

# 双参通脉颗粒对心肌缺血再灌注大鼠 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响

陈卓<sup>1</sup>, 李文杰<sup>2\*</sup>, 杨莺<sup>2</sup>

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

**[摘要]** 目的:研究双参通脉颗粒(STG)对心肌缺血再灌注大鼠的作用及机制。方法:SD大鼠随机分为假手术组(Sham),模型组(MIRI),西药合心爽组(DH),双参通脉颗粒低剂量组(STG-L),中剂量组(STG-M),高剂量组(STG-H)。连续灌胃2周后,结扎左冠状动脉前降支造模,检测左心功能及Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活性、酶联免疫吸附试验法(ELISA)检测白细胞介素(IL)-1 $\beta$ ,IL-6,肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 含量变化,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测心肌核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B),I $\kappa$ B激酶 $\alpha$ (I $\kappa$ B $\alpha$ ),I $\kappa$ B $\beta$ 蛋白表达。光镜观察心肌组织结构。结果:与MIRI组比较,STG各剂量组,DH组的左心功能及Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活性改善显著( $P < 0.05$ );血清IL-1 $\beta$ ,IL-6及TNF- $\alpha$ 水平明显降低( $P < 0.05$ );心肌NF- $\kappa$ B蛋白表达显著降低( $P < 0.05$ );I $\kappa$ B $\alpha$ 和I $\kappa$ B $\beta$ 水平显著升高( $P < 0.05$ )。结论:STG可能通过减少IL-1 $\beta$ ,IL-6及TNF- $\alpha$ 含量,抑制NF- $\kappa$ B蛋白表达,增加I $\kappa$ B $\alpha$ 和I $\kappa$ B $\beta$ 蛋白表达抑制大鼠心肌缺血再灌注损伤。

**[关键词]** 心肌缺血再灌注; 双参通脉颗粒; 核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B); I $\kappa$ B 激酶 $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ); I $\kappa$ B $\beta$

**[中图分类号]** R2-031;R22;R24;R285.5;R256.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)13-0136-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20180943

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180214.2234.037.html>

**[网络出版时间]** 2018-02-23 1:12

## Effect of Shuangshen Tongmai Granule on NF- $\kappa$ B Pathway in Rats with Ischemic Reperfusion

CHEN Zhuo<sup>1</sup>, LI Wen-jie<sup>2\*</sup>, YANG Ying<sup>2</sup>

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110847, China;

2. Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the protective effects and mechanism of Shuangshen Tongmai granule (STG) in patients with ischemic reperfusion. **Method:** SD rats were divided into Sham operation (Sham) group, myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI) group, diltiazem hydrochloride (DH) group and STG low dose, middle dose and high dose groups (STG-L, STG-M and STG-H). Intragastric administration was given for two weeks, and then the left anterior descending coronary artery was ligatured for modeling. The left ventricular function and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP enzymatic activity were measured; the contents of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in plasma were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The nuclear transcription factor (NF)- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  and I $\kappa$ B $\beta$  protein levels were measured by the techniques of Western blot. Myocardial structure was observed by light microscopy. **Result:** As compared to MIRI group, the left ventricular function and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP enzymatic activity were significantly improved in STG groups and DH treatment group ( $P < 0.05$ ), the serum levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  were lower ( $P < 0.05$ ). The results of Western blot showed that the protein expressions of NF- $\kappa$ B were lower ( $P < 0.05$ ), and the protein expressions of I $\kappa$ B $\alpha$  and I $\kappa$ B $\beta$  were higher ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** STG could alleviate myocardial ischemia reperfusion injury in rats by decreasing NF- $\kappa$ B expression protein levels and improving I $\kappa$ B $\alpha$  and I $\kappa$ B $\beta$  expression protein levels.

