

· MIRI 专题研究 ·

瓜蒌薤白半夏汤预处理对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠的心肌保护作用及机制研究

扫描二维码
查看更多翁锦龙¹, 熊尚全¹, 江澍², 郑峰¹, 林超¹, 赵利¹

【摘要】 目的 探讨瓜蒌薤白半夏汤对心肌缺血再灌注损伤(MIRI)模型大鼠的心肌保护作用及机制。方法 本实验时间为2022年2月至2023年2月。采用随机数字表法将40只大鼠分为假手术组(A组)、模型组(B组)、瓜蒌薤白半夏汤组(C组)、核因子 κ B(NF- κ B)抑制剂组(D组),每组10只。C组、D组大鼠给予瓜蒌薤白半夏汤预处理, A组、B组大鼠给予等量0.9%氯化钠溶液预处理, 四组均连续干预7 d; A组大鼠于末次给药后1 h开胸, 但不结扎; B组、C组、D组大鼠于末次给药后1 h制备MIRI模型(采用左前降支结扎法制备), 其中D组大鼠于再灌注前10 min腹腔注射吡咯烷二硫代甲酸铵。比较四组大鼠心肌梗死面积百分比、心肌组织形态学、血清炎症因子(IL-1 β 、TNF- α)水平、血清氧化应激指标[丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、乳酸脱氢酶(LDH)]、心肌组织超微结构及心肌组织Toll样受体4(TLR4)、NF- κ B p65蛋白表达水平、mRNA相对表达量。结果 B组大鼠心肌梗死面积百分比高于A组, C组和D组大鼠心肌梗死面积百分比低于B组, D组心肌梗死面积百分比高于C组($P<0.05$)。HE染色结果显示, C组大鼠心肌组织纤维排列、心肌组织形态改变、横纹结构改变均优于B组; D组大鼠细胞核散落在外侧明显。Masson染色结果显示, B组大鼠心肌细胞排列紊乱, 少部分胶原纤维染色阳性; C组和D组大鼠心肌细胞排列较规则, 几乎无胶原纤维染色阳性。B组大鼠血清IL-1 β 、TNF- α 、MDA水平及LDH活性高于A组, 血清SOD活性低于A组($P<0.05$); C组和D组大鼠血清IL-1 β 、TNF- α 、MDA水平及LDH活性低于B组, 血清SOD活性高于B组($P<0.05$); D组大鼠血清IL-1 β 、TNF- α 、MDA水平及LDH活性低于C组, 血清SOD活性高于C组($P<0.05$)。透射电镜扫描结果显示, B组大鼠细胞质中存在较多空泡, 自噬体较多, C组大鼠细胞质中可见少数自噬泡, D组大鼠细胞质部分呈空泡化。B组大鼠心肌组织TLR4、NF- κ B p65蛋白表达水平、mRNA相对表达量高于A组, C组和D组大鼠心肌组织TLR4、NF- κ B p65蛋白表达水平、mRNA相对表达量低于B组, D组大鼠心肌组织TLR4、NF- κ B p65蛋白表达水平、mRNA相对表达量低于C组($P<0.05$)。结论 瓜蒌薤白半夏汤预处理可减轻炎症反应、氧化应激及抑制心肌细胞自噬小体产生, 进而缩小MIRI模型大鼠心肌梗死面积, 保护心肌细胞, 其机制可能与瓜蒌薤白半夏汤抑制TLR4/NF- κ B信号通路有关。

【关键词】 心肌缺血再灌注损伤; 瓜蒌薤白半夏汤; 核因子 κ B; 药理作用分子作用机制; 大鼠

【中图分类号】 R 542.2 **【文献标识码】** A DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2023.00.315

Protective Effect and Mechanism of Pretreatment of Gualou Xiebai Banxia Decoction on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury Model Rats

WENG Jinlong¹, XIONG Shangquan¹, JIANG Shu², ZHENG Feng¹, LIN Chao¹, ZHAO Li¹
1. Department of Cardiology, People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350000, China

2. College of Integrated Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350000, China

Corresponding author: WENG Jinlong, E-mail: 2565260728@qq.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the protective effect and mechanism of pretreatment of Gualou Xiebai Banxia decoction on myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) model rats. **Methods** This experiment was conducted from February 2022 to February 2023. A total of 40 rats were divided into sham group (A group), model group (B group), Gualou Xiebai Banxia decoction group (C group), and nuclear factor- κ B (NF- κ B) inhibitor group (D group) using random number table method, 10 rats in each group. Rats in groups C and D were pretreated with Gualou Xiebai Banxia decoction, while rats in groups

基金项目: 2020年福建省自然科学基金项目(卫生联合资助项目)(福建中医药大学2020年新上福建省科技计划项目-自然科学基金项目)(2020J011045)

