

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2023.05.003

• 实验研究 •

清心通络方通过调控 Nrf2/HO-1 通路改善小鼠 心肌缺血再灌注损伤*

陈 梦 杨梦灵 董亚兰 胡德胜[△]

华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科,武汉 430022

摘要 目的 研究清心通络方对小鼠心肌缺血再灌注损伤的影响,并探讨其机制是否与调控 Nrf2/HO-1 信号通路相关。**方法** 将 45 只 C57BL/6J 小鼠随机分为假手术组、模型组和中药组,每组 15 只。中药组予清心通络方($1.08 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)灌胃给药,余各组予等体积生理盐水($0.2 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$)灌胃,灌胃处理 14 d 后通过结扎小鼠左侧冠状动脉左前降支 30 min 后再灌注构建心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)模型,其中假手术组仅穿线不结扎。采用伊文思蓝和 2,3,5-氯化三苯基四氮唑双重染色法测定小鼠心肌缺血和心肌梗死面积;采用生化试剂盒检测小鼠血清肌酸激酶(creatinine kinase, CK)、肌酸激酶同工酶(creatinine kinase isoenzyme, CK-MB)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及丙二醛(malondialdehyde, MDA)的水平;采用荧光实时定量 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)法检测心肌组织白介素-6(interleukin-6, IL-6)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) mRNA 相对表达量;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测心肌组织 PARP-1、Bax、Bcl-2、Nrf2、HO-1 的蛋白表达。利用 H₂O₂ 模拟氧化应激损伤细胞模型,采用细胞凋亡试剂盒检测 HL-1 细胞的凋亡情况。**结果** 与假手术组相比,模型组小鼠心肌损伤加重,血清 CK、CK-MB、LDH、AST 水平升高(P 均 <0.01);与模型组相比,中药组小鼠血清 CK、LDH、AST 水平均下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且心梗面积明显减少($P<0.01$)。与假手术组相比,模型组小鼠血清中 SOD 水平下降($P<0.05$),MDA 含量升高($P<0.01$);与模型组相比,中药组小鼠血清 SOD 水平升高($P<0.01$),MDA 含量下降($P<0.01$)。炎症因子 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 的 mRNA 表达在模型组中升高(P 均 <0.01),中药处理后可显著降低上述炎症因子的 mRNA 表达(P 均 <0.01)。模型组心肌组织 PARP-1、Bax 蛋白表达较假手术组升高(P 均 <0.01),Nrf2、HO-1 蛋白表达则下降(P 均 <0.01);与模型组相比,中药组心肌组织 PARP-1、Bax 蛋白表达量减少(P 均 <0.01),Nrf2、HO-1 蛋白表达量增加(P 均 <0.05)。此外, H₂O₂ 处理后的 HL-1 细胞凋亡明显增加($P<0.01$),不同浓度中药均可明显减少 H₂O₂ 导致的细胞凋亡($P<0.01$)。**结论** 清心通络方通过减轻炎症和氧化应激改善 MIRI,其机制可能与激活 Nrf2/HO-1 信号通路有关。

关键词 心肌缺血再灌注损伤;氧化应激;Nrf2/HO-1 通路

中图分类号 R285.5 **文献标志码** A

Qingxin Tongluo Decoction Ameliorates Myocardial Ischemia-reperfusion Injury in Mice by Regulating Nrf2/HO-1 Pathway

CHEN Meng, YANG Mengling, DONG Yalan, HU Desheng

Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Union Hospital,

Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

* 国家自然科学基金项目(No. 82274317; No. 81974249)

