

陈亚,曾阳,何飘,等. 基于“心痛治肝”理论探讨从肝治心方调控心肌缺血再灌注损伤中铁死亡的机制[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(8): 999-1006.

Chen Y, Zeng Y, He P, et al. Protective mechanism of regulating ferroptosis by Conggan Zhixin recipe in myocardial ischemia-reperfusion injury based on the theory of heartache governing liver [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(8): 999-1006.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.08.004

# 基于“心痛治肝”理论探讨从肝治心方调控心肌缺血再灌注损伤中铁死亡的机制

陈亚<sup>1</sup>, 曾阳<sup>2</sup>, 何飘<sup>2</sup>, 谢丽华<sup>2</sup>, 张程程<sup>2</sup>, 王瑾茜<sup>1\*</sup>, 袁华<sup>1</sup>,  
刘莹莹<sup>1</sup>, 朴美虹<sup>2</sup>, 汪辛强<sup>1</sup>

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410208)

**【摘要】** 目的 本研究拟基于“心痛治肝”理论探讨从肝治心方调控心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)大鼠模型铁死亡的机制。方法 SD大鼠按随机数字表分为空白组( $n = 10$ )、假手术组( $n = 10$ )、模型组( $n = 10$ )、从肝治心方组(CGZX组)( $n = 10$ )、麝香保心丸组(SXBX组)( $n = 10$ )。除空白组、假手术组外,各组均采用“冠状动脉前降支结扎+缺血后再灌注”构建MIRI模型,造模24 h后灌胃给药,灌胃周期为14 d,频率为每天1次。于第16天经腹主动脉采血,ELISA分析血清中肌酸激酶同工酶(CK-MB)、肌钙蛋白T(cTnT)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、多不饱和脂肪酸(PUFA)含量;另剪心脏进行HE染色观察心肌组织病理形态、普鲁士蓝染色观察心肌细胞铁沉积情况;电镜下观察心室肌细胞铁死亡后线粒体的形态;Western Blot及PCR测试心肌组织中Nrf2、ACSL4的蛋白及mRNA表达量。结果 与空白组相比,模型组大鼠存在明显心肌组织损伤,电镜下心肌超微结构受损明显,出现肌丝断裂或疏松及心肌组织线粒体肿胀现象,心肌细胞存在大量黑褐色铁沉积。血清中CK-MB、cTnT、MDA及PUFA含量升高( $P < 0.01$ ),SOD含量降低( $P < 0.01$ ),心肌组织中Nrf2、ACSL4的mRNA及蛋白表达量显著增加( $P < 0.01$ );与模型组相比,从肝治心方能明显改善心肌组织水肿变性,减少心肌细胞铁沉积及细胞嵴突疏松程度,且显著下调血清中MDA、PUFA、CK-MB、cTnT的含量( $P < 0.01$ ),上调SOD含量( $P < 0.01$ ),并可上调心肌组织Nrf2、下调ACSL4的mRNA及蛋白表达( $P < 0.01$ )。结论 从肝治心方对MIRI大鼠起到心肌保护作用,可能与调控Nrf2-ACSL4通路从而抑制心肌细胞铁死亡有关。

**【关键词】** 从肝治心方;心肌缺血再灌注损伤;铁死亡;心痛治肝

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2023)08-0999-08

## Protective mechanism of regulating ferroptosis by Conggan Zhixin recipe in myocardial ischemia-reperfusion injury based on the theory of heartache governing liver

CHEN Ya<sup>1</sup>, ZENG Yang<sup>2</sup>, HE Piao<sup>2</sup>, XIE Lihua<sup>2</sup>, ZHANG Chengcheng<sup>2</sup>, WANG Jinxi<sup>1\*</sup>,  
YUAN Hua<sup>1</sup>, LIU Yingying<sup>1</sup>, PIAO Meihong<sup>2</sup>, WANG Xinqiang<sup>1</sup>

**【基金项目】**湖南省自然科学基金项目(2021JJ40418),湖南省中医药科研项目(2021179,2021172),长沙市科技计划项目(kq2014222, kq2014224),湖南省卫健委科研计划项目(202103010864),湖南中医药大学校级科研基金项目(2019XJJ057,2022XYLH005)。Funded by the Natural Science Foundation of Hunan Province (2021JJ40418), Hunan Traditional Chinese Medicine Research Project (2021179, 2021172), Changsha Science and Technology Plan Project (kq2014222, kq2014224), Scientific Research Program of Hunan Health Commission (202103010864), School Level Scientific Research Fund Project of Hunan University of Traditional Chinese Medicine (2019XJJ057, 2022XYLH005)。

**【作者简介】**陈亚(1986—),女,主治医师,硕士,研究方向:中医药防治心脑血管疾病的研究。Email:876593813@qq.com

**【通信作者】**王瑾茜(1991—),女,助理研究员,博士,研究方向:心血管疾病的中医药防治。Email:273067155@qq.com

(1. the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China.

