

青藤碱调控 TLR4/NOX4 信号通路对心房颤动大鼠炎症反应及心肌纤维化的影响

王霞¹, 赵丽¹, 杜庆玲¹, 李志平²

1. 烟台市蓬莱人民医院 心血管内科, 山东 烟台 265600

2. 山东中医药大学 中医学院, 山东 济南 250355

摘要: 目的 探讨青藤碱调控 Toll 样受体 4 (TLR4)/NADPH 氧化酶 4 (NOX4) 信号通路对心房颤动大鼠炎症反应及心肌纤维化的影响。方法 将 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、青藤碱 (20、40、80 mg/kg) 组、维拉帕米组及青藤碱+Pam3Cys 组, 每组 12 只。对照组大鼠通过舌下 iv 等量的生理盐水以代替心房颤动诱导液; 其余各组大鼠均通过舌下 iv 心房颤动诱导液构建心房颤动大鼠模型, 建模成功后, 进行给药处理, 1 次/d, 持续 2 周。彩色多普勒超声仪检测大鼠左室射血分数 (LVEF)、左室短轴缩短率 (LVFS) 的变化; ELISA 法检测大鼠血清中白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平; 检测大鼠左心室质量指数; 苏木精-伊红 (HE) 染色检测大鼠心肌组织病理变化; Masson 染色检测大鼠心肌组织纤维化程度; qRT-PCR 检测左心室心肌组织中转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、胶原蛋白 I 型 (Collagen- I) mRNA 表达; Western blotting 检测大鼠左心室心肌组织中 TLR4、NOX4 蛋白表达。结果 与模型组比较, 青藤碱各剂量组大鼠心肌组织病理损伤及心肌纤维化程度有所改善, LVEF、LVFS 显著升高, IL-6、TNF- α 水平, TGF- β 1 和 Collagen- I mRNA 表达及 TLR4、NOX4 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。与青藤碱组比较, 青藤碱+Pam3Cys 组大鼠心肌组织病理损伤及心肌纤维化加重, LVEF、LVFS 显著降低, IL-6、TNF- α 水平, TGF- β 1 和 Collagen- I mRNA 表达及 TLR4、NOX4 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$)。结论 青藤碱可能通过抑制 TLR4/NOX4 通路抑制心房颤动大鼠炎症反应及心肌纤维化。

关键词: 青藤碱; Toll 样受体 4/NADPH 氧化酶 4 信号通路; 心房颤动; 心肌纤维化; 左室射血分数; 左室短轴缩短率; 转化生长因子- β 1; 胶原蛋白 I 型

中图分类号: R285; R286.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)05-1092-07
DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.05.002

Effect of sinomenine on inflammatory response and myocardial fibrosis in rats with atrial fibrillation by regulating the TLR4/NOX4 signaling pathway

WANG Xia¹, ZHAO Li¹, DU Qingling¹, LI Zhiping²

1. Department of Cardiovascular Medicine, Yantai Penglai People's Hospital, Yantai 265600, China

2. College of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: Objective To investigate the effect of sinomenine on inflammatory response and myocardial fibrosis in rats with atrial fibrillation by regulating the Toll-like receptor 4 (TLR4)/NADPH oxidase 4 (NOX4) signaling pathway. **Methods** SD rats were randomly grouped into control group, model group, sinomenine (20、40、80 mg/kg) group, verapamil group, and sinomenine + Pam3Cys group, with 12 rats in each group. Rats in control group was injected with an equal amount of physiological saline through the sublingual vein instead of atrial fibrillation inducing fluid, rats in other groups were used to construct atrial fibrillation rat models by injecting atrial fibrillation inducing fluid into the sublingual vein. After successful modeling, medication was administered once daily for 2 weeks. Color doppler ultrasound was applied to detect changes in left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular short axis shortening rate (LVFS) in rats. ELISA method was applied to detect the levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in rat serum. The left ventricular mass index of rats was detected, HE staining was applied to detect pathological changes in rat myocardial tissue, Masson staining was applied to detect the degree of myocardial fibrosis in rats, qRT-PCR was applied to detect the expression of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and Collagen-I mRNA in left ventricular myocardial tissue. Western

收稿日期: 2024-02-23

基金项目: 山东省中医药科技发展计划项目 (2019-0034)

作者简介: 王霞, 女, 副主任医师, 本科, 研究方向为心力衰竭、心肌病及心律失常的诊治。E-mail: rrey25@163.com

blotting was applied to detect the expression of TLR4 and NOX4 proteins in rat left ventricular myocardial tissue. **Results** Compared with the model group, the myocardial tissue pathological damage and severe myocardial fibrosis of rats in sinomenine group were improved, LVEF and LVFS were increased, the IL-6 and TNF- α levels, *TGF- β 1* and *Collagen- I* mRNA expression, and TLR4, NOX4 protein expression were reduced ($P < 0.05$). Compared with sinomenine group, the myocardial tissue pathological damage and myocardial fibrosis of rats in sinomenine + Pam3Cys group were aggravated, LVEF and LVFS were reduced, IL-6 and TNF- α levels, *TGF- β 1* and *Collagen- I* mRNA expression, and TLR4, NOX4 protein expression were increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Sinomenine may inhibit inflammatory response and myocardial fibrosis in rats with atrial fibrillation by inhibiting the TLR4/NOX4 pathway.

