

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.04.013

加味涤痰汤对慢性间歇低氧模型大鼠心肌组织损伤及 Keap1-Nrf2 信号通路的影响

廖燃, 陈沁, 王丰, 刘丹, 李璟怡, 徐峰圣, 王奕锦, 郑海音, 陈丽丽, 吴润华✉

福建中医药大学中西医结合学院, 福建省福州市闽侯县上街镇邱阳路 1 号, 350122

[摘要] **目的** 探讨加味涤痰汤对慢性间歇性低氧诱导大鼠心肌损伤的影响及可能作用机制。**方法** 30 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、加味涤痰汤组, 每组 10 只。模型组和加味涤痰汤组放入低氧舱内建立慢性间歇性低氧大鼠模型。加味涤痰汤组每天放进低氧舱前 30 min 按 14.8 g/(kg·d) 灌胃给药, 正常组和模型组则按相同体积予生理盐水灌胃, 共干预 12 周。检测血清心肌酶指标 [包括肌酸激酶 (CK)、肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、乳酸脱氢酶 (LDH)]、氧化应激指标 [包括丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽 (GSH)] 和组织铁含量; 检测心肌组织中 kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (Keap1)、核红系转录因子 2 (Nrf2)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (Gpx4)、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (Acsl4) 蛋白和 mRNA 的表达; HE 染色观察心肌细胞的形态。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠血清 CK、CK-MB、LDH、MDA 上升, GSH 表达和组织铁含量降低, 心肌组织 Keap1、Acsl4 蛋白和 mRNA 表达增加, Nrf2、Gpx4 蛋白和 mRNA 表达减少 ($P<0.05$); HE 染色结果显示模型组大鼠心肌组织内血管充血, 淋巴细胞浸润, 心肌细胞轻微水肿。与模型组比较, 加味涤痰汤组大鼠血清 CK、CK-MB、LDH、MDA 下降, GSH 表达和组织铁含量升高, 心肌组织 Keap1、Acsl4 蛋白和 mRNA 表达降低, Nrf2、Gpx4 蛋白和 mRNA 表达升高 ($P<0.05$); HE 染色显示心肌细胞病理形态有所改善。**结论** 加味涤痰汤能有效改善慢性间歇性低氧过程中氧化应激对大鼠心脏造成的损伤, 其机制可能是通过影响 Keap1-Nrf2 通路介导的铁死亡而发挥作用。

[关键词] 阻塞性睡眠呼吸暂停; 慢性间歇低氧; 加味涤痰汤; 心肌损伤; 氧化应激; 铁死亡; Keap1-Nrf2 通路

阻塞性睡眠呼吸暂停 (obstructive sleep apnea, OSA) 是一种发生在睡眠过程中, 常伴有睡眠时打鼾、憋气、晨起口干、头痛、白天嗜睡和注意力不集中等症状, 继而引发不同程度的夜间慢性间歇性低氧、高碳酸血症、睡眠结构紊乱以及交感神经活性增加等一系列症状的睡眠呼吸障碍性疾病^[1]。据流行病学资料, 成年男性 OSA 患病率约为 15%, 成年女性约为 5%, 肥胖人群患病率高达 40%~60%^[2]。OSA 可导致多系统多器官损害, 增加各种疾病的患病风险, 如糖代谢障碍、充血性心力衰竭、脑卒中及认知功能障碍等, 其中尤以心血管系

统疾病最为常见^[3]。目前针对 OSA 及其并发症的治疗方法多以外科治疗为主, 如持续气道正压通气和口腔矫治器等, 而长期的持续气道正压通气治疗对 OSA 心血管系统并发症的影响亦不明确^[4], 并且大多数患者无法耐受, 依从性差^[5]。因此, 寻找有效防治 OSA 合并心脏损害的方法具有重要意义。

涤痰汤源于南宋严用和的《济生方》。本课题组结合临床实际, 在原方基础上增加益气祛瘀中药, 自拟加味涤痰汤。前期临床研究发现, 加味涤痰汤能显著改善 OSA 患者的临床症状、睡眠呼吸暂停低通气指数和夜间最低血氧饱和度等指标^[6], 但其发挥作用具体的分子机制尚未清楚。因此, 本研究拟通过建立慢性间歇低氧大鼠模型, 探究加味涤痰汤对慢性间歇低氧模型大鼠心脏损伤的干预作

基金项目: 国家自然科学基金(82074192); 福建省自然科学基金(2020J01716); 福建中医药大学 2019 年校管科研课题(X2019006-重点)

