

· 药理 ·

## 基于氧化应激和 NLRP3 炎性小体探讨锦鹤养心方 总黄酮抗心肌缺血的作用机制

程艳刚<sup>1</sup>, 李国艳<sup>2</sup>, 刘艳<sup>1</sup>, 赵建斌<sup>3</sup>, 李飞鹤<sup>3</sup>, 李慧峰<sup>2</sup>, 谭金燕<sup>1</sup>, 杨炳友<sup>1</sup>, 裴妙荣<sup>2,3\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学 教育部北药基础与应用研究重点实验室, 哈尔滨 150040;

2. 山西中医药大学 中药学院, 山西 晋中 030619;

3. 山西振东健康产业集团有限公司 太原工程技术中心, 山西 晋中 030619)

**【摘要】** 目的:研究锦鹤养心方总黄酮提取物对盐酸异丙肾上腺素(ISO)诱导的小鼠心肌缺血损伤保护作用,并初步探讨其作用机制。方法:108只SPF级KM小鼠随机分为正常组,模型组,阳性药组(盐酸普萘洛尔,33 mg·kg<sup>-1</sup>),总黄酮提取物高、中、低剂量组(4.4,2.2,1.1 g·kg<sup>-1</sup>),给药组连续给药7d,各组于第5天开始,除正常组外,其余各组小鼠均于给药1h后皮下注射ISO 20 mg·kg<sup>-1</sup>,正常组小鼠皮下注射等剂量生理盐水,连续注射3d,制备心肌缺血模型。造模24h后取材,记录各组小鼠第1次注射ISO前及最后1次注射24h后心电图;测定各组小鼠的心脏指数;用2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法测定心肌缺血面积;试剂盒检测血清中肌酸激酶同工酶(CK-MB),心肌钙蛋白I(cTnI),乳酸脱氢酶(LDH),丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA),白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的含量;苏木素-伊红(HE)染色观察心肌组织病理形态学变化;蛋白免疫印迹法(Western blot)测定小鼠心肌组织核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3),凋亡相关斑点样蛋白(ASC)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)蛋白的表达。结果:与正常组比较,模型组小鼠II导联心电图ST段位移增加( $P < 0.01$ ),血清CK-MB, cTnI, ALT, AST, LDH, MDA, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 含量及心脏指数水平显著升高, SOD的含量显著降低( $P < 0.01$ ),心肌缺血面积显著增加( $P < 0.01$ ),心肌组织损伤明显, NLRP3, ASC, Caspase-1蛋白表达显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,锦鹤养心方总黄酮各剂量组小鼠II导联心电图ST段位移降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),血清CK-MB, cTnI, ALT, AST, LDH, MDA, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 含量及心脏指数水平降低, SOD的含量升高( $P < 0.05, P < 0.01$ ),心肌缺血面积降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),心肌缺血损伤明显减轻, NLRP3, ASC, Caspase-1蛋白表达降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。结论:锦鹤养心方总黄酮对心肌缺血损伤具有保护作用,且呈现一定的量效关系,该作用可能与提高机体抗氧化活性,减少氧化应激损伤,抑制NLRP3炎性小体活化有关。

**【关键词】** 锦鹤养心方总黄酮; 心肌缺血; 氧化; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3); 炎症

**【中图分类号】** R22;R24;R285.5;R289 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2018)18-0093-08

**【doi】** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181728

**【网络出版地址】** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180614.1201.015.html>

**【网络出版时间】** 2018-06-14 16:56

### Mechanism of Total Flavonoids from Jinhe Yangxin Prescription on Myocardial Ischemia Injury Based on Oxidative Stress and NLRP3 Inflammasome

CHENG Yan-gang<sup>1</sup>, LI Guo-yan<sup>2</sup>, LIU Yan<sup>1</sup>, ZHAO Jian-bin<sup>3</sup>, LI Fei-he<sup>3</sup>, LI Hui-feng<sup>2</sup>,  
TAN Jin-yan<sup>1</sup>, YANG Bing-you<sup>1</sup>, PEI Miao-rong<sup>2,3\*</sup>

(1. Key Laboratory of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Heilongjiang University of  
Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

**【收稿日期】** 20180309(004)

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(81373546,30472125,81273660)

**【第一作者】** 程艳刚,在读博士,从事中药及复方药效物质基础研究, E-mail:chengyg1992@163.com

**【通信作者】** \*裴妙荣,教授,博士生导师,从事中药及复方药效物质基础研究, Tel:0351-3179901, E-mail:peimr602@163.com

2. School of Chinese Pharmacy, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China;  
3. Taiyuan Engineering Research Center, Shanxi Zhendong Health Industry Group  
Co. Ltd., Jinzhong 030619, China)

