

丹酚酸 B 通过抑制 Sirt1 蛋白降解促进心肌细胞线粒体功能稳态和改善缺血再灌注小鼠的心脏功能

李思蒙^{1,4}, 陈建宁⁴, 申思满⁴, 刘望龙⁴, 于丽丽^{1,2,3}, 张良清^{1,4}

¹澳门科技大学医学部中医药学院, 澳门 999078, ²澳门中药机制与质量全国重点实验室, 澳门 999078, ³澳门科技大学珠海澳科大科技研究院, 广东 珠海 519099; ⁴广东医科大学附属第二医院, 广东 湛江 524000

摘要:目的 探讨丹酚酸 B(Sal-B)对缺氧复氧(HR)小鼠 HL-1 心肌细胞线粒体功能稳态和小鼠心肌缺血再灌注(IR)诱导心肌损伤调控的分子机制。方法 体外实验:在验证 Sal-B 对缺氧复氧小鼠 HL-1 心肌细胞影响的线粒体表型实验中,将细胞分为对照组(Ctrl组);缺氧复氧组(HR组;缺氧 12 h,复氧 4 h);Sal-B 预处理组(Sal-B+HR组;5 μmol/L Sal-B,预处理 30 min);敲降对照组(HR+Sal-B+sh-Ctrl组);敲降 Sirt1 组(HR+Sal-B+sh-Sirt1 组)。采用 ATP 检测试剂盒测定 HL-1 细胞 ATP 生成能力;Mito-Sox 染色测定 HL-1 细胞线粒体超氧阴离子水平;使用氧耗率 OCR 检测试剂盒测定 HL-1 细胞底物氧化水平。体内实验:在验证 Sal-B 对小鼠在体 IR 心功能影响的实验中,将 36 只 8~10 周龄 C57BL/6J 小鼠随机分为 3 组(12 只/组):假手术组(Sham组);缺血再灌注组;Sal-B 预处理缺血再灌注组(Sal-B+IR;50 mg/kg,IR 前 24 h 尾静脉注射)。在验证 Sal-B 对 Sirt1-cKO 小鼠在体缺血再灌注心功能影响的挽救实验中,将 60 只 8~10 周龄 C57BL/6J 小鼠随机分为 5 组(12 只/组):假手术组;缺血再灌注组(IR组;缺血 45 min,再灌注 6 h);Sal-B 预处理缺血再灌注组(Sal-B+IR;50 mg/kg,尾静脉注射);Sirt1 敲除对照组(IR+Sal-B+Sirt1^{fl/fl});心脏特异性 Sirt1 基因敲除组(IR+Sal-B+cKO-Sirt1)。采用 HE 染色观察心肌的组织损伤程度;通过心脏超声评估小鼠的心脏射血分数和短轴缩短率。结果 Sal-B 处理可以明显提高 HR 条件下的 HL-1 心肌细胞 ATP 生成能力($P<0.01$);Sal-B 可以降低 HR 处理的 HL-1 心肌细胞线粒体超氧阴离子水平($P<0.01$);Sal-B 可以提高 HR 处理的 HL-1 心肌细胞的耗氧率($P<0.05$)。Sal-B 处理显著改善 IR 处理的心肌的组织结构紊乱,小鼠心脏超声结果提示 Sal-B 可以提高 IR 小鼠的心脏射血功能($P<0.05$)。放线菌酮的使用联合 Western blotting 分析,以及 Sirt1-IP 后泛素化的 Western blotting 分析显示 Sal-B 明显抑制 HL-1 心肌细胞 Sirt1 蛋白降解($P<0.05$)。HL-1 心肌细胞在加入 Sal-B 的基础上,敲降 Sirt1 逆转了 Sal-B 对 HL-1 细胞的促进 ATP 生成作用($P<0.01$);逆转了 Sal-B 对 HL-1 细胞的抑制线粒体超氧阴离子水平($P<0.01$),逆转了 Sal-B 对 HL-1 细胞耗氧率的促进作用($P<0.05$)。在小鼠体内注射 Sal-B 的基础上,Sirt1-cKO 组相较于对照组明显逆转了 Sal-B 的提高 IR 小鼠的心脏射血功能的作用($P<0.05$),Sirt1-cKO 组相较于对照组明显逆转了 Sal-B 的改善 IR 处理的心肌组织结构紊乱作用。结论 Sal-B 可通过抑制 Sirt1 蛋白降解从而促进 HR 处理的 HL-1 心肌细胞的线粒体功能稳态提升和改善 IR 小鼠的心功能。

关键词:丹酚酸 B;Sirt1;心肌缺血再灌注损伤;心脏;线粒体功能稳态

Salvianolic acid B promotes mitochondrial homeostasis and improves cardiac function in mice with ischemia-reperfusion injury by inhibiting Sirt1 protein degradation

LI Simeng^{1,4}, CHEN Jianning⁴, SHEN Siman⁴, LIU Wanglong⁴, YU Lili^{1,2,3}, ZHANG Liangqing^{1,4}

¹Faculty of Chinese Medicine, Medical Sciences Division, Macau University of Science and Technology, Macau 999078, China; ²The State Key Laboratory of Mechanism and Quality of Chinese Medicine of the Macau University of Science and Technology, Macau 999078, China; ³Macau University of Science and Technology Zhuhai MUST Science and Technology Research Institute, Zhuhai 519099, China; ⁴Second Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524000, China

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanism by which salvianolic acid B (Sal-B) modulates mitochondrial functional homeostasis and alleviates myocardial ischemia-reperfusion (I/R) injury in mice. **Methods** Mouse cardiomyocyte HL-1 cells were pretreated with 5 μmol/L Sal-B with or without sh-Sirt1 transfection before exposure to hypoxia-reoxygenation (HR), and the changes in ATP production, mitochondrial superoxide activity, substrate oxidation level were evaluated. In the animal experiment, 36 C57BL/6J mice were randomized into 3 groups ($n=12$) for sham operation or ligation of the left anterior coronary artery to induce myocardial I/R injury with or without intravenous injection of Sal-B+I/R (50 mg/kg). In the rescue experiment, 60 adult C57BL/6J mice were randomized into 5 groups ($n=12$): sham-operated group, myocardial I/R group, Sal-B+I/R group, I/R+Sal-B+Sirt1fl/fl group, and I/R+Sal-B+cKO-Sirt1 group. Myocardial injury was evaluated with HE staining, and cardiac function was assessed by measurement of the ejection fraction and fractional shortening using echocardiography. **Results** In HL-1 cells with HR injury, Sal-B pretreatment significantly increased cellular ATP production, reduced mitochondrial superoxide anion levels, and enhanced oxygen consumption level. In the mouse models of myocardial I/R injury, Sal-B pretreatment markedly ameliorated I/R-induced structural disarray of the cardiac myocytes and improved cardiac ejection. Cycloheximide chase with Western blotting and ubiquitination assays after Sirt1-IP showed that Sal-B significantly inhibited Sirt1 degradation in HL-1 cells. Sirt1 knock-down reversed Sal-B-induced increases in ATP production, reduction in superoxide, and elevation of OCR in HL-1

收稿日期:2025-05-01

基金项目:国家自然科学基金(82370281);广东省自然科学基金(2024A1515013119)

Supported by National Natural Science Foundation of China (82370281).

