

# 复方龙脉宁对急性心肌梗死模型大鼠 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B p65 信号通路的影响

卜雕雕, 苏卓, 柏希慧, 高佳雨, 邹俊波, 张丹, 王昌利\*  
(陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046)

**[摘要]** **目的:**探讨复方龙脉宁汤对盐酸异丙肾上腺素诱导的心肌梗死大鼠模型的保护作用及其对 Toll 样受体 4 (TLR4)/髓样分化因子(MyD88)/核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路的影响。**方法:**取雄性 SD 大鼠 48 只,随机分成 6 组:正常组,模型组,复方丹参滴丸组(0.072 9 g·kg<sup>-1</sup>),复方龙脉宁低、中、高剂量组(0.36,0.71,1.43 g·kg<sup>-1</sup>)。采用背部皮下多点注射盐酸异丙肾上腺素的方法建立急性心肌梗死动物模型。采用苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠心肌组织病理学变化;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测大鼠血清中白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ),白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1),一氧化氮(NO)的含量;免疫组化法测定大鼠心肌组织中 NF- $\kappa$ B 激酶 $\beta$ 抑制蛋白(IKK $\beta$ ),NF- $\kappa$ B 抑制蛋白 $\alpha$ (I $\kappa$ B $\alpha$ )的表达水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠心肌组织中 TLR4,MyD88,NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠心肌损伤明显,血清中 IL-1 $\beta$ ,IL-6,TNF- $\alpha$ ,MCP-1,NO 含量明显升高( $P < 0.05$ ),心肌组织中 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05$ ),心肌组织中 IKK $\beta$ ,TLR4,MyD88,NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平明显升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,复方龙脉宁低、中、高剂量组能明显改善大鼠心肌损伤,明显升高 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的表达( $P < 0.05$ ),明显降低血清中 IL-1 $\beta$ ,IL-6,TNF- $\alpha$ ,MCP-1,NO 的活性及心肌组织中 IKK $\beta$ ,TLR4,MyD88,NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达( $P < 0.05$ )。**结论:**复方龙脉宁对心肌梗死的保护作用,可能与调控 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B p65 信号通路相关因子的表达有关。

**[关键词]** 复方龙脉宁; 盐酸异丙肾上腺素; 心肌梗死; Toll 样受体 4 (TLR4) /髓样分化因子 (MyD88) /核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)

**[中图分类号]** R289;R542.2+2;R541;R543.5;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)09-0067-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190939

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190117.1349.014.html>

**[网络出版时间]** 2019-01-18 16:32

## Effect of Compound Longmaining on TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B p65 Signaling Pathway in Rats with Acute Myocardial Infarction

BU Diao-diao, SU Zhuo, BAI Xi-hui, GAO Jia-yu, ZOU Jun-bo, ZHANG Dan, WANG Chang-li\*  
(School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effect of compound Longmaining isoprenaline hydrochloride-induced myocardial infarction model and its effect on Toll-like receptor 4 (TLR4) /myeloid differentiation factor 88 (MyD88) /nuclear transcription factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway. **Method:** Forty-eight male SD rats were randomly divided into 6 groups: normal group, model group, compound salvia miltiorrhiza drop pill group (0.072 9 g·kg<sup>-1</sup>), and low, medium and high-dose compound Longmaining decoction groups (0.36, 0.71, 1.43 g·kg<sup>-1</sup>). The acute myocardial infarction model was induced through subcutaneous injection with isoproterenol. The pathological changes of myocardial tissue were examined by hematoxylin-eosin

**[收稿日期]** 20181127(021)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81373944)

**[第一作者]** 卜雕雕,在读硕士,从事中药制剂新剂型与新技术研究,E-mail:1318749554@qq.com

**[通信作者]** \*王昌利,教授,从事中药制剂新剂型与新技术研究,E-mail:wcl3433@163.com

(HE) staining. The levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), monocyte chemotaxis protein-1 (MCP-1) and nitrogen (NO) in serum were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of inhibitors of NF- $\kappa$ B kinase subunit- $\beta$  (IKK $\beta$ ), NF- $\kappa$ B inhibitor  $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ), TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B p65 were measured by immunohistochemical staining and Western blot. **Result:** Compared with normal group, the myocardial injury in model group was obvious. The levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1 and NO in serum increased significantly ( $P < 0.05$ ), the expression level of I $\kappa$ B $\alpha$  decreased significantly ( $P < 0.05$ ), and the expression levels of IKK $\beta$ , TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B p65 increased significantly in myocardial tissue ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, low, medium and high-dose compound Longmaining groups could significantly alleviate the degree of myocardial injury in rats, significantly decrease IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1 and NO levels in the serum ( $P < 0.05$ ), significantly increase the expression level of I $\kappa$ B $\alpha$  ( $P < 0.05$ ), and decreased the expression levels of IKK $\beta$ , TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B p65 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Compound Longmaining plays a protective effect on acute myocardial infarction by regulating the expressions of TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B p65 signaling pathway and relevant inflammatory factors.