**[收稿日期]** 20171030(010)

**[基金项目]** 辽宁省自然科学基金项目(2015020392)

**[第一作者]** 陈卓,在读博士,主治医师,从事心血管疾病的预防与治疗,E-mail:chenzhuo1016@126.com

**[通信作者]** \*李文杰,博士生导师,主任医师,从事心力衰竭的中医药防治,E-mail:lwzhwh@163.com

[ **Key words** ] myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI); Shuangshen Tongmai granule (STG); nuclear transcription factor kappa B (NF- $\kappa$ B); inhibitor kappa B kinase  $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ); I $\kappa$ B $\beta$

心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 是近年来致死率最高的疾病之一,目前介入成为抢救 MI 最有效的手段,然而缺血再灌注损伤 (ischemia reperfusion injury, RI) 严重影响心脏功能的恢复<sup>[1-3]</sup>。核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 是一种重要的调节蛋白,在心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI) 进程中发挥着及其重要的作用<sup>[4-6]</sup>。炎症是 MIRI 进程中早期最关键的病理生理反应,随着炎症介质释放的增多,NF- $\kappa$ B 通过经典信号途径被激活,释放大量的炎症介质,使心肌细胞的损伤进一步加重<sup>[7-9]</sup>。

双参通脉颗粒 (Shuangshen Tongmai granule, STG) 是临床上用于治疗心肌缺血类疾病的新一代颗粒剂,本复方由人参、丹参、黄芪、麦冬、川芎、当归 6 味药组成,具有益气养阴,活血通络的功效<sup>[10]</sup>。本实验通过结扎冠状动脉建立大鼠心肌缺血模型,观察 STG 对炎症介质白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ), IL-6, 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 含量的影响,以及 NF- $\kappa$ B 信号转导通路相关凋亡蛋白, I $\kappa$ B 激酶  $\alpha$  (inhibitor kappa B kinase  $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ ), I $\kappa$ B 激酶  $\beta$  (inhibitor kappa B kinase  $\beta$ , I $\kappa$ B $\beta$ ) 表达的变化,探讨其对心肌缺血大鼠可能的保护机制,为临床用药提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级健康成年 SD 大鼠 60 只,雌雄各半,12 周龄,体质量 280 ~ 300 g,由辽宁中医药大学动物实验中心提供,许可证号 SYXK (辽) 2016-0063,自由饮水,适应性喂养 3 d 后造模。实验动物符合辽宁中医药大学动物伦理委员会标准,批号 201606-007。

**1.2 药物及试剂** 双参通脉颗粒 (STG, 辽宁中医药大学附属医院制剂,批号 20160531) 由人参、丹参、黄芪、麦冬、川芎、当归 6 味药组成;西药合心爽 (盐酸地尔硫卓片, DH, 天津田边制药有限公司,批号 1411087), 上述药物于灌胃前溶于生理盐水中;麻醉药水合氯醛 (上海化学试剂有限公司,批号分别为 20130413, 20131127), 现用现配; IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  酶联免疫吸附试验法 (ELISA) 检测试剂盒 (美国凯基生物有限公司,批号分别为 146014, 144781, 141306); Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性比色法定量检测试剂盒 (南京医药科技有限公司,批号

20160118); 蛋白免疫印迹法 (Western blot) NF- $\kappa$ B 抗体, I $\kappa$ B $\alpha$  抗体, I $\kappa$ B $\beta$  抗体,  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 抗体, Protease inhibitor cocktail (美国凯基生物有限公司,批号分别为 2457, 3462, 1437, MS-0426, 14216347203)。

**1.3 仪器** ALC-MPA 型多导生物信号分析系统 (美国 Bio 公司); MP150 型多导生理信号采集系统, DMS300Leica 图像分析仪 (德国 Leica 公司); HL-B6 型小动物呼吸机 (北京新利科技有限公司); UV1900 型双光束分光光度计 (上海奥析科学仪器有限公司); CA52-3 型酶标仪 (长沙湘江仪器公司); VU-2000 型紫外分光光度仪 (美国 PE 公司); 5234R 型高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); ROTEM 型电泳系统及转膜系统和 OM3123 型冰冻切片机 (美国 Bio-Rad 公司); FYL-YS-280L 恒温恒湿箱 (上海科技生物公司)。

## 2 方法

**2.1 分组及给药** 60 只 SD 大鼠适应性喂养后,称质量随机分为 6 组,每组 10 只,预防性给药 2 周后造模,假手术组 (Sham operation group, Sham) 与模型组 (myocardial ischemia reperfusion injury group, MIRI) 予生理盐水;合心爽组 (diltiazem hydrochloride group, DH) 予 DH 0.01 g·kg<sup>-1</sup>; STG 各组大鼠按体表面积给药,3 个剂量组分别相当于生药量 (6.17, 10.49, 14.72) g·kg<sup>-1</sup>。各组大鼠每天灌胃 1 次,连续灌胃 2 周。

