

“柴胡三参胶囊”预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其与 MLK3-p38 MAPK-NLRP3 信号通路的关系

杨成龙^{1,2} 何涛^{1,2} 刘建和^{1,2} 杨耀闯^{1,2} 卢圣花^{1,2} 张杼惠^{1,2} 曹蛟² 冯君^{1,2}

(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙410007;

2.国家中医心血管病临床医学研究中心分中心,湖南长沙410007)

摘要 目的:探讨柴胡三参胶囊通过MLK3-p38 MAPK-NLRP3信号通路减轻炎症反应对心肌缺血再灌注损伤(MIRI)大鼠心脏的保护作用。方法:将72只SD雄性大鼠随机分为假手术组、模型组、地尔硫卓组(每日给药量:51 mg/kg)及柴胡三参胶囊低、中、高剂量组(每日给药量:216、432、864 mg/kg),每组12只。各给药组灌胃给予相应药液,假手术组、模型组灌胃等体积生理盐水,均每日1次,连续7d。预处理结束后,除假手术组外,其余各组大鼠采用结扎冠状动脉左前降支并再灌注的方法建立MIRI模型,再灌注结束后立即取血、取全心,假手术组只穿线,不结扎。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测每组6只大鼠血清肌酸激酶同工酶(CK-MB)、心肌肌钙蛋白I(cTnI)含量,苏木素-伊红(HE)染色法观察每组3只大鼠心肌组织病理变化,2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法观察每组5只大鼠心肌梗死范围,蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测每组3只大鼠心肌组织中混合谱系酶3(MLK3)、p38丝裂原激活蛋白激酶(p38 MAPK)、NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)蛋白表达水平。结果:模型组大鼠血清CK-MB、cTnI含量显著高于假手术组($P<0.01$),心肌细胞排列紊乱、肥大大肿,心肌梗死面积占比明显大于假手术组($P<0.01$),缺血区心肌组织炎症相关蛋白MLK3、p38 MAPK、NLRP3、IL-1 β 的表达均显著高于假手术组($P<0.01$, $P<0.05$)。各给药组大鼠血清CK-MB、cTnI水平均显著低于模型组($P<0.01$);柴胡三参胶囊中、高剂量组与地尔硫卓组大鼠血清CK-MB、cTnI水平显著低于柴胡三参胶囊低剂量组($P<0.01$),而此3组大鼠上述指标组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。柴胡三参胶囊中、高剂量组及地尔硫卓组大鼠心肌细胞排列较整齐,心肌细胞水肿范围少于模型组,其中以柴胡三参胶囊高剂量组及地尔硫卓组改善最明显。柴胡三参胶囊中、高剂量组与地尔硫卓组大鼠心肌梗死面积占比明显低于模型组($P<0.01$),3组大鼠心肌梗死面积占比组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),柴胡三参胶囊中剂量组、地尔硫卓组大鼠心肌梗死面积占比明显低于低剂量组($P<0.01$)。柴胡三参胶囊中、高剂量组及地尔硫卓组大鼠心肌组织MLK3、p38 MAPK、NLRP3、IL-1 β 蛋白表达水平明显低于模型组和柴胡三参胶囊低剂量组($P<0.01$),其中地尔硫卓组MLK3蛋白表达明显低于柴胡三参胶囊高剂量组($P<0.05$),NLRP3蛋白表达明显低于柴胡三参胶囊中、高剂量组($P<0.01$)。结论:柴胡三参胶囊中、高剂量预处理可减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤,其可能通过MLK3-p38 MAPK-NLRP3信号通路减轻炎症反应实现对MIRI模型大鼠的心肌保护作用。

关键词 急性心肌梗死;柴胡三参胶囊;心肌缺血再灌注损伤;炎症;混合谱系酶3;p38丝裂原激活蛋白激酶;NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3

基金项目 湖南省自然科学基金青年基金项目(2021JJ40419);湖南省教育厅科学研究项目(21A0234);湖南省卫生健康委员会科研课题项目(202116001377);湖南省中医药管理局科研课题项目(B2023019);湖南省研究生科研创新项目(CX20210694)

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是目前导致人类死亡的主要原因之一,其发病率和死亡率逐年上升,给社会造成沉重的经济负担。包括经皮冠状动脉介入(PCI)治疗、冠状动脉旁路移植(CABG)术在内的再灌注策略治疗是其核心治疗措施^[1]。然而,再灌注可能会导致心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)^[2],从而引起心脏功能障碍以及心肌细胞的不可逆损

