

芪苈参萸益心方通过减轻炎症反应、溶酶体功能和抑制 NLRP3 炎症小体激活来发挥对心肌梗死大鼠的保护作用

卢超¹, 石孟琼^{2*}, 张媛媛³, 罗恒¹, 陈腊年¹, 任俊红¹, 舒恒³, 张继红^{1*}

¹三峡大学第二人民医院 & 宜昌市二医院; ²三峡大学医学院;

³三峡大学天然产物研究与利用湖北省重点实验室 & 三峡大学生物与制药学院, 宜昌 443002

摘要:为探讨芪苈参萸益心方对心肌梗死(MI)大鼠炎症反应、溶酶体功能和 NLRP3 炎症小体的影响及机制。将实验大鼠随机分为正常组、模型组、芪苈参萸益心方组和地尔硫卓组。MI 模型复制成功后分别予芪苈参萸益心方及地尔硫卓处理,正常组、模型组予 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液,连续 4 周,处死大鼠,观察血流动力学,血液中 ROS、LDH、SOD、GSH-Px、CAT、MDA、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18、IL-4、IL-10 及血液、心肌和溶酶体中 β -葡萄糖醛酸酶、 β -半乳糖苷酶、组织蛋白酶 B 和 D、心脏重量指数、心肌梗死面积的变化;HE 染色观察心脏形态学改变;实时定量 PCR 测定心肌中 TLR4、MyD88、iNOS、COX-2 mRNA 表达,Western blot 测定心肌中 p-IKK β 、p-I κ B α 、NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1、TXNIP、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 及胞浆和胞核中 NF- κ Bp65 蛋白表达。结果显示芪苈参萸益心方可显著改善 MI 大鼠心功能、降低心脏重量指数和梗死面积,减少心肌坏死和炎性细胞浸润;降低血液 LDH、ROS、MDA、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18 及血液、心肌和溶酶体中 β -葡萄糖醛酸酶、 β -半乳糖苷酶、组织蛋白酶 B 和 D 水平;升高血液中 SOD、CAT、GSH-Px、IL-4、IL-10 水平;下调心肌中 TLR4、MyD88、iNOS、COX-2 mRNA 及 p-IKK β 、p-I κ B α 、NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1、TXNIP、pro-IL-1 β 、pro-IL-18、胞核 NF- κ Bp65 蛋白表达及 p-IKK β /IKK β 和 p-I κ B α /I κ B α 比值,上调胞浆中 NF- κ Bp65 蛋白表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。芪苈参萸益心方对 MI 大鼠有保护作用,其机制可能与增强内源性抗氧化系统功能、减轻炎症反应和抑制 NLRP3 炎症小体激活有关。

关键词:芪苈参萸益心方;心肌梗死;炎症反应;溶酶体功能;NLRP3 炎症小体激活

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)11-1833-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.11.005

Cardioprotective effect of Qili Shengyu Yixin Formula on myocardial infarction rats by reducing inflammatory reaction, lysosomal function and inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome

LU Chao¹, SHI Meng-qiong^{2*}, ZHANG Yuan-yuan³,

LUO Heng¹, CHEN La-nian¹, REN Jun-hong¹, SHU Heng³, ZHANG Ji-hong^{1*}

¹The Second People's Hospital, China Three Gorges University & Yichang Second Hospital; ²Medical Science College;

³Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development & College of Biological and Pharmaceutical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

Abstract: To observe the effect of Qili Shengyu Yixin Formula on the inflammatory reaction, lysosomal function and NLRP3 inflammasome in myocardial infarction (MI) rats. The rats were randomly divided into normal group, model group, Qili Shengyu Yixin Formula groups and diltiazem group. After the successful replication of MI model, Qili Shengyu Yixin Formula and diltiazem were given respectively. The normal and model groups were given 0.5% sodium carboxymethyl cellulose solution. After 4 weeks, the hemodynamics, blood ROS, LDH, SOD, GSH-Px, CAT, MDA, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-4, IL-10, blood, myocardium and lysosome β -glucuronidase, β -galactosidase, cathepsin B and D cardiac mass index and myocardial infarction vol-

收稿日期:2020-07-10 接受日期:2020-10-09

基金项目:湖北省卫生厅项目(2012Z-Y07);湖北省宜昌市科技局项目(A16-301-30)

*通信作者 E-mail:shmq0212@126.com, zhangjihong2000@163.com

ume, myocardium and lysosome were observed; HE staining were used to observe cardiac morphological changes; The real-time PCR was applied to detect the mRNA expressions of TLR4, MyD88 and iNOS in myocardial tissue; The protein expressions of p-IKK β , p-Ik β , NLRP3, ASC, pro-caspase-1, caspase-1, TXNIP, pro-IL-1 β , pro-IL-18 and cytosol and nucleus NF- κ Bp65 in myocardial tissue were detected by Western blot. The results indicated that Qili Shenyu Yixin Formula could significantly improve cardiac function, reduce cardiac mass index and infarct area, reduce myocardial necrosis and inflammatory cell infiltration, decrease blood LDH, ROS, MDA, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18 and blood, myocardium and lysosome β -glucuronidase, β -galactosidase, cathepsin B and D levels; elevate blood SOD, CAT, GSH-Px, IL-4 and IL-10 levels; down-regulate the TLR4, MyD88, iNOS, COX-2 mRNA expressions, p-IKK β , p-Ik β , NLRP3, ASC, pro-caspase-1, caspase-1, TXNIP, pro-IL-1 β , pro-IL-18, nuclear NF- κ Bp65 protein expressions and p-IKK β /IKK β and p-Ik β /Ik β ratios; up-regulate the cytosol NF- κ Bp65 protein expression of in the myocardial tissue ($P < 0.05$ or $P < 0.01$, respectively). Qilishenyu Yixin Formula has protective effect on MI rats, which is possibly related to enhancing endogenous antioxidant system function, reducing inflammatory reaction and inhibiting inflammasome activation.

Key words: Qili Shenyu Yixin Formula; myocardial infarction; inflammatory reaction; lysosomal function; activation of NLRP3 inflammasome

心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 是心血管疾病的致死性表现之一。它是由于富含脂质的斑块破裂和血栓形成所导致的冠状动脉供血和心肌需求之间的不平衡造成的。这两种情况都会对心肌的某些部位造成不可逆转的损伤; 临床上常见为冠状动脉病变引起心肌供血不足, 造成心肌严重功能障碍, 甚至坏死。在导致斑块破裂的众多致病性诱因中, 炎症是 MI 发病的主要危险因素之一, 在它 MI 发病中起着关键作用^[1,2]。

在许多炎症途径中, 心肌缺血后细胞内释放的溶酶体酶可能直接或通过激活补体途径导致细胞损伤和死亡^[3]。溶酶体酶的释放在激活核苷酸结合区、富含亮氨酸家族和吡喃结构域-3 (NLRP3) 炎症小体^[4]。此外, 心肌梗死患者溶酶体酶活性的变化已被发现^[5]。细胞因子是炎症介质, 通过动脉粥样硬化的形成和动脉粥样硬化损伤的快速演变, 触发斑块破裂和腔内血栓形成^[6]。促炎细胞因子在急性心肌损伤和梗死中升高, 并在 MI 后升高他们对与冠状动脉疾病相关的全身和血管炎症的发生和维持负有高度责任^[7]。Toll 样受体 (TLRs) 可能通过激活核因子 kappa B (NF- κ B) 信号途径参与 NLRP3 炎症小体的蛋白表达, 以及白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和白细胞介素-18 (IL-18) 的前体^[8]。在通过包括 NF- κ B 激活在内的多种信号转导途径释放多种炎性细胞因子中, NF- κ B 是 NLRP3 基因转录的传统启动信号。近年来研究表明 NF- κ B 信号通路在缺血情况下调节 NLRP3 炎症小体的表达和活化中起着关键作用^[9]。NLRP3 炎症小体是一种重要的炎症调节因子, NLRP3 蛋白通过 PYD-PYD 结构域的相互