**[Key words]** compound Longmaining; acute myocardial infarction; isoprenaline hydrochloride; Toll-like receptor 4 (TLR4) /myeloid differentiation factor 88 (MyD88) /nuclear transcription factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)

急性心肌梗死是在冠状动脉病变的基础上,发生冠状动脉血供急剧减少或者中断,心肌持久缺血导致的部分心肌急性坏死<sup>[1]</sup>,其具有发病急、病死率高的特点。目前急性心肌梗死仍是世界上死亡和残疾的主要原因之一<sup>[2]</sup>。近年来,中医药因其整体观念、辨证论治、药源丰富等特点,在治疗心肌梗死方面显示出巨大的优势及潜力,并逐渐成为人们在治疗心肌梗死过程中必不可少的方法<sup>[3]</sup>。

复方龙脉宁是在葛根-川芎药对的基础上,加穿山龙和蜂胶而组成的汤剂,是由陕西中医药大学附属医院陶根鱼教授根据多年临床经验所得,由陕西中医药大学王昌利教授团队自发研制。该方具有通络活血、化瘀解毒的功效,临床上主要用于治疗中风所致的半身不遂、肢体麻木、口眼歪斜和胸痹所致的胸闷气短、心悸、失眠等证<sup>[4-5]</sup>。该方对心脑血管疾病疗效显著,本课题前期建立了复方龙脉宁中药材饮片的质量控制标准、汤剂煎煮工艺以及汤剂质量标准,为后续研究奠定了物质基础<sup>[6]</sup>。董林娟等<sup>[4]</sup>研究了复方龙脉宁君药葛根在心肌缺血大鼠体内的药效学活性,结果表明复方龙脉宁提取物可以有效的改善大鼠心肌组织缺血缺氧状况及炎症的发生。张文娟等<sup>[7]</sup>研究了复方龙脉宁不同提取物对小鼠急性心肌缺血缺氧损伤的保护作用,结果表明复方龙脉宁可通过抑制炎症反应发挥对急性心肌缺血缺氧损伤的保护作用。但复方龙脉宁保护心肌组织的机制仍不明确。研究表明心肌梗死的发展与炎症反应有着密切的联系<sup>[8-10]</sup>,因此研究炎症反应机制对临床防治心肌梗死具有非常重要的意义。相关文献

报道, Toll 样受体 (TLRs) 和核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路可以通过多种生物学过程参与多种疾病的发病与防治,同时都在炎症反应的发生与发展方面起到至关重要的作用<sup>[11-12]</sup>。因此,本研究建立大鼠心肌梗死模型,以 TLR4/髓样分化因子 88 (MyD88)/NF- $\kappa$ B 信号通路为切入点,证实复方龙脉宁对心肌梗死大鼠的保护作用,进一步明确复方龙脉宁保护心肌的机制。

## 1 材料

**1.1 药物** 复方龙脉宁由葛根 18 g (宝鸡向源中药饮片有限责任公司),穿山龙 12 g,川芎 12 g (西安盛兴中药饮片公司),蜂胶 6 g (陕西省咸阳市自然之子蜂产品公司) 组成,以上药材均经陕西中医药大学药学院生药教研室王继涛教授鉴定为正品。复方龙脉宁汤剂的制备:取各药材适量,分别加 14 倍量纯净水浸泡 60 min。葛根先煎 30 min,蜂胶除蜡,而后再将 4 味药合并煎煮(先武后文)2 次,第 1 次 30 min,第 2 次 20 min,合并煎煮滤液,浓缩至 55.6 mL,即得复方龙脉宁汤剂<sup>[6]</sup>。复方丹参滴丸(天士力制药集团,国药准字 Z10950111)。

**1.2 动物** SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只,体质量 (220  $\pm$  20) g,购于成都达硕实验动物有限公司,动物合格证号 SCXK (川) 2013-0024。在标准实验条件下,温度 (25  $\pm$  2)  $^{\circ}$ C,湿度 (60  $\pm$  5) %, 12/12 h 昼/夜循环适应性饲养 1 周。本研究由陕西中医药大学动物伦理委员会批准,编号 SUCM2018021101。