**2.2 大鼠心肌缺血再灌注模型复制** 大鼠术前禁食 12 h,参照文献<sup>[11]</sup>方法造模,3% 水合氯醛腹腔注射,麻醉成功后,大鼠仰卧位固定于手术台,气管切开,行气管插管,呼吸机辅助呼吸 (频率 85 次/min,潮气量 18 mL,呼吸比 1:1),连接心电检测仪,术中记录 II 导联心电图。颈部、胸前区备皮,碘伏消毒,触到心尖波动点,判断左心耳位置,于胸骨左侧第 3 肋间切口,逐层钝性分离,沿肋间分离肋骨,切口长约 2.0 ~ 2.5 cm,打开心包,暴露心脏,左右各上一眼科用小拉钩使心脏暴露充分,暴露左心耳,确定位置,以 6 号带线缝合针,于肺动脉圆锥与左心耳交界处下方 2 mm 处结扎冠状动脉左前降支 (LAD),进针深度约 2 mm,术中监测 II 导联心电图 ST 段变化,结扎后 ST 段上抬 0.2 mV 以上视为造模成功,持续 30 min 后打开结扎线,再灌注 120 min,

关胸,抽出胸腔积液,拔出引流管,腹腔注射青霉素 10 万单位预防感染。Sham 组只开胸不结扎,其余各组结扎再灌注。造模过程中大鼠未到规定时间死亡者,予以剔除。大鼠造模前后 II 导联心电图变化。

### 2.3 指标检测

**2.3.1 大鼠左心功能及  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶检测** 取材前,分离右侧颈总动脉,左心导管插管至左心室,由 ALC-MPA 多导生物信号分析系统记录血流动力学参数。处死大鼠后,准确量取左心室心肌组织适量,按照质量(g)-体积(mL)1:9 的比例加入磷酸盐缓冲液(PBS),匀浆,2 500  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清液,按试剂盒说明书进行,设定分光光度计波长 440 nm,96 孔板做好标记,各孔加入 50  $\mu\text{L}$  缓冲液,分别加入对照品、样品、阴性液各 50  $\mu\text{L}$ ,各孔加入反应液 50  $\mu\text{L}$ ,摇动酶标板,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 min,放进酶标仪,置零,分别加入底物液 50  $\mu\text{L}$ ,摇动酶标板,放入酶标仪检测。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶活性 = ( $A_{\text{样本}} / A_{\text{对照品}}$ )  $\times$  对照品浓度。

**2.3.2 ELISA 测定炎症介质 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量** 经腹主动脉负压采血 2 ~ 10 mL,低温离心取血清、试管编号后,ELISA 法检测血清 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量,按试剂盒说明书进行,将所用抗原用包被稀释液稀释到适当浓度,5% 小牛血清置 37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 40 min,洗涤液满孔洗涤 3 遍,每遍 3 min,将稀释好的样品加入酶标反应孔中,每样品至少加双孔,37  $^{\circ}\text{C}$ ,40 ~ 60 min,加入酶标抗体,37  $^{\circ}\text{C}$ ,30 ~ 60 min,加入底物液,37  $^{\circ}\text{C}$  避光放置 3 ~ 5 min,加入终止液显色,20 min 内测定。

**2.3.3 Western blot 检测 NF- $\kappa\text{B}$ , I $\kappa\text{B}\alpha$  和 I $\kappa\text{K}\beta$  蛋白表达** 取约 2 mm 缺血区心肌组织数块,进行组织蛋白提取,加液氮研磨,加入 RIPA 裂解液,漩涡混匀,放置 1 h,4  $^{\circ}\text{C}$ ,13 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min,检测蛋白浓度,计算需要的蛋白上样量,SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结束后,电压 100 V,恒压转膜 90 min,将蛋白转移到硝酸纤维膜上。转膜完成,用牛奶封闭 1 h,再用 PBST 溶液洗膜 3 次,每次 7 min,加入一抗(1:2 000)孵育 4 h,PBST 洗膜 3 次,每次 7 min。加入溶有鼠或兔二抗的牛奶,孵育 1 h,PBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加显色液显色,在暗室中显影。用 ImageJ 软件进行 Western blot 蛋白定量分析。以目的蛋白灰度值/ $\beta$ -actin 灰度值表示目的蛋白相对表达量。

