

## 芪参益气滴丸通过调控 TLR-4/NF-κB 信号通路对阿霉素所致小鼠心脏毒性的保护作用

施洋<sup>1</sup>, 候宝林<sup>1</sup>, 樊官伟<sup>2</sup>, 吴胜利<sup>3\*</sup>

1. 克拉玛依市人民医院 药剂科, 新疆 克拉玛依 834000  
2. 天津中医药大学第一附属医院 医学实验中心, 天津 300193  
3. 克拉玛依市人民医院 心衰中心, 新疆 克拉玛依 834000

**摘要:** 目的 探究芪参益气滴丸对阿霉素所致小鼠心脏毒性的影响及其作用机制。方法 将40只C57BL/6J小鼠按照随机数字表法分为对照组, 模型组, 艸参益气滴丸低、高剂量(150、600mg/kg)组, 每组10只。芪参益气滴丸低、高剂量组分别ig 150 mg/kg、600 mg/kg 艸参益气滴丸, 对照组和模型组均ig 等量生理盐水, 每日上午1次, 连续14 d后开始造模。除对照组外, 其余3组小鼠造模均采用尾iv 1 mg/mL 多柔比星脂质体注射液, 按照小鼠体质量每次给予5 mg/kg, 每周1次, 共3周, 累积量为15 mg/kg 建立心脏毒性损伤模型。对照组尾iv 等体积生理盐水, 期间密切观察并记录小鼠体质量变化及死亡情况。末次注射多柔比星脂质体1周后, 完成所有存活小鼠超声心动观测并处死留取心脏及血液标本。观察小鼠超声心动图变化评估心功能情况, 应用Millar压力-容积系统检测小鼠血流动力学改变。通过苏木精-伊红(HE)染色观察心肌细胞损伤, 利用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定血清肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-6(IL-6)水平, 使用实时定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测核因子-κB(NF-κB)及Toll样受体-4(TLR-4)表达。结果 小鼠存活率为100%; 模型组小鼠体质量较对照组相比明显降低( $P<0.05$ ), 艸参益气滴丸150、600 mg/kg组较模型组有上升趋势, 但未呈现统计学差异。与模型组相比, 艸参益气滴丸150、600 mg/kg组左室射血分数(LVEF)、左室短轴缩短率(LVFS)明显增加( $P<0.05$ 、0.01); 艸参益气滴丸600 mg/kg组干预后, 小鼠左室收缩末期内径(LVIDs)、收缩末期左室后壁厚度(LVPWs)、左室容积(LV Vol)变化显著( $P<0.05$ 、0.01)。与模型组比较, 艸参益气滴丸150、600 mg/kg组小鼠心率(HR)均明显升高( $P<0.05$ 、0.01)。与模型组相比, 艸参益气滴丸150、600 mg/kg组+dp/dt<sub>max</sub>和-dp/dt<sub>max</sub>均显著改善( $P<0.01$ )。与模型组比较, 艸参益气滴丸150、600 mg/kg组小鼠血清TNF-α、IL-1β、IL-6水平明显降低( $P<0.01$ ), 且艸参益气滴丸600 mg/kg组下降趋势更显著。HE染色结果显示, 艸参益气滴丸150、600 mg/kg组心肌损伤程度较模型组明显减轻。经艸参益气滴丸干预后, 小鼠心肌TLR-4和NF-κB mRNA表达水平显著降低( $P<0.05$ 、0.01)。结论 艸参益气滴丸通过提高心功能, 减轻心肌损伤, 降低炎性因子水平, 并通过调节TLR-4/NF-κB信号通路等多途径实现保护阿霉素所致的心脏毒性。

**关键词:** 艸参益气滴丸; 阿霉素; 心脏毒性; 炎性因子; Toll样受体-4/核因子-κB信号通路; 心脏保护

**中图分类号:** R914      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1674-5515(2022)08-1689-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.08.002

## Cardioprotection of Qishen Yiqi Dropping Pills on adriamycin induced cardiotoxicity in mice through TLR-4/NF-κB signaling pathway

SHI Yang<sup>1</sup>, HOU Bao-lin<sup>1</sup>, FAN Guan-wei<sup>2</sup>, WU Sheng-li<sup>3</sup>

1. Department of Pharmacy, Karamay Municipal Peoples' Hospital, Karamay 834000, China  
2. Medical Experiment Center, First Teaching Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China  
3. Center of Heart Failure for Karamay Municipal Peoples' Hospital, Karamay 834000, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect and mechanism of Qishen Yiqi Dropping Pills on adriamycin induced cardiotoxicity in mice. **Methods** Forty C57BL/6J mice were randomly divided into control group, model group, Qishen Yiqi Dropping Pills 150 mg/(kg·d)

收稿日期: 2022-06-13

基金项目: 天津市杰出青年科学基金(17JCJQJC46200); 克拉玛依市人民医院院级科研项目(Ry2020011)