**1.3 试剂** 盐酸异丙肾上腺素 (纯度  $\geq$  98%,上海源叶生物公司,批号 K2308B46335); 乌来糖 (上海

山浦化工公司,批号 20171219);白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ),白细胞介素-6 (IL-6),肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ),单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1),一氧化氮 (NO)酶联免疫吸附测定 (ELISA)检测试剂盒 (南京森贝伽生物科技有限公司,批号分别为 20170703, 20170705, 20170701, 20170708, 20170705); NF- $\kappa$ B 激酶  $\beta$  抑制蛋白 (IKK $\beta$ ), NF- $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ) 抗体 (北京博奥森生物技术公司,批号分别为 bs-2910R, bs-1415R);兔链霉卵白素-生物素法检测试剂盒 (北京中杉金桥生物技术公司,批号 SP9001); TLR-4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 抗体 (美国 CST 公司,批号分别为 14358, 13077, 3034);  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 兔抗鼠单克隆抗体,辣根过氧化物标记羊抗兔免疫球蛋白 (Ig) G, BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 6  $\times$  蛋白上样缓冲液, ECL 发光液 (北京 Trans Gen Biotech 公司,批号分别为 K21103, K31105, K30515, K31221, L30608); DAB 显色试剂盒, SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒, 高效 RIPA 组织/细胞裂解液, PVDF 膜, 10  $\times$  TBST (北京 Solarbio 有限公司,批号分别为 20170628, 20170706, 20170708, 20170701, 20170704); 磷酸盐缓冲液 (PBS, 以色列 Biological Industries 公司,批号 0033016); 脱脂奶粉 (伊利公司,批号 20170808); 苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (万类生物科技有限公司,批号 20170805)。

**1.4 仪器** AR1140 型电子天平 (上海梅特勒-托利多仪器仪器厂); RM2235 型石蜡切片机 (德国 Leica 公司); QH01-9030A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备公司); NW10LVF 型超纯水系统 (香港 Heal Force 公司); DP-73 型显微镜 (日本 Olympus 公司); 416 型低速离心机, X1 型高速离心机 (香港基因有限公司); iMark 型酶标仪 (伯乐生命医学产品上海有限公司); MET-50 型智能恒温加热仪 (天津大学无线电厂); Image-pro-plus6.0 型医学图像分析系统 (美国 Media Cybernetics 公司); T10BS25 型微量匀浆机 (德国 IKA 公司); WD-9405B 型水平摇床, DYY-7C 型电泳仪, DYCZ-40D 型转移槽, DYCZ-24DN 型双垂直蛋白电泳仪, WD-9413B 型凝胶成像系统 (北京六一仪器厂); H-2050R 型超速冷冻离心机 (湖南湘仪公司); ELX-800 型酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); DH36001B 型电热恒温培养箱 (天津泰斯特公司)。

## 2 方法

**2.1 造模、分组及给药** 取 48 只雄性 SD 大鼠, 随机分成 6 组, 分别为正常组, 模型组, 复方丹参滴丸

组, 复方龙脉宁低、中、高剂量组。复方龙脉宁的临床常用量为 0.13 g (生药)  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup>, 参照大鼠灌胃剂量换算方法<sup>[13]</sup>, 将此用量换算成大鼠给药剂量为 0.71 g  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup>, 因此将复方龙脉宁的给药剂量定为低、中、高剂量为 0.36, 0.71, 1.43 g  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup>。以同样的方法换算复方丹参滴丸的给药剂量为 0.0729 g  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup>。每组大鼠连续灌胃给药 7 d, 1 次/d, 正常组和模型组给予等量生理盐水。模型的建立采用药物诱导法, 第 5 ~ 7 天大鼠灌胃 30 min 后, 于大鼠的背部皮下采用多点注射盐酸异丙肾上腺素 (85 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>) 的方法建立心肌梗死动物模型, 以心电图 ST 段抬高值作为造模成功的标准<sup>[14-15]</sup>。

**2.2 HE 染色观察心肌组织病理变化** 第 7 天造模结束 30 min 后, 用 20% 乌来糖溶液以 1.0 g  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> 的剂量进行腹腔麻醉。迅速取出心肌组织, 放入预冷的生理盐水中涮洗以便除去心肌组织中的残留血液, 然后置于装有 10% 甲醛溶液的离心管中固定 24 h, 采用 HE 染色法观察心肌组织的病理学变化情况。

**2.3 ELISA 检测血清 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, NO 的水平** 第 7 天造模结束 30 min 后, 用 20% 乌来糖溶液以 1.0 g  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> 的剂量进行腹腔麻醉。使用采血针于大鼠腹主动脉处取血并低速离心 4 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 分离出血清并转移至干净的 EP 管中保存。根据 ELISA 试剂盒说明书, 检测大鼠血清中 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, NO 的含量。将每孔中加入 40  $\mu$ L 样本稀释液, 再加入对照品或样品 10  $\mu$ L。根据操作步骤依次进行, 最终于 450 nm 处用酶标仪测量吸光度 A, 按照标曲计算样品中各因子的浓度。

