

血必净注射液对缺氧/复氧大鼠心肌 TLR4—NF- κ B—TNF- α 通路的影响

刘亚坤^{1,2} 何金波¹ 陈海娥¹ 陈 丹¹ 苗亚飞¹ 应 磊^{1,3} 游 昕⁴ 王万铁^{1,3}

摘要 **目的** 探讨血必净注射液(XBJI)对大鼠缺氧/复氧心肌炎性反应相关炎症因子的抑制作用。**方法** 健康雄性 SD 大鼠 36 只,体重(280 $\pm$ 30)g,随机分为正常组(N 组)、平衡灌注组(BP 组)、模型组(M 组)、小剂量 XBJI 组(XBJI_L 组)、中剂量 XBJI 组(XBJI_M 组)、大剂量 XBJI 组(XBJI_H 组),每组 6 只。通过 Langendorff 离体心脏灌流,建立缺氧/复氧大鼠心肌炎性反应模型。用 ELISA 方法检测心肌组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的浓度,Western blot 检测心肌组织中核因子- κ B p65(NF- κ B p65)蛋白、Toll 样受体 4(TLR4)蛋白的表达,RT-PCR 检测心肌组织中 NF- κ B p65 mRNA 及 TLR4 mRNA 的表达;电镜观察缺氧/复氧大鼠心肌超微结构的变化。**结果** 与 M 组比较,XBJI_L 组、XBJI_M 组、XBJI_H 组心肌 TNF- α 的浓度、NF- κ B p65 蛋白及 mRNA、TLR4 蛋白及 mRNA 表达量有不同程度的下降,除 TNF- α 下降以 XBJI_L 组最为明显($P < 0.01$)外,其他均以 XBJI_M 组下降最为明显($P < 0.01$, $P < 0.05$);XBJI_L 组、XBJI_M 组、XBJI_H 组之间比较,XBJI_M 组 NF- κ B p65 及 TLR4 蛋白水平明显低于 XBJI_L 组($P < 0.05$),其他差异无统计学意义($P > 0.05$);M 组心肌纤维疏松、断裂、横纹消失,线粒体嵴溶解,损伤严重,而 XBJI 处理后上述情况得到改善,以 XBJI_M 组最为明显。**结论** 不同剂量 XBJI 可通过抑制 TLR4—NF- κ B—TNF- α 信号转导通路减轻缺氧/复氧大鼠心肌的炎性反应,以 4 mL/100 mL 的 XBJI 最佳。

关键词 血必净注射液;离体灌流;肿瘤坏死因子 α ;核因子- κ B p65;Toll 样受体 4

Effect of Xuebijing Injection on TLR4—NF- κ B—TNF- α Pathway of Rats' Myocardial Anoxia/Reoxygenation LIU Ya-kun^{1,2}, HE Jin-bo¹, CHEN Hai-e¹, CHEN Dan¹, MIAO Ya-fei¹, YING Lei^{1,3}, YOU Xin⁴, and WANG Wan-tie^{1,3} 1 Ischemia/Reperfusion Injury Institute, Wenzhou Medical University, Zhejiang (325035), China; 2 Department of Pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei (230032), China; 3 Department of Pathophysiology, Wenzhou Medical University, Zhejiang (325035), China; 4 Department of Cardiothoracic Surgery, The 454th PLA Hospital, Nanjing (210002), China

ABSTRACT **Objective** To explore the role of Xuebijing Injection (XBJI) in inhibiting inflammatory factors associated with anoxia/reoxygenation myocardial inflammatory response of rats. **Methods** Totally 36 healthy male Sprague-Dawley rats, 280 $\pm$ 30 g were randomly divided into six groups, i.e., the normal control group (N group), the balanced perfusion group (BP group), the model group (M group), the low dose XBJI group (XBJI_L group), the middle dose XBJI group (XBJI_M group), and the high dose XBJI group (XBJI_H group), 6 in each group. The myocardial anoxia/reoxygenation rat model was established by Langendorff isolated heart perfusion. The concentration of TNF- α in the myocardial tissue was detected by ELISA. The expression of nuclear factor kappa B p65 (NF- κ B p65) protein and Toll like receptor 4 (TLR4) protein were detected using Western blot. The expression of NF- κ B p65 mRNA and TLR4 mRNA was detected by RT-PCR. Ultrastructural changes of anoxia-reoxygenation rats' heart muscle were observed under transmission electron microscope. **Results** Compared with the M group, the TNF- α concentration, expression levels of NF- κ B p65 protein and mRNA, TLR4 protein and mRNA decreased to va-

