

荆防颗粒对异丙肾上腺素诱导大鼠急性心肌梗死的保护作用研究

董利洋¹, 程国良¹, 姚景春², 曹天佑³, 李小鹏¹, 屈会化⁴, 孔 慧^{1*}, 赵 琰^{1*}, 张贵民²

1. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029

2. 鲁南制药集团股份有限公司, 中药制药共性技术国家重点实验室, 山东 临沂 276000

3. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029

4. 北京中医药大学中医药研究院, 北京 100029

摘要: 目的 探究荆防颗粒对异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)诱导大鼠急性心肌梗死的保护作用。方法 SD大鼠随机分为对照组、模型组、普萘洛尔(10 mg/kg)组和荆防颗粒高、低剂量(32、16 g/kg)组, 每组8只。各给药组大鼠ig相应药物, 1次/d, 连续14 d; 第13天给药2 h后, 除对照组外, 其余组大鼠皮下多点注射ISO(85 mg/kg), 对照组sc等体积的生理盐水, 连续2 d。心电图观察大鼠ST段的变化; 超声心动检查大鼠左心室射血分数(ejection fraction, EF)和短轴缩短率(fractional shortening, FS); 取心脏, 计算心脏指数(heart weight index, HWI); 采用苏木素-伊红(HE)染色观察心肌组织病理变化; 采用2,3,5-氯化三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium chlorinated, TTC)法检测心肌梗死面积; 采用全自动生化分析仪检测血清中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme, CK-MB)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate transaminase, AST)活性及总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglycerides, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平; 采用试剂盒检测大鼠心肌组织中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、Na⁺, K⁺-ATP酶、Ca²⁺, Mg²⁺-ATP酶活性及丙二醛(malondialdehyde, MDA)、还原性谷胱甘肽(glutathione peroxidase, GSH)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平; 采用TUNEL染色法观察大鼠心肌细胞凋亡情况; 采用Western blotting检测心肌组织中核因子红细胞2相关因子2(nuclear factor red blood cell 2 associated factor 2, Nrf2)和血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组大鼠心电图II导联ST段弓背向上抬高($P<0.01$), 提示急性心肌梗死模型构建成功; EF和FS显著降低($P<0.01$); 血清中LDH、AST、CK-MB活性及TC、TG、LDL-C水平显著升高($P<0.01$); 心肌组织中SOD、CAT、Na⁺, K⁺-ATP酶、Ca²⁺, Mg²⁺-ATP酶活性和GSH水平显著降低($P<0.01$), MDA和ROS水平显著升高($P<0.01$); 心肌组织出现显著的病理性改变, 心肌梗死面积增加($P<0.01$), 心肌细胞凋亡数量显著增加($P<0.01$); 心肌组织中Nrf2和HO-1蛋白表达水平显著降低($P<0.01$)。与模型组比较, 荆防颗粒组大鼠EF和FS显著升高($P<0.05$ 、 0.01); 血清中LDH、AST、CK-MB活性及TC、TG、LDL-C水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01); 心肌组织中SOD、CAT、Na⁺, K⁺-ATP酶、Ca²⁺, Mg²⁺-ATP酶活性和GSH水平显著升高($P<0.05$ 、 0.01), MDA和ROS水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01); 心肌组织病理性改变得到显著改善, 心肌梗死面积和细胞凋亡数量显著降低($P<0.05$ 、 0.01); 心肌组织中Nrf2和HO-1蛋白表达水平显著升高($P<0.05$ 、 0.01)。结论 荆防颗粒通过抑制心肌细胞凋亡和氧化应激损伤从而发挥心脏保护作用。

关键词: 荆防颗粒; 异丙肾上腺素; 急性心肌梗死; 氧化应激; 细胞凋亡; 核因子红细胞2相关因子2/血红素加氧酶-1通路
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)21-6785-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.21.016

Protective effect of Jingfang Granules on acute myocardial infarction induced by isoproterenol in rats

DONG Li-yang¹, CHENG Guo-liang¹, YAO Jing-chun², CAO Tian-you³, LI Xiao-peng¹, QU Hui-hua⁴, KONG Hui¹, ZHAO Yan¹, ZHANG Gui-min²

收稿日期: 2022-08-28

基金项目: 荆防颗粒二次开发(2180071720113)

作者简介: 董利洋, 男, 硕士研究生, 研究方向为经方的现代应用。E-mail: dly1613@163.com

*通信作者: 孔 慧(1976—), 女, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为经方的现代应用。Tel: (010)64286705 E-mail: doris7629@126.com

赵 琰(1973—), 女, 博士生导师, 教授, 研究方向为经方的现代应用。Tel: (010)64286705 E-mail: zhaoyandr@bucm.edu.cn

