

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2024.09.018

论著·基础

水蛭素对缺氧诱导心脏微血管内皮细胞间质转分化的作用及机制研究

刘依,尹玉洁,韩宁馨,贾振华



基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81973692)

作者单位: 050017 石家庄,河北医科大学研究生学院(刘依、韩宁馨、贾振华);石家庄,络病研究与创新中药国家重点实验室(尹玉洁、贾振华);石家庄,国家中医药管理局重点研究室(心脑血管络病)(尹玉洁、贾振华);石家庄,河北省中西医结合医药研究院(尹玉洁、贾振华)

通信作者: 贾振华, E-mail: jzhjiazhenhua@163.com

【摘要】目的 探讨络病药物水蛭素对缺氧诱导的人心脏微血管内皮细胞(HCMECs)间质转分化(EndMT)的作用及可能机制。**方法** 取常规培养的 HCMECs 细胞,随机分为对照组、缺氧组、水蛭素组(包括 0、20、40、80、100 $\mu\text{g/ml}$ 5 个浓度)。对照组常规培养不做任何处理,缺氧组置入低氧培养箱 72 h,水蛭素组预加入 Hirudin 工作液,4 h 后置入低氧培养箱 72 h。MTS 比色法检测 HCMECs 增殖能力;倒置显微镜观察 HCMECs 形态;免疫荧光鉴定 HCMECs 间质转分化情况,Western-blot 检测内皮间质转分化相关蛋白:包括内皮细胞标记血小板-内皮细胞黏附分子(PECAM-1/CD31)、血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin)、间质细胞标记 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、成纤维细胞特异性蛋白-1(FSP-1),以及低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)、转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、Smad 同源物 2/3(Smad2/3)、锌指转录因子(snail)等相关信号通路的蛋白表达。**结果** MTS 法检测显示,缺氧显著抑制细胞活性($P < 0.01$),水蛭素在 20 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ 浓度范围内可提高细胞活性,且呈现浓度依赖性,当浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 时细胞活性最强($P < 0.01$)。各组细胞培养 72 h 后,倒置显微镜下观察发现:对照组细胞呈铺路石样或鹅卵石状结构,缺氧组细胞由鹅卵石状结构变为分散的长梭形,接近成纤维细胞形态,水蛭素组长梭形细胞形态明显改善,细胞恢复鹅卵石样。Western-blot 与免疫荧光结果显示:与对照组比较,缺氧组 CD31、VE-cadherin 蛋白水平降低($P < 0.01$),且 vWF 表达减少, α -SMA、FSP-1 蛋白水平升高($P < 0.01$),且 vimentin 表达增强;与缺氧组比较,水蛭素明显增加 CD31、VE-cadherin 蛋白表达($P < 0.01$),并增强 vWF 表达,下调 α -SMA、FSP-1 蛋白表达($P < 0.01$),并减弱 vimentin 表达;与对照组相比,缺氧组信号通路 HIF-1 α 、TGF- β_1 、p-smad2/3、snail 蛋白表达均升高($P < 0.01$),与缺氧组比较,水蛭素下调 HIF-1 α 、TGF- β_1 、p-smad2/3、snail 蛋白表达($P < 0.01$)。**结论** 水蛭素可以改善缺氧诱导的 HCMECs 细胞发生 EndMT,其机制可能与调控 HIF- α /TGF- β_1 /smad/snail 通路有关。

【关键词】 水蛭素;缺氧;人心脏微血管内皮细胞;内皮间质转分化;信号通路;作用机制**【中图分类号】** R285.5**【文献标识码】** A

Effect and mechanism of hirudin on hypoxia induced interstitial transdifferentiation of cardiac microvascular endothelial cells Liu Yi*, Yin Yujie, Han Ningxin, Jia Zhenhua. * Graduate School of Hebei Medical University, Hebei Province, Shijiazhuang 050017, China

Funding program: National Natural Science Foundation of China (81973692)

Corresponding author: Jia Zhenhua, E-mail: jzhjiazhenhua@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect and possible mechanism of the drug hirudin on hypoxia induced human microvascular endothelial cells (HCMECs) mesenchymal transition (EndMT). **Methods** HCMECs cells cultured conventionally were randomly divided into control group, Hypoxia group and Hirudin group. The control group was routinely cultured without any treatment. The hypoxic group was placed in a hypoxic incubator for 72h, and the Hirudin group was pre-added with Hirudin working solution, and then placed in a hypoxic incubator for 72h after 4h. The proliferation capacity of HCMECs was detected by MTS colorimetry. The morphology of HCMECs was observed by inverted microscope. Immunofluorescence identification of HCMECs interstitial trans differentiation, Western Blot detection of endothelial interstitial trans differentiation related proteins: Endothelial cells labeled platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1/CD31)

