

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.01.017

基于 NLRP3/Caspase-1 信号通路探讨参芪健心方对慢性心力衰竭模型大鼠心肌细胞焦亡的影响

梁国庆¹, 夏冉², 王银燕¹, 刘攀³, 张军², 戴小华¹✉

1. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽省合肥市梅山路 117 号, 230031; 2. 安徽中医药大学中医学院; 3. 安徽省中西医结合医院

[摘要] **目的** 从细胞焦亡角度探讨参芪健心方治疗慢性心力衰竭的可能作用机制。**方法** 将 52 只大鼠随机分为假手术组 8 只和造模组 44 只, 造模组大鼠结扎左冠状动脉前降支构建慢性心力衰竭大鼠模型。将造模成功的 40 只大鼠随机分为模型组、沙库巴曲缬沙坦组、参芪健心方组、MCC950 组及参芪健心方+MCC950 组, 每组 8 只。参芪健心方组予参芪健心方药液 7.4 g/(kg·d) 灌胃; 沙库巴曲缬沙坦组予沙库巴曲缬沙坦混悬液 68 mg/(kg·d) 灌胃; MCC950 组予以腹腔注射 MCC950 10 mg/kg, 隔日 1 次; 参芪健心方+MCC950 组予参芪健心方 7.4 g/(kg·d) 灌胃, 再腹腔注射 MCC950 10 mg/kg 隔日 1 次; 假手术组和模型组予生理盐水 10 ml/(kg·d) 灌胃。各组连续干预 3 周后, ELISA 法检测大鼠血清脑 B 型钠尿肽 (BNP)、肌酸激酶同工酶 MB (CK-MB)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 18 (IL-18) 水平; HE 染色、MASSON 染色观察大鼠心肌病理改变。除沙库巴曲缬沙坦组外, Western blot 法检测各组大鼠心肌 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 (Caspase-1)、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 蛋白表达, RT-PCR 法检测 NLRP3、Caspase-1 mRNA 的表达。**结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠 HE 染色示心肌损伤明显, MASSON 染色示胶原纤维化面积增大, 血清 BNP、CK-MB、IL-1 β 、IL-18 含量, 心肌组织 NLRP3、Caspase-1、ASC 蛋白表达及 NLRP3、Caspase-1 mRNA 表达均升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 参芪健心方组、沙库巴曲缬沙坦组、MCC950 组及参芪健心方+MCC950 组大鼠心肌细胞损伤减轻, 胶原纤维化面积减小, 血清 BNP、CK-MB、IL-1 β 、IL-18 含量均降低; 除沙库巴曲缬沙坦组未检测外, 其余三个干预组心肌组织 NLRP3、Caspase-1、ASC 蛋白表达及 NLRP3、Caspase-1 mRNA 表达均降低 ($P<0.05$)。与参芪健心方组比较, MCC950 组、参芪健心方+MCC950 组血清 IL-1 β 、IL-18 含量减少, 胶原纤维化面积减小, 心肌组织 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达及 Caspase-1 mRNA 表达均降低, 参芪健心方+MCC950 组 ASC 蛋白、NLRP3 mRNA 表达亦降低 ($P<0.05$); 与 MCC950 组比较, 参芪健心方+MCC950 组血清 IL-18 水平下降, 胶原纤维化面积减小, NLRP3、Caspase-1 mRNA 表达降低 ($P<0.05$)。**结论** 参芪健心方能够有效改善慢性心力衰竭模型大鼠心肌损伤, 其机制可能与其通过 NLRP3/Caspase-1 通路抑制心肌细胞焦亡, 减轻心肌内炎症水平有关, 且 MCC950 联合参芪健心方能更有效抑制心肌细胞焦亡, 治疗效果优于单一 MCC950 和参芪健心方。

[关键词] 慢性心力衰竭; 参芪健心方; 细胞焦亡; NLRP3/Caspase-1 通路; MCC950

慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF) 是心血管疾病的终末阶段, 具有高发病率、高死亡率的特点^[1]。2021 年数据显示, 我国 CHF 患者约为