**2.3.4 左心室结构变化** 取左室中部连续 2 块厚

约 2 ~ 3 mm 心肌组织,4% 多聚甲醛固定,梯度乙醇脱水,石蜡固定,进行常规切片,再于二甲苯、各级乙醇中脱水,苏木精-伊红(HE)染色,二甲苯透明、中性树胶封片,光镜下观察左心室组织学改变。

**2.4 统计方法** 采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料用  $t$  检验,以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用 one-way ANOVA 方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 STG 对大鼠左心功能及能量代谢的影响** 与 MIRI 组相比,反映左心室收缩功能的指标(left ventricular systolic function, LVSF)显著降低( $P < 0.05$ ),反映左心室舒张功能的指标(left ventricular diastolic function, LVDF)显著升高( $P < 0.05$ ),STG 各组及 DH 组  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶显著升高( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 STG 对 MIRI 大鼠左心功能及  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effect of STG on LVSF, LVDF and  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  in MIRI rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别   | 剂量<br>/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | LVSF<br>/ $\text{mmHg}$       | LVDF<br>/ $\text{mmHg}$      | $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶<br>/ $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ |
|------|---|-------------------------------|------------------------------|--|
| Sham | -                                       | 103.1 $\pm$ 3.4               | 6.4 $\pm$ 0.2                | 8.6 $\pm$ 0.7  |
| MIRI | -                                       | 89.2 $\pm$ 3.7 <sup>1)</sup>  | 13.6 $\pm$ 1.1 <sup>1)</sup> | 6.8 $\pm$ 1.2 <sup>1)</sup>  |
| DH   | 0.01                                    | 115.4 $\pm$ 3.1 <sup>2)</sup> | 9.8 $\pm$ 0.7 <sup>2)</sup>  | 7.3 $\pm$ 2.1 <sup>2)</sup>  |
| STG  | 6.17                                    | 128.4 $\pm$ 0.7 <sup>2)</sup> | 7.4 $\pm$ 3.1 <sup>2)</sup>  | 7.0 $\pm$ 1.4 <sup>2)</sup>  |
|      | 10.49                                   | 110.1 $\pm$ 5.7 <sup>2)</sup> | 7.9 $\pm$ 1.2 <sup>2)</sup>  | 7.5 $\pm$ 2.3 <sup>2)</sup>  |
|      | 14.72                                   | 107.6 $\pm$ 6.3 <sup>2)</sup> | 7.3 $\pm$ 0.7 <sup>2)</sup>  | 7.2 $\pm$ 0.6 <sup>2)</sup>  |

注:与 Sham 比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与 MIRI 比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ (表 2 ~ 3 同)。

**3.2 STG 对大鼠血清炎症介质 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量的影响** 与 Sham 比较,MIRI 组 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量增加( $P < 0.05$ )。与 MIRI 组比较,STG 各剂量组 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量均显著下降( $P < 0.05$ )。见表 2。

**3.3 STG 对大鼠 NF- $\kappa\text{B}$ , I $\kappa\text{B}\alpha$  和 I $\kappa\text{K}\beta$  蛋白表达的影响** 与 Sham 组比较,MIRI 组 NF- $\kappa\text{B}$  蛋白表达显著升高( $P < 0.05$ ), I $\kappa\text{B}\alpha$ , I $\kappa\text{K}\beta$  蛋白表达显著降低( $P < 0.05$ ),给予 STG 及 DH 后,STG 各组 NF- $\kappa\text{B}$  蛋白表达均显著降低( $P < 0.05$ ), I $\kappa\text{B}\alpha$ , I $\kappa\text{K}\beta$  蛋白表达显著升高( $P < 0.05$ )。见图 1,表 3。