**[ Abstract ] Objective:** To investigate the underlying mechanism of the total flavonoids from Jinhe Yangxin prescription (FJYP) on myocardial ischemia (MI) injury induced by isoproterenol (ISO) in mice. **Method:** Totally 108 SPF KM mice were randomly divided into blank group, model group, positive group (propranolol hydrochloride,  $33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), high-dose FJYP group ( $4.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), middle-dose FJYP group ( $2.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), and low-dose FJYP group ( $1.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). All mice were administrated with drugs for 7 days, except for the blank group. All mice were injected subcutaneously with ISO on the 5<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> day to establish the MI model. The electrocardiogram test was conducted in anesthetized mice before the first injection and after the final injection with ISO. The heart weight index (HWI) was determined. Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining was performed to determine the area of MI. Creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB), cardiac troponin I (cTnI), lactate dehydrogenase (LDH), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and IL-1 $\beta$  levels in serum were measured using commercial kits, and the pathological changes of myocardial tissues were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Western blot analysis was used to detect the expression levels of nucleotide binding oligomeric domain-like receptor protein 3 (NLRP3), apoptosis related speckle (ASC), Caspase-1. **Result:** Compared with the blank group, ST-segment was significantly elevated in model group ( $P < 0.01$ ). The heart weight index, CK-MB, cTnI, ALT, AST, LDH, MDA, IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in serum were significantly increased, and serum SOD activity was significantly decreased ( $P < 0.01$ ); the MI area was increased ( $P < 0.01$ ). The expression levels of NLRP3, ASC, Caspase-1 were all increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, FJYP could effectively decrease the change of ST-segment ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The heart weight index, CK-MB, cTnI, ALT, AST, LDH, MDA, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and the MI area of mice decreased, while the serum SOD content increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); and the pathological damages induced by ISO were significantly alleviated in FJYP treatment group; and the expression levels of NLRP3, ASC, Caspase-1 were also decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** FJYP plays a protective role in myocardial ischemia in mice, the protective effect and mechanism may be related to increase of antioxidant ability, reduction of oxidant damage and inhibition of the NLRP3 inflammasome activation.

**[ Key words ]** total flavonoids from Jinhe Yangxin prescription; myocardial ischemia; oxidation; nucleotide binding oligomeric domain-like receptor protein 3 (NLRP3); inflammation

心肌缺血是由于心脏的供血和供氧减少,从而引起心肌能量代谢异常,心脏不能正常工作的一种病理状态,是多种心脏疾病的初始阶段,其发病率和死亡率随着我国人口老龄化进程的加剧而呈现逐年上升的趋势,严重影响人类的身体健康和生活质量。心肌缺血的发病机制较为复杂,目前认为,活性氧、钙超载、炎症反应、细胞凋亡等多种生物活性分子及细胞内信号转导通路参与了心肌缺血<sup>[1-2]</sup>。其中,氧化应激和炎症反应是心肌缺血发病机制中最为重要的两个环节,心肌缺血时伴有大量的活性氧簇产生并堆积,引发机体内源性氧化应激反应,氧化应激可诱导心肌细胞凋亡、坏死,并促进炎性因子的释放

而加剧炎症反应,氧化应激和炎症反应的强弱可反映心肌缺血的损伤程度。研究发现,固有免疫系统模式识别受体 NOD 样受体已被证实与心肌缺血中无菌性炎症反应的发生、发展密切相关,其中,由核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3), 凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1) 组成的 NLRP3 炎性小体是研究最为广泛的炎症小体<sup>[3-4]</sup>, 在心肌缺血过程中,大量氧自由基等危险因素通过活化 NLRP3, 诱导白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 的释放,从而发生炎症反应<sup>[5]</sup>, 因此,基于氧化应激和 NLRP3 炎性小体的抗炎药物发现及作用机制分析对于心肌缺血的防治具有重要的

意义。

对心肌缺血的治疗,目前多采用以单靶点开发的西药如硝酸酯类、钙离子阻断剂及  $\beta$  受体阻断剂等,因其局限于某一方面而疗效欠佳。中药及复方的特色在于能发挥多靶点、多环节、多层次的药理作用,对于治疗心肌缺血等有复杂病因的疾病具有潜在的优势。诸多研究表明,中药及复方在防治心肌缺血方面疗效显著,作用途径包括抗氧自由基损伤、减轻炎症反应、调控心肌细胞凋亡等多个方面<sup>[6-8]</sup>。因此,从中医药中寻找并开发能有效预防和治疗心肌缺血的药物不失为一条有效途径。

地锦草和仙鹤草、地锦草和分心木是京城四大名医之一施今墨临床上治疗心悸、怔忡及中老年阵发性心房纤颤等多种心血管疾病的两个常用对药,均收载于国医大师吕景山所著的《施今墨对药》中<sup>[9-14]</sup>。课题组前期运用现代药理学方法,对由上述两对药组合而成的锦鹤养心方在心血管疾病方面的应用进行了大量的筛选,研究发现其具有显著的抗心肌缺血作用,且复方药效优于各单味药,为明确该方药效物质基础及作用机制,课题组以各药味所共有且含量较高的黄酮类成分为切入点,对其制备工艺进行了优选,并通过进一步实验研究发现,锦鹤养心方总黄酮能明显提高小鼠常压耐缺氧能力<sup>[15-16]</sup>,研究成果已申报国家发明专利(CN107693597A)。本文以锦鹤养心方总黄酮提取物为研究对象,以氧化应激和 NLRP3 炎性小体为切入点,利用盐酸异丙肾上腺素(ISO)诱导小鼠心肌缺血模型,探讨总黄酮提取物对心肌缺血损伤动物的保护作用及机制,为综合开发该方提供依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级雄性 KM 小鼠 108 只,体质量 18 ~ 20 g,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,合格证号 SCXK(军)2014-0013,动物实验研究部分获得山西中医药大学动物伦理委员会的批准,符合动物伦理的要求。