✉ 通讯作者: wu_runhua@126.com

用以及可能的分子机制。本实验经福建中医药大学动物伦理中心审核通过, 审查号: 2021009。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性 SPF 级 SD 大鼠 30 只, 体质量 210~230 g, 7 周龄, 购于杭州医学院, 许可证号: 20210119 Aazz0100000500。动物饲养于福建中医药大学 SPF 级动物实验室, 温度 21~27 ℃, 湿度 45%~55%, 大鼠适应性喂养 1 周后进行实验。

1.2 药物

加味涤痰汤组成: 黄芪 30 g, 党参 30 g, 茯苓 12 g, 胆南星 6 g, 法半夏 12 g, 陈皮 9 g, 石菖蒲 15 g, 当归 9 g, 川芎 12 g, 枳实 9 g, 竹茹 9 g, 甘草 3 g。饮片由福建省福州市致诚医药公司提供, 药物煎煮前先浸泡 30 min, 大火烧开后小火再煎 30 min, 将重复煎煮 2 次的药液混合在一起蒸发浓缩, 制备成生药浓度为 1 g/ml 的加味涤痰汤浓缩液, -20 ℃保存备用。

1.3 主要试剂及仪器

苏木精-伊红染液 (HE 染液, 福州塞维尔生物科技有限公司, 批号: G1783); 内参 β -Actin 抗体、kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (Keap1) 抗体、核红系转录因子 2 (Nrf2) 抗体、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (Gpx4) 抗体、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (Acsl4) 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号分别为 A04672-2、YT5218、16396-1-AP、14432-1-AP、A04372-2); BCA 试剂盒 (上海碧云天生物有限公司, 批号: P0013); 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒 (福州迈新生物技术开发有限公司, 批号分别为 KIT-9710、DAB-0031); RIPA 裂解液、逆转录试剂盒、qPCR 试剂盒 (南京诺唯赞生物技术有限公司, 批号分别为 Q461-01、R198-01、A711); 乌拉坦 (齐鲁制药有限公司, 批号 H37022259); 心肌酶测定试剂盒、丙二醛 (MDA) 试剂盒、谷胱甘肽 (GSH) 试剂盒、组织铁测定试剂盒 (南京建成生物科技有限公司, 批号分别为 A032-1-1、A003-1、A005-1、A039-2-1)。

低氧舱 (中国上海玉研科学仪器有限公司, 型号 Attendor-140Pro); 光学显微镜 (日本 hitachi 公司, 型号 ECLIPSE 551); 电子显微镜 (日本 hitachi 公司, 型号 HT7700) 电泳仪 (型号 1645050)、电泳槽 (型号 165-8001)、化学发光成像仪 (型号 Universal Hood II)、实时荧光定量 PCR 仪 (型号 t100), 美国 Bio-Rad 公司; 包埋机 (型号 RM2235)、

超薄切片机 (型号 RM2235), 德国 Leica 公司; 酶标仪 (美国特宝公司, 型号 Bio-TEKELx800)。

1.4 动物模型制备

通过电脑程序设定向低氧舱中循环充入氮气和氧气, 调控箱内氧浓度及低氧/复氧的频率。其中设定最低氧浓度 5.0%, 最高氧浓度 21%, 氧浓度下降期 50 s, 低氧持续期 20 s, 氧浓度上升期 30 s 及常氧维持期 20 s 构成一个循环周期, 共计 120 s, 每天持续 8 h (一般为上午 9:00 至下午 5:00), 连续 12 周, 建立慢性间歇低氧模型^[7]。

1.5 动物分组及干预方法

30 只大鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、加味涤痰汤组, 每组 10 只。加味涤痰汤组每天放进低氧舱前 30 min 按 14.8 ml/(kg·d) 灌胃给药, 正常组和模型组则按相同体积予生理盐水灌胃, 灌胃后将模型组和加味涤痰汤组放入低氧舱内, 每天 8 h。给药剂量按人的临床剂量 $\times 6.3$ ^[8], 给药期间, 每 3 天称一次体重以调整给药剂量。各组均干预 12 周。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 心肌酶、氧化应激指标及组织铁 各组大鼠最后一次给药后禁食 12 h, 称重, 腹腔注射 20% 乌拉坦 (0.5 ml/100 g) 麻醉, 常规腹主动脉采血, 4 ℃、3000 r/min (离心半径为 8.5 cm) 离心 15 min, 吸取上层血清, -80 ℃保存, 按照相应试剂盒的说明书分别进行检测。心肌酶指标包括肌酸激酶 (CK)、肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、乳酸脱氢酶 (LDH), 氧化应激指标包括 MDA、GSH。