1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
2. State Key Laboratory of Generic Technology of Traditional Chinese Medicine Pharmaceuticals, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276000, China
3. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
4. Institute of Chinese Medicine Research, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To explore the protective effect of Jingfang Granules (荆防颗粒) on isoproterenol (ISO)-induced acute myocardial infarction in rats. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, model group, propranolol (10 mg/kg) group and Jingfang Granules high-, low-dose (32, 16 g/kg) groups, with 8 rats in each group. Rats in each administration group were ig corresponding drugs once a day for 14 d, 2 h after administration on 13th day, except for control group, rats in other groups were sc ISO (85 mg/kg) at multiple points, and control group was sc same volume physiological saline for two consecutive days. Electrocardiogram was used to observe the changes of ST segment. Left ventricular ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) were examined by echocardiography. Hearts were collected and heart weight index (HWI) was calculated. Pathological changes of myocardium were observed by hematoxylin eosin (HE) staining; Infarct size was measured by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) method; Activities of lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase isoenzyme (CK-MB), aspartate aminotransferase (AST) and levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in serum were detected by automatic biochemical analyzer; Activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), Na^+ , K^+ -ATP, Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP and levels of malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH), reactive oxygen species (ROS) in myocardium of rats were measured by kit; TUNEL staining was used to observe the apoptosis of myocardial cells in rats; Nuclear factor red blood cell 2 associated factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) protein expressions in myocardium were detected by Western blotting. **Results** Compared with control group, ST segment in lead II of Electrocardiogram in model group was elevated upward ($P < 0.01$), indicating that the model of acute myocardial infarction was successfully constructed; EF and FS were significantly decreased ($P < 0.01$); Activities of LDH, AST, CK-MB and levels of TC, TG, LDL-C in serum were significantly increased ($P < 0.01$); Activities of SOD, CAT, Na^+ , K^+ -ATPase, Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase and level of GSH in myocardium were significantly decreased ($P < 0.01$), while the levels of MDA and ROS were increased ($P < 0.01$); Myocardial tissue showed significant pathological changes, myocardial infarction area was increased ($P < 0.01$), apoptosis of myocardial cells were significantly increased ($P < 0.01$); Nrf2 and HO-1 protein expressions in myocardium were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with model group, EF and FS in Jingfang Granules group were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$); Activities of LDH, AST, CK-MB and levels of TC, TG, LDL-C in serum were decreased ($P < 0.05, 0.01$); Activities of SOD, CAT, Na^+ , K^+ -ATP, Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP and level of GSH in myocardium were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), while the levels of MDA and ROS were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$); Pathological changes of myocardial tissue were significantly improved, myocardial infarction area and apoptosis of myocardial cells were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$); Nrf2 and HO-1 protein expressions in myocardium were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Jingfang Granules can protect the heart by inhibiting apoptosis of myocardial cells and oxidative stress injury. **Key words:** JingFang Granules; isoproterenol; acute myocardial infarction; oxidative stress; cell apoptosis; nuclear factor red blood cell 2 associated factor 2/heme oxygenase-1 pathway

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI), 为心肌组织血液供求失衡而导致的心肌缺血性损伤, 由于冠状动脉闭塞而导致局部心肌发生坏死, 大量心肌细胞凋亡^[1-2]。AMI 发生时, 患者会发生剧烈的胸骨后疼痛, 心肌酶异常升高, 严重者常发生心力衰竭而危及生命^[3-4]。异丙肾上腺素是一种 β -肾上腺素能受体 (β -adrenergic receptor, β -AR) 激动剂, 大剂量注射异丙肾上腺素可引起心肌过度收缩, 心率加快, 冠脉痉挛而导致心肌持续缺血缺氧, 继而发生 AMI^[5-7]。

AMI 可归属于中医学的“胸痹”“真心痛”范畴, 中医认为“胸痹”的病因多为“胸阳不振, 气滞血瘀”, 治疗多以“温经通阳, 行气活血”为大法^[8-9]。荆防颗粒是由古方荆防败毒散采用现代工艺制备而成的中成药, 方中荆芥、防风可宣气机于外, 柴胡、川芎可畅气机于内; 枳壳、桔梗升降相因; 茯苓、川芎血水同治; 甘草、茯苓可扶益正气, 诸药相伍可疏通气血, 改善心脏供血功能, 调整心脏缺氧状态。荆防颗粒对 AMI 的影响尚未见报道, 本研究通过 sc 异丙肾上腺素建立大鼠 AMI 模型, 观察荆防颗粒对

AMI 的保护作用, 以期为临床上荆防颗粒防治 AMI 提供实验基础。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只, 9 周龄, 体质量 180~200 g, 购自北京斯贝福生物技术有限公司, 合格证号 SYXK(京) 2020-0033。实验期间动物均饲养于同一环境下, 保持室温 (25±1)℃, 湿度 55%~65%, 12 h 光暗循环, 自由进食饮水, 适应性喂养 3 d 后进行实验。动物实验经北京中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号 BUCM-4-2022040802-2009)。

1.2 药品与试剂

荆防颗粒 (批号 80022202002) 由鲁南制药集团股份有限公司提供; 盐酸异丙肾上腺素 (批号 901E021) 购自北京拜耳迪生物技术有限公司; 盐酸普萘洛尔 (批号 C12151281) 购自北京正程生物科技有限公司; 大鼠 Na⁺, K⁺-ATP 酶 ELISA 试剂盒 (批号 22061600)、Ca²⁺, Mg²⁺-ATP 酶 ELISA 试剂盒 (批号 22061696) 购自赛谱锐思 (北京) 科技有限公司; 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (批号 20220607)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 20220606)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 试剂盒 (批号 20220629)、还原性谷胱甘肽 (glutathione peroxidase, GSH) 试剂盒 (批号 20220701)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 测定试剂盒 (批号 20220606) 购自南京建成生物工程研究所; 二甲苯 (批号 10023418) 购自国药集团化学有限公司; TUNEL 试剂盒 (批号 11684817910) 购自 Roche 公司; 抗荧光淬灭封片剂 (批号 B0007); 兔源核因子红细胞 2 相关因子 2 (nuclear factor red blood cell 2 associated factor 2, Nrf2) 抗体 (批号 ab137536)、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 抗体 (批号 ab13238)、β-actin 抗体 (批号 ab8206); 羊抗兔二抗 (批号 150016) 购自英国 Abcam 公司; 生理盐水 (批号 2202252008) 购自石家庄四药有限公司。

1.3 仪器

FX-7200 型全自动三通道六导联心电图机 (北京福田电子医疗仪器有限公司); Vevo 2100 型小动物超声仪 (Visual Sonics 公司); AU480 型全自动生化分析仪 (美国 Beckman Coulter 公司); HC-2518R 型离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); DY-2000 型电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公

司); mp11SKANMK3 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); H-4000 型免疫组化笔 (上海鑫乐生物科技有限公司); DS-U3 型正置荧光显微镜成像系统 (日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药

将 40 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、普萘洛尔 (10 mg/kg) 组和荆防颗粒低、高剂量 (16、32 g/kg) 组, 每组 8 只。各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续 14 d。第 13 天给药 2 h 后, 模型组和各给药组大鼠 sc 盐酸异丙肾上腺素 (85 mg/kg), 对照组 sc 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续 2 d, 以心电图 ST 段显著弓背抬高代表造模成功^[10]。