**2.4 免疫组化法检测组织中 IKK $\beta$ , I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的含量** 将心肌组织切片, 厚度为 5  $\mu$ m, 用二甲苯浸泡 2 遍, 每次 15 min, 乙醇梯度 (100%, 95%, 85%, 75%, 纯水) 水合。抗原修复后, 在 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中室温孵育 15 min, 滴加正常山羊血清封闭液 (BSA) 孵育 15 min, 滴加 IKK $\beta$  一抗 (1 : 50) 及 I $\kappa$ B $\alpha$  一抗 (1 : 50), 湿盒内 4  $^{\circ}$ C 过夜, 浸泡在 PBS 中 5 min, 重复 3 次。滴加二抗 (1 : 200) 湿盒内 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 浸泡在 PBS 中 5 min, 重复 3 次。取出切片, 滴加 HRP 标记亲和素, 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min。取切片浸泡在 PBS 中 5 min, 重复 3 次。滴加 DAB 显色剂 100  $\mu$ L, 直到显色。浸入苏木素中复染 3 min, 自来水中流水冲洗 2 min, 浸入 1% 盐酸-乙醇中分化 3 s, 立即浸入自来水中, 流水返蓝 20 min。返蓝后脱水、透明、封片。于显微镜下观察染色效果, 400 倍镜下

拍照。利用医学图像分析系统分别测量每张切片的积分吸光度,以此评价 IKK $\beta$ , I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的表达情况。

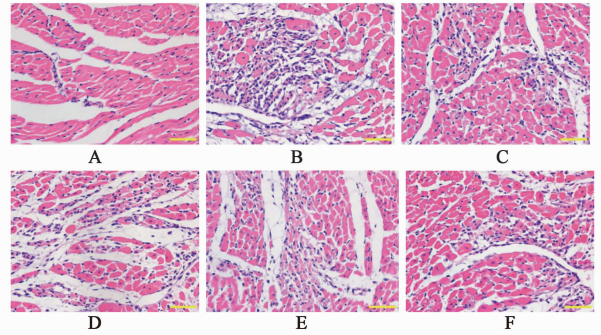
**2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达** 取心肌组织 50 mg, 加入 1 mL 蛋白裂解液, 冰上匀浆, 4  $^{\circ}$ C 离心 12 000 r  $\cdot$  min $^{-1}$  离心 20 min, 取上清, 即得总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度。每孔上样量 20 ~ 40  $\mu$ g 蛋白, 于 10% 和 5% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 中电泳, 停止电泳后, 立刻转印至 PVDF 膜, 转印结束后, 取出膜, 5% 脱脂牛奶封闭液封闭 1 h。加入 TLR4 一抗 (1 : 5 000), MyD88 一抗 (1 : 500), NF- $\kappa$ B p65 一抗 (1 : 500),  $\beta$ -actin 一抗 (1 : 1 000), 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜 5 min。加入二抗 (稀释倍数分别为 1 : 500, 1 : 5 000, 1 : 5 000, 1 : 5 000), 室温下孵育 1.5 h, 洗膜 5 min。加入 ECL 显色液, 用凝胶图象处理系统分析蛋白条带的灰度值, 用目的蛋白和内参蛋白灰度值比值表示蛋白相对表达量。

**2.6 统计学分析** 实验数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间均数比较采用单因素方差分析, 方差齐时, 采用 LSD 检验; 方差不齐时, 采用 Tamhane's  $T_2$  检验, 以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对心肌梗死大鼠组织病理学的影响** 正常组心肌细胞横纹清楚, 染色均匀, 排列有序; 模型组

心肌组织损伤严重, 染色不均匀, 横纹模糊, 排列紊乱, 大量炎性细胞浸润及片状坏死, 细胞核减少; 复方龙脉宁低剂量组可看到较清晰的条纹和较多炎性细胞浸润; 复方丹参滴丸组, 复方龙脉宁中、高剂量组均可使炎性症状均有所减轻。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 复方丹参滴丸组; D. 复方龙脉宁低剂量组; E. 复方龙脉宁中剂量组; F. 复方龙脉宁高剂量组 (图 2~4 同)  
图 1 复方龙脉宁对大鼠心肌组织病理形态学的影响 (HE,  $\times 200$ )  
Fig. 1 Effect of compound Longmaining on histopathological morphology of rat myocardial tissue (HE,  $\times 200$ )

