

· 基础研究 ·

灵宝护心丹对心肌梗死大鼠心肌 NLRP3/Caspase-1 细胞焦亡信号通路的影响

谭宇 柴华 马晓娟

摘要 **目的** 探讨灵宝护心丹对心肌梗死大鼠心肌 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) / 半胱氨酸天冬氨酸转氨酶 1 (Caspase-1) 细胞焦亡信号通路的影响。**方法** 将 50 只健康 Wistar 大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组、倍他乐克组 (0.9 mg/kg)、灵宝护心丹低剂量组 (0.9 mg/kg)、灵宝护心丹高剂量组 (1.8 mg/kg), 每组 10 只, 连续灌胃 3 周, 末次给药 24 h 后行急性心肌梗死造模手术, 假手术组只穿线不结扎。造模 24 h 后取材检测相关指标。利用 TTC 染色测量大鼠心肌梗死面积, 采用苏木精-伊红 (HE)、铁-苏木素 (Heidenhain) 染色观察心肌组织病理改变, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测大鼠血清白介素 (IL)-1 β 、IL-18 水平, 采用 Western Blot 检测大鼠心肌组织 NLRP3、Caspase-1 水平。**结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠均出现不同程度的心肌梗死范围 ($P<0.01$), 心肌组织发生炎症反应、心肌缺血情况, 大鼠血清 IL-1 β 、IL-18 水平升高 ($P<0.01$), 心肌组织 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达水平升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 倍他乐克组和灵宝护心丹高剂量组大鼠心肌梗死面积减少 ($P<0.05$), 大鼠心肌组织炎症反应、心肌缺血情况减轻, 大鼠血清 IL-1 β 、IL-18 水平下降 ($P<0.05$), 心肌组织 NLRP3、Caspase-1 水平有所下降 ($P<0.05$)。**结论** 灵宝护心丹能够减轻心肌梗死大鼠心肌损伤, 其机制可能与影响 NLRP3/Caspase-1 细胞焦亡信号通路有关。

关键词 急性心肌梗死; 灵宝护心丹; 细胞焦亡; NLRP3/Caspase-1 信号通路

Effect of Lingbao Huxin Pill on NLRP3/Caspase-1 Pyroptosis Pathway in Myocardium of Acute Myocardial Infarction Rats TAN Yu, CHAI Hua, and MA Xiao-juan *National Clinical Research Center for Chinese Medicine Cardiology, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091)*

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of Lingbao Huxin Pill (LBHXP) on NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) / cysteinyl aspartate-specific protease-1 (Caspase-1) pyroptosis signaling pathway in myocardium of acute myocardial infarction (AMI) rats. **Methods** Fifty healthy Wistar rats were randomly divided into sham group, model group, betaloc group (0.9 mg · kg⁻¹), low does LBHXP group (0.9 mg · kg⁻¹), and high does LBHXP group (1.8 mg · kg⁻¹) according to the random number table, 10 in each group. All medication lasted for 3 successive weeks. The acute myocardial infarction modeling surgery were performed 24 h after the last administration, while sham group was only treated with suture without ligation. Rats were sacrificed 24 h after modeling for further examination. The infarct size was detected by TTC staining. The pathological changes in myocardium were observed by HE staining and Heidenhain staining. The expression levels of serum interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18 were detected by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The protein expression levels of NLRP3 and Caspase-1 in myocardium were detected by Western Blot. **Results** Compared with the sham group, all rats in the model group showed different degrees of myocardial infarction sizes ($P<0.01$), myocardial tissue underwent inflammatory reaction and myocardial

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (No. 81774141)

作者单位: 国家中医心血管病临床医学研究中心, 中国中医科学院西苑医院心血管病研究所 (北京 100091)

通讯作者: 马晓娟, Tel: 010-62835005, E-mail: abc_mxj@aliyun.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20221025.214

ischemia, the levels of serum IL-1 β and IL-18 increased ($P<0.01$), as well as the expression of NLRP3 and Caspase-1 protein in cardiac tissue increased ($P<0.01$). Compared with the model group, the infarct size reduced ($P<0.05$), the area of myocardial ischemia and inflammation decreased in high doses LBHXP group and betaloc group. The serum IL-1 β and IL-18 levels decreased ($P<0.05$), the expression of NLRP3 and Caspase-1 protein in cardiac tissue also decreased in high doses LBHXP group and betaloc group ($P<0.05$).

Conclusion LBHXP could alleviate myocardial injury in AMI rats, and its mechanism might be related to NLRP3/Caspase-1 pyroptosis signaling pathway.

