

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.03.013

天香丹对冠状动脉微循环障碍模型大鼠心肌组织 Nrf2/ARE 信号通路的影响

马学宽, 古丽葛娜·萨吾尔, 张亚洁, 辛锦钰, 张华, 王思静, 安冬青✉



新疆医科大学中医学院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市新市区新医路 393 号, 830011

摘要 目的 探讨天香丹对冠状动脉微循环障碍的影响及可能作用机制。方法 63 只 SD 大鼠随机分为空白对照组、假手术组、模型组、尼可地尔组和天香丹低、中、高剂量组, 每组 9 只。除空白对照组外, 其余各组大鼠开胸后左心室内注射月桂酸钠建立冠状动脉微循环障碍大鼠模型, 假手术组注射生理盐水。造模后天香丹低、中、高剂量组大鼠分别给予天香丹颗粒 0.1188、0.2376、0.4752 g/(kg·d) 灌胃; 尼可地尔组给予尼可地尔原药粉 0.297 mg/(kg·d) 灌胃; 空白对照组、假手术组、模型组给予生理盐水 2 ml 灌胃, 均每日 1 次, 共 28 天。检测各组大鼠心功能, 采用 HE、马休黄-酸性品红-苯胺蓝染色进行冠状动脉微血管病理学观察, 观察心肌组织超微结构, 并检测心肌组织中 Nrf2/ARE 信号通路蛋白 [包括核转录因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、Kelch 样环氧丙烷相关蛋白 1 (Keap1)、醌氧化还原酶 1 (NQO1)、氧化氢酶 (CAT)、血红素加氧酶 1 (HO-1)] 表达。结果 病理结果显示, 模型组大鼠冠状动脉微血管内可见血栓混合物, 心肌细胞纤维化, 微血栓程度较重, 而各给药组微血栓程度降低, 仅有少量微血栓。与空白对照组比较, 假手术组及模型组大鼠心功能降低 ($P < 0.05$), 心肌组织 Nrf2、Keap1、NQO1、CAT、HO-1 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型组比较, 尼可地尔组和天香丹中、高剂量组大鼠心功能好转, 天香丹中、高剂量组心肌组织 Nrf2、NQO1、CAT、HO-1 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 且天香丹中剂量组心肌组织 Nrf2、NQO1、CAT 及天香丹高剂量组 HO-1 表达高于尼可地尔组 ($P < 0.05$)。结论 天香丹能够减轻微血栓及线粒体损伤程度, 从而改善冠状动脉微循环障碍, 其机制可能与调控 Nrf2/ARE 信号通路从而减轻氧化应激有关。

关键词 冠状动脉微循环障碍; 天香丹; 氧化应激; Nrf2/ARE 信号通路

冠状动脉微循环障碍 (coronary microcirculation dysfunction, CMD) 是指冠状前小动脉和小动脉的结构和 (或) 功能异常所致心肌组织灌注不良的临床综合征^[1]。微血管性心绞痛、缺血再灌注损伤、冠状动脉无复流及慢血流等心血管疾病都与 CMD 密切相关^[2]。改善冠状动脉微循环已成为冠心病治疗的主要目标之一。微血管内皮细胞受损后释放出儿茶酚胺, 被单胺氧化酶分解后产生大量氧自由基, 当超过机体的清除能力时, 可引发链式脂质过氧化反应, 导致血小板活化、黏附因子上调, 纤维蛋白聚集, 形成微血栓^[3-4]。因此, 减轻氧化应激损伤能够改善 CMD。天香丹以已故名医张绶邦教授提出的治疗胸痹心痛的通补开泄法理论

为基础, 是新疆医科大学附属中医医院治疗冠心病的院内制剂, 具有补气活血、芳香开泄的功效。前期研究表明, 天香丹能够改善冠心病患者的胸闷、胸痛、心悸等症状^[5]; 其机制可能为通过调控核因子 κB (NF- κB) 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK) 信号通路, 抑制炎症因子白细胞介素 1 β (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 表达, 控制炎症反应^[6]; 并调节血浆内皮素 (ET)、一氧化氮 (NO), 保护血管内皮, 减轻自由基损伤, 保护微循环, 改善心肌缺血症状^[7-8]。本研究采用左心室内注射月桂酸钠建立大鼠 CMD 模型, 探究天香丹对 CMD 大鼠心功能、心肌病理学及超微结构的影响, 并基于核转录因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)/抗氧化反应元件 (ARE) 信号通路探讨其可能的作用机制, 为天香丹临床应用提供理论依