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208)

Corresponding author: WANG Jinxi. E-mail:273067155@qq.com

**【Abstract】 Objective** To explore the mechanism of ferroptosis in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI), basing on the theory of heartache governing liver. **Methods** SD rats were divided into a blank group ( $n = 10$ ), sham operation group ( $n = 10$ ), model group ( $n = 10$ ), Conggan Zhixin recipe group (CGZX group) ( $n = 10$ ), and Shexiang Baoxin Pill group (SXBX group) ( $n = 10$ ) in accordance with a random number table. Except in blank and sham operation groups, all groups underwent ligation of the anterior descending coronary artery and ischemia-reperfusion to establish a myocardial ischemia-reperfusion injury model. The drug was administered by gavage at 24 h after model establishment. The gavage cycle was 14 days, and the frequency was once a day. Blood was collected from the abdominal aorta on day 16, and serum contents of creatine kinase isoenzyme (CK-MB), cardiac troponin T (cTnT), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and polyunsaturated fatty acid (PUFA) were analyzed by ELISA. The harvested heart was stained with HE to observe pathological morphology of myocardial tissue and with Prussian blue to observe iron deposition of myocardial cells. Mitochondrial morphology after ferroptosis was observed in ventricular muscle by electron microscopy. mRNA and protein expression of Nrf2 and ACSL4 in the myocardium was measured by PCR and Western Blot, respectively. **Results** Compared with the normal group, rats in the model group had obvious myocardial tissue and ultrastructure damage under the electron microscope, broken or loose myofilaments, swollen mitochondria in myocardial tissue, and a large amount of dark brown iron deposition in myocardial cells. The serum contents of CK-MB, cTnT, MDA, and PUFA were increased ( $P < 0.01$ ), while the SOD content was decreased ( $P < 0.01$ ). Moreover, mRNA and protein expression of Nrf2 and ACSL4 in the myocardium was increased significantly ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, Conggan Zhixin recipe significantly improved edema and degeneration of myocardial tissue, reduced the iron deposition of myocardial cells and the degree of cell crest relaxation, significantly reduced the serum contents of MDA, PUFA, CK-MB, and cTnT ( $P < 0.01$ ), upregulated SOD ( $P < 0.01$ ) and Nrf2 expression in myocardial tissue, and downregulated the mRNA and protein expression of ACSL4 ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Conggan Zhixin recipe has a myocardial protective effect on MIRI rats, which may be related to regulation of the Nrf2-ACSL4 pathway and inhibition of myocardial cell ferroptosis.

**【Keywords】** Conggan Zhixin recipe; myocardial ischemia-reperfusion injury; ferroptosis; heartache governing liver  
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

心肌缺血-再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI) 是指冠状动脉部分或完全急性阻塞经再通后, 血流虽恢复正常灌注, 但心肌组织缺血损伤并未缓解反而进行性加重的病理过程。因其高发病率、死亡率而成为阻碍人类健康的难题<sup>[1-2]</sup>。心肌缺血再灌注后往往伴随血液流速及缺氧环境的快速改变, 活性氧过度产生、抗氧化酶相对不足及其活性降低, 均可导致脂质过氧化酶活化, 引发脂质过氧化损伤, 从而加剧细胞损伤和铁死亡<sup>[3]</sup>。铁死亡是以细胞内铁代谢异常为主要诱发因素进而导致细胞内脂质活性氧 (lipid-ROS, L-ROS) 致死性累积, 并存在细胞氧化还原反应参与的一种细胞死亡形式。肝是主要的氧化还原及排毒的重要脏器之一。现代医学研究表明, 肝在铁的吸收、转运和储存中发挥重要作用,  $Fe^{2+}$  是铁在体内存在的主要形式之一, 当其蓄积超量会诱使活性氧

大量产生, 刺激细胞膜脂质过氧化而导致铁死亡<sup>[4-8]</sup>。而细胞铁死亡是引起心肌缺血再灌注的发作中起着关键作用<sup>[9]</sup>。

MIRI 属于胸痹心痛范畴, 史上中医药治疗疗效尚佳, 有其独特之处。《黄帝内经》著有肝属木、心属火, 是“母子关系”。“心痛治肝”之法首见于明代陈士铎所著《石室秘录》中指出肝主疏泄, 气机郁滞则气血不调, 心脉不通或心脉挛急, 遂发胸痹心痛, 并提出“从肝治心、肝心并治”的治法。研究表明, 疏肝理气、活血化瘀中药复方可减轻心肌细胞炎症, 修复损伤的心肌细胞, 提高诊疗效果<sup>[10]</sup>。因此本课题组认为“心痛治肝”治法具有科学依据, 可能与调控铁死亡密切相关。全国名老中医王行宽教授熟读经典结合自身临证经验, 根据“心病治肝”理论遣药组方自拟从肝治心方, 由柴胡、郁金、姜黄等药物组成, 疏理肝气, 散气破血以达推陈致新之功

能<sup>[11]</sup>。研究表明,该方药可明显改善心肌缺血患者的心功能<sup>[12-13]</sup>。本研究采用“结扎冠状动脉左前降支+再灌注”制备 MIRI 动物模型,观察心肌组织病理形态、心肌细胞铁沉积情况及细胞铁死亡后线粒体的形态,检测血清中肌酸激酶同工酶(creatin kinase-MB, CK-MB)、丙二醛(malonic dialdehyde, MDA)、心肌肌钙蛋白 T(cardiac troponin, cTnT)、超氧化物歧化酶(super oxide dismutase, SOD)及多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)改变,检测心肌组织中核转录因子红系 2 相关因子 2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、长链脂酰辅酶 A 合成酶 4(long-chain acyl-CoA synthetase 4, ACSL4) mRNA 及蛋白表达量,以期探寻从肝治心方调控铁死亡治疗 MIRI 机制所在,为“心痛治肝”理论提供一定的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

