

龙血通络胶囊对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌缺血的保护作用

杨沛勋¹, 刘杰璇^{1,2,3}, 刘 婧^{2,3}, 李志强^{2,3}, 张新庄^{2,3}, 曹 亮^{2,3}, 王振中^{2,3}, 范小雪^{2,3*}, 肖 伟^{1,2,3*}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

2. 中药制药过程控制与智能制造技术全国重点实验室, 江苏 连云港 222001

3. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

摘要: 目的 探究龙血通络胶囊对异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)诱导大鼠心肌缺血的保护作用。方法 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、地奥心血康(62.50 mg/kg)组和龙血通络胶囊低、中、高剂量(103.12、206.25、412.50 mg/kg)组, 每组 10 只。各组连续 28 d 给予相应药物, 第 27、28 天给药 1 h 后, 除对照组 sc 生理盐水外, 其余各组 sc ISO (150 mg/kg)。第 1 次 sc ISO 48 h 后摘取大鼠心脏, 计算心脏指数; 采用苏木素-伊红(HE)染色观察各组大鼠心肌组织病理变化; 采用 ELISA 法检测各组大鼠血清中肌酸激酶(creatine kinase, CK)、肌酸激酶同工酶(creatine kinase-MB, CK-MB)和心肌钙蛋白-I(cardiac troponin-I, cTn-I)水平; 采用试剂盒检测大鼠血清中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)活性以及丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平; 采用 TUNEL 染色观察大鼠心肌细胞凋亡情况; 采用免疫组化法检测心肌组织中核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、血红素加氧酶-1(hemeoxygenase-1, HO-1)和剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved cysteine-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3)蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组大鼠心脏指数显著升高($P<0.001$), 血清中 cTn-I、CK-MB、CK、MDA 水平以及 LDH、AST 活性显著升高($P<0.001$), SOD 活性降低($P<0.001$), 心肌组织出现明显的病理变化($P<0.001$), 心肌细胞凋亡率显著升高($P<0.001$), 心肌组织中 cleaved Caspase-3、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$ 、 0.001)。与模型组比较, 龙血通络胶囊组大鼠心脏指数明显降低($P<0.001$), 血清中 cTn-I、CK-MB、CK、MDA 水平以及 LDH、AST 活性显著降低($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), SOD 活性显著升高($P<0.001$); 心肌组织的病理性改变得到改善($P<0.05$); 心肌组织中心肌细胞凋亡率显著降低($P<0.01$); 心肌组织中 cleaved Caspase-3 蛋白表达显著降低($P<0.05$ 、 0.01), Nrf2、HO-1 蛋白表达显著升高($P<0.01$ 、 0.001)。结论 龙血通络胶囊可改善 ISO 诱导大鼠心肌缺血损伤, 其作用机制可能是通过调节 Nrf2/HO-1 通路, 进而抑制氧化应激诱导的细胞凋亡。

关键词: 龙血通络胶囊; 心肌缺血; 氧化应激; 细胞凋亡; 核因子 E2 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(2023)20-6712-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.20.015

Protective effect of Longxuetongluo Capsule on isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats

YANG Pei-xun¹, LIU Min-xuan^{1,2,3}, LIU Jing^{2,3}, LI Zhi-qiang^{2,3}, ZHANG Xin-zhuang^{2,3}, CAO Liang^{2,3}, WANG Zhen-zhong^{2,3}, FAN Xiao-xue^{2,3}, XIAO Wei^{1,2,3}

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. National Key Laboratory of Technologies for Chinese Medicine Pharmaceutical Process Control and Intelligent Manufacture, Lianyungang 222001, China

3. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of Longxuetongluo Capsule (龙血通络胶囊) on isoproterenol (ISO)-induced myocardial ischemia in rats. **Methods** Wistar rats were randomly divided into control group, model group, Di'ao Xinxuekang (62.50 mg/kg) group and Longxuetongluo Capsule low-, medium- and high-dose (103.12, 206.25, 412.50 mg/kg) groups, with 10 rats in

收稿日期: 2023-06-20

基金项目: 2021 年国家中医药管理局岐黄学者项目(国中医药人教函[2022]6 号)

作者简介: 杨沛勋, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药效应物质基础。E-mail: yangpeixun2751@163.com

*通信作者: 肖 伟, 中国工程院院士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药新药研发及过程质量控制。E-mail: kanionlunwen@163.com

范小雪, 女, 主管药师, 研究方向为药物筛选与药效评价。E-mail: 13914779902@163.com

each group. Each group was given corresponding medication for 28 consecutive days. After 1 h of administration on 27th and 28th days, except for the control group with physiological saline, all other groups were sc ISO (150 mg/kg). The hearts of rats were collected and heart weight index was calculated 48 h after the first subcutaneous injection of ISO; Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of myocardial tissues in each group; The levels of creatine kinase (CK), creatine kinase-MB (CK-MB), cardiac troponin-I (cTn-I) were detected by ELISA; The activities of lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) and aspartate aminotransferase (AST) and level of malondialdehyde (MDA) in serum were detected by kit; TUNEL staining was used to observe the apoptosis of cardiomyocytes in rats; The expressions of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1) and cleaved cysteine-aspartate protease-3 (cleaved Caspase-3) in myocardial tissue were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with control group, heart weight index of rats in model group was significantly increased ($P < 0.001$), levels of cTn-I, CK-MB, CK, MDA and activities of LDH, AST in serum were significantly increased ($P < 0.001$), SOD activity in serum was decreased ($P < 0.001$); Obvious pathological changes were observed in myocardial tissue ($P < 0.001$), cardiomyocyte apoptosis rate was increased ($P < 0.001$); The expressions of cleaved Caspase-3, Nrf2 and HO-1 proteins in myocardial tissue were up-regulated ($P < 0.05, 0.001$). Compared with model group, heart weight index of rats in Longxuetongluo Capsule group was significantly decreased ($P < 0.001$), levels of cTn-I, CK-MB, CK, MDA and activities of LDH, AST in serum were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), SOD activity was significantly increased ($P < 0.001$); The pathological changes of myocardial tissue were ameliorated ($P < 0.05$); The cardiomyocyte apoptosis rate in myocardial tissue was significantly decreased ($P < 0.01$); The expression of cleaved Caspase-3 in myocardial tissue was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), the expressions of Nrf2 and HO-1 in myocardial tissue were significantly increased ($P < 0.01, 0.001$). **Conclusion** Longxuetongluo Capsule can ameliorate ISO-induced myocardial ischemia injury in rats, and its mechanism may be related to the regulation of Nrf2/HO-1 pathway, thereby inhibiting oxidative stress-induced apoptosis.

