

• 基础研究 •

丹酚酸A对小鼠心脏骤停复苏后心功能的保护作用

曹维镠 樊子旭 郑宏超 李艳杰 吉庆起

【摘要】 目的:探讨丹酚酸 A (Sal A) 对小鼠心肺复苏 (CPR) 后心功能的作用。 **方法:** 24 只雌性 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组, 对照组小鼠不进行建模, 实验组小鼠通过颈静脉注射氯化钾建立 CPR 模型, CPR 后 30 s 给予注射 Sal A (15 mg/kg) (Sal A 组) 和等体积生理盐水 (Vehicle 组), 超声心动图分析小鼠左室射血分数和左室缩短分数, 血流动力学仪器监测 3 h 内心脏血流动力学变化, 并统计 72 h 内小鼠生存率。Western blot 分析 CPR 后 3 h 心肌炎性因子白细胞介素 (IL)-10 和肿瘤坏死因子 (TNF)- α 水平。 **结果:** 与 Vehicle 组相比, Sal A 组小鼠心脏功能指标包括左室射血分数 [(61.19 \pm 2.02)% 对 (40.73 \pm 1.53)%]、左室短轴缩短率 [(38.55 \pm 1.72)% 对 (26.09 \pm 1.82)%]、心输出量 [(7.0 \pm 1.1) mL/min 对 (3.6 \pm 0.9) mL/min]、左室压力升高最大速率 (dp/dtmax, 左室收缩功能指标) [(5 407 \pm 298.7) mmHg/s 对 (4 100 \pm 479.7) mmHg/s] 和左室压力降低最大速率 (dp/dtmin, 左室舒张功能指标) [(-5 796.0 \pm 249.6) mmHg/s 对 (-3 882 \pm 670.7) mmHg/s] 均明显改善 (P 均 $<$ 0.01), 并且有更高的生存率 (68.7% 对 33.3%, $P<$ 0.01)。与 Vehicle 组相比, Sal A 组小鼠促炎因子 TNF- α 的蛋白表达水平明显降低 (1.66 \pm 0.26 对 8.35 \pm 0.52, $P<$ 0.01), 抗炎因子 IL-10 的蛋白表达水平明显升高 (6.21 \pm 0.47 对 2.82 \pm 0.17, $P<$ 0.01)。 **结论:** Sal A 通过抑制 CPR 后炎症反应, 改善小鼠心功能及预后。

【关键词】 丹酚酸 A ; 心脏骤停; 心功能; 炎症反应

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2023.01.011

The protective role of salvianolic acid A on cardiac function in mice after resuscitation from cardiac arrest CAO Weie¹, FAN Zixu², ZHENG Hongchao², LI Yanjie², JI Qingqi³. 1. Department of Emergency, Shanghai Xuhui District Central Hospital, Shanghai 200031; 2. Department of Cardiology, Shanghai Xuhui District Central Hospital, Shanghai 200031; 3. Department of Cardiology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effect of salvianolic acid A (Sal A) on cardiac function in mice after cardiopulmonary resuscitation (CPR). **Methods:** Twenty-four female C57BL/6 mice were randomly divided into 3 group. The control group was not treated. Other mice were injected through jugular vein with potassium chloride for establishing a CPR model. 30 s latter, they were randomly treated with Sal A (15 mg/kg) (Sal A group) or equal volume of normal saline (vehicle group). Left ventricular ejection fraction and fractional shortening were determined by echocardiography. Changes in cardiac hemodynamics and survival rate of mice within 72 h were recorded. Western blot analysis of myocardial inflammatory factors interleukin (IL)-10 and tumor necrosis factor (TNF)- α levels was performed 3 h after CPR. **Results:** Compared with the vehicle group, all indexes of cardiac function were significantly improved in the Sal A group, including left ventricular ejection fraction ((61.19 \pm 2.02)% vs. (40.73 \pm 1.53)%,

基金项目: 国家自然科学基金 (82100271); 上海科技创新行动计划启明星项目 (22YF1443000)

作者单位: 200031 上海市徐汇区中心医院急诊科 (曹维镠), 心内科 (樊子旭, 郑宏超, 李艳杰); 200080 上海交通大学附属第一人民医院心内科 (吉庆起)