基金项目: 国家自然科学基金 (81760843)

✉ 通讯作者: andongqing3@gmail.com, 13609920771

据和实验基础。本动物实验通过新疆医科大学动物伦理委员会批准 (编号: IACUC-20170222027)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 70 只, 8 周龄, 体质量 (180 ± 20) g, 由新疆医科大学动物实验中心提供, 实验动物许可证号: SYXK (新) 2016-007, 饲养于新疆医科大学动物实验中心 SPF 级环境中。

1.2 药物

天香丹由红景天、丹参、新塔花、降香四味药组成, 比例为 8 : 8 : 6 : 3, 天香丹颗粒剂由新疆华世丹药业有限公司制备 (每袋 9 g, 含生药量 3.125 g, 批号: 18091201); 尼可地尔原药粉 (上海梯希爱公司, 批号: N0837)。

1.3 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠 (批号: P3761)、月桂酸钠 (批号: BCBBV3875), Sigma 公司; 苏木素 (批号: ZLI-9610)、伊红 (批号: ZLI-9613), 北京中杉金桥生物技术有限公司; 2.5% 戊二醛固定液 (批号: P1128)、马休黄-酸性品红-苯胺蓝试剂盒 (批号: G2040), 北京索莱宝科技有限公司; Nrf2 抗体 (伊莱瑞特公司, 批号: E-AB-33607); Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Keap1) 抗体 (批号: bs-4648R)、醌氧化还原酶 1 (NQO1) 抗体 (批号: bs-23407R), 博奥森生物技术有限公司; 氧化氢酶 (CAT) 抗体 (批号: bs-6874R)、血红素加氧酶 1 (HO-1) 抗体 (批号: EPR18161-128)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (批号: EPR16891), Abcam 公司; 青霉素 (山东鲁抗医药公司, 批号: B131125); 醋酸铀 (Chemapol 公司, 批号: 4961); 枸橼酸铅 (SPI 公司, 批号: GA10701-4); RIPA 裂解液 (批号: TJ272371)、蛋白酶抑制剂 (批号: SI255567)、BCA 试剂盒 (批号: RL242684), Thermo 公司; ECL 显色液 (Affinity Bioscience 公司, 批号: 1824a01)。

胰岛素针 (BD 公司, 批号: 6095683)。电泳仪 (型号: DYY-7C)、凝胶成像仪 (型号: Gel-DocXR⁺), Bio-Rad 公司; 动物呼吸机 (成都泰盟公司, 型号: HX-300S); 超声诊断仪 (Philips 公司, 型号: HD11XE); 透射电子显微镜 (日本电子株式会社, 型号: JEM-400CXII)。

1.4 动物造模、分组及给药

大鼠适应性喂养 1 周后, 使用随机数字表法取

45 只腹腔注射戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉, 使用动物呼吸机辅助通气。从胸骨左侧第 3、4 肋间纵向打开胸腔, 暴露心脏及主动脉根部, 使用一次性 1 ml 胰岛素针刺入左心室 (以有回血为准), 迅速注入月桂酸钠 1 ml/kg (浓度 2 mg/ml)^[8], 同时夹闭升主动脉与主动脉弓连接处 10 s, 关闭胸腔待自主呼吸稳定后拔除气管插管, 加热垫保持体温, 回笼复苏。手术全程无菌操作, 术后连续 3 天给予青霉素 80 万 U 腹腔注射预防感染。造模后的大鼠采用随机数字表法分为模型组, 尼可地尔组, 天香丹低、中、高剂量组, 每组补足 9 只。另取 9 只大鼠设为假手术组 (以生理盐水代替月桂酸钠注射, 其余处理同模型组), 并取 9 只未做处理的大鼠作为空白对照组。