Key words: Longxuetongluo Capsule; myocardial ischemia; oxidative stress; cell apoptosis; nuclear factor-erythroid 2-related factor 2/heme oxygenase-1 pathway

心血管疾病是人类面临的重大健康问题，造成极为严重的社会负担^[1-2]。心肌缺血是最常见的心血管疾病，是全球最主要的死亡原因，每年约 914 万人死于心肌缺血^[3-4]。当心肌缺血发生时，会出现心肌供血供氧不足，造成心肌组织的不可逆损伤，引发心衰、心绞痛等^[5-6]。目前常采用血运重建术恢复缺血心肌血流达到治疗心肌缺血的目的，但会造成心肌组织的进一步损伤^[7-8]。中药因其具有多成分、多靶点的特点，在治疗心肌缺血方面已经取得较好的临床效果^[9]。

龙血竭是我国传统名贵中药，有“活血圣药”之称^[10]。研究发现，龙血竭具有抗血小板聚集^[11]、治疗心肌缺血的作用^[12]。龙血通络胶囊成分为龙血竭酚类提取物，是从龙血竭药材中经提取精制纯化得到的有效部位，具有活血化瘀、通络的功效，临床用于卒中病中经络（轻中度脑梗死）恢复期血瘀证。中医认为心脑血管疾病存在共同的病理基础，即本虚标实，久病入络。基于心脑相通和异病同治，后世医家提出心、脑血管疾病的同法治疗，并以益气活血、活血通络为主要治法^[13]。此外，龙血竭以及相关中成药在治疗心脑血管疾病方面的有效性也多有文献报道^[11,14-16]。因此，推测龙血通络胶囊对心脏疾病可能具有改善作用。故本研究通过 sc 异丙肾

上腺素 (isoproterenol, ISO) 建立大鼠心肌缺血模型，考察龙血通络胶囊对心肌缺血的保护作用，以期为临床上龙血通络胶囊治疗心肌缺血提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 60 只，体质量 160~180 g，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，合格证号 No.110324220102763713，许可证号 SCXK（京）2019-0010，实验动物使用许可证号 SYXK（苏）2018-0026。动物饲养于室温（22±2）℃、相对湿度 50%~60% 的环境下，大鼠分笼饲养，2 只/笼，12 h 光照/黑暗交替，自由进食饮水。动物实验经江苏康缘药业股份有限公司机构动物护理与使用委员会批准（批准号 2022073102）。

1.2 药品与试剂

龙血通络胶囊（批号 220203）由江苏康缘药业股份有限公司提供；地奥心血康胶囊（批号 211004）购自成都地奥制药集团有限公司；舒泰 50（批号 88SHA）购自法国维克有限公司；拜特速眠新（盐酸赛拉嗪注射液，批号 20210102）购自长沙拜特生物科技有限公司；盐酸异丙肾上腺素（批号 H2124300）购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；氯化钠注射液（批号 A21022302B）购自河南科

伦药业有限公司；羧甲基纤维素钠（批号 20220104）、无水乙醇（批号 20220514）购自国药集团化学试剂有限公司；4%多聚甲醛溶液（批号 20220209）购自南京森贝伽生物科技有限公司；二甲苯（批号 C14131606）、切片石蜡（批号 C12959678）、中性树胶（批号 C14203248）、伊红（批号 C1405672）、苏木素（批号 C11922494）均购自上海麦克林生化科技股份有限公司；肌酸激酶同工酶（creatine kinase-MB, CK-MB）试剂盒（批号 20220628）、心肌肌钙蛋白-I（cardiac troponin-I, cTn-I）试剂盒（批号 20220628）、乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase, LDH）试剂盒（批号 20220621）、天冬氨酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase, AST）试剂盒（批号 20220509）、总超氧化物歧化酶（total superoxide dismutase, T-SOD）试剂盒（批号 20220611）、丙二醛（malondialdehyde, MDA）试剂盒（批号 20220611）购自南京建成生物工程研究所；肌酸激酶（creatine kinase, CK）试剂盒（批号 202205）购自江莱生物技术有限公司；一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（批号 071422221206）购自上海碧云天生化科技有限公司；YF®594-Phalloidin YF®594 标记鬼笔环肽（红色，批号 GY0926）、蛋白酶 K（批号 210705L1-03）购自苏州优逸兰迪生物科技有限公司；抗荧光衰减封片剂（不含 DAPI，批号 20221101）、柠檬酸钠抗原修复液（批号 20220702）购自北京索莱宝科技有限公司；增强型 DAB 显色试剂盒（批号 CR2210090）购自武汉赛维尔生物科技有限公司；核因子 E2 相关因子 2（nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2）抗体（批号 XJ3725685）购自美国 Invitrogen 公司；血红素加氧酶-1（hemeoxygenase-1, HO-1）抗体（批号 GR3348210-20）、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗（批号 1001006230）购自艾博抗（上海）贸易有限公司；剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（cleaved cysteine-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3）抗体（批号 22）购自美国 CST 公司。

1.3 仪器

XY1000-1B 型电子天平（常州市幸运电子设备有限公司）；AL204 型电子天平[梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司]；EnSpire 型多光谱扫描酶标仪（美国 PerkinElmer 公司）；TP1020 型自动生物组织脱水机、RM2235 型切片机（德国 Leica 公司）；YD-6L 型生物组织冷冻包埋机、YD 型包埋机冷冻台、YD-

A 型生物组织摊片机、YD-B 型生物组织烤片机（金华市益迪医疗设备有限公司）；Gemini AS 型染色机（美国 Epredia 公司）；Soptop HS6 型病理切片扫描仪（宁波舜宇仪器有限公司）；IX73 型倒置荧光显微镜（日本 Olympus 公司）。

2 方法

2.1 分组、造模及给药

将 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、地奥心血康（62.50 mg/kg）组和龙血通络胶囊低、中、高剂量（103.12、206.25、412.50 mg/kg，分别相对于临床剂量的 0.5、1、2 倍）组，每组 10 只。各给药组 ig 相应药物（10 mL/kg），对照组和模型组 ig 等体积羧甲基纤维素钠溶液，1 次/d，连续 28 d。第 27 天给药 1 h 后，模型组和各给药组大鼠 sc 150 mg/kg ISO（2 mL/kg），对照组 sc 等体积生理盐水，1 次/d，连续 2 d。

