

复方丹参滴丸调控 LOX-NF- κ B 炎症途径治疗心肌缺血的机制研究

曹博雅¹, 陈家黎², 石晓溪³, 李东岳², 卢令慧², 高阔², 王伟⁴, 曹俊岭^{1,5*}, 张建^{6*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029
2. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029
3. 北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029
4. 广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 510700
5. 北京中医药大学东方医院, 北京 100029
6. 北京中医药大学生命科学院, 北京 100029

摘要: **目的** 基于动物心肌缺血模型及体外心肌细胞损伤模型探究复方丹参滴丸调控脂氧合酶 (lipoxygenase, LOX)-核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 途径抑制炎症反应治疗心肌缺血的作用机制。**方法** 采用冠状动脉左前降支结扎术制备大鼠心肌缺血模型, 心电图检测心肌缺血情况; Western blotting 检测心肌组织 LOX 途径关键酶 LOX5、LOX12、LOX15 及下游分子 p-NF- κ B p65 和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 的蛋白表达。体外培养 H9c2 心肌细胞, 采用缺氧缺糖 6 h 诱导心肌细胞损伤模型, 荧光倒置显微镜下观察心肌细胞形态; MTT 法检测细胞活力; Western blotting 检测 LOX-NF- κ B 途径相关蛋白表达。**结果** 复方丹参滴丸显著抑制心肌缺血大鼠心肌组织中 LOX5、LOX12、LOX15 和 IL-1 β 的蛋白表达及 NF- κ B p65 的磷酸化水平 ($P < 0.01$ 、 0.001)。体外细胞实验结果显示复方丹参滴丸明显改善 H9c2 心肌细胞缺氧缺糖损伤, 显著提高心肌细胞存活率 ($P < 0.01$ 、 0.001), 降低 LOX5、LOX12、LOX15 和 IL-1 β 的蛋白表达及 NF- κ B p65 的磷酸化水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。**结论** 复方丹参滴丸可通过抑制 LOX-NF- κ B 炎症途径减轻心肌缺血损伤。

关键词: 复方丹参滴丸; 心肌缺血; 炎症; 脂氧合酶; 核因子- κ B

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)01-0151-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.01.018

Mechanism of Compound Danshen Dripping Pills against myocardial ischemia based on LOX-NF- κ B pathway

CAO Bo-ya¹, CHEN Jia-li², SHI Xiao-xi³, LI Dong-yue², LU Ling-hui², GAO Kuo², WANG Wei⁴, CAO Jun-ling^{1,5}, ZHANG Jian⁶

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
2. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
3. Third Affiliated Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
4. School of Basic Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510700, China
5. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
6. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Compound Danshen Dripping Pills (复方丹参滴丸) on treatment of myocardial ischemia by regulating lipoxygenase (LOX)-nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway to inhibit inflammatory response based on animal models of myocardial ischemia and *in vitro* myocardial cell injury model. **Methods** The rat model of myocardial ischemia was established by ligation of left anterior descending coronary artery, with myocardial ischemia detected by ECG; Protein expressions of

收稿日期: 2022-09-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82004095); 国家自然科学基金资助项目 (81903950); 国家自然科学基金资助项目 (81904169); 中央高校基本科研业务费专项 (2021-JYB-XJSJ031, 2019-JYB-JS-095, 2022-JYB-XJSJ008)

作者简介: 曹博雅, 硕士研究生, 研究方向为心血管药理学。E-mail: bucmcb@163.com

*通信作者: 张建, 讲师, 研究方向为中医药防治心血管疾病的基础研究。E-mail: zhangjian3428@126.com

曹俊岭, 主任药师, 博士生导师, 研究方向为药理学、医院药学。E-mail: caojunling72@163.com

LOX5, LOX12, LOX15, p-NF- κ B p65 and interleukin-1 β (IL-1 β) were detected by Western blotting. H9c2 cardiomyocytes were cultured *in vitro*, and the model of myocardial cell injury was induced by deprivation of oxygen-glucose (OGD) for 6 h, morphology of myocardial cells was observed under fluorescence inverted microscope; Cell viability was detected by MTT; Western blotting was used to detect LOX-NF- κ B pathway related protein expressions. **Results** Compound Danshen Dripping Pills significantly inhibited the protein expression levels of LOX5, LOX12, LOX15, p-NF- κ B p65 and IL-1 β in myocardial tissues of rats with ischemia ($P < 0.01, 0.001$). The *in vitro* cell experiments indicated that Compound Danshen Dripping Pills could dramatically improve the OGD injury of H9c2 myocardial cells, significantly increase the survival rate of myocardial cells ($P < 0.01, 0.001$), and reduce LOX5, LOX12, LOX15 and IL-1 β protein expressions and NF- κ B p65 phosphorylation level ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** Compound Danshen Dripping Pills can alleviate myocardial ischemia injury by inhibiting LOX-NF- κ B inflammatory pathway.

Key words: Compound Danshen Dripping Pills; myocardial ischemia; inflammation; lipoxygenase; nuclear factor- κ B