伤。因此,减轻MIRI是心血管领域亟需解决的问题之一。近年来的研究表明,MIRI的严重程度与炎症反应相关,通过抑制炎症反应可维持心肌稳态,从而减轻MIRI^[3]。盐酸地尔硫卓片能够纠正能量代谢,减少氧化应激,于心肌缺血再灌注后保护心肌细胞^[4],故本研究选其作为阳性对照药物。

柴胡三参胶囊由《伤寒论》之小柴胡汤化裁而来,为湖南中医药大学第一附属医院院内制剂。课

题组前期研究发现,本方可通过减少心肌组织活性氧(ROS)水平,抑制心肌细胞焦亡,并降低血清白细胞介素(IL)-18、IL-1 β 等炎症因子水平而发挥抗MIRI作用^[5]。p38丝裂原激活蛋白激酶(p38 mitogen activated protein kinases, p38 MAPK)是混合谱系酶3(mixed lineage kinase 3, MLK3)信号转导的重要下游介质,通过p38 MAPK信号转导可激活核因子- κ B(NF- κ B)表达诱导炎症的产生^[6]。有学者研究发现,阻断p38 MAPK信号转导可显著降低体内NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor heat protein domain-associated protein 3, NLRP3)炎性小体和IL-1 β 的表达,从而减轻炎症进程^[7]。本研究构建大鼠MIRI模型,观察柴胡三参胶囊预处理对MIRI模型大鼠心肌损伤程度及缺血心肌组织炎症蛋白MLK3、p38 MAPK、NLRP3的影响,探讨柴胡三参胶囊是否通过干预MLK3-p38 MAPK-NLRP3信号通路改善大鼠MIRI。

1 实验材料

1.1 实验动物 SPF级雄性SD大鼠72只,体重(220 $\pm$ 20)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SYXK(湘)2019-0009。饲养于湖南中医药大学动物实验中心,饲养温度为21~25℃,相对湿度58%~62%,自由饮水及进食,昼夜光照交替12h。本实验经湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准(LL2021092803)。

1.2 实验药品 柴胡三参胶囊由柴胡、黄连、丹参、苦参、党参、法半夏、青蒿、生甘草组成,药物剂量比为15:6:10:10:15:10:10:6,由湖南中医药大学第一附属医院制剂室提供。使用生理盐水将胶囊内容物溶解,分别制成32.4、64.8、129.6 mg/mL的灌胃液。盐酸地尔硫卓片由天津田边制药有限公司生产,规格:30 mg/片,批准文号:国药准字H19990388,用生理盐水溶解制成7.65 mg/mL的灌胃液。

1.3 主要试剂 高效放射免疫沉淀法(RIPA)组织快速裂解液(SL1020,北京酷来搏科技有限公司),蛋白酶抑制剂混合液(GRF101,上海雅酶生物科技有限公司),BCA蛋白定量试剂盒(BL521A,北京兰杰柯科技有限公司),5 $\times$ SDS-PAGE上样缓冲液(BL502B,北京兰杰柯科技有限公司),PVDF膜(IPV00010,美国Millipore公司),脱脂奶粉(A800889-0250,上海生工生物工程有限公司),增强化学发光(ECL)显色液(GE2301,北京鼎国昌盛生物技术有限公司),兔抗MLK3单克隆抗体(11996-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司),兔抗p38 MAPK单克隆抗体(CY5488,上海Abways公司),兔抗NLRP3多克隆抗体(CY5651,上海Abways公司),兔抗 β -actin多克隆抗

体(AB0035,上海Abways公司),山羊抗兔IgG(H+L)HRP(AB0101,上海Abways公司)。

1.4 主要仪器 小型动物呼吸机(RWD407,深圳市瑞沃德生命科技有限公司),数字心电图机(ECG-2303B,广州市三锐电子科技有限公司),多功能酶标仪(Cytation3,美国BioTek仪器有限公司),电泳仪(DYY-6C,美国BIO-RAD公司),转膜仪(DYCZ-40D,美国BIO-RAD公司),凝胶成像分析系统(Chemi Doc XRS+,美国BIO-RAD公司),石蜡切片机(HM325,美国Thermo Scientific公司),电脑生物组织包埋机(KD-BM II,浙江省金华市科迪仪器设备有限公司),电子显微镜(日本Nikon公司)。