2.2 体质量变化率测定

给药期间对大鼠体质量进行监测，并计算 sc ISO 后大鼠体质量变化率。

体质量变化率 = (sc ISO 后体质量 - 造模前体质量) / 造模前体质量

2.3 样本收集

第 1 次 sc ISO 48 h 后，大鼠 sc 舒泰（25 mg/kg）和拜特速眠新（6.25 mg/kg）麻醉，仰位固定大鼠，剪开腹部皮肤，腹主动脉取血，置于 4 °C 冰箱过夜，第 2 天进行离心，用于后续检测。采血后打开胸腔，迅速取出心脏，生理盐水洗涤，用吸水纸吸去心脏表面残留的液体后称定质量，然后置于 4%多聚甲醛溶液中固定保存，用于后续苏木素-伊红（HE）病理染色、TUNEL 染色和相关蛋白表达检测。

2.4 大鼠心脏指数测定

称定大鼠心脏质量和体质量，计算心脏指数。

心脏指数 = 心脏质量 / 体质量

2.5 心脏病理学观察

取固定好的各组大鼠心脏，梯度乙醇脱水，二甲苯处理后进行石蜡包埋，切片（4 μm 厚），温水展片并移到载玻片上，烘干，进行 HE 染色，于显微镜下观察各组大鼠心脏的病理变化。

2.6 血清心肌酶检测

按照试剂盒说明书检测大鼠血清中 CK、CK-MB、cTn-I 水平以及 AST、LDH 活性。

2.7 TUNEL 染色检测心肌细胞凋亡

取大鼠心脏石蜡切片，依次用二甲苯、梯度乙

醇、蒸馏水、不含 DNase 的蛋白酶 K 处理后, PBS 漂洗后, 滴加 TUNEL 检测液, PBS 漂洗, 滴加荧光标记的鬼笔环肽液, PBS 漂洗, 用抗荧光淬灭封片液封片后, 于荧光显微镜下观察并拍照。用 Image J 软件分析, 计算细胞凋亡率。

细胞凋亡率=凋亡细胞数/总细胞数

2.8 免疫组化检测心脏 cleaved Caspase-3 和 Nrf2/HO-1 通路蛋白表达

取大鼠心脏石蜡切片, 依次用二甲苯、梯度乙醇和蒸馏水脱蜡至水, 用柠檬酸钠抗原修复液对切片进行抗原修复, PBS 漂洗, 滴加 3% H₂O₂, PBS 漂洗, 滴加封闭液; 一抗孵育过夜后, 滴加二抗孵育 1 h, 滴加 DAB 显色液进行显色, 用苏木素复染, 经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片后于显微镜下观察并拍照, 并用 Image J 软件统计阳性表达面积占比, 以对照组阳性表达面积为 1, 对数据进行归一化处理。

2.9 血清中 SOD 活性和 MDA 水平检测

按照试剂盒说明书检测大鼠血清中 SOD 活性以及 MDA 水平。

2.10 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 采用 GraphPad Prism 8.0.2 统计软件, 选择单因素方差分析 (One-way ANOVA) 检验联合 Dunnett 的多重比较测试方法进行数据统计分析。等级资料和无序资料以四分位数 [M (Q1, Q3)] 描述, 采用 SPSS 20.0 统计软件, 选择 K-W 非参数检验进行数据统计分析。

3 结果

3.1 龙血通络胶囊对 sc ISO 后大鼠体质量变化率的影响

如图 1 所示, 第 1 次 sc ISO 48 h 后, 大鼠体质量降低, 而各给药组大鼠体质量均有所改善。

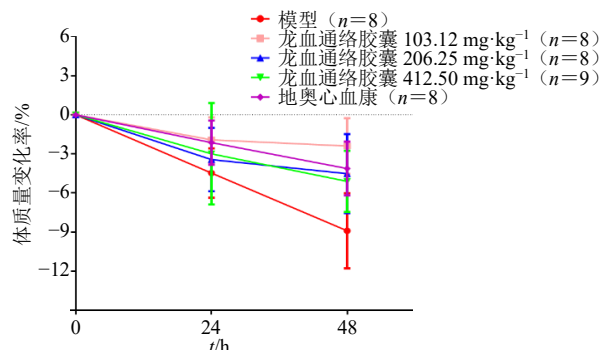
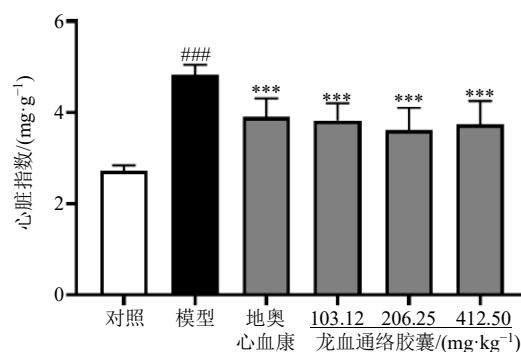


图 1 龙血通络胶囊对 sc ISO 后大鼠体质量变化率的影响
Fig. 1 Effect of Longxuetongluo Capsule on body weight change rate in rats after sc ISO

3.2 龙血通络胶囊对心肌缺血大鼠心脏指数的影响

如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠心脏指数显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组大鼠心脏指数均显著降低 ($P < 0.001$)。



对照组 $n=10$, 模型组及龙血通络胶囊低、中剂量组和地奥心血康组 $n=8$, 龙血通络胶囊高剂量组 $n=9$ 与对照组比较: $\#P < 0.05$ $\#\#\#P < 0.001$; 与模型组比较: $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ $***P < 0.001$, 下同

Control group $n=10$, model group, Longxuetongluo Capsule low-, medium-dose groups and Di'ao Xinxue Kang group $n=8$, Longxuetongluo Capsule high-dose group $n=9$ $\#P < 0.05$ $\#\#\#P < 0.001$ vs control group; $*P < 0.05$ $**P < 0.01$ $***P < 0.001$ vs model group, same as below figures