作者简介: 施洋, 主管药师, 硕士, 研究方向为心血管药理学、临床药学。E-mail: shiyangtjutcm@126.com

\*通信作者: 吴胜利, 主任医师, 本科, 研究方向为临床医学。E-mail: niuyoumou@sohu.com

group, and Qishen Yiqi Dropping Pills 600 mg/kg group, with 10 mice in each group. Qishen Yiqi Dropping Pills group were ig 150 mg/kg and 600 mg/kg Qishen Yiqi Dropping Pills, while control group and model group were ig the same amount of normal saline, once daily in the morning. The model was established after 14 consecutive days. After 14 days of Qishen Yiqi Dripping Pills intervention, except for the control group, the other 3 groups were injected with 1 mg/mL Doxorubicin Liposome Injection through tail vein, and the mice were given 5 mg/kg each time according to the body weight, once a week for 3 weeks, and the cumulative amount was 15 mg/kg to establish the cardiotoxic injury model. In the control group, the same volume of normal saline was injected into the tail vein. During the period, the changes of body weight and death of mice were closely observed and recorded. One week after the last injection of liposome doxorubicin, echocardiography was performed and all surviving mice were sacrificed for heart and blood samples. Echocardiography was used to evaluate the cardiac function, and Millar pressure-volume system was used to detect the hemodynamic changes of mice. Myocardial cell injury was observed by hematoxylin and eosin (HE) staining. Serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin-6 (IL-6) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and Toll-like receptor-4 (TLR-4). The survival rate of mice was 100%. Compared with the control group, the body weight of the model group was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Results** Compared with the model group, the Qishen Yiqi Dripping Pills 150 and 600 mg/kg groups had an upward trend, but there was no statistical difference. Compared with model group, left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular short-axis shortening rate (LVFS) were significantly increased in Qishen Yiqi Dripping Pills 150 and 600 mg/kg groups ( $P < 0.05, 0.01$ ). The left ventricular end-systolic diameter (LVIDs), left ventricular posterior wall thickness (LVPWs), and LV Vols of mice in Qishen Yiqi Dripping Pills 600 mg/kg group were significantly changed ( $P < 0.05, 0.01$ ). Compared with model group, HR of mice in Qishen Yiqi Dripping Pills 150 and 600 mg/kg groups were significantly increased ( $P < 0.05, 0.01$ ). Compared with the model group, the  $+dp/dt_{max}$  and  $-dp/dt_{max}$  of Qishen Yiqi Dripping Pills 150 and 600 mg/kg groups were significantly improved ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, the serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 in Qishen Yiqi Dripping Pills 150 and 600 mg/kg groups were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and the decreasing trend was more significant in Qishen Yiqi Dripping Pills 600 mg/kg group. The results of HE staining showed that the myocardial injury of Qishen Yiqi Dripping Pills 150 and 600 mg/kg groups was significantly reduced compared with the model group. The mRNA expression levels of TLR-4 and NF- $\kappa$ B in myocardium of mice were significantly decreased after pre-intervention with Qishen Yiqi Dripping Pills ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** Qishen Yiqi Dripping Pills can protect the cardiac toxicity caused by doxorubicin by improving cardiac function, reducing myocardial injury, reducing the level of inflammatory factors, and regulating TLR-4/NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**Key words:** Qishen Yiqi Dripping Pills; adriamycin; cardiotoxicity; inflammatory factor; TLR-4/NF- $\kappa$ B signaling pathway; cardioprotection

恶性肿瘤是当今社会严重危害人类生命和健康的严重疾病，我国随着经济快速发展，工业化和人口老龄化进程加快，环境污染等问题加剧，恶性肿瘤的发生率总体呈快速上升趋势，发病率达 201.7/10 万<sup>[1]</sup>。化疗是现今治疗恶性肿瘤的主要手段之一，可延长患者存活时间。然而，其会引起多种严重的副作用，如骨髓抑制、肝肾毒性、心脏毒性等，其中心脏毒性为最严重的副作用之一<sup>[2]</sup>。长期应用化疗药物可引起心肌退行性病变和心肌间质水肿，出现心率失常、剂量相关的不可逆转的心肌病、充血性心力衰竭等众多不良反应<sup>[3]</sup>。由于心肌细胞缺乏自我修复能力，导致心脏发生不可逆损伤，因而限制了化疗药物的临床应用。

阿霉素是一种蒽环类抗肿瘤抗生素，能与 DNA 发生嵌入式结合，阻碍 DNA 解螺旋，进而抑制癌细胞的增殖<sup>[4]</sup>。然而，心脏毒性很大程度限制了其