按照体表面积法^[9], 天香丹低、中、高剂量组大鼠分别给予天香丹颗粒 0.1188、0.2376、0.4752 g/(kg·d) 灌胃, 其中中剂量为临床等效剂量; 尼可地尔组给予尼可地尔原药粉 0.297 mg/(kg·d) 灌胃; 空白对照组、假手术组、模型组每日灌胃生理盐水 2 ml。每日给药 1 次, 每周按体重调整给药量, 共给药 28 天。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 超声心动图检测心功能 大鼠麻醉后胸前区备皮, 涂以耦合剂, 将探头对准大鼠左胸第 3、4 肋间扫描, 出现标准二维左室长轴切面后, 以超声诊断仪连续测量 3 个不同心动周期左室收缩末期内径 (LVESD)、左室舒张末期内径 (LVEDD), 取其均值。并计算左室射血分数 (LVEF), $LVEF = (LVEDD^3 - LVESD^3) / LVEDD^3 \times 100\%$ 。

1.5.2 冠状动脉微血管病理形态 大鼠开胸取出心脏, 沿心脏中线切为一半, 中性甲醛溶液固定 48 h。经脱水、透明、包埋, 将组织切成 4 μm 厚的切片, HE 及马休黄-酸性品红-苯胺蓝染色后, 采用透射电镜观察冠状动脉微血管病理形态变化。

1.5.3 心肌超微结构 大鼠开胸后快速取约 1 mm³ 的心肌组织, 置于 2.5% 戊二醛固定液中固定 24 h, 漂洗、脱水、包埋组织, 切片后醋酸铀和枸橼酸铅双重染色, 采用透射电镜观察心肌超微结构变化。

1.5.4 心肌组织 Nrf2/ARE 信号通路蛋白表达 大鼠心肌组织于液氮中冻脆后, 在研钵中研磨为粉末。加入 RIPA 裂解液及蛋白酶抑制剂, 冰上裂解 30 min。4℃、12000 r/min 离心 10 min, 离心半径为 8.4 cm。离心后取上清液, 用 BCA 试剂盒进行

蛋白定量。蛋白浓度为 $2\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，样品的上样量为每孔 $15\ \mu\text{l}$ 。上样后进行电泳、转膜，使用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h。1 × TBST 洗膜后，加入一抗 Nrf2 (1 : 1000)、Keap1 (1 : 500)、NQO1 (1 : 1000)、CAT (1 : 1000)、HO-1 (1 : 2000)、GAPDH (1 : 10000)，在 $4\ ^\circ\text{C}$ 条件下孵育过夜。洗膜，加入二抗 (1 : 2000) 室温避光孵育 2 h。洗膜后，加入 ECL 显色液，条带放入凝胶成像系统中进行显色曝光，分析目的条带的灰度值，并计算目的蛋白的相对表达量。

1.6 统计学方法

使用 SPSS 22.0 统计软件进行分析，计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 进行描述，多组间样本均数比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 法，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心功能指标比较

表 1 示，与空白对照组比较，假手术组、模型组、天香丹低剂量组大鼠 LVEDD 升高，模型组和天香丹低剂量组大鼠 LVESD 升高、LVEF 降低 ($P < 0.05$)。与假手术组比较，模型组大鼠 LVESD

升高、LVEF 降低，尼可地尔组和天香丹中、高剂量组 LVEDD 降低，天香丹低剂量组 LVESD 升高、LVEF 降低，天香丹中剂量组 LVESD 降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较，尼可地尔组、天香丹中、高剂量组 LVEDD、LVESD 均降低，LVEF 升高 ($P < 0.05$)。与尼可地尔组比较，天香丹低剂量组 LVEDD、LVESD 升高，LVEF 降低；天香丹高剂量组 LVEDD 升高 ($P < 0.05$)。与天香丹低剂量组比较，天香丹中、高剂量组 LVEDD、LVESD 均降低，LVEF 升高 ($P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠心肌组织 Nrf2、Keap1、NQO1、CAT、HO-1 蛋白相对表达量比较