890 万, 虽然 CHF 的治疗已取得重大进展, 但五年死亡率仍高达 50%, 对我国公共卫生资源造成巨大挑战^[2]。目前, CHF 的治疗仍以西药为主, 但由于 CHF 病因繁杂, 个体化差异较大, 西药的使用受到限制^[3]。

CHF 属于中医学“胸痹”“心悸”“喘证”等范畴。基于 CHF “阳虚为本, 血瘀痰饮为标”的病机

基金项目: 安徽省医疗卫生重点专科建设项目 (皖卫函[2021] 273 号); 全国老中医药专家学术经验继承工作项目 (国中医药人教函[2022] 76 号)

✉ 通讯作者: xin_d3980@163.com, (0551) 62850062

特点^[4]和新安医学“固本培元”的学术思想^[5],安徽中医药大学第一附属医院心内科基于临床实践研制了参芪健心方。前期临床试验证实,参芪健心方能够有效改善患者的心室射血分数,降低患者血清 N 末端 B 型脑钠肽前体(NT-pro BNP)水平和中医证候积分^[6-7]。实验研究^[8-9]亦发现,参芪健心方能够抑制 CHF 模型大鼠体内肾素血管紧张素醛固酮(RAAS)系统的激活,改善心室重构。CHF 心室重构过程中伴有过度炎症反应,NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)是心血管炎症的重要触发因素和内源性调节因子,且 NLRP3 炎性体诱导半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1(Caspase-1)活化启动细胞焦亡参与 CHF 心肌纤维化的病理发展^[10]。基于此,本研究以 CHF 模型大鼠为研究对象,以 NLRP3/Caspase-1 信号通路调节细胞焦亡为研究方向,进一步探究参芪健心方改善 CHF 的可能作用机制,为其临床应用提供实验依据。本研究获得安徽中医药大学动物伦理委员会批准(批准号:AHUCM-rats-2022091)。

1 材料及方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 52 只,8 周龄,体质量(200±20)g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,实验动物生产许可证号 SCXK(辽)2020-0001。以每笼 3 只饲养于安徽中医药大学经络研究所动物房(清洁级),温度(24±2)°C,相对湿度(55±5)%,12 h 昼夜交替,适应性饲养 1 周后进行干预造模。

1.2 药物及试剂

参芪健心方组成:黄芪 20 g,红参 15 g,白术 10 g,丹参 15 g,葶苈子 10 g,淫羊藿 15 g,茯苓 15 g,桂枝 6 g,选用中药颗粒冲剂(广东一方制药有限公司)开水溶解,浓缩药液至含生药 2.0 g/ml。沙库巴曲缬沙坦片(100 mg/片,批号:H20170362),北京诺华制药有限公司;NLRP3 抑制剂 MCC950(货号:HY-12815A),美国 Med Chem Express 公司;注射用青霉素钾(批号:140051253),江西省科达动物药业有限公司。

大鼠脑 B 型钠尿肽(BNP)试剂盒(批号:2022-11)、大鼠肌酸激酶同工酶 MB(CK-MB)试剂盒(批号:2022-11)、白细胞介素 18(IL-18)试剂盒(批号:2022-11)、白细胞介素 1β(IL-1β)试剂盒(批号:2022-11),泉州市睿信生物科技有限公司;戊巴比妥钠(批号:AM00469),北京化学试剂公司;MASSON 染液(包含铁苏木素、丽春

红品红,批号:20220102),北京索莱宝科技有限公司;苏木素染色液(批号:C190903)、伊红染色液(批号:719041),珠海贝索生物技术有限公司;兔多抗 Caspase-1(批号:23m5315)、兔多抗 NLRP3(批号:81P8121)、兔多抗凋亡相关斑点样蛋白(ASC)(批号:10w2997),美国 Affinity 公司;山羊抗小鼠 IgG(批号:142637)、山羊抗兔 IgG(批号:139931)、山羊抗小鼠 β-actin(批号:19AW0505),北京中杉金桥生物技术有限公司;Trizol 试剂盒(批号:248207),美国 Life Technologies 公司;2×SYBR Green qPCR Master Mix (High ROX)(批号:LT202201),武汉赛维尔生物科技有限公司;PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(批号:AJ51485A),日本 TaKaRa 公司。

