

## 实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.09.017

## 活血温通方对心肌缺血模型大鼠心肌组织 Sirt1 信号通路的影响

刘甜甜, 王擎擎, 姚魁武\*

中国中医科学院广安门医院, 北京市西城区北线阁 5 号, 100053

**摘要** 目的 探讨活血温通方对心肌缺血的影响及可能作用机制。方法 雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性药组和活血温通方低、中、高剂量组, 每组 8 只。除假手术组外其余各组采用结扎冠状动脉左前降支制备心肌缺血模型。造模后阳性药组灌胃单硝酸异山梨酯缓释片 6.3 mg/(kg·d), 活血温通方低、中、高剂量组分别灌胃活血温通方 0.42、0.84、1.68 g/(kg·d), 假手术组和模型组灌胃等体积蒸馏水。连续灌胃 4 周后检测血清心肌肌钙蛋白 I (cTn-I)、肌酸激酶 MB 同工酶 (CK-MB)、乳酸脱氢酶 (LDH) 含量, HE 染色观察心脏结构, Masson 染色观察心肌纤维化情况, Western blot 法测定心脏沉默信息调节因子 1 (Sirt1)、核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)、叉头蛋白盒子 1 (Foxo1)、p53 蛋白表达变化。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠血清 cTn-I、CK-MB、LDH 含量均明显升高 ( $P < 0.01$ ), 缺血心脏肌间隙增大, 肌纤维排列紊乱, 出现大量炎性细胞浸润, 同时胶原纤维化严重, Sirt1 蛋白表达显著降低, NF- $\kappa$ B、Foxo1、p53 蛋白表达增多 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 阳性药组和活血温通方中剂量组均可不同程度改善上述指标 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 且活血温通方中剂量组在降低 NF- $\kappa$ B 及 p53 蛋白表达, 升高 Sirt1 表达优于活血温通方低剂量组 ( $P < 0.01$ ), 在降低 CK-MB、LDH 含量及 NF- $\kappa$ B、Foxo1、p53 蛋白表达亦优于活血温通方高剂量组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。活血温通方中剂量组在改善心脏病理效果亦佳。结论 活血温通方可能通过上调 Sirt1 信号通路, 逆转缺血心脏病理改变, 从而改善心肌缺血损伤, 以中剂量效果最好。

**关键词** 活血温通方; 心肌缺血; 沉默信息调节因子 1

心肌梗死是由于冠状动脉闭塞引起局部心肌血氧供应减少甚至中断, 导致心肌细胞坏死的一种病证, 严重危害人类生命健康, 其死亡率已居各类心血管疾病之首<sup>[1]</sup>。温阳活血法是临床治疗冠心病的常用方法之一<sup>[2-4]</sup>。我们在传承国医大师薛伯寿学术思想和蒲辅周治疗胸痹效验方“双和散”<sup>[5]</sup>的基础上, 加入活血祛瘀中药组成活血温通方, 具有活血化瘀、益气温阳、通脉止痛的功效。在临床中我们观察到服活血温通方 4 周后患者心肌缺血症状有所好转。本研究采用结扎冠状动脉左前降支制备大鼠心肌缺血模型, 在体验证活血温通方对缺血心脏的保护作用, 并探讨其可能的药理机制。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

健康成年雄性 SD 大鼠 48 只, 8~10 周龄, 体重 240~280 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 实验动物合格证号 SCXK (京) 2014-0004。

### 1.2 实验药物

活血温通方组成: 丹参 30 g, 桂枝 10 g, 川芎 9 g, 鸡血藤 10 g, 赤芍 10 g, 党参 10 g, 由中国中医科学院广安门医院中药房经提取、浓缩制成颗粒剂。单硝酸异山梨酯缓释片 (阿斯利康制药有限公司, 批号 1810026, 规格 60 mg/片)。

### 1.3 实验试剂

心肌肌钙蛋白 I (cTn-I, 批号: 20190704)、肌酸激酶 MB 同工酶 (CK-MB, 批号: 20190404)、乳酸脱氢酶 (LDH, 批号: 20190401) 试剂盒、