作者单位: 1.350000福建省福州市, 福建中医药大学附属人民医院心血管内科 2.350000福建省福州市, 福建中医药大学中西医结合学院

通信作者: 翁锦龙, E-mail: 2565260728@qq.com

A and B were pretreated with an equal amount of 0.9% sodium chloride solution. All four groups were continuously intervened for 7 days. Rats in group A underwent thoracotomy at 1 hour after the last administration, but were not ligated; while rats in groups B, C, and D were used to prepare MIRI models using the left anterior descending branch ligation method at 1 hour after the last administration. Rats in group D were intraperitoneally injected with ammonium pyrrolidine dithioformate at 10 minutes before reperfusion. The percentage of myocardial infarction area, myocardial tissue morphology, serum inflammatory factor (IL-1 β and TNF- α) levels, serum oxidative stress indicators [malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), lactate dehydrogenase (LDH)], myocardial tissue ultrastructure, Toll like receptor 4 (TLR4), NF- κ B p65 protein expression level and relative mRNA expression level in myocardial tissue were compared in the four groups of rats. **Results** The percentage of myocardial infarction area in group B was higher than that in group A, the percentage of myocardial infarction area in groups C and D was lower than that in group B, while the percentage of myocardial infarction area in group D was higher than that in group C ($P < 0.05$). The HE staining results showed that the fiber arrangement, morphological changes, and transverse structural changes of myocardial tissue in group C were superior to those in group B, and the nuclei of group D were scattered and obvious on the outer side. The results of Masson staining showed that the arrangement of myocardial cells in group B was disordered, and a few collagen fibers were positively stained; the arrangement of cells in groups C and D was relatively regular, with almost no positive staining of collagen fibers. Serum levels of IL-1 β , TNF- α , MDA and serum LDH activity in group B were higher than those in group A, while the serum SOD activity was lower than that in group A ($P < 0.05$); serum levels of IL-1 β , TNF- α , MDA and serum LDH activity in groups C and D were lower than those in group B, while the serum SOD activity was higher than that in group B ($P < 0.05$); serum levels of IL-1 β , TNF- α , MDA and serum LDH activity in group D were lower than those in group C, while the serum SOD activity was higher than that in group C ($P < 0.05$). The scanning results of the projection electron microscope showed that there were many vacuoles and autophagosomes in the cytoplasm of group B, a few autophagosomes in the cytoplasm of group C, and partial cytoplasmic vacuolization of group D. The protein expression level and mRNA relative expression level of TLR4 and NF- κ B p65 in myocardial tissue of group B were higher than those of group A, the protein expression level and mRNA relative expression level of TLR4 and NF- κ B p65 in myocardial tissue of groups C and D were lower than those of group B, while the protein expression level and mRNA relative expression level of TLR4 and NF- κ B p65 in myocardial tissue of group D were lower than those of group C ($P < 0.05$). **Conclusion** Pretreatment of Gualou Xiebai Banxia decoction can reduce inflammatory response, oxidative stress, and inhibit the production of autophagosomes in myocardial cells, thereby reducing the myocardial infarction area and protecting myocardial cells in MIRI model rats. Its mechanism may be related to the inhibition of TLR4/NF- κ B signal pathway by Gualou Xiebai Banxia decoction.

【Key words】 Myocardial ischemia reperfusion injury; Gualou Xiebai Banxia decoction; Nuclear factor- κ B; Molecular mechanisms of pharmacological action; Rats

心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI) 指急性阻塞的冠状动脉血运重建后造成不可逆损伤的病理过程, 其可危及患者的生命安全, 且具有较高的致死率^[1]。近年来缺血性心脏病已逐渐成为心血管疾病患者的重要死亡原因之一^[2], 而血运重建是恢复心肌供血最直接、有效的治疗手段, 但其常伴随再灌注损伤, 进而影响血运重建效果^[3]。同时, MIRI还是急性心肌梗死患者预后不良的关键影响因素, 与后期心力衰竭的发生密切相关^[4]。因此, 如何有效防治MIRI以提高心肌缺血救治效果是当前亟需解决的临床问题。研究表明, 核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 信号通路与心肌缺血损伤关系密切, 而Toll样受体4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 是其上游因子, 故TLR4/NF- κ B信号通路可作为中医药防治MIRI的靶点^[5]。

瓜蒌薤白半夏汤是医圣张仲景基于“阳微阴弦”病机理论创立的治疗“胸痹病”的经典名方, 研究表明, 该方可通过减轻炎症反应、抑制自噬、改善细胞凋亡等机制而减轻心肌细胞损伤, 具有良好的心肌保护作用, 且应用前景广泛^[5]。但瓜蒌薤白半夏汤的心肌保护作用机制尚需要进一步

挖掘。本研究以瓜蒌薤白半夏汤为干预药物, 旨在探究其对MIRI模型大鼠的心肌保护作用及机制, 以期发掘经方提供有价值的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验时间 本实验时间为2022年2月至2023年2月。

1.2 实验动物 选取健康雄性SD大鼠40只, SPF级, 购自斯贝福(北京)生物技术有限公司, 体质量(300 \pm 20)g, 动物许可证号: SCXK(京)2019-0010。在动物实验中心分笼饲养(5只/笼), 大鼠可自由饮水, 普通饲料喂养, 不限制进食, 饲养温度控制在18~22 $^{\circ}$ C, 相对湿度为40%~70%, 12h/12h明暗昼夜循环, 实验操作均符合动物伦理要求。

1.3 主要实验药物、试剂及仪器

1.3.1 药物 制备瓜蒌薤白半夏汤^[6], 具体药材如下: 瓜蒌24g, 薤白9g、半夏12g; 统一由福建中医药大学附属人民医院中药房采购, 药材均为同一批次, 将药材放于2L白酒(市售的米酒头, 酒精含量35%)中, 搅拌后浸泡0.5~1.0h以充分浸泡药材, 加入适量水, 开启自动煎药机统一煎煮, 按成人(70kg)每日剂量换算, 浓缩成含生药1.3g/ml的水煎液,

4 ℃条件下保存备用。

1.3.2 试剂 吡咯烷二硫代氨基甲酸 (pyrrolidinedithiocarbamate, PDTC) (生产批号: BM000043)、兔抗TLR4抗体 (货号: 66350-1-Ig)、兔抗NF- κ B抗体 (货号: 66535-1-Ig)、GAPDH (货号: 60004-1-Ig)、山羊抗兔HRP二抗 (货号: SA00001-2)、IL-1 β 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (货号: KE20005)、TNF- α ELISA试剂盒 (货号: KE20018) 均购自Proteintech公司, PVDF膜 (货号: AR0136-02)、RIPA裂解液 (货号: AR0102)、蛋白酶抑制剂 (货号: AR1178)、BCA蛋白定量试剂盒 (货号: AR0198)、超敏ECL化学发光即用型底物 (货号: AR1111) 均购自武汉博士德生物工程有限公司, 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 测试盒 (货号: A001-3)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 测定试剂盒 (货号: A003-1)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒 (货号: A020-2) 均购自南京建成生物工程研究所。