1.6.2 HE 染色观察大鼠心肌组织形态学 取血后, 各组大鼠采用随机数字表法选取 3 只仰卧位固定在手术台上, 剪开腹部皮肤直至剑突, 上行暴露胸腔, 剪下心脏, 放入提前预冷的生理盐水中清洗表面的血迹, 再用滤纸吸干, 一部分放入 4% 多聚甲醛溶液中固定, 另一部分切块后放入液氮中冷冻转移至 -80 ℃超低温冰箱。将固定在多聚甲醛中的心脏组织行石蜡切片, 厚度为 5 μ m, 经二甲苯脱蜡、酒精梯度脱水, 行 HE 染色、二甲苯透明、封片, 在光学显微镜下观察心肌细胞的形态变化并采集图像。

1.6.3 Western blot 法检测心肌组织中 Keap1、Nrf2、Gpx4、Acsl4 蛋白表达 各组取冷冻的心肌组织 100 mg 切碎, 加入裂解液和蛋白酶抑制剂混合, 用研磨机研磨至无絮状沉淀, 静置 30 min 后离心取上清, BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 加适量的蛋

白上样缓冲液,再通过电泳、电转、封闭、一抗过夜,二抗孵育 2 h、显影剂中浸泡,显影后用 Image Lab v4.0 软件采集图像并分析 Keap1、Nrf2、Gpx4、Acs14 蛋白条带的灰度值。

1.6.4 q-PCR 法检测心肌组织中 Keap1、Nrf2、Gpx4、Acs14 mRNA 表达 各组取 100 mg 心肌组织,根据 qPCR 试剂盒说明书进行提取组织的总 RNA、测定大鼠心肌组织 RNA 的浓度和纯度、逆转录、q-PCR 扩增等步骤。反应条件见说明书,以 GAPDH 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各组的基因相对表达水平,引物序列由福州塞维尔生物工程有限公司合成,Nrf2:上游 GACATCCTTTGGAG-GCAAGACAT,下游 TGGGAATGTGGGCAACCTG,产物长度 268 bp;Keap1:上游 GAGATATGAGC-CAGATCGAGACG,下游 GGTGTAATCATCCGC-CACTCAT,产物长度 183 bp;Gpx4:上游 GCC-GAGTGTGGTTTACGAATC,下游 ACGCAGCCGTTCTTATCAATG,产物长度 257 bp;Acs14:上游 TCAAGCATTCCTCCAAGTAGACC,下游 CAGCCG-TAGGTTAAAGCAGGAG,产物长度 236 bp;GAPDH:上游 CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG,下游 GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT,产物长度 138 bp。

1.6.5 免疫组化检测心肌组织 Nrf2、Gpx4 蛋白的阳性表达 将固定的大鼠心肌组织取出,经脱水、脱蜡后包埋成块,经切片、捞片、烘片、摊片等步骤制成厚度为 5 μm 的玻片,再经二甲苯脱蜡、不同梯度的酒精脱水,柠檬酸或 EDTA 修复、PBS 缓冲液冲洗、阻断性内源性过氧化物酶、一抗二抗孵育、DAB 显色、复染、流水返蓝及干燥等一系列步骤后封片,在电子显微镜下观察拍照并分析平均光密度。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析,所有数据均符合正态分布,用 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,各组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较方差齐时用 LSD 法,方差不齐时用 Games-Howell 法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清 MDA、GSH 表达和组织铁含量比较

表 1 示,与正常组比较,模型组血清 MDA 表达升高,GSH 表达和组织铁含量降低;与模型组相比,加味涤痰汤组血清中 MDA 表达降低,GSH 表达和组织铁含量升高 ($P<0.05$)。

表 1 各组大鼠血清 MDA、GSH 表达和组织铁含量比较
($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	MDA/ $\text{nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$	GSH/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	组织铁含量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{gprot}^{-1}$
正常组	6	9.50 $\pm$ 1.32	2811.15 $\pm$ 96.23	19.48 $\pm$ 2.84
模型组	6	12.55 $\pm$ 1.33 ^{a)}	2400.00 $\pm$ 166.90 ^{a)}	10.20 $\pm$ 1.90 ^{a)}
加味涤痰汤组	6	5.38 $\pm$ 0.65 ^{b)}	2788.68 $\pm$ 207.17 ^{b)}	24.81 $\pm$ 4.42 ^{b)}

注:MDA,丙二醛;GSH,谷胱甘肽。

a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

2.2 各组大鼠血清心肌酶检测结果比较

每组大鼠取血成功各 6 只,故结果仅统计 6 只大鼠数据。表 2 示,与正常组比较,模型组血清 CK、CK-MB、LDH 水平升高 ($P<0.05$);与模型组比较,加味涤痰汤组大鼠心肌酶 CK、CK-MB、LDH 水平降低 ($P<0.05$)。