基金项目: 国家自然科学基金 (81873173)

\* 通讯作者: yaokuiwu@126.com

Masson 染液 (货号: D026-1-3), 均购自南京建成生物工程研究所; 核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 抗体 (货号: 8242T)、p53 抗体 (货号: 2524T)、心脏沉默信息调节因子 1 (Sirt1) 抗体 (货号: 8469S)、叉头蛋白盒子 1 (Foxo1) 抗体 (货号: 2880S), 均为 CST 公司产品; 4% 多聚甲醛固定液 (货号: P0099), 碧云天生物技术有限公司; RIPA 裂解液 (货号: R0010-100)、PMSF (货号: P0100)、丽春红染液 (货号: P0012-10), 均为 Solarbio 公司产品; BCA 蛋白定量试剂盒 (货号: 23227)、蛋白 Marker (货号: 26634), 均为 Thermo Fisher 公司产品; 羊抗兔 IgG-HRP 二抗 (货号: E1WP318), 恩晶生物科技有限公司;  $\beta$ -actin 抗体 (货号: TA-09)、山羊抗鼠 IgG-HRP 二抗 (货号: ZB2305), 北京中杉金桥生物技术有限公司; ECL 发光液 (货号: K-12045-D50), Advanta 公司。

#### 1.4 实验仪器

ALC-V8 型动物呼吸机 (上海奥尔科特生物科技有限公司); SpectraMax M2 型酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); FluorChem<sup>TM</sup> FC3 system 型化学发光凝胶成像 (美国 Protein Simple 公司); SleeMPS/P2 型石蜡包埋机、SleeCUT6062 型石蜡切片机, 德国 SLEE 公司; DM 2LLED 型倒置显微镜 (Leica 公司); Panoramic scan 型全自动切片扫描系统 (匈牙利 3DHISTECH 公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物造模及给药

48 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 按照随机数字表法分为假手术组、模型组、阳性药组及活血温通方低、中、高剂量组, 每组 8 只。除假手术组外其余各组参照文献 [6] 方法造模: 在胸部左侧 3—4 肋间剪开皮肤, 钝性分离肌肉、肋骨、心包膜, 暴露心脏, 在肺动脉圆锥与左心耳交界处下方 2 mm 处结扎冠状动脉左前降支制备心肌缺血模型。假手术组只穿线不结扎。造模成功后, 阳性药组大鼠灌胃单硝酸异山梨酯缓释片 6.3 mg/(kg·d), 活血温通方低、中、高剂量组分别灌胃活血温通方 0.42、0.84、1.68 g/(kg·d), 假手术组和模型组大鼠灌胃等体积蒸馏水。活血温通方中剂量为临床等效剂量, 参照《药理学实验方法学》[7] 中的人体表面积折算得来, 分别选取其 1/2 剂量为低剂量和 2 倍剂量为高剂量。各组大鼠均每天灌胃 1 次, 4 周后取材。

### 2.2 观察指标及方法

2.2.1 血清 cTn-I、CK-MB、LDH 含量 大鼠麻醉后进行腹主动脉取血, 血液室温静置 1 h 后取上清, 测定血清中 cTn-I、CK-MB、LDH 含量, 按试剂盒步骤操作。

2.2.2 心脏病理结构 取血后剪开胸腔, 剥离心脏, 洗净血液, 心脏横切分为两份, 一份冻存, 另一份心脏组织置于 4% 多聚甲醛固定 48 h 后, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 切片, 进行 HE 染色, 中性树胶封片, 37℃ 烘箱烤干, 全自动切片扫描系统阅片。

2.2.3 心肌纤维化情况 常规石蜡切片脱蜡至水, 苏木精染核, 蒸馏水洗, Masson 丽春红染液和苯胺蓝染色, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 37℃ 烘箱烤干, 全自动切片扫描系统阅片。

