

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2026.06.011

实验研究

活血温胆方对心房颤动痰热瘀阻证模型大鼠心肌组织蛋白质组学的影响及实验验证

侯艾琳^{1,2}, 余文熙^{1,2}, 陈琛¹, 刘宇轩¹, 吉星², 吴婵², 史大卓¹, 张莹[✉]

1. 中国中医科学院西苑医院, 北京市海淀区西苑操场1号, 100091; 2. 北京中医药大学研究生院

[摘要] **目的** 基于蛋白质组学技术探究活血温胆方治疗心房颤动(房颤)痰热瘀阻证的可能作用机制。**方法** 将40只SD大鼠随机分为空白组、模型组、活血温胆方组和抑制剂组, 每组10只, 抑制剂组用于后续实验验证。除空白组外, 其余各组大鼠采用乙酰胆碱氯化钙混合溶液尾静脉注射+高脂饮食+脂多糖腹腔注射的方法建立房颤痰热瘀阻证大鼠模型。实验一: 造模成功后活血温胆方组予活血温胆方12.6 g/(kg·d)灌胃, 空白组、模型组给予12.6 g/(kg·d)的灭菌饮用水, 均每日1次, 持续2周。比较空白组、模型组、活血温胆方组大鼠体质量、肛温、舌象RGB值; 心电图观察房颤诱发及持续时间; 心脏超声检测左心房大小(LA)、主动脉内径(AO)、射血分数(EF)、缩短分数(FS); 左心房组织进行HE染色、Masson染色(心肌胶原容积分数)和天狼星红染色[I型胶原(Collagen I)/Ⅲ型胶原(Collagen Ⅲ)]; 肝脏左外叶组织进行HE染色和油红O染色(肝脏脂滴面积); 血液生化指标包括总胆固醇(TC)、低密度胆固醇(LDL-C)、全血黏度(低切、中切、高切)、血浆黏度、红细胞沉降率及凝血指标凝血酶时间(TT)、活化部分凝血酶原时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、纤维蛋白原(FIB); ELISA法检测炎症因子[包括C反应蛋白(CRP)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-17(IL-17)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)]及纤维化因子[包括基质金属蛋白酶9(MMP9)、Collagen I、半乳糖凝集素3(Gal-3)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)]水平; 心脏组织进行非数据依赖性采集蛋白质组学研究。实验二: 根据蛋白质组学研究结果, 抑制剂组大鼠给予12.6 g/(kg·d)的灭菌饮用水, 每日1次, 同时腹腔注射肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAF6)抑制剂C25-140 5 mg/kg, 隔日1次, 连续2周。检测心肌组织TRAF6/核因子- κ B(NF- κ B)通路相关蛋白、mRNA表达及相关纤维蛋白水平。**结果** 与空白组比较, 模型组大鼠肛温升高, 舌象RGB值降低, 房颤平均持续时间延长, 心功能EF、FS降低, LA/AO升高, 左心房心肌胶原容积分数、Collagen I/Collagen Ⅲ及肝脏左外叶脂滴相对面积均升高, LDL-C、FIB水平升高, TT、APTT、PT均降低, 全血黏度(低切、中切、高切)、血浆黏度、红细胞沉降率均升高, 红细胞压积降低, CRP、IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 水平均升高, MMP9、Gal-3、 α -SMA、Collagen I升高($P<0.01$)。与模型组比较, 活血温胆方组上述各指标均改善($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。蛋白质组学分析筛选出73个关键逆转蛋白, 其中TRAF6为核心蛋白, 并富集在NF- κ B信号通路上。活血温胆方和抑制剂组均可抑制TRAF6/NF- κ B通路相关蛋白、mRNA表达及相关纤维蛋白水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 活血温胆方可能通过抑制心肌组织TRAF6/NF- κ B信号通路, 减轻心肌炎症与纤维化反应, 从而多靶点干预房颤痰热瘀阻证。

[关键词] 心房颤动; 活血温胆方; 痰热瘀阻证; 蛋白质组学; 肿瘤坏死因子受体相关因子-6; 核因子- κ B; 心肌纤维化

基金项目: 中国中医科学院西苑医院能力提升项目(XYZX0303-18)

✉ 通讯作者: echo993272@sina.com

心房颤动 (atrial fibrillation, AF) 简称房颤, 作为全球高发的心律失常类疾病, 可显著增加脑卒中、冠状动脉疾病和心力衰竭的发生风险, 且随年龄增长疾病负担不断加剧^[1]。现代研究^[2-3]表明, 房颤的发生和维持涉及复杂的病理机制, 除了电重构和结构重塑外, 代谢、炎症、纤维化也发挥了重要作用。代谢紊乱 (如脂质异常) 可触发慢性低度炎症状态, 进而通过激活核因子- κ B (NF- κ B)、转化生长因子- β (TGF- β) 等信号通路促进心肌纤维化, 最终导致心房结构重构与电生理紊乱^[4]。目前现代医学主流的抗心律失常药物 (如胺碘酮、决奈达隆等) 虽能一定程度控制心室率或维持窦性心律, 但其作用靶点相对单一, 在逆转心房结构重构方面作用有限, 且长期应用存在心外毒性等风险^[5]。

房颤可归属于中医学“心悸”“怔忡”范畴, 课题组前期研究^[6]发现, 痰火扰神证、痰瘀互阻证占比较高, 且痰证、热证与炎症指标水平呈正相关性, 提示痰热瘀阻是房颤的核心病机之一。活血温胆方是在黄连温胆汤基础上化裁而来的经验方, 紧扣房颤痰、热、瘀交织的核心病机, 具有清热化痰、活血化痰、安神定悸之效。在临床实践中, 我们观察到该方在改善房颤痰热瘀阻证患者心悸症状、减少房颤发作方面展现出良好的潜力。本研究采用蛋白质组学研究方法筛查心脏组织核心机制蛋白, 并以核心蛋白抑制剂反向验证, 旨在系统阐明活血温胆方干预房颤痰热瘀阻证的可能作用机制, 以期将临床经验转化为有实验数据支撑的科学证据。本研究已通过中国中医科学院西苑医院动物伦理委员会批准 (伦理批件号: 2024XLC033-3)。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性 SPF 级 SD 大鼠 40 只, 6 周龄, 体质量 180~200 g, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2021-0006。动物饲养在中国中医科学院西苑医院动物实验中心屏障环境内, 12 h 明暗交替, 温度控制在 (22±2) °C, 湿度控制在 50%~70%, 动物自由摄食饮水。

1.2 药物

活血温胆方组成: 黄连 10 g, 竹茹 10 g, 法半夏 10 g, 枳实 15 g, 甘松 15 g, 龙齿 15 g, 赤芍 15 g, 茯苓 20 g, 丹参 20 g, 陈皮 10 g。药物浸泡 30 min 后, 武火煮沸, 文火煎煮 30 min, 重复 2 次, 合并过滤, 浓缩至 1.26 g/ml, 4 °C 保存。