临床应用，表现为剂量相关性的不可逆心肌病变和充血性心力衰竭<sup>[5]</sup>。芪参益气滴丸以黄芪、丹参、三七、降香等中药提取制成复方制剂，具有益气活血、活血化瘀之功效，临幊上对冠心病、心力衰竭、扩张性心肌病等疾病有良好的治疗效果。现代药理学研究证实，其具有抗心肌缺血、抑制心室重构、抗动脉粥样硬化等作用<sup>[6-7]</sup>。本研究通过建立阿霉素致小鼠心肌损伤模型，考察芪参益气滴丸对小鼠心脏功能、血流动力学和炎性反应的影响，探讨芪参益气滴丸保护阿霉素致心脏毒性的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 仪器

ALC-V8 型小动物呼吸机（上海精密科学仪器有限公司）；VS4153 型超声系统气体麻醉装置、Vevo2100 型小动物超声仪（加拿大 Visual Sonics 公司）；Millar 压力 - 容积测定仪（澳大利亚

ADIInstruments 公司); Enspire 多功能酶标仪(美国 PerkinElmer 公司); DP71 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司); VCX130 型超声波细胞破碎仪(美国 Sonics 公司); DU-800 型核酸蛋白分析仪(美国 Beckman 公司); CFX96 型荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司)。

## 1.2 药品与试剂

芪参益气滴丸(天士力医药集团股份有限公司, 规格 0.5 g/袋, 批号 210815); 阿霉素(盐酸多柔比星脂质体注射液, 上海复旦张江生物医药股份有限公司, 规格 10 mg/支, 批号 210501); 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(IL-6)试剂盒(武汉优尔生科技股份有限公司, 批号 SEA133Mu、SEA563Mu、SEA079Mu); 伊红染色液、苏木精染色液(北京索莱宝科技有限公司, 批号 G1100、H8070); Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司, 批号 66108); 反转录试剂盒(瑞士 Roche 公司, 批号 04379012001); 扩增试剂盒(瑞士 Roche 公司, 批号 04913914001)。

## 1.3 动物

SPF 级 8 周龄健康 C57BL/6J 小鼠, 雌雄各半, 体质量 16~20 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(京)2020-0004。购入后饲养于清洁级动物房中, 室温 20~25 °C, 相对湿度 40%~60%, 明暗环境各 12 h 交替。小鼠每日定时定量投放鼠粮 1 次, 饮水不限, 垫料 3 d 更换 1 次, 适应性饲养 1 周。小鼠相关实验操作均经过天津中医药大学实验动物伦理委员会批准通过后执行(批准号 TCM-LAEC2015026)。

## 2 方法

### 2.1 分组、造模与给药

将 40 只 C57BL/6J 小鼠按照随机数字表法分为对照组, 模型组, 芪参益气滴丸高、低剂量组, 每组 10 只。芪参益气滴丸高、低剂量组按照成人 4 倍临床用量和 1 倍临床用量计算小鼠的日用量, 实验前用生理盐水分别配制成质量浓度为 20、5 mg/mL 的混悬液, 相当于 60、15 mg/mL 芪参益气滴丸质量浓度。其中芪参益气滴丸高剂量组小鼠按 600 mg/kg 给药, 芪参益气滴丸低剂量组小鼠按 150 mg/kg 给药, 对照组和模型组均给予等量生理盐水。所有小鼠均 ig 给药, 每日上午 1 次, 连续 14 d 后开始造模。

除对照组外, 其余 3 组小鼠造模均采用尾 iv 1

mg/mL 多柔比星脂质体注射液, 按照小鼠体质量每次给予 5 mg/kg, 每周 1 次, 共 3 周, 累积量为 15 mg/kg<sup>[8-9]</sup>。对照组尾 iv 等体积生理盐水, 期间密切观察并记录小鼠体质量变化及死亡情况。末次注射阿霉素 1 周后, 完成所有存活小鼠超声心动观测并处死留取心脏及血液标本。

### 2.2 左心室超声心动评价

小鼠称重后标记, 胸前区褪毛, 固定于操作台中央, 以异氟烷麻醉(完全麻醉: 1% 氧气+5% 异氟烷于麻醉盒内麻醉; 持续麻醉: 1% 氧气+2% 异氟烷面罩吸入麻醉)后行超声心动检测。在 B-型超声模式(B-Mode)长轴切面获得左心室图像, 随即转换至 M-型超声模式(M-Mode), 保存最大腔径处图像。选择长轴测量包(PLAX)进行测量, 获得左室前壁厚度(LVW)、左室内径(LVID)、左室后壁厚度(LVPW)、左室容积(LV Vol)等收缩期和舒张期数值, 通过系统自带软件计算左室射血分数(LVEF)及左室短轴缩短率(LVFS), 评估左心室功能及结构变化情况。

### 2.3 左心室血流动力学评价

超声结束后, 用 2,2,2-三溴乙醇按 0.03 mL/g 剂量 ip 麻醉, 将小鼠固定于鼠板上行血流动力学检测。在颈前正中纵行切开表皮, 分离右侧颈总动脉, 以 5-0 缝合线结扎远心端, 动脉夹夹闭近心端, 沿近心端缓慢插入导管至进入左心室。导管另一端连接压力转换器与微机, 通过 Millar 压力-容积系统进行监测, 待心室内压波形变化稳定后, 记录心率(HR)、左心室收缩和舒张最大压力变化速率(±dp/dt<sub>max</sub>)。

