

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.10.012

乌头赤石脂丸方对急性心肌梗死后心肌肥厚模型大鼠心肌组织氧化应激及 Keap1/Nrf2/HO-1/NQO-1 通路的影响

王鑫赫, 史晓梅, 肖钰雪, 王松, 谢璐璐, 郭军鹏, 刘宏岩✉

长春中医药大学, 吉林省长春市南关区净月街道博硕路 1035 号, 130117

[摘要] **目的** 探讨乌头赤石脂丸方治疗急性心肌梗死后心肌肥厚的可能作用机制。**方法** 将 40 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、培哚普利叔丁胺组和乌头赤石脂丸组, 每组 10 只。除正常组外, 其余 3 组通过结扎左冠状动脉前降支制备急性心肌梗死, 术后各组大鼠正常饲养 28 天后建立心肌梗死后心肌肥厚模型。造模成功后培哚普利叔丁胺组给予培哚普利叔丁胺片 0.4 mg/(kg·d) 灌胃, 乌头赤石脂丸组给予乌头赤石脂丸药液 4.9 g/(kg·d) 灌胃, 正常组和模型组给予 6.67 ml/(kg·d) 生理盐水灌胃, 均干预 28 天。观察各组大鼠心肌肥厚指数 (包括心脏质量指数和左心室质量指数); HE 染色、Masson 染色法观察心肌细胞病理学变化; 检测血清中心房钠尿肽 (ANP)、血管紧张素 II (Ang II)、醛固酮 (ALD) 和羟脯氨酸 (HYP) 含量, 心肌组织中超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 和活性氧 (ROS) 水平, 检测心肌组织中 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 (Keap1)、核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、血红素氧合酶-1 (HO-1)、醌氧化还原酶-1 (NQO-1)、B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 蛋白表达水平。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠心脏质量指数和左心室质量指数显著升高 ($P<0.01$), 病理结果显示心肌细胞横截面积变大, 心肌纤维紊乱, 心肌组织周围胶原纤维断裂、紊乱; 血清 ANP、Ang II、ALD、HYP 含量均显著升高, 心肌组织中 MDA、ROS 水平及 Keap1、Bax 蛋白表达升高, SOD 活性及 Nrf2、HO-1、NQO-1、Bcl-2 蛋白表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 乌头赤石脂丸组和培哚普利叔丁胺组大鼠心脏质量指数和左心室质量指数降低 ($P<0.01$), 心肌病理损伤改善, 心肌细胞横截面积明显减小, 血清中 Ang II、ALD、ANP、HYP 含量及心肌组织 MDA、ROS 水平及 Keap1、Bax 蛋白表达显著降低, SOD 活性及 Nrf2、HO-1、NQO-1、Bcl-2 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。乌头赤石脂丸组在降低心脏质量指数和左心室质量指数、心肌细胞横截面积、ROS 水平方面优于培哚普利叔丁胺组 ($P<0.05$)。**结论** 乌头赤石脂丸方能够减轻急性心肌梗死后心室肥厚模型大鼠心肌组织氧化应激损伤和心肌细胞凋亡, 降低心肌纤维化程度, 从而抑制心肌肥厚的程度, 其作用机制可能与激活 Keap1/Nrf2/HO-1/NQO-1 信号通路有关。

[关键词] 急性心肌梗死; 心肌肥厚; 乌头赤石脂丸; 氧化应激; 细胞凋亡; Keap1/Nrf2/HO-1/NQO-1 信号通路

《中国心血管健康与疾病报告 2020》指出, 急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 后心力衰竭的发病率呈上升趋势^[1]。AMI 发生后, 心脏出现代偿性肥厚, 导致心功能衰退或丧失。目前心肌肥厚所致的心力衰竭发病率和病死率在药物干预后仍居高不下, 心肌肥厚已被列为引起心血管疾病发病和死亡的独立危险因素^[2]。既往研究提示,

心肌肥厚与血流动力负荷增加、氧化应激反应、交感神经-肾上腺素系统、肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAS) 以及利钠肽、一氧化氮等神经体液因子表达异常有关^[3]。乌头赤石脂丸是《金匮要略》中治疗胸痹心痛的经典方剂, 临床研究^[4-5]发现, 乌头赤石脂丸可以保护心功能, 降低心肌氧化应激损伤, 提高机体对自由基的清除能力, 抑制心肌重构, 减轻心肌细胞损伤, 提高心肌收缩力。课题组前期研究表明, 乌头赤石脂丸方可以在 AMI 早

基金项目: 吉林省科技厅科技发展计划项目 (20170101007JC)

✉ 通讯作者: hong.yancc@163.com

期上调 B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 和下调 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 减轻心肌损伤程度, 减少梗死面积, 降低炎症因子^[6], 改善 AMI 后心力衰竭大鼠的心功能, 延缓心室重构的发生^[7-8]。