1.3 主要试剂及仪器

高血脂模型饲料 (配比为: 基础饲料+20% 蔗糖+15% 猪油+1.2% 胆固醇+0.2% 胆酸钠+其他, 批号 XSYT-ED-078), 小泰有泰 (北京) 生物科技有限公司; 氯化乙酰胆碱 (Ach, 批号: HY-B0282), MCE 公司; 氯化钙 (CaCl_2)、脂多糖 (LPS)、戊巴比妥钠粉末 (批号分别为 449709、L2880、20170308), Sigma 公司; 异氟烷 (批号: 64191201), 鲁南贝特制药有限公司; 肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF6)、NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B α)、磷酸化 NF- κ B 抑制蛋白 α (p-I κ B α)、TGF- β 、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、I 型胶原 (Collagen I)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、 β -管蛋白 (β -Tubulin) 抗体 (批号分别为 Ab33915、Ab32518、Ab133462、Ab215715、Ab228402、Ab270993、Ab150301、Ab8245、Ab314069), Abcam 公司; 磷酸化 NF- κ B P65 抗体 (p-NF- κ B P65)、NF- κ B P65 抗体 (批号分别为 3033T、8242T), CST 公司; 山羊抗小鼠 IgG、山羊抗兔 IgG (批号分别为 GB23301、GB23303), 塞维尔生物科技有限公司; 总 RNA 提取试剂盒、改良油红 O 染色液 (批号分别为 R1200、G1261), 北京索莱宝生物科技有限公司; cDNA 反转录试剂盒、qPCR SYBR Green 试剂盒 (货号分别为 11119ES60、11203ES03), 上海翊圣生物科技有限公司; 大鼠 C 反应蛋白 (CRP)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-17 (IL-17)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、MMP9、半乳糖凝集素 3 (Gal-3)、Collagen I、 α -SMA ELISA 检测试剂盒 (批号分别为 E20250115-30078B、E20250115-30206B、E20250115-30219B、E20250115-30201B、E20250115-31063B、E20250115-30473B、E20250115-30233B、E20250115-30514B、E20250115-30151B), 黄石市艾恩斯生物科技有限公司; 总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 检测试剂盒 (批号分别为 B2002、B2004), 北京北检新创源生物技术有限公司; 苏木素染液、伊红染液、Masson 染色试剂盒、天狼星红染色液 (批号分别为 B1001、B1006、B1301、B1305), 尔湾生物技术有限公司; 蛋白酶抑制剂 (批号: 4693159001), Hoffmann-La Roche 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号: PC0020), ThermoFisher Scientific 公司。

无线生物信号采集系统 (上海科心医学生物技术有限公司, 型号 KLB-2); 便携式小动物彩色多普勒超声成像仪 (飞依诺科技股份有限公司, 型

号: VINNO6 LAB); 血凝分析仪 (北京普朗新技术有限公司, 型号: PUN-208A); 全自动血流变仪 (北京普利生仪器有限公司, 型号: LBY-N6C); 全自动生化分析仪 (日本东芝医疗系统有限公司, 型号: TBA-120FR); 冷冻离心机 (Eppendorf 公司, 型号: Centrifuge 5430R); 酶标仪 softmax pro (Molecular Devices 公司, 型号: Spectra Max plus384); 全自动数码凝胶图像分析系统 (上海天能科技有限公司, 型号: Tanon-3500R); 数显式稳压稳流电泳仪 (上海天能科技有限公司, 型号: EPS-300); 超声波细胞破碎仪 (江苏波场智能科技股份有限公司, 型号: Fielda-650D); 扫描仪 (德国卡尔蔡司公司, 型号: Zeiss Axio Scan. Z1); 玻片扫描系统 (3DHISTECH 公司, 型号 Pannoramic SCAN)。

1.4 造模方法

依据本课题组前期造模方法^[7], 采用乙酰胆碱氯化钙混合液 (Ach-CaCl₂, Ach 60 mg·L⁻¹, CaCl₂ 10 g·L⁻¹) 尾静脉注射 1 ml·kg⁻¹, 每日 1 次, 连续 21 天构建房颤大鼠模型; 联合高脂饮食 21 天和脂多糖腹腔注射 1 g·L⁻¹、每周 1 次、连续 3 周的方法构建房颤热瘀阻证动物模型。造模成功的标准^[7]为: 1) 宏观表征: 大鼠毛发粗糙, 倦怠懒动, 大便干燥, 肛温升高 0.5℃以上, 舌色暗红。2) 心电图: 出现典型房颤改变, 即 P 波消失, 出现形态不规则的小 f 波, RR 间期不等, 房颤持续时间 > 1 s。3) 实验室指标: 血脂 (TC、LDL-C)、炎症因子 (IL-1β、TNF-α) 升高, 同时血液流变学指标 (全血黏度、血浆黏度) 及凝血功能 (纤维蛋白原) 出现符合血瘀证的异常改变。

1.5 分组与干预方法

将造模成功的 30 只大鼠采用随机数字表法分为模型组、活血温胆方组、抑制剂组, 每组 10 只, 并匹配 10 只 SPF 级 SD 大鼠作为空白组, 其中抑制剂组用于后续实验验证。参照人体与动物体表面积等效剂量换算公式 (系数 0.018)^[8], 计算得出活血温胆方组大鼠灌胃活血温胆溶液 12.6 g/(kg·d), 空白组、模型组灌胃 12.6 g/(kg·d) 的灭菌饮用水, 每日 1 次, 持续 2 周。

1.6 观察指标与方法

1.6.1 一般情况 观察大鼠的一般状态、体质量、舌象, 每周固定时间 LPS 腹腔注射 4 h 后用肛温仪测量大鼠肛温。参考文献 [9] 于第 1 天和第 35 天在固定光源、固定设备、固定高度下给各组大鼠舌面拍照, 以比色卡校正颜色, 将大鼠舌面分为九宫

格, 记录 9 个点的 RGB 值并取平均值。大鼠肛温评判热证水平, 舌色及 RGB 值可反映血瘀证状态。

1.6.2 心电图及心功能检测 药物干预 2 周后进行心电图及心脏超声检查。将大鼠称重后经 2% 异氟烷气体麻醉, 连接无线生物信号采集系统, 记录大鼠心电图, 待心电图稳定后经大鼠尾静脉注射 Ach-CaCl₂ (1 ml·kg⁻¹), 记录房颤诱发及发作持续时间。心电图检查完毕后进行心脏超声检查, 记录大鼠左心房大小 (LA)、主动脉内径 (AO)、左心室收缩末期容积 (LVESV)、左心室舒张末期容积 (LVEDV)、左心室收缩末期最小内径 (LVIDs)、左心室舒张末期最大内径 (LVIDd) 数据。以 LA/AO 作为左心房相对大小的指标; 射血分数 (EF) = (LVEDV-LVESV) / LVEDV × 100%, 缩短分数 (FS) = (LVIDd-LVIDs) / LVIDd × 100%, 以 EF 和 FS 作为心功能评判指标。

1.6.3 左心房、肝脏左外叶组织病理情况 采用随机数字表法每组选取 6 只大鼠心脏组织, 切除大鼠左心房, 用 4% 多聚甲醛固定, 脱水后进行石蜡包埋, 制成 4 μm 的石蜡切片, 进行苏木精-伊红 (HE)、Masson 染色、天狼星红染色。光学显微镜下观察炎症浸润与胶原沉积。Masson 染色下应用 Image J V1.4.3 软件统计心肌胶原容积分数表示纤维面积。天狼星红染色下, 在偏振光显微镜下观察胶原分布, 粗大的 Collagen I 纤维呈现橙黄色, 纤细的 III 型胶原 (Collagen III) 纤维呈绿色, 采用 Zeiss Zen V3.11 软件计算 Collagen I 和 Collagen III 的面积, 并以 Collagen I / Collagen III 比值反映组织内胶原纤维的成熟度、稳定性和组织重塑的状态。

切取大鼠肝脏左外叶组织, 一部分用 4% 多聚甲醛固定, 脱水后进行石蜡包埋, 制成 4 μm 的石蜡切片, 进行 HE 染色, 另一部分用 OCT 包埋制成 10 μm 冰冻切片后进行油红 O 染色, 在光学显微镜下拍照, 应用 Image J V1.4.3 软件统计肝脏脂滴面积。

1.6.4 血液生化检测 所有大鼠腹主动脉取血。一部分抗凝全血进行血液流变学检查, 包括全血黏度 (低切、中切、高切)、血浆黏度、红细胞沉降率; 一部分血浆检测凝血指标, 包括凝血酶时间 (TT)、活化部分凝血酶原时间 (APTT)、凝血酶原时间 (PT)、纤维蛋白原 (FIB), 以凝血功能和血液流变学指标变化作为血瘀证表征^[10]。剩余全血室温静止 2 h 后在 4℃下以 3500 r/min 离心 (离心半径 12 cm) 10 min, 取上清为血清, 按照 TC、LDL-C

检测试剂盒检测血脂水平，以血脂水平升高作为痰证微观评价指标^[11]。

1.6.5 ELISA 法检测炎症及纤维化因子水平 根据 ELISA 试剂盒说明书检测血清中炎症因子 CRP、IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 水平联合肛温反映热证程度^[12]；检测纤维化因子 MMP9、Collagen I、Gal-3、 α -SMA 水平以反映心肌纤维化程度，心肌纤维化不仅是房颤的病程演变，也是血瘀证的表征之一^[13]。