2.3 各组大鼠心肌组织 HE 染色结果

HE 染色结果显示,正常组大鼠的心肌细胞排列整齐,形态规则,胞质和胞核染色均匀;模型组大鼠心肌损伤明显,心肌组织内滋养血管大量充血,并且出现淋巴细胞浸润,还可见心肌细胞轻微水肿;与模型组相比,加味涤痰汤组的上述病理形态有所改善,见图 1。

2.4 各组大鼠心肌组织 Keap、Nrf2、Gpx4、Acs14 蛋白 Western Blot 检测结果比较

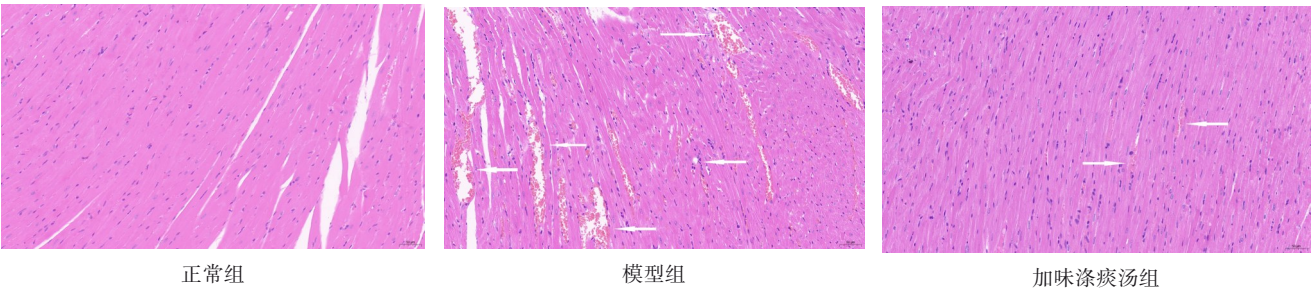
表 3 示,与正常组比较,模型组大鼠心肌组织 Keap1、Acs14 蛋白表达增加,Nrf2、Gpx4 蛋白表达减少 ($P<0.05$);与模型组比较,加味涤痰汤组大鼠心肌组织 Keap1、Acs14 蛋白表达减少,Nrf2、Gpx4 蛋白表达增加 ($P<0.05$)。各组大鼠心肌组织 Keap、Nrf2、Gpx4、Acs14 蛋白电泳图见图 2。

表 2 各组大鼠血清心肌酶检测结果比较
($\text{U}\cdot\text{L}^{-1},\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	CK	CK-MB	LDH
正常组	6	408.00 $\pm$ 170.22	355.47 $\pm$ 66.94	370.47 $\pm$ 95.42
模型组	6	1361.50 $\pm$ 494.87 ^{a)}	747.08 $\pm$ 162.16 ^{a)}	703.92 $\pm$ 144.98 ^{a)}
加味涤痰汤组	6	494.67 $\pm$ 63.24 ^{b)}	412.43 $\pm$ 101.89 ^{b)}	338.40 $\pm$ 70.79 ^{b)}

注:CK,肌酸激酶;CK-MB,肌酸激酶同工酶;LDH,乳酸脱氢酶。

a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$ 。



注：箭头所示为损伤的心肌细胞。

图 1 各组大鼠心肌组织 HE 染色结果 (×200)

表 3 各组大鼠心肌组织 Keap1、Nrf2、Gpx4、Acs14 蛋白 Western Blot 检测结果比较 (灰度值, $\bar{x}\pm s$)					
组别	鼠数	Keap1	Nrf2	Gpx4	Acs14
正常组	3	1.02±0.03	0.99±0.04	1.25±0.11	0.77±0.22
模型组	3	3.37±1.38 ^{a)}	0.42±0.11 ^{a)}	0.35±0.23 ^{a)}	1.57±0.26 ^{a)}
加味涤痰汤组	3	1.07±0.36 ^{b)}	0.72±0.17 ^{b)}	0.86±0.33 ^{b)}	0.90±0.32 ^{b)}

注：Keap1, kelch 样 ECH 关联蛋白 1; Nrf2, 核红系转录因子 2; Gpx4, 谷胱甘肽过氧化物酶 4; Acs14, 酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4。
a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

2.5 各组大鼠心肌组织 Keap1、Nrf2、Gpx4、Acs14 mRNA 表达比较

表 4 示, 与正常组比较, 模型组大鼠心肌组织 Keap1、Acs14 mRNA 水平升高, Nrf2、Gpx4 mRNA 水平降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 加味涤痰汤组大鼠心肌组织 Keap1、Acs14 mRNA 水平降低, Nrf2、Gpx4 mRNA 水平升高 ($P<0.05$)。