**3.2 对心肌梗死大鼠血清中 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, NO 的影响** 与正常组比较, 模型组中 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, NO 的含量明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 复方丹参滴丸组和复方龙脉宁低、中、高剂量组均能明显降低血清中 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, NO 的含量 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 复方龙脉宁对心肌梗死大鼠血清中 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, NO 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 1 Effect of compound Longmaining on serum levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1 and NO in acute myocardial infarction rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| 组别     | 剂量/g $\cdot$ kg $^{-1}$ | IL-1 $\beta$ /ng $\cdot$ L $^{-1}$ | IL-6/ng $\cdot$ L $^{-1}$        | TNF- $\alpha$ /ng $\cdot$ L $^{-1}$ | MCP-1/ng $\cdot$ L $^{-1}$       | NO/ $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$  |
|--------|-------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 正常     | -                       | 2.258 $\pm$ 0.592                  | 54.706 $\pm$ 1.525               | 142.500 $\pm$ 9.632                 | 4.544 $\pm$ 2.963                | 1.980 $\pm$ 0.786                |
| 模型     | -                       | 8.267 $\pm$ 0.879 <sup>1)</sup>    | 87.353 $\pm$ 6.886 <sup>1)</sup> | 208.438 $\pm$ 10.678 <sup>1)</sup>  | 76.379 $\pm$ 4.660 <sup>1)</sup> | 10.699 $\pm$ 1.118 <sup>1)</sup> |
| 复方丹参滴丸 | 0.0729                  | 5.522 $\pm$ 1.028 <sup>2)</sup>    | 64.265 $\pm$ 4.725 <sup>2)</sup> | 162.500 $\pm$ 7.844 <sup>2)</sup>   | 36.339 $\pm$ 2.496 <sup>2)</sup> | 5.981 $\pm$ 0.774 <sup>2)</sup>  |
| 复方龙脉宁  | 0.36                    | 6.293 $\pm$ 0.935 <sup>2)</sup>    | 67.794 $\pm$ 4.805 <sup>2)</sup> | 176.250 $\pm$ 8.458 <sup>2)</sup>   | 49.545 $\pm$ 5.082 <sup>2)</sup> | 7.007 $\pm$ 1.070 <sup>2)</sup>  |
|        | 0.71                    | 5.524 $\pm$ 0.845 <sup>2)</sup>    | 62.941 $\pm$ 3.877 <sup>2)</sup> | 164.375 $\pm$ 6.250 <sup>2)</sup>   | 34.791 $\pm$ 4.097 <sup>2)</sup> | 4.189 $\pm$ 0.713 <sup>2)</sup>  |
|        | 1.43                    | 3.391 $\pm$ 0.529 <sup>2)</sup>    | 58.171 $\pm$ 2.606 <sup>2)</sup> | 155.000 $\pm$ 4.816 <sup>2)</sup>   | 15.656 $\pm$ 4.959 <sup>2)</sup> | 2.258 $\pm$ 0.886 <sup>2)</sup>  |

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

**3.3 对心肌梗死大鼠心肌组织中 IKK $\beta$ , I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的影响** 与正常组比较, 模型组中 IKK $\beta$  蛋白表达水平显著上升, I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达水平明显下降 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 复方丹参滴丸组和复方龙脉宁低、中、高剂量组均能明显降低 IKK $\beta$  蛋白的表达

水平 ( $P < 0.05$ ), 均能明显升高 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的表达 ( $P < 0.05$ )。见图 2, 3, 表 2。

**3.4 对心肌梗死大鼠心肌组织中 TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 蛋白的影响** 与正常组比较, 模型组中 TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平明显上升

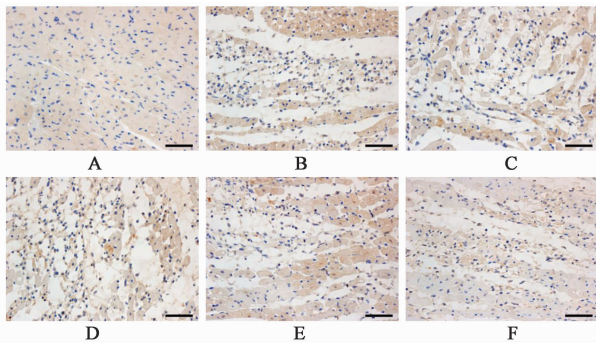


图 2 复方龙脉宁预处理对急性心肌梗死大鼠心肌组织 IKKβ 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 2 Effect of pretreatment with compound Longmaning on expression of IKKβ protein in myocardium of rats with acute myocardial infarction(IHC, ×400)

