

天香丹通过调控 ROS/Caspase-1/GSDMD 信号通路抑制氧化应激减轻心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞焦亡的机制

曾飞, 黄浩, 曹宇, 席耀明, 罗晶*

(新疆医科大学第四附属医院 中医药传承创新中心, 乌鲁木齐 830000)

[摘要] 目的:探讨天香丹(TXP)通过调控活性氧(ROS)/胱天蛋白酶-1(Caspase-1)/消皮素 D(GSDMD)信号通路减轻心肌缺血再灌注(I/R)损伤大鼠心肌细胞焦亡的机制。方法:将 54 只 SPF 级雄性成年 SD 大鼠随机分为 6 组($n=9$):假手术组(Sham 组,仅开胸不结扎)、I/R 组(冠状动脉左前降支结扎 30 min 后复灌)、N-乙酰半胱氨酸(NAC)组(阳性药物, $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ NAC)、天香丹低剂量组[TXP-L($2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,灌胃]、天香丹中剂量组[TXP-M($5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,灌胃]、天香丹高剂量组[TXP-H($10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,灌胃]。荧光探针法检测 ROS 水平。生化试剂盒法分别检测 Caspase-1 活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法检测大鼠心肌梗死面积。蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 ROS/Caspase-1/GSDMD 信号通路蛋白[GSDMD、剪切型(cleaved) Caspase-1/Caspase-1、GSDMD 的 N 端结构域(GSDMD-N)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶复合体 p22-phox 亚基(p22phox)]的表达水平。酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测白细胞介素-1 β (IL-1 β)含量。透射电镜(TEM)观察线粒体结构并对肿胀程度进行评分。结果:与 Sham 组比较,I/R 组 ROS 水平、Caspase-1 活性、GSDMD 表达、IL-1 β 含量、MDA 含量、梗死面积、线粒体肿胀评分及 cleaved Caspase-1/Caspase-1、GSDMD-N、p22phox 表达均明显升高,SOD 和 GSH-Px 活性明显降低($P<0.05$);与 I/R 组比较,NAC 组及不同剂量 TXP 组(TXP-L 组、TXP-M 组、TXP-H 组)均能明显降低 ROS 水平、Caspase-1 活性、GSDMD 表达、IL-1 β 含量、MDA 含量、梗死面积及线粒体肿胀评分,同时明显下调 cleaved Caspase-1/Caspase-1、GSDMD-N、p22phox 的表达,并明显升高 SOD 和 GSH-Px 活性($P<0.05$),且随着 TXP 给药剂量的增加,ROS、MDA、SOD、GSH-Px、Caspase-1 活性、GSDMD 表达、IL-1 β 含量、cleaved Caspase-1/Caspase-1、GSDMD-N、p22phox 及梗死面积、线粒体肿胀评分的改善效果均明显呈剂量依赖性增强($P<0.05$)。结论:天香丹可通过抑制 ROS/Caspase-1/GSDMD 信号通路介导的氧化应激与细胞焦亡,减轻心肌 I/R 损伤。

[关键词] 天香丹;活性氧/胱天蛋白酶-1/消皮素 D 信号通路;心肌缺血再灌注损伤;大鼠;细胞焦亡

[中图分类号] R289;R259;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)18-0143-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260101

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20260120.1543.003>

[网络出版日期] 2026-01-21 08:51:33



Tianxiang Pills Alleviates Myocardial Cell Pyroptosis in Rat Model of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Inhibiting Oxidative Stress via ROS/Caspase-1/GSDMD Signaling Pathway

ZENG Fei, HUANG Hao, CAO Yu, XI Yaoming, LUO Jing*

(Traditional Chinese Medicine Inheritance and Innovation Center,

The Fourth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism by which Tianxiang pills (TXP) alleviates myocardial cell pyroptosis in the rat model of myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury through modulating the reactive oxygen species (ROS)/cysteinyl aspartate-specific proteinase-1 (Caspase-1)/gasdermin D (GSDMD) signaling pathway. **Methods:** A total of 54 SPF-grade adult

[收稿日期] 2025-10-08

[基金项目] 自治区中医药青年科技人才项目(ZYQ2025024)

[第一作者] 曾飞,硕士,副主任医师,从事中西医结合心胸外科研究,E-mail:zengfei36@outlook.com

[通信作者] *罗晶,硕士,副主任医师,从事中西医结合临床研究,E-mail:luojing19831018@163.com

male Sprague-Dawley rats were randomized into six groups ($n=9$): sham (thoracotomy only without ligation), I/R (left anterior descending coronary artery ligation for 30 min followed by reperfusion), NAC (positive control, N-acetylcysteine, $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, by gavage), low-dose Tianxiang pills (TXP-L, $2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, by gavage), medium-dose Tianxiang pills (TXP-M, $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, by gavage), and high-dose Tianxiang pills (TXP-H, $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, by gavage). The fluorescent probe method was employed to measure the ROS level. Biochemical assay kits were employed to determine the Caspase-1 activity, superoxide dismutase (SOD) activity, malondialdehyde (MDA) content, and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity. Myocardial infarct size was assessed by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. Western blot analysis was performed to evaluate the expression levels of proteins in the ROS/Caspase-1/GSDMD pathway, including GSDMD, cleaved Caspase-1/Caspase-1 ratio, the N-terminal domain of GSDMD (GSDMD-N), and the p22-phox subunit of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase complex. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was utilized to determine the concentration of interleukin- 1β (IL- 1β). Transmission electron microscopy (TEM) was employed to observe mitochondrial structure and to score the degree of mitochondrial swelling.

