

• XXXX •

## 基于Epac1/VDAC1/NLRP3/Caspase信号通路探讨丹连心方对高脂血症心肌梗死大鼠心功能紊乱的改善机制

向春蓉<sup>1</sup>, 马静卓<sup>2</sup>, 何轩辉<sup>2\*</sup>, 陈恒文<sup>1</sup>

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院 广安门医院, 北京 100053)

**[摘要]** 目的: 探析丹连心方(DLXF)对高脂血症心肌梗死大鼠心功能的改善作用及机制。方法: 该实验采用高脂饲料喂养8周构建高脂血症模型, 再行左前降支结扎构建大鼠心肌梗死模型, 经灌胃DLXF低剂量(1.108 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)和高剂量(2.217 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)4周后, 观察DLXF对大鼠体征、心脏指数的影响, 超声心动图观察心功能变化, 病理学检查评价心脏形态变化, 动态激光散斑血流成像系统观察肠系膜微血管情况, 血清生化检测总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)等关键血脂指标, 及白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6、氨基末端脑钠肽前体(NT-proBNP)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等细胞炎症因子的变化, 分别采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测环磷酸腺苷调节鸟嘌呤核苷酸交换因子1(Epac1)、电压依赖性阴离子选择性通道蛋白(VDAC1)、NOD样受体蛋白3(NLRP3)、胱天蛋白酶(Caspase)-9、Caspase-3表达情况。结果: DLXF组大鼠生存状态普遍有所改善。超声心动图结果显示, 与模型组比较, 高剂量组左心室射血分数(LVEF)和左室短轴缩短率(LVFS)均显著升高( $P<0.01$ ), 各剂量组LVIdd、LVId<sub>s</sub>均显著降低( $P<0.01$ )。动态激光散斑血流成像结果显示, 与正常组比较, 高脂血症模型组的血流量明显降低( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 各给药组大鼠肠系膜血流量显著增加( $P<0.01$ )。血清生化结果显示, 与模型组比较, DLXF低剂量组TC、TG明显下降( $P<0.05$ ), 高剂量组TG明显下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。各剂量组HDL-C水平明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。各剂量组VLDL水平显著下降( $P<0.01$ ), DLXF高剂量组低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平显著下降( $P<0.01$ )。ELSA结果显示, 与正常组比较, 高脂血症模型组IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、NT-proBNP水平显著升高( $P<0.01$ ); 与模型组比较, DLXF各剂量组大鼠血清中IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 明显下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 且各剂量组NT-proBNP显著降低( $P<0.01$ )。组织病理学结果显示, 与模型组比较, DLXF组心肌结构改善, 纤维排列规整, 炎性浸润减少, 胶原增生减轻。线粒体超微结果显示, 与模型组比较, 各给药组的心肌细胞结构规整, 肌原纤维排列有序, 且线粒体排列改善、结构清晰。心肌细胞凋亡结果显示, 与假手术组比较, 高脂血症模型组心肌细胞排列紊乱, 棕褐色凋亡细胞散在分布, 凋亡细胞数较多, 与模型组比较, 各组发现散在不同程度的细胞凋亡, 细胞形态发生改变, 细胞凋亡减少。Real-time PCR、Western blot结果显示, 与模型组比较, 各给药组Epac1、VDAC1、NLRP3、Caspase-9、Caspase-3相关蛋白的表达明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论: DLXF能够明显改善高脂血症心肌梗死后大鼠心脏状态, 其作用机制可能通过Epac1/VDAC1/NLRP3/Caspase信号通路改善线粒体结构和功能, 抑制炎症反应, 从而改善心功能。

**[关键词]** 丹连心方; 心肌梗死; 高脂血症; 线粒体; 能量代谢

**[中图分类号]** R256; R259; R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(XXXX)XX-0001-12

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20260126

**[网络出版地址]**

**[网络出版日期]** XXXX-XX-XX



## Danlianxin Formula Ameliorates Cardiac Dysfunction Associated with Myocardial Infarction in Hyperlipidemic Rats via Epac1/VDAC1/NLRP3/Caspase Signaling Pathway

XIANG Chunrong<sup>1</sup>, MA Jingzhuo<sup>2</sup>, HE Xuanhui<sup>2\*</sup>, CHEN Hengwen<sup>1</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700,

**[收稿日期]** 2025-09-23

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(82074396); 北京市自然科学基金项目(7252257); 中央高水平中医医院临床科研业务费专项(HLCMHPP2023077)

**[第一作者]** 向春蓉, 在读硕士, 从事心血管临床与药物研究, E-mail: xiangchunrong@163.com

**[通信作者]** \* 陈恒文, 博士, 研究员, 从事心血管临床与药物研究, E-mail: chenhengwen@163.com;

\* 何轩辉, 助理研究员, 从事中医药防治心血管基础研究, E-mail: hexuanzi1646@sina.com

China; 2. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the improvement effect and mechanism of Danlianxin Formula (DLXF) on cardiac function associated with myocardial infarction (MI) in hyperlipidemic rats. **Methods:** The hyperlipidemia model was established by feeding rats a high-fat diet for 8 weeks, followed by the MI modeling induced by ligating the left anterior descending coronary artery. After 4 weeks of gavage administration of DLXF at low ( $1.108 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) and high ( $2.217 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) doses, the following assessments were conducted: observation of physical signs and heart index, echocardiography for cardiac function, histopathological examination for cardiac morphology, laser speckle contrast imaging for mesenteric microvascular perfusion, serum biochemical tests for key lipid parameters such as total cholesterol (TC) and triglycerides (TG), as well as inflammatory cytokines including interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), IL-6, N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and Real-time PCR and Western blot analysis for the expression of cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor 1 (Epac1), voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1), NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3), cysteinyl aspartate-specific proteinase (Caspase)-9, and caspase-3. **Results:** The survival status of rats was generally improved in the DLXF group. Echocardiography revealed that compared with the model group, the high-dose DLXF group exhibited increased left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular short-axis shortening fraction (LVFS), while both DLXF groups showed reduced left ventricular internal diameter at end-diastole (LVIDd) and left ventricular internal diameter at end-systole (LVIDs) ( $P<0.01$ ). Dynamic laser speckle flow imaging revealed reduced blood flow in the hyperlipidemia model group compared with the normal group ( $P<0.05$ ). Compared with that in the model group, mesenteric blood flow was increased in all drug treatment groups ( $P<0.01$ ). Serum biochemical test results showed that compared with those in the model group, both TC and TG levels were decreased in the low-dose DLXF group ( $P<0.05$ ), and the TG level was decreased in the high-dose group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Both DLXF groups showed elevated high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) and declined very low-density lipoprotein (VLDL) levels ( $P<0.01$ ), and the high-dose DLXF group exhibited a decreased low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) level ( $P<0.01$ ). ELISA results showed that compared with those in the normal group, the IL- $1\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and NT-proBNP levels were elevated in the hyperlipidemia model group ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, both DLXF groups showed a declining trend in serum IL- $1\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  levels ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) and reduced NT-proBNP levels ( $P<0.01$ ). Histopathological findings revealed improved myocardial structure, regular fiber arrangement, reduced inflammatory infiltration, and diminished collagen proliferation in DLXF groups compared with the model group. Ultrastructural analysis of mitochondria demonstrated well-organized myocardial cell structure, orderly myofibrillar arrangement, and improved mitochondrial alignment with clear structure in DLXF groups compared with the model group. Myocardial cell apoptosis analysis revealed disordered cell arrangement and scattered brown apoptotic cells in the hyperlipidemia model group, with a higher number of apoptotic cells than the sham operation group. Compared with the model group, DLXF groups exhibited scattered apoptosis of varying degrees, altered cell morphology, and reduced apoptosis. Real-time PCR and Western blot results indicated that compared with the model group, DLXF downregulated the protein levels of Epac1, VDAC1, NLRP3, Caspase-9, and Caspase-3 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** DLXF can modulate the Epac1/VDAC1/NLRP3/Caspase signaling pathway to improve the mitochondrial structure and function and suppress inflammation, thereby enhancing cardiac function in myocardial infarction (MI) in hyperlipidemic rats.