50 只 SPF 级雄性健康 SD 大鼠,8 ~ 10 周龄,体重为  $250 \pm 20$  g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】。饲养于湖南中医药大学附属第一医院 SPF 级动物房【SYXK(湘)2020-0010】。饲养期间各组大鼠自由饮水,饲喂普通维持饲料由湖南嘉泰实验动物有限公司提供。饲养条件:温度  $22 \sim 26^\circ\text{C}$ ,相对湿度  $40\% \sim 70\%$ ,保持每天 12 h 光照和 12 h 黑暗环境,每小时通风 10 次,各组单笼喂养。本研究所有操作均经湖南中医药大学医学伦理委员会批准(IACUC 20201010-3),实验过程遵循 3R 原则。

#### 1.1.2 药物制备

从肝治心方(红参,当归,丹参,柴胡,姜黄,郁金,白芥子,九香虫)8 味中药按 2:2:2:2:2:2:1:1 比例配方,饮片购自湖南中医药大学第一附属医院,煎煮时加入处方剂量 8 倍水,浸泡药材 30 min 后,沸水文火煎煮 2 次,每次 30 min,合并药液,过滤。 $4^\circ\text{C}$  冰箱保存。麝香保心丸说明书:1 ~ 2 丸/次,每丸 22.5 mg,每天 3 次。

#### 1.1.3 主要试剂与仪器

多聚甲醛(国药集团化学试剂有限公司,20170113),CK-MB-ELISA 试剂盒 96T(江苏酶免实业有限公司, FY3500-A),cTnT-ELISA 试剂盒 96T(江苏酶免实业有限公司, FY40431-A),SOD-ELISA

试剂盒 96T(江苏酶免实业有限公司, FY3262-A),MDA-ELISA 试剂盒 96T(江苏酶免实业有限公司, FY8503-A),PUFA-ELISA 试剂盒 96T(江苏酶免实业有限公司, FY40437-A),NRF2 兔多抗(BIOSS, BS1074R),ACSL4 兔多抗(Affinity, DF12141),GAPDH 鼠单抗(Immunoway, YM3029)。酶标仪(赛默飞, Infinite F50, 英国),紫外可见分光光度计(科佑, UV759, 中国),电热恒温水浴锅(鼎鑫, DK-8D, 中国),低速离心机(赛默飞, TDZ4-WS, 英国),手动单道可调式移液器(大龙, TopPette, 中国),可调移液器,枪头,离心机,恒温箱均购自于(菁华, eppendorf, 中国),蛋白印迹系统(伯乐, Mini T, 中国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 造模方法及分组

50 只成模大鼠随机分为空白组、假手术组、模型组、从肝治心方组(CGZX 组)、麝香保心丸组(SXBX 组)5 组。单笼喂养,自由摄食饮水。参照课题组既往经验,空白组大鼠正常饲养,模型组、CGZX 组、SXBX 组术前 12 h 禁食,于实验第 1 天进行造模,具体方式如下:连接心电图电极,记录标准 II 导联心电图,气管切开、插入气管插管。连接空气呼吸机进行人工控制呼吸,开胸暴露心脏及大血管根部,以 6-0 缝合线结扎冠状动脉左前降支血管,阻断 30 min 后松开缝合线维持再灌注状态,随后予以止血处理及逐层缝针关胸,造模结束。假手术组只穿线不结扎,余操作同模型组。手术中分开胸后、结扎后、再灌注后和关胸后 4 个点记录心电图变化。以心电图 ST 段的改变及左室前壁向外膨胀发绀为结扎成功标志。

#### 1.2.2 给药

造模 24 h 后,空白组、假手术组及模型组予以等体积蒸馏水灌胃,给药组按人与大鼠体表面积换算等效剂量,溶于蒸馏水灌胃,CGZX 组予以从肝治心方( $6.3 \text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ )灌胃, SXBX 组予以麝香保心丸混悬液( $12.15 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ )灌胃,每天灌胃 1 次,直到处死为止。

#### 1.2.3 取材

各组均于给药后 14 d(实验第 16 天)8:00,参照随机数字表分别取材。待大鼠心肌缺血再灌注完成后,立即打开大鼠的腹腔,自腹主动脉取血 2 mL,静置 15 min 后分离血清,标记分类后,放至  $-80^\circ\text{C}$  冰箱内冻存。取血完成后即刻剖取大鼠心脏,分离缺血心肌区域。于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱内保留备用。

### 1.2.4 检测指标

检测指标如下:(1)HE 染色观察心肌细胞损伤情况;计算心肌梗死面积。具体公式如下:梗死面积(%) = [(左心室梗死部位心内膜长/总心内膜周长)/2 + (左心室梗死部位心外膜长/总心外膜周

长)/2] × 100%。(2)普鲁士蓝染色观察铁沉积情况。(3)透射电镜下评估细胞铁死亡特点。(4)ELISA 测定血清心肌坏死及氧化反应相关指标含量。(5)PCR 测试心肌蛋白含量,引物序列信息见表 1。(6)Western Blot 测试心肌蛋白含量。