**1.2 药物及试剂** 地锦草、仙鹤草、分心木药材均购自河北安国药材市场,经山西中医药大学中药学院裴香萍副教授鉴定均为正品;芦丁(中国食品药品检定研究院,批号 100080-201202,纯度 > 98%)。锦鹤养心方总黄酮提取物为本实验室自制<sup>[15-16]</sup>[批号 20160511;制备工艺:称取锦鹤养心方组方药材(地锦草-仙鹤草-分心木 1:2:1),加 17 倍量 55% 乙醇回流提取 2 次,每次 146 min,提取液浓缩为 0.5 g·mL<sup>-1</sup>,上样于径高比为 1:6 的 AB-8 型树脂

柱,上样流速为 2 BV·h<sup>-1</sup>,上样量为 2 BV,吸附 4 h,加水 1.5 BV 洗脱水溶性杂质,加 50% 乙醇 3 BV 洗脱,洗脱流速为 2 BV·h<sup>-1</sup>,收集洗脱液,减压浓缩后 60 °C 干燥即得,以芦丁为对照品,采用硝酸铝显色法检测其总黄酮含量为 86.77%]。ISO(美国 Sigma 公司,批号为 55627);盐酸普萘洛尔(江苏亚邦爱普森药业有限公司,批号为 H32020133);水合氯醛(美国 Sigma 公司,批号为 47335);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染液和苏木素-伊红(HE)染色液(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20110106,20160630);肌酸激酶同功酶(CK-MB),乳酸脱氢酶(LDH),心肌钙蛋白 I(cTnI),丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD),丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20160512,20160514,20160327,20160203,20160416,20160401,20160421);白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号分别为 CSB-E04639m,CSB-E04741m,CSB-E08054m);RIPA 裂解液,BCA 蛋白浓度定量试剂盒,磷酸蛋白酶抑制剂(碧云天生物技术研究所,批号分别为 P0013B,P0010,P1006);兔抗 ASC,Caspase-1 抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab150368,ab1872);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国 Proteintech 公司,批号 5174);兔抗 NLRP3 抗体,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 二抗(美国 Cell Signaling 公司,批号分别为 15101,7074);Clarity Western ECL Substrate 试剂 A 及试剂 B(美国 Bio-Rad 公司,批号均为 1705041)。

**1.3 仪器** AB135-S 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器上海有限公司);FA2104 型电子分析天平(上海精科天平仪器厂);SB-800 DTD 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);-80 °C 超低温冰箱(中科美菱公司);BL-420F 型生物信息采集与分析系统(成都泰盟科技有限公司);Histostar 型组织包埋机,HM 340E 型石蜡切片机(美国 Thermo 公司);BX60 型显微镜,DP72 型显微摄像系统(日本 Olympus 公司);164-5050 型蛋白电泳仪及转膜仪,GelDoc2000 型凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 小鼠的分组、造模及给药** 将 108 只小鼠随机分为 6 组,分别为正常组、模型组、阳性药(盐酸普

蔡洛尔)组、锦鹤养心方总黄酮提取物高、中、低剂量组,每组 18 只。正常组和模型组灌胃(*ig*)蒸馏水 20 mL·kg<sup>-1</sup>,盐酸普萘洛尔组 *ig* 盐酸普萘洛尔 33 mg·kg<sup>-1</sup>,锦鹤养心方总黄酮提取物高、中、低剂量组分别 *ig* 锦鹤养心方总黄酮提取物 4.4, 2.2, 1.1 g·kg<sup>-1</sup>,每天给药 1 次,连续给药 7 d,各组小鼠均喂养普通饲料,自由饮水。第 5 天开始,除正常组外,其余各组小鼠均于给药 1 h 后皮下多点注射 ISO 20 mg·kg<sup>-1</sup>(四肢根部和背部共 6 点,10 s 内注射完毕),连续注射 3 d,制备心肌缺血模型,正常组小鼠皮下注射等剂量生理盐水<sup>[17-18]</sup>。

## 2.2 指标检测

**2.2.1 心电图检测** 各组小鼠于第 1 次皮下注射 ISO 前及最后 1 次注射 24 h 后,腹腔注射 10% 水合氯醛(3 mL·kg<sup>-1</sup>)进行麻醉,仰卧位固定,将心电图机电极分别插入四肢皮下,记录标准 II 导联心电图,观察 ST 段偏移的程度(QRS 波群的终点与 T 波直接相接,其交接点称 J 点,II 导联 ECG ST 段的测定是比较 J 点与标准基线偏移程度,以 P-R 段为基线,ST 段的变化值无论上抬或下移,均取其绝对值)。