**[Keywords]** Danlianxin Formula; myocardial infarction; hyperlipidemia; mitochondria; energy metabolism

心血管疾病是全球范围内导致死亡的首要原因之一,其中急性心肌梗死(MI)合并高脂血症(HL)的临床现状日益严峻,患者群体呈现年轻化趋势,构成了重大的公共卫生负担<sup>[1-2]</sup>。高脂血症不仅是动脉粥样硬化的始动因素,更能显著加剧心肌梗死后的心肌损伤、恶性心室重构及心功能紊乱<sup>[3-4]</sup>。当前西医的标准治疗在有效控制心肌梗死后的持续性炎症反应、细胞凋亡及能量代谢障碍等方面仍存在不足。近年来,炎症小体与线粒体功能障碍在心肌损伤中的作用逐渐成为研究热点。研究表明,NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体的激活是连接代谢紊乱与炎症反应的核心环节<sup>[5]</sup>,而电压依赖性阴离子选择性通道蛋白(VDAC1)作为线粒体功

能的关键调控因子,其功能障碍可同时触发细胞色素C释放激活胱天蛋白酶(Caspase)凋亡级联并参与NLRP3炎症小体活化,形成“线粒体-炎症-凋亡”的恶性循环<sup>[6]</sup>。此外,新近研究发现,鸟嘌呤核苷酸交换因子1(Epac1)作为环磷酸腺苷(cAMP)的重要下游效应器,可能是上行调控VDAC1、连接初始应激信号与线粒体损伤的潜在关键节点<sup>[7]</sup>。然而,Epac1/VDAC1/NLRP3/Caspase这一完整的信号通路在高脂血症加重心肌梗死损伤中的作用机制,尚未被系统阐明,也缺乏有效的干预策略。

中医药在防治心血管疾病方面具有多靶点,多途径整合调节的独特优势。丹连心方(DLXF)是本研究的核心干预方剂,它由广安门医院名老中医团

队基于经典名方《黄连温胆汤》合《丹参饮》化裁而来。本方以丹参为君,活血祛瘀;黄连为臣,清热泻火;佐以人参大补元气,法半夏燥湿化痰,赤芍、三七散瘀止痛,葛根通络生津,肉苁蓉补肾益精。全方诸药合用,严谨配伍,共奏补气活血、清热涤痰之功效,精准对应高脂血症心肌梗死后“气虚血瘀、痰热互结”的核心病机。前期研究虽证实其能改善心室重构,但在HL合并MI的复杂病理模型下,其是否通过调控上述信号通路发挥作用,尚属未知。为了进一步验证DLXF对高脂血症心肌梗死大鼠的治疗效果及作用机制,本研究采用高脂饮食喂养结合冠状动脉左前降支结扎术,构建病证结合的大鼠模型,灌胃给予DLXF(1.108、2.217 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)4周后,系统评价DLXF对心功能、血脂、炎症因子及心脏结构的影响,并深入探讨其对目标通路关键分子表达水平的调控作用。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级雄性SD大鼠共80只,体质量170~200 g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号SCXK(京)2021-0006,许可证号SYXK(京)2021-0017。大鼠在中国中医科学院中医基础理论研究所SPF级动物房中进行分笼饲养,每笼4只,温度保持在20~25℃,相对湿度40%~60%,采用12 h日光和12 h黑暗的周期,自由进食饮水,大鼠适应性喂养5 d后开始实验。

**1.2 伦理** 研究方案经中国中医科学院广安门医院实验动物伦理委员会批准(IACUC-GAMH-2024-020)。

**1.3 仪器** ALC-V8S型小动物呼吸机(上海奥尔科特生物科技有限公司);AMS型气体麻醉机(北京吉安得尔科技有限公司);TE412-L型电子天平(德国Sartorius公司);Vevo 3100型小动物超声成像系统(加拿大Visual Sonics公司);MoorFLPI-2型激光散斑血流成像系统(英国Moor Instruments公司);SHZ-88A型恒温振荡水浴锅(苏州培英实验设备有限公司);MULTISKAN MK3型全自动多功能酶标仪、Wellwash Versa型洗板机(美国Thermo Fisher Scientific公司);5418R型台式高速离心机(德国Eppendorf公司);TDL-5-A型医用离心机(上海安亭科学仪器厂);UV-2000型分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);NAS-99型超微量分光光度计(广州洁泓生物科技有限公司);HistoCore Arcadia H型生物组织包埋机、HistoCore Pegasus型生物组织脱水机、HistoCore ULTICUT型全自动石蜡切片机、

STS020型自动染色机、CV5030型自动封片机(德国Leica公司);KF-PRO-020型荧光扫描仪(宁波江丰生物公司);H-7650型透射电子显微镜(日本日立公司);StepOne Plus型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国ABI公司);MH-1型微型振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Mini-PROTEAN Tetra型垂直电泳槽、T100型梯度PCR仪、Mini Trans-Blot型湿转膜仪、PowerPac HC型高电流电泳仪电源、Universal Hood III型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);Tanon-5200 III化学发光成像系统(上海天能科技有限公司)。其他辅助设备包括:DH-4000A型电热恒温培养箱(天津泰斯特仪器有限公司);AF-103AS型制冰机(美国Scotsman公司);DW-86L588型超低温冰箱(青岛海尔生物医疗股份有限公司)。

**1.4 药物与试剂** DLXF由丹参、黄连、法半夏、人参、赤芍、葛根、肉苁蓉、三七共8味中药组成,各药材处方比例如下:丹参(20.8%)、葛根(20.8%)、赤芍(16.7%)、肉苁蓉(13.9%)、人参(8.3%)、法半夏(8.3%)、黄连(6.9%)、三七(4.2%)。实验所用DLXF配方颗粒采购自中国中医科学院广安门医院,由四川新绿色药业科技发展有限公司生产。各药材批号及主要成分含量如下,丹参(批号21090351,丹酚酸B 37 mg·g<sup>-1</sup>)、黄连(批号21090055,小檗碱 184.1 mg·g<sup>-1</sup>)、法半夏(批号21100305)、人参(批号21070221,人参皂苷Rg<sub>1</sub>和Re总量 7.1 mg·g<sup>-1</sup>,人参皂苷Rb<sub>1</sub> 14.2 mg·g<sup>-1</sup>)、赤芍(批号20120006,芍药苷 28.8 mg·g<sup>-1</sup>)、粉葛(批号21100314,葛根素 22.3 mg·g<sup>-1</sup>)、肉苁蓉(批号21100451,松果菊苷 66 mg·g<sup>-1</sup>)、三七(批号2110115,人参皂苷Rg<sub>1</sub>、Rb<sub>1</sub>与三七皂苷R<sub>1</sub>总量 75.9 mg·g<sup>-1</sup>)。

瑞舒伐他汀钙片(阿斯利康药业有限公司,国药准字HJ20160545,规格10 mg×7片/盒);注射用青霉素钠(华北制药集团动物保健品有限责任公司,兽药字030201248);异氟烷(瑞沃德生命科技股份有限公司,兽药生产证字15198BA4079B号);血脂检测试剂盒总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)(美康生物科技股份有限公司,货号分别为230525101、230424202、230525101、230530101);大鼠白细胞介素(IL)-1β、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、IL-6酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(欣博盛生物科技有限公司,批号分别为

R230609-007b、R230609-102b、R230609-003b);大鼠氨基末端脑钠肽前体(NT-proBNP)ELISA试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号UXO44HXT2482)。伊红染色液、苏木素、马松(Masson)三色染色液(珠海贝索生物技术有限公司,批号分别为814111、20220302、BA4079B);分化液(辽宁格林生物药业集团股份有限公司,批号130705);返蓝液(北京世济合力生物科技股份有限公司,批号714121);无水乙醇、二甲苯、95%乙醇、75%乙醇(国药集团药业股份有限公司,批号分别为100092683、10023428、20210304、20200323);碘伏消毒液(北京四环卫生药械厂有限公司,批号20221105);磷酸盐缓冲液(PBS,武汉赛维尔生物科技股份有限公司,批号G4202);0.9%氯化钠注射液(华润双鹤药业股份有限公司,批号Y2107192W);4%组织细胞固定液(北京索莱宝科技有限公司,批号P1110);细胞凋亡原位末端转移酶标记检测(TUNEL)试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司,批号090222230317);TRIzol(美国Invitrogen公司,批号15596-018)、HiFiScript cDNA第一链合成试剂盒、UltraSYBR Mixture(康为世纪公司,货号分别为CW2569、CW2602);增强化学发光法(ECL)化学发光试剂盒(美国密理博公司,批号WBKLS0500);兔抗Epc1、鼠抗VDAC1、兔抗NLRP3、鼠抗Caspase-3、鼠抗Caspase-9、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)一抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为14632-1-AP、66345-1-Ig、27458-1-AP、66470-2-Ig、66169-1-Ig、68403-1-Ig、60267-1-Ig);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗(美国CST公司,批号5174);辣根过氧化物酶(HRP)-山羊抗兔/抗鼠免疫球蛋白G(IgG)二抗(美国Jackson公司,批号115-035-003)。

## 2 方法

### 2.1 动物造模

**2.1.1 高脂大鼠造模** 将80只SD大鼠进行为期5 d的适应性饲养,期间提供普通标准饲料,并确保其自由摄食和饮水。同时,维持饲养室的通风状况良好,并保持温度恒定。5 d适应期结束后,将大鼠随机分为两组,即正常组和高脂血症模型组。正常组包含8只大鼠,其余72只大鼠为高脂血症模型组。保证大鼠饮水干净充足,正常组给予普通饲料,其余给予高脂饲料(21%脂肪和0.15%胆固醇)进行喂养。普通饲料由中国中医科学院医学实验中心提供(购置于北京维通利华实验动物技术有限