Results: Compared with the Sham group, the I/R group exhibited elevated the levels of ROS, Caspase-1 activity, GSDMD expression, IL- 1β concentration, MDA content, infarct area, mitochondrial swelling score, cleaved Caspase-1/Caspase-1, GSDMD-N, and p22phox and decreased activities of SOD and GSH-Px ($P<0.05$). Compared with the I/R group, NAC and different doses of TXP significantly reduced the ROS level, Caspase-1 activity, GSDMD expression, IL- 1β concentration, MDA content, infarct area, and mitochondrial swelling score. Moreover, they downregulated the expression of cleaved Caspase-1/Caspase-1, GSDMD-N, and p22phox and increased the activities of SOD and GSH-Px ($P<0.05$). Furthermore, TXP exerted effects on ROS, MDA, SOD, GSH-Px, Caspase-1 activity, GSDMD expression, IL- 1β concentration, cleaved Caspase-1/Caspase-1, GSDMD-N, p22phox, infarct area, and mitochondrial swelling score in a dose-dependent manner ($P<0.05$).

Conclusion: Tianxiang pills alleviates myocardial I/R injury by mitigating oxidative stress and cell pyroptosis through the inhibition of the ROS/Caspase-1/GSDMD signaling pathway.

[Keywords] Tianxiang pills; reactive oxygen species/cysteinyl aspartate-specific proteinase-1 (Caspase-1)/gasdermin D signaling pathway; myocardial ischemia/reperfusion injury; rat; pyroptosis

心肌缺血再灌注(I/R)损伤是急性心肌梗死再通治疗后的严重并发症,其核心机制涉及活性氧(ROS)爆发引发的氧化应激级联反应^[1-2]。过量ROS不仅直接损伤心肌细胞,还可激活炎症小体,促进胱天蛋白酶-1(Caspase-1)依赖的细胞焦亡^[3-6]。消皮素D(GSDMD)作为焦亡执行蛋白,其裂解的N端结构域(GSDMD-N)在细胞膜上成孔,导致细胞溶解和炎症因子白细胞介素- 1β (IL- 1β)释放,进一步扩大心肌损伤^[5-6]。研究表明,靶向ROS/Caspase-1/GSDMD信号通路可显著减轻I/R损伤^[5-6],但目前临床缺乏高效低毒的治疗药物。抗氧化剂如N-乙酰半胱氨酸(NAC)可通过清除ROS减轻I/R损伤,但其单靶点作用局限且长期疗效欠佳^[7-12]。近年来,中药复方因其多成分、多靶点优势成为研究热点^[13-16]。

天香丹是我国心血管领域专家安冬青教授研发的治疗心血管疾病的方剂,由红景天、唇香草、丹参、降香等药物组成^[17-18],是治疗心血管疾病的方剂,前期研究证实其可改善心肌缺血,然而其对ROS/Caspase-1/GSDMD信号通路的调控作用尚未明确^[17-20]。值得注意的是,细胞焦亡在心肌I/R损伤中的关键作用已被证实,但中药抑制焦亡的具体分子机制研究仍较匮乏,亟待通过严谨实验阐明其药效与机制间的因果关联^[21-22]。本研究基于ROS/Caspase-1/GSDMD信号通路并结合氧化应激与细

胞焦亡双维度评价体系,旨在揭示天香丹减轻心肌I/R损伤的深层机制,为拓展天香丹在心血管疾病治疗中的应用提供实验依据,并为开发靶向细胞程序性死亡的中药新策略奠定理论基础。

1 材料

1.1 动物 54只SPF级雄性成年SD大鼠,体质量220~250 g,购自新疆医科大学实验动物中心,实验动物生产合格证号SCXK(新)2022-0003。动物饲养于新疆医科大学实验动物中心SPF级动物房,饲养环境:温度22~26℃,相对湿度40%~60%,12 h光照/12 h黑暗交替,自由摄食饮水。

1.2 伦理 本研究所有动物实验操作均经新疆医科大学实验动物伦理委员会批准,伦理批号20230918。

1.3 试剂 NAC(美国Merk公司,纯度 $\geq 98\%$,CAS号106-87-6);天香丹颗粒(新疆医科大学附属中医医院,批号新药制字Z20040820);GSDMD抗体、剪切的(cleaved)Caspase-1抗体、Caspase-1抗体、GSDMD-N抗体、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶复合体p22-phox亚基(p22phox)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)及抗兔免疫球蛋白(Ig)G-辣根过氧化物酶(HRP)二抗(美国CST公司,货号分别为100434、89332、2225、93709、4380、2118、7074);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色

试剂盒、Caspase-1 活性检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性检测试剂盒、ROS 荧光检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号分别为 C0099、C1158、S0109、S0131、S0056、S0033);白细胞介素-1 β (IL-1 β)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(英国 Abcam 公司,货号 ab255729)。