**2.2.2 血清生化指标的检测** 各组小鼠于最后一次心电图检测后进行摘眼球取血,室温静置 2 h,3 500 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min,分离血清,用于心肌损伤指标(CK-MB, cTnI, LDH, ALT, AST),氧化应激指标(SOD, MDA)和炎症因子(IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ )的测定。

**2.2.3 心脏指数的测定** 取血完成后,各小鼠脱颈处死,开胸迅速取出心脏,用预冷生理盐水冲洗血液,滤纸吸干水分后称量全心质量,计算心脏指数。

**2.2.4 心肌缺血面积的测定** 各组小鼠心脏冻存于 -20 °C 冰箱中,30 min 后取出心脏,垂直心脏长轴均匀切成 3 片并置于 TTC 溶液中,37 °C 水浴孵育 20 min 后拍照,使用 Image J 软件分析,计算心肌缺血面积(心肌缺血区面积占整个心脏面积的比例)。

**2.2.5 心肌组织病理学检测** 取各组小鼠心脏心尖部位的心肌组织置于 10% 多聚甲醛中固定,脱水,包埋,制成石蜡切片,HE 染色,光学显微镜下观察。

**2.2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测** 检测心肌组织中 NLRP3 炎性体相关蛋白的表达 各组小鼠取出心脏以磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗,去除心房及右室组织后投入液氮速冻并保存于 -80 °C 冰箱。称取心脏组织约 50 mg,匀浆器匀浆后加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min,而后于 4 °C 下 12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min,取上清,并用

BCA 法蛋白定量,制备蛋白上样样品,取蛋白样品 30  $\mu$ g 进行 SDS-PAGE 电泳,再转移到 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST(0.3% Tris, 0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.01% 聚山梨酯-20, pH 7.4)封闭 2 h 后,分别加入一抗(NLRP3, 1:500; ASC, 1:1 000; Caspase-1, 1:1 000),4 °C 孵育过夜。次日用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 万),室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min, ECL 化学发光显色,对相关蛋白表达进行检测,用 Quantity One 软件进行分析,计算灰度值。

**2.3 统计学分析** 实验数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析,各组数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。所得数据作方差齐性检验后作 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对心肌缺血小鼠 II 导联心电图 ST 段偏移的影响** 与正常组比较,模型组小鼠 II 导联心电图 ST 段位移显著增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,盐酸普萘洛尔组和锦鹤养心方高、中剂量组 ST 段位移明显降低( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 锦鹤养心方总黄酮提取物对心肌缺血小鼠 II 导联心电图 ST 段偏移的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effect of total flavonoids from Jinhe Yangxin prescription (FJYP) administration on ST-segment in electrocardiograph of myocardial ischemia mice( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	J 点位移/mV
正常	-	0.032 ± 0.007
模型	-	0.241 ± 0.032 <sup>2)</sup>
盐酸普萘洛尔	0.033	0.164 ± 0.023 <sup>4)</sup>
锦鹤养心方	4.4	0.183 ± 0.015 <sup>4)</sup>
	2.2	0.201 ± 0.010 <sup>4)</sup>
	1.1	0.228 ± 0.031

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

**3.2 对心肌缺血小鼠血清酶学及心脏指数的影响** 与正常组比较,模型组小鼠血清 CK-MB, cTnI, ALT, AST, LDH, MDA, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  水平及心脏指数显著升高( $P < 0.01$ ),SOD 的水平显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,盐酸普萘洛尔组、锦鹤养心方总黄酮提取物高、中、低剂量组明显降低小鼠血清 CK-MB, cTnI, ALT, AST, LDH, MDA, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  水平及心脏指数,升高 SOD 的水平( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 锦鹤养心方总黄酮提取物对心肌缺血小鼠血清 CK-MB, cTnI, ALT, AST, SOD, LDH, MDA, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  水平及心脏指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of FJYP on serum levels of CK-MB, cTnI, ALT, AST, SOD, LDH, MDA, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and heart index in myocardial ischemia of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	CK-MB /U·L <sup>-1</sup>	cTnI /U·L <sup>-1</sup>	ALT /U·L <sup>-1</sup>	AST /U·L <sup>-1</sup>	SOD /U·mL <sup>-1</sup>	LDH /U·L <sup>-1</sup>
正常	-	104.33 ± 10.74	111.43 ± 14.43	29.14 ± 4.59	143.35 ± 10.07	111.57 ± 15.28	5 140.70 ± 707.85
模型	-	209.14 ± 17.49 <sup>2)</sup>	215.62 ± 20.00 <sup>2)</sup>	126.21 ± 16.34 <sup>2)</sup>	253.44 ± 15.07 <sup>2)</sup>	62.48 ± 9.82 <sup>2)</sup>	6 663.91 ± 919.50 <sup>2)</sup>
盐酸普萘洛尔	0.033	132.62 ± 13.21 <sup>4)</sup>	138.21 ± 15.09 <sup>4)</sup>	60.77 ± 6.35 <sup>4)</sup>	165.76 ± 17.46 <sup>4)</sup>	86.77 ± 10.72 <sup>4)</sup>	5 480.09 ± 4 429.97 <sup>4)</sup>
锦鹤养心方	4.4	139.32 ± 13.20 <sup>4)</sup>	137.97 ± 15.40 <sup>4)</sup>	59.86 ± 10.83 <sup>4)</sup>	171.63 ± 18.04 <sup>4)</sup>	82.89 ± 8.75 <sup>4)</sup>	5 688.37 ± 371.13 <sup>4)</sup>
	2.2	152.93 ± 18.07 <sup>4)</sup>	180.98 ± 23.38 <sup>4)</sup>	82.11 ± 7.98 <sup>4)</sup>	231.94 ± 20.55 <sup>3)</sup>	74.03 ± 8.49 <sup>3)</sup>	5 923.47 ± 592.64
	1.1	183.49 ± 17.60 <sup>3)</sup>	193.19 ± 24.89	113.22 ± 14.55	239.46 ± 17.26	67.18 ± 5.24	5 985.43 ± 548.78