[△]通信作者, Corresponding author, E-mail: desheng.hu@hust.edu.cn

Abstract Objective To study the effect of Qingxin Tongluo decoction(QXTLD) on myocardial ischemia-reperfusion injury in mice, and explore whether its mechanism is related to the regulation of Nrf2/HO-1 signaling pathway. **Methods** Forty-five C57BL/6J mice were randomly divided into sham operation group, model group and Chinese medicine group, with 15 mice in each group. The Chinese medicine group was given QXTLD($1.08 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) by gavage, while the other groups were given equal volume of physiological saline($0.2 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$) by gavage. After 14 days of gavage treatment, a myocardial ischemia-reperfusion injury(MIRI) model was established by ligating the left anterior descending branch of the left coronary artery in mice for 30 minutes and reperfusion. The sham operation group only underwent threading without ligation. The area of the myocardial ischemia and infarct area in mice were determined by double staining method of Evans blue and 2,3,5-chlorophenyltetrazolium. The serum levels of creatine kinase(CK), creatine kinase isoenzyme(CK-MB), lactate dehydrogenase(LDH), aspartate aminotransferase(AST), superoxide dismutase(SOD), and malondialdehyde(MDA) in mice were detected by biochemical kits. The relative mRNA expression levels of interleukin-6(IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in myocardial tissue were detected by quantitative real-time PCR(qPCR). The protein expression levels of PARP-1, Bax, Bcl-2, Nrf2, HO-1 in myocardial tissue were detected by Western blot. Using H_2O_2 to simulate oxidative stress induced cell damage model, and the apoptosis kit was used to detect apoptosis in HL-1 cells. **Results** Compared with the sham operation group, the model group showed more severe myocardial injury, and the serum levels of CK, CK-MB, LDH, and AST increased(all $P < 0.01$). Compared with the model group, the serum levels of CK, LDH, AST in the Chinese medicine group decreased($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the myocardial infarction area decreased significantly($P < 0.01$). Compared with the sham operation group, the serum level of SOD decreased in the model group($P < 0.05$), while the MDA content increased($P < 0.01$). Compared with the model group, the serum level of SOD in the Chinese medicine group increased($P < 0.01$), while the MDA content decreased($P < 0.01$). The mRNA expression of inflammatory factors IL-6, IL-1 β and TNF- α increased in the model group(all $P < 0.01$). After treating with traditional Chinese medicine, the mRNA expression of the above-mentioned factors were significantly reduced(all $P < 0.01$). The protein expression levels of PARP-1 and Bax in the myocardial tissue of the model group increased compared to the sham operation group(all $P < 0.01$), while the expression of Nrf2 and HO-1 decreased(all $P < 0.01$). Compared with the model group, the protein expression levels of PARP-1 and Bax in the myocardial tissue of the Chinese medicine group decreased(all $P < 0.01$), while the levels of Nrf2 and HO-1 increased(all $P < 0.05$). In addition, the HL-1 cells treated with H_2O_2 showed a significant increase in cell apoptosis($P < 0.01$). And different concentrations of Chinese medicine could significantly reduced H_2O_2 induced cell apoptosis($P < 0.01$). **Conclusion** Qingxin Tongluo decoction ameliorated MIRI by reducing inflammation and oxidative stress, and its mechanism may be related to the activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway.

Key words myocardial ischemia-reperfusion injury; oxidative stress; Nrf2/HO-1 pathway

缺血性心脏病已成为世界范围内最常见的死因之一,其主要治疗方法是通过再灌注恢复缺血心肌血运,从而改善缺血性心脏病的预后。然而再灌注会造成心肌额外损伤,称为心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)^[1]。它发生的病理机制主要与线粒体损伤、钙超载、氧化应激和炎症反应等相关^[2]。目前有关 MIRI 治疗的研究仍是热点。

核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2)是内源性抗氧化应激的关键因

子,可激活下游多种抗氧化酶,如醌氧化还原酶 1 [NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, NQO1]、血红素加氧酶 1(heme oxygenase 1, HO-1)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)等,并通过多种途径协同清除再灌注时心肌组织产生的大量超氧阴离子、过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)等活性氧(reactive oxygen species, ROS)成分而减轻缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤^[3]。

