

## 丹参酮 IIA 通过抑制 NADPH 氧化酶 保护心衰大鼠心肌纤维化的机制

员小利 井海云 王 丹

**摘要** 目的 探讨丹参酮 IIA 抑制还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶改善心肌纤维化的作用机制。方法 利用 Anversa 方法制备心衰大鼠模型,将 28 只雌性大鼠随机分成 4 组,对照组、丹参酮 IIA 组、纤维化模型组、纤维化 + 丹参酮 IIA 组。对照组、丹参酮 IIA 组只分离腹主动脉,不造成动脉狭窄;丹参酮 IIA 组、纤维化 + 丹参酮 IIA 组每日上午经腹腔注射给予 15 mg/kg 的丹参酮 IIA。检测各组大鼠心肌 NADPH 氧化酶活性、心肌超氧化物歧化酶(SOD)含量、心肌丙二醛(MDA)含量、Nox2 及 Nox4 的 mRNA 水平表达、心肌胶原含量。结果 心衰时大鼠心肌中 NADPH 氧化酶活性增强,达到(14.07 ± 0.23) nmol/mg;丹参酮 IIA 注射后,NADPH 氧化酶活性降到(8.72 ± 0.28) nmol/mg;大鼠心衰时,心肌组织中 SOD 活力下降,MDA 含量增高;纤维化 + 丹参酮 IIA 组的 SOD 活力优于纤维化模型组,纤维化模型组 MDA 含量高于纤维化 + 丹参酮 IIA 组;丹参酮 IIA 注射后,可提高 SOD 的活性;纤维化模型组和纤维化 + 丹参酮 IIA 组大鼠的 Nox2 mRNA 水平无明显变化,纤维化模型组和纤维化 + 丹参酮 IIA 组大鼠的 Nox4 mRNA 出现显著增加;纤维化模型组大鼠的心肌胶原容积百分比显著提高,心肌纤维化程度提高到 32.44%,远高于对照组的 5.13%,纤维化 + 丹参酮 IIA 组的胶原容积百分比为 18.37%。结论 丹参酮 IIA 注射抑制心衰大鼠心肌 NADPH 氧化酶中 Nox4 的表达,抑制了心肌氧化应激水平,同时丹参酮 IIA 升高 SOD 活力,从而抑制了心衰大鼠心肌纤维化水平。

**关键词** 丹参酮 IIA; 抑制; NADPH 氧化酶; 心肌纤维化

**中图分类号** R 654.2

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2019)04-0600-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.04.020

丹参酮 IIA 是从丹参中提取的具有抑菌作用的脂溶性化合物,临床主要用于预防心绞痛,减少心肌缺血、再灌注损伤,改善冠脉循环,抑制心肌肥厚和抗动脉粥样硬化等疾病<sup>[1-2]</sup>。Huo et al<sup>[3]</sup>通过使用

斑马鱼模型对多种抗炎药物的抗炎性研究发现,丹参酮 IIA 具有较强的抗炎能力。贺环宇等<sup>[4]</sup>研究发现丹参酮 IIA 可抑制内毒素血症小鼠的心肌炎症反应。活性氧(active oxygen, ROS)是细胞在代谢过程中产生的一类不稳定但具有较强活性的 O<sub>2</sub> 衍生物。多种病理因素可激活 ROS,会使巨噬细胞和嗜中性粒细胞等吞噬细胞对抗急性炎症反应,但是过量的 ROS 则会对机体有害<sup>[5-6]</sup>。NADPH 氧化酶(nadph oxidase, NOX)复合物是巨噬细胞和嗜中性粒细胞内 ROS 产生的主要来源。动物实验显示 NOX 在心肌肥厚、心肌梗死、高血压病等多种疾病模型中起重要作用<sup>[7]</sup>。ROS 生成增多引起的氧化应激在心肌重构中起重要作用。临床上使用丹参酮 IIA 磺酸钠注射液(sulfotanshinone sodium injection, STS)用于冠心病的治疗,在一定程度上可改善患者的心绞痛和心律失常症状,同时具有抑制炎症因子的作用。该研究通过探讨参酮 IIA 对炎症反应和氧化应激的影响,研究丹参酮 IIA 改善心肌纤维化的作用机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