图 2 龙血通络胶囊对心肌缺血大鼠心脏指数的影响

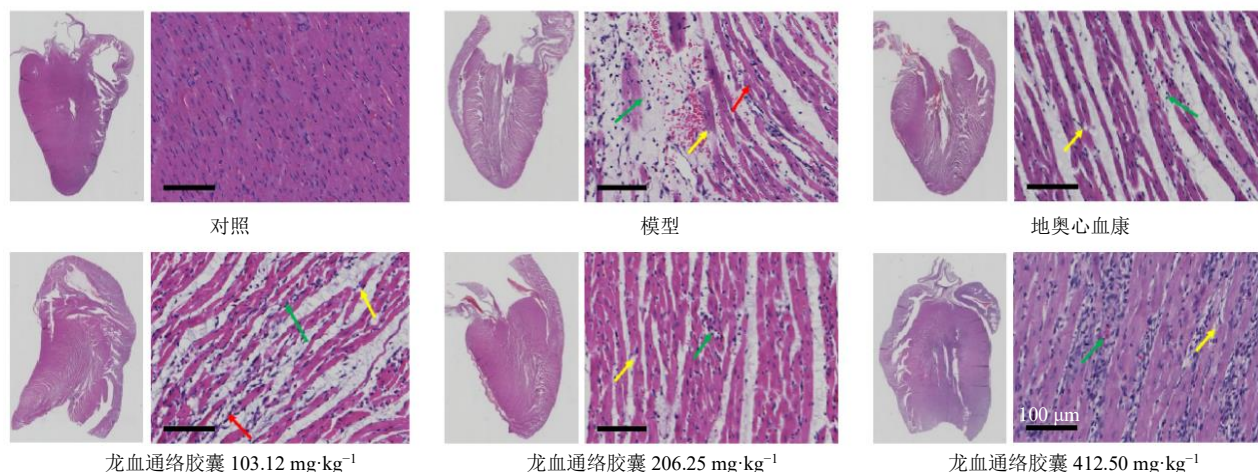
Fig. 2 Effect of Longxuetongluo Capsule on cardiac index of myocardial ischemia rats

3.3 龙血通络胶囊对心肌缺血大鼠心肌组织病理变化的影响

如图 3 和表 1 所示, 对照组大鼠心肌细胞排列整齐, 界限清晰, 呈束状分布, 心肌细胞核形态正常, 未见明显病理现象。与对照组比较, 模型组心脏组织出现严重或极严重损伤, 心肌纤维大量断裂, 细胞轮廓模糊, 细胞融合性病变坏死, 中性粒细胞大量浸润, 病理评分显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组心肌形态均得到不同程度改善, 地奥心血康组和龙血通络胶囊中、高剂量组病理评分均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.4 龙血通络胶囊对心肌缺血大鼠血清中心肌酶的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 cTn-I、CK-MB、CK 水平及 LDH、AST 活性均显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组 cTn-I 水平及 LDH、AST 活性均显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 龙血通络胶囊各剂量组 CK-MB 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 龙血通络胶囊中、高剂量组和地奥心血康组 CK 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。



黄色箭头表示心肌纤维大量断裂；红色箭头表示细胞融合性病变坏死；绿色箭头表示中性粒细胞大量浸润及出血严重

yellow arrow indicates a large amount of myocardial fiber breakage; Red arrow indicates cell fusion lesion necrosis; Green arrows indicate extensive infiltration of neutrophils and severe bleeding

图 3 龙血通络胶囊对心肌缺血大鼠心肌组织病理变化的影响

Fig. 3 Effect of Longxuetongluo Capsule on myocardial histopathology of myocardial ischemia rats

表 1 龙血通络胶囊对心肌缺血大鼠心脏组织病理评分的影响 [M(Q1, Q3)]

Table 1 Effect of Longxuetongluo Capsule on myocardial histopathology score of myocardial ischemia rats [M(Q1,Q3)]

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	病理评分
对照	—	6	0.00 (0.00, 0.00)
模型	—	6	4.00 (3.25, 4.00) ###
地奥心血康	62.50	6	2.00 (2.00, 2.00) **
龙血通络胶囊	103.12	6	3.00 (2.25, 3.00)
	206.25	6	2.00 (2.00, 2.00) *
	412.50	6	2.00 (2.00, 2.75) *

与对照组比较: ### $P<0.001$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

$P<0.001$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

3.5 龙血通络胶囊对心肌缺血大鼠心肌细胞凋亡的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠心肌组织中 cleaved Caspase-3 蛋白表达显著升高 ($P<0.001$); 与模型组比较, 各给药组 cleaved Caspase-3 蛋白表达均显著降低 ($P<0.05$ 、0.01、0.001)。

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠心肌组织中心肌细胞凋亡率显著升高 ($P<0.001$); 与模型组比较, 地奥心血康组和龙血通络胶囊高剂量组心肌组织中细胞凋亡率均显著降低 ($P<0.01$)。

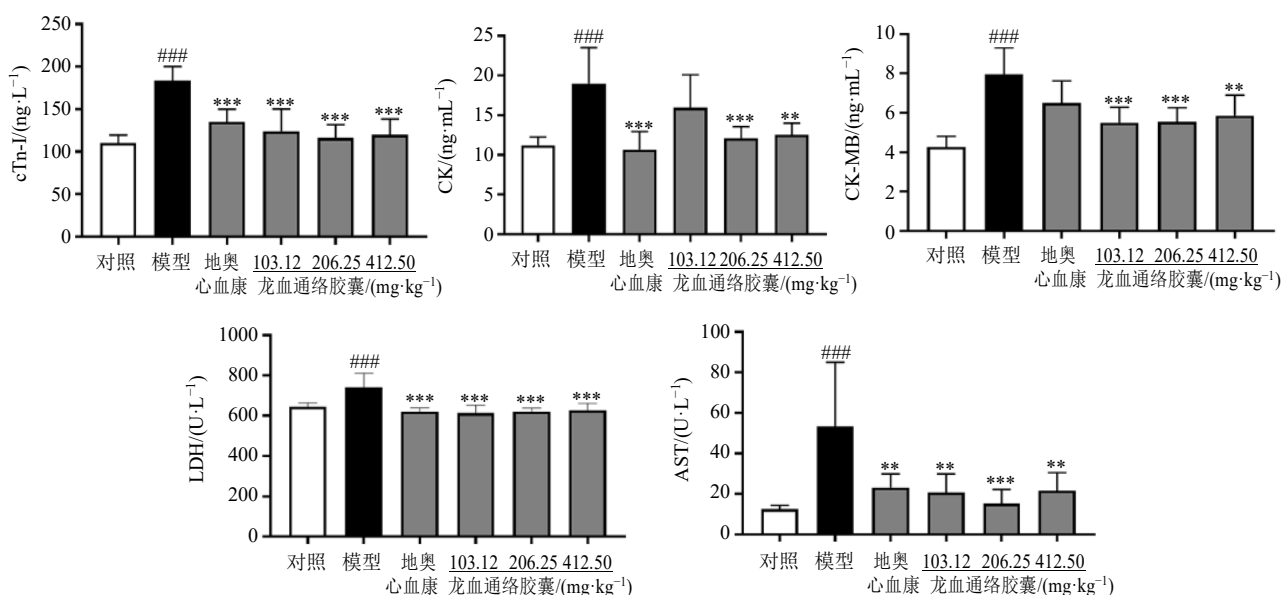


图 4 龙血通络胶囊对心肌缺血大鼠血清中心肌酶的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 4 Effect of Longxuetongluo Capsule on cardiac enzyme of myocardial ischemia rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