通信作者: 吉庆起, E-mail: lsyzjq@hotmail.com

$P < 0.01$), fractional shortening ($(38.55 \pm 1.72)\%$ vs. $(26.09 \pm 1.82)\%$, $P < 0.01$), cardiac output ((7.0 ± 1.1) mL/min vs. (3.6 ± 0.9) mL/min, $P < 0.01$) and left ventricular systolic (dp/dtmax) ($(5\ 407 \pm 298.7)$ mmHg/s vs. $(4\ 100 \pm 479.7)$ mmHg/s, $P < 0.01$) and diastolic function (dp/dtmin) ($(-5\ 796 \pm 249.6)$ mmHg/s vs. $(-3\ 882 \pm 670.7)$ mmHg/s, $P < 0.01$), which was associated with a higher survival rate (68.7% vs. 33.3%, $P < 0.01$). Western blotting showed that compared with the vehicle group, Sal A treatment significantly down-regulated factor TNF- α (1.66 ± 0.26 vs. 8.35 ± 0.52 , $P < 0.01$), whereas up-regulated factor IL-10 (6.21 ± 0.47 vs. 2.82 ± 0.17 , $P < 0.01$) expression. **Conclusion:** Sal A improves cardiac function and prognosis of mice by inhibiting the inflammatory response after CPR.

【Key words】 Salvianolic acid A; Cardiac arrest; Cardiac function; Inflammatory response

心脏骤停 (CA) 指突发心脏活动中止和体循环丧失, 近年来心肺复苏 (CPR) 技术有了较大改进, 但 CA 仍是全世界成人死亡的主要原因之一。自主循环恢复 (ROSC) 后可出现心脏损伤、脑损伤以及全身其他脏器损伤, 这与全身缺血再灌注后的瀑布式级联损伤效应有关, 称为心脏骤停后综合征 (PCAS) [1]。积极保护 CPR 后心功能对改善复苏结果及预后至关重要。

丹酚酸 A (Sal A) 是从丹参中提取出的水溶性成分, 具有抗炎、清除自由基以及调控能量代谢等功能 [2]。研究发现, Sal A 通过降低线粒体膜电位、调节钙超载、增加心肌三磷酸腺苷 (ATP) 及抑制心肌凋亡, 发挥抗心肌缺血再灌注性心律失常和损伤的作用 [3]。Sal A 还可通过抑制心肌梗死后炎症细胞浸润和转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) /Smad2 信号通路, 减少心肌梗死面积, 抑制心肌纤维化, 进而减少急性冠脉综合征的发生 [4-6]。本研究旨在探讨 Sal A 在小鼠 CPR 中的作用及潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

24 只雌性 C57/BL6 小鼠 (8~10 周龄, 体重 20~25 g) 购自上海杰思捷动物公司。Sal A 购自美国 MedChemExpress 公司, 氯化钾购自美国 Sigma 公司, 抗白细胞介素 (IL)-10 抗体、抗肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 抗体购自英国 Abcam 公司。

1.2 心肺复苏模型构建及分组

雌性小鼠随机分成 3 组: 对照组、Vehicle 组和 Sal A 组。小鼠饲养于 SPF 级环境中, 12 h 明暗周期, 温湿度可控, 给予标准饲料和饮用水。

参考文献 [7] 建立小鼠 CPR 模型。2.0% 异氟烷麻醉小鼠后行气管插管并连接小动物呼吸机。将外径 0.61 mm 的 PE 管 (SDR Scientific, 澳大利亚) 插入右颈静脉建立静脉输液通道, 通过颈动脉将传