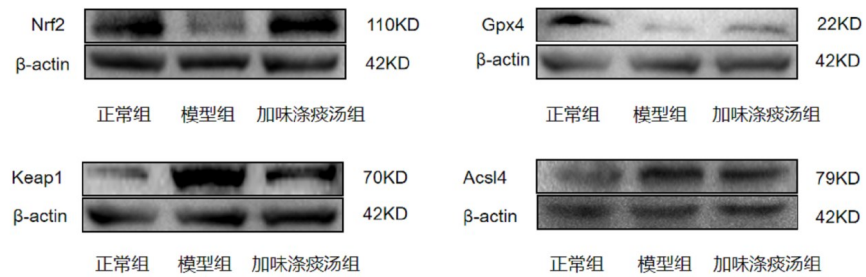
2.6 各组大鼠心肌组织 Nrf2、Gpx4 蛋白免疫组化结果比较

图 3 示, Nrf2 主要表达在心肌组织细胞核中。与

正常组比较, 模型组 Nrf2 阳性表达减少; 与模型组比较, 加味涤痰汤组 Nrf2 阳性表达增加。

图 4 示, Gpx4 主要表达在心肌组织的胞质中, 与正常组比较, 模型组 Gpx4 的阳性表达减少; 与模型组比较, 加味涤痰汤组 Gpx4 的阳性表达增加。

表 5 示, 与正常组比较, 模型组大鼠心肌组织 Nrf2、Gpx4 的平均光密度减少 ($P<0.05$); 与模型组比较, 加味涤痰汤组大鼠心肌组织 Nrf2、Gpx4 的平均光密度增加 ($P<0.05$)。

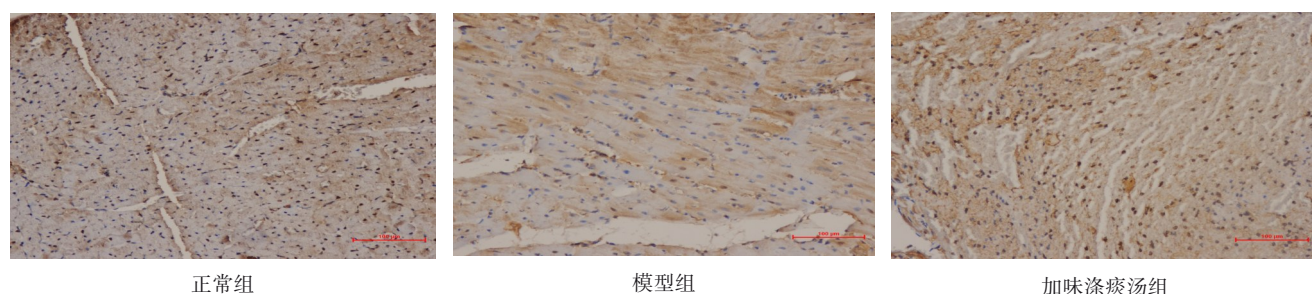


注：Keap1, kelch 样 ECH 关联蛋白 1; Nrf2, 核红系转录因子 2; Gpx4, 谷胱甘肽过氧化物酶 4; Acs14, 酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4。

图 2 各组大鼠心肌组织 Keap1、Nrf2、Gpx4、Acs14 蛋白电泳图

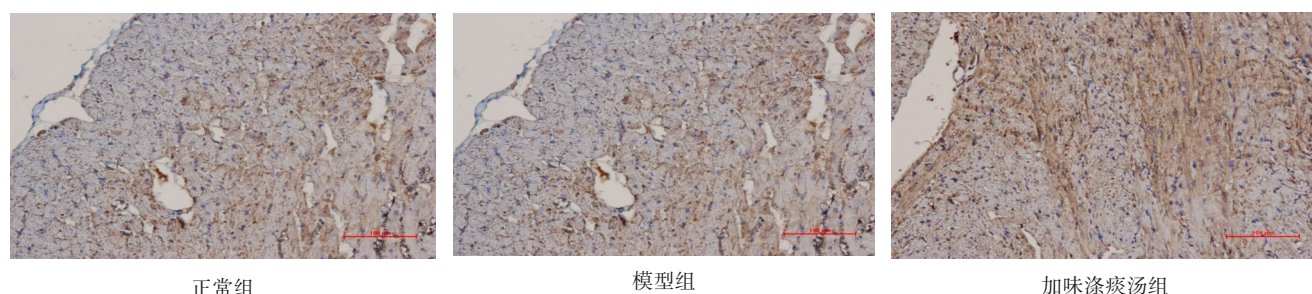
表 4 各组大鼠心肌组织 Keap1、Nrf2、Gpx4、Acs14 mRNA 相对表达水平 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$, $\bar{x}\pm s$)					
组别	鼠数	Keap1	Nrf2	Gpx4	Acs14
正常组	3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	3	1.61±0.26 ^{a)}	0.66±0.12 ^{a)}	0.58±0.04 ^{a)}	2.39±0.4 ^{a)}
加味涤痰汤组	3	0.87±0.84 ^{b)}	1.00±0.11 ^{b)}	1.23±0.13 ^{b)}	0.85±0.39 ^{b)}