基金项目:全军医药卫生科研项目(No. 08MA059);浙江省中医药重点学科建设计划项目(No. 2012-XK-A28)

作者单位:1.温州医科大学缺血/再灌注损伤研究所(温州 325035);2.安徽医科大学病理生理学教研室(合肥 230032);3.温州医科大学病理生理学教研室(温州 325035);4.解放军第四五四医院胸心外科(南京 210002)

通讯作者:王万铁, Tel:0577-86689817, E-mail:wwt@wzmc.edu.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2014.12.1463

rious degrees in the XBJL group, the XBJM group, and the XBJH group. The TNF- α expression level decreased most significantly in the XBJL group ($P < 0.01$), while other indices decreased most obviously in the XBJM group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Expression levels of NF- κ B p65 and TLR4 protein were obviously lower in the XBJM group than in the XBJL group ($P < 0.05$). There was no statistical difference in other indices among the three XBJ groups ($P > 0.05$). Myocardial fibers were loose and broken with disappearance of transverse striation, and mitochondrial cristae was dissolved and severely damaged in the M group. The aforesaid condition was improved after treated by XBJ, with the most obvious effect obtained in the XBJM group. **Conclusions** Different doses of XBJ could attenuate inflammatory reactions after myocardial anoxia/reoxygenation rats' heart muscle through inhibiting TLR4-NF- κ B-TNF- α signal transduction pathway. The best effect could be obtained by 4 mL/100 mL XBJ.

KEYWORDS Xuebijing Injection; isolated perfusion; tumor necrosis factor alpha; nuclear factor kappa B p65; Toll like receptor 4

血必净注射液(Xuebijing Injection, XBJ)是中药复方注射液,由红花、赤芍、当归、丹参、川芎等药物的有效成分组成,其提取物的有效成分包括红花黄色素 A、川芎嗪、丹参素、阿魏酸、芍药苷、原儿茶醛等,其中红花黄色素 A 浓度 > 0.5 mg/mL,芍药苷浓度 > 1 mg/mL,阿魏酸浓度 > 0.01 mg/mL。可通过抑制白介素^[1]、肿瘤坏死因子^[1]、细胞间黏附分子^[2]等炎症因子的表达发挥抗炎作用;亦可通过抑制参与炎症反应的重要转录因子 DNA 结合活性而达到抵抗炎症的效果^[3],从而对机体的重要脏器起到保护作用;以往研究报道,XBJ 在缺血/再灌注损伤中起到一定的保护作用^[4]。

为了进一步阐明 XBJ 的抗炎作用及其对受损心肌保护作用的可能机制,本实验利用排除了神经体液等因素影响,制备简单,条件易于控制的 Langendorff 离体心脏灌流装置,进行了大鼠离体心脏灌流实验,通过观察 XBJ 对缺氧/复氧大鼠心肌肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、核因子 - κ B p65 (nuclear factor kappa B p65, NF- κ B p65)、Toll 样受体 4 (Toll like receptor 4, TLR4) 表达的影响,探讨 XBJ 抑制炎症反应的可能机制,从而为临床应用 XBJ 防治体外循环下心肌缺血/再灌注损伤提供更多的实验依据和理论基础。

材料与方法

1 动物 SPF 级健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,体重 (280 ± 30) g,由温州医科大学实验动物中心提供[动物使用许可证号为 SYXK(浙)2010-0150]。

2 试剂及仪器 改良 Thomas II 停搏液成分(g/L): NaCl 6.4284、KCl 1.1928、CaCl₂ 0.1332、NaHCO₃ 0.08401、MgCl₂ · 6H₂O 3.2528(按照以上成分用超纯水自配);K-H 缓冲液成分(g/L): NaCl