AMI 发生后, 机体发生氧化应激反应, 导致氧化与抗氧化系统失衡, 心肌耗氧量增加, 容量负荷过重, 造成细胞的广泛性损伤和死亡^[9]。Kelch 样环氧丙烷相关蛋白 1 (Keap1) /核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 是氧化还原反应的内源性抗氧化防御模块, 协调细胞保护基因的表达以维持稳态。在氧化应激的状态下, Nrf2 与 Keap1 解离, Nrf2 进入细胞核, 上调下游超氧化物歧化酶 (SOD) 的表达, 发挥抗氧化作用, 并激活内源性抗氧化剂血红素氧合酶 1 (HO-1)、醌氧化还原酶 1 (NQO-1), 进而降低氧化应激对心肌细胞的损伤^[10]。本研究在前期研究的基础上, 从 Keap1/Nrf2/HO-1/NQO-1 通路及细胞凋亡角度探究乌头赤石脂丸方对 AMI 后心肌肥厚的影响及可能作用机制。本实验经长春中医药大学实验动物伦理委员会审核通过 (批准编号: 2022632)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只, 6~8 周龄, 体质量 260~300 g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 实验动物许可证号 SCXK (辽) 2020-0001。饲养于长春中医药大学实验动物中心 SPF 级实验室, 温度 21~25 ℃, 相对湿度 42%~70%, 12 h 昼夜交替。

1.2 药物及制备

乌头赤石脂丸方组成: 乌头 5 g、炮附片 5 g、蜀椒 10 g、干姜 5 g、赤石脂 10 g, 以上药物均购自长春中医药大学附属第三临床医院, 制备浓度为含生药 0.72 g/ml 的水煎液。培哚普利叔丁胺片 (施维雅天津制药有限公司, 批号 H20034053) 配制浓度为 0.06 mg/ml。

1.3 主要试剂与仪器

水合氯醛 (批号 20210107), 福晨化学试剂有限公司; 血管紧张素 II (Ang II, 批号: HY-10059)、醛固酮 (ALD, 批号: HY-10061)、羟脯氨酸 (HYP, 批号: HY-60031)、心房钠尿肽 (ANP, 批号: HY-10046)、SOD (批号: HY-M0001)、丙二醛 (MDA, 批号: HY-M0003)、活性氧 (ROS, 批号: HY-M0087) 试剂盒, 北京华英生物技术研究; 4% 多聚甲醛 (批号: BL539A), Biosharp 公

司; HE 染色液 (批号: G1120)、Masson 三色染色试剂盒 (批号: G1340), 北京索莱宝科技有限公司; RIPA 裂解液 (货号: P0013B)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号: P0011), Beyotime 公司; GAPDH (批号: 60004-1-Ig)、Keap1 抗体 (批号: 60027-1-Ig)、Nrf2 抗体 (批号: 16396-1-AP)、HO-1 抗体 (批号: 10701-1-AP)、NQO-1 抗体 (批号: 67420-1-Ig)、Bcl-2 抗体 (批号: 12789-1-AP)、Bax (批号: 50599-2-Ig)、二抗羊抗鼠 IgG-HRP (批号: SA00001-1)、二抗羊抗兔 IgG-HRP (批号: SA00001-2), 美国 Proteintech 公司; 超敏 ECL 化学发光检测试剂盒 (批号: B500024), 武汉三鹰生物技术有限公司。

HX-100E 型小动物呼吸机、BL-420S 型生物机能实验系统, 成都泰盟科技有限公司; JJ124BC 型电子天平, 常熟市双杰测试仪器厂; DR-200BS 型酶标分析仪, 无锡华卫德朗仪器有限公司; Pantherai 型生物显微镜, 麦克奥迪实业有限公司; VE-186 转移型、VE-180 垂直型电泳仪, 上海天能科技有限公司; JY-MINI610 型智能化学发光成像系统, 广州光仪生物科技有限公司。

1.4 动物分组、模型建立与给药

大鼠常规饲养 1 周, 采用随机数字表法抽取 10 只作为正常组, 其余 30 只参照文献^[11]制备 AMI 大鼠模型。禁食不禁水 12 h 后用 10% 水合氯醛 3.3 ml/kg 腹腔注射麻醉, 将完全麻醉的大鼠仰卧固定, 并将四肢连接心电图导联以便动态观察, 连接呼吸机后进行气管插管, 待呼吸与心电稳定后, 备皮、消毒手术区, 沿胸骨左缘纵向切开第三、四肋间皮肤, 依次沿肌肉走向剥离皮下肌肉, 顺肋间将心脏挤出。用 6-0 带线缝合针结扎大鼠心脏冠状动脉左前降支, 结扎后心脏复位, 挤出空气, 关胸缝合。以心电图 ST 段出现弓背向上抬高为 AMI 造模成功^[11]。造模过程中 6 只大鼠死亡, 可能与术后出血有关, 最终造模成功 24 只大鼠, 正常组无死亡。造模大鼠不进行其他干预, 28 天后大鼠心肌肥厚指数增加, 心肌组织病理形态学显示心肌细胞横截面积增大、心肌纤维化程度和心肌肥厚标志物 ANP 显著升高等提示心肌肥厚模型造模成功^[12]。将造模成功的 24 只大鼠采用随机数字表法分为模型组、培哚普利叔丁胺组和乌头赤石脂丸组, 每组 8 只。造模成功后, 依据《药理学实验方法学》^[13]中人与大鼠体表面积换算方法, 得出各组大鼠的临床等效剂