表 2 示，与空白对照组比较，假手术组和模型组大鼠各蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，尼可地尔组 Nrf2、NQO1 表达升高，天香丹低剂量组 Nrf2 升高、Keap1 降低，天香丹中、高剂量组 Nrf2、NQO1、CAT、HO-1 表达升高，Keap1 表达降低 ($P < 0.05$)。与假手术组比较，模型组和尼可地尔组大鼠 Keap1 蛋白表达降低，天香丹低剂量组 Nrf2 升高、Keap1 降低，天香丹中、高剂量组 Nrf2、NQO1、CAT、HO-1 表达升高，Keap1 表达

表 1 各组大鼠 LVEDD、LVESD、LVEF 水平比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	LVEDD/mm	LVESD/mm	LVEF/%
空白对照组	9	7.236 ± 0.451	4.091 ± 0.454	82.886 ± 4.842
假手术组	9	$7.819 \pm 0.355^{\text{a)}$	4.312 ± 0.599	82.789 ± 5.399
模型组	9	$7.717 \pm 0.338^{\text{a)}$	$4.716 \pm 0.415^{\text{a) b)}$	$77.049 \pm 2.823^{\text{a) b)}$
尼可地尔组	9	$7.178 \pm 0.337^{\text{b) c)}$	$4.153 \pm 0.286^{\text{c)}$	$82.126 \pm 2.089^{\text{c)}$
天香丹低剂量组	9	$7.932 \pm 0.381^{\text{a) d)}$	$4.881 \pm 0.486^{\text{a) b) d)}$	$76.738 \pm 4.674^{\text{a) b) d)}$
天香丹中剂量组	9	$7.092 \pm 0.192^{\text{b) c) e)}$	$3.936 \pm 0.361^{\text{b) c) e)}$	$83.459 \pm 4.590^{\text{c) e)}$
天香丹高剂量组	9	$7.333 \pm 0.532^{\text{b) c) d) e)}$	$4.056 \pm 0.381^{\text{c) e)}$	$82.087 \pm 3.519^{\text{c) e)}$

注：LVESD，左室收缩末期腔径；LVEDD，左室舒张末期腔径；LVEF，左室射血分数。

a) 与空白对照组比较， $P < 0.05$ ；b) 与假手术组比较， $P < 0.05$ ；c) 与模型组比较， $P < 0.05$ ；d) 与尼可地尔组比较， $P < 0.05$ ；e) 与天香丹低剂量组比较， $P < 0.05$ 。

表 2 各组大鼠心肌组织 Nrf2、Keap1、NQO1、CAT、HO-1 蛋白相对表达量比较

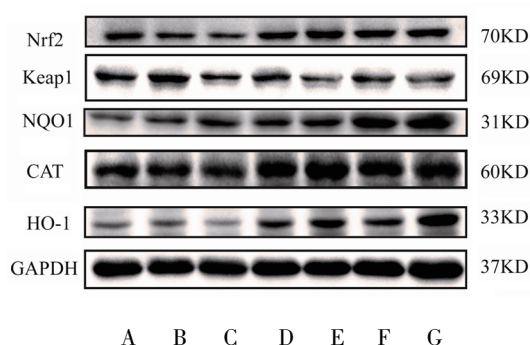
(灰度值， $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Nrf2	Keap1	NQO1	CAT	HO-1
空白对照组	9	0.532 ± 0.075	0.904 ± 0.123	0.670 ± 0.036	1.053 ± 0.149	0.578 ± 0.094
假手术组	9	0.575 ± 0.056	1.030 ± 0.197	0.923 ± 0.065	1.257 ± 0.354	0.689 ± 0.193
模型组	9	0.685 ± 0.094	$0.706 \pm 0.348^{\text{b)}$	0.778 ± 0.239	1.230 ± 0.427	0.653 ± 0.282
尼可地尔组	9	$0.751 \pm 0.102^{\text{a)}$	$0.658 \pm 0.093^{\text{b)}$	$1.197 \pm 0.211^{\text{a)}$	1.475 ± 0.377	0.909 ± 0.193
天香丹低剂量组	9	$1.043 \pm 0.074^{\text{a) b) c) d)}$	$0.463 \pm 0.137^{\text{a) b)}$	1.062 ± 0.308	1.343 ± 0.276	0.908 ± 0.072
天香丹中剂量组	9	$1.325 \pm 0.097^{\text{a) b) c) d) e)}$	$0.499 \pm 0.106^{\text{a) b)}$	$1.955 \pm 0.423^{\text{a) b) c) d) e)}$	$2.242 \pm 0.194^{\text{a) b) c) d) e)}$	$1.090 \pm 0.289^{\text{a) b) c) d) e)}$
天香丹高剂量组	9	$1.212 \pm 0.210^{\text{a) b) c) d)}$	$0.616 \pm 0.145^{\text{a) b)}$	$1.454 \pm 0.259^{\text{a) b) c) d)}$	$1.847 \pm 0.243^{\text{a) b) c)}$	$2.204 \pm 0.069^{\text{a) b) c) d) e) f)}$