1.3 仪器

ZT-12M 型生物组织自动脱水机、YB-7LF 型组织包埋机,湖北亚光医疗公司;RM2016 型徕卡切片机,上海涵飞医疗公司;EPS300 型电泳仪、VE-180 型电泳槽、VE-186 型转膜仪,上海天能科技有限公司;JW-3021HR 型高速冷冻离心机,安徽嘉文仪器装备有限公司;JS-M6P 型自动曝光仪,上海培清科技有限公司;S-1-150S 型台式高速冷冻离心机,郑州宏华仪器有限公司;TS-1000 型水平摇床,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;PTC-200 型普通 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司;V-1000 型大鼠呼吸机,上海玉研科学仪器有限公司;VINNO6 LAB 型小动物超声机,北京迈德康纳生物技术有限公司。

1.4 动物分组、造模及给药

52 只 SD 大鼠使用随机数字表法(使用 Excel 2022 软件产生随机数字,进行升序排列得到随机序列列表)分为假手术组 8 只及造模组 44 只。造模组大鼠结扎左冠状动脉前降支构建大鼠 CHF 模型^[11]:术前禁食 12 h,使用 3% 戊巴比妥钠溶液 30 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠,仰卧位固定后备皮,行气管插管并连接大鼠呼吸机(70 次/min,呼吸比值 1:2,潮气量 9.0 ml),待大鼠呼吸稳定后于第三、四肋间进行开胸,钝性分离肌肉,暴露肋骨,挤出心脏,使用 0 号手术线结扎大鼠左冠状动脉前降支,待结扎部位以下心肌发白或紫绀时复位心脏,关胸缝合,并在伤口处涂抹青霉素(用 2 ml 生理盐水调配,0.5 ml 滴加在伤口,湿棉签均匀涂抹伤口)预防感染,待大鼠恢复自主呼吸后拔出气管插管。假手术组只穿线不结扎,其余处理同造模组。造模结

束后,待大鼠恢复意识放置笼内。正常喂养 4 周后,于假手术组、造模组中根据随机数字表法各抽取 3 只,3%戊巴比妥钠溶液 30 mg/kg 麻醉大鼠,仰卧位固定于鼠板上,使用小动物超声机进行 M 型超声检测,将 15 Hz 大鼠探头垂直于大鼠左胸处,得到左室射血分数(EF)、左室短轴缩短率(FS)。CHF 模型成功标准:EF<63%,FS<30%^[12]。本研究造模组 3 只大鼠均造模成功。

造模组造模过程中死亡 4 只大鼠,将其他 40 只大鼠采用随机数字表法分为模型组、沙库巴曲缬沙坦组、参芪健心方组、MCC950 组及参芪健心方+MCC950 组,每组 8 只。参考文献[13]计算大鼠与人的等效剂量作为灌胃剂量。参芪健心方组予参芪健心方药液 7.4 g/(kg·d)灌胃;沙库巴曲缬沙坦组予沙库巴曲缬沙坦混悬液 68 mg/(kg·d)灌胃;MCC950 组予腹腔注射 MCC950 10 mg/kg 隔日 1 次;参芪健心方+MCC950 组予参芪健心方 7.4 g/(kg·d)灌胃,再腹腔注射 MCC950 10 mg/kg,隔日 1 次;假手术组和模型组予 10 ml/(kg·d)生理盐水灌胃。各组连续干预 3 周。

1.5 取材

末次给药后大鼠禁食不禁水 12 h,腹腔注射 3%戊巴比妥钠溶液 30 mg/kg 麻醉后行腹主动脉取血,于离心管中静置 30 min,4℃、3000 r/min(离心半径 10 cm)离心 12 min,取上清于 EP 管内冻存(-80℃冰箱)。取血完成后迅速取出大鼠心脏,剪取大鼠左心室组织 50 mg 放入冻存管冻存(-80℃冰箱),剩余组织使用多聚甲醛固定后进行 HE 和 MASSON 染色。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 一般情况 每日观察存活大鼠皮毛状态、活动力、24 h 饮食量及尿量等一般情况。并记录大鼠的死亡情况。