**1.1.1 动物** 健康雄性 Wistar 大鼠 28 只,清洁级,6 周龄,体质量 160~180 g,购自河北省实验动物中心。

**1.1.2 主要实验药物和设备** 丹参酮 IIA(北京华夏远洋科技有限公司);反转录试剂盒(天津众立生物科技有限公司);细胞色素(美国 Sigma 公司);NADPH(南京碧云天生物技术研究);丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所);SynergyHT 多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司)。

#### 1.2 实验方法

**1.2.1 造模方法** 参考 Anversa 方法,在双肾动脉上方 0.5 cm 处分离腹主动脉,沿腹主动脉平行放置直径为 0.7 mm 的医用针头,用丝线绕腹主动脉和针头一起结扎,随后抽出针头,造成腹主动脉狭窄<sup>[8]</sup>。

**1.2.2 实验分组与给药** 28 只雌性大鼠自由饮水

2018-12-10 接收

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(编号:2017T02093)

作者单位:郑州大学附属郑州中心医院心内科,郑州 450000

作者简介:员小利,女,主治医师,责任作者, E-mail: 1113514585@qq.com

com

进食,在 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、明暗各 12 h 的清洁级动物实验室内饲养,喂养 1 周后,随机分为 4 组。对照组、丹参酮 IIA 组只分离腹主动脉,不造成动脉狭窄。造模后次日即开始对各组大鼠进行治疗干预,丹参酮 IIA 组、丹参酮 IIA + 纤维化组每日上午经腹腔注射给予  $15\text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  的丹参酮 IIA,同时对照组和纤维化模型组大鼠给予腹腔注射等体积的生理盐水。实验于第 28 天终止。

**1.2.3 样本采集** 观察各组大鼠的身体情况并做详细记录,之后用水合氯醛进行腹腔麻醉,迅速开胸取出心脏,于冰生理盐水中洗净,用滤纸吸干,沿房室沟剪掉两心房,剪掉主肺动脉,将左心室取下,分离后迅速放至液氮中速冻,拟进行病理学检测的心肌标本置于 10% 中性福尔马林溶液中固定,脱水后用石蜡包埋。

**1.2.4 NADPH 氧化酶活性的检测** 心肌 NADPH 氧化酶活性通过细胞色素 C 还原实验测定。裂解组提取组织总蛋白,稀释至终浓度为  $1\text{ mg}/\text{ml}$  后加入到孔板中( $200\text{ }\mu\text{l}/\text{孔}$ ),并加入  $500\text{ }\mu\text{mol}/\text{L}$  细胞色素 C 和  $1\text{ }000\text{ }\mu\text{mol}/\text{L}$  NADPH。最后加入或不加入  $200\text{ U}/\text{ml}$  的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase SOD),室温下反应 30 min。应用酶标仪在 550 nm 波长处测定吸光值。根据加入 SOD 后吸光值的减少量反应 NADPH 氧化酶活性。

**1.2.5 心肌 SOD 含量测定** 称取心肌组织  $100\text{ mg}$ ,加 9 倍生理盐水,制成 10% 匀浆,  $2\text{ }500\text{ r}/\text{min}$  离心 10 min,取上清液,再用生理盐水以 1:9 稀释成组织匀浆待测,按说明书步骤测定 SOD 水平。

**1.2.6 MDA 含量检测** 取心肌组织约  $100\text{ mg}$ ,加入生理盐水  $900\text{ }\mu\text{l}$ ,利用高通量组织研磨仪获得组织匀浆,  $12\text{ }000\text{ r}/\text{min}$ 、 $4^\circ\text{C}$  离心 10 min,取上清液,利用 BCA 法测定上清液中蛋白浓度,严格按说明书步骤测定 MDA 水平。