Key words: sinomenine; TLR4/NOX4 signaling pathway; atrial fibrillation; myocardial fibrosis; LVEF; LVFS; TGF- β 1; Collagen- I

心房颤动是临床实践中最常见的心律失常疾病,也是中风、心力衰竭、猝死等疾病的主要原因之一,残疾率和死亡率很高。随着人口老龄化,心房颤动的发病率和患病率继续上升,社会负担也在增加^[1]。研究表明,心肌纤维化是心房颤动的关键病理过程,减少心房纤维化可有效抑制动物模型对房颤的易感性^[2]。因此,抑制心肌纤维化是心房颤动预防和治疗的重要方法。青藤碱是青藤的主要活性成分,具有抗炎、免疫调节及改善心血管疾病的作用^[3-4]。已有研究报道,青藤碱可抑制异丙肾上腺素诱导的心脏肥大小鼠心肌纤维化^[5]。但青藤碱能否抑制心房颤动大鼠心肌纤维化尚不可知。相关研究显示,抑制 Toll 样受体 4 (TLR4)/还原型辅酶 II (NADPH) 氧化酶 4 (NOX4) 通路可显著抑制心力衰竭大鼠心肌纤维化^[6];且青藤碱可通过抑制 TLR4 通路改善大鼠动脉粥样硬化^[7]。但青藤碱能否通过调控 TLR4/NOX4 信号通路改善心房颤动大鼠心肌纤维化尚不明确。因此,本研究主要探究青藤碱对心房颤动大鼠心肌纤维化的影响以及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 84 只 SPF 级雌性 SD 大鼠,7 周龄,体质量 250~260 g,购自上海吉辉实验动物饲养有限公司,生产许可证号 SCXK(沪)2022-0009。本研究获得烟台市蓬莱人民医院动物伦理委员会的批准(批号 2023-01005),所有动物实验均符合 3R 原则。

1.1.2 主要仪器 HD15 型彩色多普勒超声仪(上海聚慕医疗器械有限公司);SH11/YF-9 型光学显微镜(北京中西华大科技有限公司);JY-SCZ2 型蛋白电泳仪(济南君意生物科技有限公司);Gel-DocTM-XR+型凝胶成像系统(美国伯乐公司)。

1.1.3 试剂 无水氯化钙(批号 20221226)购自南通润丰石油化工有限公司;乙酰胆碱(质量分数>98%,批号 20221103)、青藤碱(质量分数>98%,

批号 20221118)购自四川省维克奇生物科技有限公司;维拉帕米(质量分数 99%,批号 20220917)购自武汉欣欣佳丽生物科技有限公司;TLR4 激活剂 Pam3Cys(批号 20221003)购自美国 MCE 公司;戊巴比妥钠(批号 20221229)购自北京华业寰宇化工有限公司;大鼠白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒(货号分别为 RJ15478、RJ16622)购自上海仁捷生物科技有限公司;兔源一抗 TLR4、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)及二抗(货号分别为 ab217274、ab8245、ab6721)均购自英国 Abcam 公司;NOX4 兔源一抗(货号 14347-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 心房颤动大鼠模型构建 在参考文献报道^[8]的基础上再通过预实验确定按照以下方式造模:通过舌下 iv 1 mL/kg 心房颤动诱导液的方式构建心房颤动大鼠模型,每隔 1 d 给药 1 次,共给药 14 次。若超声心电图显示, P 波消失,代替为小 F 波,则表明心房颤动大鼠模型构建成功^[9]。

1.2.2 心房颤动诱导液的配制 将 5 g 无水氯化钙、16.83 mg 乙酰胆碱溶解于生理盐水中,得到 500 mL 心房颤动诱导液(含有 10 g/L 氯化钙和 33.66 mg/L 乙酰胆碱)。