2.2 心脏超声检测

大鼠 ip 10% 水合氯醛麻醉后备皮固定, 通过配备 10 MHz 线性阵列超声换能器的 Visual Sonics Vevo 2100 超高分辨率小动物超声成像系统对大鼠进行超声心动图检查。分别测量左心室收缩末期内径 (left ventricular end-systolic internal diameter, LVESD) 和左心室舒张末期内径 (left ventricular end-diastolic internal diameter, LVEDD), 计算左心室射血分数 (ejection fraction, EF) 和短轴缩短率 (fractional shortening, FS)。

2.3 心脏指数分析

实验结束后, 麻醉大鼠, 取血并分离血清; 迅速取出心脏, 用冰冷的生理盐水洗去残留血液, 剪去大血管及结缔组织, 用滤纸吸干后称定质量, 于 -80℃ 冰箱保存备用, 计算心脏指数。

心脏指数 = 心脏质量 / 体质量

2.4 心肌组织病理学观察

各组大鼠心脏于 4% 多聚甲醛中固定, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 切片 (厚度为 4 μm), 进行苏木素-伊红 (HE) 染色, 于显微镜下观察各组大鼠心脏组织的病理变化。

2.5 心肌梗死率测定

取各组大鼠心脏, 垂直于心脏长轴方向将左心室横断切成 5 片, 置入 1% 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (triphenyltetrazolium chlorinated, TTC) 溶液中, 37℃ 避光孵育 15 min。灰白色为梗死区 (infarcted areas, IS), 红色为非梗死区 (non-infarcted areas, NIS), 计算心肌梗死率。

心肌梗死率 = 梗死区域面积 / 左心室面积

2.6 血清心肌酶活性和血脂水平的检测

各组大鼠麻醉后, 腹主动脉取血, 4 °C、3500 r/min 离心 10 min, 取血清, 采用全自动生化分析仪检测血清中乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶同工酶 (creatine kinase isoenzyme, CK-MB)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate transaminase, AST) 活性及总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglycerides, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 和高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 水平。

2.7 心肌组织中氧化应激指标和 Na^+ , K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性的检测

取各组大鼠心肌组织, 匀浆后取上清液, 按照试剂盒说明书测定 SOD、CAT、 Na^+ , K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性及 MDA、GSH、ROS 水平。

2.8 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡

取各组大鼠心肌组织, 于 4% 多聚甲醛中固定, 双蒸水冲洗, 石蜡包埋, 制备厚度为 2~3 μm 的切片, 滴加 TUNEL 反应液孵育 60 min, 滴加 DAPI 覆盖细胞以复染核, 滴加抗荧光淬灭剂封片, 于显微镜下观察凋亡阳性细胞, 并计算凋亡率。

凋亡率 = TUNEL 阳性细胞数/总细胞数

2.9 Western blotting 检测心肌组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达

取各组大鼠心肌组织, 加入 RIPA 裂解液, 提

取总蛋白, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于 5% 牛血清白蛋白中封闭, 加入相应一抗, 4 °C 孵育过夜; TBST 洗涤后, 加入二抗, 于 37 °C 孵育 120 min, TBST 洗涤 3 次后, 加入 ECL 发光试剂显色, 使用 Image J 软件分析条带的灰度值。

2.10 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间数据的比较当方差齐时用单因素方差分析法 (One-way ANOVA), 事后多重比较采用 LSD 法; 方差不齐时用 Dunnett's T3 法。

3 结果

3.1 荆防颗粒对 AMI 大鼠心电图参数的影响

在麻醉状态下对大鼠进行心电图检测, 如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠 ST 段显著升高 ($P < 0.01$), 表明造模成功; 与模型组比较, 各给药组大鼠 ST 段均显著降低 ($P < 0.01$)。表明荆防颗粒对 AMI 大鼠的心脏具有保护作用。

3.2 荆防颗粒对 AMI 大鼠心脏功能的影响

超声心动是检测大鼠心脏功能的重要指标。如图 2 和表 1 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠的 EF 和 FS 显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠 EF 和 FS 均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且呈剂量相关性。

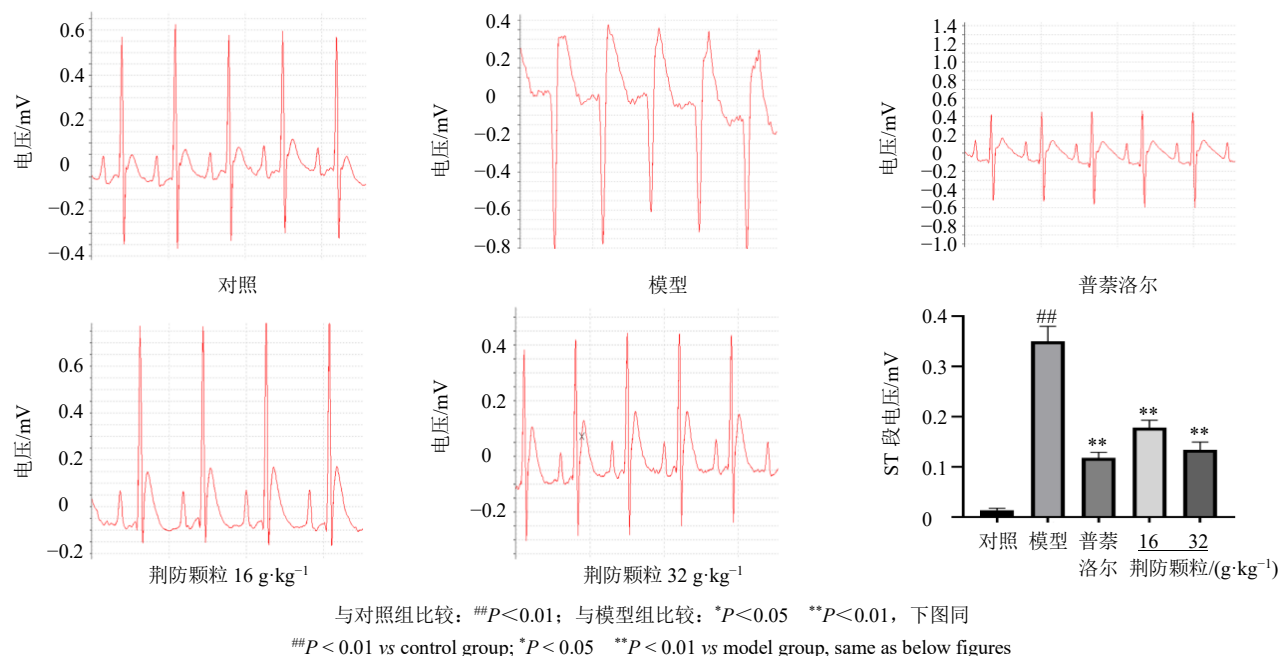


图 1 荆防颗粒对 AMI 大鼠心电图参数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 1 Effect of Jingfang Granules on electrocardiogram parameters of AMI rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