1.4 仪器 FA2004N 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司);TGL-16M 型高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);IX73 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司);Multiskan FC 型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Mini-PROTEAN Tetra 型蛋白电泳仪、Trans-Blot Turbo 型转印仪(美国 Bio-Rad 公司);DW-86L626 型超低温冰箱(海尔生物医疗股份有限公司);DHP-9052 型恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);Tech Electron TEM 120B 型透射电子显微镜(德国 Tech Electron GmbH 公司)。

2 方法

2.1 实验动物管理,模型建立和分组 大鼠均在恒温恒湿环境中饲养,光照周期为每日 12 h 明/12 h 暗,自由摄取食物和饮用水。在动物饲养稳定后,用心肌 I/R 模型模拟临床急性心肌缺血再灌注损伤。将大鼠在术前禁食 12 h,大鼠经过 40 mg·kg⁻¹ 的 1% 戊巴比妥钠腹腔注射下进入深麻状态,颈部消毒备皮,在无菌操作台上,通过开胸术暴露心脏,对左前降支冠状动脉进行穿刺性结扎,采用结扎夹闭使局部心肌进入缺血状态,缺血时间 30 min,结束后,迅速解除结扎使血液重新灌注^[23-24]。大鼠被置于恒温箱内恢复至清醒状态,并于大鼠股部肌肉注射 10 万 U/只的青霉素 G。

并将 54 只大鼠随机分为 6 组,每组 9 只。假手术组(Sham 组)大鼠进行开胸暴露,不作冠状动脉结扎处理,灌胃等体积生理盐水作为对照。I/R 组(方法同上,灌胃生理盐水)、NAC 组(阳性药,术前 3 d 和术后 14 d,每日用 150 mg·kg⁻¹ NAC 灌胃 1 次)。另外,参照人与大鼠体表面积折算比例,确定大鼠等效剂量约为 5 g·kg⁻¹,并将其设为中剂量组。为进一步评价药物的量效关系,实验设置天香丹低、中、高剂量,分别为等效剂量的 0.5 倍和 2 倍,天香丹低剂量组[TXP-L 组,术前 3 d 和术后 14 d,每日用 2.5 g·kg⁻¹ TXP 灌胃 1 次)、天香丹中剂量组(TXP-M 组,术前 3 d 和术后 14 d,每日用 5 g·kg⁻¹ TXP-M 灌胃 1 次)、天香丹高剂量组(TXP-H 组,术前 3 d 和术

后 14 d,每日用 10 g·kg⁻¹ TXP-H 灌胃 1 次)^[18,25]。每只动物体质量精确称量,分别按照体质量精确配置灌胃药物。

各组处理结束后,分离外周血保存于 4 °C。随后安乐死各组大鼠,分离全心脏组织,一部分固定于 10% 甲醛溶液中,用于 TTC 染色,另一部分速冻于液氮中保存,分子生物学实验检测;其余部分切片处理后用于透射电镜观察心肌细胞超微结构。

2.2 荧光检测 ROS 水平 配制 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)保存于 4 °C。将 15 μm 的心肌冰冻切片直接贴于载玻片,切片的组织用 100 $\mu\text{L}\cdot\text{cm}^{-2}$ 的 DCFH-DA 工作液覆盖,在 37 °C 避光孵育 30 min,再用预冷磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 5 min $\times$ 3 次。荧光显微镜设定激发光 488 nm、发射光 525 nm,最终数据为随机 5 个视野的平均荧光强度。

2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 ROS/Caspase-1/GSDMD 信号通路蛋白的表达 心肌组织置于预冷匀浆机内,加裂解缓冲液(含有 1% 蛋白酶抑制剂)匀浆,置冰上裂解 30 min 提取蛋白。裂解后,经离心(12 000 r·min⁻¹, 15 min,离心半径 8 cm, 4 °C)收集上清液,并通过聚氨基丙烯酸正丁酯(BCA)法定量蛋白的浓度。蛋白样品于 95 °C 加热 5 min 使蛋白变性。随后,在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶上电泳分离,结束后,将分离后的蛋白转移至 PVDF 膜。用 5% 脱脂奶粉在含 Tween-20 的 Tris 缓冲盐溶液(TBST)缓冲液中封闭聚偏二氟乙烯(PVDF)膜 1 h,随后用 GSDMD (1: 800)、cleaved Caspase-1 (1: 1 000)、Caspase-1 (1: 800)、GSDMD-N (1: 1 200)、p22phox (1: 1 000)、GAPDH (1: 5 000)的一抗在 4 °C 孵育过夜,并用二抗 (1: 2 000)室温孵育 1 h,经过化学发光试剂(ECL)显影后,利用 Image Lab 软件分析条带灰度值,以 GAPDH 为内参蛋白计算各目的蛋白相对表达量。

2.4 心肌生化指标及氧化应激指标检测 组织样本在液氮中冷冻后迅速研磨,再利用预置的裂解液进行裂解,使用 Caspase-1、SOD、MDA、GSH-Px 的水平试剂盒进行检测,各检测指标均依照试剂盒操作手册进行,通过酶标仪在 405 nm 处读数获得各指标的含量。