and vascular endothelial cadherin (VE-cadherin), and stromal cells labeled α smooth muscle actin (α -SMA) and fibroblast specific protein 1 (FSP-1). And the expression of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), transforming growth factor β_1 (TGF- β_1), Smad homology 2/3 (Smad2/3), Zinc finger transcription factor (snail) related signaling pathways. **Results** MTS showed that hypoxia significantly inhibited cell activity ($P < 0.01$), and the cell activity was strongest when hirudin concentration was 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($P < 0.01$). After 72h of cell culture in each group, the cells in the control group showed a pave-like or pebble-like structure under an inverted microscope, while the cells in the hypoxic group changed from pebble-like structure to dispersed long spindle shape, close to the shape of fibroblasts. Western Blot and immunofluorescence results showed: Compared with the normal group, the protein levels of CD31 and VE cadherin in hypoxia group were decreased ($P < 0.01$), and the expression of vWF was decreased. α -SMA and FSP-1 protein levels increased ($P < 0.01$) and vimentin expression was enhanced. Compared with hypoxia group, hirudin significantly increased the expression of CD31 and VE-cadherin ($P < 0.01$), enhanced the expression of vWF, and down-regulated α -SMA. The expression of FSP-1 protein ($P < 0.01$) decreased the expression of vimentin. Compared with the control group, hypoxic group of TGF- β_1 , HIF-1 α , p smad2/3, snail protein expression ($P < 0.01$) were higher, than to the hypoxia group, Cut HIF-1 α , hirudin TGF- β_1 , p smad2/3, snail protein expression ($P < 0.01$). **Conclusion** Hirudin can improve hypoxia induced EndMT in HCMECs cells, and the mechanism may be related to HIF- α /TGF- β_1 /smad/snail pathway.

【Key words】 Hirudin; Hypoxia; Human heart microvascular endothelial cells; Endothelial mesenchymal transdifferentiation; Signal pathway; Mechanism

心肌纤维化 (myocardial fibrosis, MF) 是心脏在缺血缺氧、炎症反应、代谢紊乱、心脏负荷过度等损伤下形成的病理变化^[1], 以心脏细胞外基质过量沉积、心室壁硬度增加、心室顺应性降低、心肌收缩或舒张功能障碍为主要特征, 与心功能不全的严重程度及不良预后密切相关^[2]。研究发现, 心肌梗死小鼠内皮细胞呈现 CD31⁺ PDGFR β ⁺ 特征, 内皮细胞标志物减少且成纤维细胞标志物增加^[3], 证实内皮间质转分化 (endothelial-mesenchymal transition, EndMT) 为肌成纤维细胞重要来源, 并参与心肌梗死后心肌纤维化。因此, 有效干预 EndMT 是预防和治疗心肌纤维化及心力衰竭另一重要举措。

虫类化瘀通络药是络病学说指导治疗微血管病变的代表, 清代叶天士曾高度评价虫类化瘀通络药物“凡病久入络, 血瘀凝滞, 草木之药不能深入细剔络内之邪者, 皆可选用虫类通络”, 指出其“追拔沉混气血之邪”的独特疗效, 不同于丹参、赤芍等草木类活血化瘀药物。现代研究证实虫类药水蛭主要活性成分水蛭素 (hirudin) 具有抗凝、抗血小板活化、抗氧化应激、抑制炎症反应、调节脂代谢、保护血管内皮细胞及抑制心肌纤维化的作用^[4-9]。但其是否通过保护内皮细胞发挥调控 EndMT 的作用尚未可知, 本研究以缺氧诱导的人心脏微血管内皮细胞 (HCMECs) 为模型, 探讨水蛭素对缺氧诱导 HCMECs 发生 EndMT 的干预作用及其相关潜在机制, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1) 细胞: HCMECs, 购于上海中乔新舟生

物科技有限公司。(2) 药品及试剂: 水蛭素浓缩液购于上海源叶生物科技有限公司 (纯度 $\geq 95\%$, 批号 S31625); BCA 蛋白浓度检测试剂盒购于上海碧云天生物公司; 内皮细胞专用培养基 (ECSM, 含 25 ml 胎牛血清、5 ml 内皮细胞生长因子、5 ml 青霉素/链霉素溶液), 购于上海中乔新舟生物科技有限公司; 鼠抗人 beta-Actin 购于武汉赛维尔生物科技有限公司; 兔抗人 vimentin 和鼠抗人 CD31 (PECAM-1) 购于美国 CST 公司; 兔抗人血管内皮钙黏蛋白 (VE-cadherin)、成纤维细胞特异性蛋白-1 (FSP-1)、鼠抗人低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)、兔抗人转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、兔抗人 Smad 同源物 2/3 (smad2/3)、兔抗人锌指转录因子 (snail) 均购于美国 abcam 公司; 兔抗人 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、鼠抗人 vWF 购于美国 Proteintech 公司; 兔抗人 p-smad2/3 购于北京博奥森公司; 山羊抗兔 IgG H&L、山羊抗鼠 IgG H&L 均购于美国 abcam 公司; 山羊抗兔 IgG H&L (DyLight[®] 488)、山羊抗鼠 IgG H&L (DyLight[®] 594) 均购于美国 Proteintech 公司。(3) 仪器设备: Forma371 细胞培养箱、CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司); 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司); Odyssey 双色红外线成像仪 (美国 Li-COR 公司); 激光共聚焦显微镜 (德国 ZEISS 公司)。