1.2.3 动物分组及给药 按照随机数字表法将 84 只大鼠随机分为对照组、模型组、青藤碱(20、40、80 mg/kg)组、维拉帕米组、青藤碱+Pam3Cys 组,每组 12 只。对照组大鼠通过舌下 iv 等量的生理盐水以代替心房颤动诱导液;其余各组大鼠均按 1.2.1 项下所示方法构建心房颤动大鼠模型,建模成功后,进行给药处理,青藤碱组、维拉帕米组大鼠分别需 ig 20、40、80 mg/kg 青藤碱^[10]及 25 mg/kg 维拉帕米^[11],且均需 ip 等体积生理盐水;青藤碱+Pam3Cys 组大鼠需 ig 80 mg/kg 青藤碱及 2 mg/kg Pam3Cys^[12];对照组、模型组大鼠给予注射等量的生理盐水,1 次/d,持续 2 周。

1.2.4 标本收集 末次处理 24 h 后, 2%戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉大鼠, 收集大鼠的腹主动脉血经离心 (3 500 r/min, 离心半径 10 cm) 得血清用于 ELISA 实验; 血液收集完成后, 称量大鼠的质量, 再处死大鼠, 分离并收集大鼠的左心室心肌组织, 分为 2 部分, 每部分包含 6 只大鼠的左心室心肌组织, 一部分用于左心室质量指数的检测, 该指标检测完后, 将左心室心肌组织固定于 4%多聚甲醛中用于苏木精-伊红 (HE) 染色和 Masson 染色; 另一部分左心室心肌组织冻存于-80 °C 用于 qRT-PCR、Western blotting 实验。

1.2.5 彩色多普勒超声仪检测大鼠左室射血分数 (LVEF)、左室短轴缩短率 (LVFS) 的变化 末次给药 24 h 后, 利用彩色多普勒超声仪检测大鼠 LVEF、LVFS 的变化。

1.2.6 ELISA 法检测大鼠血清中 IL-6、TNF- α 水平 严格按照 ELISA 试剂盒说明书检测大鼠血清中 IL-6、TNF- α 水平。

1.2.7 左心室指数的检测 称量大鼠的体质量后, 处死大鼠, 取出左心室, 小心擦除表面水分后, 称量左心室质量, 并计算左心室指数。

左心室指数=左心室质量/体质量

1.2.8 大鼠心肌组织的 HE 染色及 Masson 染色检测 收集左心室心肌组织并在甲醛中固定 24 h, 然后包埋在石蜡中, 切成厚度为 5 μ m 的切片后, 这些切片用于 HE 染色及 Masson 染色。在光学显微镜下观察组织切片变化, 并采用 Image J 计算心肌胶原容积分数 (CVF)。

CVF=胶原面积/视野总面积

1.2.9 qRT-PCR 检测左心室心肌组织中转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、胶原蛋白 I 型 (Collagen- I) mRNA 表达 使用 RNA 提取试剂盒分离来自组织匀浆的总 RNA。将 RNA 进行逆转录为 cDNA 后, 以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 反应。采用 GAPDH 来标准化 TGF- β 1、Collagen- I mRNA 的表达水平。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 TGF- β 1、Collagen- I mRNA 的相对表达水平, 引物序列见表 1。

1.2.10 Western blotting 检测大鼠左心室心肌组织中 TLR4、NOX4 蛋白表达 从大鼠左心室心肌组织匀浆中提取总蛋白质, 并使用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定蛋白质的浓度。在 10% SDS-PAGE 凝胶上分离等浓度的蛋白质, 随后转移到 PVDF 膜上。用 5%脱脂牛奶封闭 1.5 h 后, 将膜与一抗 TLR4、

表 1 TGF- β 1、Collagen- I mRNA 引物序列
Table 1 TGF- β 1 and Collagen- I mRNA primer sequence

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
GAPDH	ACGTGTCAGTGGT GGACCTG	GTGTAGCCCAGGAT GCCCTT
TGF- β 1	AGCAACAATTTCCTG GCGATACCTC	TCAACCACTGCCGC ACAACCTC
Collagen- I	TTCTCCTGGCAAAG ACGGAC	CTCAAGGTCACGGT CACGAA

NOX4、GAPDH 在 4 °C 下过夜孵育。然后将膜与二抗在室温下孵育 1 h。化学发光信号是用 ECL 试剂盒测试的, 使用 Image J 软件评估目的蛋白灰度值。

1.3 统计学方法

利用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素方差分析用于多组间的比较, 进一步两两比较采用 SNK- q 检验。