作者简介:李思蒙,在读博士研究生,E-mail: 3230005101@student.must.edu.mo

通信作者:于丽丽,助理教授,博士生导师,E-mail: llyu@must.edu.mo; 张良清,教授,博士生导师,E-mail: zhangliangqing@gdmu.edu.cn

cells. Cardiomyocyte-specific Sirt1 knockout obviously reversed Sal-B-mediated improvement in cardiac ejection function and myocardial structure damage in mice with myocardial I/R injury. **Conclusion** Sal-B promotes mitochondrial functional homeostasis in cardiomyocytes with HR injury and improves cardiac function in mice after myocardial I/R by inhibiting Sirt1 protein degradation.

Keywords: salvianolic acid B; Sirt1; myocardial ischemia-reperfusion injury; heart; mitochondrial homeostasis

近年来,我国急性心肌梗死(AMI)的发病率呈现出明显上升的趋势,针对这一疾病,主流的治疗方法涵盖了经皮冠状动脉介入治疗与溶栓治疗,这些方法的应用在减少缺血损伤、限制梗死范围以及迅速恢复心肌血流量方面效果显著。然而,心肌缺血再灌注(IR)过程可能对心脏构成二次伤害,进而诱发慢性心力衰竭(CHF)^[1-4]。然而,当前临床上尚缺乏一种能够有效缓解再灌注后继发性损伤的治疗方法,因此,探索新颖且高效的药物成为心肌IR治疗领域亟待攻克的关键问题。

丹酚酸B(Sal-B),作为丹参这一传统中药中的核心活性成分^[5,6],近年来在心血管疾病治疗领域的研究中逐渐凸显出其独特价值。它不仅在MI和心肌IR损伤模型中展现出了显著的保护效应,还通过多种机制对心脏微血管内皮细胞产生了积极影响^[7]。Sal-B凭借其强大的抗氧化特性,能够有效清除自由基,抑制脂质过氧化过程,从而减轻心肌细胞的损伤^[8]。研究表明,Sal-B的作用机制广泛,涵盖了抗炎、抗氧化、抗凋亡以及促进血管新生等多个方面^[9]。尤为引人注目的是,Sal-B能够通过多种途径促进一氧化氮(NO)的生成,进而减轻小鼠的心肌缺血损伤^[10],并且Sal-B还能通过促进线粒体自噬和抑制NLRP3炎性小体的激活来减轻心肌缺血性损伤^[11]。临床前系统评价和荟萃分析结果也表明,Sal-B对心肌缺血/再灌注损伤的保护作用显著^[12]。Sal-B治疗还调节了关键凋亡调节因子的表达,包括Bax、caspase-3、JNK和p38,同时增强Bcl-2表达,从而抑制心肌组织凋亡,从而减轻了小鼠MIRI损伤后的心肌梗死范围^[13]。在动脉粥样硬化的防治方面,Sal-B通过上调血红素氧合酶1(HO-1)的表达以及增加NO的产生,对治疗内皮功能障碍相关的心血管疾病展现出了潜在疗效^[14,15]。在脓毒症心肌病的防治中,Sal-B还能通过增强ATF5介导的线粒体未折叠蛋白反应改善线粒体功能障碍进而改善脓毒症心肌病^[16]。综上所述,Sal-B有望成为心血管疾病治疗领域中的一类重要药物。

近年来,Sirt家族蛋白在调控线粒体稳态方面的作用日益受到学术界的重视。Sirt家族属于一类依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)的去乙酰化酶,它们广泛参与到细胞代谢、氧化应激反应以及线粒体功能的调控过程中。哺乳动物中有7个Sirtuin同源物,即Sirt1至Sirt7。Sirt1主要存在于细胞核中,但在特定条件下可穿梭到细胞质中^[17,18]。Sirt2主要存在于细胞质中,但在细

胞周期的G2期向M期转变期间也会在细胞核中积累^[19]。Sirt3-5具有线粒体靶向序列,基本上定位于线粒体^[20-22]。Sirt6和Sirt7也是核蛋白,其中Sirt6主要与染色质相关^[23],而Sirt7则富集在核仁中^[24]。Sirt3作为线粒体内不可或缺的一员,已被科学验证能够通过调节线粒体代谢和活性氧(ROS)水平来维持线粒体稳态。例如,有研究表明,当Sirt3作为小分子激动剂2-APQC的靶标被激活后,能够有效调节线粒体中的脯氨酸代谢以及ROS代谢稳态,进而改善心肌肥厚和纤维化症状^[25]。此外,Sirt5也被证实能通过去琥珀酰化修饰来调节线粒体蛋白AIFM1,从而保护线粒体稳态,抵抗压迫诱导的椎间盘退变^[26],并且Sirt5介导的ME2去琥珀酰化可通过增强线粒体呼吸促进癌症生长^[27]。这些研究成果均表明,SIRT家族蛋白在维护线粒体稳态方面扮演着至关重要的角色,为相关疾病的治疗提供了潜在的靶点。

先前的研究表明,Sal-B可通过调节SIRT3介导的线粒体ROS和NLRP3串扰减轻心肌IR损伤^[28],还有研究表明,Sal-B处理能够提升巨噬细胞内Sirt1的表达水平,进而促进巨噬细胞的极化并改善内皮功能受损,从而缓解小鼠的肢体缺血症状^[29],但Sal-B具体是如何影响Sirt1蛋白表达的机制尚不明确,Sal-B是否通过影响Sirt1蛋白表达进而调节HR处理的小鼠HL-1心肌细胞线粒体功能稳态以及IR小鼠心肌损伤的具体作用也没有过相关报道。本研究发现,在心肌IR模型中,Sal-B通过抑制Sirt1蛋白的降解,有效促进了HL-1心肌细胞的线粒体功能稳态,并提高了IR小鼠的心脏功能。

1 材料和方法

1.1 材料

HL-1细胞(Millipore);胎牛血清(FBS)、杜尔贝科改良伊戈尔氏培养基(DMEM)(Thermo Fisher Scientific);丹酚酸B(Sal-B)、放线菌酮(CHX)(上海麦克林公司);腺相关病毒9型(AAV9)(上海吉凯基因医学科技股份有限公司);去乙酰化酶1(Sirt1)、泛素化(Ub)、 β -微管蛋白(β -Tubulin)抗体(Abcam);ATP检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);Mito-SOX染色试剂盒、HE染色试剂盒(Thermo Fisher Scientific);OCR耗氧率检测试剂盒(Agilent)。