公司);高脂饲料(货号H10141)购于北京华阜康生物科技股份有限公司,由19.5%酪蛋白、34.1%蔗糖、20%和无水奶油和0.15%胆固醇组成。

实验中,大鼠的体质量每隔3 d进行一次测定并记录相关数据。在第8周,通过大鼠尾静脉进行取血,经检测总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)与正常对照组比较显著性升高后,即成功建立高脂饮食诱导的高脂血症大鼠模型。

**2.1.2 心肌梗死大鼠造模** 高脂大鼠造模成功后<sup>[8]</sup>,参考本课题组建模方法建立高脂血症急性心肌梗死大鼠模型<sup>[9]</sup>。高脂血症大鼠模型成功后,结扎大鼠冠状动脉左前降支,叠加建立高脂血症心肌梗死大鼠模型,观察心电监测仪,持续监测II导联心电图,以冠状动脉结扎后即刻出现的典型急性心肌缺血性心电图动态演变作为造模成功的电生理标准,主要表现包括:QRS波群形态异常与振幅增高、出现病理性Q波、以及T波的高尖或深倒置等。同时,于开胸状态下直接肉眼观察,见结扎线以下区域心肌因急性缺血迅速变为灰白色。同时满足上述心电图急性改变与肉眼观察结果者,方视为造模成功。

**2.2 分组及给药方法** 心肌梗死造模成功后,将存活约35只高脂血症心肌梗死大鼠(心肌梗死大鼠模型成活率约50%)随机分为高脂血症模型组,瑞舒伐他汀钙片组(0.45 mg·kg<sup>-1</sup>),DLXF低、高剂量组(1.108、2.217 g·kg<sup>-1</sup>),加上正常组(8只)及高脂假手术组(7只),共6组。按体表面积折算法<sup>[10]</sup>,瑞舒伐他汀钙片组给药剂量为70 kg成人每日的等效剂量,即0.45 mg·kg<sup>-1</sup>;同法,DLXF低剂量组为成人的等效剂量,即1.108 g·kg<sup>-1</sup>;高剂量组为成人等效剂量的2倍,即2.217 g·kg<sup>-1</sup>。各实验组均接受连续4周的给药处理,剂量为10 mL·kg<sup>-1</sup>,每日1次。实验药物采用0.5%羧甲基纤维素钠水溶液配制悬浮液。正常组、高脂血症模型组、高脂假手术组同步灌胃等体积溶剂。

### 2.3 指标检测

**2.3.1 体征观察** 每日密切观察并记录各组大鼠的一般活动、精神状态、对外界环境的刺激反应、体毛光泽度、饮食饮水量、大小便、体质量等情况。

**2.3.2 小动物B超仪检测大鼠心功能** 各组动物灌胃28 d后,禁食不禁水12 h,异氟烷麻醉后,对实验大鼠胸前区进行脱毛处理,将完成脱毛的大鼠以仰卧体位固定于专用检查台,进行心脏超声检测。测量时每组原始数据连续测定3个心动周期的平均值,用Vero Strain Software软件分析图像数据。

**2.3.3 动态激光散斑血流成像系统观察肠系膜微血管情况** 将麻醉后大鼠置于仰卧位并固定四肢于鼠板上,备皮,沿腹正中线切开2~3 cm,打开大鼠腹腔,轻轻将回盲部的回肠取出腹外,快速暴露肠系膜。用激光散斑成像仪正对创面,测量创面的循环血流状态,记录1 min内的平均血流情况,利用moorFLPI-2 measurement V3.0数据处理软件进行量化测定,对各组大鼠血流量进行对比分析。

**2.3.4 血清生化指标的检测** 腹主动脉取血,室温下静置1~2 h后,高速离心机离心15 min ( $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,离心半径10 cm,相对离心力约为 $1\ 000\times g$ ),小心吸取上清液,将血清冻存,送广安门医院检验科检测TC、TG等关键血脂指标。NT-proBNP等心力衰竭指标,IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 等炎性因子指标。

**2.3.5 苏木素-伊红(HE)染色** 大鼠麻醉后,迅速取出心脏并固定于4%多聚甲醛溶液中24 h。经过脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡和水化处理,苏木素染色6 min,清水冲洗,再用1%盐酸-乙醇分化,清水冲洗,0.6%氨水返蓝,冲洗。伊红染色3 min后,样本经乙醇脱水、二甲苯浸泡,使用自动封片机封片。观察并记录梗死区周围心肌组织的形态变化。

**2.3.6 Masson染色** 麻醉大鼠后,迅速摘取心脏并制备石蜡切片。切片经脱蜡、水化(Masson A液过夜)后,于65 °C Masson A工作液中孵育30 min,流水冲洗至黄色褪去。随后切片浸入Masson B/C混合液染色1 min,流水冲洗,再经1%盐酸-乙醇分化约1 min至细胞核灰黑、背景淡灰。分化后水洗,吸干,Masson D液染色6 min,沥干后浸入Masson E液1 min,立即转入预热(65 °C)的Masson F液快速染色(2~30 s),不经水洗直接进行三缸1%冰乙酸梯度漂洗(各8 s)。最后切片依次经梯度无水乙醇(5、10、30 s)、正丁醇(30 s, 2 min)脱水,二甲苯(各5 min)透明,中性树胶封片,于倒置显微镜下观察拍照。

**2.3.7 心肌细胞超微结构** 取1 mm<sup>3</sup>大鼠心肌组织,经2.5%戊二醛固定24 h、PBS漂洗3次后,用1%锇酸固定1.5 h并再次PBS漂洗;随后依次经梯度乙醇(50%、70%、80%、90%、100%)脱水(各10 min)、丙酮透明(2 $\times$ 10 min),再经丙酮:环氧树脂(1:1)及纯环氧树脂梯度浸透(各2 h)后包埋聚合、修块;超薄切片机切取70 nm切片,经醋酸铀和枸橼酸铅双重染色(各30 min),于透射电子显微镜下观察拍照。

**2.3.8 TUNEL法检测心肌细胞凋亡** 麻醉大鼠后

开胸取心,经PBS冲洗后以4%多聚甲醛固定24 h,常规脱水石蜡包埋并切片。切片经二甲苯(2 $\times$ 10 min)脱蜡、随后通过一系列浓度递减的乙醇(包括无水乙醇5 min、90%乙醇2 min和70%乙醇2 min)进行复水及蒸馏水漂洗后,滴加20 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> DNase-free蛋白酶K(37 °C, 20 min),PBS漂洗3次。随后以过氧化物酶封闭液室温孵育20 min灭活内源酶,PBS漂洗3次。按试剂盒说明配制生物素标记液,滴加TUNEL检测液37 °C避光孵育60 min,PBS漂洗3次,显色封片后观察拍照。

**2.3.9 Real-time PCR检测心肌组织Epc1、VDAC1、NLRP3、Caspase-9、Caspase-3的mRNA表达情况** 取大鼠心肌组织50 mg,液氮研磨后加入TRIzol 1 mL裂解,室温静置5 min;加三氯甲烷200  $\mu$ L震荡静置,4 °C 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min;取550  $\mu$ L上清,加等体积异丙醇沉淀(-20 °C, 20 min),离心后以预冷75%乙醇1 mL洗涤,晾干后溶于无核酸酶水30  $\mu$ L。取RNA 2  $\mu$ L测定浓度(NAS-99)并电泳(1.2%琼脂糖凝胶)。按试剂说明配制逆转录体系:含总RNA、Primer Mix、dNTP、5 $\times$ g DNA Master Mix, 70 °C冰浴后,加入5 $\times$ RT Buffer、DTT、HiFiScript M-MLV, 42 °C 50 min后85 °C 15 min合成cDNA。Real-time PCR反应体系(20  $\mu$ L/管)按表配制,程序:95 °C 10 min预变性;40个循环(95 °C 10 s, 60 °C 60s);熔解曲线阶段(95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 95 °C 15 s)。检测VDAC1、NLRP3、Caspase-9、Caspase-3 mRNA表达(2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup>法),引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成,序列见表1。