心肌缺血性损伤是全球心血管疾病死亡的十大主要原因之一，是危害人类健康的最常见、最严重的疾病之一^[1]。心肌缺血是指心脏血液灌注减少，心脏供氧量降低，心肌能量代谢异常，从而不能维持心脏正常功能的病理状态^[1-2]。心肌缺血会引发心脏病理性炎症，持续失调的炎症反应会加重心肌组织损伤，导致心肌缺血最终发展为心衰^[3-4]。研究表明，脂氧合酶 (lipoxygenase, LOX) 途径介导的花生四烯酸代谢及其代谢产物引发的炎症反应与心肌缺血密切相关^[5-8]。LOX 是参与花生四烯酸代谢的关键酶之一，在刺激炎症反应中起重要作用^[9]。经 LOX 代谢途径产生的代谢产物白三烯 (leukotrienes, LTs) 是炎症反应中的炎性介质之一，具有增加血管通透性、引起血浆渗出和白细胞趋化等功能^[10]，这些产物还会触发炎症信号级联反应如核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 的激活^[11-12]，NF- κ B 在机体的免疫反应、炎症过程中参与调节细胞凋亡、增殖及应激反应，是细胞内的关键信号通路之一^[13-16]，且 NF- κ B 信号通路对于诱导各种炎症相关细胞因子和介质至关重要，包括白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等^[17-18]。研究表明，抑制炎症反应及减少炎症因子释放可治疗心肌缺血^[19-22]。因此，抑制炎症反应可以是减轻心肌缺血损伤的有效策略之一。

复方丹参滴丸由丹参、三七和冰片 3 味中药组成，具有活血化瘀、理气止痛的功效，主治气滞血瘀所致的胸痛，是中医治疗冠心病、心绞痛等心脏疾病的常用药。大量研究表明，复方丹参滴丸具有抗炎^[23]、促进冠脉微循环^[24]、抑制血小板活化和聚集^[25-26]、改善心肌能量代谢^[27-28]等多种药理活性，但其通过抗炎而抑制心肌缺血损伤的机制尚不完全清楚。基于 LOX-NF- κ B 炎症途径在介导心肌缺血

损伤中的重要作用，本研究探究了复方丹参滴丸通过抗炎而治疗心肌缺血的作用机制。

1 材料

1.1 动物与细胞

48 只 SPF 级雄性 SD 大鼠，体质量 220~240 g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，合格证号 SCXK (京)-2016-0006。动物饲养于北京中医药大学动物房，温度 (23±2) °C，湿度 (40±5) %，12 h 光照和黑暗循环，自由进食饮水。动物实验经北京中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 BUCM-4-2021100904-4166)。

H9c2 大鼠心肌细胞购自北京协和细胞库。

1.2 药品与试剂

复方丹参滴丸 (批号 Z10950111) 购自天津天士力医药集团股份有限公司；卡维地洛 (批号 0K0254D26) 购自齐鲁制药有限公司；戊巴比妥钠购自德国 Merck 公司；Zileuton (批号 15663) 购自美国 MCE 公司；PD146176 (批号 4079269)、黄芩素 (批号 MKCL8512) 购自美国 Sigma 公司；胎牛血清 (批号 2059461RP)、DMEM 培养基 (批号 8121011)、青霉素/链霉素双抗 (批号 2240831)、0.25% 胰酶 (批号 2188970) 购自美国 Invitrogen 公司；Earle's 平衡盐溶液 (批号 H23N11B131963) 购自上海源叶生物科技有限公司；MTT (批号 20200606) 购自北京百瑞极生物科技有限公司；2.5 L 厌氧产气袋 (批号 0176LJ-4) 和 2.5 L 密封厌氧罐 (批号 C-31) 购自日本三菱公司；BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 2021J1DP1511)、蛋白质相对分子质量标准 (批号 02511800)、ECL 超敏发光液 (批号 2021F0CP1050) 购自北京普利莱基因技术有限公司；LOX5 抗体 (批号 ab169755)、LOX15 抗体 (批号 ab244205)、磷酸化 NF- κ B p65 (S536) 抗体 (批号 ab76302)、IL-1 β 抗体 (批号 ab254360) 购自英

国 Abcam 公司; NF- κ B p65 抗体(批号 80979-1-RR) 购自美国 Proteintech 公司; LOX12 抗体(批号 PA578760) 购自美国 Invitrogen 公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体(批号 AB0037) 购自上海泊湾生物科技有限公司; HRP 标记的羊抗兔 IgG 多克隆抗体(批号 C1309) 购自北京普利莱基因技术有限公司。

1.3 仪器

MCO-18AIC 型 CO₂ 培养箱(日本 SANYO 公司); Epoch 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司); ECLIPSE TE2000-S 型倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司); Mini-PROTEAN Tetra 电泳及电转设备、ChemiDoc™MP 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 分组、造模与给药 48 只 SD 大鼠适应性喂养 7 d 后, 随机分为假手术组、模型组、复方丹参滴丸(170 mg/kg, 临床等效剂量)组和卡维地洛(25 mg/kg, 临床等效剂量)组, 每组 12 只。大鼠 ip 1% 戊巴比妥钠(50 mg/kg) 麻醉后, 仰卧位固定, 手术区备皮, 用碘伏消毒, 进行气管插管, 连接呼吸机, 呼吸机参数: 潮气量 6 mL, 呼吸频率 80 次/min, 呼吸比 1:2。于 3、4 肋间逐层开胸暴露心脏, 破心包膜, 取 5/0 手术缝合线于左心耳下 2 mm 处结扎冠状动脉左前降支, 在心脏表面滴 1 滴利多卡因, 清除胸腔血污, 用 2/0 缝合线逐层关胸, 脱离呼吸机。大鼠 ip 利多卡因 0.2 mL、吠塞米 0.2 mL、青霉素钠(4×10⁵ U/kg)。待手术后的大鼠恢复自主呼吸后置于电热毯上至苏醒。假手术组对冠状动脉左前降支只穿线不结扎, 其他步骤相同。

术后对大鼠行心电图检测, 将麻醉后的大鼠仰卧位固定, 参照人十二导联心电图连接电极, 设定走纸速度 25 min/s, 出现 6~8 个导联病理性 Q 波为造模成功, 剔除未成模的动物。术后 24 h 各给药组开始 ig 药物, 假手术和模型组 ig 等体积生理盐水, 1 次/d, 连续 14 d, 保持每天给药时间一致。