表 1 引物信息

Table 1 Information of primers

引物 Primers	序列(5'→3') Sequences(5'→3')	长度(bp) Length(bp)
β-tubulin	F: ACAGGACAAATGCGACTCC R: TTCGGCAGTAAGCCAGAC	82
Nrf2	F: ATGTCCAAGGAGCAATTCA R: CTGAGCGGCAACTTTATTC	103
ACSL4	F: ATCAAGAAGGGAAGCAAGG R: ACAAAGAGGGGCATCATATC	198

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析。实验数据以平均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用方差分析,方差齐性时用 LSD 检验,方差非齐性时用 Dunnett's T3 检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

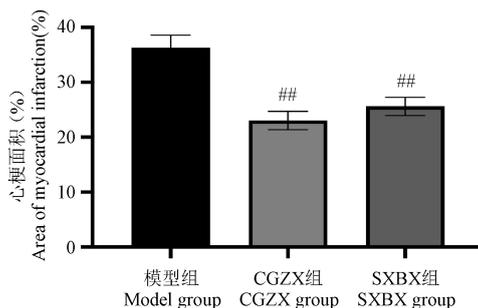
### 2.1 HE 染色测心肌梗面积

与模型组比较,CGZX 组及 SXBX 组心肌梗面积均明显缩小( $P < 0.01$ ),见图 1。

### 2.2 HE 染色观察心肌组织损伤情况

HE 染色结果显示,模型组大鼠心肌组织排列紊乱、间隙增宽,细胞部分有坏死及明显的炎性细胞浸润。而从 CGZX 组及 SXBX 组细胞坏死及炎性细胞浸润较模型组明显减少;假手术组心肌组织仅有少量炎性细胞浸润,其他结构完整,见图 2。

### 2.3 普鲁士蓝染色观察铁沉积情况



注:与模型组比较,## $P < 0.01$ 。(下同)

图 1 MIRI 大鼠心肌梗死面积测定

Note. Compared with model group, ## $P < 0.01$ . (The same in the following figures)

Figure 1 Measurement of myocardial infarction area in MIRI rats

普鲁士蓝染色结果显示,模型组大鼠心肌组织出现大量的黑褐色铁沉积;与模型大鼠心肌组织比较,CGZX 组铁沉积明显减少;假手术组心肌组织无明显铁沉积,见图 3。

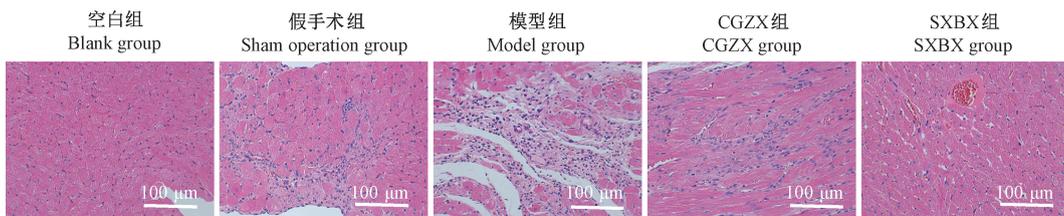


图 2 各组大鼠心肌组织病理变化(HE 染色)

Figure 2 Pathological changes in myocardial tissue of rats in each group (HE staining)

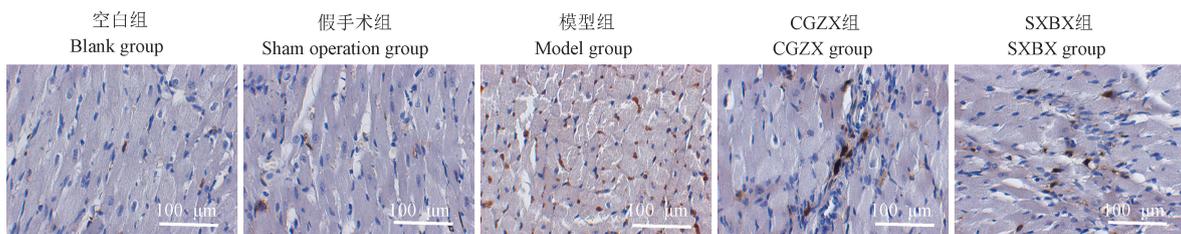


图 3 各组大鼠心肌组织铁沉积情况(普鲁士蓝染色)

Figure 3 Iron deposition in myocardial tissue of rats in each group (Prussian blue staining)