**1.2.7 Nox2 及 Nox4 的 mRNA 水平检测** 应用 TRIzol 法提取心肌组织总 RNA,逆转录合成 cDNA,利用 PCR 仪进行相应指标的特异性扩增,选择 GAPDH 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法进行定量分析。Nox2 及 Nox4 的特异性引物序列见表 1。反应条件为:  $95^\circ\text{C}$  预变性 10 min;  $95^\circ\text{C}$  变性 10 s;  $60^\circ\text{C}$  退火 10 s,

$72^\circ\text{C}$  延伸 20 s,共 40 个循环。

**1.2.8 心肌胶原含量测定** 利用天狼猩红色染色分析心肌组织胶原含量。具体过程如下:将心肌组织石蜡切片置于二苯甲溶液中 5 min,重复 3 次;相继经过 100%、90%、70% 的乙醇 1 次,各 1 min;用流水冲洗标本 10 min,冲洗完毕将标本置入纯水中清洗 1 min,再置于 0.2% 磷钼酸中 1~5 min,将切片摆放于潮湿的染色盒中,滴入数滴 0.1% 天狼猩红苦味酸溶液使其充分与标本接触,染色 90 min;充分甩去天狼猩红苦味酸溶液,再浸入纯水中数次;最后经过 70%、95% 乙醇各 30 s,100% 乙醇 30 s,各 3 次。二甲苯 2 min,重复 3 次,封片。染色后用光学显微镜拍照,每张切片随机选取 10 个视野,使用 Image-ProPlus(version 6.0) 软件测量胶原面积,从而计算胶原容积百分比(%),胶原容积百分比(%) = 胶原总面积/图像总面积  $\times 100\%$ ,取平均值作为最终结果。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用独立样本  $t$  检验,非正态分布数据采用非参数检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠一般情况观察** 对照组和丹参酮 IIA 组大鼠精神状态良好,皮毛色泽光亮,大鼠饮食正常,体质量随着实验天数逐渐增加而增加,呼吸平稳正常。单纯注射丹参酮 IIA 组的大鼠表现与对照组相比无明显变化。纤维化模型组大鼠在造模后精神逐渐变差,行动较为迟缓,食欲不振,皮毛暗淡,体型逐渐消瘦,呼吸频率加快。纤维化 + 丹参酮 IIA 组后期精神尚可,皮毛尚有一点光泽,食欲较好,体型较对照组稍瘦,呼吸较为平稳。

**2.2 丹参酮 IIA 对心衰大鼠心肌 NADPH 氧化酶活性影响** NADPH 酶活性:对照组( $5.85 \pm 0.26$ ) nmol/mg;丹参酮 IIA 组( $5.65 \pm 0.33$ ) nmol/mg;纤维化模型组( $14.07 \pm 0.23$ ) nmol/mg;纤维化 + 丹参酮 IIA 组( $8.72 \pm 0.28$ ) nmol/mg;与对照组比较,丹参酮 IIA 组的 NADPH 酶活性无显著差异,丹参酮 IIA 的注射对正常大鼠的 NADPH 氧化酶活性无明显影响。丹参酮 IIA 可下调心衰大鼠心肌氧化酶活性( $P < 0.01$ ),丹参酮 IIA 的注射很好地抑制了心衰大鼠心肌 NADPH 氧化酶活性。

**2.3 丹参酮 IIA 对心衰大鼠心肌组织 SOD、MDA 的影响** 由表 2 可知,大鼠心衰时,心肌组织中 SOD

表 1 Nox2 及 Nox4 特异性引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
Nox2	F: GGTCCAAGCAGGAGAACCA R: GAGGCCAGGAACAGTTGTGA
Nox4	F: AAGGCTTCAGGTCCACAGAGAAA R: AGACTTTGTATGGACCCCAACT