导压力-容积导管 (SPR-839, Millar Instruments, 美国) 置入左心室。通过 PE 管以氯化钾 0.08 mg/g 诱导小鼠 CA, 并将气管插管与呼吸机断开。CA 8 min 后重新连接呼吸机, 用手指以 350~400 次/min 进行 CPR。Sal A 组 CPR 后 30 s, 通过 PE 管注射 Sal A 15 mg/kg 及肾上腺素 0.4 μ g/g, Vehicle 组仅给予等体积生理盐水及肾上腺素。ROSC 定义为窦性心律恢复, 平均动脉压超过 40 mmHg 并持续至少 5 min。达到 ROSC 或 CPR 超过 5 min, 则停止 CPR。为防止脱水, 给予复苏小鼠皮下注射 0.5 mL 生理盐水, ROSC 后 2 h 拔除呼吸机支持, 将小鼠放回饲养笼并予自由进食。对照组小鼠正常喂养, 不进行建模。

1.3 CPR 后小鼠心功能测定

采用超声心动图 (Vevo 2100, VisualSonics, 加拿大) 评估 CPR 后 3 h 心脏结构和功能。2% 异氟烷麻醉小鼠, 在小鼠心率为 450~500 次/min 时获取左室长轴和 M 型图像, 并进行相关测量。左室射血分数 (LVEF) 和左室短轴缩短率 (LVFS) 的计算方法参考文献 [8]。同时, 应用上述 Millar 导管监测各组小鼠 CPR 后不同时间点血流动力学变化, 计算左室收缩功能指标左室压力升高最大速率 (dp/dtmax) 和左室舒张功能指标左室压力降低最大速率 (dp/dtmin)。

1.4 Western blot 检测心肌组织炎症因子水平

使用 Complete Lysis-M 裂解 CPR 后 3 h 心脏组织。用 BCA 法测定蛋白浓度, 取每个样品中适量 (50 μ g) 变性蛋白进行 15% 的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 并转移到硝酸纤维素膜。5% 脱脂牛奶室温下封闭膜 1 h, 加入抗白细胞介素 (IL)-10、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, HRP 结合二抗室温孵育 1 h, 用 Gel-Pro Analyzer 4.0 进行定量分析。

1.5 CPR后小鼠生存分析

若 CPR 后小鼠自发呼吸及心跳停止,并持续 2 min 以上,则确认小鼠死亡。小鼠成功达到 ROSC 后,计算不同组别小鼠此后 72 h 内生存率。

1.6 统计学分析

使用 SPSS 23.0 软件对数据进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差表示。2 组或多组间比较使用非配对 t 检验或 One-way ANOVA 方差分析。方差分析前进行方差齐性检

验,若各组间方差一致则采用 Bonferroni 事后检验,方差不一致则采用 Tamhane 事后检验。存活率用 Kaplan-Meier 方法评估,组间比较采用 Log-rank 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Sal A改善CPR后心肌功能障碍

超声心动图结果显示,Vehicle 组小鼠 LVEF 和 LVFS 明显低于对照组,Sal A 组 LVEF 和 LVFS 明显高于 Vehicle 组。见图 1、表 1。

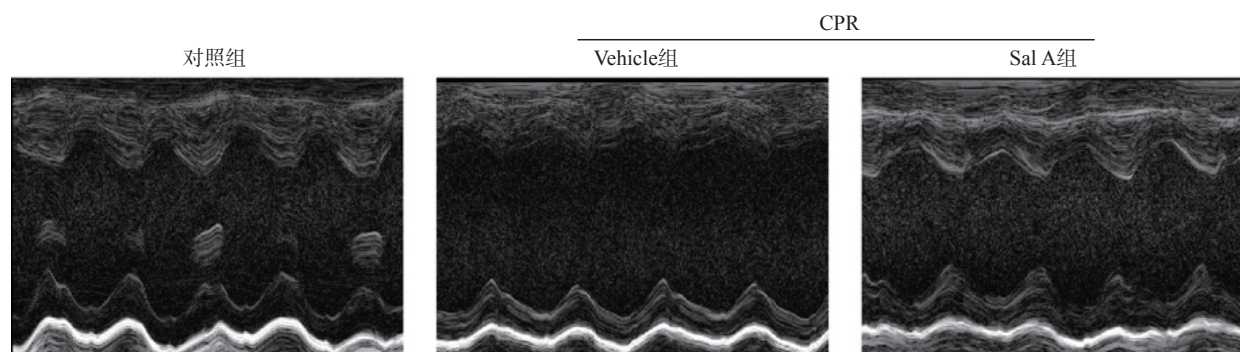


图1 超声心动图评估各组小鼠心功能情况

表1 各组小鼠心功能比较

组别	LVEF/%	LVFS/%
对照组 ($n=8$)	66.67 ± 2.34	42.88 ± 1.54
Vehicle组 ($n=8$)	$40.73 \pm 1.53^{(1)}$	$26.09 \pm 1.82^{(1)}$
Sal A组 ($n=8$)	$61.19 \pm 2.02^{(2)}$	$38.55 \pm 1.72^{(2)}$