### 2.4 电镜下评估细胞铁死亡特点

模型组大鼠心肌肌丝及线粒体内部结构疏松,且伴肌丝断裂、线粒体肿胀及自噬体形成,与模型

组相比,CGZX 及 SXBX 组虽有断裂或疏松,但形态相对完好,嵴突疏松程度较模型组轻;假手术组大鼠心肌肌丝及线粒体结构完整,见图 4。

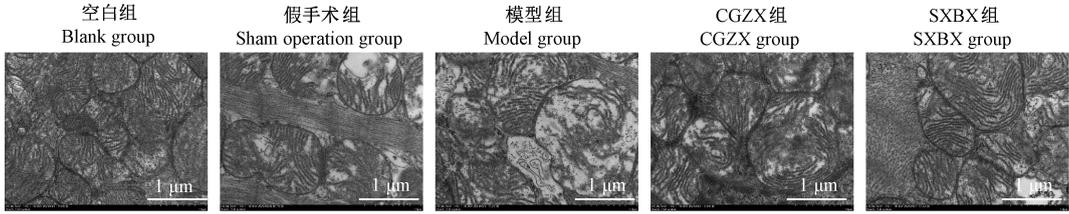


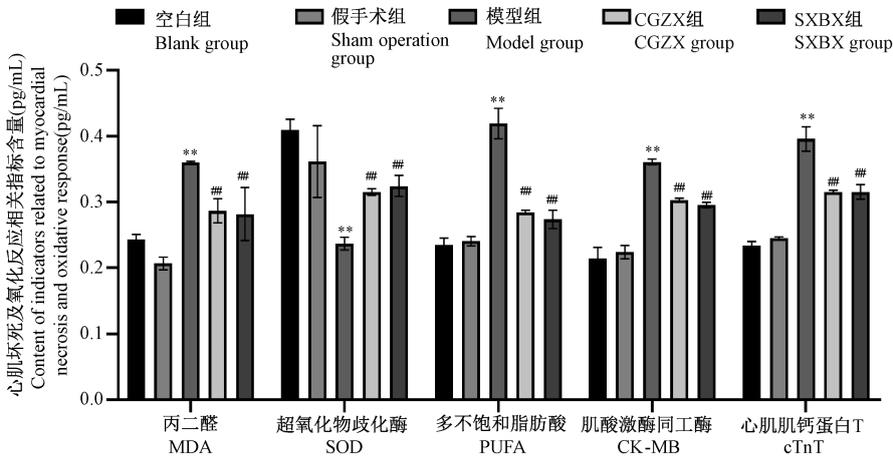
图 4 各组大鼠心肌细胞线粒体透射电镜图

Figure 4 Transmission electron microscopy images of myocardial mitochondria in each group of rats

### 2.5 ELISA 测定血清心肌坏死及氧化反应相关指标

与空白组相比,模型组 MDA、PUFA、CK-MB、cTnT 均显著升高 ( $P < 0.01$ ), SOD 显著下降 ( $P <$

0.01)。与模型组相比,CGZX 组、SXBX 组 MDA、PUFA、CK-MB、cTnT 均显著下降 ( $P < 0.01$ ), SOD 显著升高 ( $P < 0.01$ ), 见图 5。



注:与空白组相比, \*\*  $P < 0.01$ 。(下图同)

图 5 各组大鼠血清心肌坏死及氧化反应相关指标含量

Note. Compared with blank group, \*\*  $P < 0.01$ . (The same in the following figures)

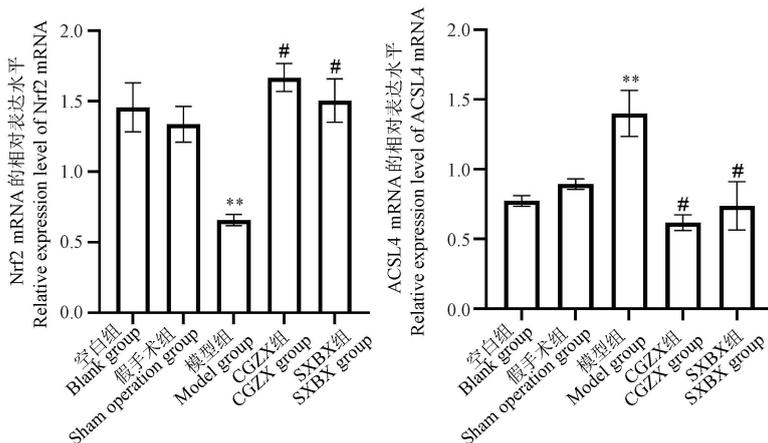
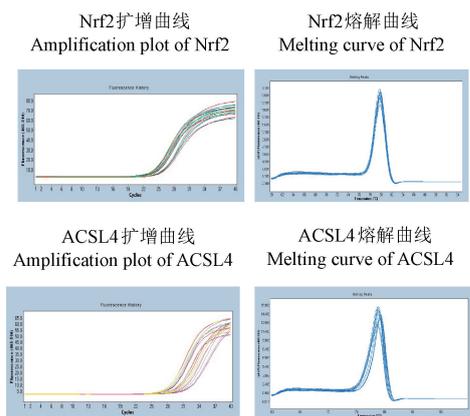
Figure 5 Content of serum myocardial necrosis and oxidative response related indicators in each group of rats

### 2.6 PCR 法检测各组大鼠心肌组织 Nrf2、ACSL4 mRNA 表达水平

Nrf2、ACSL4 的溶解曲线均为单峰分布,扩增曲线平滑,基本呈“S”形,提示扩增产物特异性较好。与空白组相比,模型组 Nrf2 mRNA 水平明显下降,ACSL4 mRNA 水平升高 ( $P < 0.01$ ),提示 MIRI 造模能抑制 Nrf2 的表达,促进 ACSL4 表达;空白组与假手术组相比,Nrf2、ACSL4 mRNA 水平差异无显著性 ( $P > 0.05$ );CGZX 组和 SXBX 组 Nrf2 mRNA 水平较模型组显著升高,ACSL4 mRNA 水平较模型组降低 ( $P < 0.01$ ),CGZX 组和 SXBX 组之间差异无显著性 ( $P > 0.05$ ),见图 6。

