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1332: 161-176
- [25] 张迪, 胡艳阁, 耿乐乐, 等. 氯化钴诱导缺氧对血管周细胞血管生成素-1 表达影响的研究[J]. *中华损伤与修复杂志(电子版)*, 2018, 13(6): 432-438
- [26] Yu X, Ye F. Role of angiopoietins in development of cancer and neoplasia associated with viral infection [J]. *Cells*, 2020, 9(2): 457-465
- [27] Tetzner A, Naughton M, Gebolys K, et al. Decarboxylation of Ang-(1-7) to Ala1-Ang-(1-7) leads to significant changes in pharmacodynamics[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 833: 116-123
- [28] 林洋, 曹彦龙, 邱红, 等. 肝星状细胞通过影响 Ang-1/Tie2 轴促进肝癌血管新生 [J]. *中华肝脏外科手术学电子杂志*, 2019, 8(4): 370-374