1.2 细胞培养

HL-1细胞培养在添加10% FBS和1%青霉素和链霉素的DMEM培养基中,于37℃,5% CO₂的细胞

培养箱中,前20代的细胞用于所有细胞相关试验。

1.3 模型和分组

1.3.1 小鼠心肌缺血再灌注(IR)模型 选用8~10周、体质量20~25 g的C57BL/6雄性小鼠。所有小鼠在实验前适应性饲养1周,保持12 h光照/黑暗循环,自由摄食和饮水。实验操作遵循动物伦理委员会的相关规定。所有动物研究均经广东医科大学附属第一医院实验动物福利与伦理委员会审核批准(伦理批号:AHGDMU-LAC-B-202403-0014)。小鼠腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)进行麻醉。麻醉后,将小鼠仰卧位固定于手术台上,剃除胸部毛发,并用碘伏消毒手术区域。在颈部正中切开皮肤,分离气管并插入气管插管,连接小动物呼吸机进行机械通气。呼吸机参数设置为:潮气量0.2~0.3 mL,呼吸频率120次/min,吸呼比1:1。沿胸骨左缘切开皮肤和肌肉,暴露肋骨。使用显微剪刀剪开第4肋间,小心分离心包,暴露心脏。在左心耳下方,将距离主动脉根部3 mm处的冠脉前降支用6-0的丝线打一活结,造成心肌缺血。缺血时间为45 min。缺血45 min后,缓慢松开缝合线,恢复左前降支动脉(LAD)血流,进行再灌注,再灌注时间为6 h。再灌注后,逐层缝合胸壁和皮肤切口。将小鼠置于温暖的环境中恢复,直至完全苏醒。动物模型分组包括:Sham组、IR组、IR+Sal-B组、IR+Sal-B+Sirt1^{fl/fl}组、IR+Sal-B+Sirt1-cKO组。

1.3.2 HL-1细胞缺氧复氧(HR)模型的建立 在缺氧的条件下(95% N₂和5% CO₂),将HL-1细胞置于无FBS的DMEM培养基中培养12 h诱导缺氧;缺氧后,将HL-1细胞在有氧条件下(37 °C,5% CO₂的细胞培养环境),于含有10% FBS的DMEM培养基中培养4 h,以构建HR细胞模型。细胞模型分组包括:Ctrl组、HR组、HR+Sal-B组、HR+Sal-B+sh-Ctrl组、HR+Sal-B+sh-Sirt1组。

1.4 ATP含量检测

将HL-1心肌细胞接种于96孔板中,在含10% FBS的DMEM培养基中培养至对数生长期,各组细胞经过不同处理后,弃去培养基,用预冷的PBS洗涤细胞2次,每孔加入100 μL ATP裂解缓冲液,冰上裂解10 min,随后于4 °C、12 000 g离心5 min,收集上清液用于ATP检测。按照碧云天ATP检测试剂盒说明书,将上清液与ATP检测工作液按比例混合,立即使用酶标仪测定发光强度。通过试剂盒提供的ATP标准品绘制标准曲线,计算样品中ATP浓度。

1.5 超氧阴离子(Mito-SOX)检测

将HL-1心肌细胞接种于共聚焦培养皿中,在含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基中培养至70%~80%融合度。各组细胞经过不同处理后,弃去培养基,用预热的HBSS缓冲液洗涤细胞2次。随后,加入用

HBSS缓冲液稀释的Mito-SOX™ Red工作液(终浓度为5 μmol/L),37 °C避光孵育10 min。孵育结束后,用HBSS缓冲液洗涤细胞3次以去除未结合的探针。最后,加入新鲜培养基,立即使用共聚焦显微镜在激发波长510 nm、发射波长580 nm下观察并拍照。荧光强度通过Image J软件进行定量分析。

1.6 耗氧率检测

将HL-1心肌细胞接种于Seahorse XF 96细胞培养板中,细胞的接种密度为1×10⁴/孔,在含10%FBS的DMEM培养基中培养至80%~90%融合度。实验前12 h更换为无血清、无缓冲剂的Seahorse XF基础培养基(补充2 mmol/L谷氨酰胺和1 mmol/L丙酮酸钠),并在37 °C无CO₂培养箱中平衡1 h。各组细胞经过不同实验处理后,按照试剂盒说明书,依次向试剂孔中加入线粒体压力测试化合物:寡霉素(Oligomycin,终浓度1 μmol/L)、FCCP(终浓度1.5 μmol/L)和鱼藤酮/抗霉素A(Rotenone/Antimycin A,终浓度0.5 μmol/L),分别用于检测基础呼吸、ATP合成相关耗氧、最大呼吸能力和非线粒体呼吸。实验数据通过Seahorse Wave软件采集并分析。

1.7 Western blotting分析

取各组细胞丢弃培养基,用4 °C PBS洗涤细胞3次。然后加入适量的细胞裂解液(蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂和RIPA细胞裂解液的比例为1:1:100)使细胞充分裂解,收集于1.5 mL EP管中,在4 °C下,12 000 r/min离心15 min,获得蛋白样品。采用二喹啉甲酸法(BCA)测定蛋白浓度。用10% SDS-PAGE分离目的蛋白,分离后的蛋白在转移缓冲液中以200 mV的电压转印到硝酸纤维素膜上。封闭后,硝酸纤维素膜与Sirt1、Ub和Tubulin的抗体在4 °C孵育过夜,Sirt1抗体的稀释比例为1:1000,Ub抗体的稀释比例为1:1000,Tubulin抗体的稀释比例为1:3000。TBST洗涤后,与HRP标记的二抗孵育60 min。使用Tanon Chemi Dog 5200T系统(上海天能科技有限公司)检测蛋白条带信号。

1.8 免疫共沉淀(IP)

收集不同分组的小鼠HL-1心肌细胞,用预冷的RIPA裂解缓冲液(含1%蛋白酶抑制剂和1%磷酸酶抑制剂)冰上裂解30 min,随后于4 °C、12 000 g离心15 min,收集上清液并测定蛋白浓度。取500 μg总蛋白与2 μg Sirt1抗体在4 °C孵育过夜,随后加入50 μL Protein A/G磁珠,继续孵育4 h。孵育结束后,用预冷的RIPA缓冲液洗涤磁珠3次,最后加入2×SDS上样缓冲液,煮沸10 min以洗脱结合蛋白,洗脱样品经SDS-PAGE电泳分离,后续同方法1.7。

1.9 组织学分析

小鼠造模后 24 h 进行处死、开胸取出心脏,在预冷的无菌生理盐水中冲洗残留血液,切取部分左心室组织,用 4% 多聚甲醛溶液进行固定、接着包埋、脱水,行石蜡切片(5 μm)。接着对其进行 HE 染色后,随机挑选 5 个视野进行观察,在显微镜下观察各组心肌组织中细胞结构形态和心肌纤维化情况。

1.10 超声检测

小鼠用异氟烷诱导麻醉后,固定于超声检查台上,使其处于仰卧位。使用胶带或专用固定装置固定小鼠的四肢,确保其身体稳定。在小鼠胸部和腹部的超声探头接触区域剃除毛发,并涂抹导声胶,将超声探头放在小鼠胸部,通常在胸骨左侧的肋间。调整探头的位置和角度,获取心脏的二维图像。记录 M 型、B 型超声图像。使用超声设备内置的测量工具,测量心脏的各个参数,如射血分数和短轴缩短率等。完成所有检查后,将小鼠从检查台上移开。根据需要给予小鼠复苏措施,如给予氧气或适当的复苏药物。