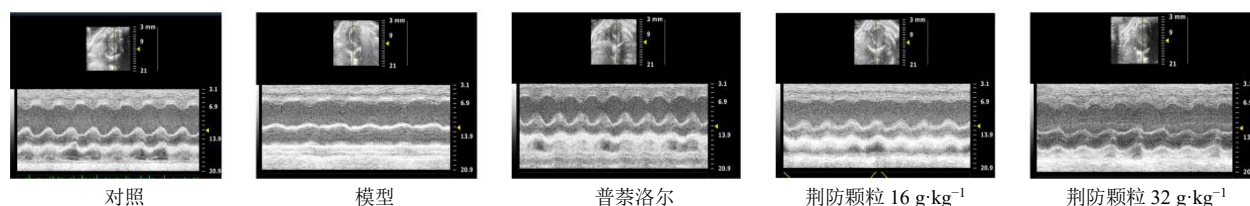


图 2 荆防颗粒对 AMI 大鼠心脏功能的影响

Fig. 2 Effect of Jingfang Granules on cardiac function of AMI rats

表 1 荆防颗粒对 AMI 大鼠心脏功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 1 Effect of Jingfang Granules on cardiac function of AMI rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	EF/%	FS/%
对照	—	75.05 ± 6.83	44.61 ± 6.34
模型	—	23.51 ± 4.39 ^{###}	16.76 ± 8.65 ^{###}
普萘洛尔	0.01	66.21 ± 7.34 ^{**}	37.41 ± 6.09 ^{**}
荆防颗粒	16.0	50.85 ± 4.47 ^{**}	26.57 ± 2.81 [*]
	32.0	60.53 ± 1.43 ^{**}	32.84 ± 0.86 ^{**}

与对照组比较: ^{###} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下表同

^{###} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below tables

3.3 荆防颗粒对 AMI 大鼠心脏形态及心脏指数的影响

如图 3 所示, 对照组大鼠心脏外观表面光滑, 色泽红润; 模型组大鼠颜色灰白, 心尖区可见明显的缺血灶; 各给药组大鼠心脏外观红润光滑, 表明荆防颗粒可显著改善心肌缺血。与对照组比较, 模型组大鼠心脏指数显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠心脏指数显著降低 ($P < 0.01$)。

3.4 荆防颗粒对 AMI 大鼠心肌组织病理变化的影响

如图 4 所示, 对照组大鼠心肌细胞形态规则,

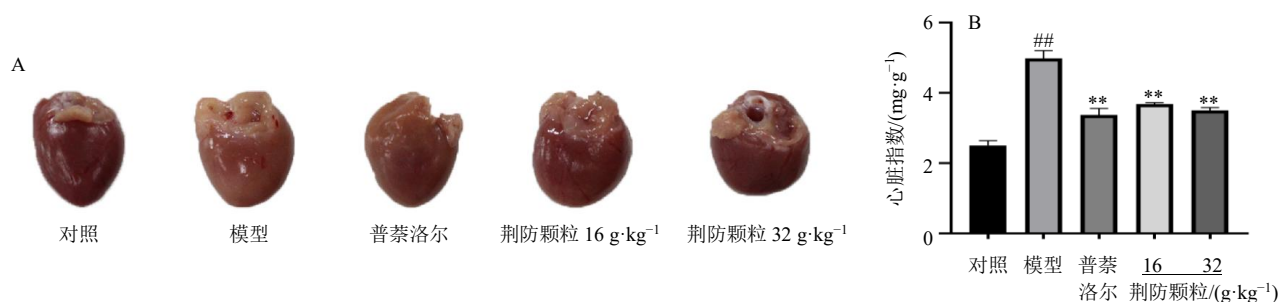


图 3 荆防颗粒对 AMI 大鼠心脏形态 (A) 及心脏指数 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Effect of Jingfang Granules on cardiac morphology (A) and cardiac index (B) of AMI rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

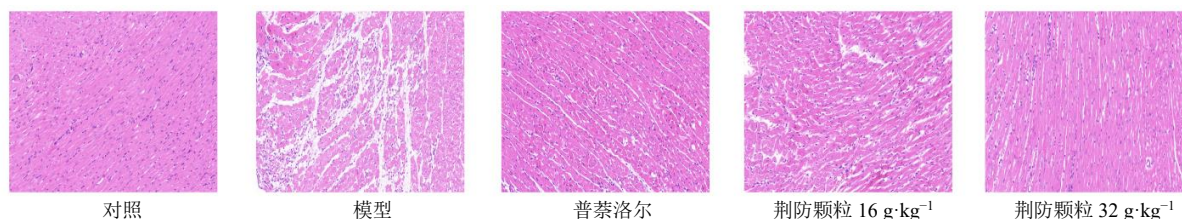


图 4 荆防颗粒对 AMI 大鼠心肌组织病理变化的影响 (HE, ×200)

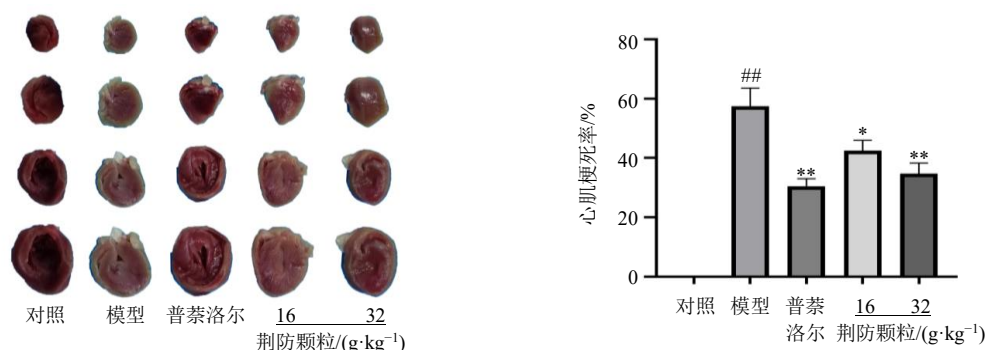
Fig. 4 Effect of Jingfang Granules on myocardial histopathology of AMI rats (HE, ×200)