KEYWORDS acute myocardial infarction; Lingbao Huxin Pill; pyroptosis; NLRP3/Caspase-1 signaling pathway

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是由于冠状动脉管腔狭窄或完全堵塞, 导致对应供血区域心肌组织急性缺血从而发生坏死的心血管疾病, 其严重危害人类健康, 是造成国民死亡的主要原因之一^[1-3]。因此, 寻找对 AMI 安全有效的治疗方法一直是心血管领域的研究热点。尽管 AMI 的发病机制目前尚未完全得以揭示, 但前期研究证明细胞焦亡在心肌缺血损伤过程中发挥重要作用^[4-6]。细胞焦亡是一种促炎性程序性细胞死亡, 在 AMI 期间表现为 NOD 样受体蛋白 3 (NODlike receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体-半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 1 (cysteiny aspartate-specific protease-1, Caspase-1) 依赖性反应, 当 NLRP3 炎症小体受到缺血性缺氧等病理刺激并活化后, 可将 Caspase-1 前体水解为激活状态的 Caspase-1^[7,8]。随后, 激活的 Caspase-1 将作为一种关键酶来刺激特定的靶点蛋白, 包括白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和 IL-18 等, 这些炎症因子在 AMI 的发生和发展中引起促炎反应, 将进一步损伤缺血心肌组织^[9, 10]。

灵宝护心丹是为防治冠心病而设计的中成药, 方中麝香、苏合香、冰片、蟾酥能开窍辟浊, 化痰散瘀; 红参补养元气, 辅以三七、丹参行气活血, 三者补充气血同时又使血脉畅通; 合以牛黄解毒镇痉, 同时配以琥珀安神。全方配伍严谨, 相辅相成, 针对胸痹心痛血脉瘀阻的关键病机, 共达活血化瘀、强心复脉的功效, 更有开窍醒神、镇痛调养心神之用^[11]。本课题组前期研究表明, 灵宝护心丹可能通过抑制氧化应激作用, 抑制线粒体损伤, 减少 ROS 产生以及减少心肌梗死后组织坏死的炎症作用挽救缺血心肌组织^[11]。但灵宝护心丹能否通过干预 NLRP3 介导的细胞焦亡通路影响 AMI 尚不清楚。

为深入探讨灵宝护心丹干预 AMI 的机制, 本研究采用体外构建大鼠 AMI 病理模型, 观察灵宝护心丹对 NLRP3 介导细胞焦亡的影响, 以阐释灵宝护心

丹对 AMI 损伤发挥保护作用的生物学基础。

材料与方法

1 动物 7 周龄 SPF 级健康 Wistar 大鼠 50 只, 雄性, 体重 (160 ± 10) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2016-0011。由中国中医科学院西苑医院动物房全封闭 SPF 环境下隔离饲养, 实验动物使用许可证号: SCXK (京) 2015-0011。实验中所有处理操作均遵循国家实验动物管理条例及实施细则进行。本实验已通过中国中医科学院西苑医院动物伦理委员会批准 (No. 2021XLC005-2)。

2 药物 灵宝护心丹 (组成: 人工麝香、蟾酥、人工牛黄、冰片、红参、三七、琥珀、丹参、苏合香), 苏州雷允上药业集团有限公司, 批号: RA05001, 每 10 丸重 0.08 g, 用生理盐水配成混悬液 (0.18 mg/mL, 0.36 mg/mL)。酒石酸美托洛尔片 (倍他乐克), 阿利斯康制药有限公司, 批号: H32025391, 25 mg/片, 用生理盐水配成混悬液 (0.9 mg/mL)。

3 主要试剂及仪器 4% 多聚甲醛, 购自北京 Biosharp 生物技术有限公司, 批号: BL539A。IL-18、IL-1 β ELISA 试剂盒, 批号: R210624-010a、R210627-007a, 均购自深圳欣博盛生物技术有限公司。HE、Heidenhain 染色试剂盒, 批号: G1120、G4480, 均购自北京索莱宝生物技术有限公司。Western Blot 所需抗体: NLRP3、Caspase-1 兔来源的多克隆抗体, 批号: 19771-1-AP, 22915-1-AP, 均购自美国 Proteintech 公司。小动物呼吸机 (型号: ALC-V8S) 为上海奥尔科特生物科技有限公司产品; 生物机能实验记录仪 (型号: RM6240BD) 为成都仪器厂产品; 常温高速离心机 (型号: 5425) 为德国 Eppendorf 公司产品; 病理切片机 (型号: RM2235) 为德国徕卡公司产品; 烤片机 (型号: DB-B2) 为常州国华电器有限公司产品; 光学显微镜 (型号: XSP-9CA) 为上海光学仪器一厂产品; 酶标仪 (型