2.5 ELISA 检测 IL-1 β 水平 为评价缺血再灌注后大鼠的炎症反应的变化,采用 ELISA 对 IL-1 β 进行测定。取血清,按照 ELISA 试剂盒说明进行操作,利用标准品建立标准曲线,利用酶标仪在

405 nm 波长下读取吸光度 A , 通过标准曲线计算 IL-1 β 的水平。

2.6 TTC 法检测心肌梗死面积 心肌组织被切成 3 mm 厚的均匀切片。将切片浸入 1%TTC 染色液(配于 0.9%NaCl 溶液中),并在 37 °C 避光条件下孵育 20 min。染色后,将切片用甲醛固定,拍照留存,红色区域为正常心肌组织,白色区域为梗死组织,利用图像分析软件 Image J 计算白色区域与总心肌面积的比值,即梗死面积=白色区域面积/总面积 $\times$ 100%。

2.7 透射电镜(TEM)检测心肌组织超微结构 将心肌组织小块(1 mm³) 在 5% 预冷至 4 °C 的戊二醛溶液中固定 2 h,采用梯度乙醇脱水,即依次用 30%、50%、70%、80%、90%、95% 和 100% 乙醇,每级浸泡约 5 min,再通过丙烯酰胺进行渗透,随后进行树脂包埋,在 60 °C 下固化 12~24 h 制成超薄切片。切片先后在铅柠檬酸盐溶液和 1% 尿酸染液中染色,再置于透射电子显微镜中观察,拍摄心肌细胞中线粒体结构的细微变化。通过对线粒体肿胀程度依 0~4 分标准进行评分(0 分,未观察到线粒体肿胀;1 分,轻度肿胀;2 分,中度肿胀;3 分,重度肿胀;4 分,极重度肿胀)。

2.8 统计学方法 所有实验数据均采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用 Shapiro-Wilk 法进行正态性检验,并用 Levene 法进

行方差齐性检验,组间数据差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA),多重比较采用最小显著性差异法 t 检验(LSD- t), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 天香丹对 I/R 大鼠心肌组织 ROS 水平的影响 实验期间,Sham 组大鼠无死亡情况,毛发浓密有光泽,日常活动活跃,自主进食饮水正常,对环境刺激反应灵敏,未见精神萎靡、蜷缩不动等异常表现。I/R 组大鼠实验过程中无死亡,大鼠毛发略显干枯、蓬松度下降,活动频率明显减少,常出现蜷缩于饲养笼角落的情况,进食量较 Sham 组有所减少,对外部刺激反应迟缓。NAC 组、TXP-L 组、TXP-M 组、TXP-H 组大鼠均无死亡,其中 NAC 组与 TXP-H 组大鼠毛发状态接近 Sham 组,光泽度较好,活动量及进食情况基本正常;TXP-L 组、TXP-M 组大鼠毛发略逊于上述两组,但优于 I/R 组,活动频率及精神状态随给药剂量增加呈改善趋势,未见明显异常行为。

与 Sham 组比较,I/R 组的 ROS 水平明显增加($P<0.05$)。与 I/R 组比较,NAC 组、TXP-L 组、TXP-M 组、TXP-H 组的 ROS 水平均明显降低($P<0.05$)。TXP-L 组、TXP-M 组、TXP-H 组的 ROS 水平明显呈剂量依赖性下降($P<0.05$)。见图 1 和表 1。

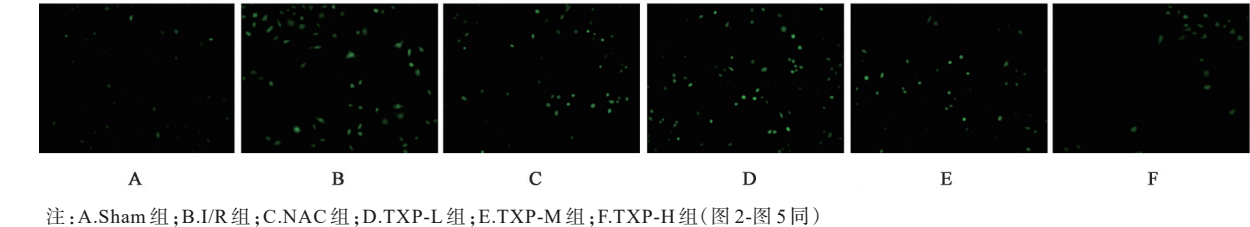


图 1 天香丹对 I/R 大鼠心肌组织 ROS 水平的影响 (DCFH-OA 荧光探针, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Tianxiang pills on ROS level in myocardial tissue of I/R rats (DCFH-OA fluorescent probe, $\times 200$)

表 1 天香丹对 I/R 大鼠心肌组织 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)
Table 1 Effect of Tianxiang pills on ROS levels in myocardial tissue of I/R rats ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/g $\cdot$ kg ⁻¹	ROS 水平/RFU
Sham 组		1.42 $\pm$ 0.28
I/R 组		8.91 $\pm$ 0.93 ¹⁾
NAC 组	0.15	6.37 $\pm$ 0.65 ²⁾
TXP-L 组	2.5	6.82 $\pm$ 0.79 ²⁾
TXP-M 组	5	4.18 $\pm$ 0.61 ^{2,3)}
TXP-H 组	10	2.95 $\pm$ 0.51 ^{2,3,4)}

注:与 Sham 组比较¹⁾ $P<0.05$;与 I/R 组比较²⁾ $P<0.05$;与 TXP-L 组比较³⁾ $P<0.05$;与 TXP-M 组比较⁴⁾ $P<0.05$ (表 2-表 6 同)