作用招募凋亡相关的斑点样蛋白 (ASC), 衔接蛋白 ASC 再通过 CARD-CARD 结构域的相互作用招募 pro-caspase-1, 结合形成炎症小体。这导致 caspase-1 活化, 将 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 剪切成成熟的 (IL-1 β 和 IL-18) 形式, 介导炎症反应^[10]。此外, 在氧化应激过程中, 触发 ROS 的过度产生, 促进硫氧还蛋白互作蛋白 (TXNIP) 与 NLRP3 的结合并激活 NLRP3 炎症小体^[11]。

芪苈参萸益心方是我们根据多年的临床经验总结出来的经验方, 前期临床试验它可增加心衰患者的每分钟心排血量、提高左室射血分数、减慢因心功能不全产生的临床症状和体征^[12,13]; 动物实验研究发现芪苈参萸益心方对心衰所致的心肌损伤具有较好的心肌保护作用, 可上调心衰大鼠心肌组织中 Sirt1、胞核中 Nrf2、Bcl-2 蛋白表达和 MnSOD、HO-1、NQO1、GCLC mRNA 表达, 下调 Ac-FoxO1 和 Ac-Pgc-1 α 蛋白表达及上调 Bcl-2 蛋白表达, 下调 Bax、cleaved-caspase-9、cleaved-caspas-3 蛋白表达, 升高 Bcl-2/Bax 比率, 并初步证实其作用机制可能与其激活 Sirt1/FoxO1/Pgc-1 α 和 Nrf2/抗氧化通路有关^[14,15]。本研究拟在此基础上, 围绕炎症反应、溶酶体功能和炎症小体激活来观察芪苈参萸益心方对 MI 大鼠的影响, 探寻其可能的作用机制, 为其临床应用于 MI 的防治提供理论基础和实验依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 120 只, 体质量 200 ± 20 g, 由三峡大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(鄂)2017-0012, 分笼饲养, 自由饮水和摄

食。所有涉及动物使用的实验程序都是按照三峡大学动物护理委员会的指导方针和在动物伦理委员会(伦理审查批号:CTGUEAC-2019-079)的监督下进行。

1.2 药物

芪苈参萸益心方[黄芪(批号 190205)30 g、葶苈子(批号 181126)15 g、山茱萸(批号 190127)20 g、北五加皮(批号 181209)10 g、大枣(批号 181213)20 g、桂枝(批号 190128)15 g、煅龙牡各(批号 181024、180513)15 g、丹参(批号 190221)20 g]均为药典规定的药材品种,经天然产物研究与利用湖北省重点实验室(三峡大学)汪黎植教授进行了鉴定,并在实验室留有药材标本。芪苈参萸益心方提取物的制备方法参见我们前期介绍的方法^[15]。盐酸地尔硫卓片(天津田边制药,批号:20190829,每片 30 mg)。实验时,所用药物分别用 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液配成相应浓度药物混悬液,备用。

1.3 主要试剂及仪器

活性氧自由基(ROS)、乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)试剂盒(南

京建成); β -葡萄糖醛酸酶、 β -半乳糖苷酶、组织蛋白酶 B、组织蛋白酶 D 试剂盒(北京百奥莱博);TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 IL-4、IL-10 ELISA 试剂盒(深圳达科为);TLR4、MyD88、iNOS、COX-2、GAPDH 引物合成(荧光定量 PCR 引物序列见表 1),Trizol 和 DEPC(上海生工);Prime Script TM RT reagent Kit、Taq DNA 聚合酶(大连宝生物);IKK β 、p-IKK β 、I κ B α 、p-I κ B α 、NF- κ Bp65、p-NF- κ Bp65、NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1、TXNIP、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 一抗(美国 Santa Cruz); β -actin 一抗及二抗(武汉博士德);组织蛋白和胞浆、胞核蛋白提取及 ECL 发光试剂盒(南京碧云天);其他所用试剂均为国产分析纯。电子天平(梅特勒-托利多);手术无影灯(上海医达);数字展示台(日本 Victor);多导生理记录仪(美国 Biopac);涡旋仪(美国奥然);高速冷冻离心机(德国 Eppendorf);酶联免疫检测仪(瑞士 Tecan);脱水机,显微镜及图像分析系统(德国 Leica);超薄切片机(奥地利莱卡);实时定量 PCR 仪(美国 Illumina);核酸测定仪(美国 Thermo);电泳仪(北京六一)。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences used in quantitative real-time PCR

基因名称 Gene	上游引物序列 Forward primer	下游引物序列 Reverse primer
TLR4	5'-TGCTCAGACATGGCAGTTTC-3'	5'-TCAAGGCTTTTCCATCCAAC-3'
MyD88	5'-GCTGAGAGGAAGATTCTAC-3'	5'-CAGTGATAACCCTGGACTAC-3'
iNOS	5'-CACCACCCTCCTTGTCAAC-3'	5'-CAATCCACAACCTCGCTCCAA-3'
COX-2	5'-TGCGATGCTCTCCGAGCTGTGCT-3'	5'-TCAGGAAGTTCCTTATTTCCTTTC-3'
GAPDH	5'-GACATTGAGAAGGGCCACAT-3'	5'-CAAAGAGGTCCAAAACAATCG-3'

2 实验方法

2.1 大鼠 MI 的建立及给药

根据 Wei 等^[16]报道方法制作 MI 大鼠模型。术后次日将模型大鼠完全随机分为模型组、芪苈参萸益心方 28.8 g/kg 剂量组(根据临床用药量,依据实验动物与人的体表面积换算关系计算为成人 2 倍量,28.8 生药 g/kg)、芪苈参萸益心方 57.6 g/kg 剂量组(根据临床用药量,依据实验动物与人的体表面积换算关系计算为成人 4 倍量,57.6 生药 g/kg)和盐酸地尔硫卓 0.016 g/kg 组(根据临床用药量,依据实验动物与人的体表面积换算关系计算约为成人 2 倍量,0.016 g/kg)及假手术组,每组 16 只。各

组大鼠灌胃给予相应的药物,灌胃体积为 10 mL/kg,模型组和假手术组灌胃给予相应体积的 0.5% CMC-Na,每天 1 次,连续给药 4 周。

2.2 心功能的测定

末次给药的次日,实验大鼠分别用 20% 氨基甲酸乙酯溶液(1.5 g/kg, i. p)麻醉后,颈部切开,分离右侧颈总动脉,进行颈总动脉和左心室插管,记录颈总动脉压 1 次,再进入左心室,用 Biopac 系统记录血流动力学指标(心率:heart rate, HR;左心室收缩压:left ventricular systolic pressure, LVSP;左心室舒张末压:left ventricular end-diastolic pressure, LV-EDP;左室内压上升最大速率:maximal rate of the in-

crease of left ventricular pressure, LV + dp/dtmax; 左室内压下降最大速率; maximal rate of the decrease of left ventricular pressure, LV-dp/dtmin)。