表2 不同处理方式心衰大鼠心肌组织 SOD、MDA 含量

项目	对照组	丹参酮 IIA 组	纤维化模型组	纤维化 + 丹参酮 IIA 组	F 值	P 值
SOD( U/mg)	396.34 ± 3.87	387.28 ± 5.62	290.59 ± 8.73 <sup>##</sup>	330.19 ± 4.95 <sup>**</sup>	18.620	0.001
MDA( nmol/mg)	11.25 ± 2.29	10.98 ± 3.14	24.37 ± 4.89 <sup>##</sup>	18.64 ± 3.96 <sup>**</sup>	22.175	0.001

与对照组比较: <sup>##</sup>  $P < 0.01$ ; 与纤维化模型组比较: <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$

表3 不同处理方式心衰大鼠心肌 Nox2、Nox4 mRNA 含量

项目	对照组	丹参酮 IIA 组	纤维化模型组	纤维化 + 丹参酮 IIA 组	F 值	P 值
SOD( U/mg)	1.05 ± 0.16	0.97 ± 0.11	1.08 ± 0.11	1.01 ± 0.09	2.385	0.352
MDA( nmol/mg)	1.01 ± 0.13	1.06 ± 0.07	1.57 ± 0.15 <sup>**</sup>	1.23 ± 0.22 <sup>##</sup>	20.034	0.000

与对照组比较: <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ ; 与纤维化模型组比较: <sup>##</sup>  $P < 0.01$

活力下降,MDA 含量增高,表明氧自由基通过脂质过氧化反应参与了心力衰竭的发病过程。纤维化 + 丹参酮 IIA 组的 SOD 活力优于纤维化模型组 ( $P < 0.01$ )。纤维化模型组 MDA 含量高于纤维化 + 丹参酮 IIA 组,说明心衰大鼠心肌氧化反应活动剧烈。由图 1 和表 2 可知,丹参酮 IIA 注射后,可以抑制细

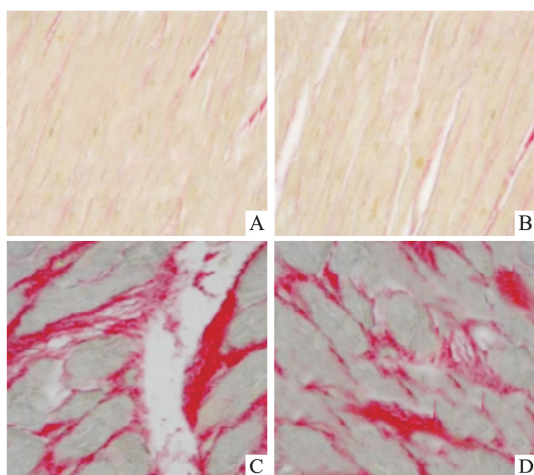


图1 不同处理方式心肌天狼猩红染色图片

A: 对照组; B: 丹参酮 IIA 组; C: 纤维化模型组; D: 纤维化 + 丹参酮 IIA 组

胞膜上的 NADH/NADPH 氧化酶的激活,提高 SOD 的活性。SOD 活性的增强,提升了清除氧自由基的能力,MDA 含量的降低,显示脂质过氧化反应作用降低,保护内皮细胞。

**2.4 心肌 Nox2 和 Nox4 基因表达水平** 与对照组大鼠比较,纤维化模型组和纤维化 + 丹参酮 IIA 组大鼠的 Nox2 mRNA 水平无明显变化,见表 3。而从 Nox4 mRNA 基因表达可以看出,纤维化模型组和纤维化 + 丹参酮 IIA 组大鼠的 Nox4 mRNA 显著增加。由于丹参酮 IIA 的注射,纤维化 + 丹参酮 IIA 组大鼠 Nox4 mRNA 含量较纤维化模型组含量降低,这可能是由于心衰大鼠心肌氧化应激水平增加, Nox4 处