### 2.7 各组大鼠心肌组织 Nrf2、ACSL4 蛋白表达水平

结果显示,与空白组相比,模型组 Nrf2 蛋白水平明显下降,ACSL4 蛋白水平升高 ( $P < 0.05$ ),提示 MIRI 造模能抑制 Nrf2 的表达,促进 ACSL4 表达;空白组与假手术组相比,Nrf2、ACSL4 蛋白水平差异无显著性 ( $P > 0.05$ );CGZX 组和 SXBX 组 Nrf2 蛋白水平较模型组明显升高,ACSL4 蛋白水平较模型组降低 ( $P < 0.05$ ),CGZX 组和 SXBX 组之间差异无显著性 ( $P > 0.05$ ),提示从肝治心方和麝香保心丸可能通过促进 Nrf2 的表达,抑制 ACSL4 的表达来改善 MIRI,见图 7。



注:与模型组相比,  $^*P < 0.01$ 。(下图同)

图 6 各组大鼠心肌组织 Nrf2、ACSL4 mRNA 表达水平 ( $n = 6$ )

Note. Compared with model group,  $^*P < 0.01$ . (The same in the following figures)

Figure 6 Expression of Nrf2 and ACSL4 mRNA in myocardium of rats in each group ( $n = 6$ )

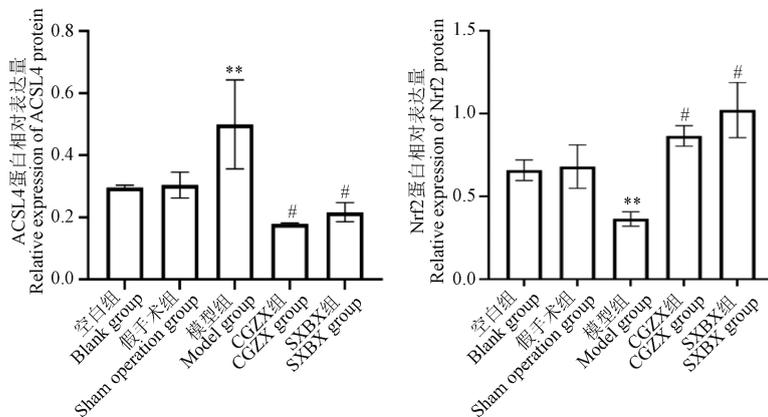
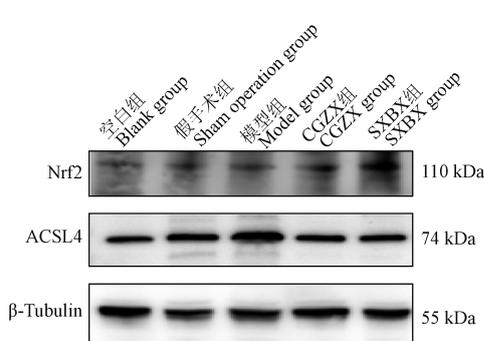


图 7 各组大鼠心肌组织 Nrf2、ACSL4 蛋白表达水平 ( $n = 6$ )

Figure 7 Expression levels of Nrf2 and ACSL4 proteins in myocardial tissue of rats in each group ( $n = 6$ )

### 3 讨论

课题组沿用前期制备的“冠状动脉前降支结扎+缺血后再灌注”造模方式制备 MIRI 模型<sup>[14]</sup>。阳性对照组选用麝香保心丸<sup>[15]</sup>,具有治疗气滞血瘀型胸痹作用,此方已列入《2020 年冠状动脉血运重建术后心绞痛中西医结合诊疗指南》、《中成药治疗冠心病临床应用指南(2020 版)》等<sup>[16-17]</sup>,且实验证明其能改善 MIRI,减轻心肌细胞铁死亡<sup>[18]</sup>。本研究通过 HE 染色发现模型组细胞水肿坏死,细胞排列不规则、疏松及大量炎性细胞浸润,透射电镜显示,模型组大鼠心肌肌丝断裂或疏松,心肌组织线粒体肿胀,内部结构疏松,同时,模型组 CK-MB、cTnT 均显著升高,说明细胞铁死亡在心肌缺血再灌注损伤中起作用。此外,与空白组相比,模型组 MDA、

PUFA 显著升高,说明心肌缺血再灌注损伤铁死亡过程中存在脂质过氧化。Nrf2 是细胞氧化应激反应的核心调节者,可平衡氧化还原,减轻细胞损伤<sup>[19-23]</sup>;而 ACSL4 铁死亡易感性的关键预测因子,可作为铁死亡标志物<sup>[24-27]</sup>。因此本研究选择 Nrf2-ACSL4 作为铁死亡的调控通路观察,结果显示模型组大鼠心肌组织 Nrf2 mRNA 及蛋白水平较空白组明显下降,ACSL4 mRNA 及蛋白水平升高,表明 Nrf2-ACSL4 可能是心肌缺血再灌注损伤铁死亡的信号通路。