号: Thermo FC) 为美国 Thermo Fisher 公司产品; 4℃低温高速离心机(型号: Thermo Micro17R)为美国 Thermo Fisher 公司产品; 稳压稳流电泳仪(型号: 16450707)为美国 Bio-Rad 公司产品; 垂直电泳槽(型号: 16580001)为美国 Bio-Rad 公司产品; 半干转电转印仪(型号: 1703940)为美国 Bio-Rad 公司产品。

4 动物分组及干预方法 分组当天将大鼠称重, 按体重由轻到重依次标为 1~50 号, 使用随机数字表法将 50 只大鼠分为 5 组: 假手术组、模型组、倍他乐克组、灵宝护心丹低剂量组、灵宝护心丹高剂量组, 每组 10 只。经 1 周动物房基础饲料适应性喂养后, 根据“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”计算^[12], 给予各组大鼠不同药物干预: 假手术组、模型组给予生理盐水灌胃; 倍他乐克组、灵宝护心丹低剂量组给予相应药物媒体 0.9 mg/kg 灌胃, 相当于临床成人每日等量剂量给药; 灵宝护心丹高剂量组给予相应药物每天 1.8 mg/kg 灌胃, 相当于临床成人每日 2 倍剂量给药, 连续给药 3 周后构建 AMI 模型。

5 动物模型制备 手术当日给大鼠称重, 按 2 mL/kg 的用量通过腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉。将大鼠四肢连接生物信息采集系统观察大鼠心电图变化。将改良后的一次性气管插管经口腔插入气道, 成功后将其固定于大鼠唇旁, 接入小动物呼吸机并调整至合适潮气量(10 mL/kg)和呼吸频率(呼吸比 1:1, 呼吸频率 90 次/分钟)。在胸骨左侧第 3~4 肋骨间隙用持针钳分离肋间肌肉, 随即用大鼠扩胸器撑开肋骨暴露心脏, 于左心耳下缘与心尖连线中点上方 2~3 mm 处用 6-0 缝合针结扎左冠状动脉前降支, 以肉眼可见结扎点以下至心尖左前壁心肌发白及心电图肢体导联 ST 段弓背抬高持续半小时以上作为造模成功的依据^[13], 假手术组只穿线不结扎。术后将大鼠放于 40℃恒温电热毯上保温, 待其苏醒后放回干净笼舍。

6 检测指标及方法

6.1 心肌 TTC 染色 心肌梗死 24 h 后麻醉, 每组随机选取 3 只大鼠, 将大鼠固定于解剖台。沿正中线打开胸腔, 取心脏并用生理盐水冲洗, 心脏 -20℃冷冻 15 min 后, 从结扎点(或穿线点)起将心脏垂直长轴横切为均匀厚度的 6 片厚约 1 mm 的切片, 放置于 2% 的 TTC 染液中, 37℃恒温孵育 24 h。用 Imagepro plus 软件计算心肌梗死范围: 左心室梗死区面积 / (左心室总面积 - 左心室腔面积) × 100%。

6.2 心肌石蜡切片 HE 染色 每组随机选取 3 只大鼠, 将大鼠心肌组织固定于 4% 多聚甲醛, 石蜡包埋, 以 4 μm 厚度切片, 烤片后进行常规 HE 染

色。在光镜(×100)下观察各组大鼠心肌组织损伤情况及炎症浸润情况。

6.3 心肌石蜡切片 Heidenhain 染色 每组随机选取 3 只大鼠, 将大鼠心肌组织固定于 4% 多聚甲醛, 石蜡包埋, 以 4 μm 厚度切片。脱蜡, 媒染于 5% 铁矾液内 5 min, 水洗 15 min; 苏木素液中染 7 min, 流水冲洗 5 min; 在铁矾液内分色, 流水冲洗 10 min; 伊红复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 树胶封片。光镜下观察心肌缺血情况并拍照。缺血心肌细胞呈灰黑色; 正常心肌呈红色; 胞核呈灰色。

6.4 ELISA 检测血清 IL-18、IL-1β 水平 造模成功 24 h 后每组随机选取 6 只大鼠, 以一次性采血管腹主动脉采血, 室温静置 2 h, 1 500×g 离心 15 min, 收集血清。应用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组大鼠血清 IL-18、IL-1β 水平。

