

梁杏梅,刘喜华,黄建春,等. 玉朗伞查尔酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠 NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 35-41.

Liang XM, Liu XH, Huang JC, et al. Effect of yulangsan chalcone on the nuclear factor- κ B signaling pathway in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(8): 35-41.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.08.005

玉朗伞查尔酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠 NF- κ B 信号通路的影响

梁杏梅^{1,2#}, 刘喜华^{1#}, 黄建春², 陈春霞³, 陈兆霓², 黄仁彬^{2*}

(1.广西卫生职业技术学院,药学系, 南宁 530023;2.广西医科大学,药学院, 南宁 530021;
3.广西壮族自治区人民医院,科研部, 南宁 530021)

【摘要】 目的 探讨玉朗伞查尔酮(yulangsan chalcone, YLSC)对心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MI/RI)大鼠核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路的影响。**方法** 通过结扎大鼠冠状动脉左前降支制备 MI/RI 模型,伊文思蓝/TTC(2,3,5-三苯基氯化四氮唑)双重染色法观察大鼠心肌梗死范围,取血清测定 MB 型肌酸激酶(creatine kinase-MB, CK-MB)、肌酸激酶(creatine kinase, CK)、羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)水平,免疫组化法和 Western blot 法检测 NF- κ B 信号通路中核因子 κ B 诱导激酶(NF- κ B-inducing kinase, NIK)、I κ B 激酶(I κ B kinase, I κ K)、 κ B 抑制蛋白(inhibitory κ B, I κ B)、NF- κ B 蛋白的表达。**结果** YLSC 能缩小 MI/RI 大鼠心肌梗死范围;能降低 MI/RI 所致的 CK、CK-MB 及 Hyp 水平的升高;能减少 NIK、I κ K 及 NF- κ B 蛋白的表达,降低 NIK 和 I κ K 的酶活性,能减慢 I κ B 的降解并使其表达增多。**结论** YLSC 对 MI/RI 大鼠具有保护作用,其保护机制可能跟 YLSC 缩小心肌梗死范围、减少心肌酶的漏出、调节炎症通路 NIK/I κ K/I κ B/NF- κ B 的表达、减少炎症反应等有关。

【关键词】 玉朗伞查尔酮;心肌缺血再灌注损伤;NF- κ B 信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 08-0035-07

Effect of yulangsan chalcone on the nuclear factor- κ B signaling pathway in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury

LIANG Xingmei^{1,2#}, LIU Xihua^{1#}, HUANG Jianchun², CHEN Chunxia³, CHEN Zhaoni², HUANG Renbin^{2*}

(1. Guangxi Medical College, Department of Pharmacy, Nanning 530023, China. 2. Guangxi Medical University, Pharmaceutical College, Nanning 530021. 3. Research Department, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of yulangsan chalcone (YLSC) on the nuclear factor (NF)- κ B signaling pathway in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury (MI/RI). **Methods** A rat model of MI/RI was prepared by ligating the left anterior descending branch of the coronary artery. The extent of myocardial infarction was observed by double staining with Evans blue/TTC, and the serum concentrations of creatinine kinase (CK), CK-MB

【基金项目】国家自然科学基金委员会地区科学基金项目(81560587);广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(2021KY1364);广西壮族自治区卫生健康委员会西药类别自筹经费科研课题(20211835)。

【作者简介】梁杏梅(1988—),女,硕士,副教授,研究方向:心血管药理学。E-mail:352740189@qq.com

刘喜华(1983—),男,硕士,副教授,研究方向:中药药理学。E-mail:86094231@qq.com *共同第一作者

【通信作者】黄仁彬(1955—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:心血管药理学。E-mail:huangrenbin518@163.com

isoenzyme, and hydroxyproline were detected. Immunohistochemistry and western blot analyses were used to detect the protein expressions of NF- κ B-inducing kinase (NIK), inhibitor of κ B (I κ B), I κ B kinase (I κ K) and NF- κ B. **Results** YLSC reduced the extent of myocardial infarction in rats with MI/RI; reduced the concentrations of CK, CK-MB isoenzyme, and hydroxyproline; inhibited the protein expressions of NIK, I κ K and NF- κ B; suppressed the enzyme activity of NIK and I κ K; lessened the degradation of I κ B and increased its expression. **Conclusions** YLSC exhibited protective effects in MI/RI rats. The protective mechanism of YLSC may be related to a reduction in the extent of myocardial infarction, decrease in myocardial enzyme leakage, regulation of NIK/I κ K/I κ B/NF- κ B expressions in the inflammatory pathway, and reduction of the inflammatory response.