随后,本研究通过 HE 染色观察到,与模型组相比,CGZX 组与 SXBX 组均可显著减少梗死面积;CGZX 组心肌组织水肿变性减少,炎症细胞浸润减轻;且 CGZX 组血清 CK-MB、cTnT 表达下降,透射电镜显示 CGZX 组大鼠心肌组织线粒体肿胀轻,提示

从肝治心组方干预可降低心肌缺血损伤程度;CGZX 组血清中 SOD 显著升高,MDA、PUFA 显著下调,提示从肝治心方可调节脂质过氧化反应;普鲁士蓝染色显示 CGZX 组铁沉积明显减少;且铁死亡标志物 ACSL4 mRNA 及蛋白水平下调,Nrf2 mRNA 及蛋白水平较模型组显著升高,与麝香保心丸组相比,差异无统计学意义,表明 CGZX 与 SXBX 组均可通过调控 ACSL4、Nrf2 水平实现抑制铁死亡的作用。综上,依据“心痛治肝”治法的从肝治心方减轻心肌细胞损伤可能通过改善铁代谢异常及调节脂质过氧化反应抑制铁死亡,且机制与上调 Nrf2、下调 ACSL4 有关,可为“心痛治肝”理论提供实验依据。

本研究结果提示 CGZX 方调控铁死亡可能与调控 Nrf2-ACSL4 的表达平衡氧化还原,改善脂质代谢有关,同时证实肝主疏泄功能,可促进铁及脂质代谢,从而减轻细胞损伤,改善心肌缺血。

#### 参 考 文 献(References)

[ 1 ] Wang X, Li B, Hu Y, et al. Novel grading system for ischemia-reperfusion injury manifestations in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing percutaneous coronary intervention [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 19349.

[ 2 ] 赵亚玲, 敖虎山. 心肌缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. *中国循环杂志*, 2011, 26(5): 396-398.

Zhao YL, Ao HS. Research progress of myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Chin Circ J*, 2011, 26(5): 396-398.

[ 3 ] Wang Z, Yao M, Jiang L, et al. Dexmedetomidine attenuates myocardial ischemia/reperfusion-induced ferroptosis via AMPK/GSK-3 $\beta$ /Nrf2 axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 154: 113572.

[ 4 ] Li JY, Liu SQ, Yao RQ, et al. A novel insight into the fate of cardiomyocytes in ischemia-reperfusion injury: from iron metabolism to ferroptosis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 799499.

[ 5 ] 向璟, 陈虹亮, 滕文友, 等. 铁蛋白与肝脏疾病关系的研究进展 [J]. *医学综述*, 2016, 22(17): 3337-3340.

Xiang J, Chen HL, Teng WY, et al. Research progress of relationship between ferritin and liver disease [J]. *Med Recapitul*, 2016, 22(17): 3337-3340, 3537.

[ 6 ] Hu Y, Wu H, Lu C, et al. Cadmium chloride exposure impairs the growth and behavior of *Drosophila* via ferroptosis [J]. *Sci Total Environ*, 2023, 865: 161183.

[ 7 ] Pan L, Gong C, Sun Y, et al. Induction mechanism of ferroptosis: a novel therapeutic target in lung disease [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1093244.

[ 8 ] Yang X, Chen Y, Song W, et al. Review of the role of ferroptosis in testicular function [J]. *Nutrients*, 2022, 14(24): 5268.

[ 9 ] Zhao WK, Zhou Y, Xu TT, et al. Ferroptosis: opportunities and challenges in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Oxid*

*Med Cell Longev*, 2021, 2021: 9929687.

[ 10 ] Dong L, Shen Z, Chi H, et al. Research progress of Chinese medicine in the treatment of myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Am J Chin Med*, 2023, 51(1): 1-17.

[ 11 ] 李金洋, 范金茹, 叶铭泉, 等. 名老中医王行宽肝心同治心系病遣方经验探讨 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2014, 34(6): 19-22.

Li JY, Fan JR, Ye MQ, et al. Famous physician wang xingquan's experience in treating heart-system diseases by Ganxin Tongzhi [J]. *J Hunan Univ Chin Med*, 2014, 34(6): 19-22.

[ 12 ] 刘小雨, 王行宽, 杨孝芳. 从肝治心组方对急性心肌梗死大鼠心肌毛细血管密度的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2004, 11(1): 17-20.

Liu XY, Wang XK, Yang XF. Effects of Conggan Zhixin prescription (CGZXP) on myocardial capillary density of rat with acute myocardial infarction [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Intentire Crit Care*, 2004, 11(1): 17-20.

[ 13 ] 刘小雨, 李国菁, 张鹏, 等. 从肝治心方促血管生成作用及其对缺血心肌血管内皮生长因子、Ang1 蛋白表达的调节 [J]. *中国临床康复*, 2006, 10(23): 76-80.

Liu XY, Li GJ, Zhang P, et al. Conggan Zhixin prescription in angiogenesis and regulating expression of vascular endothelial growth factor and Ang-1 protein of ischemic myocardium [J]. *Chin J Clin Rehabil*, 2006, 10(23): 76-80.