6.9251、KCl 0.3578、CaCl₂ 0.2775、NaHCO₃ 2.1003、KH₂PO₄ 0.1633、MgSO₄ · 7H₂O 0.2958、Glucose 2.1997(按照以上成分用超纯水自配);大鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司);兔抗鼠 NF- κ B p65 多克隆抗体(ab7970, Abcam),小鼠抗鼠 TLR4 单克隆抗体(sc-293072, Santa Cruz),兔抗鼠 GAPDH 多克隆抗体(中国杭州贤至生物科技有限公司),辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗(ab6721, Abcam),辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠二抗(碧云天生物技术研究),BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天生物技术研究),分离胶缓冲液、浓缩胶缓冲液、丙烯酰胺(北京索莱宝),封闭用奶粉(美国 BD 公司),PVDF 膜(美国 Millipore 公司),彩色预染蛋白 Marker(美国 Ferments 公司),增强化学发光试剂盒(美国 Pierce 公司),X 线胶片(柯达公司),显影定影试剂盒(南京凯基生物公司);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司),蛋白核酸检测仪(美国 Thermo 公司),逆转录 PCR 引物(上海生工生物工程技术有限公司),逆转录 PCR 试剂盒(美国 Ferments 公司),琼脂糖(德国 Biowest 公司),DNA marker(上海捷瑞公司);其余为市售分析纯。Langendorff 离体心脏灌流装置(ML870B2, AD Instruments, Australia);Powerlab 八通道生理记录仪及 Chart5.5.6 生物信号数据采集及分析系统(ML870, AD Instruments, Australia)。

3 药物 血必净注射液(天津红日药业股份有限公司,批号:Z20040033,规格:10 mL/支),使用时按照每 100 mL 改良 Thomas II 停搏液中加入相应剂量 XBJ 配置成 2、4 及 8 mL/100 mL 备用(分别相当于临床最小用药剂量的 15、30 及 60 倍)。

4 分组及模型建立 SPF 级健康雄性 SD 大鼠

36 只,按照完全随机设计原则将其随机分为正常组(N 组)、平衡灌注组(BP 组)、模型组(M 组)、小剂量 XBJI 组(XBJI_L 组)、中剂量 XBJI 组(XBJI_M 组)及大剂量 XBJI 组(XBJI_H 组),每组 6 只。

造模方法参考文献[5]。大鼠称重后,用 5%水合氯醛(7~8 mL/kg)腹腔注射麻醉,开腹,经下腔静脉注射肝素(1 000 U/kg)抗凝,迅速开胸取出心脏,立即将其放入预先准备好的 0~4℃ K-H 缓冲液中,找出主动脉,在其第 3 个分支处将其切断,将心脏悬挂在 langendorff 离体心脏灌流装置上,经主动脉进行逆行灌注,建立大鼠心脏离体灌注模型,采用恒温恒压灌流,灌注液温度为(37±0.5)℃。灌注压 100 mmHg(1 kPa=7.5 mmHg),灌注液通有 95% O₂+5% CO₂ 混合气体,并且预充 30 min,pH:7.40±0.05。在心脏左心耳根部剪一小口,经左心房、房室瓣放入与压力传感器连接的乳胶球囊,球囊与 Powerlab 八通道生理记录仪及 Chart5.5.6 生物信号数据采集及分析系统连接,往球囊内缓慢注射适量生理盐水,维持左心室舒张末期压力(LVEDP)4~10 mmHg。M 组在建立 langendorff 离体心脏灌注模型的基础上,平衡灌注 15~20 min 后,持续灌注改良 Thomas II 停搏液 3 min,使心脏完全停搏。继而停灌 30 min,然后再复灌 K-H 缓冲液使其复跳并持续灌注 120 min;XBJI_L 组、XBJI_M 组、XBJI_H 组分别 2、4、8 mL/100 mL 加入 XBJI 的改良 Thomas II 停搏液,其他处理与 M 组相同。N 组开胸取出心脏后,直接保存心肌组织以备后续指标检测;BP 组在建立 langendorff 离体心脏灌注模型的基础上,平衡灌注 15~20 min 后,将心脏取下,保存心肌组织以备后续检测(每组心脏停灌的 30 min,都采用心脏周围放冰块但不接触心脏的方法,将心脏表面温度维持在 20℃左右)。