量, 正常组和模型组大鼠给予 6.67 ml/(kg·d) 生理盐水灌胃, 培哌普利叔丁胺组给予培哌普利叔丁胺片 0.4 mg/(kg·d) 灌胃, 乌头赤石脂丸组给予乌头赤石脂丸药液 4.9 g/(kg·d) 灌胃。各组均每日灌胃 1 次, 共 28 天。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 酶联免疫法测定血清 ANP、Ang II、ALD、HYP 水平和心肌组织 SOD、MDA、ROS 水平 各组大鼠最后一次灌胃结束后, 禁食不禁水 24 h, 予 10% 水合氯醛 (0.3 ml/100 g) 腹腔注射麻醉, 将大鼠仰卧固定于鼠板上, 行腹主动脉取血后, 静置 30 min, 于 4℃、3500 r/min 离心 15 min (离心半径 5.5 mm), 取上清液, 按试剂盒说明测定 ANP、Ang II、ALD、HYP 水平。将心肌组织制备成匀浆标本, 按试剂盒说明测定心肌组织中 SOD 活性及 MDA、ROS 水平。

1.5.2 心肌肥厚指数测定 各组大鼠麻醉后称取大鼠体质量, 取血开胸取出心脏, 用生理盐水冲洗心脏组织并用滤纸吸干水分, 获取全心质量, 垂直左心室长轴将左心室切开, 称取左心室质量, 计算心脏质量指数 (全心质量/体质量) 和左心室质量指数 (左心室质量/体质量)。

1.5.3 HE、Masson 染色法观察梗死边缘区心肌组织病理学变化 大鼠整个心脏组织经 4% 多聚甲醛固定脱水、石蜡包埋并切片, 按照 HE 染色和 Masson 染色试剂盒说明书操作。封片后显微镜观察各组大鼠心肌组织病理学变化、心脏组织的纤维化程度, 通过 Image J 1.52 分析各组大鼠心肌细胞横截面积。

1.5.4 Western blot 法检测心肌组织 Keap1、Nrf2、HO-1、NQO-1、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平 取心肌组织 30 mg 于液氮中速冻 2 min 后取出, 加入裂解液 1 ml 进行研磨, BCA 法测定蛋白浓度并将各组浓度调平, 蛋白样品经凝胶电泳后转移至 PVDF 膜,

封闭, 加入一抗 Keap1 (1:2000)、Nrf2 (1:1000)、HO-1 (1:1000)、NQO-1 (1:5000)、Bcl-2 (1:2000)、Bax (1:5000), 4℃ 孵育过夜, 二抗 (1:5000) 室温孵育 1 h, ECL 化学发光法显影, 采用 Image J 1.52 软件进行蛋白条带分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 数据均符合正态分布, 用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 方差齐性多组比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法, 方差不齐多组比较采用 Kruskal-Wallis H 检验, 两两比较采用 Dunnett's t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心肌肥厚指数比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组大鼠心脏质量指数和左心室质量指数显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 乌头赤石脂丸组和培哌普利叔丁胺组心脏质量指数和左心室质量指数显著降低 ($P < 0.01$), 且乌头赤石脂丸方组低于培哌普利叔丁胺组 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠心脏质量指数和左心室质量指数比较

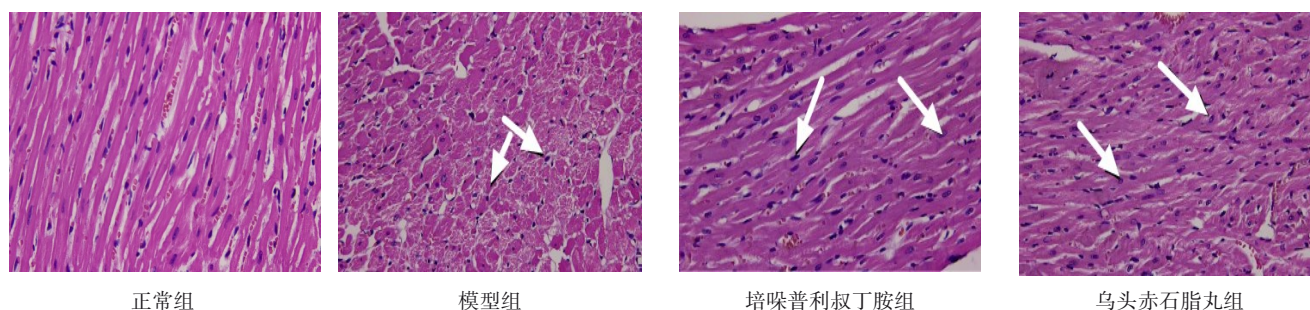
Table 1 Comparison of heart mass index and left ventricular mass index of rats in each group (mg/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	心脏质量指数	左心室质量指数
正常组	10	2.49±0.06	0.71±0.06
模型组	8	3.55±0.05 ^{a)}	1.32±0.02 ^{a)}
培哌普利叔丁胺组	8	3.02±0.13 ^{b)}	1.02±0.08 ^{b)}
乌头赤石脂丸组	8	2.81±0.12 ^{b) c)}	0.89±0.03 ^{b) c)}

注: a) 与正常组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.01$; c) 与培哌普利叔丁胺组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠梗死边缘区心肌形态结构比较