2 实验方法

2.1 分组与给药 将大鼠随机分为假手术组、模型组、地尔硫卓组以及柴胡三参胶囊低、中、高剂量组,每组12只。大鼠灌胃给药剂量根据人与动物体表面积进行换算^[8]。柴胡三参胶囊低、中、高剂量组分别灌胃给予柴胡三参胶囊溶液216、432、864 mg/(kg $\cdot$ d),地尔硫卓组灌胃给予盐酸地尔硫卓药液51 mg/(kg $\cdot$ d),假手术组及模型组灌胃等体积生理盐水,每只大鼠灌胃药液体积2 mL(以大鼠体重300 g计算)。各组大鼠均每日灌胃1次,连续灌胃1周。

2.2 造模 参照本团队前期实验进行模型制备^[9-10]。大鼠造模前一晚禁食,自由饮水。末次灌胃30 min后,腹腔注射10 mg/kg戊巴比妥钠麻醉大鼠,取仰卧位,固定四肢及颈部,用数字心电图机记录大鼠II导联心电图,颈部、胸前区剃毛,从正中中线小心剪开颈部皮肤约1 cm,逐层钝性剥离颈部肌肉,直至暴露气管;用无菌刀片横向切开气管,并迅速连接小型动物呼吸机,调整呼吸机至适当频率;于胸骨左缘旁开0.5~1 cm处纵行剪开皮肤,逐层钝性分离两侧肌肉,直至暴露胸骨;沿胸骨左缘第3~4肋间打开胸腔,暴露心脏,小心剥离心包膜,找到左心耳,从左心耳下方的冠状动脉左前降支处用无菌缝合线结扎左前降支。当大鼠II导联心电图ST段呈进行性弓背向上抬高,T波直立高尖,结扎线以下心脏表面颜色变暗,则提示心肌梗死模型构建成功。结扎30 min后行再灌注处理90 min,再灌注后心电图ST段回落>50%,提示MIRI模型建立成功。再灌注结束后立即取血,取全心。假手术组只穿线,不结扎,全程记录II导联心电图。

2.3 观察指标

2.3.1 血清肌酸激酶同工酶(CK-MB)、心肌肌钙蛋白I(cTnI)含量 每组取6只大鼠腹主动脉血,将采血管室温静置30 min,4℃、离心半径10 cm、3000 r/min离心15 min,小心吸取上清液,按照酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒说明书操作,检测各组大鼠血清CK-MB、cTnI含量。

2.3.2 心脏病理形态 每组取3只大鼠全心,用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗2~3遍,置于4%多聚甲醛溶液30 mL中固定,梯度脱水,二甲苯透明,滤纸吸水,石蜡包埋,均匀切片,脱蜡处理,乙醇脱水,苏木精-伊红(HE)染色,二甲苯透明,封片,最后于光学显微镜下观察各组大鼠心肌组织的病理形态。

2.3.3 心肌梗死面积 每组取5只大鼠心脏,用预冷的PBS缓冲液由内至外清洗2~3遍,装入10 mL离心管置于-20℃冰箱冷冻30 min,取出后于冰上沿垂直于心尖与心底连线方向进行切片,切弃心尖,每片厚度约2 mm,共切取心肌组织5片,置于含有1% 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)缓冲液的37℃水浴箱中避光孵育20 min,随后取出切片,置于10%甲醛溶液中固定24 h,用高清单反相机进行拍照。运用Image Pro Plus软件计算梗死面积及心脏切片总面积,并计算心肌梗死面积占比(百分率)。