3.2 天香丹对 I/R 大鼠心肌细胞焦亡相关蛋白表达的影响 与 Sham 组比较,I/R 组的 Caspase-1 活性增加、

GSDMD 蛋白表达增加、IL-1 β 浓度明显增加($P<0.05$)。与 I/R 组比较,NAC 组、TXP-L 组、TXP-M 组、TXP-H 组的 Caspase-1 活性明显降低、GSDMD 蛋白表达明显降低、IL-1 β 浓度明显降低($P<0.05$)。TXP-L 组、TXP-M 组、TXP-H 组的上述指标均明显呈剂量依赖性下降($P<0.05$)。见图 2、表 2。

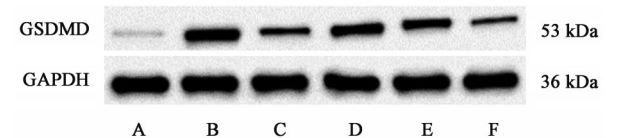


图 2 各组心肌细胞 GSDMD 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of GSDMD protein expression in myocardial cells of each group

表2 天香丹对I/R大鼠心肌细胞焦亡相关指标的影响 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 2 Effect of Tianxiang pills on pyroptosis related indicators of myocardial cells of I/R rats ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Caspase-1/U·mg ⁻¹	GSDMD/GAPDH	IL-1 β /ng·g ⁻¹
Sham组		1.05±0.11	0.92±0.10	15.38±1.47
I/R组		3.94±0.42 ¹⁾	3.17±0.34 ¹⁾	49.12±4.25 ¹⁾
NAC组	0.15	2.39±0.29 ²⁾	2.08±0.23 ²⁾	32.67±3.15 ²⁾
TXP-L组	2.5	3.21±0.36 ²⁾	2.73±0.30 ²⁾	40.15±3.92 ²⁾
TXP-M组	5	2.48±0.32 ^{2,3)}	2.19±0.25 ^{2,3)}	28.41±2.81 ^{2,3)}
TXP-H组	10	1.81±0.22 ^{2,3,4)}	1.35±0.16 ^{2,3,4)}	19.63±1.97 ^{2,3,4)}

3.3 天香丹对I/R大鼠心肌组织氧化应激指标的影响 与Sham组比较,I/R组的SOD和GSH-Px活性降低,MDA含量明显增加($P<0.05$)。与I/R组比较,NAC组、TXP-L组、TXP-M组、TXP-H组的SOD和

GSH-Px活性增加,MDA含量明显减少,差异具有统计学意义($P<0.05$)。TXP-L组、TXP-M组、TXP-H组的上述指标变化均明显呈剂量依赖性,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 天香丹对I/R大鼠心肌组织氧化应激指标的影响 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 3 Effect of Tianxiang pills on oxidative stress indicators in myocardial tissue of I/R rats ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	MDA/ μ mol·g ⁻¹	GSH-Px/U·mg ⁻¹
Sham组		46.21±4.25	1.27±0.15	39.12±3.18
I/R组		18.57±2.03 ¹⁾	5.97±0.64 ¹⁾	12.89±1.38 ¹⁾
NAC组	0.15	32.78±3.17 ²⁾	3.18±0.34 ²⁾	28.67±2.95 ²⁾
TXP-L组	2.5	25.93±2.81 ²⁾	4.35±0.47 ²⁾	21.67±2.15 ²⁾
TXP-M组	5	36.14±3.52 ^{2,3)}	2.83±0.32 ^{2,3)}	32.45±3.08 ^{2,3)}
TXP-H组	10	40.35±3.92 ^{2,3,4)}	1.94±0.23 ^{2,3,4)}	37.12±3.51 ^{2,3,4)}

3.4 天香丹对I/R大鼠心肌组织病理学改变的影响 与Sham组比较,I/R组的梗死面积增加($P<0.05$)。与I/R组比较,NAC组、TXP-L组、TXP-M组、TXP-H组的梗死面积明显降低($P<0.05$)。TXP-L组、TXP-M组、TXP-H组的梗死面积明显呈剂量依赖性降低($P<0.05$)。见图3和表4。



图3 天香丹对I/R大鼠心肌组织梗死面积的影响
Fig. 3 Effect of Tianxiang pills on myocardial tissue infarction area of I/R rats

3.5 天香丹对I/R大鼠ROS/Caspase-1/GSDMD信号通路蛋白的调控作用 与Sham组比较I/R组的cleaved Caspase-1/Caspase-1、p22phox、GSDMD-N的表达水平明显增加($P<0.05$)；与I/R组比较,NAC组、TXP-L组、TXP-M组、TXP-H组的cleaved Caspase-1/Caspase-1、p22phox、GSDMD-N的表达水

表4 天香丹对I/R大鼠心肌梗死面积的影响 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 4 Effect of Tianxiang pills on myocardial infarction area in I/R rats ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	梗死面积/%
Sham组		0.04±0.01
I/R组		82.58±4.25 ¹⁾
NAC组	0.15	58.67±3.15 ²⁾
TXP-L组	2.5	65.92±3.48 ²⁾
TXP-M组	5	45.03±2.81 ^{2,3)}
TXP-H组	10	28.89±2.01 ^{2,3,4)}