2 结果

2.1 青藤碱对各组大鼠 LVEF、LVFS 变化的影响

与模型组比较, 青藤碱各剂量组和维拉帕米组大鼠 LVEF、LVFS 显著升高 ($P < 0.05$); 与青藤碱组比较, 青藤碱+Pam3Cys 组大鼠 LVEF、LVFS 显著降低 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 各组大鼠 LVEF、LVFS 变化比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)
Table 2 Comparison of LVEF and LVFS in each group
($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	LVEF/%	LVFS/%
对照	—	73.65 $\pm$ 2.96	50.69 $\pm$ 2.31
模型	—	44.69 $\pm$ 2.58*	24.15 $\pm$ 1.18*
青藤碱	20	53.01 $\pm$ 1.94 [#]	30.78 $\pm$ 1.06 [#]
	40	59.23 $\pm$ 2.01 ^{#&}	36.95 $\pm$ 1.21 ^{#&}
	80	68.56 $\pm$ 1.76 ^{#&@}	44.73 $\pm$ 1.54 ^{#&@}
维拉帕米	25	67.94 $\pm$ 1.69 ^{#&@}	43.96 $\pm$ 1.51 ^{#&@}
青藤碱+ Pam3Cys	80+2	55.87 $\pm$ 2.12 [△]	34.49 $\pm$ 1.05 [△]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与青藤碱 20 mg kg⁻¹ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与青藤碱 40 mg kg⁻¹ 组比较: [@] $P < 0.05$; 与青藤碱 80 mg kg⁻¹ 组比较: [△] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs sinomenine 20 mg kg⁻¹ group; [@] $P < 0.05$ vs sinomenine 40 mg kg⁻¹ group; [△] $P < 0.05$ vs sinomenine 80 mg kg⁻¹ group。

2.2 青藤碱对各组大鼠血清中 IL-6、TNF- α 水平变化的影响

与模型组比较, 青藤碱各剂量组和维拉帕米组大鼠血清中 IL-6、TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与青藤碱组比较, 青藤碱+Pam3Cys 组大鼠血清中 IL-6、TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 各组大鼠血清中 IL-6、TNF-α 水平变化比较
($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 3 Comparison of serum levels of IL-6 and TNF-α in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	IL-6/(ng L ⁻¹)	TNF-α/(ng L ⁻¹)
对照	—	67.73 ± 3.15	41.15 ± 2.01
模型	—	175.53 ± 6.04*	133.38 ± 5.67*
青藤碱	20	141.66 ± 5.81 [#]	106.65 ± 4.12 [#]
	40	115.54 ± 5.12 ^{#&}	83.36 ± 4.05 ^{#&}
	80	81.14 ± 4.03 ^{#&@}	62.28 ± 2.88 ^{#&@}
维拉帕米	25	80.25 ± 4.01 ^{#&@}	60.69 ± 2.79 ^{#&@}
青藤碱+ Pam3Cys	80+2	123.34 ± 5.88 ^Δ	95.57 ± 4.01 ^Δ

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与青藤碱 20 mg kg⁻¹ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与青藤碱 40 mg kg⁻¹ 组比较: [@] $P < 0.05$; 与青藤碱 80 mg kg⁻¹ 组比较: ^Δ $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs sinomenine 20 mg kg⁻¹ group; [@] $P < 0.05$ vs sinomenine 40 mg kg⁻¹ group; ^Δ $P < 0.05$ vs sinomenine 80 mg kg⁻¹ group.

2.3 青藤碱对各组大鼠左心室指数的影响

与模型组比较, 青藤碱各剂量组和维拉帕米组大鼠左心室质量指数显著降低 ($P < 0.05$); 与青藤碱组比较, 青藤碱+Pam3Cys 组大鼠左心室质量指数显著升高 ($P < 0.05$), 见表 4。

表 4 各组大鼠左心室质量指数变化比较
($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 4 Comparison of left ventricular mass index in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	左心室质量指数
对照	—	12.06 ± 0.58
模型	—	25.58 ± 1.16*
青藤碱	20	22.46 ± 1.01 [#]
	40	19.03 ± 0.72 ^{#&}
	80	15.54 ± 0.61 ^{#&@}
维拉帕米	25	15.39 ± 0.58 ^{#&@}
青藤碱+Pam3Cys	80+2	20.35 ± 0.86 ^Δ

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与青藤碱 20 mg kg⁻¹ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与青藤碱 40 mg kg⁻¹ 组比较: [@] $P < 0.05$; 与青藤碱 80 mg kg⁻¹ 组比较: ^Δ $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs sinomenine 20 mg kg⁻¹ group; [@] $P < 0.05$ vs sinomenine 40 mg kg⁻¹ group; ^Δ $P < 0.05$ vs sinomenine 80 mg kg⁻¹ group.