1.11 统计学分析

样本量计算方法为资源方程式确定法, N 为实验单

位的总数, n 为每组的样本量, K 为处理组的数量, E 为两者之间的差值,公式为: $n = E/K + 1$ 。 E 的最小值为 10, 最大值为 20。因此可以获得每组动物的最小和最大数量: $n_{\min} = 10/K + 1$, $n_{\max} = 20/K + 1$ 。因此,总体而言,所需的最小和最大动物数量为: $N_{\min} = n_{\min} \times K = (10/K + 1) \times K$, $N_{\max} = n_{\max} \times K = (20/K + 1) \times K$ 。所有数据均以均数 \pm 标准差表示,采用 SPSS 26.0 软件进行分析。计量资料组间比较采用单因素方差分析,当 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义,每项试验重复 3~5 次。

2 结果

2.1 Sal-B 逆转 HL-1 细胞 HR 损伤后的线粒体功能紊乱

与 Ctrl 组比较, HR 组细胞 ATP 生成能力降低, 与 HR 组比较, Sal-B+HR 组细胞 ATP 生成能力增高 ($P < 0.01$, 图 1A)。与 Ctrl 组比较, HR 组细胞内线粒体超氧阴离子水平增高, 与 HR 组比较, Sal-B+HR 组细胞内线粒体超氧阴离子水平降低 ($P < 0.001$, 图 1B、C)。与 Ctrl 组比较, HR 组细胞基础呼吸值、ATP 产生量、最大呼吸值均降低, 与 HR 组比较, Sal-B+HR 组细胞基础呼吸值、ATP 产生量、最大呼吸值均提高 ($P < 0.05$, 图 1D、E)。

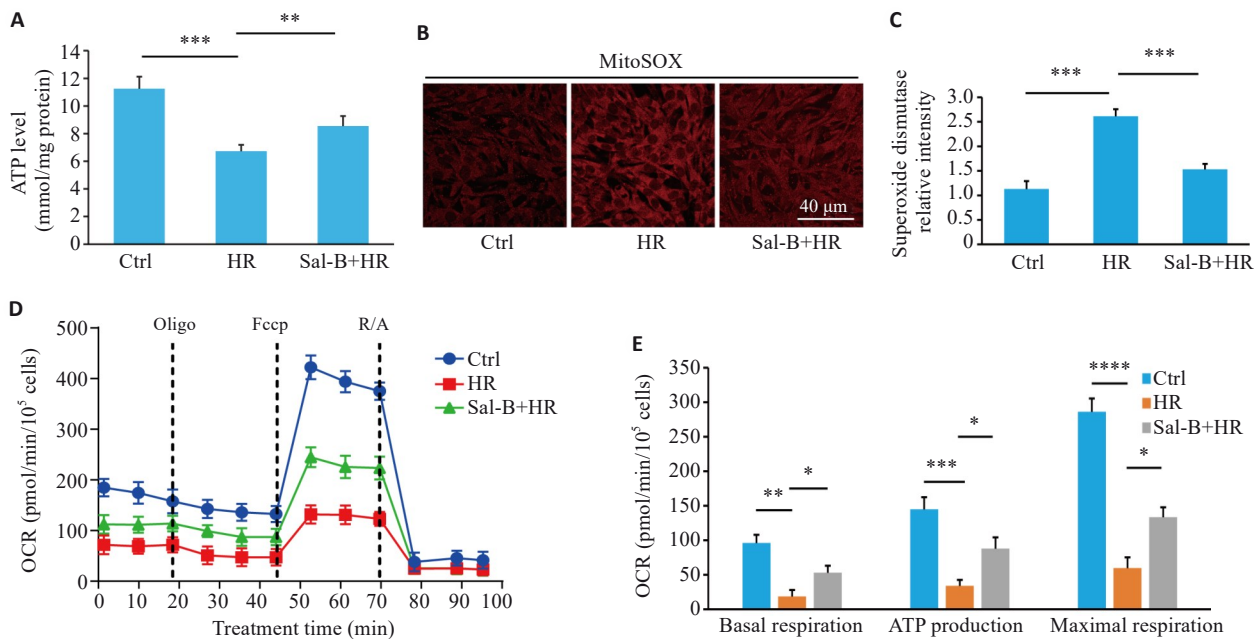


图1 Sal-B 逆转 HL-1 细胞 HR 损伤后的线粒体功能紊乱

Fig.1 Sal-B reverses mitochondrial dysfunction in HL-1 cardiomyocytes following hypoxia-reoxygenation (HR) injury. A: ATP production levels in different groups. B, C: Mito-SOX fluorescence staining for detecting superoxide levels in HL-1 cardiomyocytes and statistical results in different groups. D, E: Oxygen consumption rates (OCR) in different groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

2.2 Sal-B 减轻心肌 IR 损伤

与假手术组相比, IR 组小鼠心肌射血分数(EF)和左室短轴缩短率(FS)明显降低, Sal B 明显提高 IR 损伤状态下 EF 和 FS ($P < 0.05$, 图 2A~C)。且 IR 组小鼠心肌相较于假手术组心肌组织紊乱程度加重, Sal-B+IR 组相

较 IR 组心肌组织紊乱程度减轻(图 2D)。

2.3 Sal-B 在 HR 条件下抑制 HL-1 细胞内 Sirt1 蛋白降解

Sal-B 与 Sirt1 蛋白口袋契合较好, 能够与 Sirt1 的 ASN-409, ASN-218, GLU-408, GLY-407, ARG-438, ASP-284 氨基酸形成很强的氢键作用, Sal-B 在 Sirt1