2.1.2 大鼠心电监测、心脏取材及心脏损伤观察 在给药的第 5 天对大鼠行心电图检测, 观察药物是否在缺血的急性期就已发挥心肌保护作用。在缺血恢复期给药后的第 14 天进行心脏组织取材, 手术剪开胸, 取出全心, 置于预冷生理盐水中泵净心脏中残留的血液, 冰上剔净心耳和其他残余组织, 各

组典型心脏形态拍照记录。切取梗死边缘区组织, 液氮速冻保存, 留作 Western blotting 检测。假手术组心脏在与模型组相同位置做相同处理。

2.1.3 Western blotting 检测大鼠心肌组织相关蛋白表达 使用 RIPA 裂解液(100 g/L) 和手持匀浆器将心肌组织破碎成组织匀浆液, 于 4 °C、12 000×g 离心 10 min, 取上清。使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 完成定量后 100 °C 煮沸变性 10 min, 冷却后储存于-20 °C 冰箱。样品经 SDS-PAGE 分离, 转膜, 封闭后, 分别孵育相应的一抗和二抗后曝光并显影, 采用 Image J 软件进行灰度值分析。

2.2 体外实验

2.2.1 细胞培养 H9c2 细胞用含 10%胎牛血清和 1%青霉素/链霉素双抗的 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 在细胞融合度为 90%时传代。

2.2.2 氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)模型的建立 H9c2 细胞培养到实验所需的密度, 弃去原有培养液, PBS 清洗 2 次, 加入 Earle's 无糖平衡盐溶液, 放入缺氧小室内, 并放入厌氧产气袋, 盖紧缺氧小室的盒盖, 放入培养箱进行缺氧缺糖造模, 时间分别为 0、4、6、8 h, 然后从缺氧小室中取出, 选取当细胞活力为 50%左右的造模时间进行后续实验。

2.2.3 细胞分组与给药

(1) 复方丹参滴丸的无细胞毒性浓度和保护作用浓度测定: 复方丹参滴丸无细胞毒性浓度测定实验设置对照组和不同质量浓度(2000、1000、500、250、125 μg/mL)的复方丹参滴丸组。复方丹参滴丸保护作用浓度筛选实验设置对照组、模型组(按“2.2.2”项下方法处理)和不同质量浓度(500、250、125 μg/mL)的复方丹参滴丸组(在缺氧缺糖时分别加入含不同浓度复方丹参滴丸的 Earle's 平衡盐溶液)。

(2) 复方丹参滴丸调控 LOX-NF- κ B 炎症途径的机制研究: 设置对照组、模型组、复方丹参滴丸(500 μg/mL)组、LOX5 抑制剂 Zileuton(50 μmol/L)组、LOX12 抑制剂黄芩素(1 μmol/L)组和 LOX15 抑制剂 PD146176(1 μmol/L)组。各给药组均在造模的同时给药。

2.2.4 MTT 测定细胞活力 取生长状态良好的 H9c2 细胞, 经计数后稀释为 1×10⁵ 个/mL, 每孔 100 μL 接种到 96 孔板上, 培养 24 h, 细胞生长至约 80%时按“2.2.3 (1)”项下进行分组给药, 处理

24 h, 倒扣法倒出原有培养基, 每孔加 100 μL PBS 洗涤 2 遍后, 每孔加入 100 μL 以 PBS 配制的 0.5 g/mL 的 MTT, 放于培养箱中继续孵育 4 h, 弃去 MTT 溶液, 每孔加 150 μL DMSO 溶解结晶, 置于微量振荡器待结晶完全溶解后, 于酶标仪 570 nm 处检测吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.2.5 荧光倒置显微镜观察细胞形态 取生长状态良好的 H9c2 细胞, 经计数后稀释至 2.5×10^5 个/mL, 接种于 6 孔板中, 每孔 1 mL, 培养 24 h 后按“2.2.3 (2)”项下进行分组给药, 分别于给药前、缺氧缺糖 6 h 时, 于荧光倒置显微镜下观察细胞形态, 并拍照记录。

2.2.6 Western blotting 检测 H9c2 细胞相关蛋白表达 取生长状态良好的 H9c2 细胞, 经计数后稀释至 2.5×10^5 个/mL, 接种于 6 孔板中, 每孔 1 mL, 培养 24 h 后按“2.2.3 (2)”项下进行分组给药, 缺氧缺糖 6 h 后, 弃上清, 用预冷的 PBS 清洗 2 遍后, 每孔加入 100 μL 预冷的 RIPA 裂解液裂解 30 min, 期间反复吹打细胞使其充分裂解, 全程冰上操作。收集裂解液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、20 000 $\times g$ 离心 20 min 后收集上清。按“2.1.3”项下方法进行蛋白定量、样品制备、Western blotting 检测以及灰度分析。

2.3 统计学分析

使用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 使用 GraphPad Prism 8.0 软件作图。

3 结果

3.1 各组大鼠心电图及心脏形态比较

术后 5 d 心电图 (图 1) 结果显示, 假手术组 P 波规律出现, P-R 间期及 R-R 间期大致相同, QRS 波波形规律, 无宽大畸形, S-T 段未见明显压低及抬高。模型组 ST 段明显抬高, 呈“弓背向上”型, 为心肌梗死特异性指标, 且 QRS 波抬高、增宽。复方丹参滴丸组提示窦性心率, P 波规律出现, P-R 间期及 R-R 间期大致相同, QRS 波波形规律, 无宽大畸形, 与模型组比较, S-T 段抬高缓解。卡维地洛组心电图提示窦性心率, P 波规律出现, P-R 间期及 R-R 间期大致相同, QRS 波波形规律, 无宽大畸形, 与模型组比较, S-T 段抬高缓解。提示复方丹参滴丸在缺血的急性期已开始具有很好的心肌保护作用。术后 14 d 恢复期各组大鼠心脏取材后通过对损伤情况进行比较, 发现复方丹参滴丸组和卡维地洛