**2.3.10 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Epc1、VDAC1、NLRP3、Caspase-9、Caspase-3的蛋白表达情况** 取大鼠左心室梗死边缘区组织,液氮研磨成粉,加入预冷蛋白裂解液,冰浴振荡裂解(每10 min剧烈震荡30 s,重复4次),4 °C 13 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心1 min,取上清分装于-80 °C保存。根据目标蛋白分子量配制适宜浓度十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶,上样等量蛋白样品及预染Marker,80 V电泳至条带压缩,120 V电泳至溴酚蓝达胶底。湿法转膜(250 mA恒流,时间按分子量调整10~30 kDa, 30~40 min; 30~100 kDa, 50~70 min; 100~200 kDa, 90~120 min)。聚偏二氟乙烯(PVDF)膜经5%脱脂奶粉室温封闭1~2 h,TBST洗膜后,分别使用相应的一抗4 °C孵育过夜。所用一抗及其稀释比例如下:Epc1(兔源1:1 000)、VDAC1(鼠源

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Epacl	上游 GAGGTGCAGGACTCTGGTTCA	76
	下游 CTCGCTGGCTCCTGTGAATAC	
VDAC1	上游 ATGAAATAGCTTCCAGGTTGTCC	119
	下游 AAAGTCTAAAAATAGTGGTGCG	
NLRP3	上游 CCTGTGTGGGAACAAGTATGC	115
	下游 CAGGTCACCAAGAGGGAACAA	
Caspase-9	上游 AATACCTGGATCTGGACTGCGT	176
	下游 TAGGAAGAGCAAAGTGAGGGTG	
Caspase-3	上游 TGCTCCAGGCTTCCTTAATCAT	209
	下游 TGAGTTCCTTCCTTTCTTTGTGC	
GAPDH	上游 TGAAGCTCATTTCCTGGTATGAC	138
	下游 GGCCTCTCTTGCTCTCAGTA	

1:1 000)、NLRP3(兔源 1:1 000)、Caspase-3(鼠源 1:2 000)、Caspase-9(鼠源 1:10 000)、GAPDH(鼠源 1:20 000)。TBST洗膜,室温孵育二抗 1 h, TBST洗膜。ECL化学发光显影液(现配)避光覆盖膜面,采集化学发光信号,Image J分析数据。

**2.4 统计学分析** 本研究采用SPSS 26.0统计软件进行数据分析处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式呈现。组间差异分析依据数据类型分别采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)或独立样本t检验方法进行统计学处理。以 $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。对于不符合正态分布的数据,采用非参数检验方法。

### 3 结果

**3.1 高脂血症大鼠模型建立情况** 为研究DLXF对高脂血症心肌梗死大鼠心脏功能的影响,除正常组外,其余各组大鼠经过8周高脂饮食喂养,从正常组与高脂血症组分别随机抽取4只大鼠,尾静脉取血检测TC、TG、LDL-C水平,与正常组比较,TC、TG、LDL-C水平明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),表明造模成功。见表2。

表2 高脂血症大鼠血脂相关指标情况( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别	TC	TG	LDL-C
正常组	1.37±0.15	0.61±0.11	0.48±0.11
高脂血症组	1.91±0.05 <sup>2)</sup>	1.08±0.16 <sup>2)</sup>	0.69±0.07 <sup>1)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$

**3.2 DLXF对高脂血症心肌梗死大鼠一般情况和体质量的影响** 高脂饮食各组大鼠均出现不同程度精神较萎靡、行动较缓、便溏等情况。瑞舒伐他

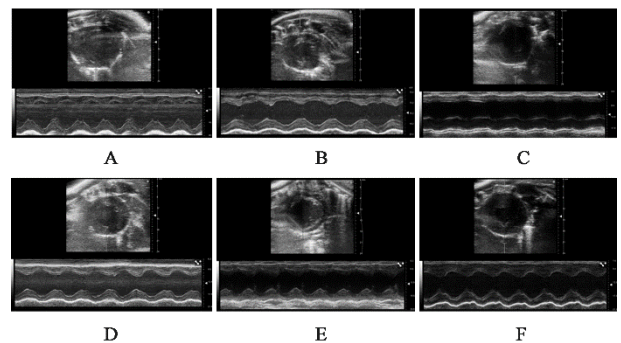
汀钙片组及DLXF各剂量组大鼠给药治疗后,各组生存状态逐渐好转。但高脂血症假手术组及高脂血症模型组大鼠体重增长较快,各组大鼠体质量变化差异无统计学意义。见表3。日常观察发现,高脂血症模型组大鼠的笼内垫料需要更频繁地更换,且可见的尿液浸湿面积与粪便颗粒数量均多于正常组。无其他异常情况发生。

表3 DLXF对高脂血症心肌梗死大鼠体质量的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 3 Effect of DLXF on body weight in hyperlipidemic rats with myocardial infarction ( $\bar{x} \pm s, n=6$ ) g

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	0周	2周	4周
正常组		449.76±41.62	482.48±64.97	472.38±54.13
高脂血症假手术组		509.71±41.17	498.55±79.66	534.30±57.11
高脂血症模型组		518.80±53.40	510.60±79.41	549.81±89.04
瑞舒伐他汀钙片组	0.000	454.93±24.61	484.51±56.77	458.82±84.59
DLXF低剂量组	1.108	511.75±23.87	483.33±44.89	478.57±44.41
DLXF高剂量组	2.217	479.88±35.77	460.70±74.06	413.49±87.43

**3.3 DLXF对高脂血症心肌梗死大鼠心功能的影响** 与正常组比较,高脂血症模型组大鼠的LVEF和LVFS显著降低( $P < 0.01$ ),LVIDd和LVIDs显著增大( $P < 0.01$ );与高脂血症模型组比较,DLXF高剂量组大鼠的LVEF和LVFS显著升高( $P < 0.01$ ),LVIDd、LVIDs显著减小( $P < 0.01$ ),DLXF低剂量组大鼠LVEF显著升高( $P < 0.01$ ),LVIDd、LVIDs显著减小( $P < 0.01$ )。见图1、表4。



注:A.正常组;B.高脂血症假手术组;C.高脂血症模型组;D.瑞舒伐他汀钙片组;E.DLXF低剂量组;F.DLXF高剂量组(图2-图6同)

图1 DLXF对大鼠心功能的影响

Fig. 1 Effect of DLXF on cardiac function of rat infarction

**3.4 动态激光散斑血流成像系统观察心肌缺血系统** 与正常组比较,高脂血症模型组肠系膜血流量明显降低( $P < 0.05$ );与高脂血症模型组比较,各给药组大鼠肠系膜血流量显著增加( $P < 0.01$ )。见图2、表5。

表4 DLXF对高脂血症心肌梗死大鼠心功能的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 4 Effect of DLXF on cardiac function in hyperlipidemic rats with myocardial infarction ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	LVEF	LVFS	LVIDd	LVIDs
正常组		72.80±2.26	53.28±7.34	7.87±0.77	4.53±0.18
高脂血症假手术组		85.67±1.30 <sup>4)</sup>	49.2±5.14 <sup>4)</sup>	7.32±0.25 <sup>4)</sup>	4.35±0.26 <sup>4)</sup>
高脂血症模型组		55.15±7.06 <sup>2)</sup>	30.42±4.90 <sup>2)</sup>	10.49±0.50 <sup>2)</sup>	8.07±0.44 <sup>2)</sup>
瑞舒伐他汀钙片组	0.000 45	74.67±3.52 <sup>4)</sup>	44.9±3.24 <sup>4)</sup>	7.87±0.69 <sup>4)</sup>	4.22±0.23 <sup>4)</sup>
DLXF低剂量组	1.108	71.15±2.45 <sup>4)</sup>	38.79±5.65	7.83±0.40 <sup>4)</sup>	4.42±0.52 <sup>4)</sup>
DLXF高剂量组	2.217	77.98±4.01 <sup>4)</sup>	48.16±3.79 <sup>4)</sup>	8.00±0.60 <sup>4)</sup>	4.48±0.80 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01;与高脂血症模型组比较<sup>3)</sup>P<0.05,<sup>4)</sup>P<0.01(表4-表10同)

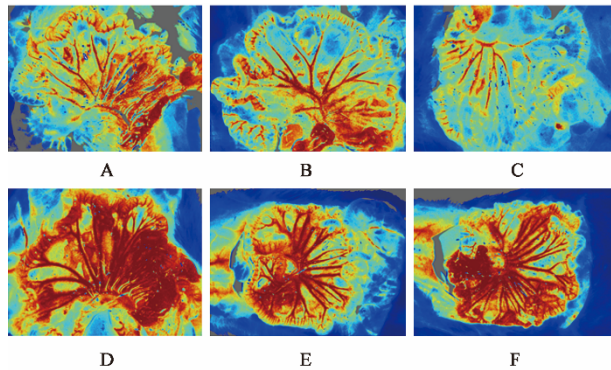


图2 大鼠肠系膜血流的激光多普勒血流灌注成像

Fig. 2 Laser Doppler perfusion imaging of rat mesenteric blood flow

表5 DLXF对高脂血症心肌梗死大鼠肠系膜血流量的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 5 Effect of DLXF on mesenteric blood flow in hyperlipidemic rats with myocardial infarction ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	相对血流量
正常组		1.00±0.17
高脂血症假手术组		0.82±0.06
高脂血症模型组		0.85±0.09 <sup>1)</sup>
瑞舒伐他汀钙片组	0.000 45	1.09±0.13 <sup>4)</sup>
DLXF低剂量组	1.108	1.13±0.06 <sup>4)</sup>
DLXF高剂量组	2.217	1.15±0.10 <sup>4)</sup>