**3.4 STG 对大鼠左心室组织结构的影响** Sham 组,心肌纤维排列较紧密规整,组织间隙水肿较轻微,仅有轻度瘀血,周围组织有微量渗出,血管轻度

表 2 STG 对 MIRI 大鼠血清 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量的影响  
( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of STG on IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in MIRI rats  
( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别   | 剂量<br>/g·kg <sup>-1</sup> | IL-1 $\beta$               | IL-6                       | TNF- $\alpha$ (×10 <sup>3</sup> ) |
|------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| Sham | -                         | 184.3 ± 4.64               | 124.3 ± 6.10               | 1.53 ± 0.25                       |
| MIRI | -                         | 286.5 ± 6.19 <sup>1)</sup> | 164.7 ± 1.36 <sup>1)</sup> | 1.94 ± 0.36 <sup>1)</sup>         |
| DH   | 0.01                      | 195.1 ± 3.12 <sup>2)</sup> | 139.5 ± 4.13 <sup>2)</sup> | 1.26 ± 0.12 <sup>2)</sup>         |
| STG  | 6.17                      | 194.7 ± 1.05 <sup>2)</sup> | 104.1 ± 4.65 <sup>2)</sup> | 1.01 ± 0.14 <sup>2)</sup>         |
|      | 10.49                     | 207.3 ± 4.12 <sup>2)</sup> | 116.2 ± 6.12 <sup>2)</sup> | 1.24 ± 0.31 <sup>2)</sup>         |
|      | 14.72                     | 183.2 ± 3.41 <sup>2)</sup> | 101.7 ± 3.19 <sup>2)</sup> | 1.33 ± 0.17 <sup>2)</sup>         |

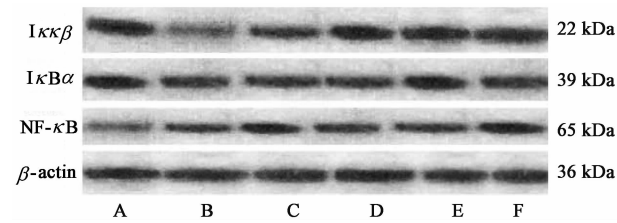


图 1 STG 对心肌组织 NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ κ $\beta$  蛋白表达电泳  
A. Sham 组; B. MIRI 组; C. DH 组; D. STG-L 组; E. STG-M 组; F. STG-H 组(图 2 同)

图 1 STG 对心肌组织 NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ κ $\beta$  蛋白表达电泳  
Fig. 1 NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ κ $\beta$  protein expression of myocardial tissue

表 3 STG 对 MIRI 大鼠 NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  和 I $\kappa$ κ $\beta$  蛋白表达的影响  
( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of STG on NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  and I $\kappa$ κ $\beta$  in MIRI rats  
( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别   | 剂量<br>/g·kg <sup>-1</sup> | NF- $\kappa$ B<br>/ $\beta$ -actin | I $\kappa$ B $\alpha$<br>/ $\beta$ -actin | I $\kappa$ κ $\beta$<br>/ $\beta$ -actin |
|------|---------------------------|------------------------------------|---|--|
| Sham | -                         | 0.41 ± 0.03                        | 0.62 ± 0.11                               | 0.85 ± 0.08                              |
| MIRI | -                         | 1.33 ± 0.25 <sup>1)</sup>          | 0.43 ± 0.02 <sup>1)</sup>                 | 0.34 ± 0.13 <sup>1)</sup>                |
| DH   | 0.01                      | 0.84 ± 0.07 <sup>2)</sup>          | 0.51 ± 0.01                               | 0.67 ± 0.05 <sup>2)</sup>                |
| STG  | 6.17                      | 0.76 ± 0.03 <sup>2)</sup>          | 0.43 ± 0.02                               | 0.56 ± 0.04 <sup>2)</sup>                |
|      | 10.49                     | 0.81 ± 0.04 <sup>2)</sup>          | 0.74 ± 0.03 <sup>2)</sup>                 | 0.62 ± 0.02 <sup>2)</sup>                |
|      | 14.72                     | 0.63 ± 0.02 <sup>2)</sup>          | 0.66 ± 0.06 <sup>2)</sup>                 | 0.71 ± 0.01 <sup>2)</sup>                |

扩张。MIRI 组, 心肌纤维扭曲断裂, 细胞肿胀, 组织间隙水肿, 细胞核散乱无序, 心肌细胞肥大, 染色疏松。DH 组, 心肌纤维断裂较少, 排列紊乱, 心肌间质疏松, 心肌间隙血管扩张, 周围可见水肿及渗出。STG 低剂量组, 心肌纤维排列较紊乱, 组织间隙有水腫渗出, 炎细胞浸润。STG 中剂量组, 心肌纤维排列较 MIRI 组规整, 水肿区域较小, 肌纤维断裂少, 组织间隙肿胀较轻。STG 高剂量组, 心肌纤维排列较规整, 组织间隙肿胀较轻。见图 2。