5 检测指标及方法

5.1 ELISA 方法检测心肌组织中 TNF-α 浓度

取低温保存的心肌组织 100 mg 置于研钵中,加液氮研成粉末后,加入 1 mL 生理盐水,充分匀浆,取上清

液,BCA 法进行蛋白定量,大鼠 TNF-α ELISA 试剂盒进行 TNF-α 浓度检测。酶标仪测出 OD 值,然后计算出总蛋白浓度、TNF-α 浓度,以 TNF-α 浓度与总蛋白浓度比值表示 TNF-α 的相对浓度。

5.2 Western blot 检测心肌组织中 NF-κB p65 及 TLR4 蛋白表达

取低温保存的心肌组织 100 mg 置于研钵中,加液氮研成粉末后,加入 1 mL RIPA 裂解液(强),使用前数分钟内加入苯甲基磺酰氟(Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF),使 PMSF 的最终浓度为 1 mmol/L 进行匀浆。取上清液,BCA 法测定蛋白浓度。配置 10% SDS-PAGE 分离胶和 3% 浓缩胶,每孔加入 20 μg 蛋白样品,置入电泳缓冲液中,90 V 电泳约 20 min,待样品进入分离胶,120 V 电泳约 60 min。采用湿式电转移法将蛋白转印至 PVDF 膜,用 5%脱脂奶粉于室温下封闭 90 min,按照 1:1 000 的稀释比例分别加入 I 抗 NF-κB p65 抗体、TLR4 抗体及 GAPDH 抗体。4℃ 孵育过夜,次日 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。再加入相应的 II 抗,室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。化学发光、曝光、显影、定影,结果用 Quantity One 凝胶软件分析系统对条带进行分析。

5.3 RT-PCR 方法检测心肌组织中 NF-κB p65 及 TLR4 mRNA 的表达

Trizol 法抽提总 RNA,取总 RNA 1 μL 用蛋白核酸仪进行 RNA 浓度的检测,记录 RNA 浓度及 A260/A280 比值判断纯度(A260/A280 值在 1.8~2.0 之间视为纯度较高,否则,重新提取 RNA),将各组 RNA 浓度用 DEPC 水调至 2 μg/μL。按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录,合成 cDNA,再按照 PCR 试剂盒说明书进行 cDNA 扩增。引物序列见表 1。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,最适退火温度退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,72℃ 后延伸 5 min,退火温度及循环次数见表 1。PCR 产物通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳、溴化乙啶染色后,用凝胶成像仪记录。用 Quantity One 凝胶软件分析系统分析灰度值。

表 1 引物序列

引物名称	碱基序列	片段大小(bp)	循环次数	退火温度(℃)
NF-κB p65	上游:5'-GATAAAATCCTCGGGGTCTAC-3'	299	27	59.3
	下游:5'-GCTGCTATGTGTAGAGGTGTCG-3'			
β-actin	上游:5'-TCAGGTCATCACTATCGGCAAT-3'	432	27	59.3
	下游:5'-AAAGAAAGGGTGTAAAACGCA-3'			
TLR4	上游:5'-CATCCAAAGGAATACTGCAACA-3'	398	28	58.0
	下游:5'-GTTTCTCAGCCAGTCCTCATTC-3'			
GAPDH	上游:5'-CAGTGCCAGCCTCGTCTCAT-3'	595	28	58.0
	下游:5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'			

5.4 电镜观察心肌组织超微结构的变化 各组最后停灌后迅速从心尖部同一部位取材,在生理盐水中漂洗 1 min,切成 1 mm³ 大小的组织块,浸入 2.5% 的戊二醛固定液内,充分摇晃约 2 min,隔 15 min 再摇晃 1 次,而后放置于 4 ℃ 冰箱内固定 2 h 以上备用。然后按电镜常规制样流程制样,透射电镜下观察心肌结构及心肌线粒体的改变,并拍照。

6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理,计量资料均进行正态性检验,以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。多组样本均数比较进行方差齐性检验,组间比较采用单因素方差分析,方差齐性者两两比较采用 LSD 法,方差不齐者进行 *Duunet's* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