### 3.5 血清生化指标的检测

**3.5.1 DLXF对高脂血症心肌梗死大鼠血清TC、TG水平的影响** 与正常组比较,高脂血症模型组大鼠血清中的TC和TG水平显著升高( $P<0.01$ );与高脂血症模型组比较,瑞舒伐他汀钙片组TC、TG均显著降低( $P<0.01$ ),DLXF低剂量组TC、TG明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ),DLXF高剂量组TG明显降低( $P<0.05$ )。见表6。

**3.5.2 DLXF对高脂血症心肌梗死大鼠血清HDL-C、LDL-C、VLDL水平的影响** 与正常组比较,高脂血症假手术组及模型组大鼠血清中HDL-C

表6 DLXF对高脂血症心肌梗死大鼠血清TC、TG水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

Table 6 Effect of DLXF on serum TC and TG levels in hyperlipidemic rats with myocardial infarction ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )mmol·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TC	TG
正常组		1.28±0.13	0.54±0.04
高脂血症假手术组		1.82±0.07	1.28±0.07
高脂血症模型组		1.95±0.03 <sup>2)</sup>	1.16±0.14 <sup>2)</sup>
瑞舒伐他汀钙片组	0.000 45	0.97±0.19 <sup>4)</sup>	0.53±0.10 <sup>4)</sup>
DLXF低剂量组	1.108	1.58±0.08 <sup>3)</sup>	0.69±0.03 <sup>4)</sup>
DLXF高剂量组	2.217	1.73±0.40	0.96±0.07 <sup>3)</sup>

水平明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ),LDL-C和极低密度脂蛋白胆固醇(VLDL)水平显著升高( $P<0.01$ )。与高脂血症模型组比较,DLXF低、高剂量组HDL-C水平明显升高( $P<0.05, P<0.01$ ),VLDL水平均显著下降( $P<0.01$ );瑞舒伐他汀钙片组LDL-C、VLDL水平显著降低( $P<0.01$ );DLXF高剂量组LDL-C水平显著下降( $P<0.01$ )。见表7。

**3.5.3 DLXF对高脂血症心肌梗死大鼠血清IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、NT-proBNP水平的影响** 与正常组比较,高脂血症模型组IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 水平显著升高( $P<0.01$ ),提示模型构建成功且伴随炎症反应增强。与高脂血症模型组比较,瑞舒伐他汀钙片组和DLXF低、高剂量组的IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 明显下降( $P<0.05, P<0.01$ ),表明该药物对炎症因子具有显著抑制作用。与正常组比较,高脂血症模型组NT-proBNP的水平显著升高( $P<0.01$ );与高脂血症模型组比较,各给药组NT-proBNP显著降低( $P<0.01$ )。见表8。

**3.6 HE、Masson染色观察心肌组织病理形态学变化** 经HE染色观察,与假手术组比较,高脂血症模型组的心肌纤维呈现肿胀状态,细胞排列出现紊乱,细胞核出现萎缩现象,心肌坏死程度加剧,心肌组织排列明显紊乱,细胞间隙扩大;与高脂血症模型组比较,瑞舒伐他汀钙片组和DLXF低、高剂量组

表7 DLXF对高脂血症心肌梗死大鼠血清HDL-C、LDL-C、VLDL水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table 7 Effect of DLXF on serum HDL-C, LDL-C, and VLDL levels in hyperlipidemic rats with myocardial infarction ( $\bar{x} \pm s, n=4$ ) mmol·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	HDL-C	LDL-C	VLDL
正常组		1.13±0.07	0.41±0.07	0.24±0.02
高脂血症假手术组		0.75±0.08 <sup>2)</sup>	0.73±0.02 <sup>2)</sup>	0.58±0.03 <sup>2)</sup>
高脂血症模型组		0.80±0.06 <sup>1)</sup>	0.73±0.07 <sup>2)</sup>	0.53±0.06 <sup>2)</sup>
瑞舒伐他汀钙片组	0.000 45	0.88±0.09	0.55±0.10 <sup>4)</sup>	0.24±0.04 <sup>4)</sup>
DLXF低剂量组	1.108	1.25±0.29 <sup>4)</sup>	0.72±0.02	0.31±0.01 <sup>4)</sup>
DLXF高剂量组	2.217	1.12±0.12 <sup>3)</sup>	0.54±0.05 <sup>4)</sup>	0.38±0.07 <sup>4)</sup>

表8 DLXF对高脂血症心肌梗死大鼠血清IL-1β、IL-6、TNF-α、NT-proBNP水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table 8 Effect of DLXF on serum IL-1β, IL-6, TNF-α and NT-proBNP levels in hyperlipidemic rats with myocardial infarction ( $\bar{x} \pm s, n=4$ ) ng·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-1β	IL-6	TNF-α	NT-proBNP
正常组		106.25±5.91	71.10±8.35	65.75±5.18	180.8±14.96
高脂血症假手术组		220.39±18.89 <sup>3)</sup>	140.99±24.08 <sup>4)</sup>	132.01±5.21 <sup>3)</sup>	234.57±10.88 <sup>4)</sup>
高脂血症模型组		265.55±18.21 <sup>2)</sup>	218.05±16.32 <sup>2)</sup>	165.7±21.14 <sup>2)</sup>	374.92±18.51 <sup>2)</sup>
瑞舒伐他汀钙片组	0.000 45	145.45±27.82 <sup>4)</sup>	80.31±6.65 <sup>4)</sup>	89.6±8.14 <sup>4)</sup>	242.35±22.36 <sup>4)</sup>
DLXF低剂量组	1.108	136.46±20.43 <sup>4)</sup>	87.33±4.52 <sup>4)</sup>	120.18±16.93 <sup>3)</sup>	226.48±10.03 <sup>4)</sup>
DLXF高剂量组	2.217	185.55±9.55 <sup>4)</sup>	95.54±11.36 <sup>4)</sup>	75.92±5.29 <sup>4)</sup>	269.68±7.26 <sup>4)</sup>

的心肌组织结构紊乱情况得到了有效改善,细胞边界相对清晰,心肌纤维排列相对规整。见图3。

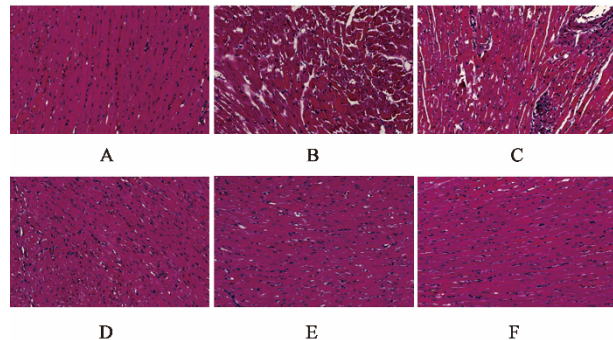


图3 DLXF对高脂血症心肌梗死大鼠心脏组织病理水平的影响 (HE, ×200)

Fig. 3 Effect of DLXF on cardiac histopathology in hyperlipidemic rats with myocardial infarction (HE, ×200)

Masson染色结果显示,正常组大鼠心肌纤维排列整齐,呈束状走行,细胞间质胶原纤维分布无明显增生;与假手术组比较,高脂血症模型组大鼠心肌纤维出现严重断裂,排列紊乱,胶原纤维显著增生,形成明显的纤维化病变;与高脂血症模型组比较,各药物干预组大鼠心肌组织均有所改善,心肌纤维排列趋于规整,胶原纤维增生程度明显减轻。见图4。

### 3.7 透射电镜观察心肌组织中线粒体的超微结构

采用透射电镜观察心肌超微结构,结果如图5,正常组心肌细胞形态规则,结构清晰,清楚可见心肌

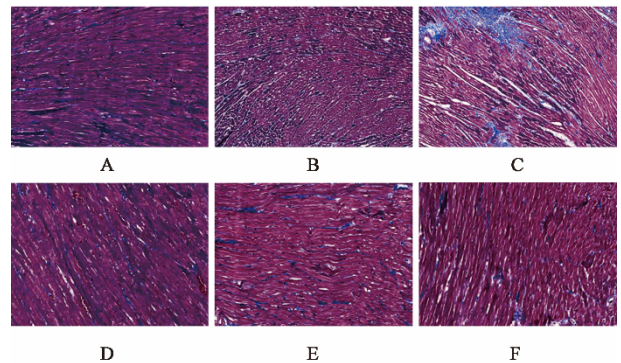


图4 DLXF对高脂血症心肌梗死大鼠心脏组织病理水平的影响 (Masson, ×200)