注：Nrf2，核转录因子 E2 相关因子 2；Keap1，Kelch 样环氧丙烷相关蛋白 1；NQO1，醌氧化还原酶 1；CAT，氧化氢酶；HO-1，血红素加氧酶 1。

a) 与空白对照组比较， $P < 0.05$ ；b) 与假手术组比较， $P < 0.05$ ；c) 与模型组比较， $P < 0.05$ ；d) 与尼可地尔组比较， $P < 0.05$ ；e) 与天香丹低剂量组比较， $P < 0.05$ ；f) 与天香丹中剂量组比较， $P < 0.05$ 。

降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较,天香丹低、中、高剂量组 Nrf2 表达升高,天香丹中、高剂量组 NQO1、CAT、HO-1 表达升高 ($P < 0.05$)。与尼可地尔组比较,天香丹低、中、高剂量组 Nrf2 表达升高,天香丹中剂量组 NQO1、CAT 表达升高,天香丹高剂量组 HO-1 表达升高 ($P < 0.05$)。与天香丹低剂量组比较,天香丹中剂量组 Nrf2、NQO1、CAT 蛋白表达升高,天香丹高剂量组 HO-1 表达升高 ($P < 0.05$)。与天香丹中剂量组比较,天香丹高剂量组 HO-1 表达升高, NQO1 表达降低 ($P < 0.05$)。各组大鼠心肌组织 Nrf2、Keap1、NQO1、CAT、HO-1 蛋白电泳图见图 1。



注: Nrf2, 核转录因子 E2 相关因子 2; Keap1, Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1; NQO1, 醌氧化还原酶 1; CAT, 氧化氢酶; HO-1, 血红素加氧酶 1; A, 空白对照组; B, 假手术组; C, 模型组; D, 尼可地尔组; E, 天香丹低剂量组; F, 天香丹中剂量组; G, 天香丹高剂量组。

图 1 各组大鼠心肌组织 Nrf2、Keap1、NQO1、CAT、HO-1 蛋白电泳图

2.3 各组大鼠冠状动脉微血管病理形态观察

HE 染色结果显示,空白对照组及假手术组未发现微血栓。模型组大鼠冠状动脉微血管内可见红色或白色血栓混合物,心肌细胞出现纤维化。尼可地尔组及天香丹低、中、高剂量组微血栓程度降低。各组大鼠冠状动脉微血管 HE 染色病理图见图 2, 请扫二维码获取。

马休黄-酸性品红-苯胺蓝染色结果显示,空白对照组及假手术组偶尔可见少量红细胞。模型组冠状动脉微血管内微血栓的成分多由红色的纤维素和蓝色的纤维蛋白所组成,微血栓程度较重。与模型组相比,尼可地尔组及天香丹低、中、高剂量组心肌细胞无纤维化,微血管内仅有少量微血栓。各组大鼠冠状动脉微血管马休黄-酸性品红-苯胺蓝染色病理图见图 3, 请扫二维码获取。

2.4 各组大鼠心肌组织超微结构观察

空白对照组及假手术组透射电镜图像可见心肌细胞排列整齐,结构良好。模型组可见心肌细胞闰盘间隙过大,心肌细胞破裂,线粒体絮状改变,内部复杂性降低,并可看到 Z 线明显不平。尼可地尔组及天香丹低、中、高剂量组线粒体损伤减轻,心肌细胞排列较整齐, Z 线略平,闰盘正常。各组大鼠心肌组织超微结构电镜图见图 4, 请扫二维码获取。