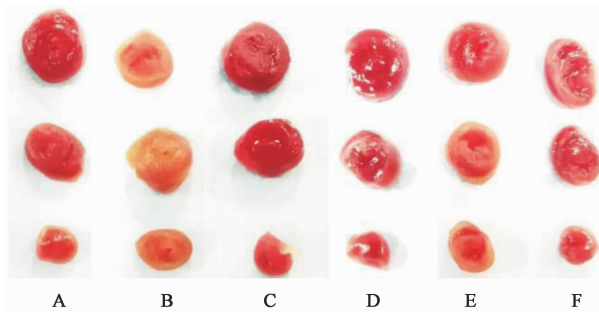
组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	MDA /μmol·L <sup>-1</sup>	IL-6 /ng·L <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$ /ng·L <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$ /ng·L <sup>-1</sup>	心脏指数 /mg·g <sup>-1</sup>
正常	-	5.13 ± 0.28	24.69 ± 5.04	35.21 ± 7.52	39.84 ± 4.09	4.72 ± 0.49
模型	-	9.05 ± 0.68 <sup>2)</sup>	89.17 ± 9.21 <sup>2)</sup>	95.42 ± 12.47 <sup>2)</sup>	127.09 ± 14.74 <sup>2)</sup>	5.91 ± 0.22 <sup>2)</sup>
盐酸普萘洛尔	0.033	6.48 ± 0.43 <sup>4)</sup>	52.02 ± 10.18 <sup>4)</sup>	56.32 ± 8.01 <sup>4)</sup>	78.96 ± 10.25 <sup>4)</sup>	4.92 ± 0.40 <sup>4)</sup>
锦鹤养心方	4.4	6.68 ± 0.51 <sup>4)</sup>	39.38 ± 4.20 <sup>4)</sup>	47.67 ± 5.45 <sup>4)</sup>	59.32 ± 6.21 <sup>4)</sup>	5.06 ± 0.28 <sup>4)</sup>
	2.2	7.56 ± 0.27 <sup>4)</sup>	62.93 ± 14.07 <sup>3)</sup>	68.32 ± 9.28 <sup>4)</sup>	78.46 ± 9.42 <sup>4)</sup>	5.53 ± 0.24 <sup>3)</sup>
	1.1	8.43 ± 0.45 <sup>3)</sup>	83.49 ± 11.60	93.99 ± 12.01	85.16 ± 7.45 <sup>3)</sup>	5.45 ± 0.40 <sup>3)</sup>

**3.3 对心肌缺血小鼠心肌缺血面积的影响** TTC 染色后,心肌组织缺血区呈白色,正常心肌组织呈红色。与正常组比较,模型组小鼠心肌缺血面积明显增大;与模型组比较,盐酸普萘洛尔及锦鹤养心方总黄酮提取物给药组小鼠心肌缺血面积均减少。见图 1。模型组小鼠心肌缺血面积显著高于正常组 ( $P < 0.01$ ),盐酸普萘洛尔及锦鹤养心方总黄酮提取物给药组小鼠心肌缺血面积均显著低于模型组 ( $P < 0.01$ )。见图 1,表 3。

表 3 锦鹤养心方总黄酮提取物对心肌缺血小鼠心肌缺血面积的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effect of FJYP on myocardial tissue in myocardial ischemia of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	心肌缺血面积/%
正常	-	7.26 ± 0.75
模型	-	82.13 ± 8.98 <sup>2)</sup>
盐酸普萘洛尔	0.033	6.12 ± 0.79 <sup>4)</sup>
锦鹤养心方	4.4	21.46 ± 3.21 <sup>4)</sup>
	2.2	40.76 ± 6.97 <sup>4)</sup>
	1.1	45.78 ± 5.02 <sup>4)</sup>



A. 正常组; B. 模型组; C. 盐酸普萘洛尔组; D. 锦鹤养心方高剂量组; E. 锦鹤养心方中剂量组; F. 锦鹤养心方低剂量组 (图 2, 3 同)

图 1 锦鹤养心方总黄酮提取物对心肌缺血小鼠心肌缺血的影响  
Fig. 1 Effect of FJYP on myocardial ischemia in myocardial ischemia of mice