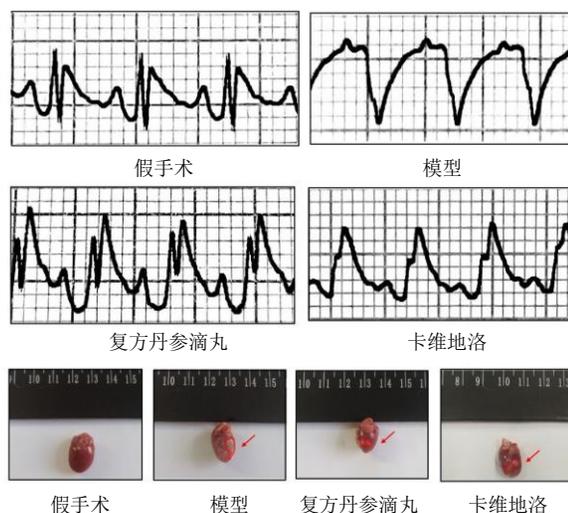


图 1 各组大鼠心电图及心脏形态

Fig. 1 Heart and electrocardiogram of rats in each group

组大鼠心肌缺血损伤区域小于模型组, 提示给药组可在一定程度上减轻心肌缺血损伤。

3.2 复方丹参滴丸对心肌缺血大鼠心肌组织相关蛋白表达的影响

如图 2 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌组织中 LOX 途径关键酶 LOX5、LOX12 和 LOX15 的蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), 提示 LOX 途径激活, 炎症反应增强; 与模型组比较, 复方丹参滴丸显著降低 LOX5、LOX12、LOX15 和 IL-1 β 的蛋白表达及 NF- κB p65 的磷酸化水平 ($P < 0.01$ 、 0.001), 表明复方丹参滴丸通过抑制 LOX 途径关键酶的蛋白表达继而降低 NF- κB p65 的磷酸化水平和 IL-1 β 的表达, 从而抑制心肌组织炎症反应, 进而发挥抗心肌缺血作用。

3.3 H9c2 细胞 OGD 模型的建立

为建立适宜的模型进行机制验证实验, 对细胞的缺氧缺糖时间进行考察。将 H9c2 细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中, 分别缺氧缺糖培养 4、6、8 h, 观察造模效果, 如图 3 所示, 当缺氧缺糖 6 h 时, 细胞活力在 50% 左右, 此时观察药物的保护作用较为合适, 故将其作为模型的缺氧缺糖时间。

3.4 复方丹参滴丸对正常 H9c2 细胞活力的影响

当药物浓度过高时, 会具有细胞毒性。为了探讨复方丹参滴丸的药理作用, 首先筛选了复方丹参滴丸的无细胞毒性浓度。如图 4 所示, 与对照组比较, 复方丹参滴丸质量浓度为 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 H9c2 细胞活力表现出明显抑制作用 ($P < 0.05$), 因此选择 125、250、500、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4 个质量浓度考察

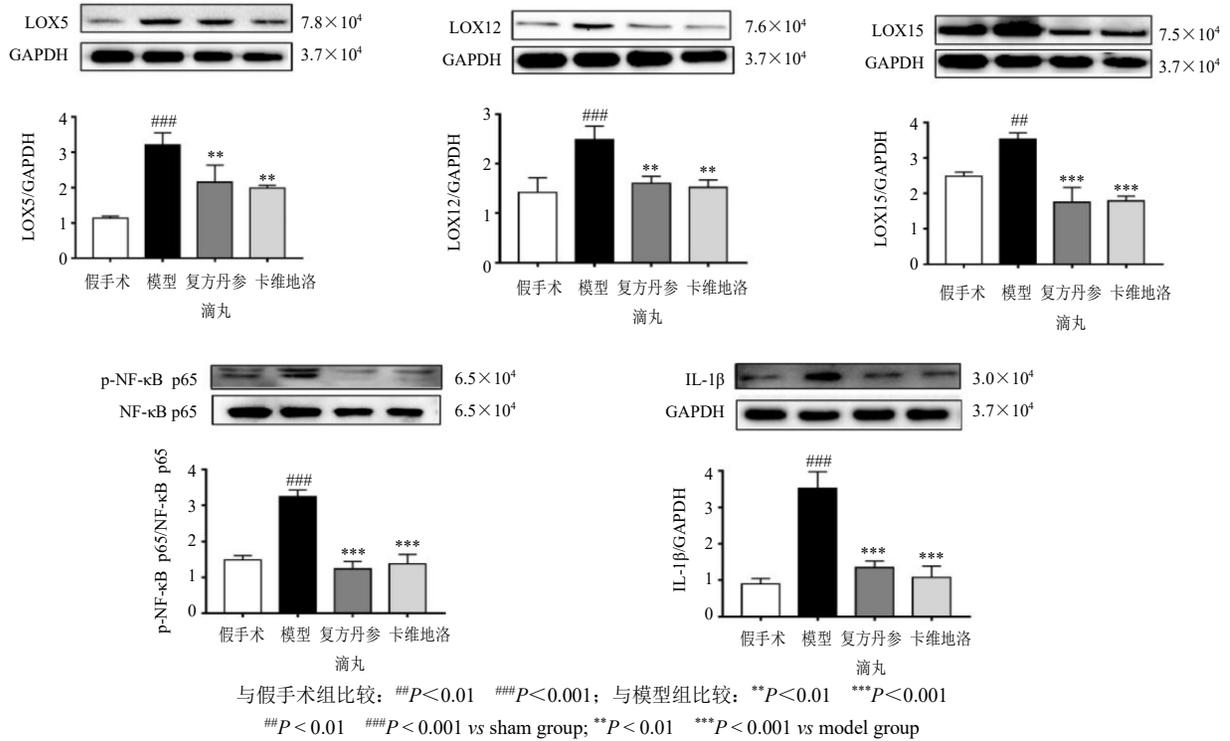


图2 复方丹参滴丸对心肌缺血大鼠心肌组织 LOX-NF-κB 途径相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of Compound Danshen Dripping Pills on LOX-NF-κB pathway related protein expressions in myocardial tissue of rats with myocardial ischemia ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