2.2.4 心肌组织中 Sirt1、NF- $\kappa$ B、Foxo1、p53 蛋白表达 采用 Western blot 法检测, 采用随机数字表法选取各组大鼠 4 只心肌组织, 使用 RIPA 裂解液收集心脏总蛋白, 采用 BCA 定量蛋白浓度。裂解液在 10% SDS-PAGE 上电泳分离并转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 4℃ 冰箱孵育一抗过夜, 第 2 天用 TBST 洗 10 min, 3 次, 室温下孵育二抗 1 h。用化学发光成像系统检测蛋白条带, 相对蛋白灰度值采用 Quantity One 4.6.2 软件进行计算和分析。

### 2.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析, 计量数据均服从正态分布, 以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组大鼠血清 cTn-I、CK-MB 和 LDH 含量比较

表 1 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠血清中 cTn-I、CK-MB 和 LDH 含量均有明显升高 (P < 0.01)。与模型组比较, 阳性药组和活血温通方低、中、高剂量组大鼠血清 cTn-I、CK-MB 和 LDH 含量都显著降低 (P < 0.01)。活血温通方高剂量组 CK-MB 含量高于阳性药组和活血温通方中、低剂量组 (P < 0.05 或 P < 0.01); 活血温通方高剂量组 LDH 含量亦高于活血温通方中剂量组 (P < 0.05)。各给药组 cTn-I 含量差异无统计学意义 (P > 0.05)。

### 3.2 各组大鼠心脏 HE 染色结果

图 1 示, 假手术组大鼠心肌纤维排列整齐, 无肌间隙增大和炎性细胞浸润。模型组大鼠心脏肌纤维排列紊乱, 肌纤维缺失, 并且肌间隙增大, 出现大量炎性细胞浸润。阳性药和活血温通方各剂量均能明显改善这些病变, 维持肌纤维结构完整, 降低炎性细胞浸润。与阳性药组相比, 活血温通方中剂量组肌纤维排列更为整齐有序, 炎性细胞浸润较少; 而活血温通方低、高剂量组炎性细胞浸润较多。

### 3.3 各组大鼠心脏 Masson 染色结果

图 2 示, 假手术组大鼠心脏无胶原纤维沉积。

与假手术组相比, 模型组大鼠出现大量胶原纤维堆积。与模型组比较, 阳性药和活血温通方各剂量组均能明显减少胶原纤维沉积, 抑制缺血心肌纤维化损伤。与阳性药组相比, 活血温通方低、中剂量组抑制胶原纤维沉积效果更显著, 而活血温通方高剂量组抑制心肌纤维化作用较差。

### 3.4 各组大鼠心肌组织 Sirt1、NF-κB、Foxo1、p53 蛋白表达比较

表 2 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌组织 Sirt1 蛋白表达显著降低, 而 NF-κB、Foxo1、p53 蛋白表达明显增加 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,

表 1 各组大鼠血清 cTn-I、CK-MB 和 LDH 含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | 鼠数 | cTn-I (ng/L)                | CK-MB (ng/ml)              | LDH (U/L)                    |
|-----------|----|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 假手术组      | 8  | 60.38 ± 11.16               | 4.19 ± 0.45                | 409.15 ± 53.92               |
| 模型组       | 8  | 662.81 ± 91.03*             | 39.90 ± 2.78*              | 809.24 ± 64.83*              |
| 阳性药组      | 8  | 176.65 ± 42.25 <sup>△</sup> | 7.81 ± 1.61 <sup>△▲▲</sup> | 480.09 ± 51.96 <sup>△</sup>  |
| 活血温通方低剂量组 | 8  | 180.42 ± 26.82 <sup>△</sup> | 8.99 ± 2.68 <sup>△▲</sup>  | 464.77 ± 74.55 <sup>△</sup>  |
| 活血温通方中剂量组 | 8  | 175.95 ± 42.73 <sup>△</sup> | 8.15 ± 1.28 <sup>△▲▲</sup> | 457.76 ± 59.02 <sup>△▲</sup> |
| 活血温通方高剂量组 | 8  | 168.75 ± 21.51 <sup>△</sup> | 21.57 ± 4.65 <sup>△</sup>  | 527.58 ± 56.88 <sup>△</sup>  |