**3.4 对心肌缺血小鼠心肌组织的影响** 正常组小

鼠心肌组织无变性、坏死,心肌纤维结构排列整齐,组织间隙无水肿,无炎细胞浸润;模型组小鼠心肌细胞坏死明显,可见较大范围的心肌纤维坏死,细胞间隙水肿明显,大量炎性细胞浸润;与模型组比较,各给药组小鼠心肌组织间隙水肿程度降低,能保持更多心肌细胞结构正常,间质炎性细胞浸润程度有所减轻。见图 2。

**3.5 对心肌缺血小鼠心肌组织中 NLPR3, ASC, Caspase-1 蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组心肌组织中 NLPR3, ASC 及 Caspase-1 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,盐酸普萘洛尔组、锦鹤养心方高、中、低剂量组 NLPR3, ASC,

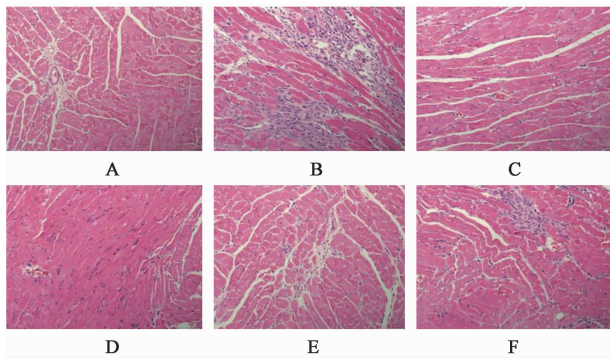


图 2 锦鹤养心方总黄酮提取物对心肌缺血小鼠心肌组织的影响 (HE, ×200)

Fig.2 Effect of FJYP on myocardial tissue in myocardial ischemia of mice (HE, ×200)

Caspase-1 蛋白含量显著降低 ( $P < 0.01$ )。见图 3, 表 4。

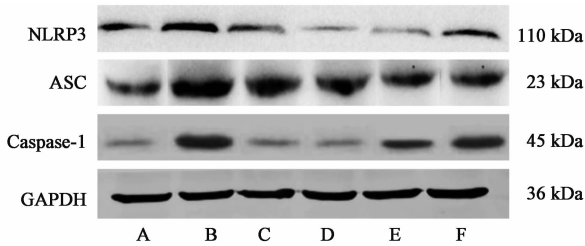


图 3 各组小鼠心肌组织中 NLRP3, ASC, Caspase-1 蛋白表达电泳  
Fig.3 Expression of NLRP3, ASC, Caspase-1 in myocardial tissue of each mice by electrophoresis

表 4 总黄酮提取物对小鼠心肌组织中 NLRP3, ASC, Caspase-1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of FJYP on expression of NLRP3, ASC, Caspase-1 in myocardial tissue of myocardial ischemia mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	NLRP3 /GAPDH	ASC /GAPDH	Caspase-1 /GAPDH
正常	-	0.12 ± 0.02	0.22 ± 0.04	0.05 ± 0.01
模型	-	1.06 ± 0.10 <sup>2)</sup>	1.75 ± 0.17 <sup>2)</sup>	1.01 ± 0.17 <sup>2)</sup>
盐酸普萘洛尔	0.033	0.20 ± 0.02 <sup>4)</sup>	0.94 ± 0.14 <sup>4)</sup>	0.11 ± 0.02 <sup>4)</sup>
锦鹤养心方	4.4	0.11 ± 0.01 <sup>4)</sup>	0.72 ± 0.05 <sup>4)</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>4)</sup>
	2.2	0.15 ± 0.03 <sup>4)</sup>	0.78 ± 0.13 <sup>4)</sup>	0.51 ± 0.04 <sup>4)</sup>
	1.1	0.34 ± 0.07 <sup>4)</sup>	0.86 ± 0.19 <sup>4)</sup>	0.86 ± 0.17

#### 4 讨论

对药(或药对)是临床用药中相对固定的两味药物的配伍形式,作为中药复方最基本的组成单位,与由多味中药组成的复方相比,对药组成简单,且在 没有改变治疗特征的同时,其在临床治疗过程中所发挥的功效又明显优于单味中药,对药的运用在中

医药临床上具有特殊的意义<sup>[19-21]</sup>。锦鹤养心方由京城四大名医之一施今墨临床上治疗心悸、怔忡及中老年阵发性心房纤颤等多种心血管疾病的两个常用对药(地锦草-仙鹤草,地锦草-分心木)组合而成,方中地锦草活血止痛,利湿通乳,专走血分,长于调气活血,流通血脉,活血化痰;仙鹤草收缩内脏血管,升高血压,强心,兴奋呼吸,调整心率;分心木行于气分,善理胸膈之气以理气止痛,三药伍用,调气和血、宣通痹阻、流通血脉、抗缺血护心肌,治疗之功益彰。

ISO 是人工合成的  $\beta$  受体激动剂,大剂量皮下注射 ISO 可造成实验动物心肌缺血,本实验采用皮下多点注射 ISO 诱导心肌缺血模型,所制备模型的酶学变化等均类似于人类心肌缺血或心肌梗死<sup>[15-16]</sup>,因此用其来评价锦鹤养心方总黄酮提取物对心肌缺血的保护作用更具科学依据。