清心通络方由黄芩、黄连、黄芩、姜黄、丹参、川芎

组成,以清热解毒、活血化瘀为治则。中医认为“瘀毒”是冠心病的重要病因病机,在冠心病发病过程中,“瘀”为常,“毒”为变,因瘀致毒,瘀毒互结,从而导致恶性心血管事件的发生,因此解毒活血是冠心病瘀毒证的主要治法^[4]。I/R 损伤时心肌局部产生大量 ROS、炎症因子,以及内皮功能障碍的病理表现与“瘀”“毒”相关。基于此,本研究探讨清心通络方改善小鼠 MIRI 的机制,以期为中医治疗 I/R 损伤提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 C57BL/6J 小鼠 45 只,8 周龄,体重 22~24 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司湖北分公司,动物许可证号:SCXK(鄂)2022-0030。造模前小鼠适应性喂养于华中科技大学同济医学院 SPF 级标准动物房中,标准饲料喂养,自由进食、饮水。

1.2 实验药物

中药清心通络方:黄芪 15 g,黄芩 10 g,黄连 5 g,丹参 15 g,川芎 10 g,姜黄 10 g。根据《药理实验方法学》换算成小鼠给药剂量(黄芪 3.7 g,黄芩 2.5 g,黄连 1.2 g,丹参 3.7 g,川芎 2.5 g,姜黄 2.5 g)。上述中药饮片均购于华中科技大学同济医学院附属协和医院中药房。所有药材加水慢煎,制成生药浓度为 5.4 g·mL⁻¹的液体,置于 4℃ 冰箱冷藏,用于动物实验。另外再取 1 份药材制成冻干粉用于细胞实验,置于 -80℃ 保存,临用前用 DMEM 培养基制成 1 mg·mL⁻¹的溶液。

1.3 主要试剂

伊文思蓝购自 Sigma-Aldrich 公司(货号 E2129)、2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)购自武汉塞维尔生物科技有限公司(货号 G1017);血清肌酸激酶(creatine kinase, CK)、肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme, CK-MB)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及丙二醛(malondialdehyde, MDA)等试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,货号分别为 A032-1-1、E006-1-1、A020-2-2、C010-2-1、A001-3-2、A003-1-2;RNA 逆转录与扩增试剂盒购自武汉擎科生物技术有限公司(货号 TSK301M、TSE201);细胞凋亡试剂盒购自杭州联科生物技术有限公司(货号 AP104);Bax、Bcl-2 抗体购自 Abmark 公司(货号

TU333334S、TU323153S),PARP-1、 α -actin 抗体购自 proteintech 公司(货号 23660-1-AP、66520-1-Ig),HO-1、Nrf2 抗体购自 ABclonal 公司(货号 A1244、A1346)。

1.4 主要仪器

小动物呼吸机(上海奥尔科特生物技术有限公司,型号 ALC-V8S);体式显微镜(日本 OLYMPUS,型号 SZX2-ZB10);多功能酶标仪(美国 PerkinElmer,型号 EnSpire);离心机(德国 Eppendorf,型号 Centrifuge 5424R);匀浆机(武汉赛维尔生物科技有限公司,型号 KZ-II);实时荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD,型号 CFX ConnectTM);电泳仪(美国 BIO-RAD,型号 PowerPacTM Basic);凝胶成像仪(美国赛默飞,型号 iBright750)

1.5 动物分组和给药

将 45 只雄性小鼠随机分为假手术组、模型组和中药组,每组 15 只。适应性喂养 1 周后,中药组给予 1.08 g·kg⁻¹·d⁻¹的清心通络方灌胃,假手术组和模型组则予等体积生理盐水(0.2 mL·d⁻¹)灌胃,每日固定给药 1 次。给药 14 d 后造模。中药剂量根据《药理实验方法学》进行换算。

1.6 小鼠心肌 I/R 模型的建立

参照常规方法:结扎小鼠左侧冠状动脉左前降支造成左心室缺血,以心电图出现 ST 段和(或)T 波抬高或降低等心肌缺血波形为结扎成功的标准,显微镜下见心肌组织泛白,30 min 后松开结扎线恢复冠脉血液。

1.7 小鼠血清及心脏组织样本提取

运用眼眶采血及摘除眼球的方法分别获得 I/R 6 h 和 I/R 1 d 的血液样本,于 4℃、3500 rpm 离心 10 min 后获取血清,并再次 4℃、12000 rpm 离心 10 min 后取上清,置于 -80℃ 冻存,等待检测相关指标。采取颈椎脱臼法处死小鼠,取左心室心肌组织进行匀浆后分别提取 RNA 及蛋白用于 qPCR 及 WB 检测。