图 1 示, 正常组可见心肌细胞边缘清晰, 分布



正常组

模型组

培哌普利叔丁胺组

乌头赤石脂丸组

注: 图中白色箭头指示为细胞核。

图 1 各组大鼠心肌形态结构比较 (HE 染色, ×40)

Figure 1 Comparison of myocardial morphology of rats in each group (HE, ×40)

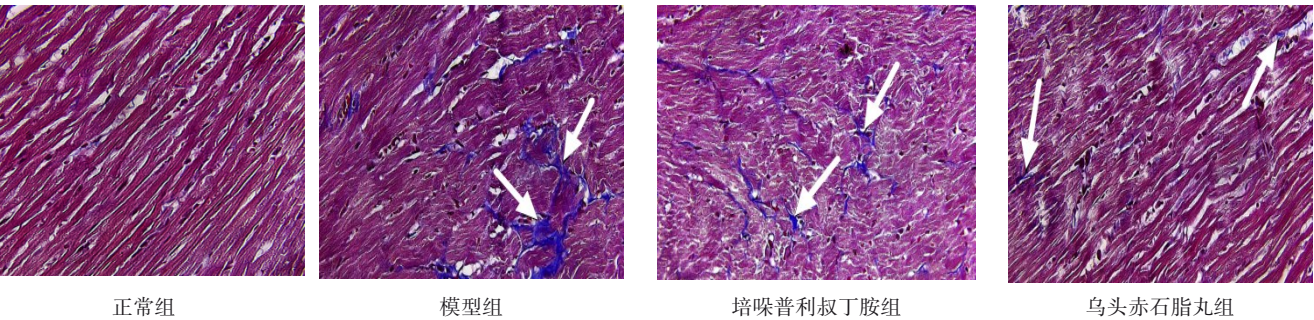
均匀，细胞核大小正常，肌纤维规则排列，纹理整齐。模型组心肌细胞间隙增宽，横截面积增大，胶原纤维增粗，细胞核呈分支状，部分核消失、溶解，大部分细胞肿胀、间质增生、炎症浸润。乌头赤石脂丸方组及培哌普利叔丁胺组比模型组的心肌细胞结构规整，纤维增生减少，细胞肿胀、坏死及炎症浸润减少，尤以乌头赤石脂丸方组形态学减轻明显。

表 2 示，模型组大鼠心肌细胞横截面积比正常组显著增大 ($P<0.01$)。与模型组比较，培哌普利叔丁胺组和乌头赤石脂丸组大鼠心肌细胞横截面积明显减小 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，且乌头赤石脂丸组大鼠心肌细胞横截面积减小较培哌普利叔丁胺组明显 ($P<0.05$)。

表 2 各组大鼠心肌细胞横截面积比较
Table 2 Comparison of cross-sectional area of cardiomyocytes of rats in each group (μm^2 , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	横截面积
正常组	10	282.21±46.76
模型组	8	668.10±89.93 ^{a)}
培哌普利叔丁胺组	8	511.08±48.30 ^{a) b)}
乌头赤石脂丸组	8	409.45±84.95 ^{c) d)}

注：a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与培哌普利叔丁胺组比较， $P<0.05$ 。



注：图中白色箭头所指为胶原纤维沉积。

图 2 各组大鼠心肌纤维化程度比较 (Masson 染色，×400)
Figure 2 Comparison of myocardial fibrosis of rats in each group (Masson, ×400)

表 3 各组大鼠血清中 ANP、Ang II、ALD、HYP 水平比较
Table 3 Comparison of serum ANP, Ang II, ALD, and HYP levels of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	ANP/ng·ml ⁻¹	Ang II/pg·ml ⁻¹	ALD/pg·ml ⁻¹	HYP/μg·ml ⁻¹
正常组	10	0.23±0.01	75.16±1.16	45.41±3.86	9.55±0.49
模型组	8	0.37±0.04 ^{a)}	83.38±3.71 ^{a)}	88.39±5.72 ^{a)}	14.27±0.44 ^{a)}
培哌普利叔丁胺组	8	0.31±0.03 ^{b)}	76.96±1.16 ^{b)}	70.23±6.96 ^{c)}	11.89±0.87 ^{c)}
乌头赤石脂丸组	8	0.29±0.06 ^{c)}	77.65±2.34 ^{b)}	75.07±8.80 ^{b)}	11.02±0.79 ^{c)}

注：ANP，心房钠肽；Ang II，血管紧张素 II；ALD，醛固酮；HYP，羟脯氨酸。

a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

2.3 各组大鼠梗死边缘区心肌纤维化程度比较

图 2 示，正常组大鼠心肌细胞排列紧密规整，肌纤维束状排列，无胶原纤维沉积。模型组胶原纤维沉积显著增多，心肌细胞扭曲肥大，纤维断裂，间隙增宽，排列无序，间质增生严重。乌头赤石脂丸方组及培哌普利叔丁胺组比模型组的心肌胶原纤维增生减轻，蓝色的心肌纤维、胶原沉积明显减少，细胞排序整齐，心肌细胞间质增生、纤维断裂等病变减轻，以乌头赤石脂丸方减轻明显。