注:与对照组比较, $^{(1)}P < 0.01$; 与Vehicle组比较, $^{(2)}P < 0.01$

2.2 Sal A提高CPR后存活率

Kaplan-Meier 曲线显示,与 Vehicle 组 (33.3%) 相比,Sal A 组 (68.7%) 在 CPR 后 72 h 内生存率更高 ($P < 0.05$)。见图 2。

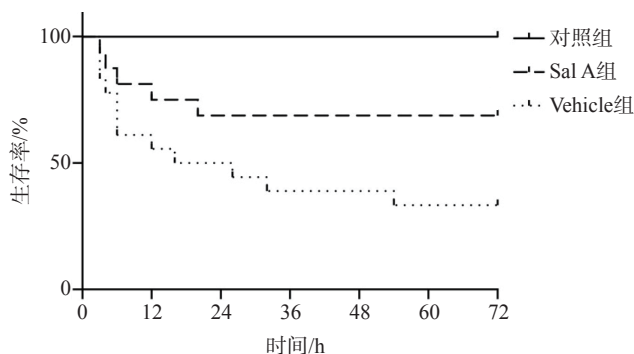


图2 各组小鼠CPR后72 h内生存分析

2.3 Sal A改善CPR后血流动力学

血流动力学分析表明,在 CPR 后 1~3 h,与 Vehicle 组相比,Sal A 组 dp/dt_{max} [(5407 ± 298.7) mmHg/s 对 (4100 ± 479.7) mmHg/s]、 dp/dt_{min} [(-5796 ± 249.6) mmHg/s 对 (-3882 ± 670.7) mmHg/s] 均明显改善 (P 均 < 0.01),心输出量水平也明显高于 Vehicle 组 [(7.0 ± 1.1) mL/min 对 (3.6 ± 0.9) mL/min, $P < 0.01$]。见图 3。