2.3.4 心肌组织炎症相关蛋白表达 使用蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测各组大鼠心肌组织炎症相关蛋白表达。模型组及各给药组分别取3只大鼠的适量缺血区心肌组织,假手术组取3只大鼠冠状动脉左前降支附近的心肌组织,加入适量RIPA裂解液及蛋白酶抑制剂(100:1)进行匀浆,离心取上清,BCA蛋白定量法测定各组心肌组织蛋白浓度。根据标准曲线统一各组蛋白浓度,按一定比例加入SDS-PAGE上样缓冲液,蛋白灭活,配制10%分离胶及5%浓缩胶,上样,先于80 V恒压条件下电泳30 min,再以120 V恒压电泳90 min;200 mA恒流湿转2 h,转膜完毕后用5%脱脂牛奶封闭1 h,并于摇床上摇晃;TBST洗脱3次,在相应蛋白分子量范围内分别孵育MLK3(1:1000)、p38 MAPK(1:2000)、NLRP3(1:2000)、IL-1 β (1:2000)及 β -actin(1:20 000)抗体,4℃孵育过夜;次日取出条带后再用TBST洗涤3次,每次10 min,于室温下孵育山羊抗兔Ig G(H+L)HRP(1:20 000)1 h, TBST清洗3次,每次5 min;在目的条带中滴加ECL显色液,置于Chemi Doc XRS+凝胶成像分析仪上显影,保存图像,用Image J软件分析各条带灰度值。

2.4 统计学方法 采用Graph Pad Prism 8软件对数据进行统计学分析。正态性检验采用Shapiro-Wilk检验,本研究所有计量资料均符合正态分布,以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比

较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠血清CK-MB、cTnI含量比较 模型组大鼠血清CK-MB、cTnI含量明显高于假手术组($P < 0.01$);各给药组大鼠上述指标均明显低于模型组($P < 0.01$)。各给药组之间的统计学比较结果显示:柴胡三参胶囊中、高剂量组及地尔硫卓组大鼠上述指标均显著低于柴胡三参胶囊低剂量组($P < 0.01$),而此3组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

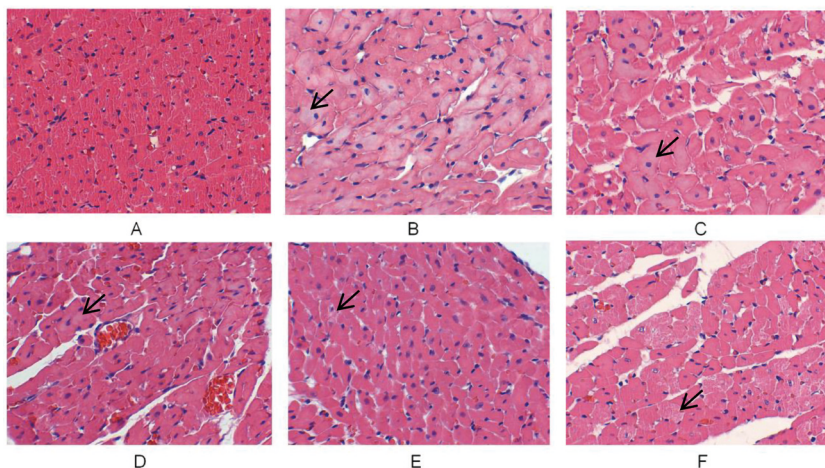
表1 各组大鼠血清CK-MB、cTnI含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	CK-MB/(ng/mL)	cTnI/(ng/L)
假手术组	6	0.81 $\pm$ 0.12	78.23 $\pm$ 5.90
模型组	6	4.94 $\pm$ 0.30**	288.26 $\pm$ 24.95**
柴胡三参胶囊低剂量组	6	4.28 $\pm$ 0.22##	177.75 $\pm$ 22.35##
柴胡三参胶囊中剂量组	6	1.94 $\pm$ 0.35###	136.64 $\pm$ 8.86###
柴胡三参胶囊高剂量组	6	1.73 $\pm$ 0.15###	114.40 $\pm$ 6.94###
地尔硫卓组	6	1.67 $\pm$ 0.23###	128.00 $\pm$ 15.76###

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;

与柴胡三参胶囊低剂量组比较,### $P < 0.01$ 。

3.2 各组大鼠心肌组织病理形态比较 见图1。假手术组大鼠心肌细胞排列整齐,细胞结构完整,肌纤维走行有序,细胞间质未见充血水肿及坏死;与假手术组相比,模型组大鼠心肌细胞排列杂乱,细胞核大小不一,心肌纤维走行紊乱,镜下可见大量细胞肥大及水肿变性(如图1-B箭头所示);柴胡三参胶囊低剂量组大鼠梗死区域心肌组织损伤程度与模型组比较无明显改善(如图1-C箭头所示);柴胡三参胶囊中、高剂量组大鼠缺血区心肌组织较模型组改善,细胞排列较整齐,细胞水肿减轻(如图1-D、E箭头所示),其中高剂量组较中剂量组损伤程度更轻;地尔硫卓组大鼠缺血区心肌组织水肿较模型组明显减轻(如图1-F箭头所示),细胞排列相对整齐,心肌细胞无明显坏死。