3 讨论

CMD 属于中医学“胸痹心痛”范畴^[1],其病机多为脉络绌急、心络瘀阻等。心络不仅联系心中各大经络,而且有灌渗气血、濡养心脏的作用^[2]。心络络体细小狭窄、气血运行较缓,寒凝、瘀血等原因均可导致心络气血瘀滞,“真心痛”“胸痹”等严重心系疾病的主要病机就是心络瘀阻^[3]。《沈氏尊生方》云“若心经络病者,动则噎干,心痛。”《诸病源候论》亦云“心为诸脏主而藏神,其正经不可伤,伤之而痛为真心痛,朝发夕死,夕发朝死,若伤心之支别络而痛者,则乍间乍盛,休作有时也。”络脉的畅通无阻是人体气血正常运行的前提。CMD 即中医络病,其治疗的根本目的在于保持络脉通畅,故“络以通为用”为 CMD 的治疗原则。叶天士首倡“络虚通补”治法,提出“大凡络虚,通补最宜”之说^[4]。天香丹以通补开泄为法,方中丹参味苦,微寒,能祛瘀止痛,活血通经,清心除烦;红景天性平,味甘、苦,功能补气活血通脉;降香味辛,性温,可行气活血止痛;新塔花味辛,性凉,具有散邪通络、补益安神的功效。本方甘苦并用,寒温并进,通补结合,使补而不滞,且方中多用芳香类中药,辛通开泄,加强了“通”的作用。四药合用,共奏益气补虚、和血通络、化瘀散结之功效。尼可地尔在改善冠状动脉微循环,降低无复流/慢血流的发生率、梗死面积,保护心肌缺血方面作用显著^[5-14],故本研究选用尼可地尔作为阳性对照药。

本研究心肌病理 HE 染色结果显示,模型组大鼠心肌冠状动脉微血管内可见血栓混合物,并可见心肌细胞纤维化;马休黄-酸性品红-苯胺蓝染色后进一步表明冠状动脉微血管内微血栓的成分多由红色的纤维素和蓝色的纤维蛋白所组成;醋酸铀和枸橼酸铅双重染色结果透射电镜显示心肌细胞线粒体损伤加重。线粒体是最主要的产生能量的细胞

器,与自由基的产生密切相关,是心肌细胞中对缺血最敏感的细胞器^[7-18]。使用天香丹各剂量和尼可地尔治疗后,心肌细胞线粒体损伤减轻,冠状动脉微血管内微血栓程度及心肌纤维化程度均好转。已有研究^[9]表明,CMD 后心功能会降低。与空白对照组相比,假手术组 LVEDD 升高、LVEF 无明显差异,说明心脏功能处于代偿期,但心肌染色结果均显示假手术组大鼠并未造成 CMD;而尼可地尔组和天香丹中、高剂量组均可改善心功能各指标,天香丹中剂量组和尼可地尔组改善效果更好,且二者效果相当。

Nrf2/ARE 信号通路是介导内源性氧化应激的重要途径,Nrf2 在响应氧化应激,诱导内源性抗氧化酶中不可或缺。在未受激活的正常细胞中,Nrf2 存在于细胞浆中,受调控蛋白 Keap1 调控,呈低水平状态^[20]。微循环障碍后 Nrf2 和 Keap1 分离,Nrf2 转位进入细胞核与 ARE 结合而激活 Nrf2/ARE 信号通路促使其下游包括 NQO1、CAT 及 HO-1 等在内的 II 相解毒酶的表达^[21]。NQO1 对各种氧化应激反应具有保护作用^[22];CAT 能够催化过氧化氢的分解,氧化甲醇、甲酸等细胞毒性物质^[23];HO-1 可阻止游离血红素参与氧化应激,具有抗氧化、抗炎、扩血管和改善组织微循环等作用^[24]。本研究结果发现,与模型组相比,天香丹中、高剂量组 Nrf2、NQO1、CAT、HO-1 蛋白表达均升高,天香丹低剂量组仅 Nrf2 蛋白表达升高,说明天香丹能够激活 Nrf2/ARE 信号通路,提高机体的抗氧化能力,且以高、中剂量效果更好。