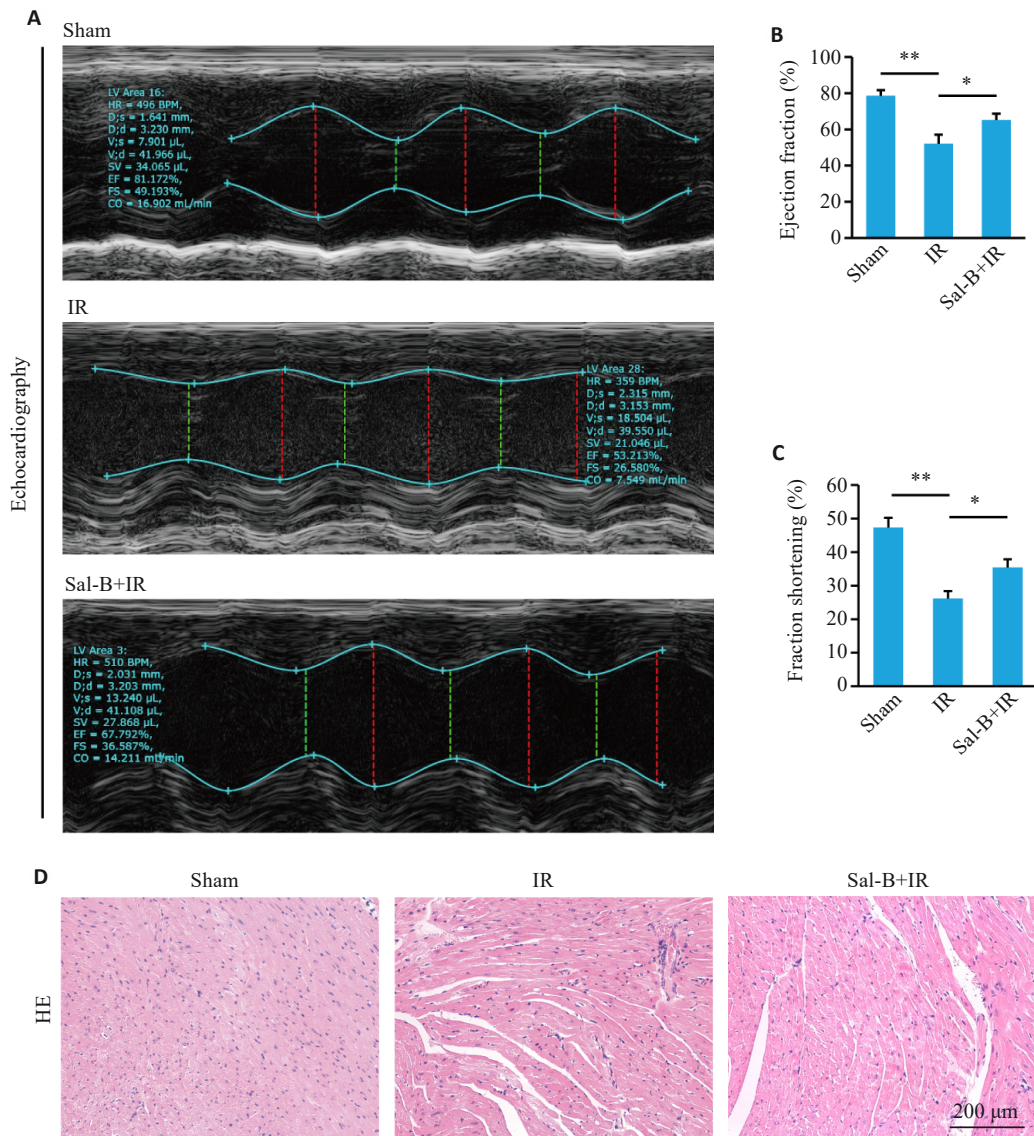


图2 Sal-B减轻心肌IR损伤

Fig. 2 Sal-B alleviates myocardial I/R injury in mice. A-C: Echocardiographic assessment of cardiac ejection fraction and fractional shortening in mice in different groups. D: HE staining showing myocardial tissue disorganization in the mice from different groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

结合口袋内匹配度较高,表现出较强的结合亲和力(图3A)。Western blotting结果显示,在HR条件下,Sal-B以剂量依赖的方式促进HL-1细胞内Sirt1蛋白表达($P < 0.01$,图3B、C)。Sal-B处理延长了HR条件下HL-1细胞内Sirt1蛋白的半衰期($P < 0.05$,图3D、E)。IP-IB实验评估了Sal-B处理的HL-1细胞中Sirt1的泛素化水平,结果显示,Sal-B降低了HR条件下HL-1细胞内Sirt1的泛素化水平(图3F)。

2.4 敲降Sirt1逆转HR条件下HL-1细胞内Sal-B的促进线粒体功能稳态作用

在HR条件下,敲降Sirt1能够部分逆转Sal-B处理对小鼠HL-1心肌细胞ATP产生的作用($P < 0.05$,图4A);部分逆转Sal-B处理对小鼠HL-1心肌细胞线粒体超氧阴离子水平的作用($P < 0.01$,图4B、C);部分逆转

Sal-B处理对小鼠HL-1心肌细胞基础呼吸值、ATP产生量、最大呼吸值的作用($P < 0.01$, $P < 0.001$,图4D、E)。

2.5 小鼠心脏特异性Sirt1基因敲除抑制Sal-B对IR条件下心功能的保护作用

在IR条件下,Sirt1-cKO鼠相较于Sirt1^{fl/fl}鼠能够部分逆转Sal-B处理对小鼠心功能的保护作用,表现为EF和FS降低($P < 0.01$, $P < 0.01$,图5A~C),心肌组织紊乱程度加重(图5D)。

3 讨论

心肌缺血再灌注损伤是AMI治疗中不可避免的病理过程,其核心机制包括氧化应激、线粒体功能障碍以及细胞凋亡等^[1,4]。Sal-B作为一种天然多酚化合物,具有显著的抗氧化特性,能够有效清除自由基,抑制脂