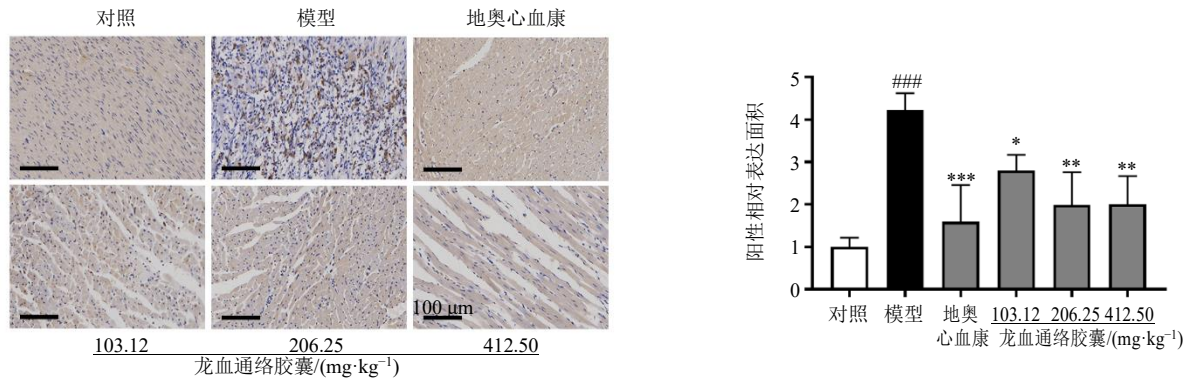


图 5 龙血通络胶囊对心肌缺血大鼠心肌组织 cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of Longxuetongluo Capsule on cleaved Caspase-3 protein expression in myocardium of myocardial ischemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

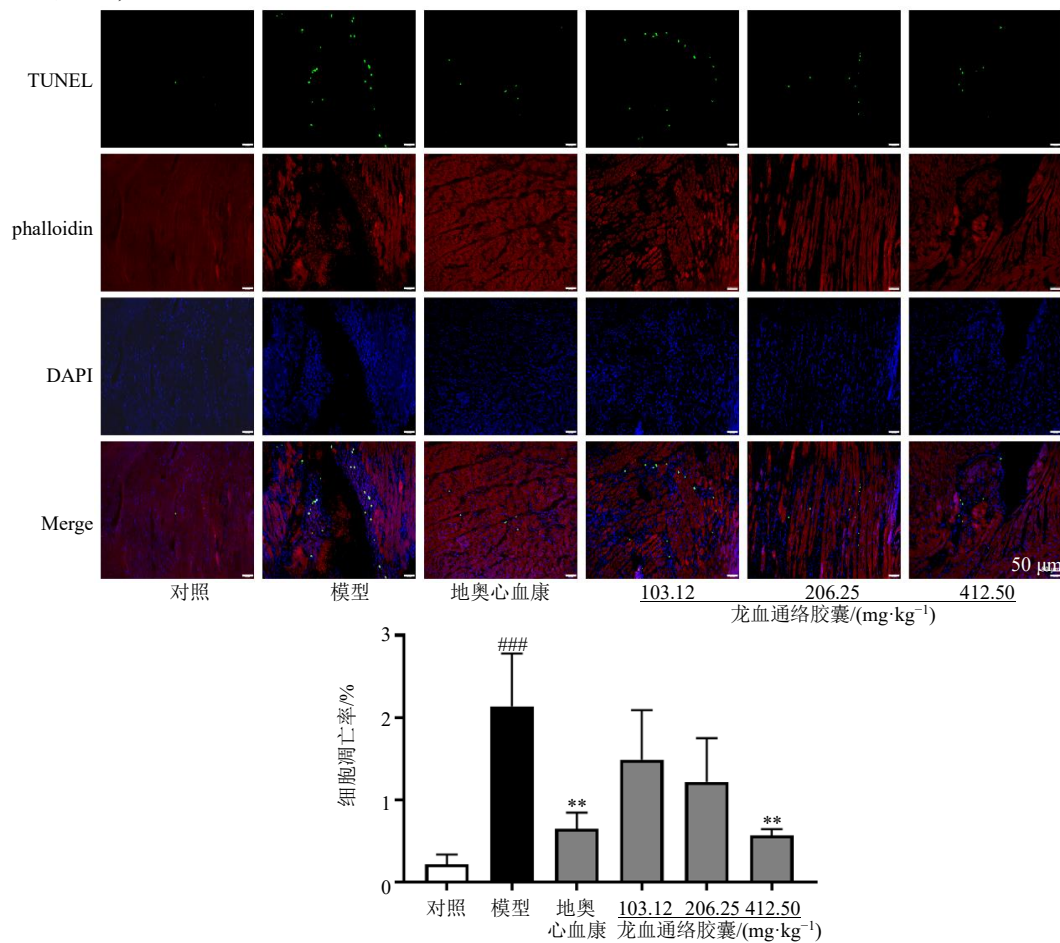


图 6 龙血通络胶囊对心肌缺血大鼠心肌细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of Longxuetongluo Capsule on myocardial cell apoptosis of myocardial ischemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 龙血通络胶囊对心肌缺血大鼠心肌组织 Nrf2/HO-1 蛋白表达的影响

如图 7 所示,与对照组比较,模型组大鼠心肌组织中 Nrf2、HO-1 表达均升高 ($P < 0.05$ 、 0.001);与模型组比较,地奥心血康组和龙血通络胶囊中、高剂量组大鼠心肌组织中 Nrf2、HO-1 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