1.8 检测指标及方法

1.8.1 小鼠一般情况评估 观察各组小鼠一般情况,包括精神、活动、饮食、皮毛光泽度、大小便等,称重记录造模前后各组小鼠体重变化。

1.8.2 心肌梗死面积的测定 I/R 3 d 后在原位重新结扎冠脉左前降支,经股静脉注入 3%伊文思蓝染料,待小鼠口唇变蓝后取出心脏,用最佳切削温度(optimal cutting temperature, OCT)化合物包埋固定后沿心脏水平面自心底向心尖平均切成薄片,随后置于 1% TTC 中 37℃ 避光孵育 30 min,用 4%多聚甲醛溶

液固定 24 h 后拍照。正常心肌呈蓝色,缺血心肌呈红色,梗死心肌呈白色。梗死面积百分比=[各切片白色梗死区域之和/(各切片白色梗死区域之和+各切片红色缺血区域之和)]×100%。

1.8.3 血清 CK、CK-MB、LDH、AST 水平测定 取各组小鼠 I/R 6 h 后的血清,按照检测试剂盒操作说明测定 CK、CK-MB、LDH、AST 的水平。

1.8.4 血清 MDA 含量及 SOD 水平测定 取各组小鼠 I/R 1 d 后的血清,按照检测试剂盒操作说明进行测定。

1.8.5 qPCR 检测心肌组织 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 相对水平 取 I/R 1 d 的小鼠左室区域心肌组织,匀浆后提取总 RNA,逆转录后进行 qPCR,检测 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 相对表达水平。

1.8.6 WB 检测心肌组织 Bax、Bcl-2、PARP-1、HO-1、Nrf2 的蛋白表达水平 分别取 I/R 1 d 和 I/R 3 d 的小鼠左室区域心肌组织,匀浆后提取总蛋白,用 BCA 法测定总蛋白浓度,绘制标准曲线,确定上样量。电泳及转膜完成后,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,用抗体稀释液按 1:1000 稀释一抗 Bax、Bcl-2、PARP-1、HO-1、Nrf2、 α -actin 后于 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜;按 1:

3000 稀释二抗,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。用 ECL 发光液及显影液处理膜后曝光获得 WB 图片。

1.8.7 HL-1 细胞凋亡检测 分为正常组、模型组、低浓度(0.1 mg·mL $^{-1}$)中药组和高浓度(0.25 mg·mL $^{-1}$)中药组,中药组先予以不同浓度中药预处理 HL-1 细胞 24 h,模型组、低浓度中药组和高浓度中药组用 200 μ M H $_2$ O $_2$ 处理 6 h,最后按细胞凋亡试剂盒的操作说明检测各组细胞凋亡水平。

1.9 统计学处理

利用 SPSS 26.0 进行数据统计分析,Image J 软件处理图像。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,数据符合正态分布和方差齐时采用单因素方差分析,两两比较使用 LSD-*t* 检验。结果以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 清心通络方对小鼠体重的影响

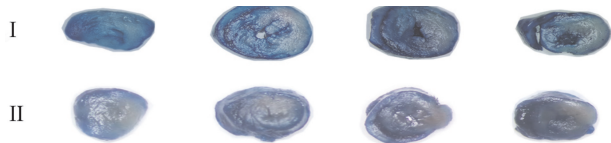
给药周期内各组小鼠一般情况可,体重均有所增长。给药结束后,与假手术组和模型组相比,中药组小鼠体重变化差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组小鼠体重变化($n=5, g, \bar{x}\pm s$)

组别	第 0 天	第 5 天	第 10 天	第 14 天
假手术组	22.70 \pm 0.83	23.72 \pm 0.74	24.33 \pm 0.47	23.95 \pm 0.29
模型组	22.65 \pm 0.47	23.56 \pm 0.57	24.19 \pm 0.76	23.60 \pm 0.67
中药组	22.73 \pm 0.62	23.51 \pm 0.64	23.93 \pm 0.33	23.26 \pm 0.26