2.3 标本采集及检测

2.3.1 标本采集

测定完实验大鼠心功能后,腹腔主动脉取血,分离血清,用于相关指标检测;取血完毕后,取出大鼠心脏,用生理盐水洗去残留血液,用洁净纱布吸干水分,称全心质量;每组随机选取 8 只大鼠心脏心肌梗死面积计算,然后随机选取 3 只大鼠心脏用于病理学指标检测,其余部分存储于-80 °C 冰箱,用于蛋白及基因表达检测。

2.3.2 血液中 ROS 含量测定

根据 Hayashi 等^[17]介绍的方法进行血液中 ROS 含量检测。

2.3.3 血液中生化指标测定

按试剂盒说明书的方法测定血液中 LDH、SOD、CAT、GSH-Px 活性和 MDA 含量。

2.3.4 血液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 IL-4、IL-10 含量测定

按 ELISA 试剂盒说明书的方法测定血液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 IL-4、IL-10 含量。

2.3.5 血液、心肌组织和溶酶体中溶酶体酶的测定

根据 Sathish 等^[18]介绍的方法分离溶酶体和胞质,然后根据 Nagoor 等^[19]介绍的方法,分别测定血液、心脏组织、溶酶体中 β -葡萄糖醛酸酶、 β -半乳糖苷酶、组织蛋白酶 B 和组织蛋白酶 D 的活性。

2.3.6 心脏质量指数测定及 MI 面积计算

全心重,计算心脏质量指数[心脏质量指数 = 全心重量(mg)/体重(g)];然后随机选取每组一半大鼠的心脏,按照我们已发表文章^[15]介绍的方法计算 MI 面积。

2.3.7 心脏组织形态学分析

将随机选取 3 只大鼠心脏,沿长轴从心尖到心底横切成五等份,选取中间等分,置于 4% 多聚甲醛中固定,乙醇脱水、石蜡包埋,切片,经 HE 染色后置于显微镜下观察心脏组织形态。

2.3.8 Real-time PCR 检测

按照 RNA 提取试剂盒说明书介绍的方法提取左心室心肌组织 RNA,然后将其反转录成 cDNA。然后按照此反应体系[SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (2X) 12.5 μ L, PCR Forward Primer(10 μ M) 1 μ L, PCR Reverse Primer(10 μ M) 1 μ L, DNA 模板 2 μ L,

灭菌蒸馏水 8.5 μ L]在 Real-time PCR 扩增仪中按 95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,退火 30 s,72 °C 延伸 20 s 条件扩增 40 次。利用 PCR 仪汇出扩增曲线,进行结果分析。

2.3.9 Western blot 检测

按照胞浆和胞核蛋白提取试剂盒说明书介绍的方法提取左心室心肌组织胞浆蛋白和胞核蛋白,按蛋白提取试剂盒说明书介绍的方法提取左心室心肌组织蛋白,经核酸测定仪测定蛋白含量后,用 10%~15% 聚丙烯酰胺凝胶在 120 V、28 mA 条件下电泳 1.5 h,然后转膜 2 h;5% 脱脂牛奶封闭,滴加 IKK β 、p-IKK β 、I κ B α 、p-I κ B α 、NF- κ Bp65、NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1、TXNIP、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 和 β -actin 一抗(1:300、1:300、1:400、1:400、1:300、1:400、1:400、1:300、1:400、1:400、1:300、1:300、1:500),4 °C 孵育过夜;用含 0.1% Tween 20 的 TBS 冲洗后,滴加二抗(1:1000)后在室温下孵育 2 h,然后用 0.1% TBST 冲洗后,X 光片显影,扫描图像,用图像分析软件分析其蛋白表达。

2.4 统计学处理

实验数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据分析在 SPSS22.0 统计软件包上进行,多组间的相关数据比较分析采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学差异。

3 实验结果

3.1 芪苈参萸益心方对 MI 大鼠心功能的影响

模型组大鼠 LVSP、LV + dp/dtmax、LV-dp/dtmin 显著降低,LVEDP 明显升高,与假手术组大鼠比较具有显著性差异($P < 0.01$);用芪苈参萸益心方(28.8、57.6 g/kg)和地尔硫卓(0.016 g/kg)治疗后,各给药组 LVSP、LV + dp/dtmax、LV-dp/dtmin 显著升高,LVEDP 明显降低,且随着芪苈参萸益心方剂量的增加,其作用效果愈加显著,与模型组比较具有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中芪苈参萸益心方 57.6 g/kg 组作用效果强于地尔硫卓组(0.016 g/kg),但各组之间心率没有明显的差异,结果见表 2。

3.2 芪苈参萸益心方对 MI 大鼠血液中 ROS、LDH 和氧化应激指标的影响

模型组大鼠血液中 LDH 活性和 ROS、MDA 含量明显增加,SOD、CAT 和 GSH-Px 活性显著降低,与假手术组大鼠比较具有显著性差异($P < 0.01$);用芪苈参萸益心方(28.8、57.6 g/kg)和地尔硫卓

表 2 芪苈参萸益心方对 MI 大鼠心功能的影响($\bar{x} \pm s, n = 16$)Table 2 Effects of Qili Shengyu Yixin Formula on cardiac function in rats with myocardial infarction ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	心率 HR (beats/min)	左心室收缩压 LVSP (mmHg)	左心室舒张 末压 LVEDP (mmHg)	左室内压上升 最大速率 LV + dp/dtmax (mmHg/s)	左室内压下降 最大速率 LV-dp/dtmin (mmHg/s)
假手术组 Sham group	-	426 ± 50	141.4 ± 6.4	2.70 ± 1.27	12 151 ± 2 005	8 376 ± 1 059
模型组 Model group	-	414 ± 29	122.3 ± 7.2 ^{##}	7.39 ± 1.33 ^{##}	7 004 ± 1 016 ^{##}	4 241 ± 1 201 ^{##}
芪苈参萸益心方组 Qili Shenyu Yixin Formula	28.8	431 ± 34	130.5 ± 6.3 *	5.68 ± 1.50 *	8 358 ± 1 095 *	5 697 ± 789 *
	57.6	421 ± 43	136.5 ± 6.8 **	4.13 ± 1.04 **	9 048 ± 1 033 **	6 375 ± 986 **
地尔硫卓组 Diltiazem	0.016	419 ± 41	135.4 ± 7.1 **	4.45 ± 1.14 **	8 652 ± 1 027 **	6 283 ± 722 **

注:与假手术组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;地尔硫卓组为阳性对照组;下同。

Note:^{##} $P < 0.01$ vs sham group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group; Diltiazem group is positive control group; The same as below tables and figures.

(0.016 g/kg) 治疗后,各给药组 LDH 活性和 ROS、MDA 含量明显降低,SOD、CAT 和 GSH-Px 活性显著升高,且随着芪苈参萸益心方剂量的增加,其作用效

果愈加显著,与模型组比较具有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中芪苈参萸益心方 57.6 g/kg 组作用效果强于地尔硫卓组(0.016 g/kg),结果见表 3。