1.3.3 仪器 DYCP-31DN型电泳仪 (北京六一生物技术有限公司), 冷冻离心机 (广州吉迪仪器有限公司, JID-17R), 凝胶成像系统 (上海培清科技有限公司, JS-2012), 透射电镜 (日本日立公司, HT7700), SpectraMax酶标仪 (上海美谷分子仪器有限公司, CMax Plus), 分光光度计 (杭州米欧仪器有限公司, ND-100c), 梯度PCR仪 (杭州米欧仪器有限公司, MV-C155-ov71), RT-PCR仪 (北京鲲鹏基因科技有限责任公司, Archimed X6)。

1.4 实验方法

1.4.1 MIRI模型制备 采用左前降支结扎法制备MIRI模型^[7], 具体如下: 腹腔注射2%戊巴比妥钠溶液以麻醉大鼠, 取仰卧位固定, 在其四肢皮下插入针电极并连接心电图仪, 待波形稳定后行气管插管, 然后连接小动物呼吸机 (潮气量5 ml/100 g, 频率60~80次/min)。胸部皮肤消毒备皮, 沿胸骨左缘第3~4肋处剪开肋间皮肤, 逐层暴露心脏, 在左心耳下方约2 mm处穿进6-0带线缝合针并穿过心肌表层, 在肺动脉圆锥旁出针, 将直径1.5 mm的硅胶管放在结扎线与左前降支血管之间。结扎线系紧时, 左前降支受硅胶管压迫而闭塞。心尖及左心室前壁变白, 心电图检查显示ST段即刻抬高、T波高耸, 结扎线下心肌颜色变暗, 左心室发绀苍白, 提示心肌缺血; 30 min后松开结扎线, 左心室发绀苍白区出现充血反应, 再灌注120 min以制备MIRI模型。

1.4.2 分组与干预方法 采用随机数字表法将40只大鼠分为假手术组 (A组)、模型组 (B组)、瓜蒌薤白半夏汤组 (C组)、NF- κ B抑制剂组 (D组), 每组10只。采用苦味酸在大鼠头、四肢部位进行染色标记, 四组大鼠在MIRI模型制备前采用药物灌胃法进行预处理, 方法参照文献^[8], 并根据实验动物剂量换算给药量 [大鼠给药量 (g/kg) = 成人给药量 (g/kg) \times 6.3], 其中C组、D组给予瓜蒌薤白半夏汤水煎液预处理, 给药剂量为4.05 g/kg, A组、B组给予等量0.9%氯化钠溶液预处理, 均1次/d, 连续干预7 d。此外, A组大鼠于末次给药后1 h开胸并在冠状动脉处完成穿线, 但不结扎; 其余

三组大鼠于末次给药后1 h制备MIRI模型, 其中D组大鼠于再灌注前10 min腹腔注射PDTC 100 mg/kg。

1.4.3 血清与心肌组织标本采集 再灌注结束后采集四组大鼠腹主动脉血5 ml, 4 ℃环境下离心15 min (离心半径10 cm, 离心机转速3 000 r/min), 分离血清待检。然后结扎大鼠冠状动脉, 在其左颈动脉注射3%伊文思蓝2 ml后迅速摘除心脏, 洗净残血, 剪去多余组织, 采用滤纸吸干, 取部分心肌组织标本置于液氮中, 后转移至-80 ℃低温冰箱中保存备用; 余心肌组织标本固定于4%多聚甲醛溶液中。

1.4.4 TTC法检测心肌梗死面积百分比 采用0.9%氯化钠溶液洗净心脏残血, 将心脏置于-20 ℃环境中冷冻10 min, 采用组织切片沿心脏短轴方向将其切成1.0~1.5 mm薄片, 共5片, 将切片置于2% TTC磷酸盐缓冲液 (pH=7.3) 中, 37 ℃避光孵育30 min, 加入4%多聚甲醛溶液于室温固定10 min。拍照记录并采用Image J软件计算心肌梗死面积百分比, 心肌梗死面积百分比=心肌梗死区面积/心肌切片区面积 \times 100%。

1.4.5 心肌组织病理学检查 (1) HE染色: 将大鼠心脏置于4%多聚甲醛溶液中固定24 h, 石蜡包埋, 5 μ m连续切片, 烘干, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇溶液脱水处理, 按照HE染色试剂盒说明书染色。(2) Masson染色: 将大鼠心脏置于4%多聚甲醛溶液中固定24 h, 石蜡包埋, 5 μ m连续切片, 按照试剂盒说明书进行Masson染色, 观察心肌纤维化情况, 其中蓝色代表胶原纤维、红色代表肌纤维。梯度乙醇溶液脱水后采用二甲苯透明、中性树胶封固, 光学显微镜下观察心肌组织形态学变化。

1.4.6 血清炎症因子、氧化应激指标检测 取血清, 采用ELISA检测血清IL-1 β 、TNF- α 水平, 具体操作严格参照ELISA试剂盒说明书进行。采用TBA法检测血清MDA水平, 采用WST-1法检测血清SOD活性, 采用微板法检测血清LDH活性, 具体操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.4.7 透射电镜观察心肌组织超微结构 切取大小约1 mm \times 1 mm \times 1 mm的心肌组织, 置于2.5%戊二醛中固定2~4 h, 采用磷酸漂液漂洗3次, 采用1%锇酸于4 ℃环境下固定2 h; 采用ddH₂O漂洗3次, 梯度乙醇溶液脱水, 环氧丙烷过渡, 812树脂梯度渗透后包埋, 60 ℃聚合, 采用Leica UC7型超薄切片机将包埋块进行半薄定位及超薄切片, 采用醋酸双氧铀和柠檬酸铅对切片进行双染色, 在透射电镜下观察心肌组织超微结构。