注：Keap1, kelch 样 ECH 关联蛋白 1; Nrf2, 核红系转录因子 2; Gpx4, 谷胱甘肽过氧化物酶 4; Acs14, 酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4。
a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$ 。



注：Nrf2，核红系转录因子2。

图3 各组大鼠心肌组织 Nrf2 免疫组化染色结果 (×200)



注：Gpx4，谷胱甘肽过氧化物酶4。

图4 各组大鼠心肌组织 Gpx4 免疫组化染色结果 (×200)

表5 各组大鼠心肌组织 Nrf2、Gpx4 蛋白免疫组化结果比较 (平均光密度, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Nrf2	Gpx4
正常组	3	0.42±0.04	0.42±0.05
模型组	3	0.27±0.02 ^{a)}	0.21±0.05 ^{a)}
加味涤痰汤组	3	0.34±0.02 ^{b)}	0.38±0.04 ^{b)}

注：Nrf2，核红系转录因子2；Gpx4，谷胱甘肽过氧化物酶4。

a) 与正常组比较， $P < 0.05$ ；b) 与模型组比较， $P < 0.05$ 。

3 讨论

根据 OSA 临床表现可归属于中医学“鼾症”“鼾眠”范畴，如《诸病源候论》曰：“鼾眠者，眼里咽喉间有声也。其有肥人眠作声者，人喉咙气上下也”。OSA 引起的心肌损伤则属于中医学“胸痹”“心痛”范畴，OSA 后期，肺、脾、肾三脏功能失调，气虚血耗，无力行血而致心血瘀滞，心失所养，痰湿凝聚，使得气虚、痰凝、血瘀三者共同为病，所以气虚痰凝血瘀是 OSA 心肌损伤的主要病机。加味涤痰汤中以黄芪、党参为君，黄芪升补阳气，补肺健脾，使气旺血行，瘀去络通；党参补肺健脾以固本，补脾养胃，润肺生津，两者共为君药，双补肺脾。茯苓健脾渗湿，宁心安神，可助中焦之清气上升；黄芪、党参、茯苓三药合用，益气健脾，顾护后天之本，杜绝生痰之源；胆南星清热化痰；陈皮理气化痰，使气顺则痰降，法半夏燥湿化痰，善于散结，陈皮善于理气，二者合用可增强

化痰散结之功，四药皆为臣药。佐以石菖蒲涤痰化湿兼能醒神开窍；当归活血化瘀而不伤血；川芎为血中之气药，上能通清窍，下能行血海，走而不守，助当归活血祛瘀。甘草调和全方药性，为使药。全方配伍共奏益气、化痰、祛瘀、开窍之功效。

氧化应激是体内氧化体系失衡，氧自由基的产生大于清除，从而导致活性氧和活性氮等大量氧化中间产物在体内或细胞内蓄积而引起的氧化损伤过程^[9]。OSA 患者在睡眠过程中反复发生上气道阻塞，机体处于慢性间歇低氧状态，引发氧化应激反应并导致 MDA 等一系列氧化产物在体内蓄积，从而引起机体心血管系统及其他各种脏器结构和功能的损害^[10]。而夜间慢性间歇性低氧激发的氧化应激反应被认为是 OSA 造成心血管损害等并发症的主要病理机制之一^[11]。夜间慢性间歇性低氧通过诱导氧化应激反应，使心肌细胞的内质网钙离子失稳，导致间质胶原蛋白增多，心肌细胞肥大，增加左室心肌细胞外基质的硬度及心肌纤维化，从而导致心血管疾病的发生^[12]。本研究 HE 染色结果显示，与正常组大鼠相比，模型组大鼠的心肌组织病理损伤明显，心肌内滋养血管大量充血，淋巴细胞浸润，还可见心肌细胞水肿，心肌酶 CK、CK-MB、LDH 水平明显上升，血清中 MDA 明显升高；而加味涤痰汤组与模型组相比，则明显改善了上述病理损伤，并且各指标均改善，提示加味涤痰汤可能通