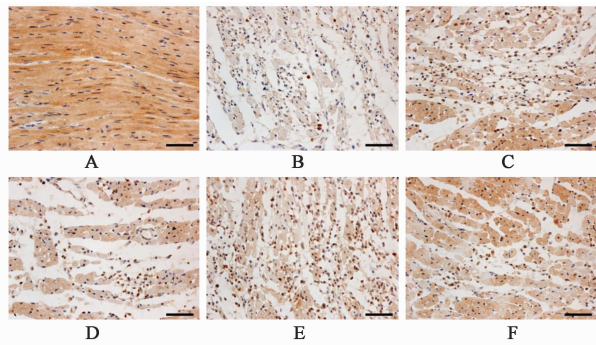


图 3 复方龙脉宁预处理对急性心肌梗死大鼠心肌组织 IκBα 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of pretreatment with compound Longmaning on expression of IκBα protein in myocardium of rats with acute myocardial infarction(IHC, ×400)

表 2 复方龙脉宁对大鼠 IKKβ 和 IκBα 蛋白表达量的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

Table 2 Effect of compound Longmaning on expression of IκBα and IKKβ proteins( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

| 组别     | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | IKKβ                            | IκBα                            |
|--------|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 正常     | -                     | 0.000 7 ± 0.000 5               | 0.157 6 ± 0.043 2               |
| 模型     | -                     | 0.025 9 ± 0.004 5 <sup>1)</sup> | 0.042 9 ± 0.002 9 <sup>1)</sup> |
| 复方丹参滴丸 | 0.072 9               | 0.013 3 ± 0.005 6 <sup>2)</sup> | 0.082 7 ± 0.011 1 <sup>2)</sup> |
| 复方龙脉宁  | 0.36                  | 0.017 3 ± 0.001 4 <sup>2)</sup> | 0.053 0 ± 0.007 2 <sup>2)</sup> |
|        | 0.71                  | 0.013 1 ± 0.005 8 <sup>2)</sup> | 0.064 3 ± 0.011 6 <sup>2)</sup> |
|        | 1.43                  | 0.008 0 ± 0.001 1 <sup>2)</sup> | 0.092 0 ± 0.009 8 <sup>2)</sup> |

( $P < 0.05$ );与模型组比较复方丹参滴丸组和复方龙脉宁低、中、高剂量组均能明显降低 TLR4, MyD88, NF-κB p65 蛋白表达水平( $P < 0.05$ )。见图 4, 表 3。

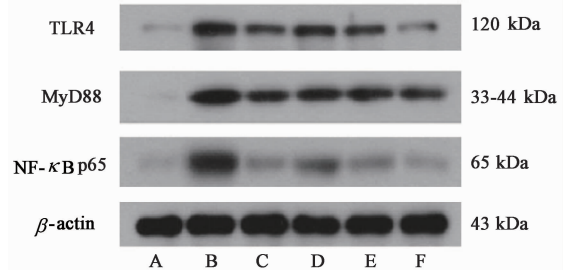


图 4 大鼠 TLR4, MyD88, NF-κB p65 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of TLR4, MyD88, NF-κB p65 proteins in rats

表 3 复方龙脉宁对大鼠 TLR4, MyD88, NF-κB p65 蛋白的表达的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

Table 3 Effect of compound Longmaning on TLR4, MyD88 and NF-κB p65 protein expressions( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

| 组别     | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | TLR4/β-actin               | MyD88/β-actin              | NF-κB p65/β-actin          |
|--------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 正常     | -                     | 1.00                       | 1.00                       | 1.00                       |
| 模型     | -                     | 8.71 ± 0.46 <sup>1)</sup>  | 13.73 ± 0.84 <sup>1)</sup> | 3.84 ± 0.31 <sup>1)</sup>  |
| 复方丹参滴丸 | 0.072 9               | 4.65 ± 0.181 <sup>2)</sup> | 7.52 ± 0.65 <sup>2)</sup>  | 1.74 ± 0.28 <sup>2)</sup>  |
| 复方龙脉宁  | 0.36                  | 7.17 ± 0.70 <sup>2)</sup>  | 11.43 ± 0.44 <sup>2)</sup> | 2.48 ± 0.51 <sup>2)</sup>  |
|        | 0.71                  | 5.32 ± 0.37 <sup>2)</sup>  | 9.57 ± 0.90 <sup>2)</sup>  | 2.23 ± 0.44 <sup>2)</sup>  |
|        | 1.43                  | 3.41 ± 0.70 <sup>2)</sup>  | 5.85 ± 0.81 <sup>2)</sup>  | 1.38 ± 0.084 <sup>2)</sup> |

#### 4 讨论

复方龙脉宁方为临床验方,本方君药葛根为太阳阳明“解肌”之药,研究表明其能扩张冠脉,缓解血管高压,改善心律失常,改善心肌缺血<sup>[16]</sup>;川芎为臣药是血中之“气药”,药理研究表明其可扩张冠状动脉、抗心肌缺血,抗心肌炎、抗心肌肥厚<sup>[17-18]</sup>。葛根-川芎常配伍使用,既可治血,又能治气,有改善