【**Keywords**】 yulangsane chalcone; myocardial ischemia/reperfusion injury; nuclear factor- κ B signaling pathway

缺血性心脏病的本质是冠状动脉血流供应与心肌需求之间的失衡,是一种以缺血性损伤为主要特征的疾病,临床上以胸闷痹痛、心悸气短为主要症状,更有甚者会发展为心肌梗死^[1]。缺血的心肌组织会伴随有心功能降低、心肌细胞缺氧、心肌代谢过程紊乱、有害物质聚集、诱发炎症反应并使得炎症因子过度释放等病理生理现象,因此,迅速恢复血液灌注是心肌缺血的基础防治措施^[2]。但不少研究证实了立即恢复正常供血,则缺血状态得以扭转但心肌功能及组织结构已被严重破坏,更有甚者出现细胞凋亡和坏死,这种适得其反的现象即称为心肌缺血再灌注损伤^[3]。

当前,国内外针对 MI/RI 进行干预的方法主要有缺血预适应、药物预适应、药物后处理、抵抗自由基损伤、减轻钙超载、减轻炎症反应等。其中药物干预通常选用抗血小板聚集、改善心肌细胞能量代谢、阻断钙离子通道的制剂等,虽产生一定作用,但其存在的针对性弱、疗效低下、耐受性差等不足也使得其应用受到了限制。另外,对于减轻炎症反应和减少炎症因子释放这条干预途径的研究也不在少数,尤其是对炎症通路 NIK/I κ K/I κ B/NF- κ B 的研究也取得了不少进展^[4],众多研究显示了对该通路进行适当干预之后,能抑制下游核因子 NF- κ B 的活性表达,使得炎症反应得以改善、炎症因子的过度释放得以缓解,最终阻断了心肌炎症所介导的后续损伤,达到保护 MI/RI 的治疗效果。

玉郎伞 (YLS, *Millettia pulchra* (Benth.) Kurz var. *Laxior* (Dunn) Z. Wei (Papilionaceae)) 原植物经考证为蝶形花科植物疏叶崖豆的块根,主产地为广西、福建、云南等,也是广西民间常用的壮药,在《广西中药材标准》《广西壮族自治区壮药质量标准(第一卷)》中有记载,常用于保护心脑血管、预防老年痴呆、调节血糖水平及保肝护肝等^[5]。本研究小组从玉郎伞总黄酮中分离出了玉郎伞查尔酮单体

成分(YLSC, 17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮),见图 1。在前期研究中,本小组发现 YLSC 在减轻心肌缺血、抑制氧自由基生成、减少心肌细胞凋亡、阻断心肌细胞钙离子通道、减轻钙超载、保护离体心肌细胞缺氧/复氧损伤等方面具有显著的保护作用^[6-8],但 YLSC 对 MI/RI 保护的相关机制尚未明了,因此,本研究将对此进行探究,明确 YLSC 的保护机制是否与炎症通路 NIK/I κ K/I κ B/NF- κ B 有关,实验结果可为 YLSC 防治 MI/RI 找寻新的作用靶点和治疗方案,具有较强的现实意义和应用前景。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 60 只,体重(265±15)g,雌雄各半,由广西医科大学实验动物中心提供[SCXK 桂 2020-0003],动物饲养在广西医科大学实验动物中心[SYXK 桂 2020-0004],室温控制在 21℃~22℃,相对湿度控制在 40%~70%,循环光照,饮水饮食自由取用。本研究通过广西医科大学动物实验伦理委员会的审批(201808009),按实验动物使用的“3R”原则给予人道主义关怀,切实遵循和保障实验动物伦理。

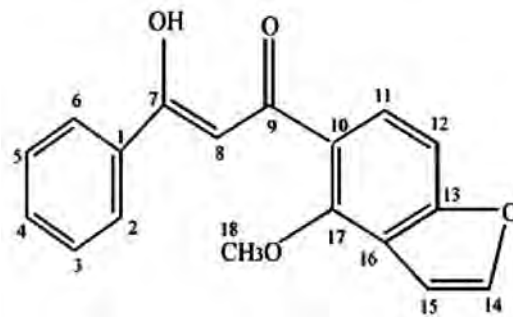


图 1 17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮的化学结构

Figure 1 Chemical structure of 17-methoxy-7-hydroxy-benzofuran chalcone

1.2 主要试剂与仪器

阳性药吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(PDTC, 碧云天生物技术研究, 批号: S1808); 受试药玉朗伞查尔酮(YLSC, 由广西医科大学药理教研室提供, 批号: 20190720); 伊文思蓝(Biosharp 公司, 批号: 619C047); TTC (Solarbio 公司, 批号: T8170); CK、CK-MB、Hyp 试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号: 20200716; 20200123; 20200726); SP 免疫组化检测试剂盒(北京中杉公司, 批号: CB05792337); 兔抗鼠(NIK、I κ B、I κ K、NF- κ B)多克隆抗体(碧云天生物技术研究, 批号: AN371、AF1870、AF5839、S1523)。动物呼吸机(ALC-V8), 上海奥尔科特生物科技有限公司; RM2245 型莱卡石蜡切片机, 美国莱卡公司; WH-1 微型旋涡混合器, 上海沪西公司; Q550CW 计算机图像分析系统, 德国 Leica 公司; Western 电泳仪, 转膜仪, 电泳槽, 电泳胶板, 核酸蛋白测定仪, 美国 Bio-Rad 公司; -86℃超低温冰箱, 海尔集团公司。