6.5 Western Blot 检测 NLRP3、Caspase-1 水平 造模成功 24 h 后每组随机选取 3 只大鼠, 取左心室心肌组织液氮速冻后存于 -80℃冰箱保存。以 BCA 法测定蛋白含量后, 将剩余蛋白样品加入等体积的 2×SDS 上样缓冲液, 沸水中煮 5 min。使用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 完成后进行转膜。转移结束后, PVDF 膜取出标记膜的方向, 用 5%TBS-T 脱脂奶粉封闭。将膜移入杂交袋中, 加入用适当漂洗液稀释的抗体(NLRP3 一抗按 1:500 稀释, Caspase-1 一抗 1:500 稀释), 4℃孵育过夜; 再用大量 TBS-T 漂洗液洗膜, 加入漂洗液稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗, 37℃振荡 60 min, 后使用大量 TBS-T 漂洗液洗膜 3 次。随后使用 ECL 化学发光液显色, 于暗室中压上 X 光片, 感光数分钟, 将已暴光的胶片放入显影液中显影, 使用 Image Pro Plus 图像分析软件进行蛋白条带分析。

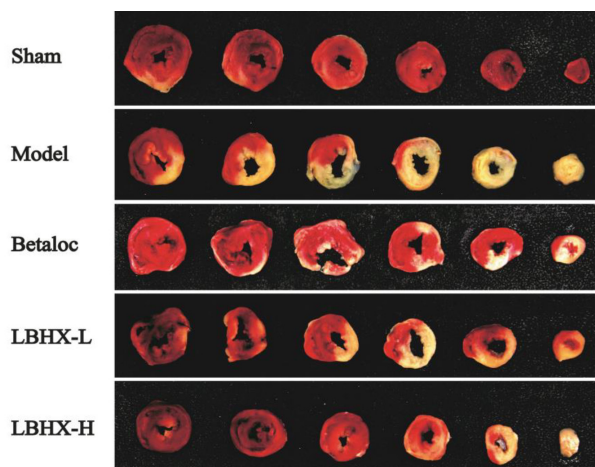
7 统计学方法 采用 SPSS 23.0 软件进行数据统计学分析, 图片采用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行数据采集, Graphpad Prism 8 软件进行作图。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 正态分布且符合方差齐性检验数据的多组间比较采用单因素方差分析(One way-ANOVA), 两两比较采用 LSD 检验(方差齐)或 Games-Howell 检验(方差不齐)。所有假设检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠一般情况比较 灌胃期间各组大鼠状态良好, 进食水量及二便无异常。各组存活率如下: 假手术组无死亡; 模型组存活率 80% (8/10), 死

亡 2 只 (1 只死于术后室颤, 1 只死于急性心功能衰竭); 倍他乐克组存活率 80% (8/10), 死亡 2 只 (死于术前麻醉过量); 灵宝护心丹低剂量组存活率 90% (9/10), 死亡 1 只 (死于急性心功能衰竭); 灵宝护心丹高剂量组存活率 80% (8/10), 死亡 2 只 (死于术后 24 h 内, 考虑心律失常所致)。

2 各组大鼠心肌梗死面积比较 (图 1, 表 1) 经 TTC 染色后见梗死区域呈灰白色, 未梗死区域呈红色, 除假手术组外, AMI 造模手术后各组大鼠左心室前壁均出现不同程度的梗死区。心梗面积结果显示, 与假手术组比较, 模型组心肌梗死面积增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 倍他乐克组、灵宝护心丹低、高剂量组心梗面积均有所减少 ($P<0.05$)。各用药组之间两两比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



注: Sham 为假手术组; Model 为模型组; Betaloc 为倍他乐克组; LBHX-L 为灵宝护心丹低剂量组; LBHX-H 为灵宝护心丹高剂量组

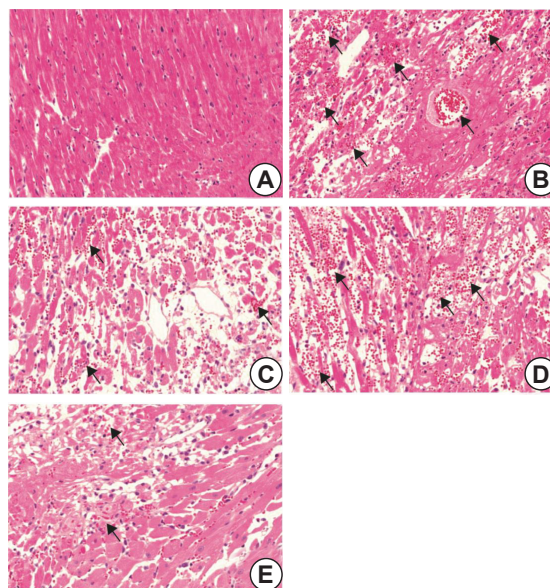
图 1 各组大鼠心肌组织 TTC 染色情况

表 1 各组大鼠心肌梗死面积比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	心梗面积
假手术	3	0
模型	3	$56.5 \pm 2.0^*$
倍他乐克	3	$19.3 \pm 1.6^\Delta$
灵宝护心丹低剂量	3	$36.9 \pm 1.2^\Delta$
灵宝护心丹高剂量	3	$22.3 \pm 1.6^\Delta$