2.4 各组大鼠血清 ANP、Ang II、ALD、HYP 水平比较

表 3 示，与正常组相比，模型组血清中 ANP、Ang II、ALD、HYP 含量显著升高 ($P<0.01$)；与模型组相比，乌头赤石脂丸方组和培哌普利叔丁胺组血清中 ANP、Ang II、ALD、HYP 含量均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。乌头赤石脂丸方组和培哌普利叔丁胺组各指标比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.5 各组大鼠心肌组织 SOD、MDA、ROS 水平比较

表 4 示，与正常组相比，模型组心肌组织中 SOD 活性显著降低，MDA、ROS 水平显著升高 ($P<0.01$)；与模型组相比，乌头赤石脂丸方组和培哌普利叔丁胺组 SOD 活性均显著升高，MDA 和 ROS 水平均降低 ($P<0.01$)。乌头赤石脂丸组 ROS 水

表 4 各组大鼠心肌组织中 SOD、MDA、ROS 水平比较

Table 4 Comparison of SOD, MDA and ROS levels in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	SOD/U·ml ⁻¹	MDA/nmol·ml ⁻¹	ROS/荧光强度·ml ⁻¹
正常组	10	78.12±8.90	2.17±0.18	569.50±11.56
模型组	8	35.03±5.54 ^{a)}	4.85±0.51 ^{a)}	658.13±24.91 ^{a)}
培哚普利叔丁胺组	8	53.07±6.92 ^{b)}	3.43±0.60 ^{b)}	618.94±8.04 ^{b)}
乌头赤石脂丸组	8	60.32±7.88 ^{b)}	3.12±0.31 ^{b)}	589.21±15.60 ^{b)c)}

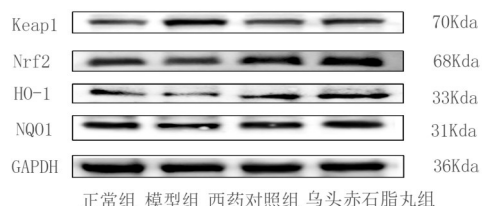
注：SOD，超氧化物歧化酶；MDA，丙二醛；ROS，活性氧。

a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与培哚普利叔丁胺组比较， $P<0.05$ 。

平降低优于培哚普利叔丁胺组 ($P<0.05$)。

2.6 各组大鼠心肌组织 Keap1、Nrf2、HO-1、NQO-1、Bcl-2、Bax 蛋白表达比较

表 5 示，与正常组比较，模型组 Keap1、Bax 蛋白表达显著升高，Nrf2、HO-1、NQO-1、Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较，乌头赤石脂丸方及培哚普利叔丁胺组 Keap1、Bax 蛋白表达均显著降低，Nrf2、HO-1、NQO-1、Bcl-2 蛋白表达均显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，而乌头赤石脂丸方及培哚普利叔丁胺组各指标比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各组大鼠心肌组织 Keap1、Nrf2、HO-1、NQO-1、Bcl-2、Bax 蛋白电泳图见图 3、图 4。



注：Keap1，Kelch 样环氧丙烷相关蛋白-1；Nrf2，核因子 E2 相关因子 2；HO-1，血红素氧合酶 1；NQO-1，醌氧化还原酶 1。

图 3 各组大鼠心肌组织 Keap1、Nrf2、HO-1 和 NQO-1 蛋白电泳图

Figure 3 Protein electrophoresis of Keap1, Nrf2, HO-1 and NQO-1 in myocardial tissue of rats in each group

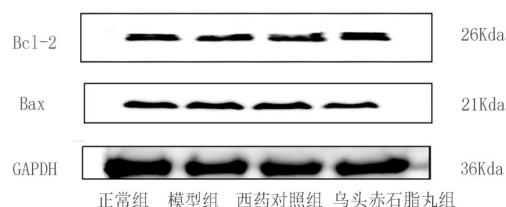
表 5 各组大鼠心肌组织 Keap1、Nrf2、HO-1、NQO-1、Bcl-2、Bax 蛋白表达比较

Table 5 Comparison of protein expression levels of Keap1, Nrf2, HO-1, NQO-1, Bcl-2, and Bax in myocardial tissue of rats in each group (/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Keap1	Nrf2	HO-1	NQO-1	Bcl-2	Bax
正常组	10	0.48±0.01	0.96±0.01	0.95±0.06	0.83±0.06	0.43±0.16	0.41±0.30
模型组	8	0.93±0.07 ^{a)}	0.83±0.04 ^{a)}	0.59±0.02 ^{a)}	0.76±0.03 ^{b)}	0.35±0.26 ^{b)}	0.58±0.31 ^{a)}
培哚普利叔丁胺组	8	0.56±0.03 ^{c)}	1.17±0.05 ^{c)}	0.98±0.03 ^{c)}	0.90±0.15 ^{c)}	0.41±0.15 ^{d)}	0.52±0.25 ^{d)}
乌头赤石脂丸组	8	0.65±0.03 ^{c)}	1.39±0.03 ^{c)}	1.16±0.04 ^{c)}	0.93±0.15 ^{c)}	0.52±0.21 ^{c)}	0.34±0.24 ^{c)}