于激活状态,而注射丹参酮 IIA 的心衰大鼠,一定程度抑制了氧化应激水平,所以 Nox4 mRNA 含量较纤维化模型组含量降低。

**2.5 心肌纤维化程度** 通过天狼猩红染色观察心衰大鼠心肌纤维化程度,对照组和丹参酮 IIA 组在显微镜下可见胶原纤维分散在心肌间质;而纤维化模型组和纤维化 + 丹参酮 IIA 组心肌间质中不同程度的出现大量胶原纤维,见图 1。通过胶原容积百分比计算得到心衰大鼠心肌胶原含量,纤维化模型组大鼠的心肌胶原容积百分比显著提高,心肌纤维化程度提高到  $(32.44 \pm 1.27)\%$ ,远高于对照组的  $(5.13 \pm 0.37)\%$ ,可见心衰大鼠的心肌纤维化程度远高于对照组,建模后,丹参酮 IIA 注射后丹参酮 IIA 组  $(5.26 \pm 0.48)\%$ ,纤维化 + 丹参酮 IIA 组的胶原容积百分比为  $(18.37 \pm 1.19)\%$ ,说明丹参酮 IIA 对降低心衰大鼠心肌纤维化水平有显著作用。

### 3 讨论

丹参酮类化合物是丹参中的特征性有效成分之一,此类化合物具有显著的心脑血管保护作用和抗肿瘤作用<sup>[9-11]</sup>。心肌纤维化是以心脏间质成纤维细胞过度增殖、胶原过度沉积及异常分布为特征的心脏间质重构。心肌纤维化与许多心脏疾病有密切关系,如心房纤颤、心肌梗死、慢性心力衰竭、风湿性心瓣膜病等<sup>[12]</sup>。心肌纤维化时局部心肌细胞凋亡,取而代之的是心肌成纤维细胞增殖和纤维性胶原成分增多,心脏功能逐步减退,最终导致心功能障碍、心力衰竭和心律失常<sup>[13]</sup>。因此预防及控制心脏间质胶原增生,从而有效防治心肌纤维化,是延缓心力衰竭、减少心律失常发生的重要手段。

ROS 通过调节细胞增殖、分化、迁移等过程维持心脏正常功能,而 ROS 生成增多引起的氧化应激参与了多种心血管疾病, NADPH 氧化酶是 ROS 最重要的来源之一。研究<sup>[14]</sup>显示,使用 NADPH 氧化

酶抑制剂或敲除 NADPH 氧化酶的基因可以明显减轻氧化损伤。本研究显示,心衰时 NADPH 氧化酶活性增强,达到 $(14.07 \pm 0.23)$  nmol/mg,丹参酮 IIA 注射后,NADPH 氧化酶活性降到 $(8.72 \pm 0.28)$  nmol/mg,NADPH 氧化酶活性受到很好地抑制。MDA 水平间接反映心肌氧化应激程度,研究显示心衰患者心肌 MDA 水平增加,提示心肌氧化应激水平增加。通过对心肌 Nox2 和 Nox4 基因表达测定,心衰大鼠 Nox4 处于持续激活状态, Nox2 基因无明显变化。注射丹参酮 IIA 的心衰大鼠, Nox4 mRNA 较模型组含量降低,说明丹参酮 IIA 可调控调节 Nox4 的表达。Nox4 表达水平的增高可能是心肌 NADPH 氧化酶活性上调的主要原因。通过天狼猩红染色,不同处理方式下心肌细胞不同程度地出现大量胶原纤维,通过胶原含量百分比测定,心衰大鼠的胶原含量为 $(32.44 \pm 1.27)\%$ ,而注射丹参酮 IIA 心衰大鼠的胶原含量为 $(18.37 \pm 1.19)\%$ ,丹参酮 IIA 对心衰大鼠心肌纤维化有一定的抑制作用,从而显著改善心衰大鼠心脏功能。本研究分析显示,丹参酮 IIA 注射可抑制心衰大鼠心肌 NADPH 氧化酶活性,升高 SOD 活力,提升清除氧自由基的能力,抑制脂质过氧化反应;MDA 含量的降低,降低氧自由基通过脂质过氧化反应造成的心力衰竭的发病过程;丹参酮 IIA 的注射, Nox4 mRNA 含量较模型组低,且显著降低心衰大鼠心肌纤维化水平,说明 Nox4 表达一定程度上促进了心肌纤维化水平。