1.3 实验方法

1.3.1 MI/RI 模型的制备

SD 大鼠随机分为 6 组($n = 10$): 假手术组(sham group, 给予蒸馏水 2 mL/kg)、模型组(model group, 给予蒸馏水 2 mL/kg)、阳性对照组(PDTC group, 给予 PDTC 30 mg/kg)、YLSC_H 组(5.00 mg/kg)、YLSC_M 组(2.50 mg/kg)、YLSC_L 组(1.25 mg/kg)。各组大鼠经鼠尾静脉连续给与相应药物 7 d, 每天 1 次, 于末次给药后除假手术组外均制备 MI/RI 模型, 即结扎大鼠冠状动脉左前降支 30 min 后, 再灌注 60 min。

各组大鼠以 3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(1.5 mL/kg), 取仰卧位固定。气管倒 T 型切开后, 连接到动物呼吸机(相关参数设置如下, respiratory rate: 60~70 times/min, tidal volume: 50 mL/kg, inspiration and expiration ratio: 1:2)。左侧胸腔消毒后逐层打开, 扩张第 3 与第 4 肋间隙, 在泪囊掀开器的助力下让心脏充分暴露于视野中, 切开心包轻轻挤压胸廓使心脏挤出, 可见冠脉左前降支起始部位藏于左心耳下缘与肺动脉圆锥左缘间, 用 6/0 无损缝合线绕过前冠脉左前降支起始部位下缘约 2 mm 处(进针深度约 1 mm, 宽度约 1~2 mm), 连同空心硅胶管一并结扎。假手术组大鼠仅做穿线处理, 不予结扎。待心肌缺血 30 min 后可将空心硅胶管剪开, 即可解除结扎并恢复灌流状态, 继续观察 1 h。

1.3.2 心肌梗死面积的测定

再灌注 1 h 后, 各组大鼠由左心室导管逆行注入 1.5 mL 伊文思蓝(浓度为 5%), 在心肌正常组织被充分染色后, 剪下心脏平行于左心室长轴制作厚度为 1~2 mm 的薄片^[9]。将心室薄片放入 1% TTC 磷酸盐缓冲液(pH = 7.4)中水浴 15 min, 由于受损心肌的细胞膜损伤导致细胞中的脱氢酶释放漏出而丢失, 故梗死心肌组织不被染色。心室薄片的染色结果使用 Image J 图像分析软件进行分析统计。白色即未被染色的部分为梗死心肌, 染成蓝色的部分为残存的正常心肌组织, 染成红色的部分为缺血心肌组织。红色的缺血组织与白色的梗死组织一并称为缺血区(area at risk, AAR), 其中白色的梗死组织又称为梗死区(area of necrosis, AN)。计算公式: 缺血范围 = AAR/心室横截面积, 梗死范围 = AN/AAR。

1.3.3 血清中 CK、CK-MB 及 Hyp 水平的测定

再灌注 60 min 后, 各组大鼠腹主动脉真空采血约 5 mL, 静置 2 h 后行高速冷冻离心(参数设置为: 转速 4000 r/min, 离心时长 10 min, 离心温度 4℃), 取上层血清于 -20℃环境下冻存。按说明书标准操作步骤分别测定血清 CK、CK-MB 及 Hyp 水平。

1.3.4 免疫组化法测定 NIK/I κ K/I κ B/NF- κ B 通路蛋白

再灌注结束后, 取各组大鼠缺血心肌组织制作切片, 切片经二甲苯、无水乙醇、水进行梯度脱蜡, 行抗原修复、3%过氧化氢甲醇液阻断内源性过氧化物酶的活性、PBS 冲洗、血清封闭、添加抗体等操作进行封片。电子显微镜下观察切片, 被染成棕黄色至深褐色的细胞核与细胞浆即为阳性蛋白。每只动物取 3 张切片, 每张切片随机选取 5 个视野, 对阳性着色区域进行观察分析, 切片经 Leica Qwin 图象分析软件对大鼠心肌组织切片中 NIK、I κ K、I κ B 以及 NF- κ B 的蛋白阳性表达情况进行半定量统计, 结果以灰度值表示, 数值范围在 0~255 之间, 灰度值越低, 则蛋白的阳性表达越高^[10]。

1.3.5 Western blot 法测定 NIK/I κ K/I κ B/NF- κ B 通路蛋白

再灌注结束后, 取各组大鼠约 80 mg 缺血心肌组织加入蛋白裂解液, 制作组织匀浆并测定蛋白含量。蛋白经过上样、电泳、分离、PVDF(聚偏氟乙烯, Polyvinylidene Fluoride)膜转移后, 将 PVDF 膜依次转入一抗(NIK、I κ K、I κ B、NF- κ B)工作液及二抗

工作液中进行孵育。将 PVDF 膜放入显色液中显色,观察显色反应过程,行漂洗、拍照,用 Image J 软件分析各条带的蛋白表达,相关数值用光密度(optical density, OD)值表示,计算公式为,目的蛋白的相对表达含量=目的蛋白 OD 值/内参(β -actin) OD 值,比值越高,则提示目的蛋白的表达越高。