### 2.4 血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平测定

小鼠经麻醉后行腹主动脉取血, 血样置于 37 °C 水浴静置 30 min, 后以 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液分装于 200 μL EP 管中, 严格按照试剂盒操作要求对血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平进行测定。

### 2.5 小鼠心肌形态学观察

小鼠心脏置于 4% 多聚甲醛溶液固定, 在临近心尖部 1/3 处平行于房室沟横切得到 3~4 mm 厚度心肌组织, 经脱水、透明、石蜡包埋等处理后, 制作成 5 μm 切片。将所得切片摊展、烘干, 并于 58 °C 烤片后放置室温过夜待完全自然干燥。按苏木精-伊红(HE)染色步骤进行染片, 以中性树胶封片, 于通风橱内晾干后置倒置显微镜下观察并拍照。

## 2.6 心肌炎因子表达水平测定

取各组小鼠心脏，剪开右心耳，以 0.01 mol/L PBS 缓冲液冲洗 3 次至无残留血液流出。剪取左心室心肌组织，包裹于锡箔纸放置于冻存管中，液氮速冻 30 min 后转入 -80 °C 冰箱保存。称取 50 mg 心肌组织，剪碎后应用超声波细胞破碎仪充分破碎，加入 Trizol 试剂提取心肌组织样本总 RNA。所有操作均在冰上进行以防止 RNA 因温度过高而降解。提取后的组织样本总 RNA 分别测定浓度和纯度，合格后行反转录合成 cDNA，并完成 qRT-PCR 检测工作。反应条件、步骤和操作事项严格按照试剂盒说明书执行。以 GAPDH 为内参，检测心肌组织中炎症因子 TLR-4 和 NF-κB 的相对表达量，相对表达量以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示，计算公式为实验组目的基因/对照组目的基因。引物序列如表 1 所示，引物合成工作由上海生工生物工程股份有限公司完成。

## 2.7 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件进行分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示，多组间比较采用单因素方差分析（One-Way

表 1 各基因引物序列

Table 1 Sequence of primers for genes

基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
TLR-4	CTCACAACTTCAGTGG CTGGATTAA	GTCTCCACAGCCA CCAGATTCTC
NF-κB	CAUGCCAGUGAGAAU GUAUGCCAU	ACGCAGGAGACGG AAGAAUAAA
GAPDH	AGGCCGGTGCTGAGTA TGTC	TGCCTGCTTCACCA CCTTCT

ANOVA），若方差齐时组间两两比较采用 LSD-t 检验法，若方差不齐则采用 Dunnett's T3 法。

## 3 结果

### 3.1 各组小鼠存亡情况及体质量变化情况

模型组、芪参益气滴丸 150、600 mg/kg 组小鼠在末次给予阿霉素 1 周后均未见死亡，存活率为 100%。然而，模型组小鼠体质量较对照组相比明显降低 ( $P < 0.05$ )，芪参益气滴丸 150、600 mg/kg 组较模型组有上升趋势，但未呈现统计学差异。此外，自造模开始至造模结束时，3 组小鼠体质量均逐渐减轻，以模型组尤为显著，见表 2。

表 2 各组小鼠造模前后体质量变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Changes of body weight in mice of each group before and after modeling ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	体质量/g			
		造模 0 周	造模 1 周	造模 2 周	造模 3 周
对照	—	20.29 ± 0.95	21.14 ± 1.35	20.97 ± 2.81	20.57 ± 2.23
模型	—	19.14 ± 0.90	16.14 ± 1.13*	15.80 ± 0.99*	14.57 ± 0.98*
芪参益气滴丸	150	19.86 ± 1.07	17.00 ± 1.63	16.83 ± 1.24	15.29 ± 1.50
	600	20.57 ± 0.53	17.57 ± 1.13	17.09 ± 1.53	15.43 ± 1.13

与对照组比较： $*P < 0.05$

$*P < 0.05$  vs control group

### 3.2 各组小鼠心功能评价结果

造模 3 周后，各组小鼠左心室 M-Mode 超声心动图结果见图 1。经过阿霉素连续尾静脉注射 3 周后，模型组小鼠心室腔呈进行性扩张，程度明显。此外，左室室壁运动减弱，收缩力下降，芪参益气滴丸干预后有明显改善。模型组 LVEF、LVFS 较对照组显著降低 ( $P < 0.01$ )；与模型组相比，芪参益气滴丸 150、600 mg/kg 组 LVEF、LVFS 明显增加 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )，见图 2。芪参益气滴丸 600 mg/kg 组干预后，小鼠左室收缩末期内径(LVIDs)、收缩末期左室后壁厚度(LVPWs)、LV Vols 变化显著 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )，LVIDd 变化不显著，见表 3。