2.4 青藤碱对各组大鼠心肌组织病理变化的影响

对照组大鼠心肌细胞结构完整, 排列整齐; 模型组大鼠心肌细胞肥大与萎缩交织, 细胞形态不规则, 排列紊乱, 间质明显增多; 与模型组比较, 青藤碱各剂量组和维拉帕米组大鼠心肌组织病理损伤减轻; 与青藤碱组比较, 青藤碱+Pam3Cys 组大鼠心肌组织病理损伤加剧, 见图 1。

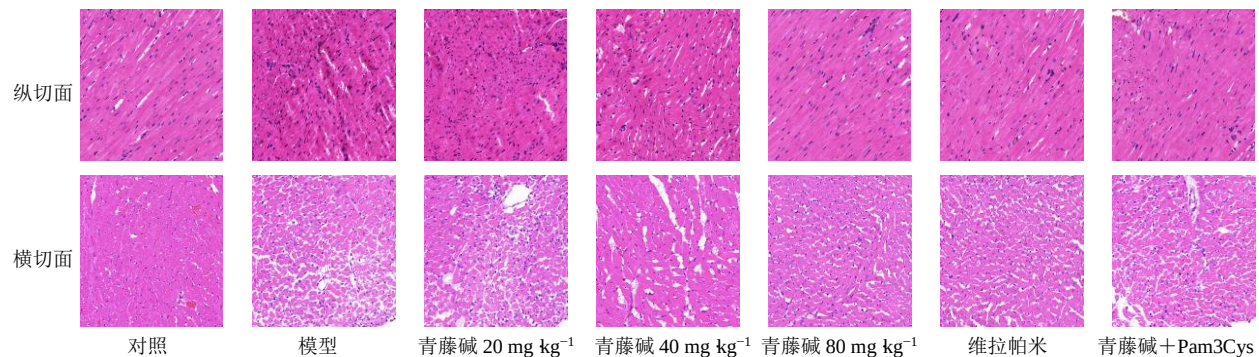


图 1 HE 染色检测大鼠心肌组织病理变化 (×200)

Fig. 1 Pathological changes of myocardial tissue were detected by HE staining (×200)

2.5 青藤碱对各组大鼠心肌组织纤维化的影响

对照组大鼠心肌组织无明显纤维化; 模型组大鼠心肌组织纤维化明显。与模型组比较, 青藤碱各剂量组和维拉帕米组大鼠心肌组织纤维化程度有所改善; 与青藤碱组比较, 青藤碱+Pam3Cys 组大鼠心肌组织纤维化程度加深, 见图 2。

与模型组比较, 青藤碱各剂量组和维拉帕米组大鼠心肌 CVF 显著降低 ($P < 0.05$); 与青藤碱组比较, 青藤碱+Pam3Cys 组大鼠心肌 CVF 显著升高 ($P < 0.05$), 见表 5。

2.6 青藤碱对各组大鼠心肌组织中 TGF-β1、Collagen- I mRNA 表达的影响

与模型组比较, 青藤碱各剂量组和维拉帕米组大鼠心肌组织中 TGF-β1、Collagen- I mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$); 与青藤碱组比较, 青藤碱+Pam3Cys 组大鼠心肌组织中 TGF-β1、Collagen- I mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), 见表 6。

2.7 青藤碱对各组大鼠心肌组织中 TLR4/NOX4 信号通路相关蛋白表达变化的影响

与模型组比较, 青藤碱各剂量组和维拉帕米组

大鼠心肌组织中 TLR4、NOX4 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$); 与青藤碱组比较, 青藤碱+Pam3Cys 组

大鼠心肌组织中 TLR4、NOX4 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$), 见图 3、表 7。

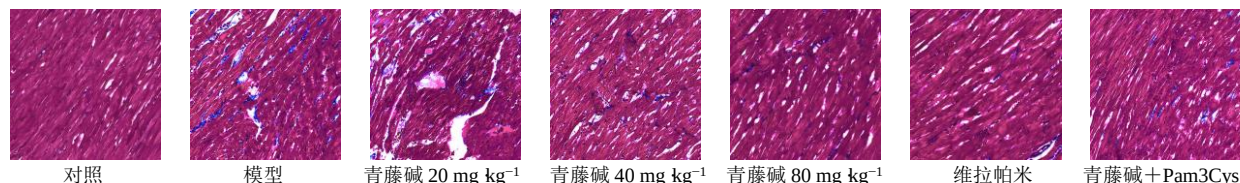


图 2 Masson 染色检测大鼠心肌组织纤维化情况 ($\times 200$)

Fig. 2 Masson staining was used to detect myocardial fibrosis in rats ($\times 200$)