3.7 龙血通络胶囊对心肌缺血大鼠血清中 MDA 水平和 SOD 活性的影响

如图 8 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中 MDA 水平显著升高 ($P < 0.001$),SOD 活性显著降低 ($P < 0.001$);与模型组比较,各给药组大鼠血清中 MDA 水平均显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.001),SOD 活性均显著升高 ($P < 0.001$)。

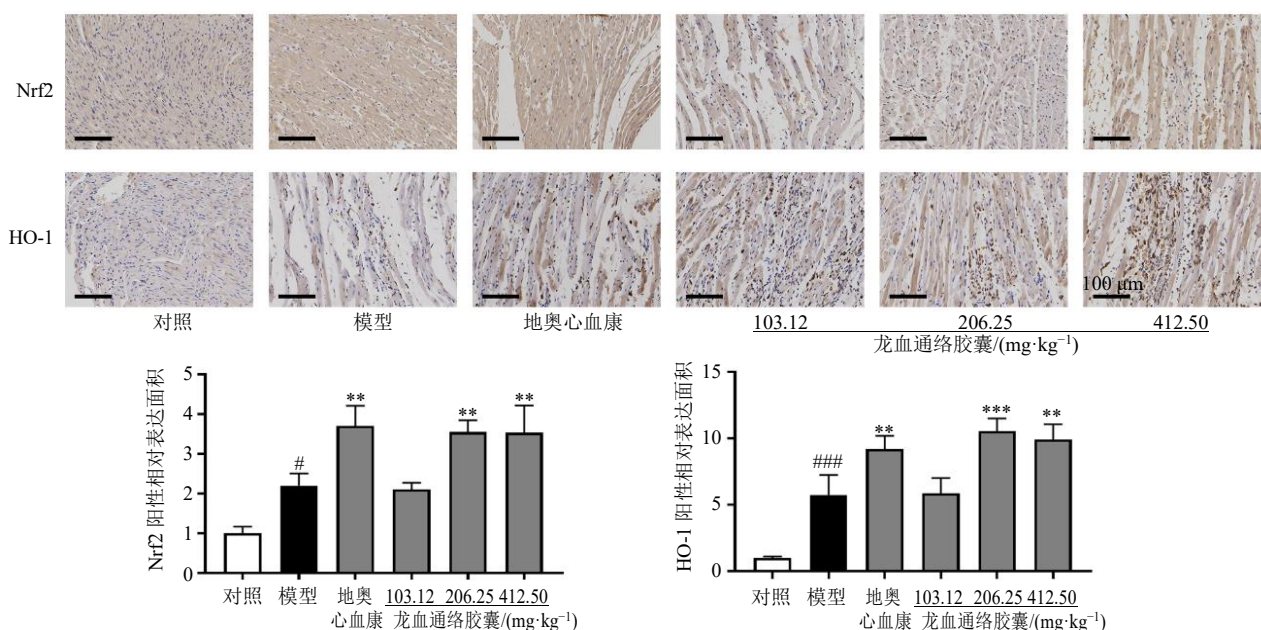


图 7 龙血通络胶囊对心肌缺血大鼠心肌组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of Longxuetongluo Capsule on Nrf2 and HO-1 protein expressions in myocardium of myocardial ischemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

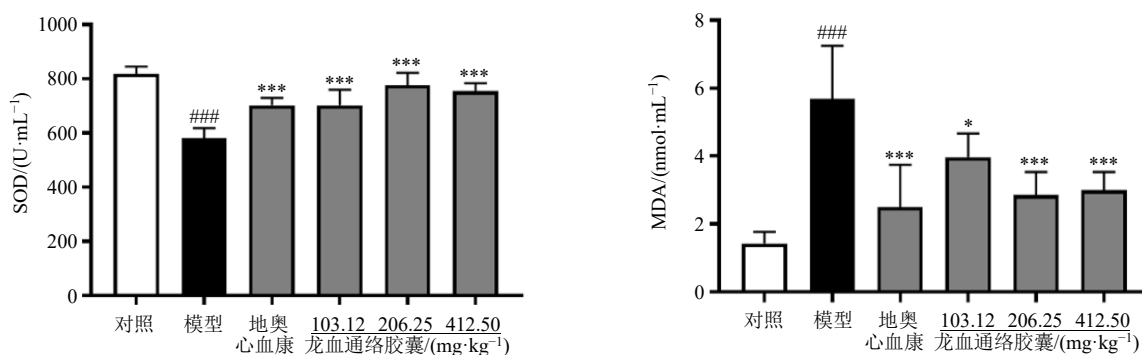


图 8 龙血通络胶囊对心肌缺血大鼠血清中 SOD 活性和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 8 Effect of Longxuetongluo Capsule on SOD activity and MDA level in serum of myocardial ischemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

心肌缺血是由于机体功能性改变或器质性病变导致心肌供血供氧不足，引发能量代谢障碍，心脏不能发挥正常功能的病理状态^[17-18]。ISO 是一种 β 肾上腺素受体激动剂，ISO 通过增加心脏耗氧量，增快心率进而引发心肌损伤^[19-20]。sc ISO 诱导的大鼠心肌缺血模型具有操作简便、模型重复率高等特点^[21]，目前已经被广泛用于心脏保护药物开发与研究^[18,22-24]，因此本实验通过皮下多点注射 ISO 构建大鼠心肌缺血模型用以研究龙血通络胶囊对心肌缺血的作用。

龙血竭是我国传统名贵中药，由叶龙血树属植物的脂木材经乙醇提取而得，龙血竭具有活血化瘀、

消肿止痛、敛疮生肌的功效^[10]。由龙血竭药材经精制研发而成的龙血通络胶囊主要用于卒中病中经络（轻中度脑梗死）恢复期血瘀证^[25-26]。中医认为心脑以脉络相连，共主神明，心脑功能的正常发挥有赖于络脉的通畅流利。气血不足、风痰瘀血阻络是心脑血管疾病的病理基础。在异病同治和心脑相通的基础上进一步发展出心、脑血管疾病的同法治疗，并提出以益气活血、活血通络为主要治法^[13,27]。提示龙血通络胶囊对于心脏疾病具有潜在作用。此外，现代药理学已经证明龙血竭以及相关中成药在治疗心脑血管疾病方面的有效性。龙血竭可以通过抑制氧化应激改善心肌缺血再灌注损伤^[11]；龙血竭提取物通过调控磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphatidylinositol