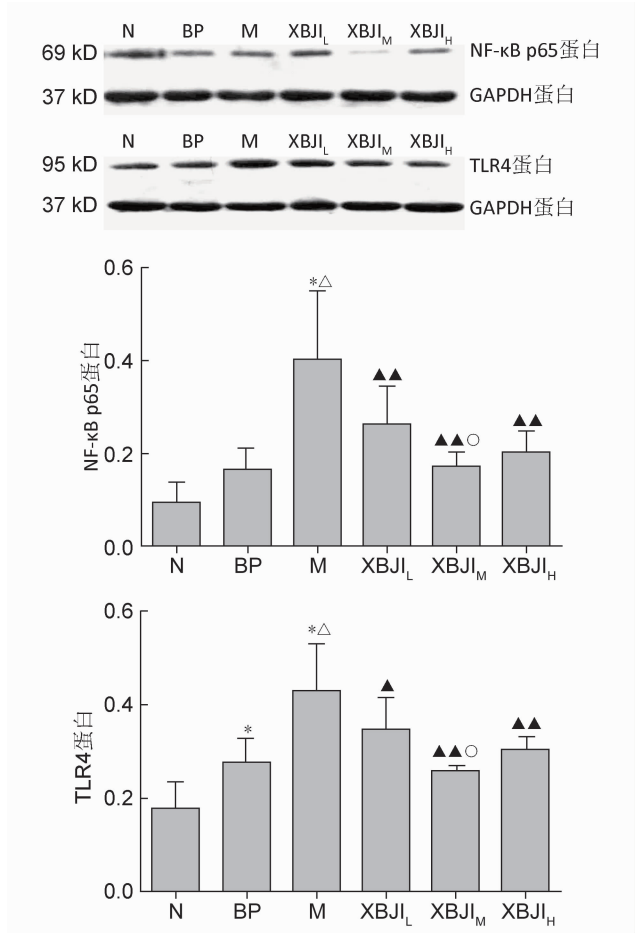
1 各组大鼠心肌组织中 TNF-α 浓度的比较 (表 2) 与 N 组及 BP 组比较,M 组 TNF-α 的浓度显著上升,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 M 组比较,XBJI 干预后,心肌组织 TNF-α 的浓度显著下降,XBJI_L 组差异显著($P < 0.01$),XBJI_M 组差异明显($P < 0.05$),XBJI_H 组有所下降,但差异不明显($P > 0.05$);XBJI 干预组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠心肌组织 TNF-α 相对浓度的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	<i>n</i>	TNF-α 相对浓度
N	6	5.03 ± 0.97
BP	6	4.76 ± 2.78
M	6	12.85 ± 1.23 ^{*△}
XBJI _L	6	9.52 ± 2.08 ^{▲▲}
XBJI _M	6	10.44 ± 0.87 [▲]
XBJI _H	6	11.15 ± 2.65

注:与 N 组比较,^{*} $P < 0.01$;与 BP 组比较,[△] $P < 0.01$;与 M 组比较,[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$

2 各组大鼠心肌组织 NF-κB p65 及 TLR4 蛋白的比较(图 1) 与 N 组比较,BP 组 TLR4 蛋白表达明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 N 组及 BP 组比较,M 组心肌组织 NF-κB p65 及 TLR4 蛋白水平显著上升,差异有统计学意义(均为 $P < 0.01$)。各剂量 XBJI 组与 M 组比较,各剂量 XBJI 显著降低心肌组织 NF-κB p65 及 TLR4 蛋白表达,差异均有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$);各剂量 XBJI 组之间比较,XBJI_M 组 NF-κB p65 及 TLR4 蛋白水平显著低于 XBJI_L 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