1.4 统计学方法

数据使用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,免疫组化及 Western blot 图像半定量数据使用 Leica Qwin 图象分析软件及 Image J 软件进行分析,计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 ANOVA 单因素方差分析,当 $P<0.05$ 时则表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 YLSC 对 MI/RI 大鼠心肌梗死面积的影响

未观察到假手术组有梗死心肌,可观察到有略微的缺血组织,可能与打开大鼠胸腔且缝合针和缝合线绕过冠脉左前降支造成轻微缺血有关。与模型组比较,各组心肌组织缺血程度基本一致,差异无统计学意义($P>0.05$),提示结扎冠脉左前降支的手术操作平行性较好。与空白组比较,模型组与各给药组大鼠的心肌缺血范围扩大较明显($P<0.05$),提示缺血模型制备成功。与模型组比较,阳性对照组、YLSC_H 组和 YLSC_M 组大鼠心肌梗死面积呈不同程度的减少($P<0.01$),YLSC_L 组大鼠心肌梗死面积减少不明显($P>0.05$),提示 YLSC 能显著缩小 MI/RI 大鼠的心肌梗死范围。结果见表 1 和图 2。

2.2 YLSC 对 MI/RI 大鼠血清 CK、CK-MB 及 Hyp 水平的影响

与假手术组比较,模型组及各给药组中的 CK、CK-MB 及 Hyp 水平显著增高($P<0.05$),心肌酶活性增强、心肌胶原组织破坏,提示模型制备成功;与模型组比较,YLSC 可以降低 MI/RI 所致的 CK、CK-MB 及 Hyp 水平的升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且呈剂量依赖关系;YLSC_L 组大鼠的 Hyp 水平下降不明显,差距无统计学意义($P>0.05$)。提示 YLSC 对 MI/RI 大鼠心肌组织具有保护作用,能减少心肌胶原组织的破坏,减少心肌细胞损伤时心肌标志物 CK 和 CK-MB 的渗出。结果见表 2。

2.3 免疫组化法测定 NIK/I κ K/I κ B/NF- κ B 通路蛋白

由免疫组化结果可知,被染为黄色及棕黄色的细胞浆及细胞核为 NIK、I κ K、I κ B 及 NF- κ B 蛋白的阳性表达。与假手术组比较,模型组和各给药组的

表 1 YLSC 对 MI/RI 大鼠心肌缺血范围和梗死范围的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effect of YLSC on myocardial risk area and infarction area in MI/RI rat

组别 Groups	缺血范围(%) Risk area	梗死范围(%) Infarction area
假手术组 Sham	12.59 $\pm$ 1.62 ^{##}	0.00 $\pm$ 0.00
模型组 Model	41.49 $\pm$ 5.42 [*]	32.33 $\pm$ 6.50 [*]
阳性对照组 PDTC	38.21 $\pm$ 2.47 [*]	20.82 $\pm$ 5.77 ^{*##}
YLSC 高剂量组 YLSC _H	36.73 $\pm$ 1.21 [*]	21.75 $\pm$ 6.33 ^{*##}
YLSC 中剂量组 YLSC _M	36.78 $\pm$ 9.29 [*]	22.87 $\pm$ 3.81 ^{*##}
YLSC 低剂量组 YLSC _L	39.57 $\pm$ 6.37 [*]	29.83 $\pm$ 8.24 [*]

注:与假手术组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, ^{##} $P<0.01$ 。

Note. Compared with the sham group, * $P<0.05$. Compared with the model group, ^{##} $P<0.01$.