3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 通路治疗小鼠心肌梗死^[14]; 龙血通络胶囊具有改善动脉粥样硬化的作用^[15], 并且可通过抑制内质网应激改善脑缺血再灌注损伤^[16]。表明龙血竭及其相关药物在治疗心脑血管疾病方面具有显著疗效, 也提示龙血通络胶囊具有改善心肌缺血的潜在作用。

心肌缺血会造成心肌细胞膜的损伤, 从而导致心肌酶释放到血液中, 血清中心肌酶活性以及心肌蛋白水平的异常升高是评价心肌缺血的重要指标, 其中血清中 CK-MB、CK、cTn-I 水平以及 AST、LDH 活性可以反映大鼠心肌损伤程度^[28]。研究发现, 龙血竭中的活性成分能够降低 CK-MB、CK 水平和 AST、LDH 活性^[11,29], 提示龙血通络胶囊具有降低血清心肌酶的潜力。本研究发现, 与模型组比较, 龙血通络胶囊可以降低大鼠血清中 CK-MB、CK、cTn-I 水平以及 AST、LDH 活性, 表明龙血通络胶囊可以改善 ISO 造成的大鼠心肌损伤。

当 sc ISO 诱发心肌缺血时, 会加速心脏的氧气消耗, 并且由于缺血心肌的氧气供应不足, 心肌细胞进行无氧呼吸产生大量 H^+ , 破坏线粒体从而产生过量活性氧^[30-31]。过量活性氧会导致线粒体和内质网的功能障碍, 造成能量代谢障碍以及钙超载, 此外活性氧也会破坏生物膜、蛋白质以及 DNA, 这些因素互相影响, 进而引起细胞的凋亡、坏死等^[32-33]。MDA 和 SOD 是衡量氧化应激水平的标志物, 其中 MDA 作为活性氧的稳定代谢产物, 其水平反映了机体氧化应激的水平; SOD 作为一种氧化清除剂, 其活性反映了机体的抗氧化水平^[34]。龙血竭及其活性成分具有良好的抗氧化应激能力, 可以提高 SOD 活性, 并降低 MDA 水平^[35], 提示龙血通络具有抑制氧化应激的可能。本研究发现, 与模型组比较, 龙血通络胶囊显著提高大鼠血清中 SOD 活性, 降低血清中 MDA 水平, 表明龙血通络胶囊可以通过提高抗氧化水平抑制心肌缺血引起的氧化应激, 从而保护心肌细胞。

心肌组织长期缺血会诱导心肌细胞凋亡, 造成缺血部位及其周边心肌的细胞死亡, 进而导致心力衰竭^[36-37]。在心肌缺血过程中, 细胞内活性氧含量的上升是造成心肌细胞凋亡的重要因素^[31-33]。Nrf2 是与氧化应激相关的核转录因子, 可以通过调节抗氧化酶活性维持细胞氧化还原平衡。在正常生理环

境下, Nrf2 与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Kelch-like epichlorohydrin-related protein 1, Keap1) 形成低活性聚合体被细胞质中的肌动蛋白锚定。当细胞被活性氧等亲电子剂攻击时, Nrf2 从聚合体释放并转位到细胞核, 与细胞核内的 Maf 蛋白和 Jun bZip 转录因子形成异二聚体, 并被核内抗氧化反应元件 (antioxidant reaction elements, AREs) 序列识别并结合, 进而启动 Nrf2 介导的转录过程, 激活下游 HO-1 以及相关抗氧化通路, 从而抑制氧化应激, 减少心肌细胞凋亡^[38-40]。Caspase-3 是细胞凋亡的重要执行蛋白, 当发生凋亡时, Caspase-3 被剪切为 cleaved Caspase-3 而活化, 进而发挥促凋亡作用, cleaved Caspase-3 也被认为是细胞凋亡的标志物^[18,41]。现有研究发现, 龙血竭及其活性成分能够抑制细胞凋亡, 激活 Nrf2/HO-1 通路, 进而抑制氧化应激^[35,42]。提示龙血通络胶囊具有通过调节 Nrf2/HO-1 通路, 抑制细胞凋亡的可能。本研究结果显示, 与模型组比较, 龙血通络胶囊显著提高大鼠心肌组织中 Nrf2、HO-1 表达水平, 显著降低大鼠心肌组织中 cleaved Caspase-3 表达水平, 并且可以显著降低心肌组织中心肌细胞凋亡率。表明龙血通络胶囊可以通过调节 Nrf2/HO-1 通路, 从而抑制心肌细胞凋亡。

综上, 龙血通络胶囊可能通过调节 Nrf2/HO-1 通路抑制氧化应激, 减少心肌细胞凋亡, 从而减轻心肌损伤, 达到改善心肌缺血的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhao D, Liu J, Wang M, et al. Epidemiology of cardiovascular disease in China: Current features and implications [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(4): 203-212.
- [2] Sabatine M S, Giugliano R P, Keech A C, et al. Evolocumab and clinical outcomes in patients with cardiovascular disease [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(18): 1713-1722.
- [3] Nowbar A N, Gitto M, Howard J P, et al. Mortality from ischemic heart disease [J]. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*, 2019, 12(6): e005375.
- [4] Roth G A, Mensah G A, Johnson C O, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990—2019: Update from the GBD 2019 study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 76(25): 2982-3021.
- [5] Pagliaro B R, Cannata F, Stefanini G G, et al. Myocardial ischemia and coronary disease in heart failure [J]. *Heart Fail Rev*, 2020, 25(1): 53-65.
- [6] Kaski J C, Crea F, Gersh B J, et al. Reappraisal of ischemic