注：Keap1，Kelch 样环氧丙烷相关蛋白-1；Nrf2，核因子 E2 相关因子 2；HO-1，血红素氧合酶-1；NQO-1，醌氧化还原酶-1；Bcl-2，B 细胞淋巴瘤-2；Bax，Bcl-2 相关 X 蛋白。

a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与正常组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与模型组比较， $P<0.05$ 。



注：Bcl-2，B 细胞淋巴瘤-2；Bax，Bcl-2 相关 X 蛋白。

图 4 各组大鼠心肌组织 Bcl-2、Bax 蛋白电泳图

Figure 4 Protein electrophoresis of Bcl-2 and Bax in myocardial tissue of rats in each group

3 讨论

根据 AMI 后心肌肥厚的临床症状，可将其归属为中医学“胸痹”“心悸”等范畴。《金匱要略》中指出胸痹的主要病机是“阳微阴弦”，阳微即阳脉极虚，上焦卫气虚衰，胸失温煦；阴弦即阴寒太盛，痰饮阻滞，水饮内停。乌头赤石脂丸方以大辛大热之品为主，驱寒止痛、化饮行血之力极强，辛味能行、能散，可以通阳气，行卫气，散寒滞，同时佐以赤石脂，取其固涩之性，收敛阳气又防辛热之品温散太过。诸药合用，具有温里散寒蠲饮的功效。既往研究发现，在 AMI 后 7 天即有心肌细胞拉长，心室质量的增加，在 28 天左右达到最大^[14-15]，故本实验采取 AMI 后常规饲养 28 天复制心肌肥厚模型，并经过预实验验证了模型的成功性。AMI 后非梗死区心肌细胞反应性增生和肥大，可使心脏质

量增加,故心肌肥厚指数是反映心肌肥厚的重要指标。ANP是公认心肌肥厚的特征性变化指标^[16]。RASS激活是心肌肥厚发生的重要病理机制,Ang II在RASS系统中起着核心作用,Ang II是引起心肌细胞肥大和纤维化的关键因素,通过促进ALD的分泌,从而引起成纤维细胞增多,心肌胶原因此大量合成,促进心室重构^[17]。细胞外基质的过度沉积导致胶原组织代谢功能减弱,HYP含量增多,使心肌被大量纤维物质填充而失去正常结构从而导致心肌肥厚甚至心力衰竭^[18]。培哚普利叔丁胺作为第三代血管紧张素转换酶抑制剂,是目前被证实可以改善心肌肥厚的代表药物^[19-20],也是临床中治疗心肌肥厚的基础用药,故本实验选择作为西药对照药物。本研究结果表明,模型组大鼠心肌细胞间隙增宽、横截面积增大,肌原纤维增粗、纤维断裂、间隙增宽、排列无序,间质增生严重,细胞核呈分支状、部分核消失,炎症浸润,心脏质量指数和左心室质量指数显著升高,血清Ang II、ALD、ANP、HYP含量均升高,说明AMI后发生心肌肥厚。而乌头赤石脂丸组和培哚普利叔丁胺组各指标及病理改变均较模型组改善,与培哚普利叔丁胺片相比,乌头赤石脂丸能够更好地减轻大鼠心肌肥厚程度、改善心肌的病理状态和胶原沉积,说明乌头赤石脂丸方改善AMI后心肌肥厚的效果更佳。

Nrf2是一种通过调控线粒体功能,促进存活细胞表达,抑制细胞凋亡及抗氧化酶的表达来降低氧化损伤的氧化还原敏感转录因子^[9]。AMI发生后,机体发生氧化应激反应,产生大量ROS,进而引起脂质过氧化生成大量MDA,导致线粒体功能障碍,体内SOD等抗氧化系统清除ROS能力减弱,导致氧化与抗氧化系统失衡,心肌耗氧量增加,容量负荷过重,造成细胞的广泛性损伤和死亡^[9,21]。线粒体是氧化应激的重要来源和靶向细胞器,在氧化应激中发挥关键作用,ROS的增多造成线粒体的通透性增加及结构的变化,并攻击线粒体膜复合体,促进膜电位降低及凋亡诱导因子的释放,最终导致细胞凋亡^[22]。Keap1/Nrf2是氧化还原反应的内源性抗氧化防御模块,Nrf2是一种通过调控线粒体功能,促进存活细胞表达,抑制细胞凋亡及抗氧化酶的表达来降低氧化损伤的氧化还原敏感转录因子^[23]。在氧化应激的状态下,Nrf2与Keap1解离,Nrf2进入细胞核,激活内源性抗氧化剂HO-1、NQO-1,清除ROS,进而降低氧化应激对心肌细胞的损伤^[24]。另外,细胞凋亡是细胞的程序性死亡过程,