1.2 细胞培养及分组处理 2023 年 1—6 月于河北以岭医药研究院进行实验。HCMECs 细胞接种于含 5% 胎牛血清的完全培养基中培养。显微镜下观察细胞生长至 80% 左右予以传代, 本实验用 6~7 代。取对数生长期的 HCMECs 细胞接种于 6 孔板中并分为

对照组、缺氧组及水蛭素组:对照组给予含 5% 胎牛血清的完全培养基培养,不做其余处理;缺氧组将含 5% 胎牛血清的完全培养基更换为无血清培养基,水蛭素组将含 5% 胎牛血清的完全培养基更换为含 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 水蛭素的无血清培养基,后 2 组均于 4 h 后置入 1% O_2 、5% CO_2 、95% N_2 、37 $^\circ\text{C}$ 的低氧培养箱中培养 72 h^[10]。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 MTS 法检测水蛭素对缺氧诱导 HCMECs 细胞生存活性影响:使用无血清培养基将水蛭素配制成 0、20、40、80、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度工作液,加入 96 孔细胞培养板,置于低氧培养箱中培养 72 h,MTS 法检测不同浓度水蛭素对缺氧诱导 HCMECs 细胞活性的影响,并筛选药物最佳作用浓度开展后续实验。

1.3.2 免疫荧光双染法鉴定 EndMT:将对数生长期的 HCMECs 以密度为 1×10^5 个/ml 接种于 3.5 cm 玻璃底培养皿中,待细胞贴壁后(24 h)给予各组细胞相应处理并继续培养 72 h。取出培养皿后,DPBS 清洗 1 次,4% 多聚甲醛固定 15 min,DPBS 清洗后 0.25% TritonX-100 通透 5 min,DPBS 清洗,山羊血清室温封闭 1 h,加入鼠抗人 vWF(1:100)、兔抗人 vimentin(1:100)一抗共染,4 $^\circ\text{C}$ 过夜。DPBS 清洗后加入山羊抗鼠 IgG H&L (DyLight[®] 594) 和山羊抗兔 IgG H&L (DyLight[®] 488) 荧光二抗混合物(1:500)避光室温孵育 1 h。避光条件下,DAPI 核染 5 min,后用 ZEISS 激光共聚焦扫描显微镜进行检测。

1.3.3 Western-blot 检测 EndMT 相关蛋白及相关通路蛋白表达水平:各组细胞进行相应处理 72 h 后提取相应蛋白。BCA 蛋白定量试剂盒测定各组蛋白浓度并制样。各组取 30 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,后将蛋白转移至 PVDF 膜上。封闭液室温封闭 1 h,后分别加入鼠抗人 CD31、 β -actin,兔抗人 VE-cadherin、 α -SMA、FSP-1、HIF-1 α 、TGF- β_1 、p-smad2/3、smad2/3、snail、Tubulin 一抗(稀释比例均为 1:1 000),于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱过夜孵育。1 \times TBST 洗 3 次(10 min/次)后加入山羊抗兔 IgG H&L 与山羊抗鼠 IgG H&L 二抗(稀释比例 1:10 000)37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 h。Odyssey 双色红外激光成像仪扫描图像,以 β -actin 和 Tubulin 作为内参,分析目的蛋白条带并进行统计分析。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 27.0 统计软件进行分析。符合正态分布计量数据以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐组间两两比较采用 LSD-*t* 检验;方差不齐组间两两比较采用 Dunnett's T3 法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学

意义。

2 结果

2.1 水蛭素对缺氧诱导的 HCMECs 活性的影响

MTS 法检测水蛭素对缺氧诱导 HCMECs 细胞活性的影响。结果显示,缺氧组 HCMECs 细胞活性显著低于对照组($P < 0.01$);与缺氧组比较,水蛭素在 20 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度范围内可增加细胞活性,且呈现浓度依赖性,当水蛭素浓度在 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时显著增加细胞活性(分别为 60.23% 和 64.28%, $P < 0.01$),提示水蛭素对缺氧诱导的 HCMECs 损伤具有保护作用,见表 1。因此选择 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 水蛭素用于后续体外实验研究。

表 1 水蛭素对缺氧诱导的 HCMECs 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effects of hirudin on hypoxia induced HCMECs cell activity

组别	<i>n</i>	剂量($\mu\text{g}/\text{ml}$)	细胞活性
对照组	6	-	100.00 \pm 0.00
缺氧组	6	-	54.68 \pm 3.67 ^a
水蛭素组	6	20	55.26 \pm 1.76
	6	40	57.28 \pm 3.92
	6	80	60.23 \pm 3.07 ^b
	6	100	64.28 \pm 4.42 ^b