2.2 清心通络方对小鼠心梗面积的影响

模型组及中药组小鼠心脏切片双染后均可见白色梗死区域和红色缺血区域,每组取 1 只小鼠心脏不同水平切面展示,从心尖部位至心室部位共选 4 个切面,见图 1。



I: 模型组; II: 中药组。

图 1 MIRI 小鼠心肌组织染色

与模型组比较,中药组小鼠心梗面积显著减少($P<0.01$),见表 2。

2.3 清心通络方对小鼠血清 CK、CK-MB、LDH、AST 的影响

与假手术组相比,模型组小鼠血清 CK、CK-MB、

LDH、AST 水平显著增加(P 均 <0.01);与模型组相比,中药组小鼠血清 CK、LDH、AST 水平均下降($P<0.01$ 或 $P<0.05$),CK-MB 水平下降但差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 2 MIRI 小鼠心梗面积比较($n=3, \%, \bar{x}\pm s$)

组别	心梗面积百分比
模型组	50.18 \pm 1.65
中药组	32.19 \pm 5.25 $^{##}$

与模型组比较 $^{##} P<0.01$ 。

2.4 清心通络方对小鼠心肌炎症因子 mRNA 水平的影响

与假手术组相比,模型组小鼠心肌组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的 mRNA 水平明显升高(P 均 <0.01);与模型组相比,中药组小鼠心肌组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的 mRNA 水平明显降低(P 均 <0.01)。见表 4。

表 3 各组小鼠血清 CK、CK-MB、LDH、AST 水平变化($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别	CK(U · mL ⁻¹)	CK-MB(U · L ⁻¹)	LDH(U · L ⁻¹)	AST(U · L ⁻¹)
假手术组	0.42 ± 0.09	203.42 ± 55.66	11878.00 ± 1989.58	25.84 ± 2.55
模型组	1.49 ± 0.20 ^{△△}	562.51 ± 241.80 ^{△△}	14380.77 ± 742.35 ^{△△}	82.46 ± 14.09 ^{△△}
中药组	0.53 ± 0.10 ^{##}	349.93 ± 101.86	12756.27 ± 803.49 [#]	33.38 ± 11.78 ^{##}

与假手术组比较^{△△} $P < 0.01$;与模型组比较[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

表 4 各组小鼠心肌 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的 mRNA 相对含量变化($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
假手术组	1.01 ± 0.22	1.03 ± 0.31	1.13 ± 0.73
模型组	3.37 ± 0.16 ^{△△}	11.17 ± 0.42 ^{△△}	7.83 ± 0.81 ^{△△}
中药组	1.63 ± 0.10 ^{##}	3.35 ± 1.69 ^{##}	3.70 ± 1.42 ^{##}

与假手术组比较^{△△} $P < 0.01$;与模型组比较^{##} $P < 0.01$ 。

2.5 清心通络方对小鼠血清 SOD、MDA 的影响

与假手术组相比,模型组小鼠血清 SOD 水平降低($P < 0.05$),MDA 含量升高($P < 0.01$);与模型组相比,中药组小鼠血清 MDA 含量明显下降($P < 0.01$),SOD 水平显著升高($P < 0.01$)。见表 5。

2.6 清心通络方对小鼠心肌 PARP-1、Bax、Bcl-2、Nrf2、HO-1 蛋白表达水平的影响

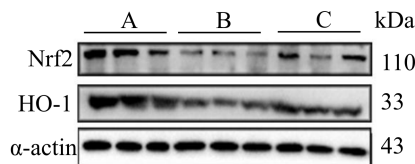
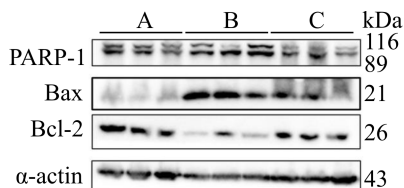
与假手术组相比,模型组小鼠心肌组织中 PARP-

1、Bax 蛋白表达量升高(P 均 < 0.01),Nrf2、HO-1 蛋白表达量下降(P 均 < 0.01);与模型组相比,中药组小鼠心肌组织中 PARP-1、Bax 蛋白表达量明显下降(P 均 < 0.01),Nrf2、HO-1 蛋白表达升高(P 均 < 0.05)。见图 2 及表 6。