心血管病变的作用。穿山龙为佐药,具有扩张冠状动脉、抗炎、抗动脉硬化等作用<sup>[19]</sup>;蜂胶为使药,含黄酮和萜烯类化合物,具有抗菌消炎、活血化瘀等作用<sup>[20]</sup>。本方葛根-川芎 2 味药佐以穿山龙和蜂胶,针对心血管疾病的病因、病机、症状的不同环节发挥综合疗效,同起通络活血,化瘀解毒之功。

心肌梗死造成心肌长时间缺氧缺血以及三磷酸

腺苷(ATP)供应下降,使心肌细胞凋亡和坏死,机体会激活自身免疫系统来清除坏死细胞,从而引起剧烈的炎症反应<sup>[21-24]</sup>。研究表明 TLR/MyD88/NF- $\kappa$ B 是关键的炎症反应下游信号通路。TLRs 在人类天然免疫系统中起重要作用<sup>[25]</sup>,心肌梗死后会激活除 TLR3 以外的其他 TLR,被激活的 TLR 通过 MyD88 依赖性通路进行信号传导,进而介导机体产生炎症损伤,促进炎症介质的产生和释放<sup>[26-27]</sup>。NF- $\kappa$ B 为转录因子蛋白家族的成员<sup>[28]</sup>,可以调控多种炎症介质、生长因子和受体的表达,包括 IL-6, IL-1, IL-2R, TNF- $\alpha$ , MCP-1, TCR 和 ICAM-1 等,部分蛋白和因子又能活化 NF- $\kappa$ B,形成正反馈效应,导致 NF- $\kappa$ B 持续活化,加重炎症反应<sup>[29]</sup>。研究表明,高浓度 NO 可以活化 NF- $\kappa$ B 信号通路,诱导促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  和 IL-6 等的产生和释放,这些因子水平的高低与心衰严重程度密切相关<sup>[30]</sup>。TLR, NF- $\kappa$ B 的激活剂是病原体衍生分子脂多糖(LPS)以及炎症细胞因子(如 TNF- $\alpha$ , IL-1 等)<sup>[31]</sup>。TLR 被 LPS 激活后进一步作用于 MyD88 继而激活 IL-1 相关受体激酶-1,4 及肿瘤坏死因子相关受体-6 等导致 NF- $\kappa$ B 上游的 I $\kappa$ B 激酶复合物(IKK)磷酸化,从而引起 NF- $\kappa$ B 抑制亚基(I $\kappa$ B)解离和降解,使 NF- $\kappa$ B 发生磷酸化反应,活化 NF- $\kappa$ B,促进炎症因子的产生和释放<sup>[32-35]</sup>。

本研究发现复方龙脉宁能显著改善大鼠心肌损伤和炎细胞浸润,能不同程度的降低 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, NO 在血清中的浓度,升高心肌组织中 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的表达水平,降低心肌组织中 IKK $\beta$ , TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达水平。因此,复方龙脉宁能有效抑制 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B p65 信号通路和相关炎症因子,对 AMI 起到良好的保护作用。

[参考文献]

[1] 胡佳,杨杭燕,刘清海,等. 中医药治疗急性心肌梗死的研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(3): 171-173.

[2] CHEN G, LI J L, SONG M C, et al. A mixed component supramolecular hydrogel to improve mice cardiac function and alleviate ventricular remodeling after acute myocardial infarction [J]. Adv Funct Mater, 2017, 27(34):1701798.

[3] 贾杰,周瑛,韦中奎. 中药治疗心血管疾病研究概况[J]. 北方药学, 2014, 11(2): 63-64.

[4] 董林娟, 张文娟, 刘诗雨, 等. 龙脉宁方中葛根素在心

肌缺血大鼠体内药动学-药效学相关性研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(8): 1535-1540.

[5] 王昌利,王莎,史亚军,等. 复方龙脉宁不同配比药理学实验研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(7): 7-11.

[6] 马海芳. 复方龙脉宁标准汤剂的研究[D]. 咸阳: 陕西中医药大学, 2015.

[7] 张文娟,董林娟,宋道,等. 复方龙脉宁提取液对小鼠急性心肌缺血缺氧损伤的保护作用[J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(5): 618-622.

[8] 孙旭晖,何正飞,余健. 瑞舒伐他汀对急性心肌梗死患者 MMP-9、炎症因子、血脂水平及心功能的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(5): 66-68.

[9] 方芳,甘受益,冯光瑞,等. 长期服用复方丹参滴丸对老年急性心肌梗死患者 PCI 术后左心室重构及炎症因子水平的影响[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(3): 544-546, 566.