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

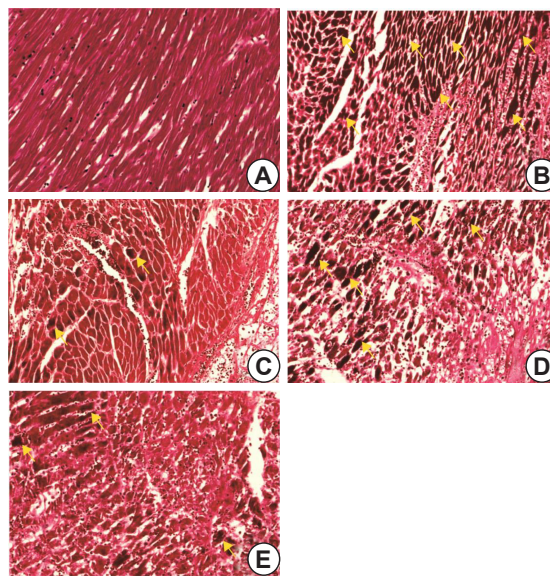
3 各组大鼠心肌组织 HE 染色比较 (图 2) 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌细胞肿胀、坏死、核溶解, 大量心肌纤维断裂, 心肌纤维排列紊乱, 伴有大量瘢痕组织形成, 大量炎性细胞浸润。灵宝护心丹预处理后, 可以改善无序的心肌细胞排列并减轻心肌细胞坏死, 尤其是在灵宝护心丹高剂量组中, 较模型组病变范围明显减小。



注: A 为假手术组; B 为模型组; C 为倍他乐克组; D 为灵宝护心丹低剂量组; E 为灵宝护心丹高剂量组; 图 3~4 组别同上; 箭头所指为心肌细胞肿胀、坏死、核溶解, 炎性细胞浸润

图 2 各组大鼠心肌组织炎症细胞浸润情况 (HE, $\times 100$)

4 各组大鼠心肌组织 Heidenhain 染色比较 (图 3) 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌组织可见大片心肌纤维黑染, 呈片状、团块状分布。与模型组比较, 倍他乐可及灵宝护心丹干预后, 大鼠心肌组织缺血心肌数量、点状黑染范围有所减少, 缺血心肌黑染范围有所缩小。



注: 箭头所指为心肌细胞缺血、点状黑染范围

图 3 各组大鼠心肌组织缺血情况 (Heidenhain 染色, $\times 100$)

5 各组大鼠血清 IL-1 β 、IL-18 水平比较 (表 2) 与假手术组比较, 模型组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-18 水平上升 ($P<0.01$)。与模型组比较, 倍他乐克组

及灵宝护心丹高剂量组大鼠血清 IL-1 β 、IL-18 水下降 ($P<0.05$)。各用药组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 各组大鼠血清 IL-1 β 、IL-18 水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-1 β	IL-18
假手术	6	7.962 $\pm$ 0.24	10.568 $\pm$ 1.24
模型	6	432.010 $\pm$ 12.25*	332.125 $\pm$ 10.26*
倍他乐克	6	120.513 $\pm$ 23.52 $^{\Delta}$	220.354 $\pm$ 33.25 $^{\Delta}$
灵宝护心丹低剂量	6	370.623 $\pm$ 33.78 $^{\Delta}$	298.352 $\pm$ 25.48
灵宝护心丹高剂量	6	146.626 $\pm$ 15.26 $^{\Delta}$	240.268 $\pm$ 14.27 $^{\Delta}$

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

6 各组大鼠心肌组织 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达水平比较 (图 4, 表 3) 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌组织中的 NLRP3、Caspase-1 蛋白水平明显升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 倍他乐克组及灵宝护心丹高剂量组大鼠心肌组织 NLRP3、Caspase-1 蛋白水平下降 ($P<0.01$, $P<0.05$)。灵宝护心丹低剂量组大鼠心肌组织 NLRP3 水平降低 ($P<0.05$)。各用药组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