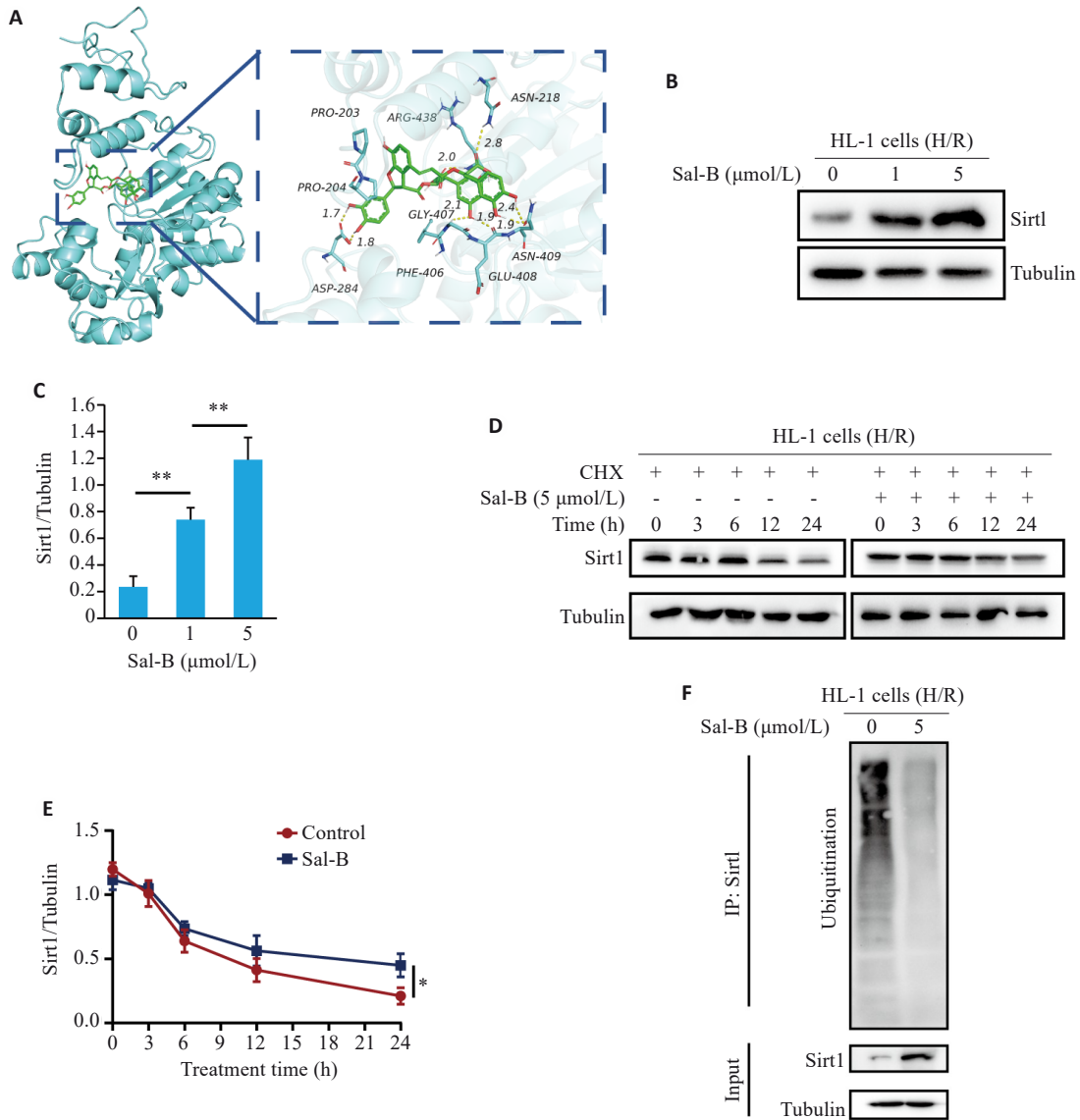


图3 Sal-B在HR条件下抑制HL-1细胞内Sirt1蛋白降解

Fig. 3 Sal-B inhibits degradation of Sirt1 protein in HL-1 cardiomyocytes with HR injury. **A**: Molecular docking diagram of Sal-B and Sirt1. **B, C**: Western blotting showing the effects of different concentrations of Sal-B on Sirt1 protein expression in the cells. **D, E**: Western blotting showing the effects of 5 μmol/L Sal-B treatment on Sirt1 protein expression at different time points under the same HR conditions with cycloheximide (CHX) treatment. **F**: Western blotting showing ubiquitination levels of Sirt1 protein in HL-1 cells treated with 5 μmol/L Sal-B before HR injury. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

质过氧化,从而减轻心肌细胞的氧化损伤^[8]。

本研究聚焦于Sal-B对心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其分子机制。研究表明,Sal-B能够显著改善心肌细胞的线粒体功能稳态,并通过抑制Sirt1蛋白降解,减轻IR诱导的心肌损伤。这一发现不仅为Sal-B作为心血管疾病治疗药物的应用提供了新的理论依据,也进一步揭示了Sirt1在心肌保护中的重要作用。

通过进一步的验证,证明Sirt1在Sal-B心肌保护中的作用,我们通过敲降Sirt1的相关实验发现,敲降Sirt1能够逆转Sal-B处理对小鼠HL-1心肌细胞线粒体功能稳态的保护作用。具体表现为敲降Sirt1能够逆转Sal-B

处理对小鼠HL-1心肌细胞ATP产生的有益作用;逆转Sal-B处理对小鼠HL-1心肌细胞线粒体超氧阴离子水平的抑制作用;以及逆转Sal-B处理对小鼠HL-1心肌细胞线粒体的基础呼吸值、ATP产生量、最大呼吸值的有益作用。这些结果表明,Sirt1作为Sal-B作用的靶标蛋白,调节了Sal-B对HR条件下HL-1心肌细胞内线粒体功能稳态的作用。在体内实验中,通过小鼠心脏特异性Sirt1基因敲除(Sirt1-cKO)模型进一步验证了Sal-B和Sirt1对小鼠心功能的作用。结果表明,在IR条件下,Sirt1-cKO鼠相较于Sirt1^{fl/fl}鼠能够逆转Sal-B处理对小鼠心功能的保护作用,表现为EF和FS降低,心肌组织

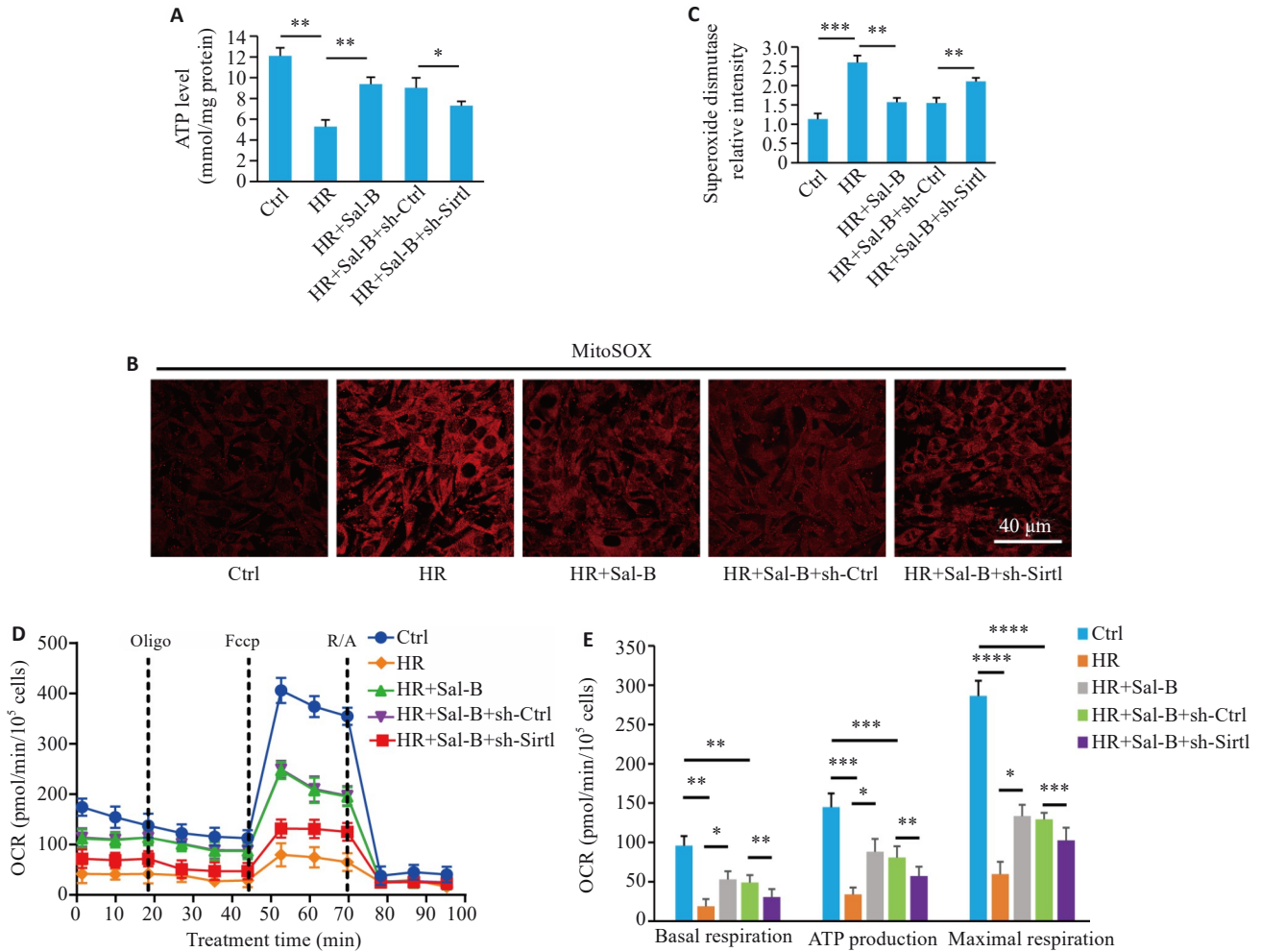


图4 敲降 Sirt1 部分逆转 HR 条件下 HL-1 细胞内 Sal-B 的促进线粒体功能稳态作用

Fig.4 Knockdown of Sirt1 partially reverses homeostatic effects of Sal-B on mitochondrial function in HL-1 cells under HR conditions. **A:** ATP production levels in different groups. **B, C:** Mito-SOX fluorescence staining for detecting superoxide levels in HL-1 cardiomyocytes in different groups. **D, E:** OCR detection in different groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