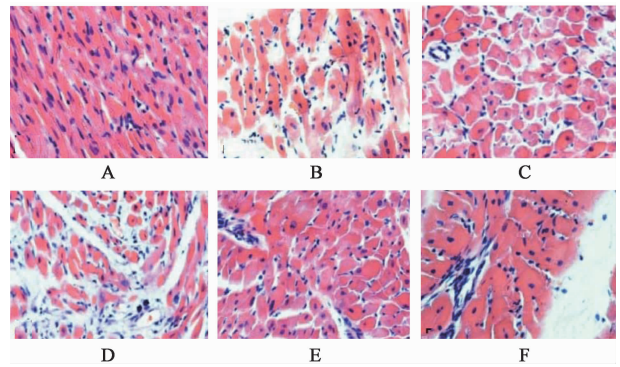


图 2 STG 对大鼠心肌组织结构变化的影响(HE, ×200)  
Fig. 2 Effect of STG on pathology of myocardial inflammation (HE, ×200)

#### 4 讨论

MIRI 发生时, 心肌组织中 NF- $\kappa$ B 被激活, NF- $\kappa$ B 是一种具有调控作用的核转录因子, 其对炎症反应、免疫应答和细胞凋亡均有调控作用, 是参与 MIRI 细胞氧化损伤的主要作用靶点<sup>[12]</sup>。NF- $\kappa$ B 刺激 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  及细胞间黏附分子 (intercellular adhesion molecules, ICAM) 等炎症介质大量释放, TNF- $\alpha$  是启动炎症级联反应的关键细胞因子, IL-1 $\beta$ , IL-6 是单核巨噬细胞分泌的炎症介质, 可以诱导中性粒细胞与血管内皮细胞黏附分子的表达, 促使粒细胞进入缺血区, 同时与 TNF- $\alpha$  协同, 诱导细胞凋亡, 加重炎症反应和氧化损伤<sup>[13]</sup>。MIRI 促进氧自由基的产生, 一方面自由基的氧化作用使心肌细胞膜上的 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性下降, 另一方面自由基刺激组织继续释放炎症介质引发 NF- $\kappa$ B 信号转导通路的激活, 放大炎症信号<sup>[14]</sup>。静息状态时, 细胞中 NF- $\kappa$ B 通常以非活性 p65/p50/I $\kappa$ B $\alpha$  三聚体复合物形式存在于细胞质中, 三聚体可以被炎症介质激活, 细胞中 I $\kappa$ κ $\beta$  发生磷酸化, 启动靶基因的转录和表达, 许多激活 NF- $\kappa$ B 的信号通路在 I $\kappa$ κ $\beta$  水平上交汇, I $\kappa$ κ $\beta$  是此水平上的关键因子, 因此它是 NF- $\kappa$ B 调节机制的关键。NF- $\kappa$ B 的活化也可通过 I $\kappa$ B 蛋白来调节, 主要为 I $\kappa$ B $\alpha$ , 由于 NF- $\kappa$ B 与 I $\kappa$ B $\alpha$  的亲合力大于其与 DNA 结合的亲合力, 因此 I $\kappa$ B $\alpha$  可中止 NF- $\kappa$ B 的活化。参与 NF- $\kappa$ B 活化经典信号途径的可能主要是 I $\kappa$ B $\alpha$  和 I $\kappa$ κ $\beta$ , 其在 TNF- $\alpha$  或 IL-1 $\beta$  等炎症介质刺激下可以被激活<sup>[15-16]</sup>。

现代药理研究已证实中医药有防治 MIRI 的功效, 其机制包括抗氧自由基损伤, 减轻炎症反应, 调控心肌细胞凋亡, 抑制钙离子超载等多个方面<sup>[17]</sup>。本实验中 STG, 具有益气养阴, 活血通络的功效。前期研究已证实, 人参皂苷可通过干预 NF- $\kappa$ B 信号转

导通路抑制心肌肥厚<sup>[18]</sup>;黄芪皂甙可通过调节心肌细胞膜上的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶增强心肌收缩力,改善心室构型和射血功能<sup>[19]</sup>;川芎嗪可通过抑制 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 信号通路改善心肌细胞的肥大<sup>[20]</sup>。本研究结果显示,STG可显著提高心肌能量代谢过程中的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性,降低心肌细胞膜的损伤,增加ATP含量,改善心肌缺血缺氧大鼠的心肌能量代谢,减少心肌缺血缺氧对心肌组织的病理损伤,降低血清中炎症介质 $\text{IL-1}\beta$ , $\text{IL-6}$ 及 $\text{TNF-}\alpha$ 的含量,上调 $\text{I}\kappa\kappa$ 水平激酶 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 和 $\text{I}\kappa\kappa\beta$ 中止 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 的活化,使 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 表达降低,通过抑制 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 的活化,又进一步降低炎症介质的释放,通过对 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 信号转导通路的调节,提高心肌抗氧化和清除氧自由基的能力,改善心肌细胞膜上 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性,减少心肌组织结构的损伤,增强左心室功能。