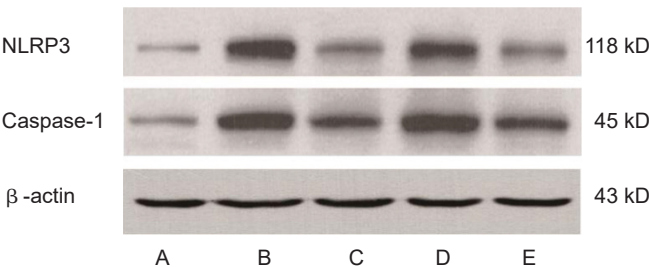


图 4 各组大鼠心肌组织 NLRP3、Caspase-1 蛋白电泳图

表 3 各组大鼠心肌组织 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NLRP3	Caspase-1
假手术	3	165.24 $\pm$ 12.35	109.40 $\pm$ 12.36
模型	3	1 645.54 $\pm$ 200.98*	951.98 $\pm$ 23.56*
倍他乐克	3	356.36 $\pm$ 23.25 $^{\Delta\Delta}$	610.32 $\pm$ 11.25 $^{\Delta}$
灵宝护心丹低剂量	3	971.48 $\pm$ 54.58 $^{\Delta}$	865.90 $\pm$ 58.26
灵宝护心丹高剂量	3	552.26 $\pm$ 57.69 $^{\Delta\Delta}$	730.32 $\pm$ 21.36 $^{\Delta}$

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

讨 论

本研究观察了灵宝护心丹通过调控 NLRP3/Caspase-1 细胞焦亡信号通路对 AMI 大鼠缺血心肌组织的保护作用, 并探讨其机制。由于心肌细胞对缺氧极为敏感, 发生急性缺血性缺氧后会迅速死亡, 诱导炎症细胞 (白细胞、巨噬细胞等) 募集等一系列病

理现象均发生在心肌细胞死亡后 24 h 左右, 因此本研究选择在术后 24 h 取材, 以截取到最佳实验观察窗口。

倍他乐克是一种以 $\beta 1$ 肾上腺素能受体阻滞剂, 通过选择性阻断 $\beta 1$ 受体发挥药理作用, 减少心肌耗氧量而挽救缺血心肌^[13]。既往研究报道经倍他乐克治疗可减少 AMI 患者梗死面积并改善左心室射血分数^[14]; 同时有文献报道倍他乐克可通过抑制内源性凋亡相关基因 bax 和 Caspase-3 减轻 AMI 大鼠心脏梗死边缘区和非梗死区域的心肌细胞凋亡^[15]; 此外, 有研究指出早期倍他乐克治疗可以调节 AMI 大鼠心肌炎性细胞因子的表达以改善心脏功能^[16]。鉴于倍他乐克可以抑制心肌兴奋性, 减少心脏做功, 抗心肌细胞凋亡, 抑制炎症因子以及心脏保护作用, 本研究选择倍他洛克作为阳性对照药。

目前, 大量体内和体外研究都表明细胞焦亡及其相关信号分子, 如在心肌细胞、心脏成纤维细胞和炎症细胞中发现的 NLRP3, 在心肌梗死中起着重要作用^[17, 18]。NLRP3 与 Caspase-1、含有胱天蛋白酶募集域的凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 组成复合炎症小体, 其通过在 ASC 协助下介导 Caspase-1 激活, 进而使炎症因子 IL-1 β 、IL-18 前体成熟并释放, 产生急性无菌性炎症^[19-21]。同时该炎症反应将募集巨噬细胞、中性粒细胞等大量炎症细胞, 进一步分泌炎症细胞因子、细胞间黏附分子和趋化因子, 产生炎症瀑布效应, 对缺血心肌组织产生不可逆损伤^[22, 23]。此外, 有研究证明针对细胞焦亡的抑制剂可以减少心肌梗死的面积和心肌梗死的炎症反应^[24]。心肌梗死后浸润的炎症细胞主要是巨噬细胞和中性粒细胞, 在这两种细胞类型中也发现了 NLRP3 炎症体的存在^[25-27]。本次研究结果表明, 灵宝护心丹可以减少 AMI 大鼠心肌梗死面积, 保护缺血心肌。同时病理染色结果表明, 可以缓解心肌缺血损伤, 改善 AMI 大鼠缺血心肌组织炎症细胞浸润情况, 保护缺血心肌并减少炎症反应。

灵宝护心丹的主要成分是麝香、牛黄、冰片、苏合香、丹参、三七、红参、琥珀、蟾酥。AMI 的临床特征, 如胸骨后或心前区压榨性疼痛, 且向左上臂颈放射, 常伴有冷汗、烦躁、濒死感等, 可归属中医学“心痹”“胸痹”“厥心痛”或“真心痛”等范畴^[28]。灵宝护心丹各药味大部分属心经, 全方以强心益气, 通阳开痹为主。方中以红参大补元气, 三七益气活血又能止痛, 使气足阳旺, 血脉流通。合以麝香、蟾酥加强强心作用、能提高冠脉流量, 增强心肌收缩功能。