表 5 各组大鼠心肌 CVF 变化比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 5 Comparison of myocardial CVF changes in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	CVF/%
对照	—	0.58 ± 0.04
模型	—	6.98 ± 0.29*
青藤碱	20	5.54 ± 0.21 [#]
	40	4.18 ± 0.19 ^{#&}
	80	1.79 ± 0.12 ^{#&@}
维拉帕米	25	1.74 ± 0.11 ^{#&@}
青藤碱+Pam3Cys	80+2	3.64 ± 0.17 [△]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与青藤碱 20 mg kg⁻¹ 组比较: [&] $P<0.05$; 与青藤碱 40 mg kg⁻¹ 组比较: [@] $P<0.05$; 与青藤碱 80 mg kg⁻¹ 组比较: [△] $P<0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs sinomenine 20 mg kg⁻¹ group; [@] $P < 0.05$ vs sinomenine 40 mg kg⁻¹ group; [△] $P < 0.05$ vs sinomenine 80 mg kg⁻¹ group.

表 6 各组大鼠心肌组织中 TGF- β 1、Collagen- I mRNA 表达变化比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 6 Comparison of mRNA expression of TGF- β 1 and Collagen- I in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量	
		TGF- β 1	Collagen- I
对照	—	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型	—	2.67 ± 0.12*	2.09 ± 0.14*
青藤碱	20	2.31 ± 0.11 [#]	1.85 ± 0.12 [#]
	40	1.96 ± 0.10 ^{#&}	1.63 ± 0.11 ^{#&}
	80	1.36 ± 0.09 ^{#&@}	1.24 ± 0.07 ^{#&@}
维拉帕米	25	1.34 ± 0.08 ^{#&@}	1.23 ± 0.08 ^{#&@}
青藤碱+Pam3Cys	80+2	2.05 ± 0.13 [△]	1.77 ± 0.12 [△]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与青藤碱 20 mg kg⁻¹ 组比较: [&] $P<0.05$; 与青藤碱 40 mg kg⁻¹ 组比较: [@] $P<0.05$; 与青藤碱 80 mg kg⁻¹ 组比较: [△] $P<0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs sinomenine 20 mg kg⁻¹ group; [@] $P < 0.05$ vs sinomenine 40 mg kg⁻¹ group; [△] $P < 0.05$ vs sinomenine 80 mg kg⁻¹ group.

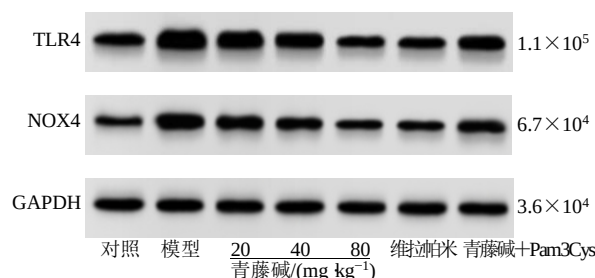


图 3 Western blotting 检测各组大鼠心肌组织中 TLR4、NOX4 蛋白表达

Fig. 3 Western blotting analysis of TLR4 and NOX4 protein expression in myocardium of rats in each group

表 7 各组大鼠心肌组织中 TLR4、NOX4 蛋白表达变化比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 7 Comparison of TLR4 and NOX4 protein expression in myocardium of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	TLR4/GAPDH	NOX4/GAPDH
对照	—	1.21 ± 0.11	0.75 ± 0.06
模型	—	2.83 ± 0.19*	1.69 ± 0.13*
青藤碱	20	2.54 ± 0.16 [#]	1.46 ± 0.11 [#]
	40	1.99 ± 0.14 ^{#&}	1.13 ± 0.07 ^{#&}
	80	1.43 ± 0.12 ^{#&@}	0.86 ± 0.08 ^{#&@}
维拉帕米	25	1.45 ± 0.11 ^{#&@}	0.87 ± 0.07 ^{#&@}
青藤碱+Pam3Cys	80+2	2.11 ± 0.10 [△]	1.25 ± 0.11 [△]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与青藤碱 20 mg kg⁻¹ 组比较: [&] $P<0.05$; 与青藤碱 40 mg kg⁻¹ 组比较: [@] $P<0.05$; 与青藤碱 80 mg kg⁻¹ 组比较: [△] $P<0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs sinomenine 20 mg kg⁻¹ group; [@] $P < 0.05$ vs sinomenine 40 mg kg⁻¹ group; [△] $P < 0.05$ vs sinomenine 80 mg kg⁻¹ group.