综上所述,STG可能是通过调节 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 信号转导通路相关蛋白,降低 $\text{IL-1}\beta$ , $\text{IL-6}$ 及 $\text{TNF-}\alpha$ 炎症介质的含量,保护心肌细胞膜上的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶,增强心肌收缩力,从而改善心室功能的。

#### [参考文献]

[1] Benjamin E J, Blaha M J, Chiuve S E, et al. Heart disease and stroke statistics-2017update. A report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee [J]. *Circulation*, 2017, 135(10):e146-e603.

[2] 王勇,范书英. 冠心病介入治疗的现状和展望[J]. *临床内科杂志*, 2015, 32(1):5-9.

[3] Yellon D M, Hausenloy D J. Myocardial reperfusion injury [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(11):1121-1135.

[4] LU M, TANG F, ZHANG J, et al. Astragaloside IV attenuates injury caused by myocardial ischemia reperfusion in rats *via* regulation of toll-like receptor 4 nuclear factor- $\kappa\text{B}$  signaling pathway [J]. *Phytother Res*, 2015, 29(4):599-606.

[5] LIU F Y, Bardhan K K, YANG D F, et al.  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  directly regulates Fas transcription to modulate Fas-mediated apoptosis and tumor suppression [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(30):2530-2540.

[6] George A O, Anton L, Hwang Y C, et al. A functional genomics screen for microRNA regulators of  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  signaling [J]. *BMC Biology*, 2013, 11-19.

[7] Beinke S, Ley S. Functions of  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 1 and  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 2 in immune cell biology [J]. *Biochem J*, 2004, 382(2):393-409.

[8] Hayden M S, Ghosh S. Signaling to  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  [J]. *Genes Dev*, 2004;18(18):219-224.

[9] Andresen L, Jorgensen V L, Perner A, et al. Activation of nuclear factor  $\kappa\text{B}$  colonic mycosis from patients with collagenous and ulcerative colitis [J]. *Gut*, 2005, 54:503-509.

[10] 谢鸣. 方剂学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2016:52-67.

[11] 陈路,李玮玮,刘春慧. 心肌缺血再灌注损伤的中医药研究进展及其模型的制备 [J]. *中国生化药物杂志*, 2015, 35(9):174-176.

[12] LU M, TANG F, ZHANG J, et al. Astragaloside IV attenuates injury caused by myocardial ischemia reperfusion in rats *via* regulation of toll-like receptor nuclear factor- $\kappa\text{B}$  signaling pathway [J]. *Phytother Res*, 2015, 29(4):599-606.

[13] XING J, XUE F, YUAN Y, et al. Cholinergic anti-inflammatory pathway: a possible approach to protect against myocardial ischemia reperfusion injury [J]. *Chin Med J*, 2010, 123(19):2719-2725.

[14] XIONG J, YUAN Y, XUE F, et al. Postconditioning with  $\alpha 7$  nAChR agonist attenuates systemic inflammatory response to myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Inflammation*, 2012, 35:1352-1361.

[15] Bonizzi G, Karin M. The two  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  activation pathways and their role in innate and adaptive immunity [J]. *Trends Immunol*, 2014, 25(6):280-288.

[16] Hayden M S, Ghosh S. Signaling to  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  [J]. *Genes Develop*, 2013, 18(1):2195-2224.

[17] 韵海霞,芦殿香. 中药抗心肌缺血再灌注损伤与基因表达的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(10):360-364.

[18] 姜文大,梁灵君,顾洁莹,等. 人参皂苷  $\text{Rg}_1$  对腹主动脉缩窄致大鼠心肌肥厚和  $\text{TLR4}$  的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(1):35-38.

[19] 耿长山. 黄芪的免疫药理作用研究 [J]. *中西医结合杂志*, 2016, 36(1):8-26.

[20] 张翠英,章洪,戚琼华. 川芎的有效成分及药理研究进展 [J]. *辽宁中医杂志*, 2014, 41(10):2264-2266.

[责任编辑 全燕]