注: cTn-I, 心肌肌钙蛋白 I; CK-MB, 肌酸激酶 MB 同工酶; LDH, 乳酸脱氢酶; 与假手术组比较: \*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较:  $\Delta P < 0.01$ ; 与活血温通方高剂量组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$

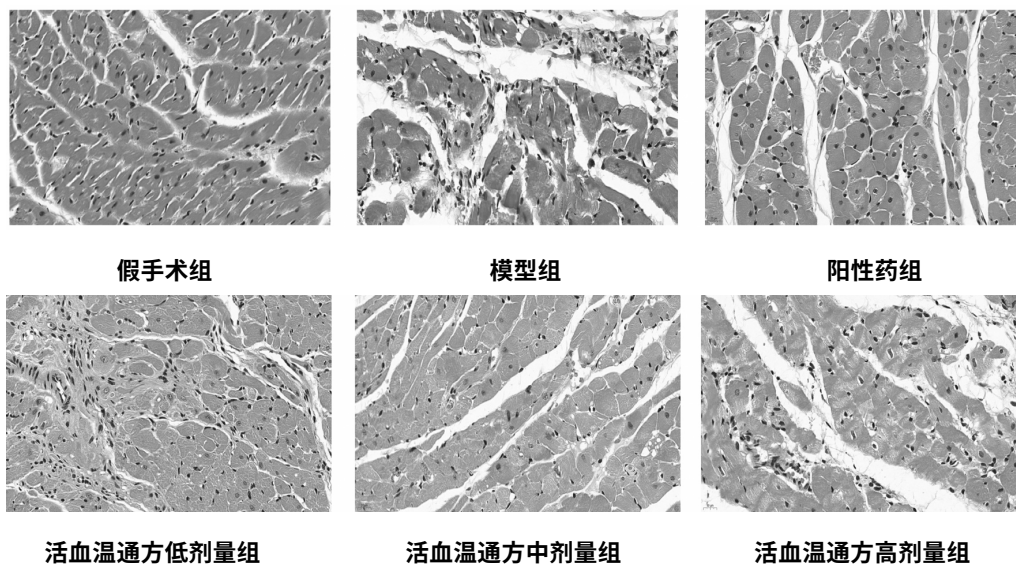


图 1 各组大鼠心脏 HE 染色结果 ( $\times 400$ )

表 2 各组大鼠心肌组织中 Sirt1、NF-κB、Foxo1、p53 蛋白表达比较 (灰度值,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | 鼠数 | Sirt1                          | NF-κB                           | Foxo1                           | p53                            |
|-----------|----|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 假手术组      | 4  | 0.4275 ± 0.0870                | 0.1623 ± 0.0426                 | 0.1586 ± 0.0479                 | 0.2363 ± 0.0432                |
| 模型组       | 4  | 0.1427 ± 0.0339*               | 0.9177 ± 0.0424*                | 0.5265 ± 0.0499*                | 0.8274 ± 0.1107*               |
| 阳性药组      | 4  | 0.4490 ± 0.0905 <sup>△</sup>   | 0.1389 ± 0.0382 <sup>△</sup>    | 0.1943 ± 0.0315 <sup>△</sup>    | 0.3026 ± 0.0465 <sup>△</sup>   |
| 活血温通方低剂量组 | 4  | 0.1949 ± 0.0355                | 0.4393 ± 0.0602 <sup>△</sup>    | 0.2295 ± 0.0389 <sup>△</sup>    | 0.8132 ± 0.1108                |
| 活血温通方中剂量组 | 4  | 0.3748 ± 0.0691 <sup>△▲▲</sup> | 0.2125 ± 0.0527 <sup>△▲▲</sup>  | 0.2092 ± 0.0478 <sup>△</sup>    | 0.2726 ± 0.0808 <sup>△▲▲</sup> |
| 活血温通方高剂量组 | 4  | 0.3433 ± 0.0967 <sup>△▲</sup>  | 0.5712 ± 0.1458 <sup>△▲##</sup> | 0.3345 ± 0.0550 <sup>△▲##</sup> | 0.8588 ± 0.0931 <sup>#</sup>   |