表 3 芪苈参萸益心方对 MI 大鼠血液中 ROS、LDH 和氧化应激指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 16$)Table 3 Effects of Qili Shengyu Yixin Formula on the blood ROS, LDH and oxidative stress in rats with myocardial infarction ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	ROS (OD550nm)	LDH (U/mL)	SOD (U/mL)	GSH-Px (U/mL)	CAT (U/mL)	MDA (nmol/mL)
假手术组 Sham group	-	0.194 ± 0.026	91.87 ± 9.21	81.10 ± 7.83	39.59 ± 4.39	116.27 ± 10.67	1.709 ± 0.285
模型组 Model group	-	0.490 ± 0.063 ^{##}	253.04 ± 13.29 ^{##}	33.82 ± 5.74 ^{##}	15.82 ± 2.21 ^{##}	47.08 ± 5.43 ^{##}	6.504 ± 0.894 ^{##}
芪苈参萸益心方组 Qili Shenyu Yixin Formula	28.8	0.386 ± 0.055 *	187.66 ± 11.40 *	43.16 ± 5.04 *	19.71 ± 2.20 *	57.25 ± 6.10 *	4.968 ± 0.671 *
	57.6	0.295 ± 0.035 *	145.78 ± 17.24 *	69.71 ± 5.32 **	31.51 ± 3.60 **	92.30 ± 8.89 **	2.961 ± 0.378 **
地尔硫卓组 Diltiazem	0.016	0.330 ± 0.028 *	158.53 ± 16.84 *	54.91 ± 5.60 **	24.17 ± 3.04 **	74.42 ± 7.11 **	3.914 ± 0.420 **

3.3 芪苈参萸益心方对 MI 大鼠血液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 IL-4、IL-10 含量的影响

模型组大鼠血液中促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18 含量明显升高,抗炎因子 IL-4、IL-10 含量明显降低,与假手术组比较具有显著性差异($P < 0.01$);用芪苈参萸益心方(28.8 和 57.6 g/kg)和地

尔硫卓(0.016 g/kg) 治疗后,上述异常改变的细胞因子得到有效逆转,且随着芪苈参萸益心方剂量的增加,其作用效果愈加显著,与模型组比较具有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中芪苈参萸益心方 57.6 g/kg 组作用效果强于地尔硫卓组(0.016 g/kg),结果见表 4。

表 4 芪苈参萸益心方对 MI 大鼠血液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 IL-4、IL-10 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 16$)Table 4 Effects of Qili Shengyu Yixin Formula on the blood contents of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-4 and IL-10 in rats with myocardial infarction ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	TNF- α (ng/mL)	IL-1 β (ng/mL)	IL-6 (ng/mL)	IL-18 (ng/mL)	IL-4 (ng/mL)	IL-10 (ng/mL)
假手术组 Sham group	-	32.76 ± 3.30	21.69 ± 2.50	17.85 ± 2.93	30.09 ± 3.29	55.93 ± 6.89	88.20 ± 8.72
模型组 Model group	-	79.49 ± 8.85 ^{##}	49.80 ± 5.91 ^{##}	41.88 ± 5.30 ^{##}	62.05 ± 7.18 ^{##}	26.74 ± 4.32 ^{##}	39.45 ± 4.30 ^{##}
芪苈参萸益心方组 Qili Shenyu Yixin Formula	28.8	65.39 ± 6.83 *	41.67 ± 4.75 *	33.57 ± 3.88 *	51.83 ± 5.24 *	34.21 ± 5.59 *	58.16 ± 5.03 **
	57.6	41.78 ± 4.46 **	28.02 ± 2.79 **	25.54 ± 2.94 **	37.81 ± 4.83 **	47.60 ± 6.05 **	73.82 ± 7.65 **
地尔硫卓组 Diltiazem	0.016	64.33 ± 6.76 *	40.37 ± 5.79 *	32.19 ± 5.13 *	48.94 ± 6.33 *	36.88 ± 6.30 *	60.31 ± 6.79 **

3.4 芪苈参萸益心方对 MI 大鼠血液、心肌和溶酶体细胞器中溶酶体酶活性的影响

模型组大鼠血液、心肌中 β -葡萄糖醛酸酶、 β -半乳糖苷酶、组织蛋白酶 B、组织蛋白酶 D 活性和溶酶体细胞器胞质中 β -葡萄糖醛酸酶、组织蛋白酶 D 的活性明显升高,溶酶体细胞器溶酶体中 β -葡萄糖醛酸酶、组织蛋白酶 D 的活性明显降低,与假手术组

比较具有显著性差异 ($P < 0.01$);用芪苈参萸益心方 (28.8、57.6 g/kg) 和地尔硫卓 (0.016 g/kg) 治疗后,上述异常改变的溶酶体酶活性被有效逆转,且随着芪苈参萸益心方剂量的增加,其作用效果愈加显著,与模型组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中芪苈参萸益心方 57.6 g/kg 组作用效果强于地尔硫卓组 (0.016 g/kg),结果见表 5。

表 5 芪苈参萸益心方对 MI 大鼠血液、心肌和溶酶体细胞器中溶酶体酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 16$ 或 $n = 8$)

Table 5 Effects of Qili Shengyu Yixin Formula on activities of lysosomal in the blood, heart tissue and subcellular fractions in rats with myocardial infarction ($\bar{x} \pm s, n = 16$ or $n = 8$)

组别 Group	假手术组 Sham group	模型组 Model group	芪苈参萸益心方组 Qili Shengyu Yixin formula (g/kg)		地尔硫卓组 Diltiazem
			28.8	57.6	
血清溶酶体酶 Serum lysosomal enzymes					
β -葡萄糖醛酸酶 β -Glucuronidase (mM/h)	21.07 \pm 2.66	34.30 \pm 4.16 ^{##}	28.59 \pm 3.58 [*]	24.70 \pm 3.77 ^{**}	27.81 \pm 3.92 [*]
β -半乳糖苷酶 β -Galactosidase (mM/h)	18.90 \pm 3.03	32.30 \pm 4.12 ^{##}	26.01 \pm 3.81 [*]	21.82 \pm 2.71 ^{**}	25.00 \pm 4.10 [*]
组织蛋白酶-B Cathepsin-B (mM/h)	34.44 \pm 3.62	45.99 \pm 3.57 ^{##}	40.38 \pm 3.77 [*]	35.18 \pm 3.05 ^{**}	38.91 \pm 4.62 [*]
组织蛋白酶-D Cathepsin-D (mM/h)	26.11 \pm 2.16	42.49 \pm 3.08 ^{##}	37.66 \pm 2.90 [*]	28.81 \pm 2.79 ^{**}	35.20 \pm 4.16 [*]
心肌溶酶体酶 Heart lysosomal enzymes					
β -葡萄糖醛酸酶 β -Glucuronidase (100 mg/pro/h)	14.76 \pm 1.57	23.50 \pm 2.75 ^{##}	19.35 \pm 2.00 [*]	16.67 \pm 1.93 ^{**}	19.11 \pm 1.69 [*]
β -半乳糖苷酶 β -Galactosidase (100 mg/pro/h)	15.81 \pm 0.89	27.52 \pm 3.46 ^{##}	22.97 \pm 2.15 [*]	18.78 \pm 1.77 ^{**}	23.00 \pm 1.16 [*]
组织蛋白酶-B Cathepsin-B (100 mg/pro/h)	24.01 \pm 2.52	33.44 \pm 3.16 ^{##}	29.19 \pm 2.70 [*]	26.49 \pm 1.41 ^{**}	28.48 \pm 2.16 [*]
组织蛋白酶-D Cathepsin-D (100 mg/pro/h)	35.63 \pm 3.41	54.61 \pm 3.42 ^{##}	49.10 \pm 3.34 [*]	41.10 \pm 2.98 ^{**}	48.50 \pm 4.38 [*]
溶酶体酶(细胞器中) Lysosomal enzymes (subcellular fractions)					
溶酶体中 Lysosomal fraction					
β -葡萄糖醛酸酶 β -Glucuronidase (100 mg/pro/h)	26.51 \pm 2.23	15.16 \pm 1.01 ^{##}	17.74 \pm 1.77 [*]	23.50 \pm 1.68 ^{**}	17.55 \pm 1.84 [*]
组织蛋白酶-D Cathepsin-D (100 mg/pro/h)	26.12 \pm 2.24	16.35 \pm 1.78 ^{##}	18.98 \pm 1.58 [*]	23.21 \pm 1.96 ^{**}	19.90 \pm 2.00 [*]
胞质中 Cytosolic fraction					
β -葡萄糖醛酸酶 β -Glucuronidase (100 mg/pro/h)	15.63 \pm 1.68	44.48 \pm 3.71 ^{##}	39.17 \pm 2.52 [*]	27.63 \pm 1.24 ^{**}	38.01 \pm 3.29 [*]
组织蛋白酶-D Cathepsin-D (100 mg/pro/h)	9.97 \pm 1.42	19.29 \pm 1.44 ^{##}	15.53 \pm 2.32 [*]	12.86 \pm 0.95 ^{**}	15.94 \pm 1.98 [*]