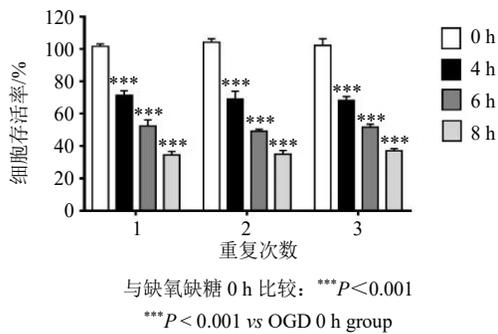


图3 缺氧缺糖不同时间下的细胞活力 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Cell viability under different time periods of oxygen-glucose deprivation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

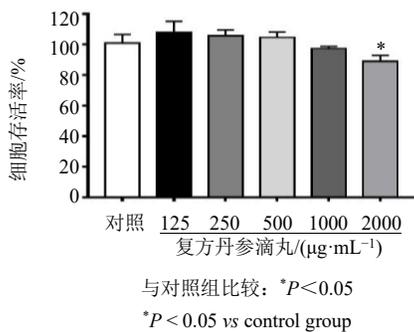
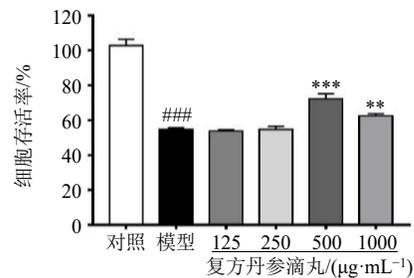


图4 复方丹参滴丸对 H9c2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 4 Effect of Compound Danshen Dripping Pills on viability of H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 复方丹参滴丸对 OGD 诱导的 H9c2 细胞活力的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组细胞活力显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 复方丹参滴丸在 500、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时均对心肌细胞活力表现显著保护作用 ($P < 0.01, 0.001$), 其中复方丹参滴丸在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对细胞活力的影响最大, 因此选择



与对照组比较: ###P < 0.001; 与模型组比较: *P < 0.05 **P < 0.01 ***P < 0.001, 图 7 同
###P < 0.001 vs control group; *P < 0.05 **P < 0.01 ***P < 0.001 vs model group, same as Fig. 7

图5 复方丹参滴丸对 OGD 诱导的 H9c2 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 5 Effect of Compound Danshen Dripping Pills on viability of OGD-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

500 μg/mL 的复方丹参滴丸作为后续探究其机制的质量浓度。

3.6 复方丹参滴丸保护 OGD 模型各时段 H9c2 细胞形态

在荧光倒置显微镜下观察 OGD 模型各时段 H9c2 细胞形态, 如图 6 所示, 给药前, 各组细胞贴

壁状态良好, 大部分呈长梭形, 细胞边缘结构清晰, 胞质透亮。对照组细胞在各时段细胞形态规则, 增长速度正常。模型组细胞在缺氧缺糖 6 h 后贴壁不牢, 细胞皱缩, 形态变得不规则, 漂浮细胞增多, 细胞数量显著减少。复方丹参滴丸组细胞贴壁数量增加, 细胞皱缩变形的现象得到改善。

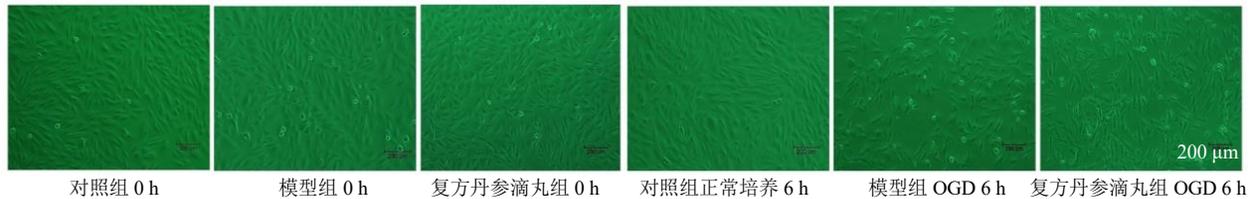


图 6 复方丹参滴丸对 H9c2 心肌细胞形态的保护作用 (×100)

Fig. 6 Protective effect of Compound Danshen Dripping Pills on morphology of H9c2 cells (×100)

3.7 复方丹参滴丸对 OGD 诱导的 H9c2 细胞相关蛋白表达的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组 LOX 途径关键酶 LOX5、LOX12 和 LOX15 的蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.001$), 提示 LOX 途径激活, 炎症反应增强; 与模型组比较, 复方丹参滴丸组 LOX5、LOX12、LOX15 和 IL-1β 蛋白表达及 NF-

κB p65 的磷酸化水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 与 LOX5 抑制剂 Zileuton、LOX12 抑制剂黄芩素、LOX15 抑制剂 PD146176 作用相似 ($P < 0.01$ 、0.001)。表明复方丹参滴丸通过抑制 LOX 途径的激活继而降低 NF-κB p65 磷酸化水平和 IL-1β 表达, 从而抑制心肌细胞炎症反应, 减少细胞丢失, 发挥对 OGD 心肌细胞损伤模型的保护作用