注: Sirt1, 心脏沉默信息调节因子 1; NF-κB, 核因子 κB; Foxo1, 叉头蛋白盒子 1; 与假手术组比较: \*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较:  $\Delta P < 0.01$ ; 与活血温通方低剂量组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与活血温通方中剂量组比较,  $\Delta P < 0.01$

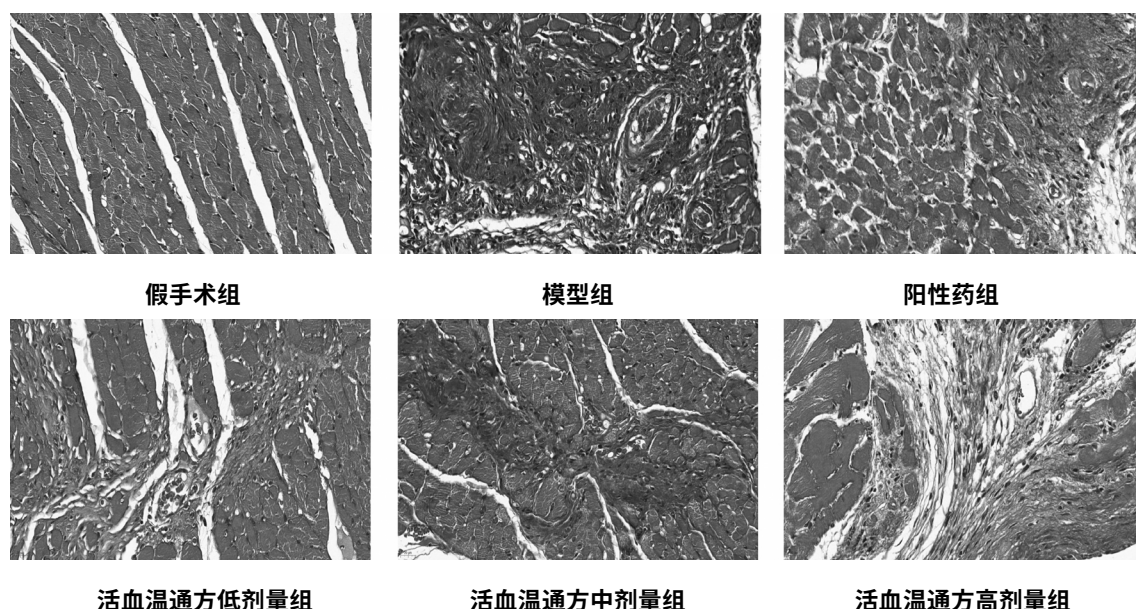
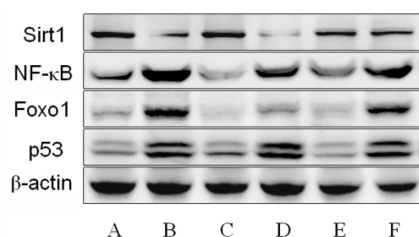


图 2 各组大鼠心脏 Masson 染色结果 (×400)

阳性药组和活血温通方中剂量组 Sirt1 蛋白表达升高, NF-κB、Foxo1、p53 蛋白表达下降 ( $P < 0.01$ ); 活血温通方低剂量组仅 NF-κB、Foxo1 蛋白下降, 活血温通方高剂量组 Sirt1 蛋白表达升高, NF-κB、Foxo1 蛋白表达下降 ( $P < 0.01$ )。活血温通方高、中剂量组 Sirt1、NF-κB 表达与活血温通方低剂量组差异有统计学意义, 活血温通方高剂量组 Foxo1 蛋白表达高于活血温通方中、低剂量组, 活血温通方中剂量组 p53、NF-κB 蛋白表达低于活血温通方低、高剂量组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。各组大鼠心肌组织中 Sirt1、NF-κB、Foxo1、p53 蛋白电泳图见图 3。