心脏正常的生理功能与心脏中大量的酶类物质密切相关,如 CK-MB, cTnI 等对心肌具有较高的特异性和敏感性,在临床上被称作诊断和治疗心肌缺血的酶学黄金指标。ISO 可破坏实验动物心肌细胞膜的完整性,提高细胞膜的通透性,使心肌中含有的酶类物质如 CK-MB, cTnI, AST, ALT, LDH 等大量释放入血,致使血中浓度升高<sup>[22-27]</sup>。此外,ISO 可使小鼠心肌组织细胞间隙水肿,并有大量炎性细胞浸润而使小鼠心脏指数升高<sup>[22,26,28]</sup>,因此检测血清中此类物质的水平及心脏指数对诊断心肌缺血及评价心肌缺血的严重程度具有重要的意义。实验研究表明,锦鹤养心方总黄酮提取物能显著降低心肌缺血小鼠血清中 cTnI, CK, CK-MB, AST, ALT, LDH 的水平,降低小鼠心脏指数,对心肌缺血小鼠具有保护作用。

氧化和抗氧化的失衡是很多心血管疾病发病机制中的重要环节,也是导致心血管系统结构功能异常的重要原因之一。现代药理学研究表明,心肌缺血的发生与体内氧自由基的产生与蓄积密切相关,氧自由基作用于人体细胞,引起核酸、蛋白质和脂质等的氧化或再氧化损害,破坏细胞结构的完整性和功能,造成细胞氧化应激损伤,MDA 的生成增多;SOD 作为生物体内清除自由基的首要物质,可减弱氧自由基对细胞造成的损害,并及时修复受损细胞<sup>[29-30]</sup>。实验研究发现,锦鹤养心方总黄酮提取物能升高心肌缺血小鼠血清 SOD 水平,降低 MDA 水平。

NLRP3 是 NLRP3 炎性体信号通路中 Nod 样受体之一 NLRP 蛋白家族中的一个典型代表,是机体

固有免疫系统的一类重要感受器,作为炎症反应的一个关键调控因素,活化的 NLRP3 可通过 ATP 聚合形成 NLRP3 蛋白寡聚体,随后通过其效应结构域 PYD 募集 ASC 和 Caspase-1 而形成 NLRP3 炎性小体, NLRP3 炎性小体的激活可促进机体炎性细胞因子 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  等的分泌,造成炎症损伤<sup>[31-32]</sup>。本实验从 NLRP3 炎性小体通路研究锦鹤养心方总黄酮提取物抗心肌缺血损伤作用,结果显示其可抑制心肌缺血损伤小鼠 NLRP3, ASC, Caspase-1 蛋白的表达及 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  的分泌,表明锦鹤养心方总黄酮提取物可通过抑制 NLRP3 炎性小体通路的活化来抑制心肌缺血损伤过程中的炎症反应而发挥抗心肌缺血作用。

综上所述,本实验围绕氧化应激损伤和 NLRP3 炎性小体对锦鹤养心方总黄酮提取物抗心肌缺血作用机制进行了研究,研究结果表明锦鹤养心方总黄酮提取物具有明显的抗心肌缺血作用,且呈现出一定的量效关系,其作用机制与其增加机体抗氧化活性,减少氧化损伤,抑制 NLRP3 炎性小体的激活而抑制炎症反应有关。此外,锦鹤养心方虽组方简单,但其成分复杂,且中药及复方有其多环节、多层次、多靶点的作用特点,因此,仍需笔者进一步从动物、组织、细胞及分子水平去阐明锦鹤养心方抗心肌缺血的药效物质基础及作用机制,为其在临床的合理用药提供实验依据。

#### [参考文献]

[1] 魏志成,童东,杨娟,等.基于网络药理学的沙棘总黄酮治疗心肌缺血的作用机制研究[J].中国中药杂志,2017,42(7):1238-1244.

[2] Lee Y M, CHENG P Y, CHEN S Y, et al. Wogonin suppresses arrhythmias, inflammatory responses, and apoptosis induced by myocardial ischemia/reperfusion in rats [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2011, 58 (2): 133-142.

[3] 王文倩,童东,黄婉奕,等.桂枝拮抗麻黄中枢氧化应激损伤及 NLRP3 炎症小体上调作用分析[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(17):133-137.

[4] ZHANG Y L, WANG R B, LI W Y, et al. Pioglitazone ameliorates retinal ischemia/reperfusion injury via suppressing NLRP3 inflammasome activities [J]. Int J Ophthalmol, 2017, 10(12):1812-1818.

[5] Mastrocola R, Collino M, Penna C, et al. Maladaptive modulations of NLRP3 inflammasome and cardioprotective pathways are involved in diet-induced exacerbation of myocardial ischemia/reperfusion injury

in mice [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016:1-12.

[6] 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.

[7] 冷雪,臧安缘,李其芳,等.人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 通过 PI3K/Akt/eNOS 信号通路调控异丙肾上腺素致急性心肌缺血大鼠心肌的抗氧化作用[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(11):145-150.