1.6.2 ELISA 法检测大鼠血清 BNP、CK-MB、IL-1 β 、IL-18 含量 参照 ELISA 试剂盒步骤进行检测,在酶标仪 450 nm 波长上测定吸光度(OD 值),根据标准曲线计算样品浓度。

1.6.3 心肌组织病理学形态 采用随机数字表法每组选取 5 只大鼠,其心脏组织经多聚甲醛固定液固定 72 h,脱水浸蜡包埋切片,放入二甲苯及乙醇中梯度脱蜡处理。HE 染色:切片入苏木精染液 15 min,乙醇脱水后入伊红染液 3 min,放入乙醇中梯度脱水,透明处理后中性树胶封片。MASSON 染色:将切片放入铁苏木素染液 10 min,分化后返蓝 5 min,

丽春红品红染色 10 min,乙醇脱水,透明处理后中性树胶封片。显微镜下观察大鼠心肌组织病理情况,并使用 Image J 2.1.0 进行心肌胶原纤维化面积的计算。

1.6.4 RT-PCR 法检测大鼠心肌组织 NLRP3、Caspase-1 mRNA 含量 考虑到沙库巴曲缬沙坦对细胞焦亡机制关键靶点作用不明,故检测除沙库巴曲缬沙坦组外的其余各组 NLRP3、Caspase-1 mRNA 及蛋白表达。

采用随机数字表法分别选取 3 只大鼠取心脏组织 50 mg,加入 Trizol 裂解,4℃、12 000 r/min 离心 10 min(离心半径 10 cm),提取总 RNA,再进行逆转录反应后得到 cDNA,进行 PCR 反应:总体积 20 μ l,95℃ 30 s,1 个循环,95℃ 15 s、60℃ 30 s,40 个循环,记录 Ct 值,以 β -actin 作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 NLRP3 mRNA、Caspase-1 mRNA 的相对表达量。引物序列由 Sangon Biotech 公司设计,NLRP3:上游 TGATGAGTGTTCGCTGCAAG,下游 GGATCGGAACACAGCCTTTC,长度 117 bp;Caspase-1:上游 CGGGCAAGCCAGATGTTTAT,下游 AATGCG-CCACCTTCTTTGTT,长度 176 bp; β -actin:上游 CTGTGCCCATCTATGAGGGT,下游 GCCATC-TCTTGCTCGAAGTC,长度 199 bp。

1.6.5 Western blot 法检测心肌组织 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达 采用随机数字表法每组选取 3 只大鼠,取心脏组织 50 mg,加入 RIPA 细胞裂解液,冰上裂解 30 min,4℃、12 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 15 min,收集上清液,配制 SDS-PAGE 凝胶,加入 5 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,加热使蛋白变性,电泳分离并转膜,使用 Western 洗涤液漂洗去除转膜液,室温封闭 2 h。加入一抗 NLRB3(1:1000)、ASC(1:500)、Caspase-1(1:1000),4℃孵育过夜,PBST 洗膜 3 次,每次 15 min,再加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:10 000)、山羊抗兔 IgG(1:10 000)二抗,室温孵育 2 h,PBST 洗涤 3 次,每次 10 min。按照 1:1 混合 ECL 试剂盒 A 液和 B 液,将 PVDF 膜放在自动曝光仪中进行曝光显影。采用 Image J 2.1.0 软件进行灰度值分析,以目的蛋白与 β -actin 蛋白条带灰度值比值为相对表达量。

1.7 统计学方法

使用 SPSS 26.0 对数据进行统计分析。计量资料符合正态分布采用均数 $\pm$ 平均差($\bar{x}\pm s$)表示,方差齐者两组数据比较用两独立样本 t 检验;方差不

齐者用两独立样本校正 t 检验；多组间比较采用单因素方差分析，方差齐两两比较用 LSD 检验；方差不齐两两比较用 Mann-Whitney U 检验，多组间用 Dunnett's T^3 检验。计量资料非正态分布采用中位数（下四分位数，上四分位数） $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示，组间比较采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况观察