综上所述,天香丹可能通过激活 Nrf2/ARE 信号通路,从而减轻氧化应激损伤,提高心功能,改善 CMD。但本研究中未探讨天香丹对氧化应激相关因子的影响,今后的实验中需对相关指标进一步深入研究。

参考文献

- [1] 中华医学会心血管病学分会基础研究学组. 冠状动脉微血管疾病诊断和治疗的专家共识 [J]. 中国循环杂志, 2017, 32(5): 421-430.
- [2] MEJIA-RENTERIA H, VAN DER HOEVEN N, VAN DE HOEF TP, et al. Targeting the dominant mechanism of coronary microvascular dysfunction with intracoronary physiology tests [J]. Int J Cardiovasc Imag, 2017, 33(7): 1041-1059.
- [3] 李俊平, 郭丽丽, 陈中, 等. 丹萎片对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(1): 95-100.
- [4] LEOPOLD JA, LOSCALZO J. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease [J]. Free Radic Biol Med, 2009, 47(12): 1673-1706.
- [5] 杨建梅, 安冬青, 王晓峰, 等. 天香丹颗粒治疗冠心病心绞痛 33 例 [J]. 上海中医药大学学报, 2006, 20(2): 29-31.
- [6] 安冬青, 胡金霞, 赵明芬, 等. 天香丹对冠心病病人血管内皮生长因子及相关因子的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2007, 5(8): 662-664.
- [7] 王昕宇, 焦玉洁, 安冬青. 不同剂量天香丹对动脉粥样硬化小鼠血脂及血管内皮生长因子的影响 [J]. 中国中医急症, 2014, 23(3): 400-403, 415.
- [8] 安冬青, 周铭心, 张晓天, 等. 天香丹对心肌缺血大鼠血栓形成及心肌细胞结构的影响 [J]. 新疆医科大学学报, 2007, 30(5): 434-437.
- [9] 沈成兴, 梁春, 陈良龙, 等. 经冠状动脉内注射月桂酸钠构建大鼠冠状动脉微栓塞模型 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(4): 447-450.
- [10] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1052-1053.
- [11] 卢健棋, 温志浩. 中医药干预冠脉微循环障碍的研究近况 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2013, 19(5): 597-600.
- [12] 冯宇. 心之络病: 孙络瘀阻的中医微观病理特征研究 [D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2019.
- [13] 吴以岭. 络病治疗原则与通络药物 [J]. 疑难病杂志, 2005, 4(4): 213-215.
- [14] 张兰坤, 过伟峰, 肖婧, 等. 从叶天士“络以通为用”学说谈通络药物的临床应用 [J]. 中医杂志, 2014, 55(9): 89-90, 93.
- [15] JI Z, ZHANG R, LU W, et al. The effect of nicorandil in patients with acute myocardial infarction undergoing percutaneous coronary intervention: a systematic review and meta-analysis [J]. Ir J Med Sci, 2020, 189(1): 119-131.
- [16] PI SF, LIU YW, LI T, et al. Effect of sequential nicorandil on myocardial microcirculation and short-term prognosis in acute myocardial infarction patients undergoing coronary intervention [J]. J Thorac Dis, 2019, 11(3): 744-752.
- [17] TIAN L, CAO W, YUE R, et al. Pretreatment with Tilianin improves mitochondrial energy metabolism and oxidative stress in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury via AMPK/SIRT1/PGC-1 alpha signaling pathway [J]. J Pharmacol Sci, 2019, 139(4): 352-360.
- [18] 李磊. 冠脉微循环障碍模型的建立及双参宁心胶囊的