排列紧密, 未见炎性细胞浸润和充血水肿; 模型组大鼠心肌细胞排列紊乱, 间质水肿, 可见大量炎性细胞浸润和不同程度的心肌细胞坏死, 且有明显的胶原纤维和结缔组织增生; 普萘洛尔组大鼠心肌细胞排列较为有序, 可看到较多的炎性细胞浸润, 间质水肿变形; 荆防颗粒高、低剂量组大鼠心肌细胞排列规则, 部分心肌细胞增大, 有少量的炎性细胞

浸润, 心肌纤维化较模型组明显改善。表明荆防颗粒可有效改善盐酸异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌组织病理变化。

3.5 荆防颗粒对 AMI 大鼠心肌梗死面积的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠心肌梗死率显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠心肌梗死率均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。

图 5 荆防颗粒对 AMI 大鼠心肌梗死率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Fig. 5 Effect of Jingfang Granules on myocardial infarct rate of AMI rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.6 荆防颗粒对 AMI 大鼠血清中 LDH、AST、CK-MB 活性及 LDL、HDL、TC、TG 水平的影响

如表 2 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中 LDH、AST 和 CK-MB 活性均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠血清中 LDH、AST 和 CK-MB 活性均显著降低 ($P < 0.01$)。表明荆防颗粒能在一定程度上减轻心肌损伤程度。

如表 3 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中 LDL-C、TC 和 TG 水平均显著升高 ($P < 0.01$),HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$),表明造模后机体出现血脂异常状态;与模型组比较,各给药组血清中 LDL-C、TC 和 TG 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01),HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.01$)。表明荆防颗粒能有效减轻 AMI 大鼠血清中血脂异常状态。

3.7 荆防颗粒对 AMI 大鼠心肌组织中 SOD、CAT 活性及 MDA、GSH、ROS 水平的影响

氧化应激是 AMI 发病的重要机制之一,通过测定各组大鼠心肌组织中 SOD、CAT 活性及 MDA、

GSH、ROS 水平来反映机体的氧化应激程度。如表 4 所示,与对照组比较,模型组大鼠心肌组织中 ROS 和 MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$),SOD、CAT 活性及 GSH 水平显著降低 ($P < 0.01$),表明机体过氧化程度加重。与模型组比较,各给药组大鼠心肌组织中 ROS 和 MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01),SOD、CAT 活性及 GSH 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01),表明荆防颗粒能够降低 AMI 大鼠心肌组织中氧化应激水平,提高机体抗氧化能力的水平。

3.8 荆防颗粒对 AMI 大鼠心肌组织中 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATP 酶活性的影响

Na^+ 、 K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATP 酶是维持细胞内 Ca^{2+} 浓度的重要酶,其含量的高低可间接反映心肌细胞的损伤程度。如表 5 所示,与对照组比较,模型组大鼠心肌组织中 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATP 酶活性均显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠心肌组织中 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATP 酶活性均显著升高 ($P < 0.01$)。表明

表 2 荆防颗粒对 AMI 大鼠血清中 LDH、AST 和 CK-MB 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 2 Effect of Jingfang Granules on LDH, AST and CK-MB activities in serum of AMI rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	CK-MB/(U·L ⁻¹)
对照	—	240.02 ± 30.25	75.86 ± 9.12	391.01 ± 38.19
模型	—	1 600.42 ± 141.87 ^{##}	391.22 ± 35.44 ^{##}	1 480.62 ± 308.81 ^{##}
普萘洛尔	0.01	834.13 ± 71.87 ^{**}	100.04 ± 17.01 ^{**}	720.63 ± 81.87 ^{**}
荆防颗粒	16.0	1 082.25 ± 85.09 ^{**}	127.43 ± 7.86 ^{**}	801.66 ± 149.65 ^{**}
	32.0	819.43 ± 102.12 ^{**}	109.26 ± 31.81 ^{**}	547.82 ± 104.85 ^{**}

表 3 荆防颗粒对 AMI 大鼠血清中 LDL-C、HDL-C、TC 和 TG 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 3 Effect of Jingfang Granules on LDL-C, HDL-C, TC and TG levels in serum of AMI rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	0.36 ± 0.05	1.36 ± 0.09	0.52 ± 0.05	1.66 ± 0.11
模型	—	0.91 ± 0.09 ^{##}	0.85 ± 0.08 ^{##}	1.49 ± 0.52 ^{##}	2.10 ± 0.16 ^{##}
普萘洛尔	0.01	0.54 ± 0.06 ^{**}	1.13 ± 0.07 ^{**}	0.98 ± 0.13 ^{**}	1.82 ± 0.10 ^{**}
荆防颗粒	16.0	0.61 ± 0.05 ^{**}	1.14 ± 0.10 ^{**}	0.96 ± 0.07 ^{**}	1.82 ± 0.13 [*]
	32.0	0.57 ± 0.08 ^{**}	1.16 ± 0.09 ^{**}	0.98 ± 0.15 ^{**}	1.64 ± 0.38 ^{**}