1.6.6 心脏组织非数据依赖性采集 (DIA) 蛋白质组学研究 1) 蛋白提取及含量测定：每组采用随机数字表法取 3 只大鼠的心脏组织 0.2 g 裂解后，高温 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min，14 000 $\times g$ 高速离心 10 min，收集上清测定蛋白含量。2) 色谱分离和质谱分析：采用色谱仪进行肽段分离，分析柱为 uPAC High Throughput column (75 $\mu\text{m}\times 5.5\text{ cm}$)，流动相 A 为水 (2% 乙腈+0.1% 甲酸)，流动相 B 为水 (80% 乙腈+0.1% 甲酸)，色谱时长为 8 min。采用 Orbitrap Astral 质谱仪检测模式为正离子，离子源电压设置为 1.5 kV。质谱扫描范围：100–1700 m/z。将 DIA 原始数据导入 Thermo Xcalibur 4.7 软件系统进行搜库分析。3) 生物信息学分析：使用美吉云生物平台^[14] 进行蛋白质组学数据处理及生物信息学分析，筛选 $P<0.05$ ，同时差异倍数 (FC) >1.2 的蛋白为差异表达性蛋白。选择基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集对所有的差异蛋白进行 GO 注释和通路分析。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 27.0 软件进行统计分析，数据均符合正态分布以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，方差齐性时采用单因素方差分析进行组间比较，组间两两比较采用 LSD- t 检验，方差不齐则采用非参数秩和检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

空白组大鼠精神状态良好，饮食饮水规律，毛

发光滑有光泽，二便正常，体质量缓慢增长，舌色淡红。模型组大鼠精神萎靡，倦怠懒动、抱团，毛发暗沉无光泽，大便干燥，体质量减轻，肛温升高，舌色暗红。活血温胆方组大鼠精神状态较模型组改善，毛发略有光泽。表 1 示，与空白组比较，模型组大鼠体质量显著降低，肛温升高，舌象 R、G、B 值均降低 ($P<0.01$)。与模型组比较，活血温胆方组大鼠肛温下降，舌象 R、G、B 值升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.2 各组大鼠房颤诱发情况比较

空白组大鼠未见房颤诱发。模型组 10 只大鼠全部诱发房颤，房颤平均持续时间 (5.04 $\pm$ 1.38)s；活血温胆方组 8 只大鼠诱发房颤，房颤平均持续时间 (2.25 $\pm$ 1.25)s。活血温胆方组大鼠房颤平均持续时间较模型组缩短 ($P<0.01$)。

2.3 各组大鼠心脏超声结果比较

表 2 示，与空白组比较，模型组大鼠 LA/AO 增大，EF 及 FS 降低 ($P<0.01$)。与模型组比较，活血温胆方组大鼠 LA/AO 缩小，EF 及 FS 升高 ($P<0.01$)。

表 2 各组大鼠心脏超声指标比较

Table 2 Comparison of cardiac ultrasound parameters among groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	LA/AO	EF/%	FS/%
空白组	10	1.04 $\pm$ 0.11	82.79 $\pm$ 2.82	53.16 $\pm$ 3.02
模型组	10	1.41 $\pm$ 0.13 ^{a)}	65.63 $\pm$ 3.36 ^{a)}	37.20 $\pm$ 2.69 ^{a)}
活血温胆方组	10	1.15 $\pm$ 0.18 ^{b)}	73.58 $\pm$ 4.48 ^{b)}	44.26 $\pm$ 4.45 ^{b)}

注：LA，左心房大小；AO，主动脉内径；EF，射血分数；FS，缩短分数。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

2.4 各组大鼠左心房及肝脏左外叶病理染色结果

表 3 示，与空白组比较，模型组大鼠左心房心肌胶原容积分数、Collagen I /Collagen III 及肝脏左外叶脂滴相对面积均升高 ($P<0.01$)。与模型组比较，活血温胆方组大鼠左心房心肌胶原容积分数、Collagen I /Collagen III 及肝脏左外叶脂滴相对面积均降低 ($P<0.01$)。左心房 (图 1)：HE 染色

表 1 各组大鼠体质量、肛温、舌象 RGB 值比较

Table 1 Comparison of body weight, anal temperature and tongue RGB values among groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	体质量/g	肛温/ $^{\circ}\text{C}$	舌象 R 值	舌象 G 值	舌象 B 值
空白组	10	409.60 $\pm$ 25.67	37.39 $\pm$ 0.24	232.40 $\pm$ 8.41	127.30 $\pm$ 14.36	131.60 $\pm$ 30.36
模型组	10	319.20 $\pm$ 11.52 ^{a)}	38.31 $\pm$ 0.29 ^{a)}	146.50 $\pm$ 13.37 ^{a)}	64.40 $\pm$ 17.94 ^{a)}	64.30 $\pm$ 18.37 ^{a)}
活血温胆方组	10	331.10 $\pm$ 15.78	37.96 $\pm$ 0.20 ^{b)}	212.20 $\pm$ 14.61 ^{c)}	107.6 $\pm$ 27.50 ^{c)}	100.70 $\pm$ 41.46 ^{b)}

注：a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

表3 各组大鼠心脏和肝脏组织病理指标比较
Table 3 Comparison of pathological indicators of cardiac and hepatic tissues in rats of each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	左心房		肝脏左外叶脂肪相对面积
		心肌胶原容积分数	Collagen I / Collagen III	
空白组	6	2.60±0.79	1.48±0.09	1.00±0.12
模型组	6	16.05±1.11 ^{a)}	5.01±1.32 ^{a)}	1.55±0.20 ^{a)}
活血温胆方组	6	7.37±0.97 ^{b)}	2.28±0.23 ^{b)}	1.21±0.03 ^{b)}

注：Collagen I，I型胶原；Collagen III，III型胶原。
a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

结果显示，空白组大鼠心肌纤维排列整齐，细胞形态完整，细胞核均匀分布，间质无水肿及炎症细胞浸润；模型组大鼠心肌纤维排列显著紊乱、扭曲断裂，局部肌束走向紊乱，间质明显水肿增宽，可见大量炎症细胞浸润；活血温胆方组大鼠心肌纤维排列基本规则，纤维局部灶较小，炎症细胞浸润散在，间质轻度水肿，轻度纤维组织增生。Masson染色结果显示，空白组大鼠心肌间质呈淡蓝色胶原纤维极少；模型组大鼠心肌广泛蓝染胶原纤维沉积，形成致密网状结构包绕心肌束，血管周围纤维鞘增厚；活血温胆方组大鼠心肌间质可见少量蓝色胶原沉积。天狼星红染色结果显示，空白组以纤细、弹性更好的网状纤维 Collagen III（绿色）为主；与空白组比较，模型组以粗壮、成熟、稳定的 Collagen I（橙色）为主，纤维化程度更重；与模