1.4.8 Western blot法检测心肌组织TLR4、NF- κ B p65蛋白表达水平 取心肌组织, 冲洗干净后进行组织匀浆, 低温高速 (4 ℃, 12 000 \times g) 离心15 min以提取胞质蛋白, 采用BCA法在562 nm波长处测定OD值, 绘制标准曲线, 将样本测得的OD值带入曲线, 得到蛋白浓度。然后进行SDS-PAGE, 将转膜夹板放入含转膜缓冲液的转移电泳槽中转膜, 转膜后漂洗3次, 放入5% BSA后室温封闭2 h, 稀释一抗至工作浓度 (TLR4 1:4 000, NF- κ B p65 1:2 000, GAPDH 1:20 000), 将膜置于一抗溶液中, 于4 ℃环境下摇床、孵育过夜, 次日洗涤后加入二抗, 室温孵育2 h, 加入显影液, 置于化学发光成像仪中曝光成像, 采用Image J软件分析条带灰度值。

1.4.9 RT-PCR检测心肌组织TLR4、NF-κ B p65 mRNA相对表达量 称取100~150 μg心肌组织块，置于预冷研磨机中进行粉碎（频率60 Hz，30 s，振动3次），采用RNA提取试剂盒提取样本组织RNA，取5 μl RNA进行电泳以检测RNA的完整性，从NCBI数据库中查找大鼠TLR4、NF-κ B基因的mRNA序列，并以相应种属的GAPDH作为内参基因，根据引物设计原则，采用Primer Premier 5.0设计目标基因和内参基因的特异性引物，引物设计由上海博尚生物工程技术有限公司合成，RT-PCR引物序列见表1。将样本组织RNA反转录成cDNA，采用Archimed X6型荧光定量PCR仪进行PCR，反应体系为20 μl，循环40次，每组设3个复孔，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算mRNA相对表达量。

表1 RT-PCR引物序列
Table 1 RT-PCR primer sequences

名称	序列
TLR4	
正向引物	5'-GGCAGCAGGTCGAATTGTAT-3'
反向引物	5'-GCTTCTTGTTCCTCCTCTGATGT-3'
NF-κ B	
正向引物	5'-AGAGAAGCACAGATACCACTAAGA-3'
反向引物	5'-GTTTCAGCCTCATAGAAGCCATC-3'
GAPDH	
正向引物	5'-ACGGCAAGTTCAACGGCACAG-3'
反向引物	5'-GAAGACGCCAGTAGACTCCACGAC-3'

注：TLR4= Toll样受体4，NF-κ B=核因子κ B

1.5 统计学方法 应用SPSS 26.0统计学软件进行数据处理。符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

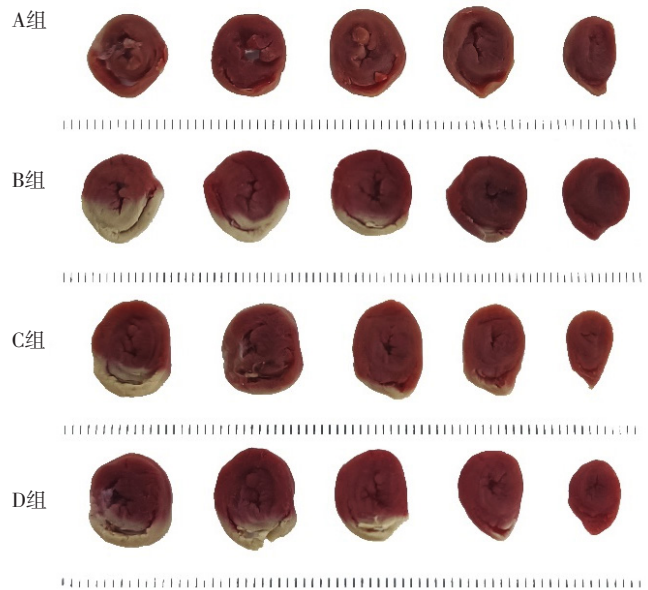
2.1 心肌梗死面积百分比 A组、B组、C组、D组大鼠心肌梗死面积百分比分别为(1.2 ± 0.5)%、(28.6 ± 2.2)%、(18.4 ± 2.9)%、(24.4 ± 1.2)%。四组大鼠心肌梗死面积百分比比较，差异有统计学意义($F = 232.00, P < 0.001$)；B组大鼠心肌梗死面积百分比高于A组，C组和D组大鼠心肌梗死面积百分比低于B组，D组大鼠心肌梗死面积百分比高于C组，差异有统计学意义($P < 0.05$)，见图1。

2.2 心肌组织病理学检查结果 HE染色结果显示，A组大鼠心肌纤维排列整齐，心肌组织形态正常，可见横纹结构；B组大鼠心肌纤维呈不规则排列，横纹断裂，出现心肌间质水肿且有明显坏死；C组大鼠心肌组织纤维排列、心肌组织形态改变、横纹结构改变均优于B组；D组大鼠细胞核散落在外侧明显，见图2。Masson染色结果显示，A组大鼠心肌细胞排列有序；B组大鼠心肌细胞排列紊乱，少部分胶原纤维染色阳性；C组和D组大鼠心肌细胞排列较规则，几乎无胶原纤维染色阳性，见图3。