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与缺氧组比较,^b $P < 0.01$ 。

2.2 形态学观察水蛭素对缺氧诱导的 HCMECs 的影响 光学显微镜观察 HCMECs 细胞形态变化,对照组呈鹅卵石样紧密排列,呈典型内皮细胞样形态;缺氧组呈长梭形、不规则多边形、大小不一,与肌成纤维细胞类似;水蛭素干预后,细胞形态明显好转,长梭形细胞明显减少。表明水蛭素可逆转缺氧诱导的 HCMECs 形态变化,见图 1。

2.3 水蛭素对缺氧诱导的 HCMECs 细胞 EndMT 的影响 采用免疫荧光双染法检测内皮细胞标志物 vWF 与间质细胞标志物 vimentin 表达,结果发现,缺氧组 vWF 表达明显减少,vimentin 表达明显增加;水蛭素组 vWF 表达明显增加,vimentin 表达明显减少,证实水蛭素能够改善缺氧诱导 HCMECs 细胞发生 EndMT,见图 2。

2.4 水蛭素对内皮细胞标志物 CD31、VE-cadherin 及间质细胞标志物 α -SMA、FSP-1 蛋白表达的影响 Western-blot 法检测发现,与对照组比较,缺氧组内皮细胞标志物 CD31、VE-cadherin 蛋白表达显著降低($P < 0.01$),间质细胞标志物 α -SMA、FSP-1 蛋白表达显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与缺氧组相比,水蛭素组 CD31、VE-cadherin 蛋白表达显著升高($P < 0.01$), α -SMA、FSP-1 蛋白表达显著降低($P < 0.01$),见图 3、表 2。

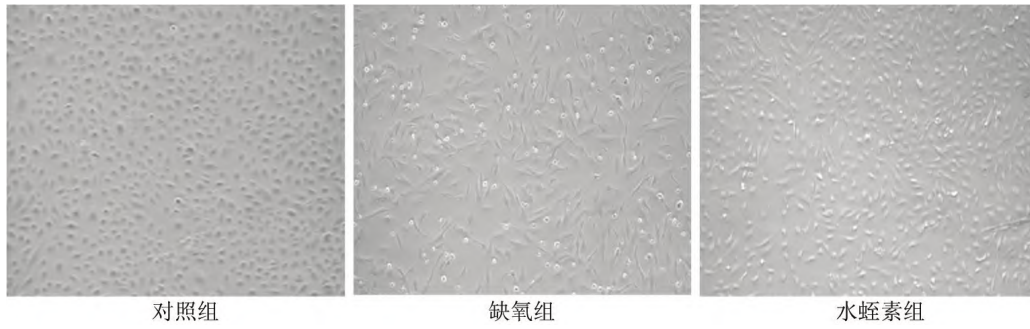
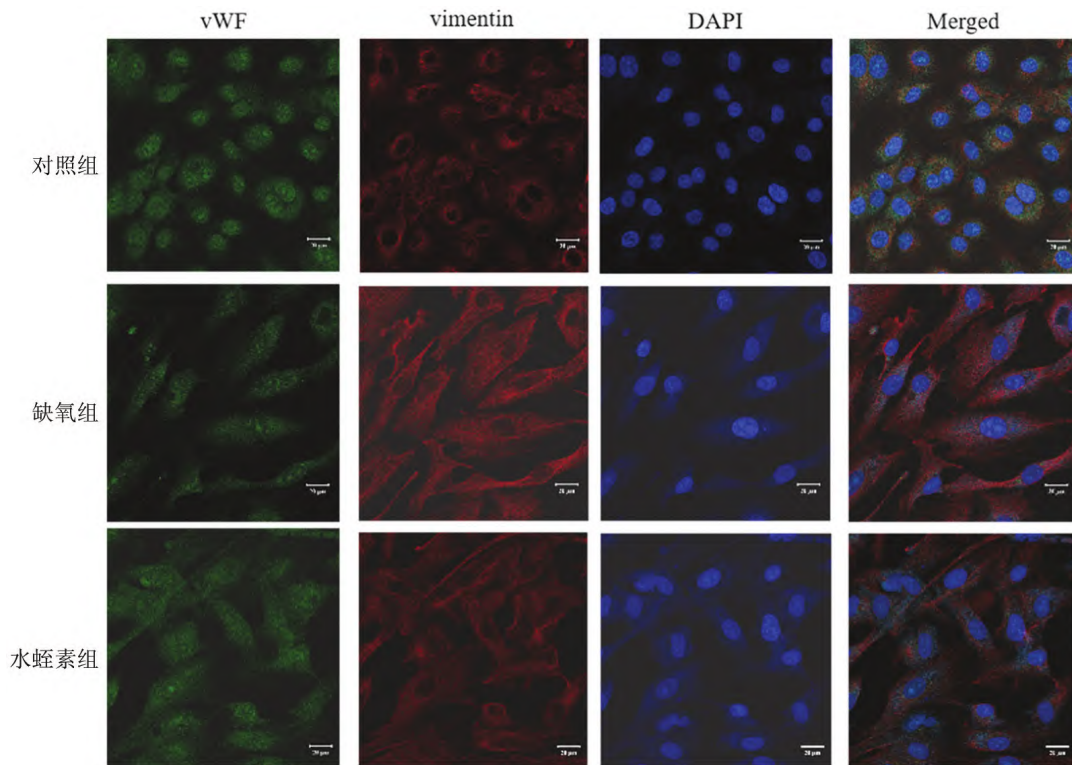