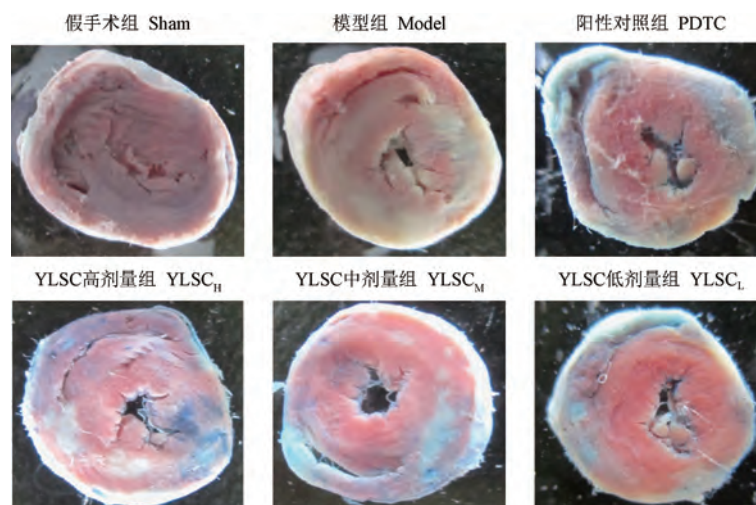


图 2 YLSC 对 MI/RI 大鼠心肌缺血范围和梗死范围的影响

Figure 2 Effect of YLSC on myocardial risk area and infarction area in MI/RI rat

I κ B 蛋白的阳性表达范围明显减少,而 NIK、I κ K 及 NF- κ B 阳性表达范围则明显增多。与模型组相比, YLSC 能下调 NIK、I κ K 及 NF- κ B 的酶活性,抑制其蛋白表达的升高,同时减少 I κ B 的降解,且呈剂量依赖关系($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。说明 YLSC 对 MI/RI 大鼠具有保护作用,能减少 NIK、I κ K 及 NF- κ B 蛋白的表达,降低 NIK 和 I κ K 的酶活性,能减慢 I κ B 的降解并使其表达增多。结果见表 3 和图 3。

2.4 Western blot 法测定 NIK/I κ K/I κ B/NF- κ B 通路蛋白

实验结果显示,与假手术组相比,各实验组 NIK、I κ K 及 NF- κ B 的酶活性被激活,阳性表达增多($P<0.05$),反之 I κ B 的阳性表达则减少($P<0.05$)。与模型组比较, YLSC 各剂量能不同程度地抑制 NIK、I κ K 及 NF- κ B 的阳性表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且减少 I κ B 的降解,增加 I κ B 的阳性表达(P

<0.05 或 $P<0.01$),呈剂量依赖关系。结果表明, YLSC 对 MI/RI 大鼠具有保护作用,其能通过调控 NIK/I κ K/I κ B/NF- κ B 信号通路中相关酶的活性来阻断后续损伤。结果见表 4 和图 4。

3 讨论

NIK 是 I κ K 的上游激酶,其能通过级联反应引起 I κ K 的活化, I κ K 的活化继而使得 I κ B 发生磷酸化,磷酸化后的 I κ B 被蛋白酶体识别继而解体,即解除了 NF- κ B-I κ B 复合物的聚集,复合物的解体使得 NF- κ B 恢复了游离和活性状态,同时也让 NF- κ B 的 DNA 结合结构域处于裸露状态,则 NF- κ B 将与细胞核内相关基因激活区接轨,启动转录多种免疫因子^[11]。由此得出,若是 I κ B 的降解过程受到阻断或干扰,将会造成 NF- κ B-I κ B 复合物的解体失败,则 NF- κ B 无法暴露核定位序列,其诱导的炎症反应和

表 2 YLSC 对 MI/RI 大鼠血清 CK、CK-MB 及 Hyp 水平的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of YLSC on level of CK, CK-MB and Hyp in MI/RI rat

组别 Groups	CK (U/mL)	CK-MB (U/mL)	Hyp (mg/L)
假手术组 Sham	0.18 $\pm$ 0.07 ^{##}	73.57 $\pm$ 60.11 ^{##}	6.08 $\pm$ 3.1 ^{##}
模型组 Model	2.17 $\pm$ 1.04 [*]	718.96 $\pm$ 90.30 [*]	13.96 $\pm$ 7.6 [*]
阳性对照组 PDTC	0.33 $\pm$ 0.18 ^{*##}	322.256 $\pm$ 129.08 ^{*##}	7.59 $\pm$ 1.1 ^{*#}
YLSC 高剂量组 YLSC _H	0.36 $\pm$ 0.10 ^{*##}	346.104 $\pm$ 80.53 ^{*##}	8.21 $\pm$ 1.4 ^{*#}
YLSC 中剂量组 YLSC _M	0.41 $\pm$ 0.21 ^{*##}	501.60 $\pm$ 49.81 ^{*##}	8.55 $\pm$ 0.3 ^{*#}
YLSC 低剂量组 YLSC _L	0.45 $\pm$ 0.30 ^{*##}	574.05 $\pm$ 90.92 ^{*#}	15.92 $\pm$ 7.6 [*]

注:与假手术组比较, $^*P<0.05$;与模型组比较, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$ 。

Note. Compared with the sham group, $^*P<0.05$. Compared with the model group, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$.

表 3 YLSC 对 MI/RI 大鼠 NIK/I κ K/I κ B/NF- κ B 蛋白水平的影响($\bar{x}\pm s$, 灰度值)

Table 3 Effect of YLSC on level of NIK/I κ K/I κ B/NF- κ B in MI/RI rat (gray value)