牛黄既可清心解毒,又能解痉镇痛。麝香、苏合香、冰片不但芳香开窍,且可行气开郁、使瘀血痰浊,随气而化;再配之琥珀、丹参宁心安神、养血活血。全方组成紧密,相辅相成,共达强心益气,通阳复脉之功,更有芳香开窍,活血镇痛之用。灵宝护心丹在临床上对包括心绞痛、心律失常在内的缺血性心脏病有着良好的保护和治疗作用,它已用于缺血性心脏病的临床治疗超过 30 年,并提供了良好的临床疗效。但其改善心肌梗死及是否能保护缺血心肌的具体机制尚未阐明。因此,本研究观察了灵宝护心丹对心肌梗死大鼠缺血心肌的保护作用。

细胞焦亡是一种促炎型调节性细胞死亡,其特征是 *gasdermin D* (*GSDMD*) 介导的膜孔形成、细胞肿胀和快速溶解,随后细胞释放大量促炎介质,如 $IL-1\beta$ 、 $IL-18$ ^[29]。细胞焦亡有两种主要的信号转导途径:*Caspase-1* 介导的典型途径和 *Caspase-4*、*5*、*11* 介导的非经典途径。两种途径都能使活化的 *Caspase* 对关键炎性分子 $IL-1\beta$ 和 $IL-18$ 的前体进行切割加工,使其成熟。随后导致细胞内外跨膜物质转运失衡,细胞肿胀、破裂,造成大量细胞炎性内容物如 $IL-1\beta$ 和 $IL-18$ 的释放,导致炎症因子风暴^[30, 31]。细胞焦亡不仅会引起局部炎症,还会导致炎症反应的放大,从而导致细胞死亡^[32]。本次研究结果显示,灵宝护心丹下调了大鼠心肌组织中 *NLRP3*、*Caspase-1* 蛋白表达量,同时降低了 AMI 大鼠血清中炎症因子 $IL-1\beta$ 、 $IL-18$ 水平,这表明该复方中药改善 AMI 的病理进程机制可能是通过调节细胞焦亡实现。

此外,本研究存在以下局限性:未采用针对性指标如形态变化的扫描电镜、TUNEL 染色,因为扫描电镜是一种能够在高分辨率条件下直接观察细胞三维结构的病理学检测手段,更适用于观察心肌细胞肌丝、肌桥、肌小节等超微结构;使用 TUNEL 染色可以检测到被其剪切的断裂 DNA,但目前缺乏有效手段将 TUNEL 检测到的阳性 DNA 碎片来源很好的区分,因此本研究没有选择使用 TUNEL 染色法。

综上所述,本次研究结果表明,灵宝护心丹能够减少心肌梗死大鼠心肌组织细胞焦亡和炎症细胞浸润,降低心肌梗死面积,缓解心肌组织急性缺血,其机制可能与抑制 *NLRP3*、*Caspase-1* 蛋白表达进而抑制炎症因子 $IL-1\beta$ 、 $IL-18$ 激活有关。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Montecucco F, Carbone F, and Schindler T. Pathophysiology of ST-segment elevation myocardial infarction: novel mechanisms and treatments[J]. *Eur Heart J*, 2016, 37 (16): 1268–1283.
- [2] Zhou M, Wang H, Zeng X, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet*, 2019, 394 (10204): 1145–1158.
- [3] Nowbar A, Gitto M, Howard J, et al. Mortality from ischemic heart disease[J]. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*, 2019, 12 (6): e005375.
- [4] Wang Q, Wu J, Zeng Y, et al. Pyroptosis: a pro-inflammatory type of cell death in cardiovascular disease[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 510 (11): 62–72.
- [5] Li Z, Xu H, Liu X, et al. GDF11 inhibits cardiomyocyte pyroptosis and exerts cardioprotection in acute myocardial infarction mice by upregulation of transcription factor HOXA3[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11 (10): 917.
- [6] Do Carmo H, Arjun S, Petrucci O, et al. The Caspase 1 inhibitor VX-765 protects the isolated rat heart via the RISK pathway[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2018, 32 (2): 165–168.
- [7] Ji N, Qi Z, Wang Y, et al. Pyroptosis: a new regulating mechanism in cardiovascular disease[J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14 (1): 2647–2666.
- [8] He B, Nie Q, Wang F, et al. Role of pyroptosis in atherosclerosis and its therapeutic implications[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236 (10): 7159–7175.
- [9] Ashrafizadeh M, Najafi M, Kavyiani N, et al. Anti-inflammatory activity of melatonin: a focus on the role of *NLRP3* inflammasome[J]. *Inflammation*, 2021, 44 (4): 1207–1222.
- [10] 曹朝晖, 吴颢, 胡小波. 细胞焦亡参与动脉粥样硬化形成的分子机制新进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29 (7): 560–565.
- [11] 谭宇, 史大卓, 柴华, 等. 基于网络药理学探究灵宝护心丹治疗急性心肌梗死的潜在机制 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2021, 19 (7): 1057–1069.
- [12] 徐叔云主编. 临床药理学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 207.
- [13] Podlesnikar T, Pizarro G, Fernández-Jiménez R, et al.