平明显降低($P<0.05$)，TXP-L组、TXP-M组、TXP-H组的上述指标变化均明显呈剂量依赖性降低($P<0.05$)。见表5和图4。

3.6 天香丹对I/R大鼠心肌细胞超微结构的影响 与Sham组比较I/R组的线粒体肿胀评分明显增加($P<0.05$)；与I/R组比较NAC组、TXP-L组、TXP-M组、TXP-H组的线粒体肿胀评分明显降低($P<0.05$)，TXP-L组、TXP-M组、TXP-H组的线粒体肿胀评分呈剂量依赖性降低($P<0.05$)。见图5、表6。

4 讨论

本研究利用大鼠心肌I/R模型,观察到天香丹

表5 天香丹对I/R大鼠心肌组织ROS/Caspase-1/GSDMD通路蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	cleaved Caspase-1/Caspase-1	GSDMD-N/GAPDH	p22phox/GAPDH
Sham组		0.28±0.03	0.25±0.03	0.32±0.04
I/R组		1.76±0.19 ¹⁾	1.82±0.20 ¹⁾	1.89±0.21 ¹⁾
NAC组	0.15	1.12±0.13 ²⁾	1.05±0.12 ²⁾	1.23±0.15 ²⁾
TXP-L组	2.5	1.45±0.16 ²⁾	1.38±0.15 ²⁾	1.56±0.17 ²⁾
TXP-M组	5	0.98±0.11 ^{2,3)}	0.89±0.10 ^{2,3)}	1.08±0.12 ^{2,3)}
TXP-H组	10	0.65±0.07 ^{2,3,4)}	0.54±0.06 ^{2,3,4)}	0.78±0.09 ^{2,3,4)}

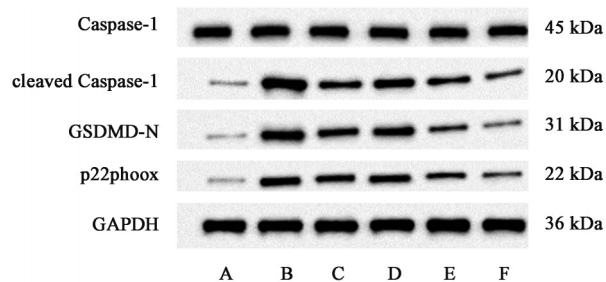


图4 各组ROS/Caspase-1/GSDMD信号通路蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoretic of expression of ROS/Caspase-1/GSDMD signaling pathway proteins in each group

可通过多靶点干预抑制心肌损伤:有效降低心肌

ROS水平、恢复抗氧化酶活性,调控Caspase-1及GSDMD表达以减少IL-1 β 释放,进而抑制细胞焦亡;同时缩小心肌梗死面积、改善线粒体结构完整性,揭示其通过ROS/Caspase-1/GSDMD信号通路发挥作用的分子机制。缺血再灌注使大鼠心肌ROS显著升高,天香丹各剂量可剂量依赖性降低ROS浓度,效果与NAC相当,推测其可能通过抑制上游氧化反应或下调p22phox减少ROS生成,这与天香丹激活雌激素受体 α 信号通路、改善心肌氧化应激的报道一致^[10,26-27],为探讨其氧化损伤保护靶点提供新视角。

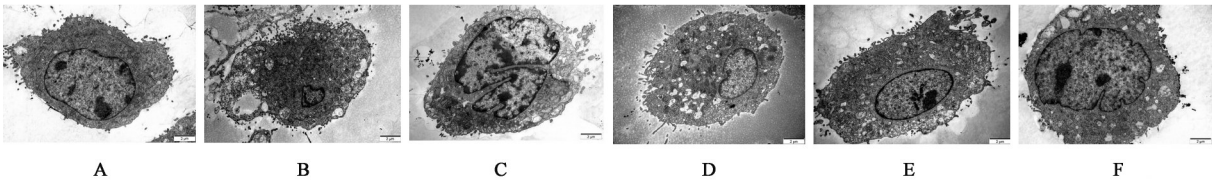


图5 天香丹对I/R大鼠心肌细胞超微结构的影响(TEM,×10 000)
Fig. 5 Effect of Tianxiang pills on ultrastructure of cardiomyocytes observed of I/R rats (TEM,×10 000)

表6 天香丹对I/R大鼠心肌细胞线粒体肿胀评分的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 6 Effect of Tianxiang pills on mitochondrial swelling score of myocardial cells in I/R rats($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	线粒体肿胀评分/分
Sham组		0.12±0.02
I/R组		2.89±0.31 ¹⁾
NAC组	0.15	1.78±0.19 ²⁾
TXP-L组	2.5	2.34±0.25 ²⁾
TXP-M组	5	1.45±0.16 ^{2,3)}
TXP-H组	10	0.89±0.10 ^{2,3,4)}

心肌梗死面积评估显示,天香丹剂量依赖性缩小梗死面积,推测其通过改善氧化应激与抑制细胞焦亡双重机制维护组织完整性。I/R组Caspase-1活性、GSDMD表达及IL-1 β 水平显著升高,天香丹干预后上述指标剂量依赖性下降,表明其兼具抗氧化效应与直接抑制Caspase-1激活、GSDMD剪切及炎