型组比较，活血温胆方组 Collagen I 减少，纤维化程度改善。

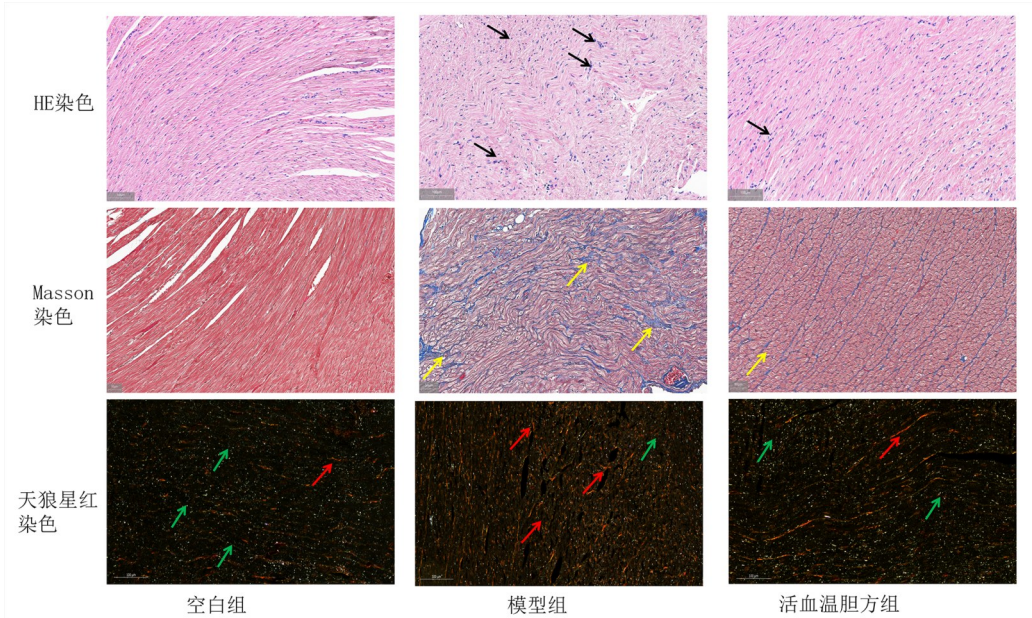
肝脏左外叶（图2）：HE染色显示，空白组大鼠肝小叶结构完整，肝细胞呈放射状有序排列，细胞核居中，无脂肪空泡，中央静脉及汇管区形态正常；模型组肝小叶结构破坏，超过90%肝细胞充满大泡型脂肪空泡，甚至融合成片，细胞核被挤压至边缘，伴显著气球样变及局灶坏死，炎症细胞浸润加重；活血温胆方组肝细胞排列轻度紊乱，约60%肝细胞出现脂肪空泡（以小泡型脂滴为主），汇管区可见少量炎症细胞浸润。油红O染色显示，空白组几乎无红色脂滴着色；模型组肝细胞及胞质内可见密集的大块状红色脂滴；活血温胆方组肝细胞内可见部分中、小脂滴。

2.5 各组大鼠血液生化指标比较

表4示，与空白组比较，模型组TC、LDL-C、FIB水平升高，TT、APTT、PT均降低，全血黏度（低切、中切、高切）、血浆黏度、红细胞沉降率均升高，红细胞压积降低（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，活血温胆方组LDL-C、FIB水平降低，TT、APTT、PT均升高，全血黏度（低切、中切、高切）、血浆黏度均降低，红细胞压积升高（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。

2.6 各组大鼠血清炎症因子水平比较

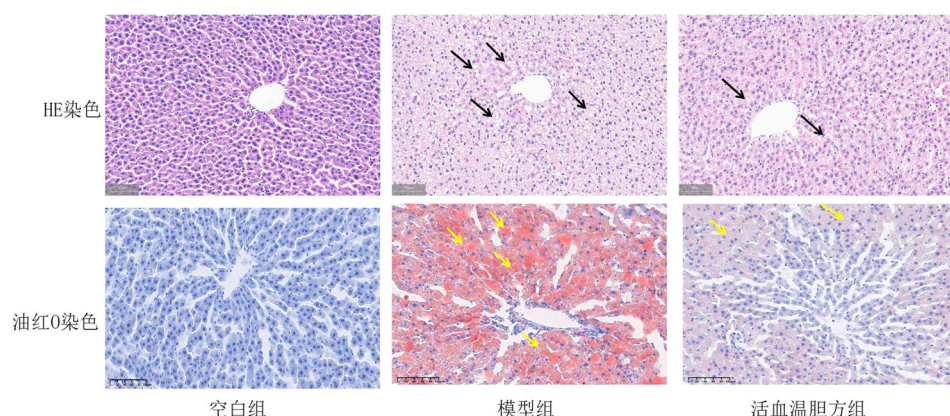
表5示，与空白组比较，模型组炎症因子CRP、IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 水平均升高（ $P<0.01$ ）；



注：黑色箭头示炎症细胞浸润，黄色箭头示纤维沉积，红色箭头示 Collagen I，绿色箭头示 Collagen III。

图1 各组大鼠左心房组织 HE 染色、Masson 染色和天狼星红染色结果（×200）

Figure 1 Results of HE staining, Masson staining and Sirius Red staining of left atrial tissue in rats of each group (×200)



注：图中黑色箭头指示为脂肪空泡；黄色箭头指示为脂肪滴。

图2 各组大鼠肝脏左外叶组织HE染色、油红O染色结果(×200)

Figure 2 Results of HE staining and Oil Red O staining of the left lateral lobe of liver tissue in rats from each group (×200)

表4 各组大鼠血液生化指标比较

Table 4 Comparison of blood biochemical indicators in rats of each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TC/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	LDL-C/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	TT/s	APTT/s	PT/s	FIB/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
空白组	10	1.43±0.26	0.21±0.31	49.65±4.09	31.76±3.25	28.05±4.11	121.76±6.07
模型组	10	3.48±0.88 ^{a)}	1.02±0.53 ^{a)}	32.55±7.56 ^{a)}	20.12±3.50 ^{a)}	16.01±1.92 ^{a)}	167.61±10.48 ^{a)}
活血温胆方组	10	2.98±0.45	0.66±0.14 ^{b)}	39.24±5.19 ^{b)}	26.88±3.04 ^{c)}	21.94±3.51 ^{c)}	139.13±13.46 ^{c)}

组别	鼠数	全血黏度/ $\text{mPa} \cdot \text{s}^{-1}$			血浆黏度/ $\text{mPa} \cdot \text{s}^{-1}$	红细胞压积/%	红细胞沉降率/ $\text{mm} \cdot \text{h}^{-1}$
		低切	中切	高切			
空白组	10	6.97±0.61	4.62±0.52	3.06±0.32	1.04±0.08	42.50±3.85	1.40±0.35
模型组	10	8.64±0.59 ^{a)}	6.17±0.85 ^{a)}	4.34±0.84 ^{a)}	1.29±0.10 ^{a)}	34.37±2.64 ^{a)}	2.83±0.26 ^{a)}
活血温胆方组	10	7.28±0.52 ^{c)}	5.26±0.89 ^{b)}	3.40±0.53 ^{c)}	1.13±0.09 ^{c)}	37.63±2.05 ^{b)}	2.59±0.83

注：TC，总胆固醇；LDL-C，低密度脂蛋白胆固醇；TT，凝血酶时间；APTT，活化部分凝血酶原时间；PT，凝血酶原时间；FIB，纤维蛋白原。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

表5 各组大鼠血清炎症因子水平比较

Table 5 Comparison of serum inflammatory factor levels in rats of each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CRP/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	IL-1 β / $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	IL-6/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	IL-17/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	TNF- α / $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$
空白组	10	910.83±150.49	18.80±1.32	90.52±3.18	16.42±3.18	200.13±26.65
模型组	10	2201.44±121.41 ^{a)}	35.79±2.89 ^{a)}	178.96±9.47 ^{a)}	40.74±1.80 ^{a)}	346.77±26.00 ^{a)}
活血温胆方组	10	1514.42±260.29 ^{b)}	24.98±3.71 ^{b)}	124.95±10.40 ^{b)}	28.45±3.21 ^{b)}	262.93±31.39 ^{b)}

注：CRP，C反应蛋白；IL-1 β ，白细胞介素-1 β ；IL-6，白细胞介素-6；IL-17，白细胞介素-17；TNF- α ，肿瘤坏死因子- α 。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

与模型组比较，活血温胆方组CRP、IL-1 β 、IL-6、IL-17、TNF- α 水平均降低($P<0.01$)。

2.7 各组大鼠血清纤维化相关因子水平比较

表6示，与空白组比较，模型组纤维化相关因子MMP9、Gal-3、 α -SMA、Collagen I均升高($P<0.01$)；与模型组比较，活血温胆方组MMP9、Gal-3、 α -SMA、Collagen I水平均降低($P<0.01$)。

2.8 各组大鼠心肌组织蛋白质组学结果比较

根据差异倍数(FC) >1.2 且 $P<0.05$ ，对空白组、模型组和活血温胆方组样本进行差异蛋白检

测，结果发现与空白组比较，模型组共有510个差异蛋白，其中包括326个上调蛋白，184个下调蛋白；与模型组比较，活血温胆方组共有465个差异蛋白，其中包括240个上调蛋白，225个下调蛋白。对各组样本进行韦恩图分析，发现共有121个交集蛋白，其中活血温胆方组逆转模型组的靶蛋白共73个。