紊乱程度加重。这一结果进一步证实了 Sirt1 在 Sal-B 心肌保护中的关键作用。

Sirt1 作为一种依赖 NAD⁺ 的去乙酰化酶, 在调节线粒体功能和抗氧化应激方面发挥着关键作用^[30]。目前有报道证明 Sirt1 通过 PGC-1 α -DRP1/FIS1/MFF 通路阻止线粒体裂变, 从而减轻低压缺氧诱导的心功能不全^[31]; Sirt1/SIRT3-Mfn2-Parkin-PGC-1 α 通路在心肌缺血/再灌注损伤中对线粒体质量控制发挥重要作用^[32]; Sirt1 的激活促进心肌线粒体自噬, 减少心肌损伤相关蛋白以恢复脓毒症心肌功能和抑制炎症活性^[33]; Sirt1 通过促进线粒体生物能量学改善核纤层蛋白 A/C 缺陷诱导的扩张型心肌病心功能障碍^[34]。并且近些年的研究证实, Sirt1 介导的线粒体自噬在心肌 IR 损伤的不同阶段起着不同的作用^[35]。由此可见, Sirt1 在调节心肌线粒体功能方面扮演不可或缺的角色。

然而, 本研究仍存在一些不足之处。首先, 尽管本研

究在体外和体内实验中观察到 Sal-B 调节 Sirt1 进而发挥对心肌细胞的保护作用, 但其具体的分子机制尚未完全明确。例如, Sirt1 是否通过其他信号通路或调节某种蛋白质修饰发挥作用仍需进一步研究。最后, 尽管 Sal-B 在动物模型中表现出显著的保护作用, 但其在人体中的安全性和有效性尚未得到验证, 仍需通过大规模的临床试验来进一步评估。

综上所述, 本研究结果显示 Sal-B 通过抑制 Sirt1 蛋白降解, 维持线粒体功能稳态, 显著改善了心肌缺血再灌注损伤。然而, Sirt1 的具体作用机制仍需进一步研究。未来的研究可以进一步探索具体调控机制。此外, Sal-B 的安全性和有效性也需要在临床试验中进一步验证。本研究为 Sal-B 在心血管疾病治疗中的应用提供了新的视角, 并为未来的研究和临床应用奠定了基础。

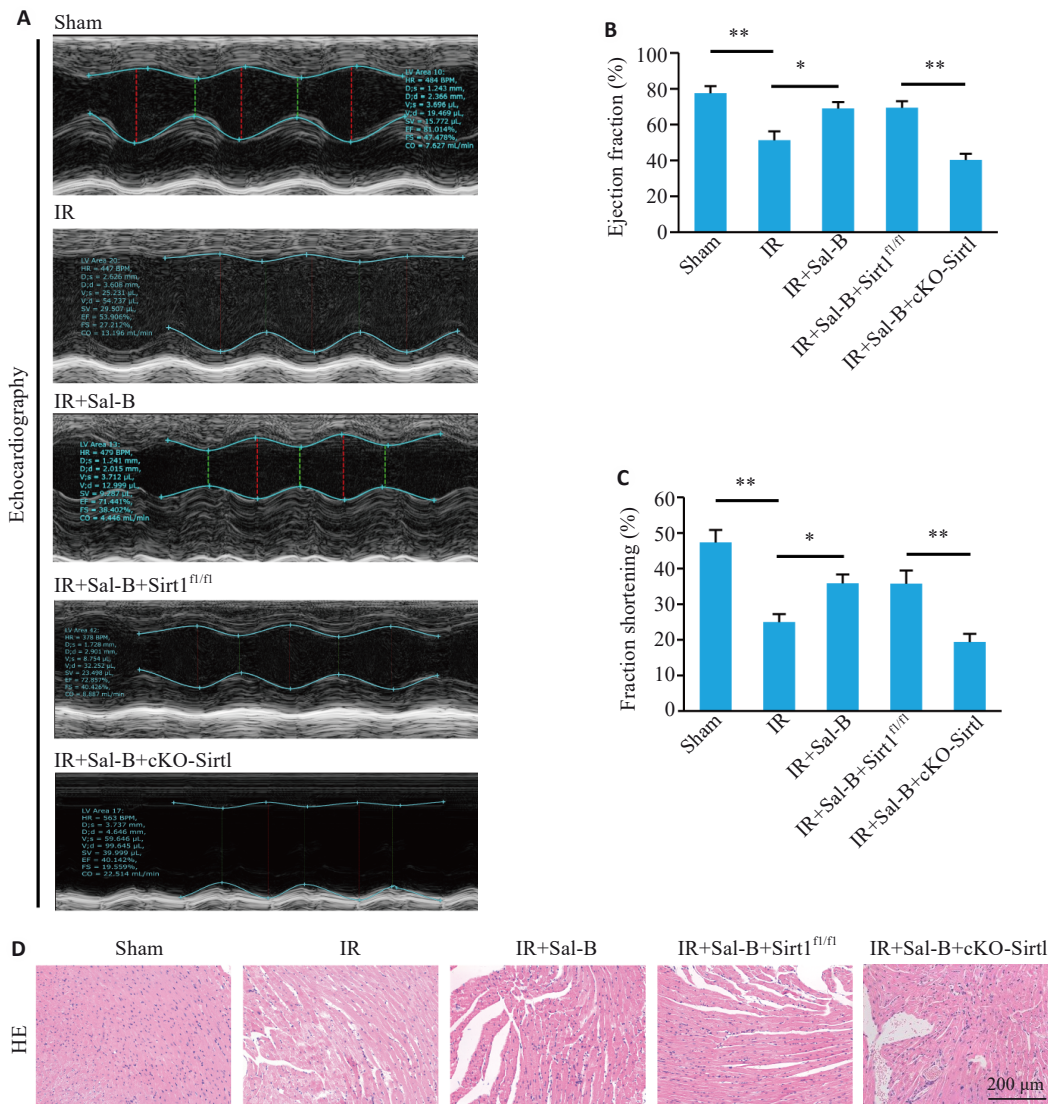


图5 小鼠心脏特异性Sirt1基因敲除部分抑制Sal-B对IR条件下心功能的保护作用

Fig5 Cardiac-specific Sirt1 gene knockout partially abrogates the protective effect of Sal-B on cardiac function in mice with myocardial I/R injury. A-C: Echocardiographic assessment of cardiac ejection fraction and fractional shortening in mice from different groups. D: HE staining of the myocardial tissue in mice from different groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

[1] Buja LM. Pathobiology of myocardial ischemia and reperfusion injury: models, modes, molecular mechanisms, modulation, and clinical applications[J]. *Cardiol Rev*, 2023, 31(5): 252-64.
 [2] Crossman DC. The pathophysiology of myocardial ischaemia[J]. *Heart*, 2004, 90(5): 576-80.
 [3] Heusch G. Myocardial ischemia: lack of coronary blood flow or myocardial oxygen supply/demand imbalance[J]? *Circ Res*, 2016, 119(2): 194-6.
 [4] Davidson SM, Ferdinandy P, Andreadou I, et al. Multitarget strategies to reduce myocardial ischemia/reperfusion injury: JACC review topic of the week[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73(1): 89-99.
 [5] Shi M, Huang FF, Deng CP, et al. Bioactivities, biosynthesis and biotechnological production of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59(6): 953-64.