组别 Groups	NIK	I κ K	I κ B	NF- κ B
假手术组 Sham	144.00 $\pm$ 5.73 ^{##}	135.57 $\pm$ 7.32 ^{##}	108.14 $\pm$ 4.81 ^{##}	154.90 $\pm$ 1.66 ^{##}
模型组 Model	103.71 $\pm$ 7.57 [*]	100.57 $\pm$ 3.87 [*]	142.29 $\pm$ 7.78 [*]	111.50 $\pm$ 15.50 [*]
阳性对照组 PDTC	125.57 $\pm$ 5.74 ^{*##}	128.57 $\pm$ 3.05 ^{*##}	122.29 $\pm$ 3.77 ^{##}	143.80 $\pm$ 0.92 ^{##}
YLSC 高剂量组 YLSC _H	124.57 $\pm$ 6.55 ^{*#}	125.43 $\pm$ 6.07 ^{*##}	121.86 $\pm$ 4.56 ^{##}	132.70 $\pm$ 1.70 ^{*#}
YLSC 中剂量组 YLSC _M	121.14 $\pm$ 4.14 ^{*#}	121.29 $\pm$ 3.86 ^{*##}	133.71 $\pm$ 5.62 ^{*#}	131.60 $\pm$ 14.66 ^{*#}
YLSC 低剂量组 YLSC _L	114.43 $\pm$ 10.03 [*]	116.43 $\pm$ 3.51 ^{*#}	133.00 $\pm$ 5.66 ^{*#}	126.20 $\pm$ 1.93 [*]

注:与假手术组比较, $^*P<0.05$;与模型组比较, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$ 。

Note. Compared with the sham group, $^*P<0.05$. Compared with the model group, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$.

表 4 YLSC 对 MI/RI 大鼠 NIK/I κ K/I κ B/NF- κ B 蛋白水平的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Effect of YLSC on level of NIK/I κ K/I κ B/NF- κ B in MI/RI rat

组别 Groups	NIK/ β -actin	I κ K/ β -actin	I κ B/ β -actin	NF- κ B/ β -actin
假手术组 Sham	0.930 $\pm$ 0.03 ^{##}	0.924 $\pm$ 0.01 ^{##}	1.099 $\pm$ 0.01 ^{##}	0.843 $\pm$ 0.03 ^{##}
模型组 Model	1.432 $\pm$ 0.01 [*]	1.376 $\pm$ 0.04 [*]	0.794 $\pm$ 0.01 [*]	1.377 $\pm$ 0.02 [*]
阳性对照组 PDTC	0.987 $\pm$ 0.07 ^{##}	1.102 $\pm$ 0.04 ^{*#}	1.043 $\pm$ 0.03 ^{##}	1.037 $\pm$ 0.05 ^{*#}
YLSC 高剂量组 YLSC _H	1.028 $\pm$ 0.14 ^{##}	1.123 $\pm$ 0.01 ^{*#}	1.011 $\pm$ 0.02 ^{##}	1.047 $\pm$ 0.06 ^{*#}
YLSC 中剂量组 YLSC _M	1.260 $\pm$ 0.04 ^{*#}	1.244 $\pm$ 0.11 [*]	0.854 $\pm$ 0.03 ^{*#}	1.135 $\pm$ 0.02 ^{*#}
YLSC 低剂量组 YLSC _L	1.383 $\pm$ 0.03 [*]	1.324 $\pm$ 0.11 [*]	0.820 $\pm$ 0.004 [*]	1.259 $\pm$ 0.02 [*]

注:与假手术组比较, $^*P<0.05$;与模型组比较, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$ 。

Note. Compared with the sham group, $^*P<0.05$. Compared with the model group, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$.