3.5 芪苈参萸益心方对 MI 大鼠心脏重量指数和心肌梗死面积的影响

由图 1 和图 2 可见,模型组大鼠心脏重量指数和心肌梗死面积明显增加,与假手术组比较具有显著性差异 ($P < 0.01$);用芪苈参萸益心方 (28.8、57.6 g/kg) 和地尔硫卓 (0.016 g/kg) 治疗后,心脏重量指数和心肌梗死面积明显降低,且随着芪苈参萸益心方剂量的增加,其作用效果愈加显著,与模型组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中芪苈参萸益心方 57.6 g/kg 组作用效果强于地尔硫卓组 (0.016 g/kg)。

3.6 芪苈参萸益心方对 MI 大鼠心脏组织形态学的影响

如图 3 所示,假手术组大鼠心肌组织结构和形

态正常,核正常,无炎性细胞浸润;模型组大鼠心肌组织表现为广泛的心肌结构紊乱和破裂,心肌纤维呈坏死和波浪状,细胞核消失;用芪苈参萸益心方 (28.8、57.6 g/kg) 和地尔硫卓 (0.016 g/kg) 治疗后,可显著减少坏死程度和炎性细胞浸润,且随着芪苈参萸益心方剂量的增加,其作用效果愈加显著。

3.7 芪苈参萸益心方对 MI 大鼠心肌中 TLR4、MyD88、iNOS、COX-2 mRNA 表达的影响

模型组心肌组织中 TLR4、MyD88、iNOS、COX-2 mRNA 表达明显升高,与假手术组比较具有显著性差异 ($P < 0.01$);用芪苈参萸益心方 (28.8、57.6 g/kg) 和地尔硫卓 (0.016 g/kg) 治疗后,TLR4、MyD88、iNOS、COX-2 mRNA 表达明显降低,且随着芪苈参萸益心方剂量的增加,其作用效果愈加显著,与模型

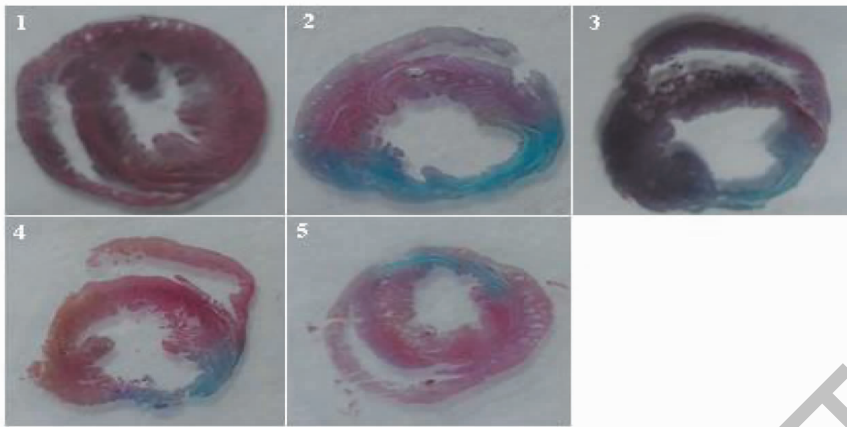


图 1 芪苈参萸益心方对 MI 大鼠心脏外观形态的影响

Fig. 1 Effects of Qili Shengyu Yixin Formula on cardiac appearance and morphology in rats with myocardial infarction
 注: 1: 假手术组; 2: 模型组; 3: 芪苈参萸益心方 28.8 g/kg 组; 4: 芪苈参萸益心方 57.6 g/kg 组; 5: 地尔硫卓组。Note: 1: Sham group; 2: Model group; 3: Qili Shengyu Yixin Formula 28.8 g/kg group; 4: Qili Shengyu Yixin Formula 57.6 mg/kg group; 5: Diltiazem group.

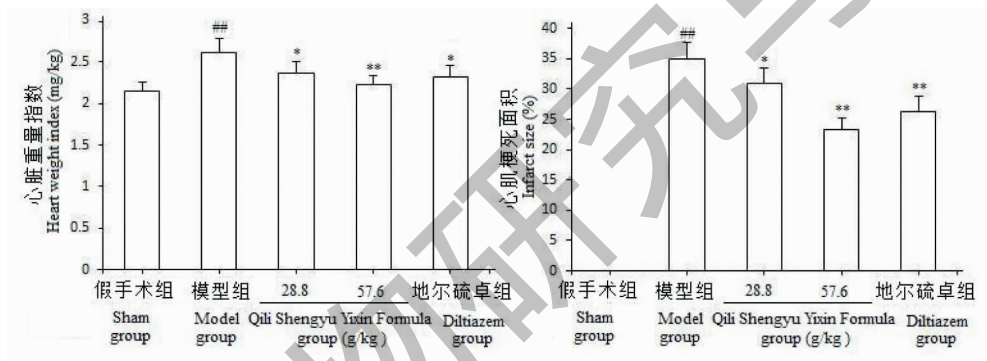


图 2 芪苈参萸益心方对 MI 大鼠心脏重量指数和心肌梗死面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effects of Qili Shengyu Yixin Formula on the cardiac weight index and myocardial infarct size in rats with myocardial infarction ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

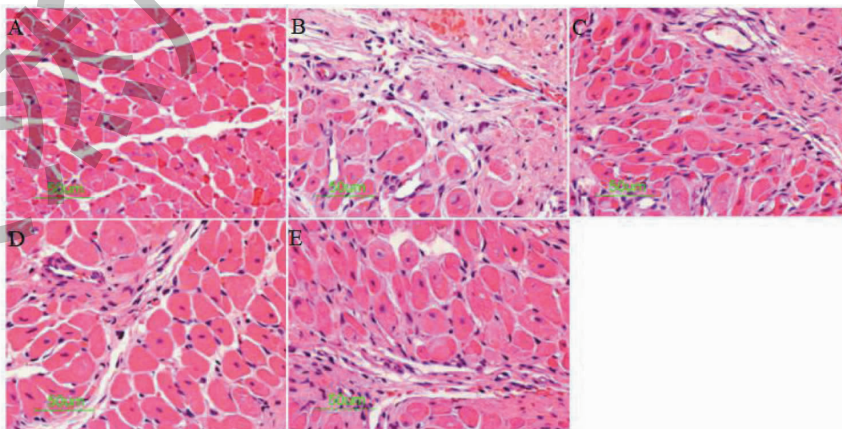


图 3 芪苈参萸益心方对 MI 大鼠心脏组织形态学的影响 (HE 染色)

Fig. 3 Effect of Qili Shengyu Yixin Formula on the histomorphology in rats with myocardial infarction (Hematoxylin and eosin)
 注: A: 假手术组; B: 模型组; C: 芪苈参萸益心方 28.8 g/kg 组; D: 芪苈参萸益心方 57.6 g/kg 组; E: 地尔硫卓组。Note: A: Sham group; B: Model group; C: Qili Shengyu Yixin Formula 28.8 g/kg group; D: Qili Shengyu Yixin Formula 57.6 mg/kg group; E: Diltiazem group.