[8] 赵桂峰,黄欣玮,吴丽玉,等.基于 NF- $\kappa$ B 通路的参芎胶囊保护大鼠心肌缺血再灌注损伤的机制分析[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(12):145-150.

[9] 吕景山.施今墨对药[M].北京:人民军医出版社,2015:315,321.

[10] 卢宏丽,卢宏霞.地锦草总黄酮提取纯化工艺的优化[J].中国药物与临床,2013,13(9):1150-1151.

[11] 朱青梅,令狐晨,阿依吐伦·斯马义.新疆核桃分心木总皂苷的提取纯化工艺研究[J].西北药学杂志,2015,30(1):20-23.

[12] 赵焕新,景援朝,白虹,等.分心木中的化学成分及抗氧化活性研究[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(7):54-57.

[13] 路芳,巴晓雨,何永志.仙鹤草的化学成分研究[J].中草药,2012,43(5):851-855.

[14] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:102,127.

[15] CHENG Y G, TAN J Y, LI H F, et al. Cardioprotective effects of total flavonoids from Jinhe Yangxin prescription by activating the PI3K/Akt signaling pathway in myocardial ischemia injury [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 72(98):308-317.

[16] 程艳刚,谭金燕,李国艳,等.锦鹤养心方总黄酮纯化工艺优选及对小鼠常压耐缺氧影响[J].辽宁中医药大学学报,2018,3(20):176-181.

[17] 舒海燕,杨仕林.丹参饮不同提取工艺样品对急性心肌缺血模型小鼠的保护作用[J].中国药房,2016,27(7):913-915.

[18] 齐田田,包怡敏,刘爱华.丹参水溶性成分抗心肌缺血再灌注的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(24):217-223.

[19] SONG S A, CHEN F L, XING X F, et al. Concurrent quantification and comparative pharmacokinetic analysis of bioactive compounds in the Herba Ephedrae-Semen Armeniacae Amarum Herb pair [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 109:67-73.

[20] SONG S A, MA Q H, TANG Q F, et al. Stereoselective metabolism of amygdalin-based study of detoxification of Semen Armeniacae Amarum in the Herba Ephedrae-Semen Armeniacae Amarum Herb pair [J]. J

- Ethnopharmacol, 2016, 179:356-366.
- [21] PAN L T, SHENG Y P, GUO W P, et al. Hedyotis diffusa plus *Scutellaria barbata* induce bladder cancer cell apoptosis by inhibiting akt signaling pathway through downregulating miR-155 expression [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, doi: 10. 1155/2016/9174903.
- [22] Abbas A M. Cardioprotective effect of resveratrol analogue isorhapontigenin versus omega-3 fatty acids in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats[J]. J Physiol Biochem, 2016, 72(3):469-484.
- [23] ZHANG W L, LI Y H, GE Z M. Cardioprotective effect of crocetin by attenuating apoptosis in isoproterenol induced myocardial infarction rat model [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 71(93):376-82.
- [24] LI Y, FENG J, MO Y Q, et al. Concordance between cardio-protective effect on isoproterenol-induced acute myocardial ischemia and phenolic content of different extracts of *Curcuma aromatica* [J]. Pharmaceutical Biology, 2016, 54(12):3226-3221.
- [25] 李淑玲, 刘凯, 赵信科, 等. 当归红芪多糖对急性心肌梗死大鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(17):92-96.
- [26] Dhivya V, Priya L B, Chirayil H T, et al. Piperine modulates isoproterenol induced myocardial ischemia through antioxidant and anti-dyslipidemic effect in male Wistar rats[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 71(87):703-713.
- [27] ZHANG Z H, NAN C, WANG H Q, et al. Crocetin ester improves myocardial ischemia via Rho/ROCK/NF- $\kappa$ B pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 38:186-193.
- [28] Mnafgui K, Hajji R, Derbali F, et al. Anti-inflammatory, antithrombotic and cardiac remodeling preventive effects of eugenol in isoproterenol-induced myocardial infarction in wistar rat [J]. Cardiovasc Toxicol, 2015, 16(4):336-344.
- [29] Althaf Hussain S, Kareem M A, Rasool S N, et al. Trace element determination and cardioprotection of terminalia pallida fruit ethanolic extract in isoproterenol induced myocardial infarcted rats by ICP-MS [J]. Biol Trace Elem Res, 2018, 181(1):112-121.
- [30] Prasad E M, Mopuri R, Islam M S, et al. Cardioprotective effect of *Vitex negundo* on isoproterenol-induced myocardial necrosis in wistar rats; a dual approach study [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 70(85):601-610.
- [31] QIU Z, LEI S Q, ZHAO B, et al. NLRP3 inflammasome activation-mediated pyroptosis aggravates myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic rats [J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, doi: 10. 1155/2017/9743280.
- [32] XU Y, YAO J, ZOU C, et al. Asiatic acid protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by inactivation of Kupffer cells via PPAR $\gamma$ /NLRP3 inflammasome signaling pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8(49):86339-86355.

[责任编辑 周冰冰]