[10] 潘洁丽, 邦国焯, 王萌. 中药制剂复方丹参滴丸对急性心肌梗死患者体内核因子- $\kappa$ B p65 介导的炎症反应的影响[J]. 药物生物技术, 2017, 24(2): 120-123.

[11] 范金斌, 李军, 朱丹. 血清 Mb, cTnI 及炎症因子 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  检测对急性心肌梗死的临床诊断意义[J]. 实验与检验医学, 2017, 35(5): 724-727.

[12] 徐玲, 许朝祥, 蔡银链. Toll 样受体 3 信号通路介导自身免疫性心肌炎炎症反应及作用机制[J]. 免疫学杂志, 2017, 33(8): 655-660.

[13] 章元沛. 药理学实验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 238.

[14] 吴广均, 张云. Langendorff 法、冠脉结扎法及 ISO 诱导心肌缺血模型的比较[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(22): 2849-2851.

[15] HUANG H, GENG Q, YAO H, et al. Protective effect of scutellarin on myocardial infarction induced by isoprenaline in rats [J]. Iran J Basic Med Sci, 2018, 21(3): 267-276.

[16] 楚纪明, 马树运, 李海峰, 等. 葛根有效成分及其药理作用研究进展[J]. 食品与药品, 2015, 17(2): 142-146.

[17] 罗仁书, 何治勇. 川芎有效成分药理作用的研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析, 2018, 18(9): 1294-1296.

[18] 姜宇懋, 王丹巧. 川芎嗪药理作用研究进展[J]. 中国现代中药, 2016, 18(10): 1364-1370.

[19] 张宁, 于栋华, 周琦, 等. 穿山龙药理作用的研究进展[J]. 中国药房, 2015, 26(4): 547-550.

[20] 金平, 张宇, 王会, 等. 蜂胶的化学成分及药理作用[J]. 吉林中医药, 2018, 38(4): 432-434.

[21] Prabhu S D, Frangogiannis N G. The biological basis for

- cardiac repair after myocardial infarction: from inflammation to fibrosis[J]. *Circul Res*, 2016, 119(1): 91-112.
- [22] 胡珍,陈景瑞,魏静,等. 冠状动脉结扎制备大鼠心肌梗死模型及评价实验研究[J]. *天津中医药*, 2016, 33(2): 90-95.
- [23] 齐翌婷,但家立,晁晶,等. 超声心动图对慢性心功能衰竭患者的左心功能评价的价值[J]. *医学影像学杂志*, 2017, 27(8): 1592-1594.
- [24] 贺忠梅,张红霞,杨敏,等. 小鼠心肌梗死后补体系统激活与炎症反应的相关性研究[J]. *心肺血管病杂志*, 2014, 33(1): 98-102.
- [25] 孙丹丹,吴玉鹏,杨军,等. Toll 样受体-4 基因启动子区多态性与急性心肌梗死发病风险的关系[J]. *山东医药*, 2017, 57(17): 17-20.
- [26] 刁爱芹,王卉,潘爱萍,等. 大豆异黄酮下调 TLR4/MyD88 介导的信号通路保护心肌肥厚的作用机制[J]. *重庆医学*, 2018, 47(20): 2659-2662.
- [27] 李年忠. LPS 诱导下池蝶蚌免疫相关基因 LBP、TLR4、MyD88 和 AP-1 的表达分析以及 TLR4 和 MyD88 互作关系[D]. 南昌:南昌大学, 2018.
- [28] 刘振华,王世军. 调营养心汤治疗亚健康失眠及对血清核转录因子- $\kappa$ B, 炎症因子的作用研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(6): 177-180.
- [29] 赵运旺. NF- $\kappa$ B 信号通路研究进展[J]. *甘肃科技*, 2016, 32(21): 117-123, 112.
- [30] 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.
- [31] 李叶静,谈弋. 紫草素通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路抑制由脂多糖诱导的巨噬细胞炎症研究[J]. *安徽医药*, 2017, 21(8): 1384-1387.
- [32] 陈涛,陈文江,陈灿. NF- $\kappa$ B 信号通路心肌梗死关系的研究进展[J]. *现代医药卫生*, 2017, 33(5): 707-709.
- [33] 崔艳,曹小平. 核转录因子- $\kappa$ B 的研究进展[J]. *川北医学院学报*, 2014, 29(5): 510-513.
- [34] 朱雪坤,杨日芳,孟艳秋. Toll 样受体 4 配体的研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2016, 30(4): 389-396.
- [35] 杨燕燕,王训立. TLR4 信号通路在中药抗动脉粥样硬化中的研究进展[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2017, 23(1): 144-147.

[责任编辑 孙丛丛]