Fig. 4 Effect of DLXF on cardiac histopathology in hyperlipidemic rats with myocardial infarction (Masson, ×200)

横纹,明暗带交替分明,Z线及M线清晰平直。成束的肌丝之间可见大量密集呈线性排列、形态饱满的线粒体,线粒体膜及嵴结构清晰,内容物饱满,线粒体嵴结构细密而整齐。模型组心肌细胞排列松散没有规律,部分心肌组织断裂,肌节长度不均。线粒体排列无序,肿胀变形,部分体积增大外膜破裂,可见泡状结构,线粒体嵴变短且紊乱,破坏明显。与模型组比较,瑞舒伐他汀钙片组及DLXF低、高剂量组心肌细胞形态规则,结构更为清晰,可见有规律的明暗带交替排列,少见有线粒体聚集成簇的情况出现,大致排列有序,线粒体膜及嵴结构清晰,内容物较为饱满,部分线粒体可见轻度肿胀。

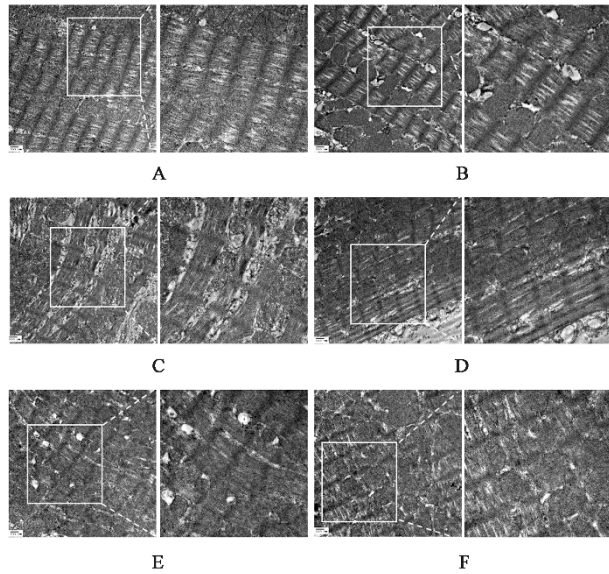


图5 DLXF对高脂血症心肌梗死大鼠心肌线粒体的影响(透射电镜,  $\times 15\ 000, \times 25\ 000$ )

Fig. 5 Effect of DLXF on myocardial mitochondria in hyperlipidemic rats with myocardial infarction (TEM,  $\times 15\ 000, \times 25\ 000$ )

**3.8 TUNEL法检测心肌细胞凋亡** TUNEL染色结果如图6,正常组和假手术组内棕褐色细胞较为少见,凋亡细胞较少,细胞形态规则完整;模型组心肌细胞排列紊乱,棕褐色凋亡细胞散在分布,凋亡细胞

数较多;其他给药各组发现散在不同程度的细胞凋亡,细胞形态发生改变,但较模型组有所改善。

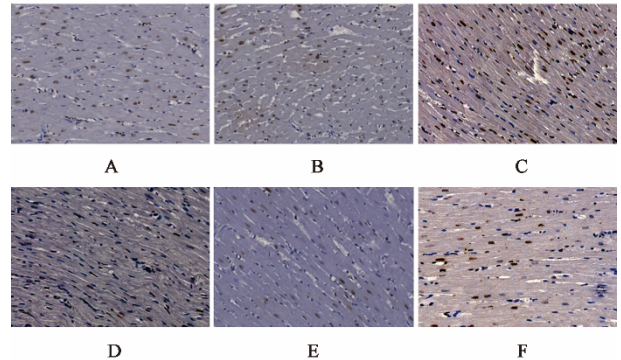


图6 DLXF对高脂血症心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡的影响

Fig. 6 Effect of DLXF on myocardial apoptosis in hyperlipidemic rats with myocardial infarction

**3.9 对心肌组织 Epac1、VDAC1、NLRP3、Caspase-9、Caspase-3的mRNA表达的影响** 与正常组比较,高脂血症模型组大鼠心脏组织 Epac1、VDAC1、NLRP3、Caspase-9、Caspase-3 mRNA表达水平明显升高( $P < 0.05, P < 0.01$ )。与高脂血症模型组比较,各给药组大鼠心肌组织的 Epac1、VDAC1、NLRP3、Caspase-9、Caspase-3 mRNA表达水平明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表9。

表9 DLXF对高脂血症心肌梗死大鼠心脏组织 Epac1、VDAC1、NLRP3、Caspase-3、Caspase-9 mRNA的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 9 Effect of DLXF on cardiac mRNA expression of Epac1, VDAC1, NLRP3, Caspase-3, and Caspase-9 in hyperlipidemic rats with myocardial infarction ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	Epac1	VDAC1	NLRP3	Caspase-9	Caspase-3
正常组		0.96 $\pm$ 0.20	1.00 $\pm$ 0.05	0.73 $\pm$ 0.32	1.05 $\pm$ 0.12	0.69 $\pm$ 0.21
高脂血症假手术组		0.96 $\pm$ 0.15 <sup>3)</sup>	1.04 $\pm$ 0.24 <sup>4)</sup>	0.78 $\pm$ 0.42 <sup>4)</sup>	1.15 $\pm$ 0.18 <sup>3)</sup>	0.81 $\pm$ 0.22 <sup>4)</sup>
高脂血症模型组		1.41 $\pm$ 0.02 <sup>1)</sup>	1.65 $\pm$ 0.09 <sup>2)</sup>	2.10 $\pm$ 0.21 <sup>2)</sup>	1.43 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>	1.91 $\pm$ 0.53 <sup>2)</sup>
瑞舒伐他汀钙片组	0.000 45	0.98 $\pm$ 0.21 <sup>3)</sup>	0.83 $\pm$ 0.12 <sup>4)</sup>	0.98 $\pm$ 0.22 <sup>4)</sup>	0.95 $\pm$ 0.09 <sup>4)</sup>	1.06 $\pm$ 0.30 <sup>4)</sup>
DLXF低剂量组	1.108	1.00 $\pm$ 0.26 <sup>3)</sup>	1.01 $\pm$ 0.33 <sup>4)</sup>	0.38 $\pm$ 0.11 <sup>4)</sup>	1.01 $\pm$ 0.26 <sup>4)</sup>	0.41 $\pm$ 0.06 <sup>4)</sup>
DLXF高剂量组	2.217	1.06 $\pm$ 0.25 <sup>3)</sup>	1.22 $\pm$ 0.25 <sup>3)</sup>	0.72 $\pm$ 0.36 <sup>4)</sup>	1.14 $\pm$ 0.15 <sup>3)</sup>	0.80 $\pm$ 0.44 <sup>4)</sup>

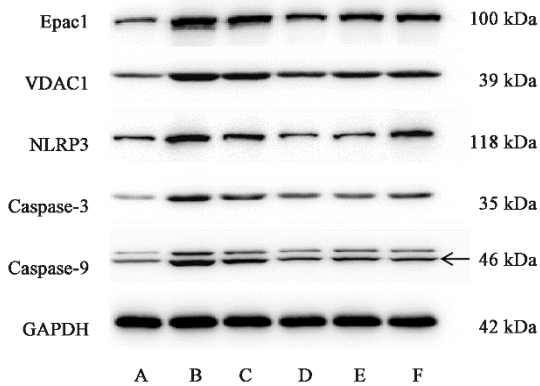
**3.10 对 Epac1、VDAC1、NLRP3、Caspase-9、Caspase-3的蛋白表达的影响** 大鼠造模后,予以DLXF干预4周,取各组大鼠左室心肌组织,测定 Epac1、VDAC1、NLRP3、Caspase-9、Caspase-3 相关蛋白表达量,见表10、图7,与正常组比较,模型组各蛋白表达水平显著增高( $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组 Epac1、VDAC1、NLRP3、Caspase-9、Caspase-3 相关蛋白表达明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

#### 4 讨论

伴随近年来人们生活方式的变化,在高脂血症基础上发生的急性心肌梗死不仅在人群中普遍发

发,更呈现明显的年轻化趋势<sup>[11]</sup>。应对这一日益严峻的复合型心血管危机,具备多维度调节优势的中医药研究价值日益凸显<sup>[12-14]</sup>。

DLXF(宣痹安痛方的商品名)系由广安门医院名老中医团队基于多年临床实践研发的经典方剂,该方以丹参为君药,佐以人参、黄连、法半夏、赤芍、葛根、三七、肉苁蓉等多味药材科学配伍而成。具有补气活血,清热涤痰之功效。诸药相合,攻补兼施,祛邪不伤正,则瘀血得散,里热得清,痰湿得化。安全性评价结果显示,DLXF安全无不良反应。药理学研究显示,DLXF具有改善脂质异常、线粒体损