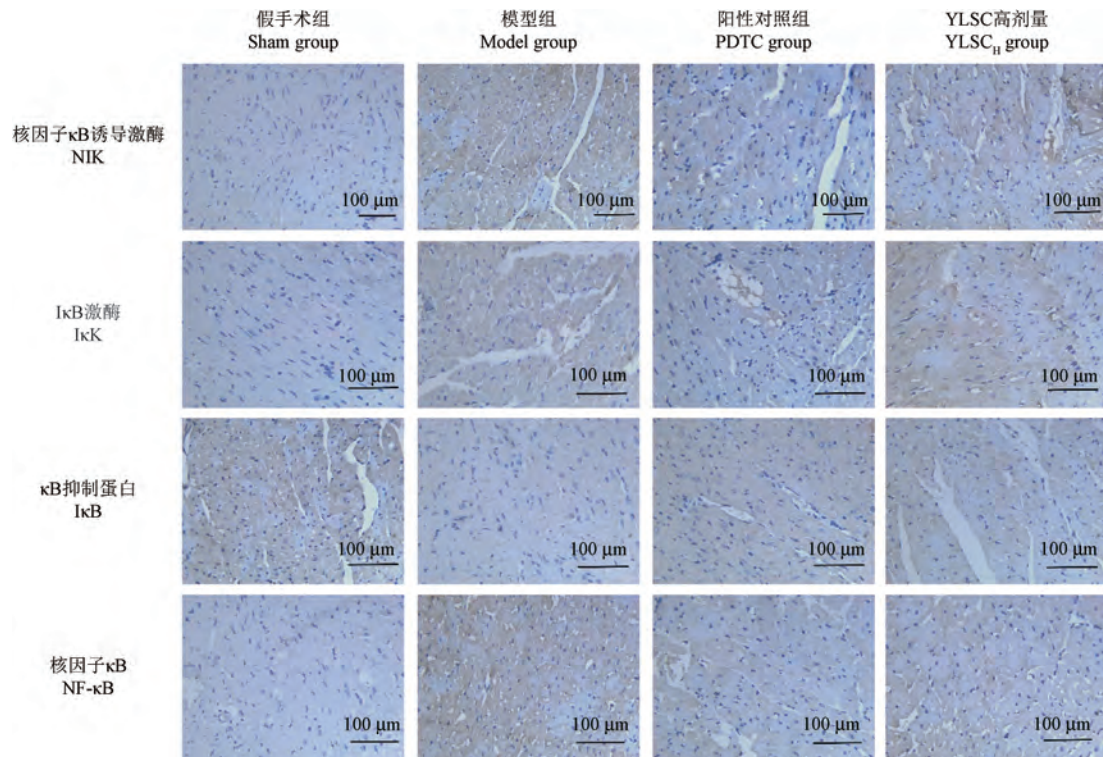


图 3 YLSC 对 MI/RI 大鼠 NIK/IκK/IκB/NF-κB 蛋白水平的影响

Figure 3 Effect of YLSC on level of NIK/IκK/IκB/NF-κB in MI/RI rat

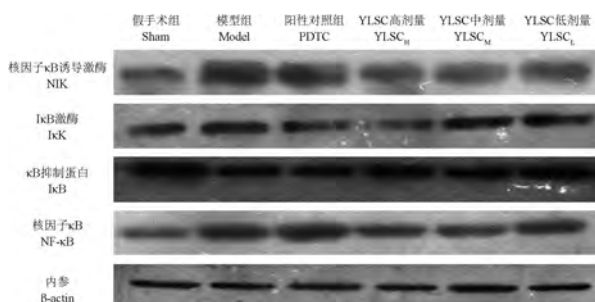


图 4 YLSC 对 MI/RI 大鼠 NIK/IκK/IκB/NF-κB 蛋白水平的影响

Figure 4 Effect of YLSC on protein expression level of NIK/IκK/IκB/NF-κB in MI/RI rat

炎症因子的释放也将无法激活。付海荣等^[12]发现, MI/RI 大鼠心肌组织中 NF-κB 表达升高,反之 IκB 蛋白表达却呈下降趋势,阳性对照药复方丹参片及受试药能逆转该势态;同时邓红等^[13]也发现在肺缺血再灌注损伤大鼠模型中,肺脏组织中的 NF-κB 被激活,蛋白表达显著上调;在 Yu 等^[14]的研究中也发现了,慢性心衰患者在给予中药参附汤干预之后,能阻断 NF-κB 通路的酶活性并抑制促炎因子的释放,改善心功能的同时有效减缓了心力衰竭患者的病理进程;周玥等^[15]的研究发现,吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(PDTC)作为 NF-κB 的专属性抑制剂,其

能有效阻断 NF-κB 信号传导通路的活化,下调心肌组织中 NF-κB 的酶活性,且能减轻炎症介质的释放;杨敏华等^[16]研究发现,在脂多糖诱导的脓毒症大鼠模型中,使用核因子特异性抑制剂 PDTC 进行干预,能改善脓毒症大鼠心脏、肺病理损伤程度和炎症反应。可见,寻找对 NIK/IκK/IκB/NF-κB 信号通路具有针对性调控作用的靶点药物,也成为了 MI/RI 疾病治疗研究的急切任务。

该项实验结果也与上述研究相呼应,MI/RI 大鼠 NIK/IκK/IκB/NF-κB 通路被激活,各类激酶活性增强、IκB 降解增多、NF-κB 得以激活,提示 MI/RI 大鼠心肌组织损伤与该通路的表达上调密切相关,受试药 YLSC 则是通过抑制该通路的各激酶活性、减少复合物的解体、阻止核因子核定位序列的暴露阻断了该通路介导的下游炎症反应。近年来大量的研究证实了,NF-κB 家族作为一种联通各类免疫、炎症、增殖、分化、凋亡、氧化应激的重要通路,参与了多种病理生理过程,其同时也存在于心肌细胞中介导缺血性心肌病、心肌炎、心肌细胞凋亡及坏死等,而有效的对抗该条通路即能为 MI/RI 的防治开辟更多防治路径^[17]。

另外,实验表明,尾静脉注射 YLSC 给药预处理可明显缩小 MI/RI 大鼠的心肌梗死范围。急性 MI/

RI 时患者的心肌梗死范围对预后有着很大的影响,且患者的心梗并发症及病死率也与心梗面积的大小密切相关^[18]。据研究表明,当缺血性心肌病发生后,其衰减的心功能预后好坏受梗死面积影响,心肌梗死面积越小则预后越好,因而缩小心梗面积可作为抗心肌缺血药物的主要疗效指标^[19],而该项研究的实验结果也印证以上结论。此外,当心肌细胞受损后,相应的心肌酶如 CK、CK-MB 等会随着细胞膜的破坏而漏出到细胞外,并进入到血流中,故检测血中心肌酶活性可反映心肌受损程度^[20],给与 YLSC 预处理能减少 CK 和 CK-MB 的活性,减少心肌酶的漏出,改善心肌受损程度;Hyp 是胶原组织的主要成分之一,当体内结缔组织大量增生或破坏时,其在血、尿中的含量会显著增加,因此通过对血液和尿液中羟脯氨酸的测定,可了解体内组织胶原蛋白分解代谢情况^[21],给与 YLSC 预处理能减少 MI/RI 大鼠血中 Hyp 含量,提示 YLSC 能减少心肌组织的胶原代谢、减轻心肌组织的损伤和心肌细胞的坏死分解。