图 1 水蛭素对缺氧诱导的 HCMECs 细胞形态变化的影响

Fig. 1 The effect of hirudin on the morphological changes of HCMECs cells induced by hypoxia



注:绿色代表 vWF 阳性表达细胞;红色代表 vimentin 阳性表达细胞;蓝色代表 DAPI 染色的细胞核。

图 2 水蛭素对缺氧诱导的 EndMT 中 vWF 和 vimentin 表达的影响

Fig. 2 The effect of hirudin on the expression of vWF and vimentin in hypoxia induced EndMT

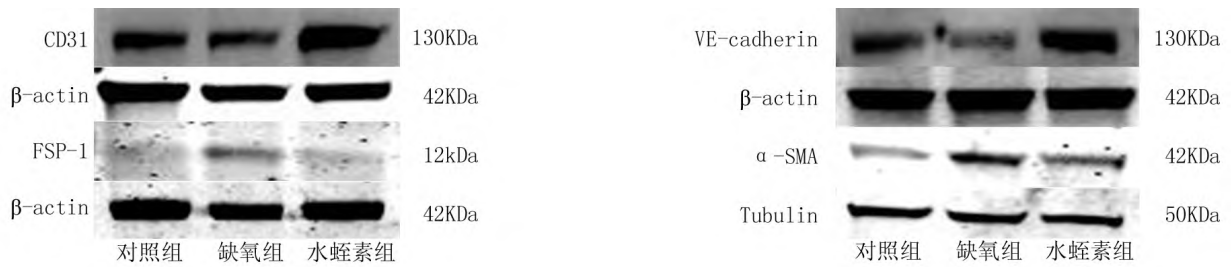


图 3 水蛭素对缺氧诱导的 CD31、VE-cadherin、FSP-1 和 α -SMA 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of hirudin on the expression of CD31, VE-cadherin, FSP-1, and α -SMA proteins induced by hypoxia

2.5 水蛭素对 HIF-1 α /TGF- β_1 /smad/snail 信号通路的影响 Western-blot 法检测水蛭素对 HIF-1 α /TGF- β_1 /smad/snail 通路相关蛋白表达的影响,与对照组相比,缺氧组 HCMECs 细胞 HIF-1 α 、TGF- β_1 、p-smad2/3、smad2/3、snail 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与缺氧组相比,水蛭素组 HIF-1 α 、p-smad2/3、smad2/3、TGF- β_1 、snail 相关蛋白表达显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。结果表明:缺氧成功激活 HIF-1 α /TGF- β_1 /smad/snail 信号通路,水蛭素可抑制 HIF-1 α /TGF- β_1 /smad/snail 信号通路相关蛋白表达,见图 4、表 3。

3 讨论

EndMT 被认为是包括 MF 在内的多种心血管疾病重要的病理生理环节^[11]。近年来,EndMT 对 MF 的作用受到越来越多的关注。研究发现,在心脏高血压负

荷小鼠模型中,大约 30% 成纤维细胞来源于内皮细胞,同时 EndMT 明显加重了心脏高压负荷小鼠的病理性心肌纤维化病程。以往关于心脏 EndMT 的研究主要集中在体内和体外的人冠状动脉内皮细胞 (HCAECs) 或人脐静脉内皮细胞 (HUVECs),而对 HCMECs 研究较少^[12-13]。缺血性心脏疾病、糖尿病性心肌病和晚期心力衰竭患者中易出现 HCMECs 功能障碍,心肌供血减少,使心脏处于低氧的微环境,血管内皮细胞从血管分离,迁移到血管周围间隙或心脏间质组织,丢失内皮细胞标志物 VE-cadherin、CD-31、vWF 等,上调间质细胞标志物 α -SMA、Vimentin、FSP-1 等^[14],并获得间充质表型,增殖产生大量细胞外间质 (ECM) 沉积在血管周围和间质组织,导致心脏组织结构 and 功能障碍,供血进一步减少,恶化缺氧环境。研究发现,缺氧诱导 TGF- β 自分泌机制上调转录因子 snail,