注:A.正常组;B.高脂血症模型组;C.高脂血症假手术组;D.瑞舒伐他汀钙片组;E.DLXF低剂量组;F.DLXF高剂量组

图7 大鼠心肌组织 Epac1、VDAC1、NLRP3、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达电泳

Fig.7 Electrophoretogram of Epac1, VDAC1, NLRP3, Caspase-3, and Caspase-9 protein expression in rat myocardial tissue

伤,降低心肌耗氧量,增强心肌耐缺氧能力,降低全血黏度,改善心功能,保护受损心肌等作用<sup>[15-18]</sup>。现代药理研究支持 DLXF 中人参、黄连等<sup>[19-23]</sup>中药组分具有改善心肌功能、抑制细胞凋亡、抑制炎症反应、促进血管生成,调节血脂及改善微循环、调节能量代谢等方面的作用,但相关研究仍较为有限。本文依据前期研究,利用 DLXF 对高脂血症急性心肌梗死模型大鼠进行干预,通过炎症因子相关生物标志物及蛋白表达途径,探究 DLXF 对大鼠心功能的作用机制,希望为中医药在心血管相关疾病治疗中的应用价值提供后续基础。

本研究通过构建高脂血症叠加急性心肌梗死模型大鼠,进行 DLXF 干预高脂加心肌梗死大鼠的药效学研究,结果表明,DLXF 可以显著改善心功能,全面提升大鼠的整体生存质量。研究结果显示,DLXF 高剂量组大鼠 LVEF、LVFS 均增高, LVIDd、LVIDs 均显著减少,提示药物能有效改善心肌收缩功能。血脂作为人体内代谢过程中的重要

组成部分在血液中广泛分布,是维持生命活动不可或缺的物质<sup>[24]</sup>。血清生化结果表明,DLXF 可有效降低 TC、TG、LDL-C,升高 VLDL,由此证实 DLXF 可有效调节高脂血症大鼠血脂相关指标变化水平,降低相关心血管负荷的影响。IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  都是重要的炎症细胞因子,他们在炎症反应中相互调节的同时,在心脏损伤和心力衰竭的病理过程中也发挥着重要作用<sup>[25-27]</sup>。NT-proBNP 是脑钠肽(BNP)的前体,主要由心脏室壁在压力或容量负荷增加时分泌。DLXF 可显著降低 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  及 NT-proBNP 水平,减轻大鼠炎症反应。心脏作为循环系统的动力中心,其泵血功能可直接影响全身器官的血液灌注<sup>[28]</sup>。心排血量的变动与肠系膜上动脉血流或内脏血流的改变之间存在显著的关联性<sup>[29-30]</sup>。研究中,DLXF 给药组可明显改善肠系膜血流灌注情况。组织病理学观察显示,DLXF 能减轻心肌细胞损伤、减少坏死灶、抑制炎症浸润、改善心肌纤维排列并控制纤维增生,透射电镜证实其可修复心肌超微结构及线粒体形态,TUNEL 染色提示其在一定程度上抑制心肌细胞凋亡。

cAMP 是细胞内广泛存在的第二信使,能够激活多种蛋白质来调控线粒体功能。当细胞内 cAMP 水平显著升高时,会直接激活其效应因子 Epac1,进而通过下游信号分子促使 VDAC1 过度开放或寡聚化<sup>[31-32]</sup>。VDAC1 作为通道蛋白,介导 Bax、Bcl-2 对线粒体膜通透性的调控,VDAC1 的上调能够引发细胞凋亡途径<sup>[33-34]</sup>,并在 NLRP3 炎症小体激活<sup>[35]</sup>及炎症因子 IL-1 $\beta$  释放中扮演关键角色<sup>[36]</sup>。其异常表达也可能影响线粒体释放 Cyt c,进而激活 Caspase-9, Caspase-9 是凋亡的启动因子,可被凋亡信号激活,进而激活下游的 Caspase-3 等执行因子,触发凋亡级联反应<sup>[37-38]</sup>。本研究结果显示,DLXF 给药组大鼠心肌组织的 Epac1、VDAC1、NLRP3、Caspase-3、Caspase-9 mRNA 及蛋白表达水平与模型组比较显

表 10 DLXF 对大鼠心肌组织 Epac1、VDAC1、NLRP3、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 10 Effect of DLXF on cardiac protein expression of Epac1, VDAC1, NLRP3, Caspase-3, and Caspase-9 in hyperlipidemic rats with myocardial infarction ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Epac1	VDAC1	NLRP3	Caspase-9	Caspase-3
正常组		0.65±0.12	0.92±0.02	0.29±0.04	0.48±0.13	0.37±0.07
高脂血症假手术组		0.52±0.04 <sup>1)</sup>	0.79±0.20 <sup>2)</sup>	0.48±0.12 <sup>2)</sup>	0.60±0.13 <sup>2)</sup>	0.61±0.15 <sup>2)</sup>
高脂血症模型组		1.22±0.22 <sup>2)</sup>	1.50±0.14 <sup>4)</sup>	1.35±0.10 <sup>4)</sup>	1.36±0.36 <sup>4)</sup>	1.21±0.16 <sup>4)</sup>
瑞舒伐他汀钙片组	0.000 45	0.60±0.06 <sup>4)</sup>	0.75±0.20 <sup>4)</sup>	0.74±0.08 <sup>4)</sup>	0.73±0.05 <sup>4)</sup>	0.91±0.03 <sup>3)</sup>
DLXF 低剂量组	1.108	0.87±0.12 <sup>4)</sup>	0.77±0.11 <sup>4)</sup>	1.07±0.24 <sup>3)</sup>	0.68±0.23 <sup>4)</sup>	0.87±0.09 <sup>4)</sup>
DLXF 高剂量组	2.217	0.78±0.19 <sup>4)</sup>	0.82±0.09 <sup>4)</sup>	0.77±0.18 <sup>4)</sup>	0.45±0.09 <sup>4)</sup>	0.97±0.16 <sup>3)</sup>

著降低。尤为重要的是,DLXF对这条信号轴上多个节点均表现出协同性抑制作用。这种跨分子的高度一致性,结合已有研究证实Epac1可直接调控VDAC1功能<sup>[39]</sup>,共同强有力地提示:DLXF并非孤立地作用于多个平行靶点,而是很可能通过抑制上游枢纽分子Epac1,从而“釜底抽薪”般地阻断了由其介导的VDAC1功能异常,进而协同抑制了下游的NLRP3炎症小体激活与Caspase凋亡级联反应。值得注意的是,笔者观察到高脂假手术组的VDAC1蛋白水平呈现适应性下调,而其mRNA表达不变,提示存在翻译后调控。我们推测,这可能是心脏在代谢应激早期启动的一种“预适应”保护机制,通过适度抑制VDAC1功能以增强细胞对后续损伤的耐受性<sup>[31]</sup>。

本研究聚焦于DLXF通过抑制Epac1过度激活,调控VDAC1维持线粒体能量稳态以“补气”,改善“气虚无以行血”状态;通过抑制Epac1/VDAC1/NLRP3/Caspase信号通路减少凋亡以“活血”,减轻“瘀血阻络”相关病变;通过阻断NLRP3炎症小体激活以“涤痰”,逆转“痰热壅塞”导致的损伤。三者相辅相成,共同构成了其治疗高脂血症合并心肌梗死的整合机制。因此,Epac1及其介导的VDAC1/NLRP3信号通路可视作“补气活血、清热涤痰”治则的核心生物载体。本研究为DLXF的心脏保护机制提供了新的理论基础,揭示了清热活血涤痰类中药在心血管疾病治疗中的作用。通过聚焦Epac1、VDAC1、NLRP3、Caspase等多靶点,为高脂血症及心肌梗死的综合治疗提供了新思路,推动了中西医结合研究进展。本研究具有一定局限性,后续研究需在中医药理论指导下,进一步优化病证结合动物模型及方药评价体系,深入挖掘DLXF作用的具体机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] RALLIDIS L S, KOSMAS N, TSIREBOLOS G, et al. Prevalence of heterozygous familial hypercholesterolemia and combined hyperlipidemia phenotype in very young survivors of myocardial infarction and their association with the severity of atheromatous burden[J]. *J Clin Lipidol*, 2019, 13(3):502-508.

[2] WIESBAUER F, BLESSBERGER H, AZAR D, et al. Familial-combined hyperlipidaemia in very young myocardial infarction survivors (< or =40 years of age)[J]. *Eur Heart J*, 2009, 30(9): 1073-1079.

[3] GOLDSTEIN J L, HAZZARD W R, SCHROTT H G, et al. Hyperlipidemia in coronary heart disease. I. Lipid levels in 500 survivors of myocardial infarction[J]. *J Clin Invest*, 1973, 52(7):

1533-1543.