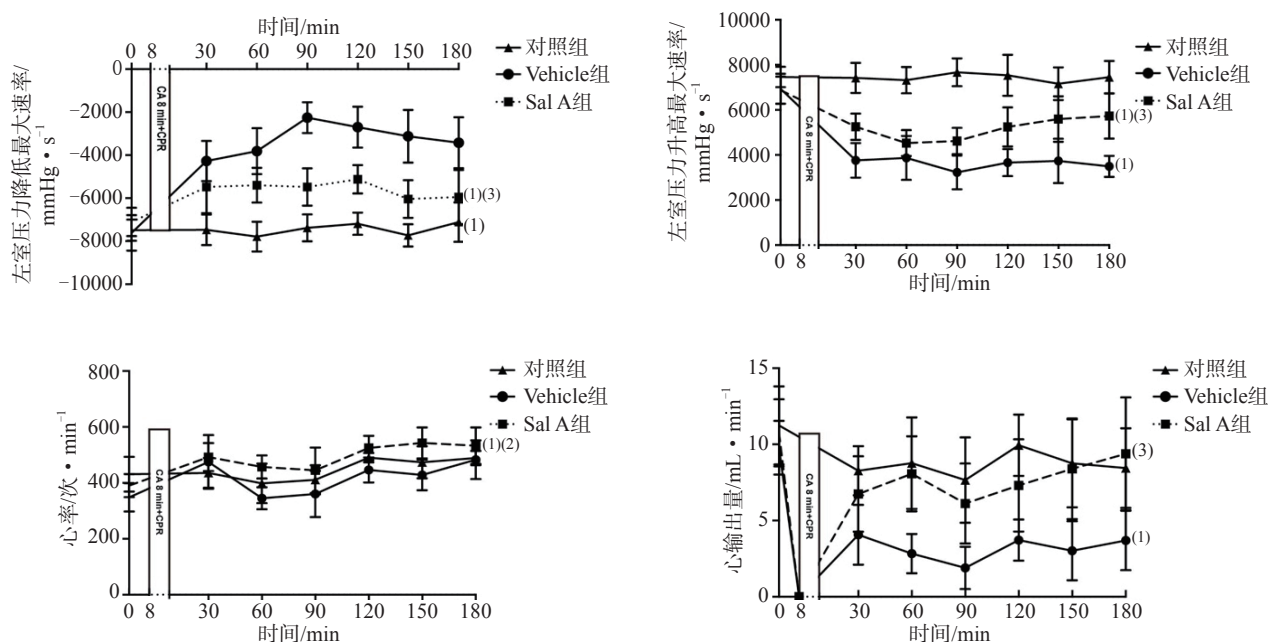
2.4 Sal A抑制CPR后心肌炎性反应

Western blot 结果显示,与 Vehicle 组相比,Sal A 组心肌促炎因子 TNF- α 明显下调 (1.66 ± 0.26 对 8.35 ± 0.52 , $P < 0.01$),抗炎因子 IL-10 明显上调 (6.21 ± 0.47 对 2.82 ± 0.17 , $P < 0.01$)。见图 4、表 2。

表2 各组小鼠心肌组织炎症因子蛋白表达水平比较

组别	IL-10	TNF- α
对照组 ($n=6$)	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.10
Vehicle组 ($n=6$)	$2.82 \pm 0.17^{(1)}$	$8.35 \pm 0.52^{(2)}$
Sal A组 ($n=6$)	$6.21 \pm 0.47^{(1)(3)}$	$1.66 \pm 0.26^{(3)}$

注:与对照组比较, $^{(1)}P < 0.05$, $^{(2)}P < 0.01$; 与Vehicle组比较, $^{(3)}P < 0.01$



注: 与对照组相比, ⁽¹⁾ $P < 0.05$, 与Vehicle组相比, ⁽²⁾ $P < 0.05$, ⁽³⁾ $P < 0.01$

图3 各组小鼠CPR 3 h内血流动力学监测情况

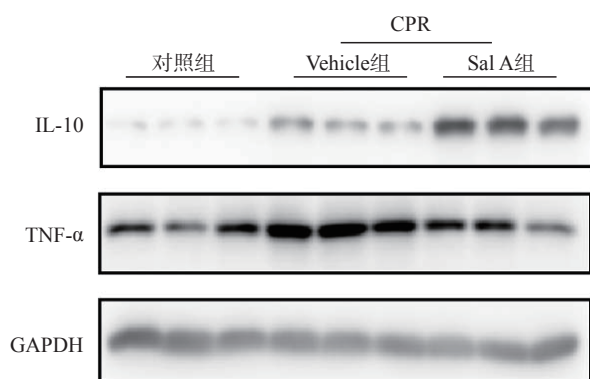


图4 各组小鼠心肌组织炎症因子蛋白表达情况

3 讨论

本研究发现, Sal A 通过抑制小鼠心肺复苏后心肌炎性反应, 减轻心肌损伤, 改善心肺复苏后心功能异常。

CPR 后心肌功能障碍和血流动力学不稳定是生存率低下的主要原因。研究表明, 复苏成功后心功能障碍是可逆的, 这与急性心力衰竭的失代偿不同^[9]。然而, 复苏后早期的心输出量不足和外周循环低灌注可使全身性缺血再灌注损伤恶化^[10]。在 CPR 后早期改善血液循环, 可稳定血流动力学并改善生存预后^[11]。我们既往研究发现, 丹参成分之一丹酚酸 B (Sal B) 对 CPR 后心功能具有保护作用^[12]。有文献报道, Sal A 可改善慢性失代偿性心力衰竭^[13], 然

而, Sal A 对 CPR 后心功能障碍的影响尚未有相关研究。本研究表明, 在 CPR 模型中, Sal A 能够改善心脏骤停诱发的循环衰竭, 这与 Sal A 抑制 CPR 后心肌炎性反应有关。