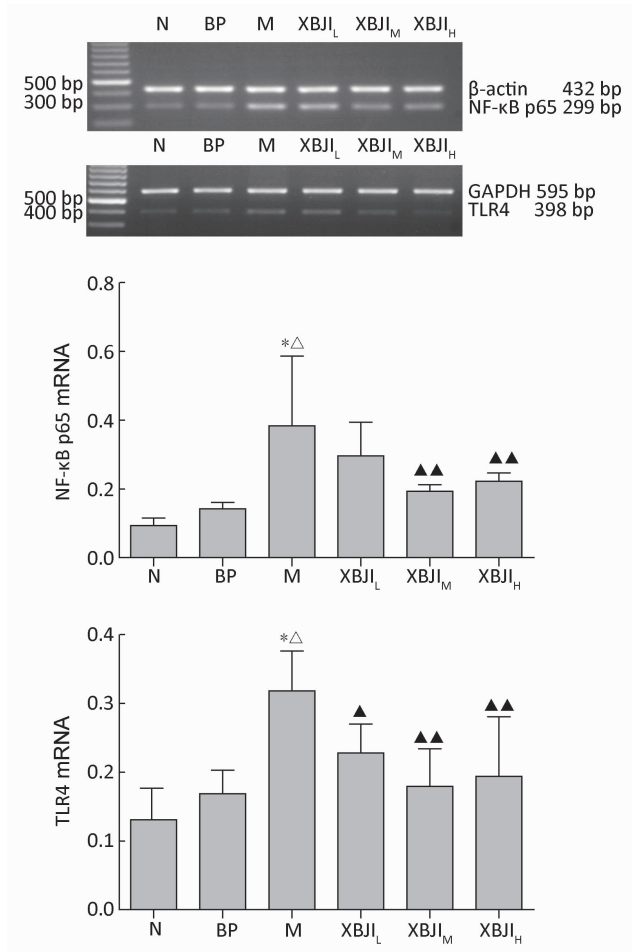


注:与 N 组比较,^{*} $P < 0.01$;与 BP 组比较,[△] $P < 0.01$;与 M 组比较,[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$;与 XBJI_L 组比较,[○] $P < 0.05$

图 1 Western blot 方法检测各组大鼠心肌组织 NF-κB p65 及 TLR4 蛋白的变化 ($n = 6$)

3 各组大鼠心肌组织中 NF-κB p65 及 TLR4 mRNA 表达的比较(图 2) 与 N 组及 BP 组比较,M 组 NF-κB p65 mRNA 的表达上升,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 M 组比较,XBJI_M 组和 XBJI_H 组 NF-κB p65 mRNA 的表达均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);各剂量 XBJI 组之间没有差异($P > 0.05$),但以 XBJI_M 组降低最多;与 N 组比较,M 组 TLR4 mRNA 表达显著升高($P < 0.01$);与 BP 组比较,M 组明显升高($P < 0.05$);与 M 组比较,各剂量 XBJI 组 TLR4 mRNA 的表达均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$);各剂量 XBJI 组之间表达差异无统计学意义($P > 0.05$),但以 XBJI_M 组下降最多。

4 各组大鼠心肌组织透射电镜下超微结构的变化(图 3) N 组与 BP 组心肌纤维排列紧密、走行正常、横纹明显,线粒体形态正常,线粒体嵴结构清晰。M 组心肌纤维纤细、疏松,横纹不明显,线粒体出现畸



注:与 N 组比较, * $P < 0.01$; 与 BP 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 M 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

图 2 RT-PCR 方法检测各组大鼠心肌组织 NF-κB p65 及 TLR4 mRNA 的变化 ($n = 6$)

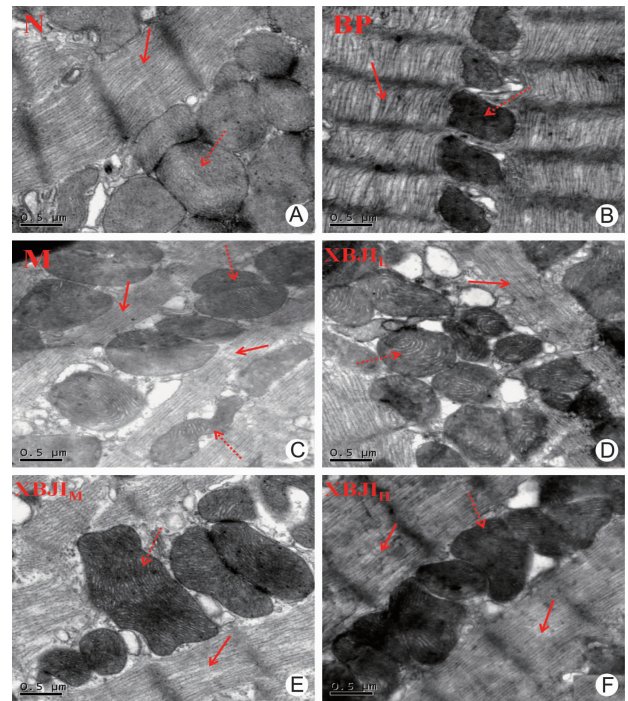
形,线粒体嵴走形紊乱,存在线粒体聚集现象(图 3C)。XBJI 处理后心肌纤维变粗,横纹明显,线粒体形态接近正常,线粒体聚集现象减轻(图 3D、E、F)。