- Left ventricular functional recovery of infarcted and remote myocardium after ST-segment elevation myocardial infarction (METOCARD-CNIC randomized clinical trial substudy) [J]. *J Cardiovasc Magn R*, 2020, 22 (1): 44.
- [14] Mateos A, García-Lunar I, García-Ruiz J, et al. Efficacy and safety of out-of-hospital intravenous metoprolol administration in anterior ST-segment elevation acute myocardial infarction: insights from the METOCARD-CNIC trial[J]. *Ann Emerg Med*, 2015, 65 (3): 318–324.
- [15] 陈跃峰, 杨跃进, 陈曦, 等. β 受体阻滞剂阿替洛尔和酒石酸美托洛尔对大鼠急性心肌梗死后心肌细胞凋亡及凋亡相关基因表达的作用 [J]. *中国医学科学院学报*, 2006, 1 (4): 538–543, 609–610.
- [16] Wu W, Huang L, Zhang J, et al. High-frequency ultrasound evaluation of effects of early treatment with metoprolol on myocardial inflammatory cytokine expression in rats with acute myocardial infarction[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2012, 32 (5): 774–778.
- [17] Meeran M, 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 (1): 153405.
- [18] Takahashi M. Cell-specific roles of NLRP3 inflammasome in myocardial infarction[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2019, 74 (3): 188–193.
- [19] Liang C, Liu Y, Xu H, et al. Exosomes of human umbilical cord MSCs protect against hypoxia/reoxygenation-induced pyroptosis of cardiomyocytes via the miRNA-100-5p/FOXO3/NLRP3 pathway[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8 (1): 615850.
- [20] 王婷婷, 张健, 张再媛, 等. 柚皮苷抑制大鼠心肌缺血/再灌注损伤诱导的细胞焦亡 [J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37 (6): 1019–1026.
- [21] Sharma B, Kanneganti T. NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases[J]. *Nat Immunol*, 2021, 22 (5): 550–559.
- [22] 叶赛, 刘亮, 杨人强. NLRP3-caspase1 介导的细胞焦亡与心血管疾病的关系 [J]. *南昌大学学报 (医学版)*, 2021, 61 (2): 94–97.
- [23] Wang X, Guo Z, Ding Z, et al. Inflammation, autophagy, and apoptosis after myocardial infarction[J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7 (9): 245–253.
- [24] Wei N, Zhang C, He H, et al. Protective effect of saponins extract from *Panax japonicus* on myocardial infarction: involvement of NF- κ B, Sirt1 and mitogen-activated protein kinase signalling pathways and inhibition of inflammation[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2014, 66 (11): 1641–1651.
- [25] Gao R, Shi H, Chang S, et al. The selective NLRP3-inflammasome inhibitor MCC950 reduces myocardial fibrosis and improves cardiac remodeling in a mouse model of myocardial infarction[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 74 (1): 105575.
- [26] Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a novel player in myocardial infarction[J]. *Int Heart J*, 2014, 55 (2): 101–105.
- [27] Zhou W, Chen C, Chen Z, et al. NLRP3: a novel mediator in cardiovascular disease[J]. *J Immunol Res*, 2018, 2018 (1): 5702103.
- [28] 中国医师协会中西医结合医师分会, 中国中西医结合学会心血管病专业委员会, 中国中西医结合学会重症医学专业委员会, 等. 急性心肌梗死中西医结合诊疗指南 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38 (3): 272–284.
- [29] Kovacs S, Miao E. Gasdermins: effectors of pyroptosis[J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27 (9): 673–684.
- [30] Feng S, Fox D, Man S. Mechanisms of gasdermin family members in inflammasome signaling and cell death[J]. *J Mol Biol*, 2018, 430 (1): 3068–3080.
- [31] Shi J, Gao W, Shao F. Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed necrotic cell death[J]. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42 (4): 245–254.
- [32] Shi J, Zhao Y, Wang K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death[J]. *Nature*, 2015, 526 (7575): 660–665.

(收稿: 2021-09-02 在线: 2022-12-21)

责任编辑: 白霞