综上所述,YLSC 对 MI/RI 大鼠受损心肌具有保护作用,其能减少 MI/RI 大鼠心梗面积,减少血中 CK、CK-MB 和 Hyp 水平,调控 NF- κ B 信号转导通路中相关蛋白的表达,实验结果可为后续研究 YLSC 治疗 MI/RI 提供基础,也为 YLSC 进一步的探索开发提供科学依据。

参考文献:

- [1] 王平安, 杨珂伟, 王静, 等. 大鼠心肌缺血再灌注损伤模型建立的改良方法 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(1): 104-108.
- [2] Wang N, Ma J, Ma Y, et al. Electroacupuncture pretreatment mitigates myocardial ischemia/reperfusion injury via XBP1/GRP78/Akt pathway [J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 629547.
- [3] Fan ZX, Yang J. The role of microRNAs in regulating myocardial ischemia reperfusion injury [J]. Saudi Med J, 2015, 36(7): 787-793.
- [4] 李静, 王东亮, 衣蕾, 等. 瑞香素抑制 c-Jun 氨基末端激酶/核因子 κ B (JNK/NF- κ B) 通路减轻大鼠心肌缺血损伤 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2020, 36(6): 513-519.
- [5] 李玲. 民族药玉郎伞的研究概况 [J]. 中国现代中药, 2011, 13(12): 53-55.
- [6] 李映新, 黄媛恒, 覃斐章, 等. 17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮对心肌细胞内游离钙浓度及 L-型钙电流的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(15): 213-217.
- [7] 叶芳杏, 何俊慧, 李梅兰, 等. 玉郎伞 MHBFC 调控 eNOS-NO 信号通路逆转大鼠心室重构的机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(11): 1516-1520.
- [8] 覃斐章, 简洁, 焦杨, 等. 17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮对垂体后叶素致大鼠心肌缺血的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 145-148.
- [9] 杨海龙, 刘春萍, 刘建滔, 等. 基于自噬探讨丹萎片减轻心肌缺血再灌注损伤的机制研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(3): 318-323.
- [10] 尹海鹏, 刘向群, 于昕, 等. 黄芩苷对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化及 VE-钙黏蛋白表达水平的影响 [J]. 山东大学学报 (医学版), 2013, 51(9): 26-30.
- [11] 郝锋, 蔡荣林, 余倩, 等. 电针预处理对急性心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌组织 NF- κ B p65、I κ B α 、IKK β 蛋白表达的影响 [J]. 中国针灸, 2020, 40(10): 1103-1107.
- [12] 付海荣, 谭家华, 邓雪松, 等. 齿阿米素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(9): 1238-1244.
- [13] 邓红, 高静, 刘金碧, 等. 依托咪酯对大鼠肺缺血再灌注损伤时 NF- κ B 活性的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2017, 37(4): 498-500.
- [14] Yu M, Ye L, Bian J, et al. Effect of Jiawei Shenfu decoction on tumor necrosis factor- α and nuclear factor- κ B in patients who have chronic heart failure with syndromes of deficiency of heart Yang [J]. J Tradit Chin Med, 2019, 39(3): 418-424.
- [15] 周玥, 钟杭, 李成朋, 等. 基于 NF- κ B 信号通路探究活血定痛方对心肌缺血再灌注损伤动物模型的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(6): 39-45.
- [16] 杨敏华, 姚友杰, 王娟, 等. 穿心莲内酯对脓毒症大鼠急性心肺组织损伤和炎症反应的影响 [J]. 医药导报, 2021, 40(4): 454-460.
- [17] 冯周恒, 王海英. miRNA 调控 NF- κ B 在心肌缺血再灌注损伤中的研究进展 [J]. 实用医学杂志, 2019, 35(23): 3694-3697.
- [18] 徐桂萍, 朱倩倩, 杨振宇. 富马酸二甲酯减轻糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤及其相关机制研究 [J]. 中华危重症医学杂志 (电子版), 2021, 14(2): 100-106.
- [19] 耿红艳, 赵丹丹. 急性心梗的急救康复转归的护理分析 [J]. 双足与保健, 2018, 27(14): 56-57.
- [20] 康孟杰, 李想, 韩朝霞, 等. 急性冠脉综合征患者 CK-MB、cTnT 及 CRP 水平变化与临床意义 [J]. 中国分子心脏病学杂志, 2021, 21(2): 3827-3830.
- [21] 王策. 积雪草苷对心梗大鼠心肌纤维化影响的实验研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2014, 34(8): 19-22.

[收稿日期] 2021-12-15