组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中芪苈参萸益心方 57.6 g/kg 组作用效果强于地尔硫卓组 (0.016 g/kg), 结果见表 6。

表 6 芪苈参萸益心方对 MI 大鼠心肌中 TLR4、MyD88、iNOS、COX-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 6 Effect of Qili Shengyu Yixin Formula on the mRNA expressions of TLR4, MyD88, iNOS and COX-2 in myocardial tissue of rats with myocardial infarction ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	TLR4/ GAPDH	MyD88/ GAPDH	iNOS/ GAPDH	COX-2/ GAPDH
假手术组 Sham group	-	0.530 ± 0.053	0.603 ± 0.074	0.476 ± 0.071	0.391 ± 0.087
模型组 Model group	-	1.725 ± 0.163 ^{##}	1.523 ± 0.139 ^{##}	1.361 ± 0.136 ^{##}	1.845 ± 0.207 ^{##}
芪苈参萸益心方组 Qili Shenyu Yixin Formula	28.8	1.474 ± 0.122 *	1.323 ± 0.111 *	1.198 ± 0.078 *	1.562 ± 0.150 *
	57.6	0.855 ± 0.113 * *	0.793 ± 0.087 * *	0.756 ± 0.091 * *	0.931 ± 0.128 * *
地尔硫卓组 Diltiazem	0.016	1.461 ± 0.104 *	1.254 ± 0.151 *	1.175 ± 0.102 *	1.502 ± 0.136 *

3.8 芪苈参萸益心方对 MI 大鼠心肌中 NF- κ B/NLRP3 炎症小体信号通路相关蛋白表达的影响

模型组心肌中胞浆 p-IKK β 、p-I κ B α 、NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1、TXNIP、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 和胞核 NF- κ Bp65 蛋白表达明显上调, p-IKK β /IKK β 和 p-I κ B α /I κ B α 比值明显增加, 胞浆 NF- κ Bp65 蛋白表达明显下调, 与假手术组比较具有显著性差异 ($P < 0.01$); 用芪苈参萸益心方 (28.8、57.6 g/kg) 和地尔硫卓 (0.016 g/kg) 治疗后, 心肌

组织中胞浆 p-IKK β 、p-I κ B α 、NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1、TXNIP、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 和胞核 NF- κ Bp65 蛋白表达明显下调, p-IKK β /IKK β 和 p-I κ B α /I κ B α 比值明显减少, 胞浆 NF- κ Bp65 蛋白表达明显上调, 且随着芪苈参萸益心方剂量的增加, 其作用效果愈加显著, 与模型组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组间 IKK β 和 I κ B α 蛋白表达无显著性差异 ($P > 0.05$), 结果见表 7~9 和图 4。

表 7 芪苈参萸益心方对 MI 大鼠心肌中 IKK 复合物中相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 7 Effect of Qili Shengyu Yixin Formula on the IKK complex related protein expressions in myocardial tissue of rats with myocardial infarction ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	p-IKK β / β -actin	IKK β / β -actin	p-IKK β /IKK β	p-I κ B α / β -actin	I κ B α / β -actin	p-I κ B α /I κ B α
假手术组 Sham group	-	0.091 ± 0.012	0.431 ± 0.064	0.214 ± 0.033	0.161 ± 0.025	0.543 ± 0.062	0.299 ± 0.054
模型组 Model group	-	0.457 ± 0.058 ^{##}	0.408 ± 0.046	1.117 ± 0.047 ^{##}	0.403 ± 0.046 ^{##}	0.563 ± 0.071	0.723 ± 0.115 ^{##}
芪苈参萸益心方组 Qili Shenyu Yixin Formula	28.8	0.371 ± 0.049 *	0.421 ± 0.058	0.885 ± 0.086 * *	0.342 ± 0.027 *	0.533 ± 0.048	0.535 ± 0.065 *
	57.6	0.148 ± 0.025 * *	0.398 ± 0.041	0.375 ± 0.076 * *	0.219 ± 0.030 * *	0.515 ± 0.066	0.437 ± 0.117 * *
地尔硫卓组 Diltiazem	0.016	0.347 ± 0.013 *	0.413 ± 0.058	0.849 ± 0.116 * *	0.334 ± 0.029 *	0.579 ± 0.056	0.573 ± 0.020 *

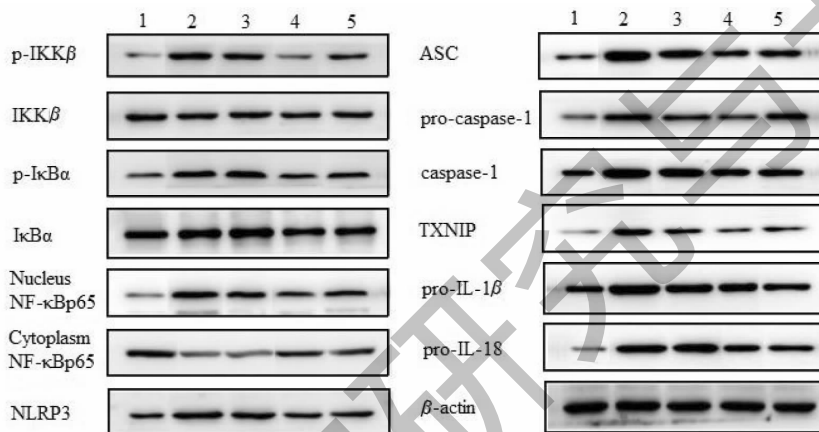
表 8 芪苈参萸益心方对 MI 大鼠心肌中 NF- κ B/NLRP3 炎症小体信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 8 Effect of Qili Shengyu Yixin Formula on the protein expressions of NF- κ B/NLRP3 signaling pathway in myocardial tissue of rats with myocardial infarction ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	Nucleus NF- κ Bp65 / β -actin	Cytoplasm NF- κ Bp65 / β -actin	NLRP3 / β -actin	ASC / β -actin	pro-caspase-1 / β -actin
假手术组 Sham group	-	0.116 ± 0.013	0.509 ± 0.074	0.235 ± 0.016	0.250 ± 0.043	0.150 ± 0.027
模型组 Model group	-	0.535 ± 0.077 ^{##}	0.122 ± 0.020 ^{##}	0.518 ± 0.068 ^{##}	0.651 ± 0.89 ^{##}	0.570 ± 0.076 ^{##}
芪苈参萸益心方组 Qili Shenyu Yixin Formula	28.8	0.422 ± 0.058 *	0.203 ± 0.046 * *	0.433 ± 0.031 *	0.478 ± 0.079 *	0.457 ± 0.053 *
	57.6	0.263 ± 0.033 * *	0.421 ± 0.067 * *	0.314 ± 0.048 * *	0.341 ± 0.053 * *	0.365 ± 0.045 * *
地尔硫卓组 Diltiazem	0.016	0.331 ± 0.051 * *	0.346 ± 0.046 * *	0.395 ± 0.060 *	0.434 ± 0.079 * *	0.437 ± 0.062 *