将121个交集蛋白进行GO富集分析，结果如图3所示。细胞组分方面，两组间显著差异的蛋白主要参与RPAP3/R2TP/类似预折叠复合体、CD40

表6 各组大鼠血清纤维化相关因子水平比较

Table 6 Comparison of serum fibrosis-related factor levels in rats of each group (x̄±s)

组别	鼠数	MMP9/ng·ml ⁻¹	Gal-3/ng·ml ⁻¹	α-SMA/pg·ml ⁻¹	Collagen I /ng·ml ⁻¹
空白组	10	52. 24±11. 09	3. 92±0. 57	136. 68±25. 88	19. 83±3. 34
模型组	10	115. 61±6. 56 ^{a)}	7. 99±0. 38 ^{a)}	266. 13±48. 12 ^{a)}	40. 40±6. 78 ^{a)}
活血温胆方组	10	82. 83±8. 77 ^{b)}	5. 45±0. 61 ^{b)}	174. 68±13. 99 ^{b)}	30. 24±2. 92 ^{b)}

注: MMP9, 基质金属蛋白酶9; Gal-3, 半乳糖凝集素-3; α-SMA, α-平滑肌肌动蛋白; Collagen I, I型胶原。
a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

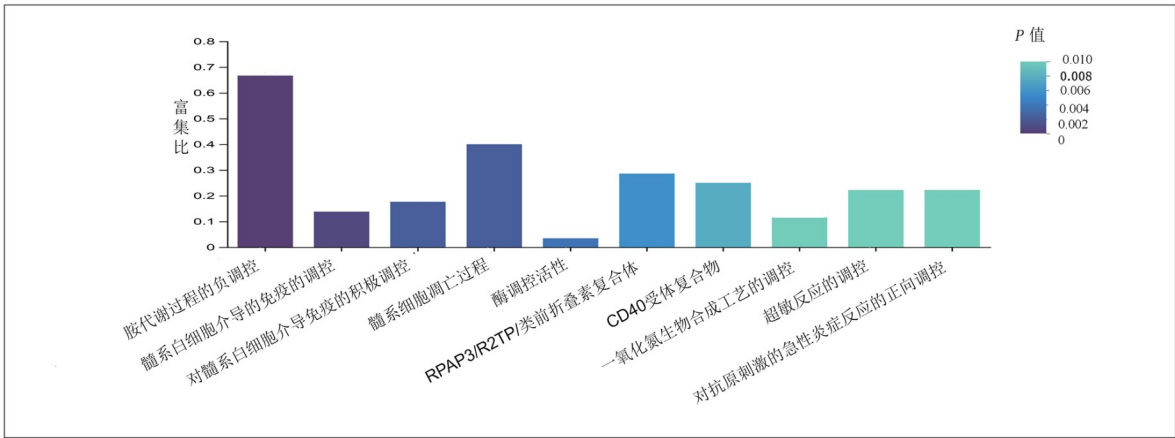


图3 活血温胆方干预心房颤动痰热瘀阻证交集蛋白的基因本体富集通路

Figure 3 Gene ontology enrichment pathways of intersection proteins in atrial fibrillation with phlegm-heat stasis obstruction syndrome treated by *Huoxue Wendan Formula* (活血温胆方)

受体复合物等;分子功能方面,差异蛋白主要富集于酶调控活性;生物过程方面,差异蛋白主要富集于胺代谢过程负调控、髓系白细胞介导的免疫的调控、对髓系白细胞介导免疫的积极调控、髓系细胞凋亡过程等。

将121个交集蛋白进行KEGG富集通路分析,结果如图4所示。差异蛋白共富集到176条信号通

路,排名前5位的通路为Notch信号通路、NF-κB信号通路、自噬、EB病毒感染、造血细胞谱系。

将前10位KEGG富集通路上的蛋白进行筛选,发现仅有rCG_30673、Traf6、Wipi1、Bcl7c、Atg16l1、Itgam和RGD1561347_predicted为活血温胆方逆转模型组的靶蛋白,其中Traf6蛋白参与通路数量最多,且富集于NF-κB信号通路上。既往研究^[15-16]

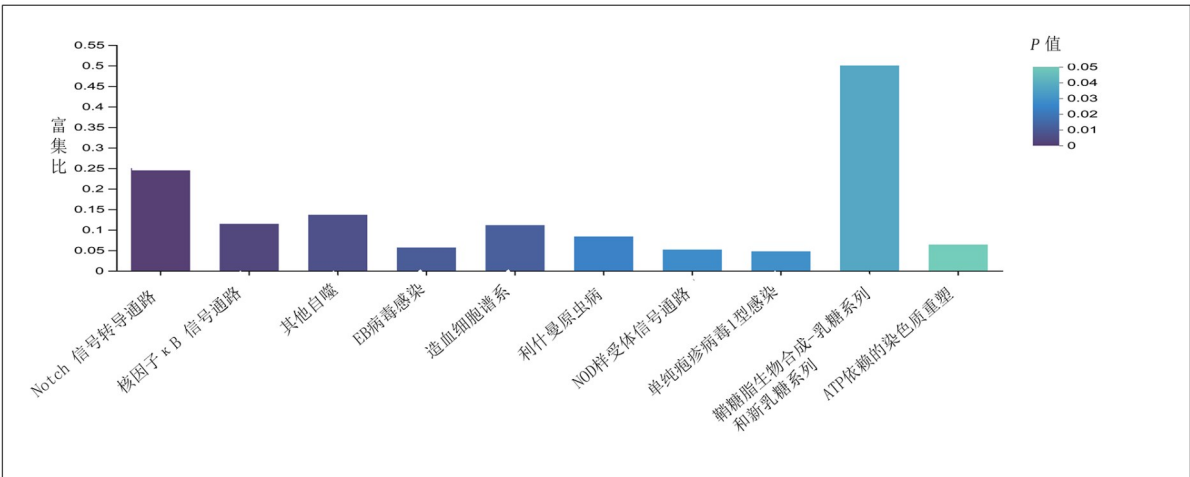


图4 活血温胆方干预心房颤动痰热瘀阻证交集蛋白的京都基因与基因组百科全书富集通路

Figure 4 Kyoto encyclopedia of genes and genomes enrichment pathways of intersection proteins in atrial fibrillation with phlegm-heat stasis obstruction syndrome treated by *Huoxue Wendan Formula* (活血温胆方)

发现, Traf6 为 NF- κ B 通路的上游, 且 NF- κ B 通路可调节房颤心肌纤维化, 因此拟定 Traf6 为靶蛋白, 进一步通过实验验证 TRAF6/NF- κ B 通路是否为活血温胆方干预房颤痰热瘀阻证的关键通路。

3 实验验证

3.1 干预方法及检测指标

抑制剂组大鼠灌胃 12.6 g/(kg·d) 灭菌饮用水, 每日 1 次, 同时腹腔注射 TRAF6 抑制剂 C25-140 5 mg/kg, 隔日 1 次^[17], 连续 2 周。

1) Western Blot 法检测心肌组织 TRAF6/NF- κ B 通路相关蛋白及相关纤维蛋白水平。随机选取空白组、模型组、活血温胆方组和抑制剂组各 3 只大鼠心脏左心房组织剪断, 匀浆低温离心后提取蛋白, BCA 法进行蛋白定量, 置于 100 °C 恒温浴使蛋白变性, 制备电泳胶, 取蛋白 30 μ l, 上样后依次进行电泳、转膜、封闭, 依次加入一抗 TRAF6、IKB α 、p-IKB α 、NF- κ B P65、p-NF- κ B P65、TGF- β 、MMP9、Collagen I、 α -SMA、 β -Tubulin、GAPDH (稀释比例均为 1:1000), 4 °C 孵育过夜。次日 TBST 洗涤膜 3 次, 每次 10 min, 随后室温下与辣根过氧酶标记的山羊抗小鼠 IgG、山羊抗兔 IgG 二抗 (1:5000) 孵育 2 h, 再次 TBST 清洗 3 次, 使用化学发光成像仪进行图像采集, 用 Image J V1.4.3 软件分析目标蛋白条带灰度值, 进行半定量分析。