表 4 荆防颗粒对 AMI 大鼠心肌组织中 SOD、CAT 活性及 MDA、GSH、ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of Jingfang Granules on activities of SOD, CAT and levels of MDA, GSH, ROS in myocardial tissue of AMI rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	CAT/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	GSH/(μmol·g ⁻¹)	ROS/(μmol·mg ⁻¹)
对照	—	200.26 ± 30.26	28.85 ± 2.39	3.24 ± 0.46	8.97 ± 0.63	139.41 ± 10.51
模型	—	90.28 ± 19.57 ^{##}	15.90 ± 1.73 ^{##}	6.23 ± 0.73 ^{##}	4.90 ± 0.56 ^{##}	331.04 ± 52.72 ^{##}
普萘洛尔	0.01	120.30 ± 7.16 ^{**}	22.83 ± 1.86 ^{**}	3.72 ± 0.63 ^{**}	7.09 ± 0.60 ^{**}	245.41 ± 39.38 ^{**}
荆防颗粒	16.0	105.45 ± 6.13 ^{**}	20.53 ± 1.81 [*]	4.46 ± 0.88 ^{**}	6.40 ± 0.89 ^{**}	262.65 ± 36.38 [*]
	32.0	136.20 ± 16.59 ^{**}	25.71 ± 4.96 ^{**}	3.23 ± 0.57 ^{**}	7.11 ± 0.40 ^{**}	215.67 ± 13.62 ^{**}

表 5 荆防颗粒对 AMI 大鼠心肌组织中 Na⁺, K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺, Mg²⁺-ATP 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Effect of Jingfang Granules on activities of Na⁺, K⁺-ATPase and Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase in myocardial tissue of AMI rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Na ⁺ , K ⁺ -ATP 酶/(U·L ⁻¹)	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -ATP 酶/(U·L ⁻¹)
对照	—	7 089.21 ± 106.77	2 304.59 ± 178.84
模型	—	1 856.17 ± 241.03 ^{##}	1 539.29 ± 59.57 ^{##}
普萘洛尔	0.01	3 230.18 ± 853.10 ^{**}	1 915.57 ± 182.24 ^{**}
荆防颗粒	16.0	2 672.88 ± 257.55 ^{**}	1 890.74 ± 92.29 ^{**}
	32.0	3 514.30 ± 502.71 ^{**}	1 997.31 ± 23.40 ^{**}

荆防颗粒可有效恢复 AMI 大鼠心肌组织中 Na⁺, K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺, Mg²⁺-ATP 酶活性, 减轻心肌损伤。

3.9 荆防颗粒对 AMI 大鼠心肌细胞凋亡的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠心肌细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$), 提示机体造模后细胞凋亡程度增加; 与模型组比较, 各给药组大鼠心肌细胞凋亡率均显著降低 ($P < 0.01$)。表明荆防颗粒能够有效减轻 AMI 大鼠心肌细胞凋亡。

3.10 荆防颗粒对 AMI 大鼠心肌组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠心肌

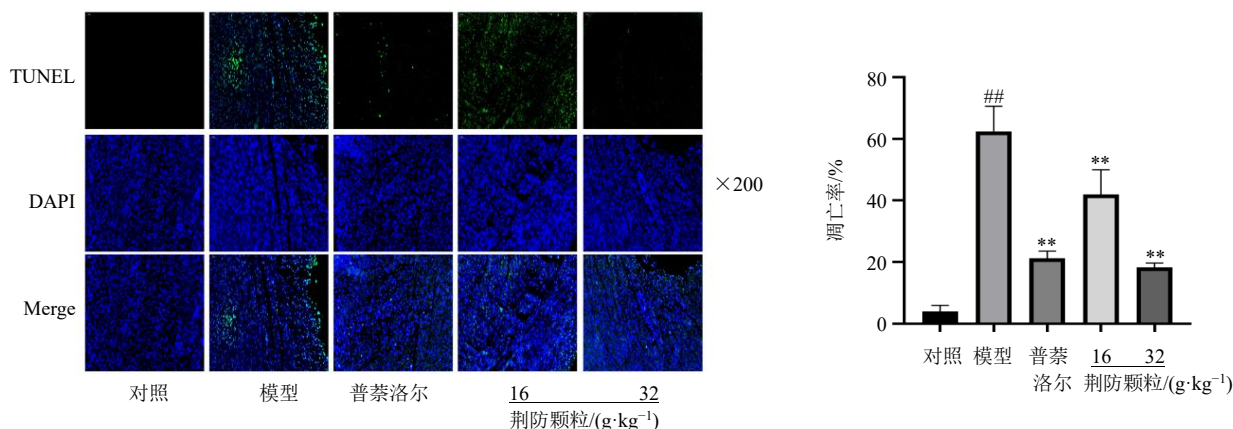


图 6 荆防颗粒对 AMI 大鼠心肌细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Effect of Jingfang Granules on apoptosis of cardiomyocytes in AMI rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

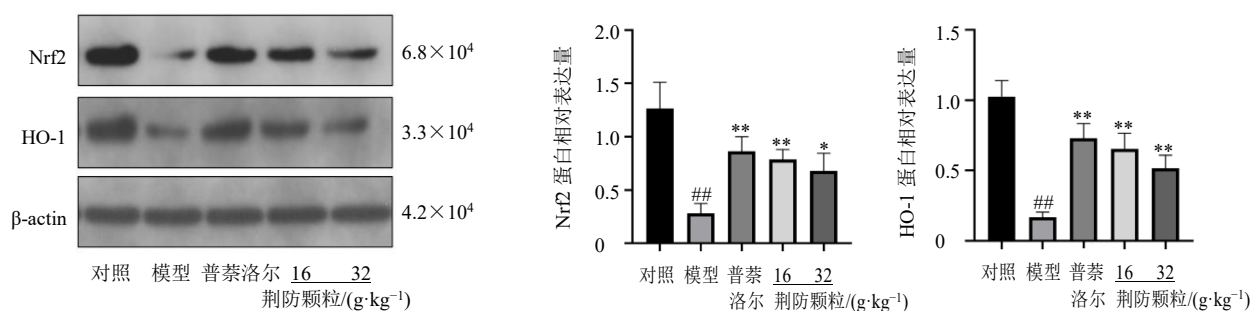


图 7 荆防颗粒对 AMI 大鼠心肌组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of Jingfang Granules on Nrf2 and HO-1 protein expressions in myocardial tissue of AMI rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠心肌组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)。表明荆防颗粒可能通过调控 Nrf2/HO-1 通路来减轻机体氧化应激和细胞凋亡水平, 减轻心肌缺血损伤。