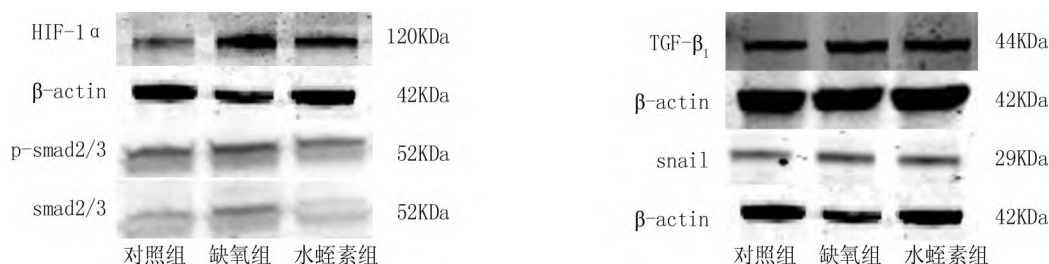


图 4 水蛭素对 HIF-1 α /TGF- β_1 /smad/snail 信号通路相关蛋白表达的影响

Fig. 4 The effect of hirudin on the expression of proteins related to the HIF-1 α /TGF- β_1 /smad/snail signaling pathway

表 2 水蛭素对缺氧诱导的 CD31、VE-cadherin、FSP-1 和 α -SMA 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effects of hirudin on the expression of CD31, VE cadherin, FSP-1, and α - SMA proteins induced by hypoxia

组 别	n	CD31	VE-cadherin	α -SMA	FSP-1
对照组	3	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
缺氧组	3	0.69 \pm 0.11 ^a	0.44 \pm 0.15 ^a	1.43 \pm 0.10 ^a	2.66 \pm 1.05 ^b
水蛭素组	3	1.93 \pm 0.24 ^c	0.76 \pm 0.40 ^c	0.92 \pm 0.18 ^c	0.72 \pm 0.25 ^c
F 值		54.801	21.183	15.127	22.454
P 值		<0.001	0.002	0.005	0.002

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与缺氧组比较,^c $P < 0.01$ 。

表 3 水蛭素对 HIF-1 α /TGF- β_1 /smad/snail 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effects of hirudin on the expression of proteins related to the HIF-1 α /TGF- β_1 /smad/snail signaling pathway

组 别	n	HIF-1 α	TGF- β_1	p-smad2/3	snail
对照组	3	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
缺氧组	3	4.51 \pm 0.87 ^a	1.29 \pm 0.07 ^a	1.70 \pm 0.14 ^b	2.78 \pm 1.03 ^b
水蛭素组	3	1.48 \pm 0.18 ^c	0.87 \pm 0.09 ^d	1.14 \pm 0.12 ^d	1.33 \pm 0.21 ^d
F 值		41.076	32.761	23.975	131.043
P 值		<0.001	0.001	0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与缺氧组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$ 。

进而诱导 EndMT^[15]。因此,本实验构建了体外缺氧 72 h 诱导的 EndMT 模型,在缺氧条件下,HCMECs 的生存活性显著下降,间质细胞标志物 α -SMA、FSP-1、vimentin 表达上调,内皮细胞标志物 CD31、VE-cadherin、vWF 表达显著减少,表明缺氧严重损伤了 HCMECs,诱导了 EndMT。

HIF-1 α 是缺氧条件下细胞生存所必须的转录因子,研究发现缺氧通过 HIF-1 α 激活调节 EndMT 的转录因子 snail 刺激人冠状动脉内皮细胞 EndMT^[12]。HIF-1 α 在哺乳动物和细胞对缺氧的反应中起着关键作用^[16],也是诱导 EndMT 的关键介质。TGF- β 及其信号通路的激活是导致纤维化的主要因素,也是内皮细胞 EndMT 的公认信号通路^[8]。TGF- β /smad 通过与 HIF-1 α 相互作用,形成 smad-HIF-1 α 复合物,改变 TGF- β 的功能^[17]。在人冠状动脉内皮细胞中,HIF-1 α 和 TGF β RI/smard2/3 通过转录因子 snail 协同调节缺氧诱导的 EndMT^[18]。此外,HIF-1 α 激活经典的 TGF β RI/smard2/3 信号,最终促进辐射诱导的 EndMT^[19]。然而,HIF-1 α /TGF- β ₁/smad/snail 信号在低氧诱导的 EndMT 中的作用尚未完全阐明。本实验中,缺氧处理的 HCMECs 中 HIF-1 α 和 TGF- β ₁ 显著上调,TGF- β ₁ 下游通路 p-smad2/3、smad2/3、snail 均显著上调。因此,缺氧激活了 HIF-1 α /TGF- β ₁/smad/snail 信号通路。

络络学说提出气虚血瘀是 AMI 基本病机^[20],但对 AMI 后 MF 病机尚缺乏深入阐述。《灵枢·百病始生》指出“虚邪之中人也,始于皮肤,……留而不去,传舍于肠胃之间,募原之间,留著于脉,稽留不去,息而成积,或著孙脉,或著络脉”,指出病邪不仅导致了络络自身病变,又在此基础上继发了脏腑组织病变,导致“络息成积”。因此提出“气虚血瘀,络塞积成”是 AMI 后 MF 重要病机特点^[21-22]。这一过程与缺血缺氧损伤心脏微血管内皮细胞,进而通过 EndMT 转化为具有间充质表型细胞,发挥成纤维细胞作用,受损心肌区域过度沉积 ECM,继而发生 MF、脏器扩大等病理过程高度吻合。因此,EndMT 既是 AMI 后 MF 的关键病理环节,又是“孙络—微血管”损伤后“络塞积成”的促发因素。