干预过程中各组无死亡大鼠。假手术组大鼠 24 h 内笼内垫料明显湿润，皮毛光泽，反应灵敏；与假手术组大鼠比较，模型组大鼠出现厌食，尿量减少，24 h 内笼内垫料较为干燥，皮毛略发黄、枯燥，喜静倦动，行动缓慢，肢体蜷缩；与模型组比较，参芪健心方组、沙库巴曲缬沙坦组、MCC950 组和参芪健心方+MCC950 组大鼠饮食量增加，尿量增多，24 h 内笼内垫料较为湿润，皮毛较为柔顺光泽，喜扎堆蜷缩，行动较为灵敏。各干预组间一般情况无明显差异。

2.2 各组大鼠血清 BNP、CK-MB 含量比较

表 1 示，与假手术组比较，模型组大鼠血清 BNP、CK-MB 含量升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，沙库巴曲缬沙坦组、MCC950 组、参芪健心方组、参芪健心方+MCC950 组血清 BNP、CK-MB 含量降低 ($P < 0.05$)；与沙库巴曲缬沙坦组比较，参芪健心方+MCC950 组 BNP 含量降低 ($P < 0.05$)；与参芪健心方组比较，参芪健心方+MCC950 组血清 BNP、CK-MB 含量降低 ($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠血清 IL-1 β 、IL-18 含量比较

表 2 示，与假手术组比较，模型组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-18 含量升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，沙库巴曲缬沙坦组、MCC950 组、参芪健心方组、参芪健心方+MCC950 组血清中 IL-1 β 、IL-18 含

量降低 ($P < 0.05$)；与沙库巴曲缬沙坦组比较，参芪健心方组 IL-18 含量升高，参芪健心方+MCC950 组 IL-1 β 、IL-18 含量降低 ($P < 0.05$)；与 MCC950 组比较，参芪健心方组 IL-1 β 、IL-18 含量升高，参芪健心方+MCC950 组 IL-18 含量降低 ($P < 0.05$)；与参芪健心方组比较，参芪健心方+MCC950 组血清 IL-1 β 、IL-18 含量降低 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠血清 IL-1 β 、IL-18 含量比较
Table 2 Comparison of IL-1 β and IL-18 contents in each group

group		(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)	
组别	鼠数	IL-1 β	IL-18
假手术组	8	1.14 $\pm$ 0.19	6.92 $\pm$ 2.12
模型组	8	3.73 $\pm$ 0.78 ^{a)}	28.75 $\pm$ 2.77 ^{a)}
沙库巴曲缬沙坦组	8	2.34 $\pm$ 0.58 ^{b)}	14.17 $\pm$ 2.36 ^{b)}
MCC950 组	8	1.92 $\pm$ 0.75 ^{b)}	11.99 $\pm$ 3.04 ^{b)}
参芪健心方组	8	2.62 $\pm$ 0.84 ^{b) c)}	18.44 $\pm$ 2.56 ^{b) c) d)}
参芪健心方+MCC950 组	8	1.48 $\pm$ 0.49 ^{b) d) e)}	7.40 $\pm$ 1.54 ^{b) c) d) e)}

注：IL-1 β ，白细胞介素 1 β ；IL-18，白细胞介素 18。
a) 与假手术组比较， $P < 0.05$ ；b) 与模型组比较， $P < 0.05$ ；
c) 与 MCC950 组比较， $P < 0.05$ ；d) 与沙库巴曲缬沙坦组比较， $P < 0.05$ ；e) 与参芪健心方组比较， $P < 0.05$ 。