### 参考文献

- [1] Tan D, Wu J R, Zhang X M, et al. Sodium tanshinone II A sulfonate injection as adjuvant treatment for unstable angina pectoris: a Meta-analysis of 17 randomized controlled trials[J]. *Chin J Integr Med*, 2018, 24(2): 156–60.
- [2] Porwol T, Ehleben W, Brand V, et al. Tissue oxygen sensor function of NADPH oxidase isoforms, an unusual cytochrome aa3 and reactive oxygen species[J]. *Respir Physiol*, 2001, 128(3): 331–48.
- [3] Huo Y, Rangarajan P, Ling E A, et al. Dexamethasone inhibits the Nox-dependent ROS production via suppression of MKP-1-dependent MAPK pathways in activated microglia[J]. *Bmc Neuroscience*, 2011, 12(1): 49.
- [4] 贺环宇. 丹参酮 IIA 对大鼠肺间质纤维化的保护作用及机制研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2014.
- [5] Burgoyne J R, Monguedin H, Eaton P, et al. Redox signaling in cardiac physiology and pathology[J]. *Circ Res*, 2012, 111(8): 1091–106.
- [6] 解华. 基于 NADPH 氧化酶活性调控的益心解毒方治疗心力衰竭的分子机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.
- [7] 房晓楠, 张荣成, 张健. T 细胞免疫调节机制在心力衰竭心肌纤维化中的作用[J]. *中国循环杂志*, 2015, 30(5): 508–10.
- [8] 戴新新, 宿树兰, 郭盛, 等. 丹参酮类成分的生物活性与应用开发研究进展[J]. *中草药*, 2017, 48(7): 1442–8.
- [9] Maione F, Piccolo M, De Vita S, et al. Down regulation of pro-inflammatory pathways by tanshinone IIA and cryptotanshinone in a non-genetic mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Pharmacol Res*, 2012, 1299(3): 482–90.
- [10] Yu Z L, Wang J N, Wu X H, et al. Tanshinone IIA prevents rat basilar artery smooth muscle cells proliferation by inactivation of PDK1 during the development of hypertension[J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2018, 20(6): 563–71.
- [11] Wang S, Jing H, Yang H, et al. Tanshinone I selectively suppresses pro-inflammatory genes expression in activated microglia and prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 164(8): 247–55.
- [12] 王汉章. ERK1/2 信号通路介导 PDGF-CC 诱导的鼠心肌成纤维细胞增殖和胶原合成的分子机制[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2017.
- [13] 于婷, 王小梅. 通心络对高糖培养下心肌成纤维细胞增殖和凋亡的影响[J]. *中国医科大学学报*, 2018, 47(2): 132–6.
- [14] 程琪, 李勇文, 李丽, 等. 甲基阿魏酸对乙醇诱导 HSC-LX2 细胞 NOX4 和  $\alpha$ -SMA 表达的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(4): 509–15.

## Tanshinone IIA protects myocardial fibrosis in rats with heart failure by inhibiting NADPH oxidase

Yuan Xiaoli, Jing Haiyun, Wang Dan

(Dept of The Fifth Ward of Cardiology, The Affiliated Zhengzhou Central Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000)

**Abstract Objective** To investigate the mechanism of tanshinone IIA inhibiting NADPH oxidase in improving myocardial fibrosis. **Methods** The rat model of heart failure was prepared by Anversa, and 28 female rats were randomly divided into 4 groups, the control group, the tanshinone IIA group, the fibrosis model group, and the fibrosis + tanshinone IIA group. The control group and tanshinone IIA group only separated the abdominal aorta and