表9 芪苈参萸益心方对 MI 大鼠心肌中炎症因子蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)Table 9 Effect of Qili Shengyu Yixin Formula on the protein expressions of inflammatory factors in myocardial tissue of rats with myocardial infarction ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	caspase-1 / β -actin	TXNIP / β -actin	pro-IL-1 β / β -actin	pro-IL-18 / β -actin
假手术组 Sham group	-	0.193 \pm 0.032	0.109 \pm 0.019	0.357 \pm 0.047	0.111 \pm 0.019
模型组 Model group	-	0.531 \pm 0.063 ^{##}	0.357 \pm 0.031 ^{##}	0.997 \pm 0.181 ^{##}	0.724 \pm 0.075 ^{##}
芪苈参萸益心方组 Qili Shenyu Yixin Formula	28.8	0.445 \pm 0.047 [*]	0.270 \pm 0.036 ^{**}	0.636 \pm 0.060 ^{**}	0.533 \pm 0.069 ^{**}
	57.6	0.383 \pm 0.039 ^{**}	0.179 \pm 0.027 ^{**}	0.481 \pm 0.022 ^{**}	0.336 \pm 0.054 ^{**}
地尔硫卓组 Diltiazem	0.016	0.427 \pm 0.051 [*]	0.289 \pm 0.043 [*]	0.592 \pm 0.055 ^{**}	0.520 \pm 0.062 ^{**}

图4 芪苈参萸益心方对 MI 大鼠心肌中 NF- κ B/NLRP3 炎症小体信号通路相关蛋白表达的影响Fig. 4 Effect of Qili Shengyu Yixin Formula on the protein expressions of NF- κ B/NLRP3 signaling pathway in myocardial tissue of rats with myocardial infarction

注:1:假手术组;2:模型组;3:芪苈参萸益心方 28.8 g/kg 组;4:芪苈参萸益心方 57.6 g/kg 组;5:地尔硫卓组。Note:1:Sham group;2:Model group;3:Qili Shengyu Yixin Formula 28.8g/kg group;4:Qili Shengyu Yixin Formula 57.6 mg/kg group;5:Diltiazem group.

4 讨论

MI 后炎症是近年来心血管研究的热点,它影响缺血心脏的重塑过程,从而严重影响患者的临床预后。适度的炎症反应可以缩小心肌梗死范围,促进受损心肌的修复,然而过度炎症可能产生有害影响,并可能导致与心力衰竭风险增加相关的不良室重塑^[20]。因此,减轻炎症反应在改善 MI 心肌损伤,促进心肌功能恢复中具有重要意义。近年来,我们在临床试验和动物的实验研究时发现,芪苈参萸益心方对心肌损伤具有较好的治疗作用,并证实抑制心肌细胞凋亡和氧化应激损伤恢复受损心肌功能可能是其发挥作用机制之一^[14,15]。本实验将在此基础上,通过冠脉结扎诱导的大鼠 MI 模型,观察芪苈参萸益心方对炎症反应、溶酶体功能和炎症小体活性的影响,在此基础上探寻其可能的作用机制,为此我

们进行了本实验。实验结果表明,芪苈参萸益心方可显著改善 MI 大鼠心功能、降低心脏重量指数和梗死面积,减少心肌坏死程度和炎性细胞浸润;降低血清、心肌中 β -葡萄糖醛酸酶、 β -半乳糖苷酶、组织蛋白酶 B、组织蛋白酶 D 活性和溶酶体细胞器胞质中 β -葡萄糖醛酸酶、组织蛋白酶 D 的活性,升高溶酶体细胞器溶酶体中 β -葡萄糖醛酸酶、组织蛋白酶 D 的活性;降低血液中 LDH 活性、ROS、MDA 和 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18 含量,升高血液中 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性和 IL-4、IL-10 含量;下调心肌中 iNOS、COX-2、TLR4、MyD88 mRNA 表达,下调心肌胞浆中 p-IKK β 、p-I κ B α 、NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1、TXNIP、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 和胞核 NF- κ Bp65 蛋白表达,降低 p-IKK β /IKK β 和 p-I κ B α /I κ B α 比值,上调心肌胞浆中 NF- κ Bp65 蛋白表达。

上述结果表明,芪芩参萸益心方可通过抑制炎症反应、溶酶体功能和炎症小体激活功能来发挥对 MI 大鼠的治疗作用。

众所周知,ROS 的产生是细胞正常代谢的一部分,此时产生的 ROS 会被细胞内的内源性抗氧化系统所清除,但是当细胞缺氧所致氧化应激会引起 ROS 的过量产生和异常积累,会导致膜脂类、蛋白质、碳水化合物和 DNA 的氧化损伤。因此 ROS 也被认为是心肌损伤的关键因子^[21]。ROS 攻击细胞膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化,破坏细胞膜的完整性,导致 LDH 等心肌酶渗漏,MDA 是膜脂过氧化的最终分解产物,其含量可以反映细胞膜结构和功能上受到损伤的程度^[22]。在本研究中,MI 大鼠血液中 ROS、MDA 含量和 LDH 活性较假手术组显著升高,SOD、GSH-Px、CAT 活性明显降低。上述结果提示 MI 引起的心肌损伤导致氧化应激发生。芪芩参萸益心方可显著升高血液中 SOD、GSH-Px 和 CAT 活性,降低 LDH 活性和 ROS、MDA 含量,减轻心肌细胞的脂质过氧化,进而保持细胞膜结构和功能的完整性。总之,芪芩参萸益心方主要通过提高抗氧化酶活性来保护 MI 所致的心肌损伤。

心肌缺血时产生的 ROS 除了破坏细胞膜的细胞膜结构和功能外,还可与溶酶体脂质双层膜反应,破坏溶酶体膜的稳定性,导致溶酶体破裂,酸性水解酶和组织蛋白酶释放到胞浆和循环中。酸水解酶从溶酶体释放到胞质中,导致缺血心脏的心肌细胞损伤和死亡^[23]。在实验中,模型组大鼠血清、心肌中 β -葡萄糖醛酸酶、 β -半乳糖苷酶、组织蛋白酶 B、组织蛋白酶 D 活性和溶酶体细胞器胞质中 β -葡萄糖醛酸酶、组织蛋白酶 D 的活性明显升高,溶酶体细胞器溶酶体中 β -葡萄糖醛酸酶、组织蛋白酶 D 的活性明显降低;用芪芩参萸益心方治疗后可有效抑制 β -葡萄糖醛酸酶、 β -半乳糖苷酶、组织蛋白酶 B、组织蛋白酶 D 从溶酶体渗漏。

越来越多的证据表明炎症在 MI 的病理生理过程中起着至关重要的作用^[24]。在缺氧条件下,心肌氧化应激产生 H_2O_2 、超氧阴离子和羟基自由基等一方面被心肌细胞膜上的模式识别受体 (PRR) TLR4 识别,随后募集下游的信号蛋白 MyD88,形成 MyD88-TLR4 复合物,MyD88 的死亡结构域与 IRAK 的死亡结构域结合从而依次引起 IRAK1 和 IRAK4 的自磷酸化,随后离开 MyD88-TLR4 复合物而与 TRAF6 结合,导致 TRAF6 激活,而 TRAF6 又激活