2) Real-time PCR 检测 TRAF6/NF- κ B 通路 mRNA 表达。采用心脏组织总 RNA 提取试剂盒进行样本总 RNA 的提取, 经浓度测定后, 根据反转录试剂盒说明书反转录合成 cDNA, 随后使用 SuperReal 荧光定量预混试剂配制反应体系, 于 Real-time PCR 仪中进行扩增。以 GAPDH 作为内参基因, 数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对定量分析。引物由北京博迈德基因技术有限公司设计并合成, 引物序列见表 7。

表 7 大鼠心肌组织基因引物序列

Table 7 Gene primer sequences of rat myocardial tissue		
基因	引物序列 5'-3'	产物长度/bp
TRAF6	上游: 5'-CAGCCAGATGGAGGTGAAGA-3'	198
	下游: 5'-TGGGTCAGGAAGTCATCAAG-3'	
IKB α	上游: 5'-GCTGAAGAAGGCCACCAACT-3'	204
	下游: 5'-TCCTTGAGCTCAGCGTCTTC-3'	
NF- κ B P65	上游: 5'-GAGACCTTGAGCTTGCCTT-3'	62
	下游: 5'-TGGGTGCGTCTTAGTGGTAT-3''	
GAPDH	上游: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	116
	下游: 5'-GGCATGGAAGTGTGTCATGAG-3'	

注: TRAF6, 肿瘤坏死因子受体相关因子 6; IKB α , 核因子- κ B 抑制蛋白 α ; NF- κ B P65, 核因子- κ B P65; GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

3.2 各组大鼠心肌组织 TRAF6/NF- κ B 通路蛋白及相关纤维蛋白水平比较

表 8 示, 与空白组比较, 模型组 TRAF6、TGF- β 、MMP9、Collagen I、 α -SMA 水平及 p-IKB α /IKB α 、p-NF- κ B P65/NF- κ B P65 值升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 活血温胆方组和抑制剂组 TRAF6、TGF- β 、MMP9、Collagen I、 α -SMA 水平及 p-IKB α /IKB α 、p-NF- κ B P65/NF- κ B P65 值降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。抑制剂组在降低 TRAF6、Collagen I 水平及 p-IKB α /IKB α 值方面优于活血温胆方组, 但在降低 MMP9 水平方面劣于活血温胆方组 ($P<0.01$)。各蛋白电泳图见图 5。

3.3 各组大鼠心肌组织 TRAF6/NF- κ B 通路相关蛋白 mRNA 表达比较

表 9 示, 与空白组比较, 模型组大鼠心肌组织 TRAF6、IKB α 、NF- κ B P65 mRNA 表达上调 ($P<0.01$); 与模型组比较, 活血温胆方组、抑制剂组 TRAF6、IKB α 、NF- κ B P65 mRNA 表达下调 ($P<$

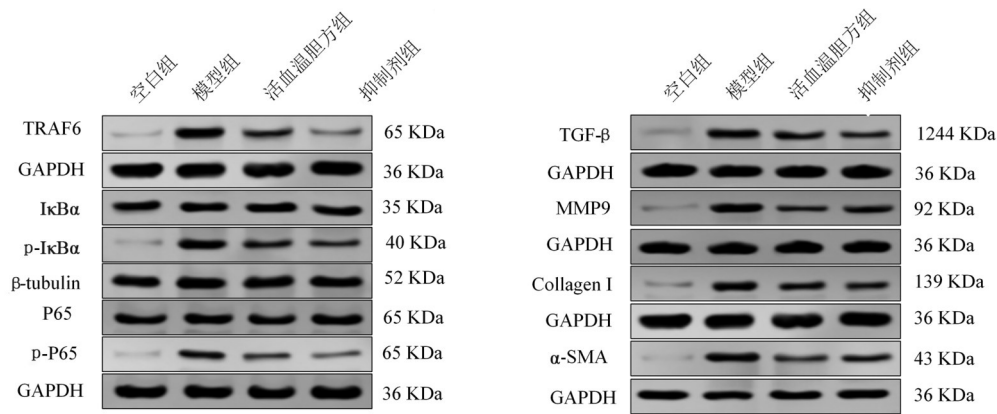
表 8 各组大鼠心肌组织 TRAF6/NF- κ B 通路蛋白及相关纤维蛋白水平比较

Table 8 Comparison of TRAF6/NF- κ B pathway proteins and related fibrinogen levels in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	TRAF6	TGF- β	MMP9	Collagen I	α -SMA	p-IKB α /IKB α	p-NF- κ B P65/ NF- κ B P65
空白组	3	1.00 $\pm$ 0.18	1.00 $\pm$ 0.44	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.38	1.00 $\pm$ 0.47	1.02 $\pm$ 0.65
模型组	3	9.08 $\pm$ 0.31 ^{a)}	6.06 $\pm$ 0.10 ^{a)}	9.18 $\pm$ 0.44 ^{a)}	5.95 $\pm$ 0.36 ^{a)}	10.28 $\pm$ 0.79 ^{a)}	6.56 $\pm$ 0.28 ^{a)}	4.23 $\pm$ 0.02 ^{a)}
活血温胆方组	3	6.37 $\pm$ 0.27 ^{b)}	4.15 $\pm$ 0.45 ^{b)}	5.49 $\pm$ 0.36 ^{b)}	4.87 $\pm$ 0.02 ^{b)}	6.86 $\pm$ 0.35 ^{b)}	5.10 $\pm$ 0.12 ^{b)}	2.89 $\pm$ 0.22 ^{c)}
抑制剂组	3	4.12 $\pm$ 0.45 ^{b) d)}	3.48 $\pm$ 0.54 ^{b)}	6.91 $\pm$ 0.36 ^{b) d)}	4.24 $\pm$ 0.07 ^{b) d)}	6.97 $\pm$ 0.79 ^{b)}	4.23 $\pm$ 0.09 ^{b) d)}	2.79 $\pm$ 0.72 ^{b)}

注: TRAF6, 肿瘤坏死因子受体相关因子 6; TGF- β , 转化生长因子- β ; MMP9, 基质金属蛋白酶 9; Collagen I, I 型胶原; α -SMA, α -平滑肌肌动蛋白; p-IKB α , 磷酸化核因子- κ B 抑制蛋白 α ; IKB α , 核因子- κ B 抑制蛋白 α ; p-NF- κ B P65, 磷酸化核因子- κ B P65; NF- κ B P65, 核因子- κ B P65。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.05$; d) 与活血温胆方组比较, $P<0.01$ 。



注：TRAF6，肿瘤坏死因子受体相关因子6；TGF-β，转化生长因子β；MMP9，基质金属蛋白酶9；Collagen I，I型胶原；α-SMA，α-平滑肌肌动蛋白；p-IκBα，磷酸化核因子-κB抑制蛋白α；IκBα，核因子-κB抑制蛋白α；p-NF-κB P65，磷酸化核因子-κB P65；NF-κB P65，核因子-κB P65。

图5 各组大鼠心肌组织TRAF6/NF-κB通路蛋白及相关纤维蛋白电泳图
Figure 5 Electrophoretograms of TRAF6/NF-κB pathway proteins and related fibrinogen in myocardial tissue of rats in each group

0.05或 $P<0.01$)；活血温胆方组与抑制剂组 *TRAF6*、*IκBα*、*NF-κB P65* mRNA 表达比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表9 各组大鼠心肌组织 *TRAF6/NF-κB* 通路相关蛋白 mRNA 表达比较
Table 9 Comparison of mRNA expression of *TRAF6/NF-κB* pathway-related proteins in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	<i>TRAF6</i>	<i>IκBα</i>	<i>NF-κB P65</i>
空白组	3	1.00±0.10	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	3	4.07±0.63 ^{a)}	4.22±0.60 ^{a)}	4.95±0.56 ^{a)}
活血温胆方组	3	2.85±0.39 ^{b)}	3.22±0.40 ^{c)}	3.73±0.34 ^{b)}
抑制剂组	3	2.15±0.13 ^{b)}	2.89±0.22 ^{b)}	3.00±0.42 ^{b)}