2.3 血清炎症因子、氧化应激指标 四组大鼠血清IL-1β、TNF-α、MDA水平及SOD、LDH活性比较，差异有统计学意

义($P < 0.05$)；B组大鼠血清IL-1β、TNF-α、MDA水平及LDH活性高于A组，血清SOD活性低于A组，差异有统计学意义($P < 0.05$)；C组和D组大鼠血清IL-1β、TNF-α、MDA水平及LDH活性低于B组，血清SOD活性高于B组，差异有统计学意义($P < 0.05$)；D组大鼠血清IL-1β、TNF-α、MDA水平及LDH活性低于C组，血清SOD活性高于C组，差异有统计学意义($P < 0.05$)，见表2。

2.4 心肌组织超微结构 透射电镜扫描结果显示，A组大鼠心肌纤维排列基本规则、整齐，肌丝清晰，线粒体基本完整，线粒体嵴排列整齐、无断裂，细胞中无明显自噬泡；B组大鼠心肌纤维排列紊乱、断裂，线粒体大小不等，可见聚集，线粒体嵴明显减少、变短，细胞质中存在较多空泡，自噬体较多；C组大鼠心肌纤维排列较整齐，可观察到部分肌丝，少数线粒体嵴断裂，可见少数自噬泡；D组大鼠心肌纤维断裂，线粒体聚集、大小不等，线粒体嵴断裂现象严重，细



注：A组为假手术组，B组为模型组，C组为瓜蒌薤白半夏汤组，D组为核因子κ B (NF-κ B) 抑制剂组

图1 四组大鼠心肌组织TTC染色结果

Figure 1 TTC staining results of myocardial tissue in the four groups of rats

表2 四组大鼠血清炎症因子、氧化应激指标比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Comparison of serum inflammatory factors and oxidative stress index in the four groups of rats

组别	IL-1β (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)	MDA (nmol/ml)	SOD (U/mg prot)	LDH (U/g prot)
A组	41.23 ± 2.42	13.52 ± 0.83	9.34 ± 0.98	92.33 ± 1.78	32.68 ± 2.12
B组	149.90 ± 7.81 ^a	56.02 ± 0.71 ^a	33.32 ± 2.02 ^a	20.18 ± 0.67 ^a	101.70 ± 2.16 ^a
C组	97.60 ± 3.09 ^b	40.82 ± 1.88 ^b	23.13 ± 0.96 ^b	40.89 ± 2.18 ^b	72.86 ± 1.68 ^b
D组	70.46 ± 2.00 ^{bc}	25.79 ± 1.45 ^{bc}	15.62 ± 0.51 ^{bc}	66.03 ± 1.62 ^{bc}	51.68 ± 2.11 ^{bc}
F值	1 063.00	1 992.00	676.70	3 549.00	2 133.00
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：A组为假手术组，B组为模型组，C组为瓜蒌薤白半夏汤组，D组为核因子κ B (NF-κ B) 抑制剂组；MDA=丙二醛，SOD=超氧化物歧化酶，LDH=乳酸脱氢酶；^a表示与A组比较， $P < 0.05$ ；^b表示与B组比较， $P < 0.05$ ；^c表示与C组比较， $P < 0.05$

胞质部分呈空泡化, 见图4。

2.5 心肌组织TLR4、NF-κ B p65蛋白表达水平、mRNA相对表达量 四组大鼠心肌组织TLR4、NF-κ B p65蛋白表达水平、mRNA相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); B组大鼠心肌组织TLR4、NF-κ B p65蛋白表达水平、mRNA相对表达量高于A组, C组和D组大鼠心肌组织TLR4、NF-κ B p65蛋白表达水平、mRNA相对表达量低于B组, D组大鼠心肌组织TLR4、NF-κ B p65蛋白表达水平、mRNA相对表达量低于C组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表3。

3 讨论

目前, 开通狭窄或闭塞血管是心肌梗死患者的首选治疗方案, 但缺血心肌再灌注可能造成心肌组织二次损伤, 进而引起心律失常、心力衰竭等并发症, 故减少MIRI的发生对于挽救梗死心肌组织具有重要意义。MURRY等^[9]于1986年首次提出心肌缺血预处理的概念, 即血管再通前对心肌预先进行数次短时间的缺血再灌注处理, 是延缓后期心肌损伤的一项内源性措施, 但该方式对操作者的技术要求较高, 在临床上具有一定操作难度。近年来有关中医药防治MIRI的研究较多, 一项文献计量学分析结果显示, 中医药在预防MIRI发生和促进经皮冠状动脉介入治疗患者康复方面具有良好作

用^[10]。如敖玉涵等^[11]在常规诊疗方案基础上联用参芪瓜蒌半夏薤白汤治疗PCI后患者, 结果显示, 治疗后患者心绞痛症状、中医证候疗效、硝酸甘油用量及血脂指标改善效果均确切。瓜蒌薤白半夏汤出自张仲景《金匱要略·胸痹心痛短气病脉证并治》, 该方主要由栝楼实、薤白、半夏及白酒组成, 具有宣痹通阳、祛痰散结之功效, 是治疗胸阳不振、痰

表3 四组大鼠心肌组织TLR4、NF-κ B p65蛋白表达水平、mRNA相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Comparison of protein expression level and mRNA relative expression level of TLR4 and NF-κ B p65 in myocardial tissue in the four groups of rats

组别	TLR4		NF-κ B p65	
	蛋白表达水平	mRNA相对表达量	蛋白表达水平	mRNA相对表达量
A组	0.35 ± 0.02	1.00 ± 0.00	0.57 ± 0.08	1.00 ± 0.00
B组	1.06 ± 0.03 ^a	7.54 ± 0.19 ^a	1.71 ± 0.04 ^a	6.34 ± 0.33 ^a
C组	0.80 ± 0.11 ^b	2.78 ± 0.46 ^b	1.26 ± 0.15 ^b	2.64 ± 0.18 ^b
D组	0.42 ± 0.02 ^{bc}	1.14 ± 0.03 ^{bc}	0.92 ± 0.21 ^{bc}	1.17 ± 0.06 ^{bc}
F值	101.40	442.65	38.87	502.30
P值	0.002	<0.001	0.001	<0.001