讨 论

XBJI 主要由红花、赤芍、当归、丹参、川芎等药物的有效成分组成,具有抗炎、抑制与炎症反应相关的重要转录因子 DNA 结合活性^[1-3]。本实验结果进一步说明 XBJI 有效成分发挥抗炎及心肌保护作用的可能机制。

电镜结果显示:M 组心肌损伤严重,表现为心肌纤维疏松、断裂、横纹消失,线粒体嵴溶解;XBJI 处理后心肌纤维及线粒体损伤得到明显改善,以 4 mL/100 mL 的 XBJI 最为显著。表明 XBJI 对缺氧/复氧大鼠心肌具有一定程度的保护作用。

缺氧/复氧过程伴随着白细胞的增多,中性粒细胞



注:A 为 N 组;B 为 BP 组;C 为 M 组;D 为 XBJI_L 组;E 为 XBJI_M 组;F 为 XBJI_H 组;实箭头所指为心肌;虚箭头所指为线粒体。

图 3 各组大鼠心肌组织电镜下的变化 (TEM, $\times 25\ 000$)

和血管内皮细胞的多种黏附分子表达增强,从而引起中性粒细胞的黏附、聚集,而使中性粒细胞激活,激活的中性粒细胞可以释放 TNF- α 、IL-1 及 IL-6,经过一系列的改变,最终诱发性炎症反应。本实验通过观察大鼠心肌缺氧/复氧模型诱发的心肌炎症反应,阐明了 XBJI 拮抗心肌炎症反应的作用及其可能存在的机制。

有大量资料证实 XBJI 可以通过抑制 TNF- α 、IL-1 β 的产生而降低炎症反应,使许多由炎症反应而引起的疾病得到了很好救治。如: XBJI 可能通过下调 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等的表达而对大鼠的急性肺损伤发挥保护作用^[6];在肝缺血/再灌注后, XBJI 可减轻全身炎症反应, XBJI 组较缺血/再灌注组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、ICAM-1 均降低^[7]; XBJI 可能通过降低老年脓毒症患者血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平及提高 IL-10 的浓度,来改善老年脓毒症患者的病情,降低病死率^[8]。本实验发现, XBJI 干预组心肌组织 TNF- α 的浓度显著下降,与 M 组比较, XBJI_L 组差异有统计学意义, XBJI_M 组差异明显, XBJI_H 组有所下降,但差异不明显。说明 XBJI 可以抑制缺氧/复氧心肌 TNF- α 的表达。

核因子- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 是参与免疫与炎症反应的重要转录因子^[9]。已有资

料证实,对重症急性胰腺炎患者,XBJI 治疗后可使患者血清中的 NF- κ B p65 明显降低^[10];另外,XBJI 可抑制 NF- κ B 及炎性细胞活性,对百草枯中毒大鼠急性肺损伤有治疗作用^[11]。本实验中 XBJI 可使心肌组织 NF- κ B p65 蛋白及 mRNA 的表达明显下降($P < 0.01$, $P < 0.05$);各剂量 XBJI 组之间比较,XBJI_M 组下降更明显。说明 XBJI 可以下调缺氧/复氧心肌 NF- κ B p65 蛋白及 mRNA 的表达,且以 XBJI_M 组最明显。

TLR 是一类天然免疫受体,TLR4 是介导内毒素/脂多糖应答的主要受体,TLR4—NF- κ B 参与炎症反应^[12],抑制 TLR4—NF- κ B 通路,可以使大鼠心肌缺血/再灌注损伤减轻^[13]。有研究表明,TLR4—NF- κ B 通路参与了创伤弧菌脓毒症损伤的早期病理生理过程,XBJI 能抑制 TLR4—NF- κ B 活化,减轻创伤弧菌脓毒症大鼠肺损伤^[14];另有资料显示:XBJI 可以通过下调肠组织内 TLR4、NF- κ B 和 ICAM-1 表达减轻脓毒症大鼠的肠损伤^[15]。本实验中 XBJI 可使 TLR4 蛋白及 mRNA 的表达明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);各剂量 XBJI 组之间比较,以 XBJI_M 组下降最多。说明 XBJI 可以下调缺氧/复氧心肌 TLR4 蛋白及 mRNA 的表达,且以 XBJI_M 组最明显。