注：*TRAF6*，肿瘤坏死因子受体相关因子6；*IκBα*，核因子-κB抑制蛋白α；*NF-κB P65*，核因子-κB P65。
a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

4 讨论

我们认为房颤的核心病机在于痰、热、瘀三者互结，痰热壅滞心脉，阻碍气血运行，瘀血由生，终致痰热瘀相互搏结、阻滞心络，扰及心神而发为心悸。基于此病机，本课题组以黄连温胆汤为基础，加用活血安神之品，化裁组成活血温胆方。方中君药黄连苦寒，擅清心与中焦之郁热；臣药以半夏、陈皮燥湿化痰，茯苓健脾渗湿以绝生痰之源，竹茹清热化痰，枳实行气化痰，共奏健脾化痰、理气清热之效；佐以丹参、赤芍活血凉血，化瘀通络；使以甘松理气醒脾，龙齿镇心安神。全方配伍体现清热化痰、活血化瘀、安神定悸的治则。本研

究结果显示，活血温胆方干预后，模型大鼠不仅血脂水平（痰）、肛温及炎症指标（热）显著下降，而且血液高凝状态（瘀）、心肌纤维化程度（瘀）也得到缓解，同时舌色暗红，RGB值下降也从宏观角度反映了血瘀证的改善。这些客观指标的同步改善，提示该复方可能通过改善代谢紊乱-炎症-纤维化轴发挥整合调节作用，从而降低房颤诱发率、缩短房颤持续时间及改善心功能。

房颤的发生与持续是一个多因素参与的病理过程，其中代谢紊乱、炎症反应与纤维化之间形成的恶性循环轴被认为是关键机制之一^[2-3]。研究表明，高脂饮食诱导的肥胖状态可导致多种促炎因子（如IL-1β、IL-6和TNF-α）及促纤维化因子的分泌增加，进而促进心房纤维化，显著提高房颤易感性^[4]。本研究结果显示，模型组大鼠呈现出明显的脂质代谢紊乱，表现为血清TC与LDL-C水平显著升高，肝脏病理切片亦显示大范围脂滴沉积。而经活血温胆方干预后，大鼠血脂水平及肝脏脂质沉积均得到有效改善，提示该复方对动物模型的代谢紊乱环节具有调节作用。炎症是连接代谢异常与纤维化进程的核心环节，系统性及心房局部炎症可驱动心肌纤维化，为房颤的发生与进展提供病理基质^[18]。本研究检测的炎症指标中，CRP是系统性炎症的经典标志物，IL-1β、IL-6、IL-17、TNF-α则是启动并放大炎症级联反应的关键细胞因子。这些因子水平的升高，直接反映了房颤病理过程中活跃的炎症状态，并与不良临床预后相关^[19-20]。本研究发现，活血温胆方能显著降低上述炎症因子水

平,表明其具备明确的抗炎效应。纤维化是此代谢紊乱-炎症-纤维化轴的终末环节,直接导致心肌结构性重构。本研究中,模型组大鼠促纤维化因子水平显著上调,其中 Gal-3 是连接炎症与纤维化的关键分子,既可由巨噬细胞分泌并促进其他炎症因子释放,也可激活 TGF- β 信号通路,驱动成纤维细胞增殖、分化及胶原沉积^[21-22]; α -SMA 阳性表达增加,提示活化的肌成纤维细胞增多;同时, Collagen I 与 MMP9 的表达异常升高,共同导致细胞外基质比例失衡与病理性重塑。心肌组织病理分析进一步显示胶原沉积增加及 Collagen I / Collagen III 型胶原比例失衡,这些都是心肌结构重塑的直观证据。活血温胆方的干预有效下调了上述促纤维化因子表达,并改善了胶原沉积与比例失调。综上所述,活血温胆方能够同时改善房颤模型中的脂质代谢紊乱、抑制炎症反应并减轻心肌纤维化。这表明该方治疗房颤的效应可能部分源于其对代谢-炎症-纤维化这一关键病理轴的协同干预,体现了从多靶点、多环节整合调控复杂疾病的中医整体观治疗思路。

为深入探究活血温胆方的作用机制,本研究采用定量蛋白质组学技术进行筛选,结果显示 TRAF6 鉴定为潜在的关键靶蛋白。随后的实验验证表明,活血温胆方能显著抑制 TRAF6 在蛋白及基因水平方面的表达,并下调 NF- κ B 信号通路关键节点 p-I κ B α 与 p-NF- κ B P65 的水平,其作用方向与 TRAF6 特异性抑制剂的效果一致。TRAF6 是一种具有泛素连接酶活性的关键信号转导蛋白,其通过连接上游炎症信号与下游 NF- κ B 通路的激活,在炎症级联反应中发挥核心适配分子的作用,其过度激活会驱动 NF- κ B 信号持续活化,进而促进包括 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 在内的多种炎症因子表达,并可协同 TGF- β 等促进纤维化进程^[23-24]。综上所述,本研究的组学分析与实验验证共同提示,抑制 TRAF6/NF- κ B 信号通路可能是活血温胆方发挥抗炎及抗纤维化作用的核心机制之一。

本研究构建了房颤痰热瘀阻病证结合动物模型,在模拟心律失常的同时再现了中医学痰、热、瘀的核心证候特征,进一步结合多维药效评价与蛋白质组学分析,系统阐明活血温胆方通过调控 TRAF6/NF- κ B 通路在抗炎、调脂、抗纤维化及抗心律失常方面的整合机制,并经抑制剂反向验证强化了该通路的中心地位。然而,本研究仍存在一定

局限: TRAF6 在信号网络中的上下游调控及通路交叉作用尚未完全明晰,复方中药的药效物质基础亦有待进一步解析。未来还需开展临床样本验证、药效成分分析、多组学整合分析等,以进一步推动该方的转化应用与机制深化。

参考文献

- [1] LINZ D, GAWALKO M, BETZ K, et al. Atrial fibrillation: epidemiology, screening and digital health[J]. Lancet Reg Health Eur, 2024, 37: 100786. doi: 10. 1016/j. lanepe. 2023. 100786.
- [2] MIMBRERO GUILLAMON M, LONCARIC F, LONCARIC F, et al. Inflammation and fibrosis biomarkers are related to atrial dysfunction in patients at risk of atrial fibrillation [J]. Eur Heart J, 2020, 41(Supplement 2): ehaa946. 0130.
- [3] SHAIHOV-TEPER O, RAM E, BRZEZINSKI R, et al. Small extracellular vesicles from epicardial fat of patients with atrial fibrillation induce inflammation, fibrosis and re-entrant arrhythmias [J]. Eur Heart J, 2020, 41 (Supplement 2): ehaa946. 3612. <https://doi.org/10.1093/ehjci/ehaa946.3612>.
- [4] HOU A, SHI D, HUANG H, et al. Inflammation pathways as therapeutic targets in angiotensin II induced atrial fibrillation [J]. Front Pharmacol, 2025, 16: 1515864. doi: 10. 3389/fphar. 2025. 1515864.
- [5] ALDIAN FM, VISUDDHO V, WITARTO BS, et al. Effectiveness and safety of different types of ablation modalities in patients with atrial fibrillation: a bayesian network meta-analysis from randomized controlled trials [J]. J Cardiothorac Surg, 2025, 20(1): 225.
- [6] 侯艾琳, 刘宇轩, 黄弘博, 等. 924 例心房颤动患者临床特征分布及中医证型与实验室指标相关性分析 [J]. 中国中医药信息杂志, 2025, 32(8): 153-158.
- [7] 侯艾琳, 刘宇轩, 余文熙, 等. 基于代谢组学探究痰热瘀阻型心房颤动大鼠模型的生物学特征 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2026, 32(5): 245-255.
- [8] 魏伟. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 38-44.
- [9] 平兴枫, 尹建新, 黄宗轩, 等. 痰热腑实证大鼠模型建立的条件探索 [J]. 内科, 2024, 19(2): 163-169.
- [10] 郝剑, 邸研博, 魏蔚. 血瘀证动物模型客观化评价方法概述 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(6): 3323-3329.
- [11] 李小兵. 中医痰证微观指标现代研究概况 [J]. 中医基础医学杂志, 2002, 8(7): 79-80.
- [12] 杨威, 张学进, 郭勇. 热毒血瘀证与炎症相关性研究