表 5 各组小鼠血清中 SOD、MDA 水平变化($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	SOD(U · mL ⁻¹)	MDA(nmol · mL ⁻¹)
假手术组	20.53 ± 0.41	10.23 ± 0.88
模型组	19.28 ± 0.47 [△]	14.16 ± 0.72 ^{△△}
中药组	22.61 ± 0.27 ^{##}	10.47 ± 1.09 ^{##}

与假手术组比较[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与模型组比较^{##} $P < 0.01$ 。



A:假手术组;B:模型组;C:中药组。

图 2 各组小鼠心肌组织 Bax、Bcl-2、PARP-1、HO-1、Nrf2 蛋白表达

表 6 各组小鼠心肌组织中 PARP-1、Bax、Bcl-2、Nrf2、HO-1 蛋白相对表达($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	PARP-1/ α -actin	Bax/ α -actin	Bcl-2/ α -actin	Nrf2/ α -actin	HO-1/ α -actin
假手术组	0.29 ± 0.04	0.20 ± 0.03	1.00 ± 0.31	1.09 ± 0.11	2.55 ± 0.11
模型组	0.68 ± 0.02 ^{△△}	1.02 ± 0.21 ^{△△}	0.43 ± 0.24	0.79 ± 0.07 ^{△△}	1.76 ± 0.11 ^{△△}
中药组	0.26 ± 0.03 ^{##}	0.38 ± 0.17 ^{##}	0.69 ± 0.03	1.00 ± 0.04 [#]	2.08 ± 0.14 [#]

与假手术组比较[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与模型组比较[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

2.7 清心通络方对 H₂O₂ 处理后 HL-1 细胞凋亡的影响

与正常组相比,H₂O₂ 处理后模型组 HL-1 细胞凋亡明显增加($P < 0.01$),中药组 HL-1 细胞凋亡减少($P < 0.01$),但低剂量中药组与高剂量中药组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 7。

表 7 各组 HL-1 细胞凋亡结果比较($n=4, \%, \bar{x} \pm s$)

组别	凋亡百分比
正常组	6.26 ± 0.84
模型组	14.85 ± 0.46 ^{△△}
低剂量中药组	8.12 ± 0.20 ^{##}
高剂量中药组	9.29 ± 0.54 ^{##}