### 3.3 各组小鼠血流动力学评价结果

与对照组比较，模型组小鼠 HR 明显降低 ( $P <$

0.01)；与模型组比较，芪参益气滴丸 150、600 mg/kg 组小鼠 HR 均明显升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。血流动力学结果显示，反映左室收缩功能的指标 +dp/dt<sub>max</sub> 和反映舒张功能的指标 -dp/dt<sub>max</sub> 绝对值对比中，模型组小鼠明显低于对照组 ( $P < 0.01$ )；与模型组相比，芪参益气滴丸 150、600 mg/kg 组上述指标均有显著改善 ( $P < 0.01$ )，见表 4。

### 3.4 各组小鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平检测结果

与对照组相比，模型组血清中炎性因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平显著升高 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，芪参益气滴丸 150、600 mg/kg 组血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平明显降低 ( $P < 0.01$ )，且芪参益气滴丸 600 mg/kg 组下降趋势更显著，见表 5。

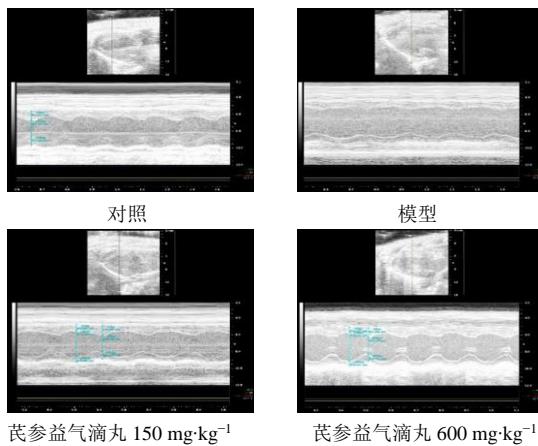
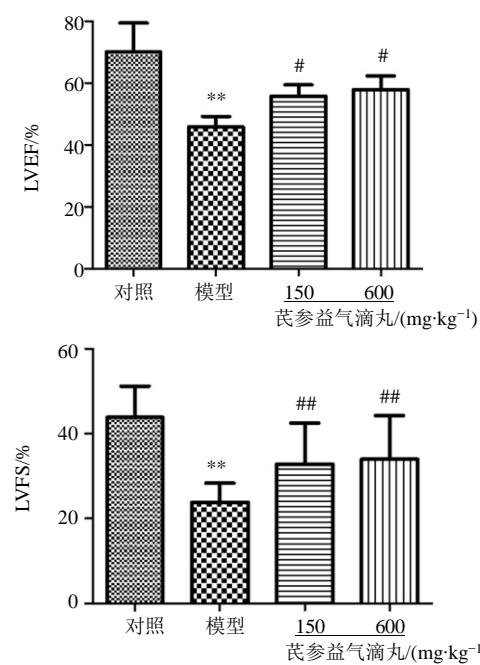


图1 各组小鼠左心室M-Mode超声心动图

Fig. 1 Left ventricular echocardiography of mice in each group for M-Mode

### 3.5 各组小鼠心肌形态学考察结果

HE染色结果显示，对照组小鼠心肌细胞染色清晰、排列整齐、横纹清楚、细胞核致密，未见细胞坏死。与对照组相比，模型组小鼠心肌纤维纵横纹排列紊乱、横纹消失，白细胞浸润明显，心肌纤维破裂且间质水肿显著。芪参益气滴丸150、600 mg/kg组小鼠心肌损伤程度较模型组明显减轻，见图3。



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$

\*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group

图2 各组小鼠左心室LVEF、LVFS情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 2 Left ventricular situation of LVEF and LVFS in mice for each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

表3 各组小鼠左心室结构变化情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 3 Changes of left ventricular structure in mice for each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	LVIDd/mm	LVIDs/mm	LVPWd/mm	LVPWs/mm	LV Vold/μL	LV Vols/μL
对照	—	3.08 ± 0.31	1.90 ± 0.30	0.65 ± 0.20	1.03 ± 0.24	37.95 ± 9.32	11.62 ± 4.68
模型	—	3.08 ± 0.25	2.35 ± 0.27**	0.49 ± 0.09	0.73 ± 0.15**	37.64 ± 7.89	19.49 ± 5.94**
芪参益气滴丸	150	3.06 ± 0.16	2.06 ± 0.27	0.52 ± 0.11	0.85 ± 0.13	36.76 ± 4.78	16.04 ± 4.28
	600	2.88 ± 0.30	1.91 ± 0.33##	0.56 ± 0.06	0.90 ± 0.18#	32.24 ± 8.82	13.85 ± 5.27##