[ 14 ] 谢丽华, 何飘, 邱华安, 等. 从肝治心组方调控 SLC7A11/GPX4 介导的铁死亡对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响 [J/OL]. *中国中医药信息杂志*, [2023-04-24]. <https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=3uoqIhG8C45S0n9fL2suRadTyEVl2pW9UrhTDCdPD64PPghXj9oLzqSu8TW1hSzd66obz00Bjo7zj-zTUq4HRF4aIBL-cWj7&uniplatform=NZKPT>

Xie LH, He P, Qiu HA, et al. Effects of Conggan Zhixin prescription on myocardial ischemia reperfusion injury by regulating the iron death mediated by SLC7A11/GPX4 in rats [J/OL]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, [2023-04-24]. <https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=3uoqIhG8C45S0n9fL2suRadTyEVl2pW9UrhTDCdPD64PPghXj9oLzqSu8TW1hSzd66obz00Bjo7zj-zTUq4HRF4aIBL-cWj7&uniplatform=NZKPT>

[ 15 ] 中国医师协会中西医结合医师分会心血管病专业委员会, 国家中医心血管病临床医学研究中心. 麝香保心丸治疗冠心病专家共识 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2022, 42(7): 782-790.

China Association of Physicians of Integrated Traditional Chinese and Western medicine division of Cardiovascular Disease Professional Committee, National Center for clinical research of cardiovascular disease of traditional Chinese medicine. Expert consensus on treatment of coronary heart disease with Shexiang Baoxin Pill [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med*, 2022, 42(7): 782-790.

[ 16 ] 世界中医药联合会心血管病专业委员会, 中国中西医结合学会心血管病专业委员会, 中华中医药学会介入心脏病学会, 等. 冠状动脉血运重建术后心绞痛中西医结合诊疗指南 [J].

- 中国中西医结合杂志, 2020, 40(11): 1298-1307.
- World Federation of Chinese Medicine Societies Cardiovascular Disease Professional Committee, Chinese Association of Integrative Medicine Cardiovascular Disease Professional Committee, China Association of Traditional Chinese Medicine Interventional Cardiology Society, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of integrated traditional chinese and western medicine in post-coronary artery bypass grafting angina pectoris [J]. Chin J Integr Tradit Chin West Med, 2020, 40(11): 1298-1307.
- [17] 《中成药治疗优势病种临床应用指南》标准化项目组. 中成药治疗冠心病临床应用指南 [J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(4): 391-417.
- 《Clinical Practice Guidelines for the Clinical Application of Traditional Chinese Medicine in the Treatment of Specific Diseases》Standardization Project Team. Clinical practice guidelines for the clinical application of traditional chinese medicine in the treatment of coronary heart disease [J]. Chin J Integr Tradit Chin West Med, 2021, 41(4): 391-417.
- [18] 叶健, 李凌燕, 席鑫, 等. 麝香保心丸基于 miR-144-3p/SLC7A11 通路减轻心肌细胞铁死亡的机制研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(11): 1335-1340.
- Ye J, Li LY, Xi X, et al. Mechanism of Shexiang Baoxin pills attenuating cardiomyocyte ferroptosis based on miR-144-3p/SLC7A11 pathway [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2022, 42(11): 1335-1340.
- [19] Kato K, Takahashi M, Oh-Hashi K, et al. Quercetin and resveratrol inhibit ferroptosis independently of Nrf2-ARE activation in mouse hippocampal HT22 cells [J]. Food Chem Toxicol, 2023, 172: 113586.
- [20] Lu Q, Yang L, Xiao JJ, et al. Empagliflozin attenuates the renal tubular ferroptosis in diabetic kidney disease through AMPK/NRF<sub>2</sub> pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2023, 195: 89-102.
- [21] 刘继红, 邵思迈, 赵振荣, 等. Nrf2-ARE 信号通路在帕金森病中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 145-150.
- Liu JH, Shao SM, Zhao ZR, et al. The role of the Nrf2-ARE pathway in Parkinson's disease [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 145-150.
- [22] Nazar-Zadeh M, Jalili C, Nikgoftar Fathi A, et al. Royal-jelly-based apitherapy can attenuate damages to male reproductive parameter following nicotine administration [J]. Animal Model Exp Med, 2022, 5(2): 133-140.
- [23] Liu J, Ma Z, Li H, et al. Chinese medicine in the treatment of autoimmune hepatitis: progress and future opportunities [J]. Anim Model Exp Med, 2022, 5(2): 95-107.
- [24] 张天赐, 郭婷, 孙秀璇, 等. 铁死亡相关基因 ACSL4, TFRC 及 Hippo 通路关键分子 YAP 在间皮瘤组织中的表达及意义 [J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(9): 1617-1622, 1606.
- Zhang TC, Guo T, Sun XX, et al. The expression and significance of ACSL4, TFRC and crucial mediator of hippo signaling YAP in mesothelioma [J]. Prog Mod Biomed, 2021, 21(9): 1617-1622, 1606.
- [25] Lv YW, Du Y, Ma SS, et al. Proanthocyanidins attenuates ferroptosis against influenza-induced acute lung injury in mice by reducing IFN- $\gamma$  [J]. Life Sci, 2023, 314: 121279.
- [26] Zhang F, Li Z, Gao P, et al. HJ11 decoction restrains development of myocardial ischemia-reperfusion injury in rats by suppressing ACSL4-mediated ferroptosis [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1024292.
- [27] Doll S, Proneth B, Tyurina YY, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition [J]. Nat Chem Biol, 2017, 13(1): 91-98.

[收稿日期] 2023-01-06