凋亡通路通过线粒体通路和死亡受体实现^[25]。抗凋亡蛋白Bcl-2和促凋亡蛋白Bax之间的平衡是调控细胞凋亡的关键,氧化应激损伤的减轻会使Bcl-2的表达增加,Bax表达减少,从而减少心肌细胞的凋亡^[26]。本研究结果显示,模型组大鼠心肌组织ROS、MDA含量显著升高,SOD活性明显降低,Keap1、Bax蛋白表达升高,Nrf2、HO-1、NQO-1、Bcl-2蛋白表达降低,可能在氧化应激状态下与机体防御系统受损严重有关,抗氧化基因表达不及时,机体自身的抗氧化能力无法消除严重的氧化应激反应。而给予中药乌头赤石脂丸方后,ROS、MDA含量显著降低,SOD活性明显提高,Keap1、Bax蛋白表达降低,Nrf2、HO-1、NQO-1、Bcl-2蛋白表达升高,提示乌头赤石脂丸方对心肌细胞的保护作用可能与降低氧化应激损伤、抑制细胞凋亡有关,其可抑制心肌组织中Keap1与Nrf2结合,并促进Nrf2表达,恢复机体抗氧化能力,从而提高心肌细胞面对ROS攻击时的存活能力,从而降低心肌细胞的凋亡。与培哚普利叔丁胺片相比,乌头赤石脂丸方能够更好地降低ROS水平,但在调节心肌组织Keap1、Nrf2、HO-1、NQO-1、Bcl-2、Bax蛋白表达方面效果相当,可能与样本量较小有关,需进一步深入研究。

综上所述,乌头赤石脂丸方能够减轻氧化应激损伤和心肌细胞凋亡,从而抑制心肌肥厚的发展,其作用机制可能与激活Keap1/Nrf2/HO-1/NQO-1信号通路有关。但本实验尚未在细胞层面上验证,有待课题组后续实验进一步研究。

参考文献

- [1]中国心血管健康与疾病报告编写组.中国心血管健康与疾病报告2020概要[J].中国循环杂志,2021,36(6):521-545.
- [2]ADAMCZAK DM,OKO-SARNOWSKA Z. Sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy [J]. Cardiol Rev, 2018,26(3): 145-151.
- [3]LOMPRE AM. Enigma in cardiac hypertrophy[J]. Cardiovasc Res,2010,86(3):349-350.
- [4]鲁文涛,韩丽华.乌头赤石脂汤对老年缺血性心脏病伴心力衰竭患者血清TNF- α ,BNP及Hcy水平的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(5):174-178.
- [5]焦利东.参附汤合乌头赤石脂汤辅治缺血性心脏病伴心力衰竭临床观察[J].实用中医药杂志,2020,36(7):894-895.
- [6]闫晓博,李予焯,陈章凤,等.乌头赤石脂汤对急性心肌

- 梗死大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(7): 887-889.
- [7] 谢璐璐, 郭军鹏, 张兆鹏, 等. 乌头赤石脂丸方对急性心肌梗死大鼠血清炎症因子及心肌 CX43 蛋白表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(8): 1691-1695.
- [8] 谢璐璐. 乌头赤石脂丸方抗大鼠急性心梗后心衰的实验研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2021.
- [9] SANTINI SJ, CORDONE V, FALONE S, et al. Role of mitochondria in the oxidative stress induced by electromagnetic fields: focus on reproductive systems [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 5076271. doi: 10.1155/2018/5076271.
- [10] GUO Z, MO Z. Keap1-Nrf2 signaling pathway in angiogenesis and vascular diseases [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2020, 14(6): 869-883.
- [11] 胡珍, 陈景瑞, 魏静, 等. 冠状动脉结扎制备大鼠心肌梗死模型及评价实验研究[J]. 天津中医药, 2016, 33(2): 90-95.
- [12] SOLTAN F, DAHEJ ME, YADEGARI M, et al. Resveratrol confers protection against ischemia/reperfusion injury by increase of angiotensin (1-7) expression in a rat model of myocardial hypertrophy [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2021, 78(1): e55-e64.
- [13] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 69-73.
- [14] HENDERSON KK, DANZI S, PAUL JT, et al. Physiological replacement of T3 improves left ventricular function in an animal model of myocardial infarction-induced congestive heart failure [J]. *Circ Heart Fail*, 2009, 2(3): 243-252.
- [15] ZHAO H, ZHANG J, HONG G. Minocycline improves cardiac function after myocardial infarction in rats by inhibiting activation of PARP-1 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 1119-1124. doi: 10.1016/j.biopha. 2017. 10. 053.
- [16] 王庆义, 刘洪智, 高传玉, 等. 血管紧张素受体脑啡肽酶抑制剂 LCZ696 通过上调心房利钠肽改善心肌病大鼠的心功能[J]. 武汉大学学报(医学版), 2022, 43(2): 210-214.
- [17] ZHAI CG, XU YY, TIE YY, et al. DKK3 overexpression attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis in an angiotensin-perfused animal model by regulating the ADAM17/ACE2 and GSK-3 β / β -catenin pathways [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 114: 243-252. doi: 10.1016/j.yjmcc. 2017. 11. 018.
- [18] 吕雁, 张琳琪, 王娇. 益肾化癆方对肾间质纤维化大鼠肾组织羟脯氨酸表达的影响[J]. 中医学报, 2020, 35(12): 2619-2625.
- [19] HOWES LG, HODSMAN GP, ROWE PR, et al. Comparative effects of angiotensin converting enzyme inhibition (perindopril) or diuretic therapy on cardiac hypertrophy and sympathetic activity following myocardial infarction in rats [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1991, 5(1): 147-152.
- [20] JIANG QJ, XU G, MAO FF, et al. Effects of combination of irbesartan and perindopril on calcineurin expression and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity in rat cardiac pressure-overload hypertrophy [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2006, 7(3): 228-234.
- [21] SYKIOTIS GP. Keap1/Nrf2 signaling pathway [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(6): 828.
- [22] YOUNIS NS, ABDULDAIUM MS, MOHAMED ME. Protective effect of geraniol on oxidative, inflammatory and apoptotic alterations in isoproterenol-induced cardiotoxicity: role of the Keap1/Nrf2/HO-1 and PI3K/Akt/mTOR pathways [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(10): 977.
- [23] LI H, SONG F, DUAN LR, et al. Paeonol and danshensu combination attenuates apoptosis in myocardial infarcted rats by inhibiting oxidative stress: roles of Nrf2/HO-1 and PI3K/Akt pathway [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23693. doi: 10.1038/srep23693.
- [24] JIN LM, MIAO JH, LIU YJ, et al. Icaritin induces mitochondrial apoptosis by up-regulating miR-124 in human oral squamous cell carcinoma cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85: 287-295. doi: 10.1016/j.biopha. 2016. 11. 023.
- [25] 朱思行, 严世芸, 徐燕, 等. 基于 PI3K/Akt/Caspase-9 信号通路研究严氏强心饮对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. 康复学报, 2022, 32(2): 131-139.
- [26] 徐由财, 丁文俊, 陈思, 等. Nrf2 在黄芩素抑制氧化应激诱导心肌细胞凋亡中的作用[J]. 中成药, 2022, 44(5): 1434-1440.