注: ^a表示与A组比较, $P < 0.05$; ^b表示与B组比较, $P < 0.05$; ^c表示与C组比较, $P < 0.05$

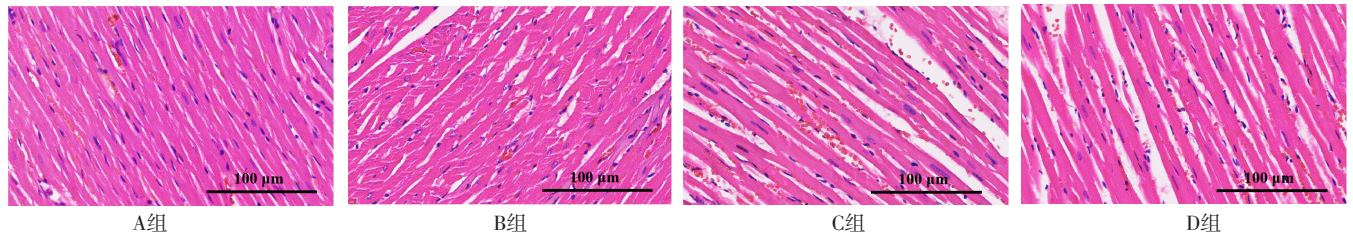


图2 四组大鼠心肌组织HE染色结果 (×200)

Figure 2 HE staining results of myocardial tissue in the four groups of rats

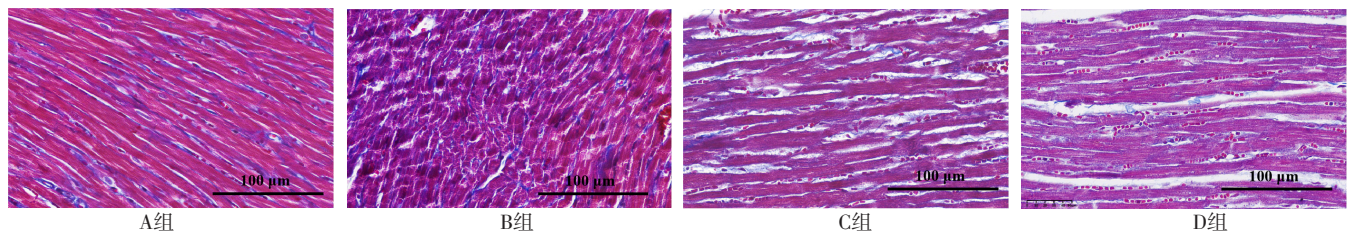


图3 四组大鼠心肌组织Masson染色结果 (×200)

Figure 3 Masson staining results of myocardial tissue in the four groups of rats

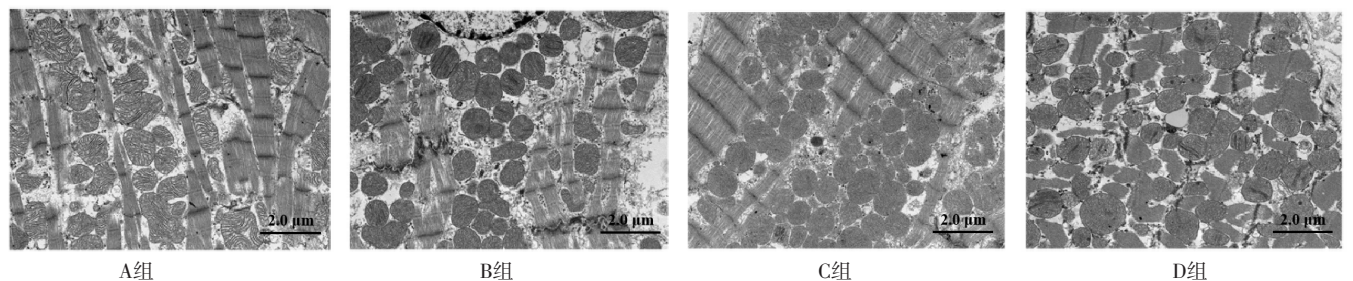


图4 四组大鼠心肌组织超微结构 (×6 000)

Figure 4 Ultrastructure of myocardial tissue in the four groups of rats

浊痹阻之胸痹的代表方。

本研究旨在探讨瓜蒌薤白半夏汤对MIRI模型大鼠的心肌保护作用及机制,结果显示,B组大鼠心肌梗死面积百分比高于A组,C组大鼠心肌梗死面积百分比低于B组;HE染色结果显示,C组大鼠心肌组织纤维排列、心肌组织形态改变、横纹结构改变均优于B组;Masson染色结果显示,B组大鼠心肌细胞排列紊乱,少部分胶原纤维染色阳性;C组大鼠心肌细胞排列较规则,几乎无胶原纤维染色阳性。提示瓜蒌薤白半夏汤预处理可有效缩小MIRI模型大鼠心肌梗死面积,保护心肌细胞。目前认为,MIRI的发病机制主要包括线粒体功能障碍、氧化应激、炎症反应和凋亡级联反应等,其中炎症反应和氧化应激贯穿MIRI的全过程^[12-13]。炎症反应是机体对损伤因子的防御行为,适度的炎症反应可参与组织损伤的修复过程,而过度的炎症反应可引发严重的功能损伤,目前认为心肌二次损伤后的过度炎症反应是MIRI的重要发病机制之一^[14],故抑制炎症因子过度释放可保护受损心肌组织,进而减轻MIRI后的心功能障碍^[15]。自噬是一种通过自我清除模式使自身细胞得到更新的能力。研究表明,提高自噬水平可提高MIRI病变过程中心肌细胞的生存机会^[15]。本研究结果显示,B组大鼠血清IL-1 β 、TNF- α 、MDA水平及LDH活性高于A组,血清SOD活性低于A组;C组大鼠血清IL-1 β 、TNF- α 、MDA水平及LDH活性低于B组,血清SOD活性高于B组。透射电镜扫描结果显示,B组大鼠细胞质中存在较多空泡,自噬体较多,C组大鼠心肌组织可见少数自噬泡。提示瓜蒌薤白半夏汤预处理可减轻MIRI模型大鼠的炎症反应、氧化应激及抑制心肌细胞自噬小体产生,进而发挥心肌保护作用。