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$

\*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group

表4 各组小鼠HR、+dp/dt<sub>max</sub>及-dp/dt<sub>max</sub>变化情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 4 Changes of HR, +dp/dt<sub>max</sub>, and -dp/dt<sub>max</sub> in mice for each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	HR/bpm	+dp/dt <sub>max</sub> /(mm Hg·s <sup>-1</sup> )	-dp/dt <sub>max</sub> /(mm Hg·s <sup>-1</sup> )
对照	—	418.26 ± 56.93	7 142.05 ± 650.12	-4 923.77 ± 1 779.42
模型	—	329.18 ± 33.31**	2 863.34 ± 791.71**	-2 296.84 ± 919.69**
芪参益气滴丸	150	374.91 ± 50.52#	4 296.08 ± 737.49##	-3 179.90 ± 857.81##
	600	409.72 ± 55.30##	5 134.58 ± 610.57##	-3 816.74 ± 869.13##

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$

\*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group

### 3.6 各组小鼠心肌TLR-4、NF-κB mRNA表达水平测定结果

与对照组比较，模型组小鼠心肌TLR-4和NF-κB mRNA表达水平显著升高( $P < 0.01$ )。经芪参益

气滴丸预干预后，小鼠心肌TLR-4和NF-κB mRNA表达水平显著降低( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )，见图4。

### 4 讨论

目前，阿霉素的心脏毒性正受到越来越多的关

表 5 各组小鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 变化情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 5 Changes of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 in mice serum for each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(mg·kg $^{-1}$ )	TNF- $\alpha$ /(pg·mL $^{-1}$ )	IL-1 $\beta$ /(pg·mL $^{-1}$ )	IL-6/(pg·mL $^{-1}$ )
对照	—	47.22 $\pm$ 16.74	13.21 $\pm$ 5.62	5.41 $\pm$ 1.71
模型	—	196.60 $\pm$ 37.49**	126.33 $\pm$ 28.47**	42.88 $\pm$ 3.32**
芪参益气滴丸	150	65.73 $\pm$ 16.21##	86.55 $\pm$ 15.82##	17.90 $\pm$ 5.59##
	600	55.84 $\pm$ 11.46##	69.21 $\pm$ 9.69##	16.42 $\pm$ 5.31##

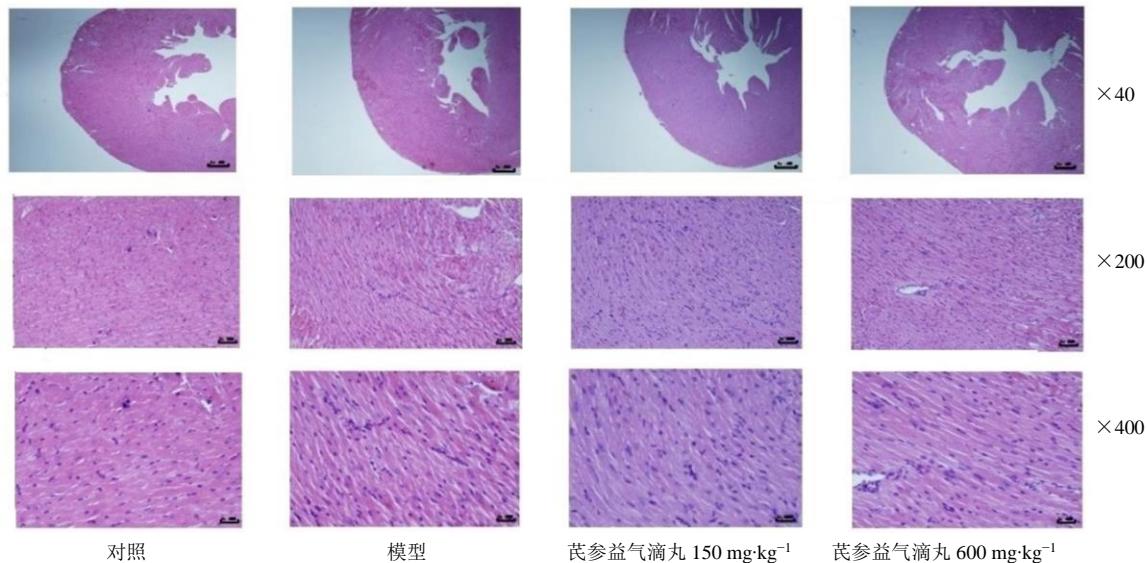
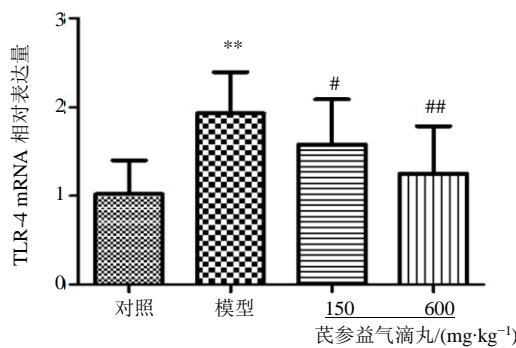
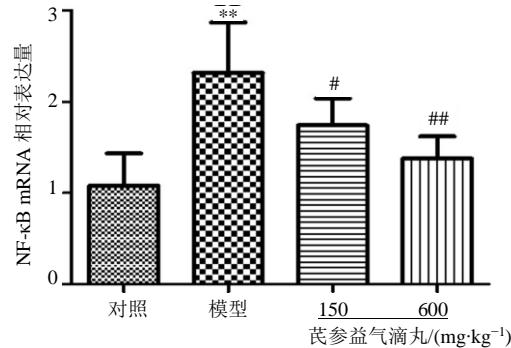
与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ \*\* $P < 0.01$  vs control group; ## $P < 0.01$  vs model group