注:A.假手术组;B.模型组;C.柴胡三参胶囊低剂量组;D.柴胡三参胶囊中剂量组;E.柴胡三参胶囊高剂量组;F.地尔硫卓组。

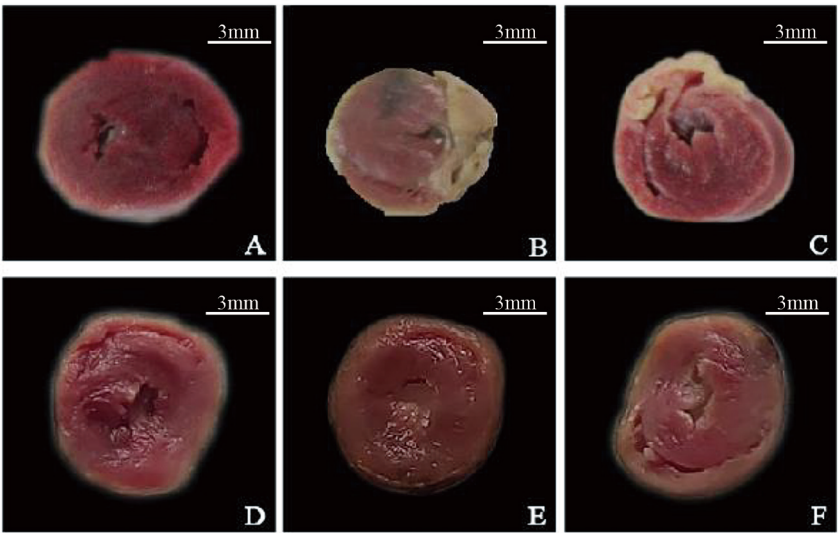
图1 各组大鼠心肌组织病理形态(HE染色, $\times 400$)

3.3 各组大鼠心肌梗死面积比较 假手术组大鼠心肌组织无明显梗死,模型组大鼠心肌组织梗死区域较假手术组显著增加,各给药组大鼠心肌组织梗死区域较模型组有不同程度减少,见图2。模型组大鼠心肌梗死面积占比明显高于假手术组 ($P<0.01$);柴胡三参胶囊中、高剂量组及地尔硫卓组大鼠心肌梗死面积占比明显低于模型组 ($P<0.01$)。各给药组之间比较,柴胡三参胶囊中剂量组、地尔硫卓组大鼠心肌梗死面积占比明显低于柴胡三参胶囊低剂量组 ($P<0.01$),柴胡三参胶囊中、高剂量组与地尔硫卓组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表2。

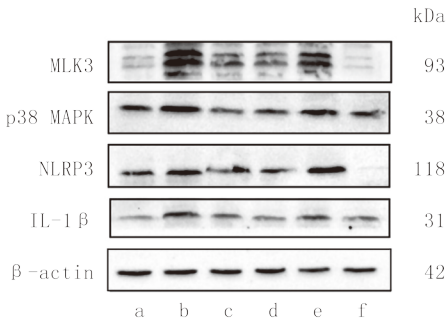
表2 各组大鼠心肌梗死面积占比比较 ($\bar{x}\pm s$)		
组别	动物数/只	心肌梗死面积占比/%
假手术组	5	1.08±1.10
模型组	5	20.96±4.01**
柴胡三参胶囊低剂量组	5	14.41±1.57
柴胡三参胶囊中剂量组	5	7.26±2.76###
柴胡三参胶囊高剂量组	5	9.74±3.19##
地尔硫卓组	5	7.49±1.50###

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,### $P<0.01$;与柴胡三参胶囊低剂量组比较,&& $P<0.01$ 。

3.4 各组大鼠心肌组织炎症相关蛋白表达比较 模型组大鼠缺血区心肌组织MLK3、p38 MAPK、NLRP3、IL-1 β 蛋白表达均明显高于假手术组 ($P<0.01$, $P<0.05$);柴胡三参胶囊低剂量组大鼠上述蛋白表达与模型组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$);柴胡三参胶囊中、高剂量组与地尔硫卓组大鼠缺血区心肌组织上述蛋白表达明显低于模型组和柴胡三参胶囊低剂量组 ($P<0.01$, $P<0.05$)。地尔硫卓组MLK3蛋白表达显著低于柴胡三参胶囊高剂量组 ($P<0.05$),NLRP3蛋白表达显著低于柴胡三参胶囊中、高剂量组 ($P<0.01$)。见图3、表3。