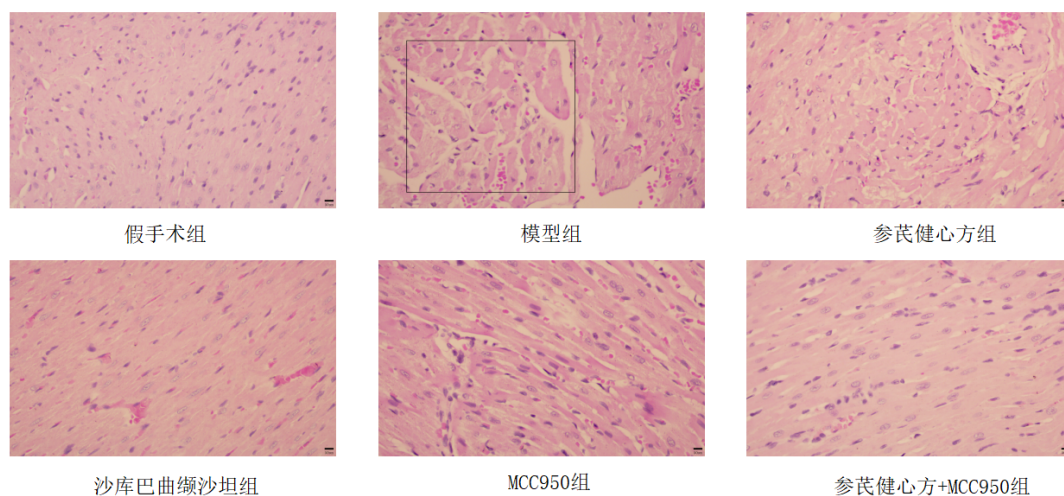
2.4 各组大鼠心肌组织病理学结果比较

图 1 示 HE 染色结果，假手术组大鼠心肌纤维排列整齐，细胞结构完整，细胞核数量正常。与假手术组比较，模型组心肌损伤明显，细胞核减少，心肌纤维排列紊乱，且出现断裂、萎缩、部分消失。与模型组比较，参芪健心方组、沙库巴曲缬沙坦组、MCC950 组及参芪健心方+MCC950 组心肌细胞损伤减少，细胞核增多，心肌纤维排列较为整齐。各药物干预组未见明显差异。图 2、表 3 示 MASSON 染色结果，假手术组心肌组织正常，无明显胶原纤维化；与假手术组比较，模型组心肌胶原纤维化面积增大 ($P < 0.05$)，心肌纤维化严重；与模型组比较，沙库巴曲缬沙坦组、MCC950 组、参芪健心方组、参芪健心方+MCC950 组心肌胶原

表 1 各组大鼠血清 BNP、CK-MB 含量比较
Table1 Comparison of BNP and CK-MB contents in each group $[M(P_{25}, P_{75})]$

组别	鼠数	BNP/pg·ml ⁻¹	CK-MB/ng·ml ⁻¹
假手术组	8	19.59 (14.97, 29.30)	1.29 (1.07, 2.33)
模型组	8	99.54 (94.23, 122.04) ^{a)}	8.93 (7.43, 9.49) ^{a)}
沙库巴曲缬沙坦组	8	49.80 (41.32, 69.50) ^{b)}	4.86 (3.87, 5.69) ^{b)}
MCC950 组	8	32.33 (28.83, 54.89) ^{b)}	2.77 (1.90, 5.26) ^{b)}
参芪健心方组	8	63.12 (43.99, 77.75) ^{b)}	4.63 (3.00, 5.62) ^{b)}
参芪健心方+MCC950 组	8	28.02 (21.34, 30.26) ^{b) c) d)}	3.60 (2.60, 4.15) ^{b) d)}