综上所述,不同剂量血必净注射液有可能通过抑制 TLR4—NF- κ B—TNF- α 信号转导通路的活化减轻缺氧/复氧大鼠心肌的炎症反应,以 4 mL/100 mL 的 XBJI 最佳。这为 XBJI 的临床应用提供了可靠的实验依据和理论依据。

参 考 文 献

- [1] Qi F, Liang ZX, She DY, et al. A clinical study on the effects and mechanism of Xuebijing Injection in severe pneumonia patients [J]. J Tradit Chin Med, 2011, 31(1): 46–49.
- [2] 李春盛,金铭,武军元,等.血必净对严重脓毒症患者血管内皮细胞相关促炎因子和凝血因子的影响[J]. 中华医学杂志, 2009, 89(39): 2744–2747.
- [3] 宫蓓蕾,张永,许启霞,等.重症肺炎患者核转录因子- κ B DNA 结合活性变化及血必净注射液的干预作用[J]. 中国危重病急救医学, 2010, 22(9): 543–546.
- [4] Ma JF, Xuan LZ, Wu W, et al. Effect of Xuebijing Injection on rabbits ischemia/reperfusion injury induced by femoral arterial disease [J]. Chin Crit Care Med, 2012, 24(4): 233–236.
- [5] 施通,刘东,施克俭,等.脂肪乳制复苏布比卡因导致的心脏停搏的机制探讨[J]. 温州医学院学报, 2010, 40(2): 119–122, 129.
- [6] 王光权,王龙.血必净注射液对大鼠急性肺损伤的作用[J]. 现代预防医学, 2011, 38(5): 996–998.
- [7] 马巍,杨季红,马静,等.血必净对大鼠肝缺血-再灌注后全身炎症反应综合征的干预作用[J]. 河北医药, 2010, 32(24): 3443–3444.
- [8] 黎清标,曾庆春,佟琳,等.血必净对老年脓毒症患者的疗效和机制研究[J]. 医学研究杂志, 2009, 38(6): 50–53.
- [9] Penna G, Fibbi B, Amuchastegui S, et al. The vitamin D receptor agonist elocalcitol inhibits IL-8-dependent benign prostatic hyperplasia stromal cell proliferation and inflammatory response by targeting the RhoA/Rho kinase and NF- κ B pathways [J]. Prostate, 2009, 69(5): 480–493.
- [10] 朱绍辉,李荣,李泽信.血必净治疗重症急性胰腺炎 20 例分析[J]. 中国现代普通外科进展, 2010, 13(4): 321–322.
- [11] 刘明伟,林昕,张明谦,等.血必净对急性百草枯中毒鼠肺 NF- κ B 活性及肺损伤保护的影响[J]. 重庆医学, 2010, 39(1): 37–39.
- [12] Andrea B, Monica B, Gabriele V, et al. Inhibition of Toll-like receptor 4 (TLR4)-induced NF- κ B activation by NOPr is lost in human glioblastoma cells chronically exposed to LPS [J]. Brain Behav Immun, 2013, 29(Suppl): S18.
- [13] Yang J, Li Y, Hu C. Ischemic preconditioning protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through inhibiting Toll-like receptor 4/NF- κ B signaling pathway in rats [J]. J Cent South Univ (Med Sci), 2011, 36(10): 972–978.
- [14] 李忠旺,邱俏檬,孙琦,等.血必净注射液对创伤弧菌脓毒症大鼠肺组织 Toll 样受体 4 及核转录因子- κ B 表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2010, 17(1): 24–27.
- [15] 祝伟,吕青,陈华文,等.血必净注射液对脓毒症大鼠肠 TLR4 和 NF- κ B 的影响[J]. 中国医药导刊, 2011, 13(2): 293–294.

(收稿:2013-08-07 修回:2014-09-01)