[4] HAZZARD W R, GOLDSTEIN J L, SCHROTT M G, et al. Hyperlipidemia in coronary heart disease. 3. Evaluation of lipoprotein phenotypes of 156 genetically defined survivors of myocardial infarction[J]. *J Clin Invest*, 1973, 52(7):1569-1577.

[5] CHO S, YING F, SWEENEY G. Sterile inflammation and the NLRP3 inflammasome in cardiometabolic disease[J]. *Biomed J*, 2023, 46(5):100624.

[6] MA Y, YANG W, LIANG P, et al. The VDAC1 oligomerization regulated by ATP5B leads to the NLRP3 inflammasome activation in the liver cells under PFOS exposure[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 281:116647.

[7] SARTRE C, PEUROIS F, LEY M, et al. Membranes prime the RapGEF EPAC1 to transduce cAMP signaling[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1):4157.

[8] REN Q, LIU X Q, ZHOU X W, et al. Effects of Huatan Jiangzhuo decoction on diet-induced hyperlipidemia and gene expressions in rats[J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19(2):100-111.

[9] 马静卓,姚博,陈恒文,等. 养心达瓦依米西克蜜膏通过调节VDAC1/NLRP3/Bax/Bcl-2通路改善大鼠心功能[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(8):115-124.

MA JZ, YAO B, CHEN HW, et al. Yangxin Dawayimicol honey ointment improves cardiac function in rats by regulating the VDAC1/NLRP3/Bax/Bcl-2 pathway[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(8):115-124.

[10] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072.

HUANG J H, HUANG X H, CHEN Z Y, et al. Dose conversion between animals and from animals to humans in pharmacological studies[J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2004, 9(9):1069-1072.

[11] MAINIERI F, LA BELLA S, CHIARELLI F. Hyperlipidemia and cardiovascular risk in children and adolescents[J]. *Biomedicines*, 2023, 11(3):809.

[12] ZHANG Y, JU J, JIAO L, et al. Bioactive components of Chinese herbal medicines in the treatment of glucose and lipid metabolism disorders: Evidence and potential mechanisms[J]. *Engineering*, 2023, 29:73-82.

[13] GAO J, HOU T. Cardiovascular disease treatment using traditional Chinese medicine: Mitochondria as the Achilles' heel [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 164:114999.

[14] LI G, HAN R X, LIN M J, et al. Developing a core outcome set for clinical trials of Chinese medicine for hyperlipidemia[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:847101.

[15] 陈恒文,张翠英,任伟光,等. 多指标综合评分法优化宣痹安痛方的水提醇沉工艺[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(1): 70-74.

CHEN H W, ZHANG C Y, REN W G, et al. Multi-index integrated evaluation method optimizes water-extraction and ethanol precipitation of Xuanbi'antong formula (XBF)[J]. *China J Chin Mater Med*, 2016, 41(1):70-74.

[16] YUAN R, GUO L L, CHEN H W, et al. Cardioprotective effects

- of HuoxueAnshen recipe against myocardial injuries induced by sleep deprivation in rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 7359760.
- [17] CHEN H, DONG Y, HE X, et al. Paeoniflorin improves cardiac function and decreases adverse postinfarction left ventricular remodeling in a rat model of acute myocardial infarction[J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12: 823-836.
- [18] 陈恒文, 李军, 林飞, 等. 宣痹安痛方对心肌梗死后心室重构大鼠心功能的改善及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(23): 71-78.  
CHEN H W, LI J, LIN F, et al. "Effect of Xuanbi Antong formula in improving ventricular remodeling in myocardial infarction rats and its mechanism"[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2017, 23(23): 71-78.
- [19] WANG Q, FU W, YU X, et al. Ginsenoside Rg<sub>2</sub> alleviates myocardial fibrosis by regulating TGF- $\beta_1$ /Smad signalling pathway[J]. Pharm Biol, 2021, 59(1): 106-113.
- [20] TURKIEH A, EL M Y, PINET F, et al. Mitophagy regulation following myocardial infarction[J]. Cells, 2022, 11(2): 199.
- [21] ZHANG Y, CAI W, HAN G, et al. *Panax notoginseng* saponins prevent senescence and inhibit apoptosis by regulating the PI3K-Akt-mTOR pathway in osteoarthritic chondrocytes[J]. Int J Mol Med, 2020, 45(4): 1225-1236.
- [22] WANG D, BU T, LI Y, et al. Pharmacological activity, pharmacokinetics, and clinical research progress of puerarin[J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(11): 2121.
- [23] SHEN P, CHEN J, PAN M. The protective effects of total paeony glycoside on ischemia/reperfusion injury in H9C2 cells via inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(3): 3332-3340.
- [24] 王增武, 郭远林. 中国血脂管理指南(基层版2024年)[J]. 中国循环杂志, 2024, 39(4): 313-321.  
WANG Z W, GUO Y L. Chinese guideline for lipid management (primary care version 2024)[J]. J. Chin. Microcirc, 2024, 39(4): 313-321.
- [25] SUN J Y, DU L J, SHI X R, et al. An IL-6/STAT3/MR/FGF21 axis mediates heart-liver cross-talk after myocardial infarction[J]. Sci Adv, 2023, 9(14): eade4110.
- [26] TOLDO S, ABBATE A. The role of the NLRP3 inflammasome and pyroptosis in cardiovascular diseases[J]. Nat Rev Cardiol, 2024, 21(4): 219-237.
- [27] CHENG Y, FENG Y, XIA Z, et al.  $\omega$ -Alkynyl arachidonic acid promotes anti-inflammatory macrophage M2 polarization against acute myocardial infarction via regulating the cross-talk between PKM2, HIF-1 $\alpha$  and iNOS[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2017, 1862(12): 1595-1605.
- [28] 张铭璐, 周斌. 冠状动脉血管发育与再生[J]. 中国科学: 生命科学, 2022, 52(5): 606-617.  
ZHANG M J, ZHOU B. The development and regeneration of coronary artery vessels[J]. Sci Sin Vitae, 2022, 52(5): 606-617.
- [29] HILTEBRAND L B, KREJCI V, TENHOEVEL M E, et al. Redistribution of microcirculatory blood flow within the intestinal wall during sepsis and general anesthesia [J]. Anesthesiology, 2003, 98(3): 658-669.
- [30] LEITHE M E, MARGORIEN R D, HERMILLER J B, et al. Relationship between central hemodynamics and regional blood flow in normal subjects and in patients with congestive heart failure[J]. Circulation, 1984, 69(1): 57-64.
- [31] MUSHESHE N, OUN A, SABOGAL-GUÁQUETA A M, et al. Pharmacological inhibition of Epac1 averts ferroptosis cell death by preserving mitochondrial integrity[J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(2): 314.
- [32] LI X S, LIU W, JIANG G, et al. Celastrol ameliorates neuronal mitochondrial dysfunction induced by intracerebral hemorrhage via targeting cAMP-activated exchange protein-1[J]. Adv Sci (Weinh), 2024, 11(19): e2307556.
- [33] ZHANG T, CAO R, NIU J, et al. G6PD maintains the VSMC synthetic phenotype and accelerates vascular neointimal hyperplasia by inhibiting the VDAC1-Bax-mediated mitochondrial apoptosis pathway[J]. Cell Mol Biol Lett, 2024, 29(1): 47.
- [34] LU H, ZHANG J, XUAN F. MiR-7a-5p attenuates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis by targeting VDAC1[J]. Cardiovasc Toxicol, 2022, 22(2): 108-117.
- [35] 纪凌云, 吴俏兰, 陈泽涛, 等. 基于NLRP3炎症小体介导的巨噬细胞焦亡探究黄芩-黄连对动脉粥样硬化的干预机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(7): 121-130.  
JI L Y, WU Q L, CHEN Z T. *Scutellariae Radix-Coptidis Rhizoma* treats atherosclerosis via NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis of macrophages[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2024, 30(7): 121-130.
- [36] LIN D, CUI B, REN J, et al. Regulation of VDAC1 contributes to the cardioprotective effects of penehyclidine hydrochloride during myocardial ischemia/reperfusion[J]. Exp Cell Res, 2018, 367(2): 257-263.
- [37] ZHANG Q, LIU J, ZHANG M, et al. Apoptosis induction of fibroblast-like synoviocytes is an important molecular-mechanism for herbal medicine along with its active components in treating rheumatoid arthritis [J]. Biomolecules, 2019, 9(12): 795.
- [38] FU Z, ZHAO P Y, YANG X P, et al. Cannabidiol regulates apoptosis and autophagy in inflammation and cancer: A review [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1094020.
- [39] PITTALÀ M, REINA S, CUBISINO S, et al. Post-translational modification analysis of VDAC1 in ALS-SOD1 model cells reveals specific asparagine and glutamine deamidation [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(12): 1218.

[责任编辑 张丰丰]