注: A, 假手术组; B, 模型组; C, 阳性药组; D, 活血温通方低剂量组; E, 活血温通方中剂量组; F, 活血温通方高剂量组; Sirt1, 心脏沉默信息调节因子 1; NF-κB, 核因子 κB; Foxo1, 叉头蛋白盒子 1

图 3 各组大鼠心肌组织中 Sirt1、NF-κB、Foxo1、p53 信号通路蛋白电泳图

#### 4 讨论

心肌梗死在中医学属“胸痹”“心痛”“心悸”范畴。《金匱要略·胸痹心痛短气病脉证治》指出“夫脉当取太过不及, 阳微阴弦, 即胸痹而痛, 所以然者, 责其极虚也。今阳虚知在上焦, 所

以胸痹心痛者, 以其阴弦故也”, 表明胸痹心痛的本质是“阳微阴弦”。活血温通方针对此病机, 在温补心阳的同时加入活血祛瘀中药。方中丹参为君药, 桂枝、鸡血藤、党参为臣药, 赤芍为佐药, 川芎为使药。全方共奏活血化瘀、益气温阳、通脉止痛之功效。

cTn-I、CK-MB 和 LDH 是临床常用的诊断心肌梗死的血清酶学指标, 心肌缺血后血清 cTn-I、LDH 和 CK-MB 显著升高<sup>[8]</sup>。本研究结果显示, 模型组大鼠血清 cTn-I、CK-MB 和 LDH 水平明显升高, 说明存在心肌梗死, 而给予单硝酸异山梨酯缓释片和活血温通方低、中、高剂量均可以不同程度降低血清 cTn-I、CK-MB 和 LDH 水平, 并且活血温通方低、中剂量效果较好。此外, 活血温通方中剂量与阳性药降低 cTn-I、CK-MB 和 LDH 水平效果相当。同时, 心脏 HE 染色及 Masson 染色结果亦显示, 活血温通方中剂量组在维持肌纤维结构完整, 降低炎性细胞浸润, 减少胶原纤维沉积, 抑制缺血心肌纤维化损伤方面效果最佳。

Sirt1 是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖的组蛋白去乙酰化酶, 主要定位于胞核和胞浆中, 在已知的 7 种 Sirt 亚型中, Sirt1 作用最广泛<sup>[9]</sup>。Sirt1 通过不同非组蛋白去乙酰化和几种转录调节因子调节哺乳动物细胞多种重要的生理和病理过程, 如调控氧化应激、炎症反应、自噬、有丝分裂、细胞凋亡、细胞增殖、细胞衰老及新陈代谢等多种生命活动<sup>[10]</sup>。许多转录因子调控着细胞增殖和凋亡, 这些转录因子被认为是 Sirt1 的底物, 包括 NF-κB、肌细胞分

化因子 (MyoD)、叉头蛋白盒子 (Foxo) 家族、Ku、p53 等, Sirt1 对 NF- $\kappa$ B、MyoD、叉头蛋白盒子 3 (Foxo3)、p53、p73 等的抑制作用, 可以促进 DNA 进行修复、抵抗氧化应激和减轻炎症反应, 从而促进细胞存活<sup>[1-13]</sup>。已有研究<sup>[14]</sup>报道, 在缺血/再灌注模型中, 由于心脏 Sirt1 基因的缺失会导致小鼠心肌损伤加剧, 而心脏高表达 Sirt1 基因的小鼠则可以减轻心肌缺血损伤。此外, 上调 Sirt1 的表达能够抑制凋亡, 并在氧化应激损伤中保护心肌细胞以及延缓大鼠心脏的衰老进程<sup>[15]</sup>。