与正常组比较^{△△} $P < 0.01$;与模型组比较^{##} $P < 0.01$ 。

3 讨论

MIRI 可归于中医学“胸痹”“真心痛”等范畴。心主血脉,其五行属火,故火热之邪最易入心,如《圣济总录》云:“大抵心属火而恶热,其受病则易以生热”。火为热之极,毒为火之聚,内生火热毒邪煎灼脉道,伤其形,败其血,遂致血脉失和,变证丛生^[5]。正如《素问·刺热篇》言:“心热病者,先不乐,数日乃热,热争则卒心痛”。且“瘀毒”与血管内皮损伤、炎症反应、细胞凋亡和氧化应激相关^[6]。针对“瘀毒”,清热解毒可降低“热毒负荷”,而活血可扩张冠脉、抗血小板黏附、改善微循环^[7-8]。清心通络方由黄芪、丹参、川芎、姜黄、黄芩、黄连组成,其中丹参活血祛瘀、清心除烦,川芎活血行气、姜黄破血行气、黄芪补气行血,三者加强丹参之活血祛瘀;黄连、黄芩性味苦寒,能清热解毒;全方共奏清热解毒、活血化瘀之效。现代药理学研究表明,川芎能镇痛、抗炎、抗氧化、抗凝血、抗肿瘤、改善心功能等^[9]。川芎提取物在盐酸异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌缺血损伤模型和大鼠心肌 I/R 损伤模型中均能增加血清 SOD 的含量、减少 MDA 含量,通过抗氧化改善缺血心肌损伤^[10-11]。姜黄能抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗菌、抗纤维化及保护神经细胞等^[12]。其有效成分姜黄素可通过抑制氧化应激、抑制炎症反应、抑制凋亡等途径减轻 MIRI^[13]。丹参活性成分多方面抗 MIRI,包括清除氧自由基、抑制心肌细胞钙超载、改善能量代谢、抑制炎症反应、抗血小板聚集、调节血管内皮功能及促进微血管再生等^[14]。丹参及其配伍制剂均能治疗冠心病,保护心脏^[15]。此外,临床研究发现丹参川芎嗪在室间隔缺损修补术中应用于体外循环时,可明显降低 MDA、升高 SOD,从而发挥保护心肌和抗心律失常的作用^[16]。黄芪具有抗炎、抗氧化应激、抗纤维化、促进血管生成等作用,能有效减轻缺血再灌注损伤^[17];其活性成分黄芪甲苷和丹参有效成分——丹参素联用能在大鼠心肌缺血晚期发挥保护心肌及改善心功能的作用,可能与调控缺血心肌糖脂代谢、抗炎、抗心肌纤维化等作用有关^[18]。黄芩的药理作用主要包括抗炎、抗氧化、抗免疫等^[19];研究发现其有效成分黄芩苷通过 MAPK/Nrf-2/HO-1/NF- κ B 信号通路调节心脏氧化应激与炎症,从而减轻大鼠 MIRI^[20]。黄连最主要的有效成分小檗碱在心血管系统中具有抗心律失常、抗心力衰竭、抗血小板聚集、抗高血压等药理作用^[21];它可通过降低 MIRI 时的心肌过氧化抑制心肌细胞凋亡^[22]。本研究结果与前述研究相似,方中诸药配伍,能改善 MIRI,并通

过增强抗炎、抗氧化的作用保护心肌。

再灌注治疗仍是目前急性心梗的主要治疗方案,而有效减轻 MIRI 能进一步改善缺血性心脏病的最终预后。氧化应激和炎症反应均是导致 MIRI 的重要机制。目前有关 MIRI 氧化应激的机制研究主要涉及 Nrf2/抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)、PI3K/Akt-eNOS 和线粒体参与^[23]。其中 Nrf2/ARE 信号通路功能强大,它庞大的转录网络是 Nrf2 能够多方面维持内部环境稳定的基础。Nrf2 具有氧化还原、促进代谢和维持蛋白质稳态及缓解炎症的生理作用,它的激活剂已在许多人类疾病模型中显示出保护作用,被认为是一种药物靶点^[24]。在非应激状态下,E3 泛素连接酶通过 kelch 样 ECH 相关蛋白 1(kelch like ECH associated protein 1, Keap1) 靶向 Nrf2 使其降解;而在应激状态下,多种蛋白通过 Keap1 激活 Nrf2 使其入核与 ARE 结合,激活下游抗氧化基因如 HMOX1、GPX2、NQO1 的转录,抑制 IL-1 β 、IL-6 等促炎基因的表达,从而发挥 Nrf2 抗氧化、抗炎等多种生物功能^[25]。Hao T 等基于 MIRI 时 ROS 与 NO 失衡的病理改变合成具有逆转 ROS/NO 失衡功效的药物 CS-B-NO,该药物发挥抗 MIRI 作用的主要机制是激活 Nrf2/Keap1 信号通路,增加 SOD、HO-1、NQO1 等抗氧化酶的含量,在抗氧化应激的同时抑制 NF- κ B 信号通路减轻炎症反应^[26]。

本研究结果显示,清心通络方能有效减少心肌细胞凋亡及心梗面积,提高小鼠血清抗氧化酶 SOD 活性、降低 MDA 含量,并提高 Nrf2 及 HO-1 的蛋白表达,提示其对 MIRI 小鼠具有显著的抗氧化损伤作用。同时,用药后心肌损伤炎症因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 水平明显下降,表明其具有抗炎功效。综上所述,清心通络方能够改善小鼠 MIRI,其机制可能是通过激活 Nrf2/HO-1 通路、抗氧化应激、抗心肌细胞凋亡等途径发挥药理作用。