症因子释放的作用。
p22phox是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶的膜结合亚基之一,负责电子传递和ROS的生成,p22phox在I/R条件下的表达显著增加,导致心肌细胞内ROS水平升高,进而引发细胞凋亡、坏死和心肌重塑^[28-29]。本研究发现,I/R组的SOD及GSH-Px的活性明显降低,而p22phox蛋白水平和脂质过氧化产物MDA的水平升高,提示I/R组的氧化损伤加剧,天香丹治疗后,SOD和GSH-Px活性均得到恢复,同时p22phox和MDA水平明显下降。本研究利用透射电镜检查显示,I/R组的心肌细胞普遍存在线粒体肿胀、膜结构破坏及基质稀疏等异常变化,而天香丹干预后,线粒体形态大为改善,尤其在高剂量组中其保护效果更为明显。线粒体损伤不仅导致能量代谢障碍,还可能引发细胞内钙稳态失衡和进一步ROS生成。天香丹通过抑制ROS生成、稳定

线粒体膜结构,实现了细胞层面的系统保护。表明天香丹可增强心肌自身抗氧化能力,进一步验证了天香丹在多重信号干预中的抗炎及抗焦亡优势。

ROS/Caspase-1/GSDMD 信号通路是诱导细胞发生焦亡的核心机制^[30-31]。在本研究分子水平检测发现,I/R 状态下,与 ROS 产生和细胞焦亡密切相关的 cleaved Caspase-1、GSDMD-N 及 p22phox 蛋白表达显著增强,而天香丹的干预以剂量依赖的方式有效抑制了这些蛋白的异常上调。这提示天香丹可能通过调控 ROS/Caspase-1/GSDMD 信号通路及其下游效应蛋白,进而阻断细胞焦亡的启动过程。ZHANG 等^[6]研究表明抑制 ROS/Caspase-1/GSDMD 信号通路的介导的焦亡,可以显著改善心肌缺血诱导的心肌纤维化和心脏重构。表明在心肌 I/R 的病理过程中,天香丹治疗通过抑制 ROS 介导的 Caspase-1 激活及 GSDMD 切割导致的细胞焦亡环节从而发挥抗 I/R 的作用。

本研究仍然存在一些局限性,如仅采用 SPF 级雄性 SD 大鼠模型,I/R 动物模型类型单一,未来需要扩展到不同类型动物的 I/R 模型;本文重点关注氧化应激、炎症和细胞焦亡,但心肌 I/R 损伤涉及凋亡、自噬、铜死亡等多种细胞死亡形式,天香丹是否对这些类型的死亡具有调控作用尚需进一步深入探讨。因此未来需构建更为系统的信号网络模型以阐明各机制之间的交互作用,将有助于进一步阐明天香丹的精确调控机制。

综上所述,天香丹通过抑制 ROS/Caspase-1/GSDMD 信号通路从而降低 ROS 水平并抑制 Caspase-1 介导的细胞焦亡及炎症因子释放,有效减轻了心肌 I/R 的损伤。因此,本研究中天香丹抑制心肌 I/R 损伤的结果为进一步探讨天然药物在心血管疾病预防中的应用奠定了理论基础和数据支持。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] GUO J, WANG S, WAN X, et al. Mitochondria-derived methylmalonic acid aggravates ischemia-reperfusion injury by activating reactive oxygen species-dependent ferroptosis[J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1): 53.
- [2] ALGOET M, JANSSENS S, HIMMELREICH U, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury and the influence of inflammation[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2023, 33(6): 357-366.
- [3] WANG Y, YUAN H, SHEN D, et al. Artemisinin attenuated ischemic stroke induced pyroptosis by inhibiting ROS/TXNIP/NLRP3/Caspase-1 signaling pathway [J]. *Biomed*

- Pharmacother*, 2024, 177: 116894.
- [4] WANG F, LIANG Q, MA Y, et al. Silica nanoparticles induce pyroptosis and cardiac hypertrophy via ROS/NLRP3/Caspase-1 pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 182: 171-181.
- [5] ZHOU W, YANG Y, FENG Z, et al. Inhibition of Caspase-1-dependent pyroptosis alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury during cardiopulmonary bypass (CPB) in type 2 diabetic rats[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 19420.
- [6] ZHANG X, QU H, YANG T, et al. Astragaloside IV attenuate MI-induced myocardial fibrosis and cardiac remodeling by inhibiting ROS/Caspase-1/GSDMD signaling pathway [J]. *Cell Cycle*, 2022, 21(21): 2309-2322.
- [7] WANG Y W, DONG H Z, TAN Y X, et al. HIF-1 α -regulated lncRNA-TUG1 promotes mitochondrial dysfunction and pyroptosis by directly binding to FUS in myocardial infarction [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 178.
- [8] KIM S, LEE W, JO H, et al. The antioxidant enzyme Peroxiredoxin-1 controls stroke-associated microglia against acute ischemic stroke[J]. *Redox Biol*, 2022, 54: 102347.
- [9] DHALLA N S, OSTADAL P, TAPPIA P S. Involvement of oxidative stress and antioxidants in modification of cardiac dysfunction due to ischemia-reperfusion injury [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2025, 14(3): 340.
- [10] LIU H, WANG X, HE K, et al. Oxidized DJ-1 activates the p-IKK/NF- κ B/Beclin1 pathway by binding PTEN to induce autophagy and exacerbate myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 974: 1176496.
- [11] LEE T L, SHEN W C, CHEN Y C, et al. miR221- and miR222-enriched ADSC-exosomes mitigate PM exposure-exacerbated cardiac ischemia-reperfusion injury through the modulation of the BNIP3-MAP1LC3B-BBC3/PUMA pathway [J]. *Autophagy*, 2025, 21(2): 374-393.
- [12] AYDIN H, BULMUS O, KORKUT O, et al. An evaluation of the effectiveness of melatonin and N-acetylcysteine in cerebral ischemia-reperfusion injury in adult rats [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2023, 59(11): 2026.
- [13] ZHOU J, LIU H, JIANG F, et al. Traditional Chinese medicine protects against doxorubicin cardiotoxicity via epigenetic modification and beyond[J]. *Phytomedicine*, 2025, 145: 157020.
- [14] PRADHAN S K, TODESCHINI G, GANTENBEIN A R, et al. Traditional Chinese medicine and headache disorders-a review of categorization and selected therapeutic approaches [J]. *Holist Nurs Pract*, 2025, 39(5): 259-272.
- [15] XING N, QIN J, REN D, et al. Integrating UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS, network pharmacology and experimental validation to reveal the potential mechanism of Tibetan medicine *Rhodiola* granules in improving myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 314: 116572.
- [16] LIU L, WANG R, GAO W, et al. Drug pairs of Huangqi and Danggui alleviates pyroptosis by promoting autophagy