本研究结果证实了活血温通方各剂量组均可不同程度通过激活 Sirt1 信号通路, 调节相关转录因子蛋白表达, 从而改善心肌缺血损伤, 并且活血温通方中剂量效果与单硝酸异山梨酯缓释片作用相当。鉴于中药复方的活性成分多、作用靶点多, 本研究只在蛋白水平验证活血温通方调节 Sirt1 信号通路改善大鼠心肌缺血损伤, 缺乏相关基因水平的验证结果, 需进一步探讨。

#### 参考文献

- [1] MONTECUCCO F, CARBONE F, SCHINDLER TH. Pathophysiology of ST-segment elevation myocardial infarction: novel mechanisms and treatments [J]. Eur Heart J, 2015, 37(16): 1268-1283.
- [2] 杨庆有, 赵立诚. 益气温阳活血方对心肌梗死患者骨髓干细胞动员作用和心功能的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(12): 1078-1081.
- [3] 宋婷婷, 王东海, 刘呈宇, 等. 温阳活血方治疗阳虚血瘀型冠心病心绞痛的疗效观察 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014, 12(6): 668-669.
- [4] 秦敬品. 温阳活血方治疗冠心病心绞痛疗效分析 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志 (电子版), 2015, 3(23): 110-111.
- [5] 李传方, 罗琦. 蒲辅周治疗冠心病心绞痛经验探析 [J]. 皖南医学院学报, 1992, 11(1): 57-58.
- [6] LINDSEY ML, BOLLI R, CANTY JM, et al. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2018, 314(4): 812-838.
- [7] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 882-887.
- [8] 宋文宣, 曲彦, 王晏平, 等. 冠心病的诊断与治疗 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 108-112.
- [9] GU C, LI Y, XU WL, et al. Sirtuin 1 activator SRT1720 protects against lung injury via reduction of type II alveolar epithelial cells apoptosis in emphysema [J]. COPD, 2015, 12(4): 444-452.
- [10] HAO C, ZHU PX, YANG X, et al. Overexpression of SIRT1 promotes metastasis through epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma [J]. BMC Cancer, 2014, 14: 978. doi: 10.1186/1471-2407-14-978.
- [11] OLMOS Y, BROSENS JJ, LAM EW. Interplay between SIRT proteins and tumour suppressor transcription factors in chemotherapeutic resistance of cancer [J]. Drug Resist Update, 2011, 14(1): 35-44.
- [12] REHAN L, LASZKI-SZCZACHOR K, SOBIESZCZANSKA M, et al. SIRT1 and NAD as regulators of ageing [J]. Life Sci, 2014, 105(1/2): 1-6.
- [13] RAHMAN S, ISLAM R. Mammalian Sirt1: insights on its biological functions [J]. Cell Commun Signal, 2011, 9: 11. doi: 10.1186/1478-811X-9-11.
- [14] HSU CP, ZHAI P, YAMAMOTO T, et al. Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion [J]. Circulation, 2010, 122(21): 2170-2182.
- [15] HSU YJ, HSU SC, HSU CP, et al. Sirtuin 1 protects the aging heart from contractile dysfunction mediated through the inhibition of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in cardiac-specific Sirtuin 1 knockout mouse model [J]. Int J Cardiol, 2017, 228: 543-552. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.11.247.

#### Effects of *Huoxue Wentong Formula* (活血温通方) on Sirt1 Signaling Pathway in Myocardial Tissue of Myocardial Ischemia Model Rats