4 讨论

AMI 是临床常见的一种急性缺血性心脏病, 其发病率逐年上升, 严重威胁着人类的生命健康^[11]。目前 AMI 的主要治疗手段是血管成形术和溶栓治疗后对缺血区域进行再灌注, 然而血运重建法对心肌细胞可造成进一步的损伤, 严重者可诱发心力衰竭, 这需要寻找新的预防和治疗 AMI 的药物。异丙肾上腺素是一种合成的儿茶酚胺^[12], 其诱发的 AMI 模型与临床患者发病相似, 且具有简单方便、动物死亡率低、模型稳定等优点, 因此异丙肾上腺素诱导的 AMI 可作为用于心脏保护药物的开发和研究的标准化模型^[13]。

AMI 可归类为中医“胸痹”范畴, 治疗以“温经散寒, 理气活血”为主。荆防败毒散^[14]首载于明代张时彻《摄生众妙方》, 方中荆、防与二活开表透外; 前、柴二胡枢利出入气机; 枳壳、桔梗提壶揭盖, 升降上下之气机; 茯苓、甘草补脾利水以安五脏, 诸药合用可以促进气机流转, 开上导下, 升清降浊, 推动脏腑的新陈代谢, 可有效缓解人体气血瘀滞状态, 对心脏发挥保护作用。现代药理研究也证实了荆防败毒散具有很好的活血化瘀、解热、镇痛、抗炎作用, 已广泛应用于治疗外感内伤各科疾病^[15]。

在心脏疾病中, 心电图是临床最常用的检测手段, 当 AMI 发生时, 会出现心电图 ST 段的特异性改变, 故 ST 段的变化幅度可基本反映心肌梗死的严重程度。超声心动也是检测心脏功能的重要手段, 超声心动中的 EF 和 FS 常作为心脏功能检测的重要指标, 当心肌发生缺血损伤时, EF 和 FS 会低于正常值。本研究发现, 模型组大鼠心电图 ST 段显著抬高 ($>0.2 \text{ mV}$), EF 和 FS 显著降低; 荆防颗粒可显著降低心电图 ST 段的抬高, 并明显升高了 EF、FS 值, 表明荆防颗粒具有正向肌力作用, 可减少异丙肾上腺素对心肌的损伤。

当心肌发生缺血梗死时, 心肌细胞膜遭到破坏而使心肌酶释放到血液中, 其中 CK-MB、LDH 和 AST 活性可以反映缺血损伤的程度。此外, 血脂异常是心肌梗死发病最常见的危险因素, 脂质代谢异

常导致脂质在动脉内膜的沉积, 进而促进心肌梗死的发生^[16-17]。能量供应不足是心肌细胞损伤的重要因素, 心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度升高可使心肌收缩力和需氧量增加, 心肌的过度收缩可导致 ATP 降解, 最终导致心肌细胞损伤^[18]。心肌细胞膜上的钠钾泵和钙镁泵在维持细胞内 Ca^{2+} 浓度方面具有重要作用^[19], 其活性降低可引起细胞内的 Ca^{2+} 超载, 进而引起心肌细胞的凋亡, 异丙肾上腺素可通过激活腺苷酸环化酶-环磷酸腺苷-蛋白激酶 A (adenylate cyclase-adenosine cyclophosphate-protein kinase A, AC-cAMP-PKA) 信号转导通路而介导钙通道的磷酸化, 进而使 Ca^{2+} 内流增加导致钙超载。本研究发现荆防颗粒可以降低血清中心肌标志酶 (CK-MB、LDH、AST) 活性和 TC、TG、LDL-C 水平, 升高 HDL-C 水平, 并且增加 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATP 酶活性来发挥心脏保护作用。

氧化应激在 AMI 发病过程中发挥着重要作用, 大剂量重复使用异丙肾上腺素会诱导自由基介导的脂质过氧化, 从而通过缺氧、钙超载和心肌细胞膜丢失来增强心肌细胞中的氧化应激反应^[20-21]。心肌细胞在病理过程中会产生大量的 ROS, 对细胞膜内的蛋白质和 DNA 造成氧化损伤, 并最终导致能量代谢发生变化, 继而引起细胞坏死和凋亡^[22]。MDA 是 ROS 的一种稳定代谢物, 是作为多不饱和脂肪酸过氧化而产生的一种氧化应激标志物, 急性缺血损伤引起的低氧水平和氧化应激可导致 MDA 在心肌中积累^[23]。SOD、MDA、GSH 和 CAT 等自由基清除酶是抗氧化系统的第一道防线, SOD 通常存在于质膜中, 其活性降低是氧化应激的显著标志。GSH 通过减少过氧化氢和脂质过氧化来保护细胞膜免受氧化损伤。CAT 是一种四聚体血红蛋白, 可作为去除过氧化氢的催化剂。本研究结果显示, 荆防颗粒显著增加心肌组织中 SOD、CAT 活性及 GSH 水平, 降低 ROS 和 MDA 水平, 说明荆防颗粒可以提高体内抗氧化酶活性, 对抗自由基引发的脂质过氧化反应, 保护缺血心肌细胞^[24-25]。

细胞凋亡是异丙肾上腺素诱导 AMI 的主要病理机制, 可导致缺血区和缺血边界的心肌细胞死亡, 进而发展为 AMI, 并最终引发心力衰竭^[26]。细胞凋亡是由多基因控制, 通过信号转导通路介导的复杂过程。多项研究表明, Nrf2/HO-1 是维持心肌细胞氧化还原稳定的重要信号通路。Nrf2 是一种与氧化还原相关的转录因子, 对氧化损伤有保护作用。在

生理状态下, Nrf2 与其抑制剂 Keap1 作为异二聚体结合在细胞质中, 在缺血缺氧条件下, Nrf2 与 Keap1 分离后进入细胞核, 与细胞内的抗氧化反应元件 (anti-oxidant response element, ARE) 结合, 进而上调 HO-1 及相关抗氧化基因的表达, 从而抑制细胞凋亡。本研究结果表明, 荆防颗粒可显著降低 AMI 大鼠心肌细胞凋亡, 上调心肌组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平, 表明荆防颗粒可以激活 Nrf2/HO-1 通路, 从而抑制细胞凋亡, 减轻心肌缺血损伤。