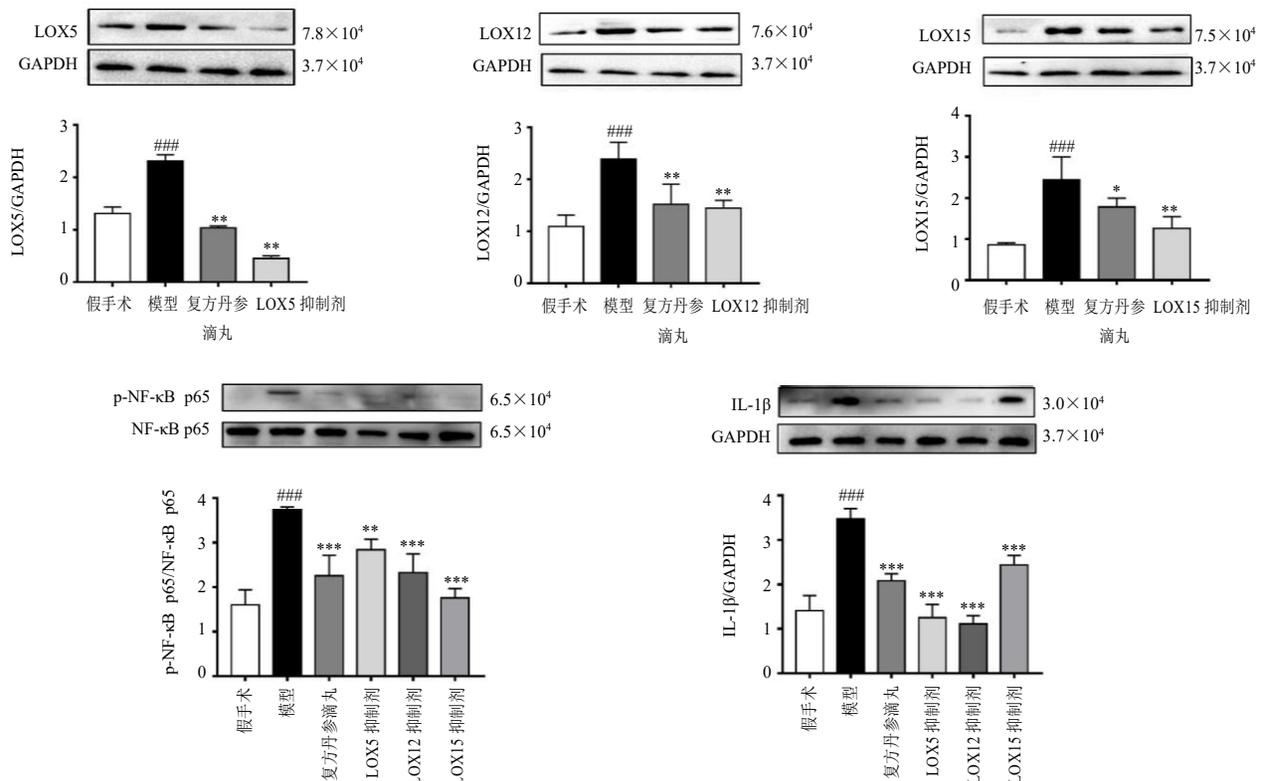


图 7 复方丹参滴丸对 OGD 诱导的 H9c2 细胞 LOX-NF-κB 途径相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of Compound Danshen Dripping Pills on LOX-NF-κB pathway related protein expressions in OGD-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

心肌缺血损伤会引起心肌细胞强烈的炎症风暴、凋亡、氧化应激等病理过程，最终导致心力衰竭。LOX 途径关键酶对心肌缺血时炎症反应的调控具有重要作用^[29-30]。研究表明，LOX15 在冠心病患者心肌组织中的表达显著增加^[31]。另有研究发现，在小鼠心肌缺血再灌注模型中 LOX5 蛋白表达量显著上调，该信号通路被显著激活^[32]，且 LOX5 抑制剂可通过减少 NF-κB 表达、抑制心肌细胞炎症和凋亡从而减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤^[33]。心肌缺血导致细胞中的 LOX 途径被激活，该途径产生的代谢产物如羟基二十碳四烯酸、白三烯等表现出多种生物活性，如增加血管通透性、促进血浆渗出以及使白细胞迁移到炎症区域等^[33-34]，这些代谢产物促进了炎症的发生发展^[35]，如白三烯可促进 NF-κB 的激活，而 NF-κB 是诱导炎症细胞因子表达的关键转录因子，激活的 NF-κB 会诱导炎症反应增强并促进炎症因子释放，因此，抑制 LOX-NF-κB 炎症途径的激活，对于减轻心肌细胞的炎症反应、改善心肌缺血损伤具有重要意义。

本研究首先采用冠状动脉左前降支结扎术构建了大鼠心肌缺血模型，在给药的第 5 天对大鼠行心电图检测，发现复方丹参滴丸在缺血的急性期已开始具有很好的心肌保护作用。在缺血恢复期给药后的第 14 天进行心脏取材，通过心脏组织损伤情况比较，发现复方丹参滴丸可在一定程度上减轻心肌缺血损伤。继而，对心肌组织 LOX5、LOX12、LOX15 和 IL-1β 的蛋白表达及 NF-κB p65 的磷酸化水平进行定量检测，结果显示模型组大鼠心肌组织中上述蛋白表达水平均显著升高，表明 LOX-NF-κB 介导的炎症途径在大鼠心肌缺血模型中被高度激活。复方丹参滴丸干预后可显著降低上述蛋白的表达水平，减小大鼠心肌组织梗死面积，减轻心脏炎症反应，改善心肌缺血现象。随后构建 H9c2 心肌细胞氧糖剥夺模型，体外模拟心肌缺血的病理状态，从 LOX-NF-κB 炎症途径探究复方丹参滴丸抗心肌缺血损伤的具体分子机制，结果同样显示，复方丹参滴丸给药后 LOX 途径关键酶 LOX5、LOX12、LOX15 表达水平显著降低，其下游蛋白 NF-κB p65 的磷酸化水平和 IL-1β 的表达水平也显著降低。由此表明复方丹参滴丸可通过抑制 LOX 途径 3 个关键酶的表达水平，继而降低了 NF-κB p65 的磷酸化水平，抑制炎症因子 IL-1β 的释放（图 8），从而减