TAK1;TAK1 激活 IKK 复合物,IKK 复合物被激活后可使其下游分子 I κ B 降解,从而释放 NF- κ B 的 2 个亚基:p50 和 p65,并使 p65 亚基磷酸化,磷酸化 p65 在有核定位信号 p50 的帮助下进入细胞核,从而启动炎症反应免疫相关基因转录,表达与分泌 IL-6、TNF- α 炎症因子及无活性的 pro-IL-1 β 、pro-IL-18 和 NLRP3 产生,完成炎症反应信号的传递,参与炎性激活、细胞凋亡等病理过程^[25,26]。另一方面进入心肌细胞后可被细胞质中 PRR:NLRP3 所识别并促进细胞内 TXNIP 与硫氧蛋白分离,然后与 NLRP3 结合,使 NLRP3 募集 ASC 和 pro-caspase-1,完成无活性的 NLRP3 炎症小体组装;同时还可引起线粒体损伤和溶酶体破裂,导致线粒体内容物 (mtROS 和 mtDNA) 的释放或暴露,溶酶体释放组织蛋白酶 B,促进 NLRP3 炎症小体结合并将其激活,诱导 pro-caspase-1 自我剪切活化,活化的 caspase-1 使 pro-IL-1 β 、pro-IL-18 剪切为活化的 IL-1 β 、IL-18,活化的 IL-1 β 、IL-18 刺激心肌细胞,通过自分泌/旁分泌系统分泌多种更多炎症介质、炎症因子,形成恶性循环^[2,27,28]。由此可见,TLR4/NF- κ B 通路及下游 NLRP3 炎症小体途径掌控着 MI 炎症反应,靶向此通路可为 MI 的治疗提供新思路。实验中,我们发现 MI 模型大鼠心肌组织中 TLR4、MyD88、iNOS、COX-2 mRNA 和心肌组织胞浆中 p-IKK β 、p-I κ B α 、NLRP3、ASC、pro-caspase-1、caspase-1、TXNIP、pro-IL-1 β 、pro-IL-18 和胞核 NF- κ Bp65 蛋白表达明显上调,p-IKK β /IKK β 和 p-I κ B α /I κ B α 比值明显增加,胞浆 NF- κ Bp65 蛋白表达明显下调;血液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18 含量明显升高,IL-4、IL-10 含量明显降低;用芪芩参萸益心方治疗后上述异常表达得到了有效遏制,实验提示芪芩参萸益心方可通过抑制 TLR4/NF- κ B/NLRP3 炎症小体信号通路炎性激活,进而抑制炎症因子发生发挥对 MI 的治疗作用。

综上所述,芪芩参萸益心方对冠脉结扎诱导的大鼠 MI 有显著治疗作用,其作用机制可能与其增强内源性抗氧化系统功能、缓解 MI 后氧化应激及减轻炎症反应、纠正溶酶体功能障碍和抑制 NLRP3 炎症小体激活有关。本研究为芪芩参萸益心方治疗 MI 提供了分子生物学依据。

参考文献

- 1 Tanaka T, Ozaki K. Inflammation as a risk factor for myocardial infarction[J]. J Hum Genet, 2006, 51: 595-604.

- 2 Nagoor Meeran MF, Azimullah S, Laham F, et al. α -Bisabolol protects against β -adrenergic agonist-induced myocardial infarction in rats by attenuating inflammation, lysosomal dysfunction, NLRP3 inflammasome activation and modulating autophagic flux[J]. *Food Funct*, 2020, 11(1):965-976.
- 3 Mari Kannan M, Darlin Quine S. Pharmacodynamics of ellagic acid on cardiac troponin-T, lysosomal enzymes and membrane bound ATPases: mechanistic clues from biochemical, cytokine and *in vitro* studies[J]. *Chem Biol Interact*, 2011, 193:154-161.
- 4 Chen Y, Li X, Boini KM, et al. Endothelial Nlrp3 inflammasome activation associated with lysosomal destabilization during coronary arteritis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1853:396-408.
- 5 Welman E, Selwyn AP, Peters TJ, et al. Plasma lysosomal enzyme activity in acute myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res*, 1978, 12(2):99-105.
- 6 Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340:115-126.
- 7 Cusack MR, Marber MS, Lambiase PD, et al. Systemic inflammation in unstable angina is the result of myocardial necrosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39:1917-1923.
- 8 Fann DY, Lim YA, Cheng YL, et al. Evidence that NF- κ B and MAPK signaling promotes NLRP inflammasome activation in neurons following ischemic stroke [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55:1082-1096.
- 9 Yang J, Wang HX, Zhang YJ, et al. Astragaloside IV attenuates inflammatory cytokines by inhibiting TLR4/NF- κ B signaling pathway in isoproterenol-induced myocardial hypertrophy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150:1062-1070.
- 10 Liu DL, Zeng X, Li X, et al. Advances in the molecular mechanisms of NLRP3 inflammasome activators and inactivators [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 175:113863.
- 11 Zhou R, Tardivel A, Thorens B, et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11:136-140.
- 12 Liu YY, Zhang JH. Treatment of 102 cases of chronic heart failure with Qili Shanyu Xinshuai formula [J]. *J Tradit Chin Med (中医杂志)*, 2008, 49(7):630.
- 13 Liu YY, Zhang JH. Treatment of 50 cases of chronic heart failure with Qiliqiangxin capsule [J]. *Hubei J Tradit Chin Med (湖北中医杂志)*, 2011, 33(1):34-35.
- 14 Liu YY, Chen T, Zhang JH, et al. Qili Shanyu Xinshuai decoction on left ventricular reconstruction in rats with congestive heart failure [J]. *J Hubei Univ Chin Med (湖北中医药大学学报)*, 2010, 12(3):7-9.
- 15 Zhang JH, Lu C, Shi MQ, et al. Effects of Qili Shenyu Yixinfang on Sirt1/FoxO1/Pgc-1 alpha and Nrf2/antioxidant pathways in rats with congestive heart failure [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床)*, 2019, 35(2):108-115.
- 16 Wei N, Zhang C C, He HB, et al. Protective effect of saponins extract from *Panax japonicus* on myocardial infarction; involvement of NF- κ B, Sirt1 and mitogen-activated protein kinase signalling pathways and inhibition of inflammation [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2014, 66:1641-1651.
- 17 Hayashi I, Morishita Y, Imai K, et al. High-throughput spectrophotometric assay of reactive oxygen species in serum [J]. *Mutat Res*, 2007, 631(1):55-61.
- 18 Sathish V, Ebenezer KK, Devaki T. Synergistic effect of nicorandil and amlodipine on lysosomal hydrolases during experimental myocardial infarction in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2003, 57:309-313.
- 19 Nagoor Meeran MF, Jagadeesh GS, Selvaraj P. Thymol attenuates inflammation in isoproterenol induced myocardial infarcted rats by inhibiting the release of lysosomal enzymes and downregulating the expressions of proinflammatory cytokines [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 754:153-161.
- 20 Iking J, Klose J, Staniszevska M, et al. Imaging inflammation after myocardial infarction; implications for prognosis and therapeutic guidance [J]. *Q J Nucl Med Mol Im*, 2020, 64(1):35-50.
- 21 Zhao ZG, Tang ZZ, Zhang WK, et al. Inactivated *Pseudomonas aeruginosa* protects against myocardial ischemia reperfusion injury via Nrf2 and HO-1 [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19:3362-3368.
- 22 Han H, Dai DP, Hu JQ, et al. Dexmedetomidine improves cardiac function and protects against maladaptive remodeling following myocardial infarction [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20:5183-5189.
- 23 Kiernan EA, Smith SM, Mitchell GS, et al. Mechanisms of microglial activation in models of inflammation and hypoxia; Implications for chronic intermittent hypoxia [J]. *J Physiol*, 2016, 594:1563-1677.
- 24 Takahashi M. Role of NLRP3 inflammasome in cardiac inflammation and remodeling after myocardial infarction [J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42:518-523.
- 25 Xu GR, Zhang C, Yang HX, et al. Modified citrus pectin ameliorates myocardial fibrosis and inflammation via suppressing galectin-3 and TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, doi: 10. 1016/j. biopha. 2020. 110071.