Effects of *Wutou Chishizhi Pill* (乌头赤石脂丸) on Myocardial Oxidative Stress and Keap1/Nrf2/HO-1/NQO-1 Pathway in Myocardial Hypertrophy Model Rats after Acute Myocardial Infarction

WANG Xinhe, SHI Xiaomei, XIAO Yuxue, WANG Song, XIE Lulu, GUO Junpeng, LIU Hongyan¹

Changchun University of Chinese Medicine, Changchun, 130117

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Wutou Chishizhi Pill* (乌头赤石脂丸, WCP) in

treating myocardial hypertrophy after acute myocardial infarction (AMI). **Methods** Forty SD rats were randomly divided into normal group, model group, perindopril tert-butylamine group and WCP group, with 10 rats in each group. Except for the normal group, AMI model was prepared by ligation of the left anterior descending coronary artery; rats in each group were fed normally for 28 days after operation to establish the model of myocardial hypertrophy after AMI. After successful modeling, the perindopril tert-butylamine group was given 0.4 mg/(kg·d) of perindopril tert-butylamine tablets, while the WCP group was given 4.9 g/(kg·d) of WCP liquid, and the normal group and the model group were given 6.67 ml/(kg·d) of normal saline, all by gavage for 28 days. The myocardial hypertrophy indexes including heart mass index and left ventricular mass index were assessed. HE staining and Masson staining were used to observe the pathological changes of cardiomyocytes. The serum atrial natriuretic peptide (ANP), angiotensin II (Ang II), aldosterone (ALD) and hydroxyproline (HYP) levels were detected, as well as the superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) levels in myocardial tissue. The protein expression levels of Kelch-like epichlorohydrin-related protein-1 (Keap1), nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), quinone oxidoreductase-1 (NQO-1), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2-related X protein (Bax) in myocardial tissue were detected. **Results** Compared to those in the normal group, the heart mass index and left ventricular mass index of rats in the model group significantly increased ($P < 0.01$), and the pathological results showed that the cross-sectional area of cardiomyocytes became larger, with disordered myocardial fibers, and broken and disordered collagen fibers around the myocardial tissue; serum ANP, Ang II, ALD, and HYP levels significantly increased, as well as the MDA and ROS levels in myocardial tissue and Keap1 and Bax protein expression levels, while SOD activity and Nrf2, HO-1, NQO-1, Bcl-2 protein expression levels decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the model group, the heart mass index and left ventricular mass index of the rats in the WCP group and the perindopril tert-butylamine group decreased ($P < 0.01$); the myocardial pathological damage was improved, and the cross-sectional area of cardiomyocytes was significantly reduced; the serum Ang II, ALD, ANP and HYP levels, as well as MDA and ROS levels in the myocardial tissue and Keap1 and Bax protein expression levels significantly decreased, while SOD activity and Nrf2, HO-1, NQO-1, Bcl-2 protein expression levels significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The WCP group was superior to the perindopril tert-butylamine group in reducing heart mass index and left ventricular mass index, the cross-sectional area of cardiomyocytes, and the ROS level ($P < 0.05$). **Conclusion** WCP can reduce oxidative stress injury and myocardial cell apoptosis in myocardial tissue of myocardial hypertrophy model rats after AMI, and can reduce the degree of myocardial fibrosis, thereby inhibiting the degree of myocardial hypertrophy. The mechanism may be related to the activation of Keap1/Nrf2/HO-1/NQO-1 signaling pathway.

Keywords acute myocardial infarction; myocardial hypertrophy; *Wutou Chishizhi Pill* (乌头赤石脂丸); oxidative stress; apoptosis; Keap1/Nrf2/HO-1/NQO-1 signaling pathway

(收稿日期: 2022-08-10; 修回日期: 2023-02-27)

[编辑: 邓媛]