综上所述, 荆防颗粒能够通过减少心肌梗死面积、降低心肌酶活性、增加自由基清除酶活性、抑制细胞凋亡, 从而发挥对急性缺血心肌损伤的预防性保护作用, 其作用机制可能为通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路来调控氧化应激和细胞凋亡。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Davidson S M, Ferdinandy P, Andreadou I, *et al.* Multitarget strategies to reduce myocardial ischemia/reperfusion injury: JACC review topic of the week [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73(1): 89-99.
- [2] Emile S H, Khan S M, Barsoum S H. Predictors of bowel necrosis in patients with acute mesenteric ischemia: Systematic review and Meta-analysis [J]. *Updates Surg*, 2021, 73(1): 47-57.
- [3] Kartschmit N, Birnbach B, Hartwig S, *et al.* Knowledge of symptoms of acute myocardial infarction, reaction to the symptoms, and ability to perform cardiopulmonary resuscitation: Results from a cross-sectional survey in four regions in Germany [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 897263.
- [4] Yoon C W, Oh H, Lee J, *et al.* Comparisons of prehospital delay and related factors between acute ischemic stroke and acute myocardial infarction [J]. *J Am Heart Assoc*, 2022, 11(9): e023214.
- [5] Sun L L, Jia H M, Yu M, *et al.* *Salvia miltiorrhiza* and *Pueraria lobata*, two eminent herbs in Xin-Ke-Shu, ameliorate myocardial ischemia partially by modulating the accumulation of free fatty acids in rats [J]. *Phytomedicine*, 2021, 89: 153620.
- [6] Wei N, Chi M, Deng L, *et al.* Antioxidation role of different lateral stellate ganglion block in isoproterenol-induced acute myocardial ischemia in rats [J]. *Reg Anesth Pain Med*, 2017, 42(5): 588-599.
- [7] Emran T, Chowdhury N I, Sarker M, *et al.* L-carnitine protects cardiac damage by reducing oxidative stress and inflammatory response via inhibition of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta against isoproterenol-induced myocardial infarction [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 143: 112139.
- [8] 孙铭鸿, 张艳, 肖阳, 等. 冠心病不同类型与中医病机辨证的关系 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15(4): 507-508.
- [9] 谢连娣, 刘洋, 周琨, 等. 心肌缺血再灌注损伤的中医病机浅识 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(9): 3139-3141.
- [10] Zhang T P, Dang M Y, Zhang W Z, *et al.* Gold nanoparticles synthesized from *Euphorbia fischeriana* root by green route method alleviates the isoprenaline hydrochloride induced myocardial infarction in rats [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2020, 202: 111705.
- [11] Xing N, Wang Y, Wang W J, *et al.* Cardioprotective effect exerted by Timosaponin BII through the regulation of endoplasmic stress-induced apoptosis [J]. *Phytomedicine*, 2020, 78: 153288.
- [12] Yang Q, Huang D D, Li D G, *et al.* Tetramethylpyrazine exerts a protective effect against injury from acute myocardial ischemia by regulating the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2019, 24: 17.
- [13] Greaves K, Dixon S R, Coker I O, *et al.* Influence of isoprostane F2alpha-III on reflow after myocardial infarction [J]. *Eur Heart J*, 2004, 25(10): 847-853.
- [14] 赵琰, 胡杰, 张贵民, 等. 荆防败毒散的源流与应用 [J]. 环球中医药, 2020, 13(11): 1996-2002.
- [15] 曹天佑, 屈会化, 董利洋, 等. 荆防颗粒对马兜铃酸 I 致小鼠急性肾损伤的预防和保护作用研究 [J]. 中草药, 2022, 53(18): 5742-5749.
- [16] Lee J, Ko A R, Beom J W, *et al.* RAAS inhibitors in AMI patients with hypertension and preserved left ventricular systolic function [J]. *Eur J Heart Fail*, 2022, 24: 108.
- [17] Xie Y H, Lu L, Chen B L. Asymmetrical alternating current electrochemically-mediated washing method for susta RAAS inhibitors in AMI patients with hypertension and preserved left ventricular systolic function inable remediation of Cr(VI)-contaminated soil [J]. *J Hazard Mater*, 2022, 437: 129088.
- [18] Su X M, Lv L F, Li Y, *et al.* lncRNA MIRF promotes cardiac apoptosis through the miR-26a-Bak1 axis [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 20: 841-850.
- [19] Jin T T, Lin J, Gong Y C, *et al.* iPLA2 β contributes to ER stress-induced apoptosis during myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1446.
- [20] Guo J C, Yang Z Z, Lu Y Z, *et al.* An antioxidant system

- through conjugating superoxide dismutase onto metal-organic framework for cardiac repair [J]. *Bioact Mater*, 2021, 10: 56-67.
- [21] Park J H, Nho K J, Lee J Y, *et al*. Anti-ischemic effects of PIK3IP1 are mediated through its interactions with the ET A-PI3K γ -AKT axis [J]. *Cells*, 2022, 11(14): 2162.
- [22] Zou J, Fei Q, Xiao H, *et al*. VEGF-A promotes angiogenesis after acute myocardial infarction through increasing ROS production and enhancing ER stress-mediated autophagy [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 17690-17703.
- [23] Song Y F, Wang B C, Zhu X L, *et al*. Human umbilical cord blood-derived MSCs exosome attenuate myocardial injury by inhibiting ferroptosis in acute myocardial infarction mice [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2021, 37(1): 51-64.
- [24] 冯芹, 张贵民. 荆防败毒散治疗急性呼吸道感染的临床应用以及作用机制的探讨 [J]. *中药与临床*, 2020, 11(3): 28-32.
- [25] 彭文杰, 颜学桔, 刘光宪. 刘光宪应用荆防败毒散化裁治疗外感发热经验 [J]. *湖南中医杂志*, 2016, 32(7): 18-19.
- [26] Chen Q X, Su L A, Liu C F, *et al*. PRKAR1A and SDCBP serve as potential predictors of heart failure following acute myocardial infarction [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 13.

[责任编辑 李亚楠]