- 干预作用研究 [J]. 北京: 中国中医科学院, 2019.
- [9] 贾承明, 马静, 陈昌波, 等. 补肾活血方对去卵巢小鼠冠脉微循环的保护作用及机制研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 39(2): 102-108.
- [20] TU W, WANG H, LI S, et al. The anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway in chronic diseases [J]. Aging Dis, 2019, 10(3): 637-651.
- [21] 赵萍, 高建. Nrf2/Keap1/ARE 信号通路为难治性呼吸系统疾病研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(11): 1488-1492.
- [22] 郭冲, 岳霄, 贾大林. 舒芬太尼后处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤时 Nrf2-ARE 信号通路的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(16): 17-22.
- [23] ZHANG CY, REN XM, LI HB, et al. Simvastatin alleviates inflammation and oxidative stress in rats with cerebral hemorrhage through Nrf2-ARE signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(14): 6321-6329.
- [24] RAFFAELE M, CAROTA G, SFERRAZZO G, et al. Inhibition of heme oxygenase antioxidant activity exacerbates hepatic steatosis and fibrosis in vitro [J]. Antioxidants (Basel), 2019, 8(8): 277.

The Effect of *Tian Xiang Dan* (天香丹) on Nrf2/ARE Signaling Pathway in Myocardial Tissues of Model Rats with Coronary Microcirculation Dysfunction

MA Xuekuan, GULIGENA · Sawuer, ZHANG Yajie, XIN Jinyu, ZHANG Hua, WANG Sijing, AN Dongqing
Institute of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi, 830011

ABSTRACT Objective To explore the effect of *Tian Xiang Dan* (天香丹) on coronary microcirculation dysfunction (CMD) and its possible mechanism. **Methods** Sixty-three SD rats were randomly divided into a blank control group, a sham operation group, a model group, a nicorandil group and *Tian Xiang Dan* low, medium and high dose groups, with nine rats in each group. The model of CMD was established in all rats except for the blank control group, by injecting normal saline (for sham operation group) or sodium laurate (for other groups) into the left ventricle after thoracotomy. After modeling, *Tian Xiang Dan* at a dosage of 0.1188 g/(kg·d), 0.2376 g/(kg·d), and 0.4752 g/(kg·d) was administered by gavage in *Tian Xiang Dan* low, medium and high dose groups, respectively; 0.297 mg/(kg·d) nicorandil powder by gavage was administered in nicorandil group; the blank control group, the sham operation group, and the model group were given 2mL normal saline by gavage; all administrations were performed once per day, for 28 days. Cardiac function was detected in all the rats. Hematoxylin and eosin (HE) stain and martius yellow-acid fuchsin-aniline blue stain were used to observe the pathological changes in the capillary blood vessels of coronary circulation. The ultrastructure of the myocardial tissues was investigated; the expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) / antioxidant response element (ARE) signaling pathway proteins, including Nrf2, Kelch-like epichlorohydrin-associated protein 1 (Keap1), quinone oxidoreductase 1 (NQO1), catalase (CAT), heme oxygenase-1 (HO-1) were determined. **Results** In model group, there was thromboembolism in capillary blood vessels; myocardial cells showed fibrosis; and microthrombosis was severe, while in other treatment groups, the degree of thrombosis was light with only few microthrombi. Compared to the blank control group, the cardiac function in sham operation group and model group decreased significantly ($P < 0.05$), while no significant differences were found between groups in the expression of Nrf2, Keap1, NQO1, CAT and HO-1 ($P > 0.05$). Compared to the model group, the cardiac function significantly improved in nicorandil group and *Tian Xiang Dan* medium and high dose groups ($P < 0.05$); and the expression levels of Nrf2, NQO1, CAT, and HO-1 proteins significantly increased in *Tian Xiang Dan* medium and high dose groups ($P < 0.05$). Compared to nicorandil group, there was higher expression levels of Nrf2, NQO1, CAT proteins in *Tian Xiang Dan* medium group, and higher expression level of HO-1 protein in *Tian Xiang Dan* high group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Tian Xiang Dan* can alleviate microthrombosis and mitochondrial damage, thereby improving coronary microcirculation dysfunction. The underlying mechanism may be related to Nrf2/ARE signaling pathway through which oxidative stress is reduced.

Keywords coronary microcirculation dysfunction; *Tian Xiang Dan* (天香丹); oxidative stress; Nrf2/ARE signaling pathway

(收稿日期: 2020-09-08; 修回日期: 2020-11-10)

编辑: 邓 媛