注:A.假手术组;B.模型组;C.柴胡三参胶囊低剂量组;D.柴胡三参胶囊中剂量组;E.柴胡三参胶囊高剂量组;F.地尔硫卓组。
图2 各组大鼠心肌梗死程度(TTC染色)



注:a.假手术组;b.模型组;c.柴胡三参胶囊高剂量组;d.柴胡三参胶囊中剂量组;e.柴胡三参胶囊低剂量组;f.地尔硫卓组。
图3 各组大鼠心肌组织MLK3、p38 MAPK、NLRP3、IL-1 β 蛋白电泳图

表3 各组大鼠心肌组织MLK3、p38 MAPK、NLRP3、IL-1 β 相对蛋白表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)					
组别	动物数/只	MLK3	p38 MAPK	NLRP3	IL-1 β
假手术组	3	0.48±0.07	0.75±0.10	0.68±0.14	0.30±0.15
模型组	3	1.35±0.14**	1.28±0.20*	1.33±0.20**	1.08±0.18**
柴胡三参胶囊低剂量组	3	1.34±0.14	1.18±0.19	1.33±0.19	0.76±0.18
柴胡三参胶囊中剂量组	3	0.73±0.08###	0.65±0.14###	0.78±0.01### $\Delta\Delta$	0.43±0.15###
柴胡三参胶囊高剂量组	3	0.83±0.15### Δ	0.67±0.17###	0.90±0.09###	0.52±0.16###
地尔硫卓组	3	0.42±0.11###	0.57±0.11###	0.19±0.05###	0.29±0.08###

注:与假手术组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.05$,### $P<0.01$;与柴胡三参胶囊低剂量组比较,&& $P<0.01$;与地尔硫卓组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

4 讨论

血管再通是心肌梗死的首要治疗措施,主要通过恢复冠脉血流以挽救濒死心肌,从而挽救患者生命^[1],但随着血管再通,其导致的缺血再灌注损伤可能导致再灌注性心律失常、心力衰竭等并发症^[12],并

能够引起心肌组织病理损伤、心肌梗死面积增加及心肌损伤标记物CK-MB、cTnI的释放^[13]。目前普遍认为MIRI的病理生理机制包括氧化应激、炎症反应、心肌负荷过重、线粒体功能障碍、血小板聚集、白细胞黏附和活化、自噬功能障碍、钙超载以及活性氧产生过多等^[14-15]。

柴胡三参胶囊针对气滞血瘀痰阻之病机而立,具有疏肝行气、化痰活血之功效。方中以柴胡为君药,疏泄肝气、调畅气机,黄连为臣,清泄少阳之邪,二药配伍,具疏泄和解之功;以党参健脾益气,助血液运行,丹参活血化瘀,法半夏下气化痰,奏行气活血化痰之效,三者亦为臣药;佐以青蒿截少阳之疟,苦参泻少阳之火,共助柴胡和解少阳;生甘草补脾益气、调和诸药为使。

现代药理学研究发现:柴胡皂苷D可降低H₂O₂诱导的H9c2心肌细胞的氧化应激,发挥保护受损心肌的作用^[16];黄连素在糖氧剥夺诱导的H9c2心肌细胞损伤过程中发挥保护作用^[17];丹参有效成分丹参酮II A预处理可有效减少MIRI后心肌梗死面积,抑制线粒体通透性,从而对心肌组织发挥保护作用^[18];甘草有效成分甘草素可通过抗氧化、抗炎和抗凋亡作用发挥抗MIRI功效^[19];党参水溶液有助于减轻MIRI后家兔细胞内钙超载,进而保护受损心肌^[20];苦参提取物可减轻缺血再灌注大鼠心肌氧化损伤^[21];经姜半夏预处理的MIRI模型大鼠血清乳酸脱氢酶、心肌酶含量较模型组有所降低,梗死范围缩小,心肌线粒体超微结构得到改善^[22]。