3 讨论

心肌纤维化为心房颤动的发生和维持提供了重要的病理基础^[12]。因此, 如何逆转或抑制心肌纤维

化进展有可能达到治疗心房颤动的效果。本研究首先采用舌下静脉注射心房颤动诱导液的方法构建了心房颤动大鼠模型,结果显示,与对照组比较,模型组大鼠 LVEF、LVFS 降低,左心室质量指数升高,且心肌组织病理损伤严重,表明大鼠存在心功能异常及心肌损伤,符合心房颤动的病理特征,证实心房颤动大鼠模型构建成功。有研究报道,炎症是心房颤动发展过程中病理生理过程中的关键组成部分,炎症途径的放大触发心房颤动,同时,心房颤动增加炎症状态^[13]。几种炎症生物标志物(IL-6、TNF- α)的血清水平在心房颤动患者中升高,因此,炎症可能有助于心房颤动的维持和发生^[14]。此外,纤维化在各种心脏病中起致病作用,是心房颤动发作的重要因素^[15]。TGF- β 1 作为关键的促纤维化因子,可诱导心肌细胞中 Collagen- I 蛋白的合成和分泌,从而诱导心肌纤维化的发生^[16]。本研究显示,与对照组比较,模型组大鼠血清中 IL-6、TNF- α 水平升高,心肌 CVF 升高,心肌纤维化严重,心肌组织中 TGF- β 1、Collagen- I mRNA 表达升高,表明心房颤动大鼠存在炎症反应及心肌纤维化。提示抑制炎症反应及心肌纤维化可能成为治疗心房颤动的有效策略之一。

青藤碱是一种从青藤根中提取的生物碱,其具有抗心律失常、抗氧化和抗炎作用^[17]。据报道,青藤碱通过抑制炎症反应在大鼠的缺血再灌注损伤中起抗心律失常作用^[18];青藤碱可改善大鼠脓毒症诱导的心肌损伤^[19];青藤碱可改善肾间质纤维化大鼠肾纤维化^[20]。以上研究表明青藤碱具有保护心肌、抑制纤维化的作用。本研究结果与其是一致的,本研究结果显示,青藤碱可抑制心房颤动大鼠炎症反应及心肌纤维化,且呈剂量相关性。维拉帕米是临床上用于治疗心房颤动的常用药物^[21],本研究以维拉帕米作为阳性药物,结果显示,青藤碱与维拉帕米对心房颤动大鼠炎症反应及心肌纤维化的抑制作用差异无统计学意义,提示青藤碱可能成为治疗心房颤动的潜在有效药物之一。

TLR4/NOX4 通路的激活可引起组织纤维化、心脏肥大及炎症反应^[22]。如激活 TLR4/NOX4 通路可加重大鼠心脏肥大^[23];抑制 TLR4/NOX4 通路可改善血管紧张素 II 诱导的大鼠肾脏组织纤维化^[24];抑制 TLR4/NOX4 通路可降低炎症反应,从而减轻脓毒症引起的大鼠脑损伤^[11]。本研究结果与其是一致的,本研究显示,青藤碱可抑制心房颤动大鼠心

肌组织中 TLR4、NOX4 蛋白表达,且青藤碱剂量越高,抑制作用越明显。推测青藤碱可能通过抑制 TLR4/NOX4 通路抑制心房颤动大鼠炎症反应及心肌纤维化。为了验证该推测,本研究在高剂量青藤碱作用的基础上再加上 TLR4 激活剂 Pam3Cys 来干预心房颤动大鼠,结果显示, Pam3Cys 减弱了高剂量青藤碱对心房颤动大鼠炎症反应及心肌纤维化的抑制作用。证实了猜想的正确性,即青藤碱可能通过抑制 TLR4/NOX4 通路抑制心房颤动大鼠炎症反应及心肌纤维化。

综上所述,青藤碱可能通过抑制 TLR4/NOX4 通路抑制心房颤动大鼠炎症反应及心肌纤维化。青藤碱抑制心房颤动大鼠炎症反应及心肌纤维化的机制较为复杂,具体通过 TLR4/NOX4 通路下游的哪些蛋白来发挥作用有待后续实验进一步探究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lippi G, Sanchis-Gomar F, Cervellin G. Global epidemiology of atrial fibrillation: An increasing epidemic and public health challenge [J]. *Int J Stroke*, 2021, 16(2): 217-221.
- [2] Zhu X, Zhang X G, Cong X P, *et al*. ANGPTL4 attenuates Ang II-induced atrial fibrillation and fibrosis in mice via PPAR pathway [J]. *Cardiol Res Pract*, 2021, 2021: 9935310.
- [3] Zhang M W, Wang X H, Shi J, *et al*. Sinomenine in cardio-cerebrovascular diseases: Potential therapeutic effects and pharmacological evidences [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8:749113.
- [4] Li L, Fang P, Chen J K, *et al*. Protective effect of sinomenine on isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in mice [J]. *J Appl Biomed*, 2021, 19(3): 142-148.
- [5] Liao M R, Xie Q, Zhao Y Q, *et al*. Main active components of Si-Miao-Yong-An decoction (SMYAD) attenuate autophagy and apoptosis via the PDE5A-AKT and TLR4-NOX4 pathways in isoproterenol (ISO)-induced heart failure models [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 176: 106077.
- [6] Geng P B, Xu X H, Gao Z. Sinomenine suppress the vitamin d3 and high fat induced atherosclerosis in rats via suppress of oxidative stress and inflammation [J]. *J Oleo Sci*, 2021, 70(12): 1815-1828.
- [7] 邢佳依, 梁卓, 邢爱君, 等. LncRNA MIAT 靶向调节 miR-128-3p 对心房颤动大鼠心室重构和心肌纤维化的影响 [J]. *天津医药*, 2022, 50(9): 932-937.
- [8] 梁浩, 张娜, 赵乐, 等. miR-92a 通过调控 TGF- β 1/Smads 通路对心房颤动心肌纤维化的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(16): 4015-4021.