络病理论认为,营卫不通血凝不流,血脉相传壅塞不通,败血凝痰,混处经络,病根深伏,属沉痾痼疾,非丹参、赤芍等一般草木活血化瘀药所能取效。必借虫类蠕动之力,啖血之性,走窜攻冲,搜剔络中混处之瘀浊。张仲景应用“飞者升,走者降,能搜剔血络,攻积除坚,用于络病痰瘀交结之痼疾”的虫类药物搜剔化瘀

通络,清代叶天士继承并发扬了张仲景虫药之治“结聚血分成形,仲景有缓攻通络之法可宗”。水蛭作为虫类药的代表之一,以其破血逐瘀、搜风剔络之功效,在多种纤维化疾病的防治过程中发挥了独特的优势作用^[23-24]。水蛭素为水蛭的主要活性成分及药用成分,发挥了水蛭大部分药理作用,具有抗凝、抗血栓、抗血小板活化及调节脂质代谢、抑制炎症反应和氧化应激、保护内皮细胞及抗动脉粥样硬化等作用^[25]。有研究证实,水蛭素抑制单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠肾组织及 TGF- β 诱导的炎症反应、调节 EMT 相关蛋白、减少肾小管上皮细胞凋亡从而抑制肾组织和肾小管上皮细胞纤维化^[26]。课题组前期研究发现,通心络作为络络学说指导防治血管病变的代表药物,有效抑制 AMI 后 EndMT 及心肌纤维化^[27-28],色谱特征指纹图谱显示水蛭素为通心络的重要化学成分^[29],可能在抑制 EndMT、减轻心肌纤维化中发挥重要作用。本实验证实,水蛭素能够增强缺氧条件下内皮细胞 CD31、VE-cadherin 蛋白表达,抑制间质细胞 α -SMA、FSP-1 蛋白表达,从而抑制 EndMT,保护心脏内皮细胞。综上所述,水蛭素对 HCMECs 具有保护作用,有效改善了缺氧诱导的 EndMT,其机制与调控 HIF-1 α /TGF- β ₁/smad/snail 通路有关,为水蛭素作为治疗心肌纤维化的潜在药物提供了有力证据。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

刘依:实施研究过程,文章撰写;尹玉洁:资料搜集整理,论文审核;韩宁馨:数据收集、分析,协助文章审阅;贾振华:课题设计,论文审核

参考文献

- [1] Tallquist MD, Cardiac fibroblast diversity [J]. *Annu Rev Physiol*, 2020, 82:63-78. DOI:10.1146/annurev-physiol-021119-034527.
- [2] 李丽,吴立玲.心脏间质细胞在心肌纤维化中的作用机制及研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(8):652-660. DOI:10.3969/j.issn.1007-3949.2021.08.002.
- [3] Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis [J]. *Nat Med*, 2007, 3(8):952-961. DOI:10.1038/nm1613.
- [4] Trabold K, Makhoul S, Gambaryan S, et al. The direct thrombin inhibitors dabigatran and lepirudin inhibit GPIIb/IIIa-mediated platelet aggregation [J]. *Thromb Haemost*, 2019, 119:916-929. DOI:10.1055/s-0039-1685139.
- [5] Chapman K, Favalaro EJ. Time dependent reduction in platelet aggregation using the multiplate analyser and hirudin blood due to platelet clumping [J]. *Platelets*, 2018, 29:305-308. DOI:10.1080/09537104.2017.1384540.
- [6] Hao W, Zhang HY, Chen J, et al. Hirudin protects against isoproterenol-induced myocardial infarction by alleviating oxidative via an Nrf2