did not cause arterial stenosis , the tanshinone IIA group , and the fibrosis + tanshinone IIA group were given 15 mg/kg tanshinone IIA every morning by intraperitoneal injection. The mechanism of tanshinone IIA in improving myocardial fibrosis was comprehensively assessed by macroscopic characterization combined with physical and chemical indicators. The myocardial NADPH oxidase activity , myocardial SOD content , myocardial malondialdehyde ( MDA) content , Nox2 , Nox4 mRNA level and myocardial collagen content were detected. **Results** The activity of NADPH oxidase in myocardium of heart failure rats increased to ( 14. 07  $\pm$  0. 23) nmol/mg. After injection of tanshinone IIA , the activity of NADPH oxidase decreased to ( 8. 72  $\pm$  0. 28) nmol/mg. In heart failure ( HF) rats , SOD activity in myocardium decreased and MDA content increased , SOD activity in fibrosis + tanshinone IIA group was better than that in fibrosis model group , and MDA content in fibrosis model group was higher than that in fibrosis + tanshinone IIA group. Tanshinone IIA injection can increase the activity of SOD. There was no significant change in the level of Nox2 mRNA in the fibrosis model group and the fibrosis + tanshinone IIA group , but the Nox4 mRNA in the fibrosis model group and the fibrosis + tanshinone IIA group increased significantly. The percentage of myocardial collagen volume in fibrosis model group was significantly increased to 32. 44% , which was much higher than that in control group ( 5. 13% ) . The percentage of collagen volume in fibrosis + tanshinone IIA group was 18. 37% . **Conclusion** Tanshinone IIA injection inhibits the expression of Nox4 in myocardial NADPH oxidase in heart failure rats and inhibits the level of myocardial oxidative stress , while tanshinone IIA increases SOD activity , thus inhibiting the level of myocardial fibrosis in rats with heart failure.

**Key words** tanshinone IIA; inhibition; NADPH oxidase; myocardial fibrosis

( 上接第 599 页)

## Construction of stable transfected cell line of IL-6 overexpression lentiviral and its effect on the expression of HBsAg , HBeAg , HBV-DNA

Pan Zhenglan , Guan Shihe , Chen Liwen et al

( Dept of Clinical Laboratory , The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230601)

**Abstract Objective** To construct stable transfect cell line of IL-6 overexpression lentiviral and explore its effect on the expression of HBsAg , HBeAg and HBV-DNA. **Methods** IL-6 fragment was amplified by PCR using Huh7 cell gDNA as template and cloned into pMIGR1 vector. After sequencing analysis successfully , pMIGR1 plasmid and pMIGR1-IL-6 plasmid was used respectively with lentiviral packaging plasmid pCL-40A1 to co-transfected 293T cells to obtain recombinant lentiviral particles , and then transfected Huh7 cell. The cells named Huh7/con cell line and Huh7/IL-6 cell line respectively were screened by puromycin , expanded the cells obtained. IL-6 expression was confirmed by electrochemiluminescence and qRT-PCR; HBsAg , HBeAg expression was detected by chemiluminescence microparticle immunoassay; HBV-DNA expression was detected by PCR-fluorescence probe. **Results** The MIGR1-IL-6 plasmid was confirmed successfully by sequencing analysis , which indicated that IL-6 lentiviral expression vector was successfully constructed. IL-6 expression in the Huh7/IL-6 cell lines increased significantly compared with Huh7/con cell lines. The expression of IL-6 in Huh7 , HepG2 and Huh7/IL-6 cells transfected with pcDNA1. 3 plasmid after 6 h , 12 h , 24 h and 48 h of transfection were significantly increased. The expression of HBsAg , HBeAg and HBV-DNA in Huh7 and HepG2 cells treatment with pcDNA1. 3 plasmid and dealt with 20 ng/ml IL-6 after 6 h , 12 h , 24 h and 48 h of transfection were significantly decreased. The expression of HBsAg , HBeAg and HBV-DNA in Huh7/IL-6 cells transfected with pcDNA1. 3 plasmid after 6 h , 12 h , 24 h and 48 h of transfection were significantly decreased. **Conclusion** The IL-6 lentiviral expression vector is successfully constructed , and the Huh7 cell line stably expressing IL-6 is established. Transfection of pcDNA1. 3 plasmid up-regulates IL-6 expression. IL-6 decreases the expression of HBsAg , HBeAg and HBV-DNA.

**Key words** IL-6; lentiviral vector; stable transfection; HBsAg; HBeAg; HBV-DNA