- activity via AMPK/mTOR signaling pathway in middle-cerebral artery occlusion/reperfusion in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 337(Pt 3): 118982.
- [17] SAWUER G, MA X K, ZHANG Y J, et al. Tianxiangdan improves coronary microvascular dysfunction in rats by inhibiting microvascular inflammation via Nrf2 activation[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, doi: 10. 1155/2021/4114784.
- [18] 马学宽, 古丽葛娜·萨吾尔, 辛锦钰, 等. 天香丹对冠脉微循环障碍大鼠血清中MDA、SOD、GSH-Px表达的影响[J]. *新疆医科大学学报*, 2020, 43(5): 634-636, 641.
- MA X K, SAWUER G, XIN J Y, et al. Effects of Tianxiangdan on expressions of MDA, SOD and GSH-Px in serum of rats with coronary microcirculation disorder [J]. *J Xinjiang Med Univ*, 2020, 43(5): 634-636, 641.
- [19] ZHANG Y J, HE H, SAWUER G, et al. Tianxiangdan suppresses foam cell formation by enhancing lipophagy and reduces the progression of atherosclerosis [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2025, 61(3): 298-310.
- [20] YUE Y, LI Y, RONG X, et al. Tianxiangdan (TXD) alleviates myocardial ischemia reperfusion-induced ferroptosis through the activation of estrogen receptor alpha (ER α) [J]. *Chin J Nat Med*, 2025, 23(1): 102-110.
- [21] CHEN X Z, XU H F, ZHAO X M, et al. PYRCR alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice via inhibiting DRG2-mediated cardiomyocyte pyroptosis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2025, 46(12): 3204-3216.
- [22] SHI H, GAO Y, DONG Z, et al. GSDMD-mediated cardiomyocyte pyroptosis promotes myocardial I/R injury [J]. *Circ Res*, 2021, 129(3): 383-396.
- [23] MA R, HU X, FU W, et al. IL-34 aggravates myocardial ischemia-reperfusion injury by upregulating the HMGB1-IL-17A-IL-6 axis through the JAK signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2025, 20(1): e0315489.
- [24] ZHANG G, WANG X, LI C, et al. Integrated stress response couples mitochondrial protein translation with oxidative stress control [J]. *Circulation*, 2021, 144(18): 1500-1515.
- [25] ZHANG X J, LI L, WANG A L, et al. GSK2795039 prevents RIP1-RIP3-MLKL-mediated cardiomyocyte necroptosis in doxorubicin-induced heart failure through inhibition of NADPH oxidase-derived oxidative stress [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2023, 463: 116412.
- [26] HU C, YUAN F, WU Y, et al. Disruption of the Caspase-1/IL-1 β axis alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury via improvement of mitochondrial homeostasis and reduction of pyroptosis [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2025, 47(1): 2506619.
- [27] CHEN R, DUAN J, ZHOU Y, et al. Endothelial HMGB1-AIM2 axis worsens myocardial ischemia-reperfusion injury by regulating endothelial pyroptosis [J]. *Apoptosis*, 2025, 30(9/10): 2466-2479.
- [28] LIM M J, OH H, JEON J, et al. An intra articular injectable Mitocelle recovers dysfunctional mitochondria in cellular organelle disorders [J]. *Bioact Mater*, 2024, 43: 305-318.
- [29] SIMSEK O, BARIS E, URAL C, et al. Preventative effect of montelukast in mild to moderate contrast-induced acute kidney injury in rats via NADPH oxidase 4, p22phox and nuclear factor kappa-B expressions [J]. *Int Urol Nephrol*, 2025, 57(7): 2313-2325.
- [30] LI J, WANG G, WEN Z, et al. Modulating the electronic structure of MnNi2S3 nanoelectrodes to activate pyroptosis for electrocatalytic hydrogen-immunotherapy [J]. *Adv Mater*, 2024, 36(48): e2412925.
- [31] XIE W, PENG M, LIU Y, et al. Simvastatin induces pyroptosis via ROS/Caspase-1/GSDMD pathway in colon cancer [J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 329.
- [责任编辑 周冰冰]