CPR 后炎症反应广泛激活, 尤其是细胞因子大量释放, 在 CPR 后发挥重要作用, 可导致缺血再灌注损伤和心肌功能障碍。CPR 后大量单核/巨噬细胞和中性粒细胞迁移浸润, 伴有大量促炎性因子生成, 可激活下丘脑-垂体-肾上腺轴, 在一定程度上抑制炎症反应过度激活^[14]。本研究发现, Sal A 可明显减少促炎性因子 TNF-α 表达, 上调抗炎性因子 IL-10 表达, 从而抑制 CPR 后炎症反应的过度激活。

本研究有一定局限性: (1) 实验对象为小鼠, 未来研究可应用诸如猪或狗等大型动物, 进一步明确 Sal A 对 CPR 后心功能的保护作用。(2) CPR 模型是通过氯化钾利用健康小鼠构建, 并没有在心力衰竭或冠状动脉疾病动物模型基础上进行, 一定程度上降低了临床相关性。

本研究揭示了 Sal A 对 CPR 后心功能障碍的保护作用, 为改善 PCAS 提供了新的治疗策略, 未来的研究将以大动物为实验对象, 以进一步提高 Sal A 治疗的临床转化性。

参考文献

- [1] Gando S, Wada T. Disseminated intravascular coagulation in cardiac arrest and resuscitation[J]. J Thromb Haemost, 2019,

- 17(8):1205-1216.
- [2] 张莉, 张维库, 赵莹, 等. 丹酚酸A的研究与进展[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(19):2603-2609.
- [3] Qian W, Wang ZL, Xu TD, et al. Anti-apoptotic effects and mechanisms of salvianolic acid A on cardiomyocytes in ischemia-reperfusion injury[J]. *Histol Histopathol*, 2019, 34(3):223-231.
- [4] Wang SB, Tian S, Yang F, et al. Cardioprotective effect of salvianolic acid A on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 615(1/3):125-132.
- [5] Fan HY, Fu FH, Yang MY, et al. Antiplatelet and antithrombotic activities of salvianolic acid A[J]. *Thromb Res*, 2010, 126(1):e17-e22.
- [6] 石春光, 黄琛, 胡益森, 等. 丹酚酸A对心肌梗死大鼠心肌纤维化及心功能的作用及其机制[J]. 广西医科大学学报, 2021, 38(10):1876-1881.
- [7] Abella BS, Zhao DH, Alvarado J, et al. Intra-arrest cooling improves outcomes in a murine cardiac arrest model[J]. *Circulation*, 2004, 109(22):2786-2791.
- [8] Ji QQ, Zhao YC, Yuan AC, et al. Deficiency of liver-X-receptor- α reduces glucose uptake and worsens post-myocardial infarction remodeling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 488(3):489-495.
- [9] Ruiz-Bailén M, Aguayo de Hoyos E, Ruiz-Navarro S, et al. Reversible myocardial dysfunction after cardiopulmonary resuscitation[J]. *Resuscitation*, 2005, 66(2):175-181.
- [10] Kern KB, Hilwig RW, Rhee KH, et al. Myocardial dysfunction after resuscitation from cardiac arrest: an example of global myocardial stunning[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1996, 28(1):232-240.
- [11] Morimura N, Sakamoto T, Nagao K, et al. Extracorporeal cardiopulmonary resuscitation for out-of-hospital cardiac arrest: a review of the Japanese literature[J]. *Resuscitation*, 2011, 82(1):10-14.
- [12] Ji QQ, Li YJ, Wang YH, et al. Salvianolic acid B improves postresuscitation myocardial and cerebral outcomes in a murine model of cardiac arrest: involvement of Nrf2 signaling pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020:1605456.
- [13] 丁超, 谢利平, 李荣成. 丹酚酸A对压力超负荷大鼠心功能减退和心室重构的改善作用[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2014, 34(1):12-17.
- [14] Zhao Q, Shen YT, Li R, et al. Cardiac arrest and resuscitation activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and results in severe immunosuppression[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2021, 41(5):1091-1102.
- (收稿:2022-06-10 修回:2022-11-22)
(本文编辑:胡晓静)