过改善大鼠体内氧化应激的水平而发挥改善心肌损伤的作用。

铁死亡是近年来发现的一种全新的细胞死亡方式，具有独特的生物化学表现，即 GSH 减少，Gpx4 活性下降，组织铁和脂质过氧化产物超量蓄积^[13-14]。铁离子水平越高，脂质过氧化反应越强烈，细胞损伤即铁死亡越严重^[15]。Gpx4 能将细胞内的 GSH 转化为氧化型谷胱甘肽，减轻细胞内脂质的毒性^[16]，所以 Gpx4 的失活会直接导致铁死亡的发生。另外，抑制 Gpx4 会使 Acs14 的表达增加^[17]。Acs14 是脂肪酸分解代谢第一步反应的关键酶，能参与合成细胞膜的组成成分，从而减轻铁死亡过程中大量脂质过氧化物堆积造成的细胞损伤^[18]。因此，目前普遍把 Gpx4 的失活和 Acs14 的升高当作评估体内铁死亡发生的重要标志。Keap1-Nrf2 信号通路作为抗氧化应激的核心通路之一，与铁死亡的关系十分密切^[19]。Nrf2 不仅是抗氧化反应的调节剂，而且也是促铁死亡发生的调节剂^[20]。在细胞正常状态下，Nrf2 与上游 Keap1 特异性结合于细胞质中，此时 Nrf2 的活性受到抑制，细胞处于稳定状态；但当细胞遭受缺血或缺氧等刺激时，上游的 p62 通过使 Keap1 失活，Nrf2 降解减少，促进其激活并进入胞核内，入核的 Nrf2 与 Maf 蛋白等形成二聚体，并与抗氧化反应元件结合，激活下游调节铁和活性氧 ROS 代谢相关基因的表达，从而影响铁死亡^[21]。本研究结果显示，与正常组相比，模型组大鼠心脏组织中铁含量明显降低，GSH 含量减少，Nrf2、Gpx4 蛋白及 mRNA 表达显著降低，Keap1、Acs14 蛋白及 mRNA 表达显著增多；与模型组相比，加味涤痰汤组心肌组织上述各指标均改善，表明慢性间歇低氧可能导致大鼠心脏发生了铁死亡，并且加味涤痰汤可以抑制铁死亡的发生。

综上所述，加味涤痰汤能有效改善慢性间歇性低氧过程中氧化应激对大鼠心脏造成的损伤，其机制可能是通过影响 Keap1-Nrf2 通路介导的铁死亡而发挥作用。但本实验未在体外实验上验证且没有设置阳性对照组等，有待后续实验进一步改进。

参考文献

- [1] PATEL SR. Obstructive sleep apnea[J]. Ann Intern Med, 2019, 171(11): ITC81-ITC96.
- [2] BENJAFIELD AV, AYAS NT, EASTWOOD PR, et al. Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis[J]. Lancet Respir Med, 2019, 7(8): 687-698.

- [3] VELDHUISEN SLVAN, HAZEBOEK EJ. Obstructive sleep apnea in adults[J]. N Engl J Med, 2019, 381(3): e7.
- [4] SANTER P, EIKERMANN M. Unrecognized obstructive sleep apnea in patients undergoing surgery [J]. JAMA, 2019, 322(12): 1211.
- [5] MARTINEZ-GARCIA MA, CAMPOS-RODRIGUEZ F, BARBÉ F, et al. Precision medicine in obstructive sleep apnea[J]. Lancet Respir Med, 2019, 7(5): 456-464.
- [6] 陈沁, 林劲榕, 洪旭初, 等. 加味涤痰汤对老年阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者氧化应激和炎症反应的干预作用[J]. 中华老年医学杂志, 2015, 34(7): 715-719.
- [7] CAI XH, LI XC, JIN SW, et al. Endoplasmic reticulum stress plays critical role in brain damage after chronic intermittent hypoxia in growing rats [J]. Exp Neurol, 2014, 257: 148-156. doi: 10. 1016/j. expneurol. 2014. 04. 029.
- [8] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [9] 蔡姗姗, 周燕. OSAHS 与氧化应激及其相关并发症的最新研究进展[J]. 临床医学工程, 2012, 19(10): 1860-1862.
- [10] 薛欣欣, 周燕. OSAHS 与氧化应激的研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2014, 19(4): 728-730.
- [11] 文慧兰, 况九龙. 重叠综合征与炎症、心血管疾病关系的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(8): 2033-2035.
- [12] YEUNG HM, HUNG MW, LAU CF, et al. Cardioprotective effects of melatonin against myocardial injuries induced by chronic intermittent hypoxia in rats [J]. J Pineal Res, 2015, 58(1): 12-25.
- [13] XIE Y, HOU W, SONG X, et al. Ferroptosis: process and function [J]. Cell Death Differ, 2016, 23(3): 369-379.
- [14] 梅胜兰, 夏中元, 孟庆涛, 等. 细胞铁死亡发生机制的研究进展[J]. 医学综述, 2020, 26(21): 4207-4211.
- [15] GALLUZZI L, VITALE I, AARONSON SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 [J]. Cell Death Differ, 2018, 25(3): 486-541.
- [16] DOLL S, PRONETH B, TYURINA YY, et al. ACSL4 ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid [J]. Nat Chem Biol, 2017, 13: 91-98. doi: 10. 1038/NCHEMBIO. 2239.
- [17] SHIMBARA-MATSUBAYASHI S, KUWATA H,