MLK3是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,与炎症、氧化应激等密切相关,在心肌细胞损伤的保护中发挥重要作用^[23]。p38 MAPK是MLK3信号转导的重要下游介质,p38 MAPK通路可在转录和翻译水平上促进NF- κ B及NLRP3炎症小体的激活。NLRP3炎症小体由NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶前体等组成,机体损伤时可激活NLRP3炎症小体,被活化的NLRP3炎症小体又可激活半胱氨酸蛋白酶1(Caspase-1),通过裂解无生物活性的IL-1 β 前体生成具有生物活性的IL-1 β ,从而引起炎症反应^[24]。有学者发现,MLK3可以调控NF- κ B/NLRP3信号通路介导的炎症反应从而减轻心肌损伤,因此,降低MLK3的表达,可能通过抑制MLK3-p38 MAPK-NLRP3通路减少缺血再灌注所致的炎症反应。

本研究通过结扎大鼠冠状动脉左前降支30 min并再灌注90 min的方法构建MIRI大鼠模型,结果发现:造模后大鼠心肌发生较明显梗死,心肌损伤标志物CK-MB、cTnI显著升高,心肌细胞排列紊乱,细胞

间隙水肿,炎症相关蛋白MLK3、p38 MAPK、NLRP3、IL-1 β 表达明显上升。给予柴胡三参胶囊及地尔硫卓预处理后,MIRI模型大鼠心肌组织损伤减轻,心肌损伤标志物CK-MB、cTnI水平显著降低,梗死面积减少,MLK3、p38 MAPK、NLRP3、IL-1 β 蛋白表达水平降低,表明柴胡三参胶囊和盐酸地尔硫卓预处理均可以减少缺血再灌注大鼠炎症的发生发展,从而实现对MIRI模型大鼠的心肌保护作用。其中以柴胡三参胶囊中、高剂量和盐酸地尔硫卓对MIRI减轻作用更为显著,且中剂量与高剂量对各指标的改善作用比较差异无统计学意义($P>0.05$),可供临床参考。

综上,柴胡三参胶囊中、高剂量及地尔硫卓预处理能够保护MIRI大鼠心肌细胞,减轻缺血再灌注损伤,其机制可能与抑制大鼠MLK3、p38 MAPK、NLRP3、IL-1 β 蛋白表达从而减轻炎症有关。下一步拟从细胞水平探索柴胡三参胶囊预处理对MIRI模型大鼠心肌保护作用的机制,也将进一步探究柴胡三参胶囊含药血清对心肌细胞氧糖剥夺/复氧模型的保护作用,以为AMI的临床治疗提供更可靠的实验依据。

参考文献

- [1] 中国医师协会中西医结合医师分会,中国中西医结合学会心血管病专业委员会,中国中西医结合学会重症医学专业委员会,等.急性心肌梗死中西医结合诊疗指南[J].中国中西医结合杂志,2018,38(3):272.
- [2] 张铭,张娜娜,余信,等.达格列净对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护的实验研究[J].陕西医学杂志,2022,51(7):795.
- [3] HOU Y H, WANG Y T, HE Q, et al. Nrf2 inhibits NLRP3 inflammasome activation through regulating Trx1/TXNIP complex in cerebral ischemia reperfusion injury[J]. Behav Brain Res, 2018, 336: 32.
- [4] CHEN C X, CHEN W, NONG Z H, et al. Cardioprotective effects of combined therapy with hyperbaric oxygen and diltiazem pretreatment on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 38(5): 2015.
- [5] 刘建和,李群,何少平,等.柴胡三参胶囊对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响[J].中国中医药信息杂志,2010,17(11):29.
- [6] ZHONG Z Y, UMEMURA A, SANCHEZ-LOPEZ E, et al. NF- κ B restricts inflammasome activation via elimination of damaged mitochondria[J]. Cell, 2016, 164(5): 896.
- [7] LI D D, REN W Y, JIANG Z L, et al. Regulation of the NLRP3 inflammasome and macrophage pyroptosis by the p38 MAPK signaling pathway in a mouse model of acute lung injury[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(5): 4399.