研究表明,NF- κ B信号通路作为关键炎症信号通路,在MIRI期间被激活并引发炎症级联反应,进而加重心肌损伤程度^[16]。Toll样受体是机体固有免疫的关键组成部分,作为炎症通路中的模式识别受体,其在MIRI发生时可激活下游信号分子,促使TNF- α 、IL-1 β 等促炎因子释放;此外,作为NF- κ B的上游信号,TLR4参与了MIRI的发生过程^[17]。且目前TLR4/NF- κ B信号通路已成为MIRI的治疗靶点,其已引起国内外学者的广泛关注。本研究结果显示,B组大鼠心肌组织TLR4、NF- κ B p65蛋白表达水平、mRNA相对表达量高于A组,C组和D组大鼠心肌组织TLR4、NF- κ B p65蛋白表达水平、mRNA相对表达量低于B组,提示瓜蒌薤白半夏汤预处理可抑制TLR4/NF- κ B信号通路。

目前研究认为,抑制NF- κ B活性能有效减轻心肌氧化损伤,从而起到心肌保护作用^[18],而为了明确瓜蒌薤白半夏汤对TLR4/NF- κ B信号通路的调控作用,本研究在瓜蒌薤白半夏汤预处理基础上加用了NF- κ B抑制剂,结果显示,D组大鼠血清IL-1 β 、TNF- α 、MDA水平及LDH活性低于C组,血清SOD活性高于C组,提示瓜蒌薤白半夏汤预处理可通过抑制NF- κ B信号通路而减轻MIRI模型大鼠的炎症反应、氧化应激。但D组大鼠心肌梗死面积百分比高于C组,D组大鼠细胞核散落在外侧明显、心肌纤维断裂,线粒体聚集、大小不等,线粒体嵴断裂现象严重,细胞质部分呈空泡化,提示

与瓜蒌薤白半夏汤预处理相比,增加NF- κ B抑制剂并未发挥更好的心肌保护作用,分析原因可能为:抑制TLR4/NF- κ B信号通路虽能减轻炎症反应及氧化应激,但也可能抑制了机体的正常自我防御功能;而瓜蒌薤白半夏汤是通过调控机体免疫平衡而发挥心肌保护作用的,其除了调控TLR4/NF- κ B信号通路外,还可能通过调控其他信号分子而发挥心肌保护作用,这值得进一步探究。因此,在后续实验中可以加用NF- κ B通路激动剂,分析不同剂量瓜蒌薤白半夏汤对MIRI的心肌保护作用,从细胞层面验证该方对缺血缺氧心肌细胞模型的保护作用机制,以期为临床防治MIRI提供更可靠的实验依据。

综上所述,瓜蒌薤白半夏汤预处理可减轻炎症反应、氧化应激及抑制心肌细胞自噬小体产生,进而缩小MIRI模型大鼠心肌梗死面积,保护心肌细胞,其机制可能与瓜蒌薤白半夏汤抑制TLR4/NF- κ B信号通路有关,这为临床防治MIRI后的心肌损伤提供了一定的实验依据。

作者贡献:翁锦龙进行文章的构思与设计,研究的实施与可行性分析,负责撰写、修订论文,负责文章的质量控制及审校,并对文章整体负责、监督管理;翁锦龙、熊尚全、江澍、郑峰、林超、赵利进行数据收集、整理、分析;翁锦龙、熊尚全、江澍进行结果分析与解释。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] KAKAVAND H, AGHAKOUCHAKZADEH M, COONS J C, et al. Pharmacologic prevention of myocardial ischemia-reperfusion injury in patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2021, 77 (4): 430-449. DOI: 10.1097/FJC.0000000000000980.
- [2] ZALEWSKI J, NOWAK K, FURCZYNSKA P, et al. Complicating acute myocardial infarction. current status and unresolved targets for subsequent research [J]. *J Clin Med*, 2021, 10 (24): 5904. DOI: 10.3390/jcm10245904.
- [3] PATEL K V, PANDEY A, DE LEMOS J A. Conceptual framework for addressing residual atherosclerotic cardiovascular disease risk in the era of precision medicine [J]. *Circulation*, 2018, 137 (24): 2551-2553. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035289.
- [4] HEUSCH G. Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17 (12): 773-789. DOI: 10.1038/s41569-020-0403-y.
- [5] 何业辉, 卢健棋, 周娇娇, 等. 中医药干预NF- κ B信号通路防治心肌缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2022, 33 (7): 1707-1711. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2022.07.54.
- [6] 郑梦梦, 赵启韬, 周继栋, 等. 瓜蒌薤白半夏汤促进2型糖尿病合并急性心肌梗死大鼠内皮祖细胞动员的作用及其机制 [J]. *暨南大学学报(自然科学与医学版)*, 2018, 39 (5): 435-441, 448. DOI: 10.11778/j.jdx.2018.05.009.
- [7] 张卫强, 王涛, 张志明, 等. 大鼠心肌缺血再灌注损伤模型的改进与评判 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26 (3): 311-316. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.03.007.