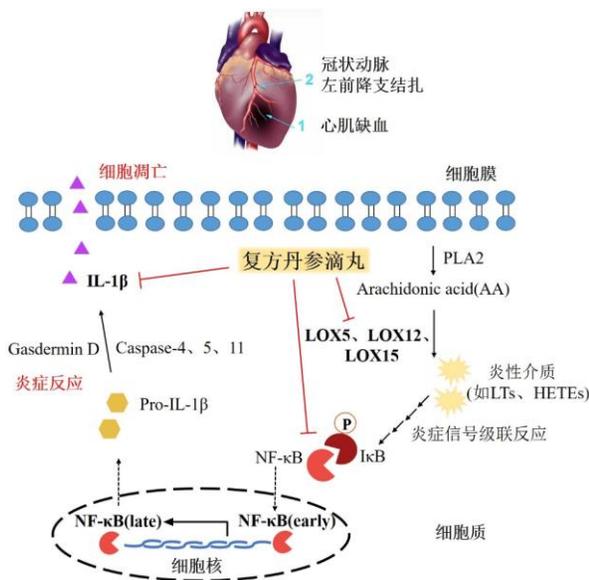


图 8 复方丹参滴丸对心肌缺血时 LOX-NF-κB 炎症途径及其下游分子的抑制作用

Fig. 8 Inhibition of Compound Danshen Dripping Pills on LOX-NF-κB inflammatory pathway and its downstream molecules

轻炎症反应和心肌细胞损伤，明显改善 OGD 损伤后心肌细胞的形态，显著缓解心肌细胞 OGD 损伤。

复方丹参滴丸是利用现代制剂工艺研制的一种中药滴丸复方制剂，具有多效应成分溶解快、易吸收、纯度高且便于服用等优点，在心肌缺血等心血管疾病的治疗中也发挥了重要作用^[36-38]。丹参酮 II_A 作为丹参的有效成分，可减少脂多糖刺激的 RAW264.7 巨噬细胞中促炎介质的产生，其机制可能为通过抑制 RAW264.7 细胞中的 NF-κB 活化以发挥抗炎活性^[39]；另有研究表明，三七的主要化学成分人参皂苷 Rg₁ 能下调脂多糖诱导的炎症细胞因子的表达，减少 Toll 样受体 4 和 NF-κB 的表达，减轻脂多糖诱导的心肌细胞炎症反应和凋亡^[40]。更多复方丹参滴丸抑制炎症反应减轻心肌缺血的效应成分需要被进一步揭示，在动物整体水平以及细胞分子水平上进行确切验证。