图 3 各组小鼠心肌 HE 染色结果

Fig. 3 Result of HE staining of myocardial tissue in mice for each group

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group图 4 各组小鼠 TLR-4、NF-κB mRNA 表达情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Fig. 4 Expression of TLR-4 and NF-κB mRNA in mice for each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

注, 尽管科研工作者在明确其风险因素、开发低毒衍生物以及动物实验和临床应用等方面取得了一定的成绩, 但在预防和治疗方面却仍未找到相当有效的方案。

阿霉素所诱导的心脏毒性主要分急性和慢性 2 种, 通过大剂量、单次应用阿霉素可建立心肌损伤

的急性心脏毒性模型, 虽可用于短期研究, 但动物死亡率较高<sup>[10]</sup>。慢性心脏毒性模型则是通过小剂量、周期性多次给药, 在体内达到一定累积量而形成模型, 具有稳定、成功率高、易重复等优势<sup>[11]</sup>。此外, 尾静脉注射阿霉素相较于传统的腹腔注射, 可有效避免腹腔黏连、腹膜炎、血性腹水等后果,

且药物吸收率更高，能更好地模拟临床给药方式。阿霉素剂量的选择也是造模成功的关键因素之一，研究表明，阿霉素不同累积量会引起死亡率和成模率出现较大差异，小于10 mg/kg时不易成模，超过20 mg/kg时死亡率明显增加<sup>[12]</sup>。因而，本研究选择阿霉素15 mg/kg分3周尾静脉注射建立小鼠心脏毒性模型，该方案成功率较高、死亡率低，期间未见严重不良反应。

超声心动观测和血流动力学检测不仅能直接、简便、安全、有效地考察阿霉素致心脏损伤的程度，同时可反映出心脏电激动的综合过程，二者结合成为评价阿霉素心脏毒性的重要指标<sup>[13]</sup>。本研究发现，模型组小鼠LVEF、LVFS明显低于对照组，LVIDs、LV Vols显著高于对照组，而直接反映左心室收缩功能的血流动力学指标+dp/dt<sub>max</sub>亦较对照组明显降低，提示阿霉素可导致左心室收缩能力显著下降，同时增加心脏体积，改变心脏结构。阿霉素致心脏毒性的过程中伴随着复杂的心肌超微结构及组织形态学的变化，表现为肌纤维缺失、空泡变性、间质纤维化等病理性改变<sup>[14]</sup>。本研究通过HE染色，证明芪参益气滴丸可减少炎性细胞浸润和纤维断裂，降低心肌病变程度，减轻阿霉素诱导的心脏损伤。炎症因子激活和释放是心脏损伤过程中的重要环节，与心肌损害形成和发展密切相关<sup>[15-17]</sup>。TNF-α在炎症反应中占有重要地位，可诱导其他炎性介质释放并参与炎症反应。研究表明，TNF-α导致心肌损害的原因与促进白细胞趋化黏附，增加间质内粒细胞浸润，刺激炎性介质分泌，产生氧自由基等高度关联<sup>[18]</sup>。此外，其诱导心肌细胞凋亡，参与心室重构进展，最终导致充血性心力衰竭<sup>[19]</sup>。IL-1β是IL-1家族中的重要成员，具有较强促炎活性，可诱导炎症反应和机体防御反应而损伤心脏组织，参与动脉粥样硬化、心肌细胞凋亡、心肌纤维化的发生发展<sup>[20]</sup>。IL-6由活化的T细胞和单核巨噬细胞分泌，对维持机体免疫、炎症反应及应激反应等状态下的生理平衡具有重要作用，与多种心血管疾病预后联系紧密<sup>[21]</sup>。本研究结果过表明，芪参益气滴丸可显著降低阿霉素所致心脏毒性小鼠血清TNF-α、IL-1β及IL-6水平，抑制炎性因子释放，减少炎性细胞浸润和渗出，表现出较理想的抗炎作用。

TLR-4/NF-κB信号通路是经典的炎症信号通路，广泛分布于各种组织细胞内，介导炎性因子在细胞间相互表达，改变机体病理过程<sup>[22]</sup>。既往研