- associated with hypertension and metabolic syndrome but not atherosclerosis in Chinese inpatients with type 2 diabetes [J]. *J Hypertens*, 2015, 33 (3): 482-490. DOI: 10.1097/HJH.0000000000000417.
- [7] 李艳, 任俊红. 超声诊断颈动脉粥样硬化斑块的方法和规范化应用 [J]. *中华全科医师杂志*, 2022, 21 (2): 105-108. DOI: 10.3760/cma.j.cn114798-20211117-00858.
- [8] 中国医师协会超声医师分会. 血管超声检查指南 [J]. *中华超声影像学杂志*, 2009, 18 (11): 993-1012. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1004-4477.2009.11.030.
- [9] 张梅, 黄正京, 李镒冲, 等. 中国35岁及以上人群缺血性心血管病10年发病风险预测 [J]. *中华流行病学杂志*, 2016, 37 (5): 689-693. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.05.021.
- [10] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心血管病预防指南 [J]. *中华心血管病杂志*, 2011, 39 (1): 3-22. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3758.2011.01.002.
- [11] DEHLIN M, JACOBSSON L, RODDY E. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence, treatment patterns and risk factors [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16 (7): 380-390. DOI: 10.1038/s41584-020-0441-1.
- [12] LI X, MENG X R, HE Y Z, et al. Genetically determined serum urate levels and cardiovascular and other diseases in UK Biobank cohort: a phenome-wide mendelian randomization study [J]. *PLoS Med*, 2019, 16 (10): e1002937. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002937.
- [13] DEL PINTO R, VIAZZI F, PONTREMOLI R, et al. The URRAH study [J]. *Panminerva Med*, 2021, 63 (4): 416-423. DOI: 10.23736/S0031-0808.21.04357-3.
- [14] RICHETTE P, PEREZ-RUIZ F, DOHERTY M, et al. Improving cardiovascular and renal outcomes in gout: what should we target? [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2014, 10 (11): 654-661. DOI: 10.1038/nrrheum.2014.124.
- [15] MARUHASHI T, HISATOME I, KIHARA Y, et al. Hyperuricemia and endothelial function: from molecular background to clinical perspectives [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 278: 226-231. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.10.007.
- [16] YU W, CHENG J D. Uric acid and cardiovascular disease: an update from molecular mechanism to clinical perspective [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 582680. DOI: 10.3389/fphar.2020.582680.
- [17] LI W, WANG Y, OUYANG S R, et al. Association between serum uric acid level and carotid atherosclerosis and metabolic syndrome in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 890305. DOI: 10.3389/fendo.2022.890305.
- (收稿日期: 2023-08-15; 修回日期: 2023-11-15)
(本文编辑: 谢武英)

(上接第48页)

- [8] 吴琼, 王志刚, 娄序笙, 等. 痰瘀同治法治疗冠心病心绞痛的临床疗效及炎症因子影响的网状Meta分析 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2022, 17 (7): 1273-1282, 1289. DOI: 10.13935/j.cnki.sjzx.220701.
- [9] MURRY C E, JENNING R B, REIMER K A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal injury in ischemic myocardium [J]. *Circulation*, 1986, 74 (5): 1124-1136. DOI: 10.1161/01.cir.74.5.1124.
- [10] 祁祥, 卢健棋, 王昱涵, 等. 中药防治心肌缺血再灌注损伤的文献计量学分析 [J]. *中国药房*, 2022, 33 (21): 2590-2596. DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.21.06.
- [11] 敖玉涵, 张明雪, 王稀莹. 参芪瓜蒌半夏薤白汤加减治疗经皮冠状动脉介入术后患者心绞痛再发临床疗效观察 [J]. *中医药临床杂志*, 2018, 30 (5): 912-916. DOI: 10.16448/j.cjctm.2018.0276.
- [12] PARADIES G, PARADIES V, RUGGIERO F M, et al. Mitochondrial bioenergetics and cardiolipin alterations in myocardial ischemia-reperfusion injury: implications for pharmacological cardioprotection [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, 315 (5): H1341-1352. DOI: 10.1152/ajpheart.00028.2018.
- [13] 吕仪, 陈蓉, 郑雯婧, 等. 基于氧化应激的心肌缺血再灌注损伤研究进展 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35 (2): 815-819.
- [14] XU L J, CHEN R C, MA X Y, et al. Scutellarin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by suppressing NLRP3 inflammasome activation [J]. *Phytomedicine*, 2020, 68: 153169. DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153169.
- [15] LIU X M, JIANG Y C, FU W W, et al. Combination of the ginsenosides Rb3 and Rb2 exerts protective effects against myocardial ischemia reperfusion injury in rats [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45 (2): 519-531. DOI: 10.3892/ijmm.2019.4414.
- [16] QIANG Z, YU W L, YU Y H. Design and development of novel 1, 3, 5-triazine-procaine derivatives as protective agent against myocardial ischemia/reperfusion injury via inhibitor of nuclear factor- κ B [J]. *Pharmacology*, 2019, 104 (3/4): 126-138. DOI: 10.1159/000500702.
- [17] ZHANG D Y, WANG Q, QIU X B, et al. Remifentanyl protects heart from myocardial ischaemia/reperfusion (I/R) injury via miR-206-3p/TLR4/NF- κ B signalling axis [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2022, 74 (2): 282-291. DOI: 10.1093/jpp/rgab151.
- [18] WEI C, LI L, KIM I K, et al. NF- κ B mediated miR-21 regulation in cardiomyocytes apoptosis under oxidative stress [J]. *Free Radic Res*, 2014, 48 (3): 282-291. DOI: 10.3109/10715762.2013.865839.
- (收稿日期: 2023-05-05; 修回日期: 2023-10-18)
(本文编辑: 谢武英)