[6] Hu SA, Yang ZH, Li L, et al. Salvianolic acid B alleviates liver injury by regulating lactate-mediated histone lactylation in macrophages[J]. *Molecules*, 2024, 29(1): 236.
 [7] Liu CL, Xie LX, Li M, et al. Salvianolic acid B inhibits hydrogen peroxide-induced endothelial cell apoptosis through regulating PI3K/Akt signaling[J]. *PLoS One*, 2007, 2(12): e1321.
 [8] Ho JH, Hong CY. Salvianolic acids: small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection[J]. *J Biomed Sci*, 2011, 18(1): 30.
 [9] Katary MA, Abdelsayed R, Alhashim A, et al. Salvianolic acid B slows the progression of breast cancer cell growth via enhancement of apoptosis and reduction of oxidative stress, inflammation, and angiogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22): 5653.
 [10] Pan CS, Lou LX, Huo YQ, et al. Salvianolic acid B and tanshinone IIA attenuate myocardial ischemia injury in mice by NO production through multiple pathways[J]. *Ther Adv Cardiovasc Dis*, 2011, 5(2): 99-111.

- [11] Hu Y, Wang XY, Li QJ, et al. Salvianolic acid B alleviates myocardial ischemic injury by promoting mitophagy and inhibiting activation of the NLRP3 inflammasome[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(6): 5199-208.
- [12] Yang YH, Sun ZY, Sun XN, et al. Protective effect of salvianolic acid B against myocardial ischemia/reperfusion injury: preclinical systematic evaluation and meta-analysis[J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1452545.
- [13] Mao QP, Shao CY, Zhou HF, et al. Exploring the mechanism of salvianolic acid B against myocardial ischemia-reperfusion injury based on network pharmacology[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2024, 17(3): 309.
- [14] Zhang Q, Liu J, Duan H, et al. Activation of Nrf2/HO-1 signaling: an important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis *via* the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress[J]. *J Adv Res*, 2021, 34: 43-63.
- [15] Joe Y, Zheng M, Kim HJ, et al. Salvianolic acid B exerts vasoprotective effects through the modulation of heme oxygenase-1 and arginase activities[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 341(3): 850-8.
- [16] Chen RS, Zheng AR, Wang YJ, et al. Salvianolic acid B improves mitochondrial dysfunction of septic cardiomyopathy *via* enhancing ATF5-mediated mitochondrial unfolded protein response[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2024, 491: 117072.
- [17] Michishita E, Park JY, Burneskis JM, et al. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins[J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(10): 4623-35.
- [18] Tanno M, Sakamoto J, Miura T, et al. Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(9): 6823-32.
- [19] Vaquero A, Scher MB, Lee DH, et al. SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(10): 1256-61.
- [20] Schwer B, North BJ, Frye RA, et al. The human silent information regulator (Sir)₂ homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase[J]. *J Cell Biol*, 2002, 158(4): 647-57.
- [21] Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, et al. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells[J]. *Cell*, 2006, 126(5): 941-54.
- [22] Nakagawa T, Lomb DJ, Haigis MC, et al. SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle[J]. *Cell*, 2009, 137(3): 560-70.
- [23] Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6[J]. *Cell*, 2006, 124(2): 315-29.
- [24] Kiran S, Chatterjee N, Singh S, et al. Intracellular distribution of human SIRT7 and mapping of the nuclear/nucleolar localization signal[J]. *FEBS J*, 2013, 280(14): 3451-66.
- [25] Peng F, Liao MR, Jin WK, et al. 2-APQC, a small-molecule activator of Sirtuin-3 (SIRT3), alleviates myocardial hypertrophy and fibrosis by regulating mitochondrial homeostasis[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 133.
- [26] Mao JX, Wang D, Wang D, et al. SIRT5-related desuccinylation modification of AIFM1 protects against compression-induced intervertebral disc degeneration by regulating mitochondrial homeostasis[J]. *Exp Mol Med*, 2023, 55(1): 253-68.
- [27] Teng P, Cui KS, Yao SR, et al. SIRT5-mediated ME2 desuccinylation promotes cancer growth by enhancing mitochondrial respiration[J]. *Cell Death Differ*, 2024, 31(1): 65-77.
- [28] Wei XH, Chen J, Wu XF, et al. Salvianolic acid B alleviated myocardial ischemia-reperfusion injury *via* modulating SIRT3-mediated crosstalk between mitochondrial ROS and NLRP3[J]. *Phytomedicine*, 2025, 136: 156260.
- [29] Niu WH, Wu F, Cao WY, et al. Salvianolic acid B alleviates limb ischemia in mice *via* promoting SIRT1/PI3K/AKT pathway-mediated M2 macrophage polarization[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 1112394.
- [30] Tang BL. Sirt1 and the mitochondria[J]. *Mol Cells*, 2016, 39(2): 87-95.
- [31] Xu HB, Song XN, Zhang XR, et al. SIRT1 regulates mitochondrial fission to alleviate high altitude hypoxia induced cardiac dysfunction in rats *via* the PGC-1 α -DRP1/FIS1/MFF pathway[J]. *Apoptosis*, 2024, 29(9/10): 1663-78.
- [32] Zheng MS, Bai YL, Sun XY, et al. Resveratrol reestablishes mitochondrial quality control in myocardial ischemia/reperfusion injury through Sirt1/Sirt3-Mfn2-parkin-PGC-1 α pathway[J]. *Molecules*, 2022, 27(17): 5545.
- [33] Tang W, Guo RN, Hu CY, et al. BMAL1 alleviates myocardial damage in sepsis by activating SIRT1 signaling and promoting mitochondrial autophagy[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 133: 112111.
- [34] Du ZH, Zhou YT, Li QH, et al. SIRT1 ameliorates lamin A/C deficiency-induced cardiac dysfunction by promoting mitochondrial bioenergetics[J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2024, 9(10): 1211-30.
- [35] Ding XQ, Zhu CY, Wang WH, et al. SIRT1 is a regulator of autophagy: Implications for the progression and treatment of myocardial ischemia-reperfusion[J]. *Pharmacol Res*, 2024, 199: 106957.

(编辑:余诗诗)