- dependent manner [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 162: 425-435. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.06.097.
- [7] Han JR, Pang XX, Zhang YG, et al. Hirudin protects against kidney damage in streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats by inhibiting inflammation via P38 MAPK/NF- κ B pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 3223-3234. DOI:10.2147/DDDT.S257613.
- [8] 王敏, 崔连群, 王晓军, 等. 水蛭素对凝血酶诱导血管内皮细胞与中性粒细胞表达黏附分子的影响 [J]. *中国新药杂志*, 2005, 14 (8): 989-991. DOI:10.3321/j.issn:1003-3734.2005.08.013.
- [9] Yu CX, Wang WM, Jin X, Hirudin protects Ang II-induced myocardial fibroblasts fibrosis by inhibiting the extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 6264-6272. DOI:10.12659/MSM.909044.
- [10] Yin YJ, Zhang Q, Zhao QF, et al. Tongxinluo attenuates myocardial fibrosis after acute myocardial infarction in rats via inhibition of endothelial-to-mesenchymal transition [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 6595437. DOI:10.1155/2019/6595437.
- [11] Maddaluno L, Rudini N, Cuttano R, et al. EndMT contributes to the onset and progression of cerebral cavernous malformations [J]. *Nature*, 2013, 498: 492-496. DOI:10.1038/nature12207.
- [12] Xu XB, Tan XY, Tampe B, et al. Snail is a direct target of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF1alpha) in hypoxia-induced endothelial to mesenchymal transition of human coronary endothelial cells [J]. *Biol Chem*, 2015, 290: 16653-16664. DOI: 10.1074/jbc.M115.636944.
- [13] Lee SW, Won JY, Kim WJ, et al. Snail as a potential target molecule in cardiac fibrosis; Paracrine action of endothelial cells on fibroblasts through snail and CTGF axis [J]. *Molecular therapy: The journal of the American Society of Gene Therapy*, 2013, 21 (9): 1767-1777. DOI:10.1038/mt.2013.146.
- [14] Bischoff J. Endothelial-to-mesenchymal transition [J]. *Circ Res*, 2019, 124 (8): 1163-1165. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.119.314813.
- [15] Zou J, Liu YH, Li BG, et al. Autophagy attenuates endothelial-to-mesenchymal transition by promoting Snail degradation in human cardiac microvascular endothelial cells [J]. *Bioscience Reports*, 2017, 37 (5): BSR20171049. DOI:10.1042/BSR20171049.
- [16] Semenza GL. HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus [J]. *Cell*, 2001, 107 (1): 1-3. DOI:10.1016/S0092-8674(01)00518-9.
- [17] Huang YW, Chen ZC, Lu T, et al. HIF-1 α switches the functionality of TGF- β signaling via changing the partners of smads to drive glucose metabolic reprogramming in non-small cell lung cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40: 398. DOI: 10.1186/s13046-021-02188-y.
- [18] Xu XB, Tan XY, Hulshoff MS, et al. Hypoxia-induced endothelial-mesenchymal transition is associated with RASAL1 promoter hypermethylation in human coronary endothelial cells [J]. *FEBS Lett*, 2016, 590: 1222-1233. DOI: 10.1002/1873-3468.12158.
- [19] Good RB, Gilbane AJ, Trinder SL, et al. Endothelial to mesenchymal transition contributes to endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension [J]. *Am J Pathol*, 2015, 185: 1850-1858. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.03.019.
- [20] 尹玉洁, 张倩, 王亚芬, 等. 基于络学说探析心肌梗死后心肌纤维化 [J]. *天津中医药*, 2019, 36 (5): 421-425. DOI:10.11656/j.issn.1672-1519.2019.05.03.
- [21] 王康, 常丽萍, 尹玉洁, 等. 基于络学说指导的急性心肌梗死后心肌纤维化中医病机及临床治疗探讨 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27 (12): 189-195. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20211047.
- [22] 李红蓉, 贾振华, 魏聪, 等. 络学说指导调和营卫气治疗络病变方药数据挖掘及用药规律分析 [J]. *疑难病杂志*, 2019, 18 (1): 80-85. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2019.01.019.
- [23] 王家兴, 任桐. 水蛭及其活性成分治疗脏器纤维化研究进展 [J]. *辽宁中医杂志*, 2020, 47 (5): 213-216. DOI: 10.13192/j.issn.1000-1719.2020.05.064.
- [24] 国家中医药管理局重大疑难疾病(急性心肌梗死)中西医临床协作试点项目组, 通心络防治急性 ST 段抬高型心肌梗死心肌无再流专家共识编制组. 中药通心络防治急性 ST 段抬高型心肌梗死心肌无再流中国专家共识 (2022 年) [J]. *疑难病杂志*, 2022, 21 (7): 675-682. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2022.07.002.
- [25] Jun RC, Xiao FX, Hui QZ, et al. Pharmacological activities and mechanisms of hirudin and its derivatives - a review [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 660757. DOI:10.3389/fphar.2021.660757.
- [26] Xie Y, Lan F, Zhao J, et al. Hirudin improves renal interstitial fibrosis by reducing renal tubule injury and inflammation in unilateral ureteral obstruction (UUO) mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 81: 106249. DOI:10.1016/j.intimp.2020.106249.
- [27] Yin Y, Zhang Q, Zhao Q, et al. Tongxinluo attenuates myocardial fibrosis after acute myocardial infarction in rats via inhibition of endothelial-to-mesenchymal transition [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 6595437. DOI:10.1155/2019/6595437.
- [28] 袁国强, 常成成, 张凤虹, 等. 通心络防治急性心肌梗死再灌注后无再流研究进展 [J]. *疑难病杂志*, 2023, 22 (2): 208-211. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.02.019.
- [29] 吴以岭. 络论 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2010.

(收稿日期: 2024 - 02 - 25)