参 考 文 献

- [1] Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(1): 92-100.
- [2] Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(11): 1121-1135.
- [3] Chen QM. Nrf2 for cardiac protection: pharmacological options against oxidative stress [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2021, 42(9): 729-744.
- [4] 李晓雅,王松子,孙卓,等.以“因瘀致毒,瘀毒互结致变”理论诊治冠心病经验[J]. *中国中西医结合杂志*, 2021, 41

- (10):1248-1250.
- [5] 蒋庆雨,唐毅华,周玉清,等.从“火热灼脉”学说探析急性冠脉综合征的证治发微[J].中国中医急症,2019,28(2):299-301,304.
- [6] 刘悦,梁晓,魏竞竞,等.心脑血管疾病瘀毒互结证的研究现状与展望[J].中华中医药杂志,2023,38(3):937-941.
- [7] 胡镜清.“热结血脉”概论[J].世界科学技术-中医药现代化,2019,21(10):2005-2008.
- [8] 张京春,陈可冀,史大卓,等.冠心病稳定期因毒致病的辨证诊断量化标准[J].中国中西医结合杂志,2011,31(03):313-314.
- [9] 张晓娟,张燕丽,左冬冬.川芎的化学成分和药理作用研究进展[J].中医药信息,2020,37(6):128-133.
- [10] 陈德森,郭俐宏.川芎提取物对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响[J].现代中西医结合杂志,2010,19(27):3427-3429.
- [11] 汪刚,刘莹,侯雪峰,等.川芎提取物通过激活 Nrf2 通路对抗心肌缺血大鼠氧化应激损伤[J].中国中药杂志,2017,42(24):4834-4840.
- [12] 郭芳,顾哲,贾训利,等.药用植物姜黄的研究进展[J].安徽农业科学,2022,50(16):14-19.
- [13] 朱盼盼,徐彤彤,彭丽,等.姜黄素减轻心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J].广西医学,2021,43(6):750-753.
- [14] 李永鑫,高彦宇,胡晓阳,等.丹参活性成分对心肌缺血再灌注损伤保护作用及机制研究进展[J].中医药学报,2021,49(4):106-111.
- [15] 郝晨伟,李正翔,张铭慧,等.丹参及其配伍制剂治疗冠心病的研究进展[J].中草药,2021,52(13):4096-4106.
- [16] 袁超,高宁阳,李永乐,等.丹参川芎嗪对小儿缺血再灌注心肌保护作用的临床研究[J].中医药临床杂志,2021,33(12):2393-2396.
- [17] 张尚祖,刘永琦,李洋洋,等.黄芪防治心血管疾病的作用机制研究进展[J/OL].中药药理与临床:1-27[2023-06-09].<https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyj.20221114.002>.
- [18] 李翔,赵琴琴,郑鸣之,等.黄芪甲苷和丹参素对大鼠心肌缺血后心功能的保护作用研究[J].中国现代应用药学,2021,38(18):2208-2214.
- [19] 黄玉普,吴大章,王森.黄芩的药理作用及其药对研究进展[J].中国药业,2022,31(15):后插 1-后插 5.
- [20] 刘萍,唐代,王旭,等.黄芩苷对心肌缺血再灌注损伤的保护作用机制[J].中医药学报,2021,49(2):16-21.
- [21] 周瑞,项昌培,张晶晶,等.黄连化学成分及小檗碱药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2020,45(19):4561-4573.
- [22] 陈强,姜益,郝军军,等.黄连素抑制心肌细胞凋亡改善大鼠心肌缺血再灌注损伤的机制研究[J].国际检验医学杂志,2021,42(1):56-58,63.
- [23] 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.
- [24] Cuadrado A, Rojo AI, Wells G, et al. Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18(4):295-317.
- [25] Dinkova-Kostova AT, Copple IM. Advances and challenges in therapeutic targeting of NRF2[J]. Trends Pharmacol Sci, 2023, 44(3):137-149.
- [26] Hao T, Qian M, Zhang Y, et al. An injectable dual-function hydrogel protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by modulating ROS/NO disequilibrium[J]. Adv Sci(Weinh), 2022, 9(15):e2105408.

(收稿日期:2023-06-26)