本研究基于体内外实验证实了复方丹参滴丸具有类似 LOX 抑制剂的作用，通过抑制 LOX 途径关键酶的激活，从而调节 LOX-NF-κB 炎症途径缓解心肌缺血损伤。为复方丹参滴丸靶向调控心肌缺血的分子机制阐明提供了科学依据，提示抑制炎症因子释放可能是预防和治疗心血管疾病的潜在策略，同时为心肌缺血引发的心血管疾病的防治提供干预机制和治疗思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wang W L, Ge T Y, Chen X, *et al.* Advances in the protective mechanism of NO, H₂S, and H₂ in myocardial ischemic injury [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2020, 7: 588206.
- [2] Fan S, Sun J B, Li R, *et al.* Lycopene protects myocardial ischemia injury through anti-apoptosis and anti-oxidative stress [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(7): 3096-3104.
- [3] Hanna A, Frangogiannis N G. Inflammatory cytokines and chemokines as therapeutic targets in heart failure [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2020, 34(6): 849-863.
- [4] Severino P, D'Amato A, Pucci M, *et al.* Ischemic heart disease and heart failure: Role of coronary ion channels [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3167.
- [5] Halade G V, Kain V, Tourki B, *et al.* Lipoxygenase drives lipidomic and metabolic reprogramming in ischemic heart failure [J]. *Metabolism*, 2019, 96: 22-32.
- [6] Kain V, Ingle K A, Rajasekaran N S, *et al.* Activation of EP4 receptor limits transition of acute to chronic heart failure in lipoxygenase deficient mice [J]. *Theranostics*, 2021, 11(6): 2742-2754.
- [7] Mashima R, Okuyama T. The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives [J]. *Redox Biol*, 2015, 6: 297-310.
- [8] Sexton A, McDonald M, Cayla C, *et al.* 12-Lipoxygenase-derived eicosanoids protect against myocardial ischemia/reperfusion injury via activation of neuronal TRPV₁ [J]. *FASEB J*, 2007, 21(11): 2695-2703.
- [9] Lončarić M, Strelec I, Moslavac T, *et al.* Lipoxygenase inhibition by plant extracts [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(2): 152.
- [10] Colazzo F, Gelosa P, Tremoli E, *et al.* Role of the cysteinyl leukotrienes in the pathogenesis and progression of cardiovascular diseases [J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 2432958.
- [11] Hu T Y, Zhang H, Chen Y Y, *et al.* Dysiarenone from marine sponge *Dysidea arenaria* attenuates ROS and inflammation via inhibition of 5-LOX/NF-κB/MAPKs and upregulation of Nrf2/HO-1 in RAW264.7 macrophages [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 587-597.
- [12] Wang D Z, Dubois R N. Eicosanoids and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(3): 181-193.
- [13] Pena E, Brito J, El Alam S, *et al.* Oxidative stress, kinase activity and inflammatory implications in right ventricular hypertrophy and heart failure under hypobaric hypoxia [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17): E6421.
- [14] Szabo T M, Frigy A, Nagy E E. Targeting mediators of inflammation in heart failure: A short synthesis of experimental and clinical results [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23): 13053.
- [15] Bezhaeva T, Karper J, Quax P H A, *et al.* The intriguing role of TLR accessory molecules in cardiovascular health and disease [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 820962.
- [16] Rasmi R R, Sakthivel K M, Guruvayoorappan C. NF-κB inhibitors in treatment and prevention of lung cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110569.
- [17] Wu J, Zhao Y M, Deng Z K. Tangeretin ameliorates renal failure via regulating oxidative stress, NF-κB-TNF-α/iNOS signalling and improves memory and cognitive deficits in 5/6 nephrectomized rats [J]. *Inflammopharmacology*, 2018, 26(1): 119-132.
- [18] Lu J S, Zhang H B, Pan J Y, *et al.* Fargesin ameliorates osteoarthritis via macrophage reprogramming by downregulating MAPK and NF-κB pathways [J]. *Arthritis Res Ther*, 2021, 23(1): 142.
- [19] Wolf D, Ley K. Immunity and inflammation in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2019, 124(2): 315-327.
- [20] Soehnlein O, Libby P. Targeting inflammation in atherosclerosis—from experimental insights to the clinic [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(8): 589-610.
- [21] Murphy S P, Kakkar R, McCarthy C P, *et al.* Inflammation in heart failure: JACC state-of-the-art review [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 75(11): 1324-1340.
- [22] Ong S B, Hernández-Reséndiz S, Crespo-Avilan G E, *et al.* Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 186: 73-87.
- [23] Yi J, Yuan C J, Ai Q, *et al.* The effects of Compound Danshen Dripping Pills and human umbilical cord blood mononuclear cell transplant after acute myocardial infarction [J]. *Exp Clin Transplant*, 2014, 12(2): 123-128.
- [24] Han J Y, Li Q, Ma Z Z, *et al.* Effects and mechanisms of compound Chinese medicine and major ingredients on microcirculatory dysfunction and organ injury induced by ischemia/reperfusion [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 177: 146-173.
- [25] Wang F, Liu Y Y, Liu L Y, *et al.* Inhibition effect of cardiogenic pills on venous thrombosis induced in rat mesentery by photochemical reaction [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2006, 34(1/2): 131-138.
- [26] Yu C, Qi D, Lian W, *et al.* Effects of danshensu on platelet aggregation and thrombosis: *In vivo* arteriovenous shunt and venous thrombosis models in rats [J]. *PLoS One*, 2014,

- 9(11): e110124.
- [27] Zou H M, Zhang B, Xu X C, *et al.* Urinary metabolomic strategy to evaluate Compound Danshen Dripping Pills for myocardial ischaemia in rats [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 112: 98-105.
- [28] Guo J H, Yong Y H, Aa J Y, *et al.* Compound Danshen Dripping Pills modulate the perturbed energy metabolism in a rat model of acute myocardial ischemia [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 37919.
- [29] Kayama Y, Minamino T, Toko H, *et al.* Cardiac 12/15 lipoxygenase-induced inflammation is involved in heart failure [J]. *J Exp Med*, 2009, 206(7): 1565-1574.
- [30] Lin B, Zhao H, Li L, *et al.* Sirt1 improves heart failure through modulating the NF- κ B p65/microRNA-155/BDNF signaling cascade [J]. *Aging*, 2020, 13(10): 14482-14498.
- [31] Magnusson L U, Lundqvist A, Asp J, *et al.* High expression of arachidonate 15-lipoxygenase and proinflammatory markers in human ischemic heart tissue [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 424(2): 327-330.
- [32] Li C, Wang J, Wang Q Y, *et al.* Qishen granules inhibit myocardial inflammation injury through regulating arachidonic acid metabolism [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36949.
- [33] Abueid L, Uslu Ü, Cumbul A, *et al.* Inhibition of 5-lipoxygenase by zileuton in a rat model of myocardial infarction [J]. *Anatol J Cardiol*, 2017, 17(4): 269-275.
- [34] Wang B, Wu L J, Chen J, *et al.* Metabolism pathways of arachidonic acids: Mechanisms and potential therapeutic targets [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 94.
- [35] He Z L, Tao D, Xiong J M, *et al.* Phosphorylation of 5-LOX: The potential set-point of inflammation [J]. *Neurochem Res*, 2020, 45(10): 2245-2257.
- [36] 郝晨伟, 李正翔, 张铭慧, 等. 丹参及其配伍制剂治疗冠心病的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(13): 4096-4106.
- [37] 刘永成, 田颖, 郭栋, 等. 复方丹参滴丸治疗原发性高血压的系统评价和 Meta 分析 [J]. *中草药*, 2022, 53(10): 3111-3124.
- [38] 陈凯, 陈敏娜, 王琼, 等. 基于网络药理学及分子对接技术的复方丹参滴丸治疗心绞痛潜在分子机制探讨 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(7): 1282-1293.
- [39] Jang S I, Kim H J, Kim Y J, *et al.* Tanshinone II_A inhibits LPS-induced NF- κ B activation in RAW264.7 cells: Possible involvement of the NIK-IKK, ERK1/2, p38 and JNK pathways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 542(1/2/3): 1-7.
- [40] Luo M, Yan D, Sun Q, *et al.* Ginsenoside Rg₁ attenuates cardiomyocyte apoptosis and inflammation via the TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(4): 2994-3004.

[责任编辑 李亚楠]