- TANAKA N, et al. Analysis on the substrate specificity of recombinant human Acyl-CoA synthetase ACSL4 variants [J]. Biol Pharm Bull, 2019, 42(5):850-855.
- [18] DOLL S, PRONETH B, TYURINA YY, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition[J]. Nat Chem Biol, 2017, 13(1):91-98.
- [19] SUN X, OU Z, CHEN R, et al. Activation of the p62-Keap1-NRF2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells[J]. Hepatology. 2016, 63(1): 173-184.
- [20] DODSON M, CASTRO-PORTUGUEZ R, ZHANG DD. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis[J]. Redox Biol, 2019, 23:101-107. doi: 10.1016/j.redox.2019.101107.
- [21] FIZAZI K, SCHER HI, MOLINA A, et al. Abiraterone acetate for treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: final overall survival analysis of the COU-AA-301 randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study [J]. Lancet Oncol, 2012, 13(10):983-992.

Effects of *Modified Ditan Decoction* (加味涤痰汤) on Myocardial Tissue Injury and Keap1-Nrf2 Signaling Pathway in Chronic Intermittent Hypoxia Model Rats

LIAO Ran, CHEN Qin, WANG Feng, LIU Dan, LI Jingyi, XU Fengsheng, WANG Yijin, ZHENG Haiyin, CHEN Lili, WU Runhua

School of Integrated Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350122

ABSTRACT Objective To investigate the effect of *Modified Ditan Decoction* (加味涤痰汤, MDD) on myocardial injury in chronic intermittent hypoxia model rats, and to explore the possible mechanism. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into normal group, model group, and MDD group, with 10 rats in each group. The rats in the model group and the MDD group were placed in a hypoxic chamber to establish a chronic intermittent hypoxia model. The rats in the MDD group was given 14.8 g/(kg·d) MDD by gavage 30 minutes before they entered the hypoxic chamber each day, while those in the normal group and the model group were given the same dose of normal saline by gavage, for 12 weeks. The serum myocardial enzyme indicators including creatine kinase (CK), CK myocardial band (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH), oxidative stress indicators including malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) as well as iron content in the tissue were measured. The protein and mRNA expressions of kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), nuclear erythroid transcription factor 2 (Nrf2), glutathione peroxidase 4 (Gpx4), and Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (Acsl4) in the myocardial tissue were detected, and HE staining was used to observe the morphology of cardiomyocytes. **Results** Compared to those in the normal group, the serum CK, CK-MB, LDH, and MDA levels were significantly increased in the model group, and the GSH expression and iron content were significantly reduced; additionally, the protein and mRNA expressions of Keap1 and Acsl4 in myocardial tissue were increased, while those of Nrf2 and Gpx4 were reduced ($P < 0.05$). HE staining showed that in the model group, there were congested blood vessels in the myocardial tissue, infiltrated lymphocytes, and slightly swollen myocardial cells. Compared to those in the model group, the serum CK, CK-MB, LDH, and MDA levels significantly decreased in the MDD group, and GSH expression and tissue iron content were significantly increased; the protein and mRNA expressions of Keap1 and Acsl4 in myocardial tissue decreased, while those of Nrf2 and Gpx4 increased ($P < 0.05$). HE staining showed that the pathological morphology of cardiomyocytes was improved in the MDD group. **Conclusion** MDD can significantly improve the cardiac injury induced by oxidative stress in rats with chronic intermittent hypoxia, and its mechanism may be related to the inhibition of ferroptosis mediated by the Keap1-Nrf2 pathway.

Keywords obstructive sleep apnea; chronic intermittent hypoxia; *Modified Ditan Decoction* (加味涤痰汤); myocardial injury; oxidative stress; ferroptosis; Keap1-Nrf2 pathway

(收稿日期: 2021-11-02; 修回日期: 2021-12-08)

[编辑: 邓媛]