- heart disease [J]. *Circulation*, 2018, 138(14): 1463-1480.
- [7] Johnson T, Zhao L N, Manuel G, *et al.* Approaches to therapeutic angiogenesis for ischemic heart disease [J]. *J Mol Med*, 2019, 97(2): 141-151.
- [8] Zhang X L, Zhu Q Q, Yang J J, *et al.* Percutaneous intervention versus coronary artery bypass graft surgery in left main coronary artery stenosis: A systematic review and meta-analysis [J]. *BMC Med*, 2017, 15(1): 84.
- [9] Zhang K J, Zheng Q, Zhu P C, *et al.* Traditional Chinese medicine for coronary heart disease: Clinical evidence and possible mechanisms [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 844.
- [10] 张丽, 王绪平, 黄孝闻, 等. 血竭及龙血竭化学成分、药理作用研究进展 [J]. 中国现代应用药理学, 2019, 36(20): 2605-2611.
- [11] 陈品秋, 班玮康, 王文艳, 等. 龙血竭及其主要活性成分对脑缺血的药理作用与机制研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(18): 6172-6184.
- [12] 杨天睿, 张海燕, 叶堃, 等. 龙血竭对体外心肌缺血再灌注树鼩模型细胞凋亡及内质网应激蛋白表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(12): 7037-7042.
- [13] 孙寒梅, 李肖亮, 陈东英, 等. “脑心同治”理论之中西医结合考辨 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(22): 3383-3386.
- [14] Li C, Zhang Y, Wang Q Y, *et al.* Dragon's Blood exerts cardio-protection against myocardial injury through PI3K-AKT-mTOR signaling pathway in acute myocardial infarction mice model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 227: 279-289.
- [15] Zhou J M, Wang H M, Lv Y Z, *et al.* Anti-atherosclerotic effect of Longxuetongluo Capsule in high cholesterol diet induced atherosclerosis model rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 793-801.
- [16] Pan B, Sun J, Liu Z Y, *et al.* Longxuetongluo Capsule protects against cerebral ischemia/reperfusion injury through endoplasmic reticulum stress and MAPK-mediated mechanisms [J]. *J Adv Res*, 2021, 33: 215-225.
- [17] 张丽, 黄思敏, 董业红, 等. 葛根、粉葛对异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌缺血的影响 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(1): 125-130.
- [18] 王小平, 薛志鹏, 杜少兵, 等. 基于 PI3K/PDK1/Akt 信号通路研究丹参-红花药对对寒凝血瘀型心肌缺血大鼠的保护作用及机制 [J]. 中草药, 2022, 53(16): 5085-5092.
- [19] 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.
- [20] Dewenter M, Pan J Y, Knödler L, *et al.* Chronic isoprenaline/phenylephrine vs. exclusive isoprenaline stimulation in mice: Critical contribution of α_1 -adrenoceptors to early cardiac stress responses [J]. *Basic Res Cardiol*, 2022, 117(1): 1-23.
- [21] 王娟娟, 陈凤英. 异丙肾上腺素诱导大鼠急性心肌梗死模型的制作 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(12): 12-13.
- [22] 赵博, 屈新亮, 王祁, 等. 四逆汤对异丙肾上腺素诱导大鼠急性心肌缺血的保护作用及机制 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(3): 545-548.
- [23] Zhang X D, Li X J, Wang C L, *et al.* Ameliorative effect of ferruginol on isoprenaline hydrochloride-induced myocardial infarction in rats [J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36(2): 249-256.
- [24] Liu B, Zhang Y Q, Wu Q K, *et al.* Alleviation of isoprenaline hydrochloride induced myocardial ischemia injury by brucine through the inhibition of Na^+/K^+ -ATPase [J]. *Exp Gerontol*, 2021, 149: 111332.
- [25] 赵宾江, 王振中, 罗惠平, 等. 龙血通络胶囊治疗动脉粥样硬化性血栓性脑梗死恢复期血瘀证的随机、双盲、安慰剂对照、多中心临床试验 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(18): 3473-3477.
- [26] 朱永林. 龙血通络胶囊联合长春西汀治疗血栓性脑梗死恢复期的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(3): 469-472.
- [27] 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.
- [28] Zhao L L, Zhou Z, Zhu C S, *et al.* Luteolin alleviates myocardial ischemia reperfusion injury in rats via Sirt1/NLRP3/NF- κ B pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 85: 106680.
- [29] 梁丽梅, 冯湘玲, 刘燕, 等. 龙血竭总黄酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞的保护作用研究 [J]. 中国临床新医学, 2017, 10(9): 857-860.
- [30] Mnafigui K, Hajji R, Derbali F, *et al.* Protective effect of hydroxytyrosol against cardiac remodeling after isoproterenol-induced myocardial infarction in rat [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2016, 16(2): 147-155.
- [31] He J F, Liu D Y, Zhao L X, *et al.* Myocardial ischemia/reperfusion injury: Mechanisms of injury and implications for management (Review) [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 23(6): 430.
- [32] Bou-Teen D, Kaludercic N, Weissman D, *et al.* Mitochondrial ROS and mitochondria-targeted antioxidants in the aged heart [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 167: 109-124.
- [33] Kurian G A, Rajagopal R, Vedantham S, *et al.* The role of

- oxidative stress in myocardial ischemia and reperfusion injury and remodeling: Revisited [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 1656450.
- [34] Chen Y P, Ba L N, Huang W, *et al.* Role of carvacrol in cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through activation of MAPK/ERK and Akt/eNOS signaling pathways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 796: 90-100.
- [35] Liu Y S, Mi Y, Wang Y P, *et al.* Loureirin C inhibits ferroptosis after cerebral ischemia reperfusion through regulation of the Nrf2 pathway in mice [J]. *Phytomedicine*, 2023, 113: 154729.
- [36] Nagoor Meeran M F, Azimullah S, Adeghate E, *et al.* Nootkatone attenuates myocardial oxidative damage, inflammation, and apoptosis in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats [J]. *Phytomedicine*, 2021, 84: 153405.
- [37] Chen Q X, Su L N, Liu C F, *et al.* PRKAR1A and SDCBP serve as potential predictors of heart failure following acute myocardial infarction [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 878876.
- [38] Zhang Q, Liu J, Duan H, *et al.* Activation of Nrf2/HO-1 signaling: An important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress [J]. *J Adv Res*, 2021, 34: 43-63.
- [39] Zhang X Y, Yu Y H, Lei H Y, *et al.* The Nrf-2/HO-1 signaling axis: A ray of hope in cardiovascular diseases [J]. *Cardiol Res Pract*, 2020, 2020: 5695723.
- [40] Wang D, Chen T Y, Liu F J. Betulinic acid alleviates myocardial hypoxia/reoxygenation injury via inducing Nrf2/HO-1 and inhibiting p38 and JNK pathways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 838: 53-59.
- [41] Younis N S, Mohamed M E. Anethole's effects against myocardial infarction: The role of TLR4/NF- κ B and Nrf2/HO-1 pathways [J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 360: 109947.
- [42] Yang T R, Zhang T, Mu N H, *et al.* *Resina draconis* inhibits the endoplasmic-reticulum-induced apoptosis of myocardial cells via regulating miR-423-3p/ERK signaling pathway in a tree shrew myocardial ischemia-reperfusion model [J]. *J Biosci*, 2019, 44(2): 53.

[责任编辑 李亚楠]