- 进展[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(10): 2168-2171.
- [13]彭岳, 韦燕飞, 赵铁建, 等. 复合多因素法对血瘀型肝纤维化大鼠模型的建立和评价[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18(1): 141-149.
- [14]HAN C, SHI C, LIU L, et al. Majorbio cloud 2024: update single-cell and multiomics workflows [J]. Imeta, 2024, 3(4): e217.
- [15]WANG Q, SHEN H, WANG J, et al. Myeloid-specific S100A8/A9 deficiency attenuates atrial fibrillation through prevention of TLR4/NF- κ B-mediated immune cell recruitment and inflammation [J]. Front Immunol, 2025, 16: 1623486. doi: 10.3389/fimmu.2025.1623486.
- [16]YU L, YANG Y, WANG J, et al. PDCD4 promotes inflammation/fibrosis by activating the PPAR- γ /NF- κ B pathway in mouse atrial myocytes [J]. Mol Med Rep, 2024, 30(5): 209.
- [17]LI X, LIU Y, SHAO M, et al. Exploring the mechanism of Nav1.3 in the ION-CCI rat model based on the TLR4/TRAF6/NF- κ B pathway [J]. Neurosci Lett, 2024, 832: 137806. doi: 10.1016/j.neulet.2024.137806.
- [18]ALLESSIE M, AUSMA J, SCHOTTEN U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation [J]. Cardiovasc Res, 2002, 54(2): 230-246.
- [19]XU L, WANG N, LIANG Y, et al. Interleukin-17A contributes to atrial fibrillation recurrence and left atrial reservoir function after catheter ablation [J]. Pol Arch Intern Med, 2019, 129(6): 432-435.
- [20]ASCHAR-SOBBI R, IZADDOUSTDAR F, KOROGYI AS, et al. Increased atrial arrhythmia susceptibility induced by intense endurance exercise in mice requires TNF α [J]. Nat Commun, 2015, 6: 6018. doi: 10.1038/ncomms7018.
- [21]CLEMENTY N, PIVER E, BISSON A, et al. Galectin-3 in atrial fibrillation: Mechanisms and therapeutic implications [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(4): 976.
- [22]XIAO M, ZHANG M, BIE M, et al. Galectin-3 induces atrial fibrosis by activating the TGF- β 1/smad pathway in patients with atrial fibrillation [J]. Cardiology, 2020, 145(7): 446-455.
- [23]WANG W, WANG Y, WANG F, et al. Gastrodin regulates the TLR4/TRAF6/NF- κ B pathway to reduce neuroinflammation and microglial activation in an AD model [J]. Phytomedicine, 2024, 128: 155518. doi: 10.1016/j.phymed.2024.155518.
- [24]SUN J, LIAO Z, LI Z, et al. Down-regulation miR-146a-5p in schwann cell-derived exosomes induced macrophage M1 polarization by impairing the inhibition on TRAF6/NF- κ B pathway after peripheral nerve injury [J]. Exp Neurol, 2023, 362: 114295. doi: 10.1016/j.expneurol.2022.114295.

Effects of *Huoxue Wendan Formula* (活血温胆方) on Myocardial Tissue Proteomics in Atrial Fibrillation Model Rats with Phlegm-Heat Stasis Obstruction Syndrome and Experimental Verification

HOU Ailin^{1,2}, YU Wenxi^{1,2}, CHEN Chen¹, LIU Yuxuan¹, JI Xing², WU Chan², SHI Dazhuo¹, ZHANG Ying¹

1. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100091; 2. Graduate School of Beijing University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanism of *Huoxue Wendan Formula* (活血温胆方) in treating atrial fibrillation with the phlegm-heat and stasis obstruction syndrome based on proteomics technology. **Methods**

Forty Sprague-Dawley (SD) rats were randomly and equally divided into a blank group, a model group, a *Huoxue Wendan Formula* group, and an inhibitor group, and the inhibitor group was used for subsequent experimental verification. Except for the blank group, rats were administered a mixed solution of acetylcholine and calcium chloride via tail vein injection, combined with a high-fat diet and intraperitoneal injection of lipopolysaccharide to establish a rat model of atrial fibrillation with the phlegm-heat and stasis obstruction syndrome. **Experiment 1** After successful modeling, the *Huoxue Wendan Formula* group was given 12.6 g/(kg·d) of *Huoxue Wendan Formula* by gavage, while the control group and model group were given 12.6 g/(kg·d) of sterilized drinking water, once daily for 2 weeks. Body weight, anal temperature, and tongue RGB values were compared among the blank group, model group, and *Huoxue Wendan Formula* group. Electrocardiography was used to observe the induction and duration of atrial fibrillation, and cardiac ultrasound was performed to measure left atrial diameter (LA), aortic diameter (AO), ejection fraction (EF), and fractional shortening (FS). Left atrial tissue was subjected to hematoxylin-eosin (HE) staining, Masson staining (myocardial collagen volume fraction), and Sirius red staining (Collagen I/Collagen III). The left

lateral lobe of the liver was examined using HE staining and oil red O staining (hepatic lipid droplet area). Blood biochemical parameters including total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), whole blood viscosity (low, middle, and high shear rates), plasma viscosity, erythrocyte sedimentation rate (ESR), and coagulation parameters such as thrombin time (TT), activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT), and fibrinogen (FIB) were determined. ELISA was used to measure inflammatory factors including C-reactive protein (CRP), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-17 (IL-17), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and fibrotic factors including matrix metalloproteinase 9 (MMP9), Collagen I, galectin-3 (Gal-3), and α -smooth muscle actin (α -SMA). Cardiac tissue was analyzed using data-independent acquisition-based proteomics.

Experiment 2 Based on the proteomics results, rats in the inhibitor group were given 12.6 g/(kg·d) of sterilized drinking water once daily, along with intraperitoneal injection of the tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) inhibitor C25-140 at a dose of 5 mg/kg once every other day for 2 weeks. The protein and mRNA expression levels of TRAF6/nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway-related factors and associated fibrotic markers in myocardial tissue were measured. **Results** Compared with the control group, the model group showed elevated anal temperature, decreased tongue RGB values, prolonged average duration of atrial fibrillation, reduced cardiac function parameters (EF, FS), increased LA/AO ratio, elevated myocardial collagen volume fraction in the left atrium, increased Collagen I / Collagen III ratio, enlarged relative area of lipid droplets in the left lateral lobe of the liver, elevated levels of LDL-C and FIB, decreased TT, APTT, and PT, increased whole blood viscosity (at low, middle, and high shear rates), plasma viscosity, and ESR, reduced hematocrit, and elevated levels of inflammatory factors (CRP, IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α) and fibrotic factors (MMP9, Gal-3, α -SMA, Collagen I), with statistically significant differences ($P < 0.01$). Compared with the model group, the *Huoxue Wendan Formula* group exhibited significant improvements in all the aforementioned indicators ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Proteomic analysis identified 73 key reversely expressed proteins, among which TRAF6 was identified as a core protein, and these proteins were enriched in the NF- κ B signaling pathway. Both the *Huoxue Wendan Formula* group and the inhibitor group suppressed the protein and mRNA expression levels of TRAF6/NF- κ B pathway-related factors and associated fibrotic markers ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The *Huoxue Wendan Formula* may attenuate myocardial inflammation and fibrosis by inhibiting the TRAF6/NF- κ B signaling pathway in myocardial tissue, thereby exerting multi-target therapeutic effects on atrial fibrillation with phlegm-heat stasis obstruction syndrome.

Keywords atrial fibrillation; *Huoxue Wendan Formula* (活血温胆方); phlegm-heat and stasis obstruction syndrome; proteomics; tumor necrosis factor receptor-associated factor 6; nuclear factor- κ B; myocardial fibrosis

(收稿日期: 2025-09-15; 修回日期: 2026-03-06)

[编辑: 邓媛]