LIU Tiantian, WANG Qingqing, YAO Kuiwu

Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100053

**ABSTRACT Objective** To explore effects of *Huoxue Wentong Formula* (活血温通方) on myocardial ischemia and its possible mechanism. **Methods** Male SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, positive medicine group, as well as *Huoxue Wentong Formula* low, medium, and high dose groups, with 8 rats in each group. For all groups but the sham operation group, left anterior descending coronary arteries were ligated to prepare models of myocardial ischemia. After modeling, the positive medicine group was administrated with 6.3 mg/(kg·d) isosorbide mononitrate sustained release tablets, the *Huoxue Wentong Formula* low, medium and high dose groups were administrated with 0.42, 0.84 and 1.68 g/(kg·d) *Huoxue Wentong Formula* respectively, the sham

operation group and the model group were given equal volume of distilled water by gavage. Serum cardiac troponin I (cTn-I), creatine kinase MB isoenzyme (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH) levels were measured 4 weeks after continuous gavage. Cardiac structure was observed by HE staining, and Masson staining was applied for observing on myocardial fibrosis. Western blot was used for determining expressions of cardiac silent information regulator 1 (Sirt1), nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), forkhead box protein O1 (Foxo1) and p53 protein. **Results** Compared with the sham operation group, the serum levels of cTn-I, CK-MB and LDH in the model group were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Ischemic myocardium space was increased, muscle fibers were arranged disorderly, and infiltration of a large number of inflammatory cells occurred. At the same time, collagen fibrosis was severe, the Sirt1 protein expression was significantly decreased, and the NF- $\kappa$ B, Foxo1 and p53 protein expressions were increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the above indexes could be improved to different degrees in the positive medicine group and the medium dose *Huoxue Wentong Formula* group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The decrease of NF- $\kappa$ B and p53 protein expressions and the increase of Sirt1 expression in the medium dose *Huoxue Wentong Formula* group were more significant than those in the low dose *Huoxue Wentong Formula* group ( $P < 0.01$ ). And it was also better than the high dose *Huoxue Wentong Formula* group in decreasing CK-MB and LDH levels, as well as expressions of NF- $\kappa$ B, Foxo1 and p53 protein ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). It was also effective in improving cardiac pathology in the medium dose *Huoxue Wentong Formula* group. **Conclusion** *Huoxue Wentong Formula* may reverse pathological changes of ischemic heart by up-regulating Sirt1 signaling pathway, thereby improving myocardial ischemic injury, and the efficacy is best at medium dose.

**Keywords** *Huoxue Wentong Formula* (活血温通方); myocardial ischemia; silent information regulator 1

(收稿日期: 2019-08-05; 修回日期: 2019-11-28)

编辑: 邓 媛

(上接第 799 页)

## Regional Homogeneity of Resting State Brain Function of Patients with Amnesic Mild Cognitive Dysfunction and Liver Qi Stagnation

ZHAN Xianghong, ZHAO Ziwei, LIU Ziyang, LIU Xiuling, LIU Yong

Cognitive Neuroscience Laboratory, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, 450046

**ABSTRACT** **Objective** To explore the characteristics of regional homogeneity (ReHo) of resting state brain function in patients with amnesic mild cognitive impairment (aMCI) and liver qi stagnation. **Methods** Questionnaires were used to screen normal subjects (normal group) aged from 46 to 65 years in communities in Zhengzhou City and patients with amnesic mild cognitive dysfunction and liver qi stagnation (liver qi stagnation aMCI group). According to the same sex, same age ( $\pm 2.5$  years old), and the same education level, 1 : 1 matching was applied to the 2 groups. Brain ReHo was analyzed by using resting state functional magnetic resonance imaging technique. **Results** Compared with the normal group, the ReHo values of the left inferior frontal gyrus, the left frontal gyrus and the left central anterior gyrus of the liver qi stagnation aMCI group were lower ( $t > 0$ ,  $P < 0.001$ ), and the ReHo value in the left occipital gyrus of the liver qi stagnation aMCI group was increased ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** The ReHo values of the left inferior frontal gyrus, the left frontal gyrus, the central anterior gyrus and left occipital gyrus were changed in aMCI patients with liver qi stagnation.

**Keywords** mild cognitive impairment; amnesic; liver qi stagnation; brain function resting state functional magnetic resonance imaging; regional homogeneity

(收稿日期: 2019-09-01; 修回日期: 2019-12-16)

编辑: 王利芬