- [8] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:1052.
- [9] 刘建和,毛宗裕,肖冰凌,等.柴胡三参胶囊对缺血性心律失常大鼠心肌细胞Bcl-2及Fas表达的影响[J].中国中医急症,2020,29(6):962.
- [10] 刘建和,杨成龙,袁恒佑,等.柴胡三参胶囊对缺血性心律失常大鼠心肌组织CaMK II 蛋白及CaMK II -mRNA表达的影响[J].现代中西医结合杂志,2020,29(17):1834.
- [11] 国家卫生计生委合理用药专家委员会,中国药师协会.冠心病合理用药指南(第2版)[J].中国医学前沿杂志(电子版),2018,10(6):1.
- [12] CHIANG M H, LIANG C J, LIU C W, et al. Aliskiren improves ischemia-and oxygen glucose deprivation-induced cardiac injury through activation of autophagy and AMP-activated protein kinase[J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 819.
- [13] WANG K, HU W. Oxypaeoniflorin improves myocardial ischemia/reperfusion injury by activating the Sirt1/Foxo1 signaling pathway[J]. Acta Biochim Pol, 2020, 67(2): 239.
- [14] HEUSCH G, GERSH B J. The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: a continual challenge[J]. Eur Heart J, 2017, 38(11): 774.
- [15] 刘丹勇,夏正远,韩荣辉,等.心肌缺血再灌注损伤机制研究的回顾与展望[J].中国动脉硬化杂志,2020,28(12):1013.
- [16] 丁雨,陈雪梅,吴思思.柴胡皂苷D对H₂O₂诱导大鼠心肌细胞H9c2损伤保护机制研究[J].浙江医学,2019,41(24):2571.
- [17] 卢玉润,唐宇帆.黄连素通过miR-29b保护缺氧复氧诱导H9c2细胞损伤中的作用及其机制[J].河北医科大学学报,2021,42(3):256.
- [18] 马春香,孙媛,陈晓斌,等.丹参酮II A预处理对心肌缺血再灌注损伤保护作用的研究[J].陕西医学杂志,2017,46(10):1358.
- [19] 张岩,冯超,韩吉春,等.甘草素减轻大鼠离体心肌缺血再灌注损伤作用研究[J].天然产物研究与开发,2017,29(9):1492.
- [20] 郭自强,朱陵群,张立平,等.党参对大鼠离体工作心脏缺血/再灌注损伤的保护作用[J].北京中医药大学学报,1995,18(5):39.
- [21] 张静,秦方,付莉,等.苦参提取物通过JAK/STAT信号通路减轻缺血再灌注大鼠心肌损伤的实验研究[J].中国煤炭工业医学杂志,2019,22(2):177.
- [22] 李玲,马瑜红,黄川锋,等.附子与半夏预处理对缺血再灌注损伤大鼠心功能和心肌超微结构的影响[J].时珍国医国药,2014,25(2):325.
- [23] HE S Y, LIU S B, WU X C, et al. Protective role of downregulated MLK3 in myocardial adaptation to chronic hypoxia[J]. J Physiol Biochem, 2016, 73(3): 371.
- [24] TOLDO S, MAURO A G, CUTTER Z, et al. Inflammasome, pyroptosis, and cytokines in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2018, 315(6): H1553.

第一作者:杨成龙(1988—),男,医学硕士,主治医师,从事中医药防治心血管疾病研究。

通讯作者:冯君,医学博士,副主任医师。
705500732@qq.com

收稿日期:2023-02-01

编辑:吴宁

文末参考文献著录规则之页码的标注

根据国家标准GB/T 7714—2015《信息与文献 参考文献著录规则》的规定,本刊关于参考文献页码的著录做重要修订如下:(1)专著或期刊中析出文献的页码或引文页码,应采用阿拉伯数字著录,引自序言或扉页题词的页码,可按实际情况著录(例:钱学森.创建系统学[M].2版.太原:山西科学技术出版社,2001:序2.);(2)阅读型参考文献的页码著录文章的起始页,引文参考文献的页码著录引用信息所在页。阅读型参考文献指著者为撰写或编辑论著而阅读过的信息资源;引文参考文献指著者为撰写或编辑论著而引用的信息资源。例如:将谈勇等发表在本刊2015年第1期第1—4页的文章《夏桂成国医大师调治复发性流产经验探赜》作为阅读型参考文献引用时,页码著录为“1”;作为引文文献引用“夏老提出心-肾-子宫轴功能失常是流产病机关键”这一观点或原文时,著录这些引用信息的所在页“3”。更多有关本刊参考文献著录规则见本刊网站(www.jstcm.cn)首页下载专区。