究表明，TLR-4/NF-κB信号通路与心血管损伤导致的细胞因子失衡、炎症细胞活化、炎性反应启动环节密切相关<sup>[23]</sup>。本研究发现，芪参益气滴丸干预可通过下调模型组小鼠心肌TLR-4和NF-κB mRNA表达水平，抑制TLR-4/NF-κB信号通路介导的炎症反应，减轻阿霉素所致心脏毒性损伤。本研究未设置阳性药作为对照，目的在于探究不同剂量芪参益气滴丸对于阿霉素所致心脏毒性的保护作用及其潜在机制。

综上所述，芪参益气滴丸通过提高心功能，减轻心肌损伤，降低炎性因子水平，调控TLR-4/NF-κB信号通路等多条途径实现保护阿霉素所致心脏毒性。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- Yadav A, Singh S, Sohi H, et al. Advances in delivery of chemotherapeutic agents for cancer treatment [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2021, 23(1): 25.
- Pereira G C, Silva A M, Diogo C V, et al. Drug-induced cardiac mitochondrial toxicity and protection: From doxorubicin to carvedilol [J]. *Curr Pharm Des*, 2011, 17(20): 2113-2129.
- 施洋, 樊登峰, 候宝林, 等. 阿霉素致心脏毒性的作用机制及其中药防治的研究进展 [J]. 新疆中医药, 2019, 37(1): 113-116.
- Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin induced cardiotoxicity [J]. *Nat Med*, 2012, 18(11): 1639-1642.
- 马莉, 刘志超, 高晟玮, 等. 茸参益气滴丸治疗心血管疾病药理作用与临床应用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(4): 780-787.
- 刘丽伟, 周霖, 孙志, 等. 基于UHPLC-Q-Orbitrap HRMS技术的芪参益气滴丸中主要化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5761-5771.
- Wang L, Wang L, Zhou X, et al. Qishen Yiqi Dropping Pills ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice via enhancement of cardiac angiogenesis [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 2435-2444.
- Li M C, Sala V, de Santis M C, et al. Phosphoinositide 3-kinase gamma inhibition protects from anthracycline cardiotoxicity and reduces tumor growth [J]. *Circulation*, 2018, 138(7): 696-711.

- [10] Zhu J G, Jin K, Ren Y. Ulinastatin reduces myocardial injury induced by doxorubicin in SD rats [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(20): 10769-10778.
- [11] Li L, Ni J Y, Li M, et al. Ginsenoside Rg<sub>3</sub> micelles mitigate doxorubicin-induced cardiotoxicity and enhance its anticancer efficacy [J]. *Drug Deliv*, 2017, 24(1): 1617-1630.
- [12] Teraoka K, Hirano M, Yamaguchi K, et al. Progressive cardiac dysfunction in adriamycin-induced cardiomyopathy rats [J]. *Eur J Heart Fail*, 2000, 2(4): 373-378.
- [13] 陈景瑞, 魏静, 倪晶宇, 等. 茯苓参益气滴丸对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用的研究 [J]. 天津中医药, 2017, 34(10): 688-691.
- [14] Hong Y M, Lee H, Cho M S, et al. Apoptosis and remodeling in adriamycin-induced cardiomyopathy rat model [J]. *Korean J Pediatr*, 2017, 60(11): 365-372.
- [15] Lafuse W P, Wozniak D J, Rajaram M V S. Role of cardiac macrophages on cardiac inflammation, fibrosis and tissue repair [J]. *Cells*, 2020, 10(1): 51.
- [16] Prabhu S D, Frangogiannis N G. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: From inflammation to fibrosis [J]. *Circ Res*, 2016, 119(1): 91-112.
- [17] Thackeray J T, Hupe H C, Wang Y, et al. Myocardial inflammation predicts remodeling and neuroinflammation after myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 71(3): 263-275.
- [18] 施洋, 候宝林, 樊登峰, 等. 丹红注射液对急性心肌梗死模型大鼠炎症反应和心肌形态学的影响 [J]. 中国药房, 2018, 29(19): 2602-2607.
- [19] Schumacher S M, Naga Prasad S V. Tumor necrosis factor- $\alpha$  in heart failure: an updated review [J]. *Curr Cardiol Rep*, 2018, 20(11): 117.
- [20] 甄臻, 王涛, 贾如意. 白细胞介素 1 $\beta$  在心血管疾病中的研究进展 [J]. 中国综合临床, 2016, 32(11): 1038-1041.
- [21] 郑晚来, 樊梁军, 张伟. 心房颤动患者血清中 I 型胶原、IL-6 水平与患者心功能及心血管事件的关系 [J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(5): 605-607.
- [22] 鲍璐璐, 崔立红. TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路的研究进展 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2019, 28(5): 568-572.
- [23] Chen H, Zhang R Q, Wei X G, et al. Mechanism of TLR-4/NF- $\kappa$ B pathway in myocardial ischemia reperfusion injury of mouse [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2016, 9(5): 503-507.

【责任编辑 高源】