- [9] Fu Y F, Li L, Fang P, *et al.* Sinomenine's protective role and mechanism in stress load-induced heart failure [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2020, 72(2): 209-217.
- [10] 肖福龙, 宫丽鸿, 吴启华, 等. 祛痰化瘀中药复方对心房颤动模型大鼠心肌超微结构及氧化应激的影响 [J]. *中医杂志*, 2022, 63(23): 2266-2271.
- [11] 朱国辉, 魏锋. 脂氧素 A4 抑制 TLR4/NOX4/NF- κ B 通路减轻脓毒症大鼠脑损伤的研究 [J]. *河北医药*, 2021, 43(8): 1156-1160.
- [12] Yue H H, Zhao X S, Liang W T, *et al.* Curcumin, novel application in reversing myocardial fibrosis in the treatment for atrial fibrillation from the perspective of transcriptomics in rat model [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 146: 112522.
- [13] Rafaqat S, Afzal S, Khurshid H, *et al.* The role of major inflammatory biomarkers in the pathogenesis of atrial fibrillation [J]. *J Innov Card Rhythm Manag*, 2022, 13(12): 5265-5277.
- [14] 符宇宇, 熊春明, 曾嫚嫚, 等. 炎症因子 IL-6、hsCRP 和 TNF- α 与心房颤动相关性研究 [J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2022, 56(3): 217-220.
- [15] Reese-Petersen A L, Olesen M S, Karsdal M A, *et al.* Atrial fibrillation and cardiac fibrosis: A review on the potential of extracellular matrix proteins as biomarkers [J]. *Matrix Biol*, 2020(91-92): 188-203.
- [16] 李小兵, 王军, 吕瑛, 等. CXXC5 对心房颤动大鼠心肌纤维化的影响及机制 [J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(13): 1552-1557.
- [17] Xia B Y, Li Q, Wu J J, *et al.* Sinomenine confers protection against myocardial ischemia reperfusion injury by preventing oxidative stress, cellular apoptosis, and inflammation [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 922484.
- [18] Lu C H, Guo X, He X H, *et al.* Cardioprotective effects of sinomenine in myocardial ischemia/reperfusion injury in a rat model [J]. *Saudi Pharm J*, 2022, 30(6): 669-678.
- [19] Sun L G, Chen Z Y, Ni Y J, *et al.* Network pharmacology-based approach to explore the underlying mechanism of sinomenine on sepsis-induced myocardial injury in rats [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1138858.
- [20] Gu H P, Li J R, Ni Y H. Sinomenine improves renal fibrosis by regulating mesenchymal stem cell-derived exosomes and affecting autophagy levels [J]. *Environ Toxicol*, 2023, 38(10): 2524-2537.
- [21] 李芳. 维拉帕米在老年阵发性心房颤动治疗中的作用 [J]. *人人健康*, 2016(16): 57.
- [22] Matsuo I, Kawamura N, Ohnuki Y, *et al.* Role of TLR4 signaling on Porphyromonas gingivalis LPS-induced cardiac dysfunction in mice [J]. *PLoS One*, 2022, 17(6): e0258823.
- [23] Wu L M, Jia M, Xiao L L, *et al.* TRIM-containing 44 aggravates cardiac hypertrophy via TLR4/NOX4-induced ferroptosis [J]. *J Mol Med*, 2023, 101(6): 685-697.
- [24] Bai F, Zhang L H, Zhang W W, *et al.* Conservation of glucagon like peptide-1 level with liraglutide and linagliptin protects the kidney against angiotensin II-induced tissue fibrosis in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 867(1): 172844.

[责任编辑 高源]