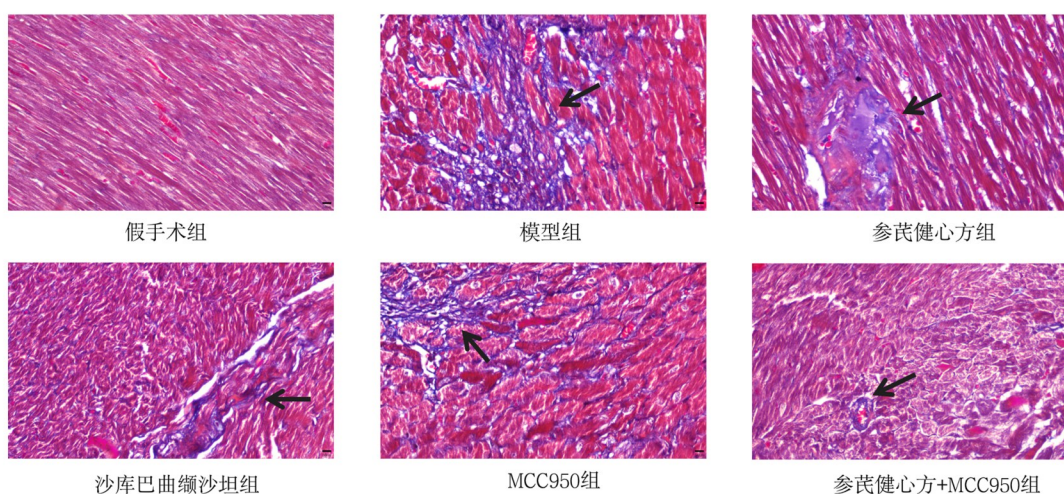
注：BNP，B 型钠尿肽；CK-MB，肌酸激酶同工酶 MB。
a) 与假手术组比较， $P < 0.05$ ；b) 与模型组比较， $P < 0.05$ ；c) 与沙库巴曲缬沙坦组比较， $P < 0.05$ ；d) 与参芪健心方组比较， $P < 0.05$ 。



注：方框区域表示模型组心肌细胞排列紊乱。

图1 各组大鼠心肌组织病理学形态 (HE 染色, ×200)

Figure 1 Histopathological morphology of rat myocardium in each group (HE staining, ×200)



注：黑色箭头指向表示心肌胶原纤维化表现特征。

图2 各组大鼠心肌组织病理学形态 (MASSON 染色, ×200)

Figure 2 Histopathological morphology of rat myocardium in each group (MASSON staining, ×200)

表3 各组大鼠心肌组织胶原纤维化面积比较

Table 3 Comparison of myocardial collagen fibrosis area in each groups (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	胶原纤维化面积
假手术组	5	0.51±0.24
模型组	5	35.36±2.70 ^{a)}
沙库巴曲缬沙坦组	5	14.50±2.18 ^{b)}
MCC950组	5	7.20±0.82 ^{b) c)}
参芪健心方组	5	16.22±1.07 ^{b) d)}
参芪健心方+MCC950组	5	2.87±0.25 ^{b) c) d) e)}

注：a) 与假手术组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与沙库巴曲缬沙坦组比较, $P < 0.05$; d) 与MCC950组比较, $P < 0.05$; e) 与参芪健心方组比较, $P < 0.05$ 。

纤维化面积减小 ($P < 0.05$)；与沙库巴曲缬沙坦组比较, MCC950组、参芪健心方+MCC950组心肌胶原纤维化面积均减小 ($P < 0.05$)；与MCC950组比较, 参芪健心方组心肌胶原纤维化面积增大, 参芪健心方+MCC950组心肌胶原纤维化面积减小 ($P < 0.05$)；与参芪健心方组比较, 参芪健心方+MCC950组心肌胶原纤维化面积减小 ($P < 0.05$)。

2.5 各组大鼠心肌组织 NLRP3、Caspase-1 mRNA 含量比较

表4示, 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌组织中 NLRP3、Caspase-1 mRNA 含量升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较, 参芪健心方组、MCC950组、参芪

健心方+MCC950 组 NLRP3、Caspase-1 mRNA 含量降低 ($P<0.05$)；与 MCC950 组比较，参芪健心方组 Caspase-1 mRNA 含量升高，参芪健心方+MCC950 组 Caspase-1、NLRP3 mRNA 含量降低 ($P<0.05$)；与参芪健心方组比较，参芪健心方+MCC950 组 Caspase-1、NLRP3 mRNA 含量降低 ($P<0.05$)。

表 4 各组大鼠心肌组织 NLRP3、Caspase-1 mRNA 相对表达量比较

Table 4 Comparison of relative expression levels of NLRP3, Caspase-1 and ASC protein in myocardial tissues of rats in each group ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x}\pm s$)			
组别	鼠数	NLRP3	Caspase-1
假手术组	3	0.98±0.29	1.52±0.67
模型组	3	9.79±1.53 ^{a)}	13.60±2.39 ^{a)}
MCC950 组	3	4.13±0.66 ^{b)}	4.70±0.44 ^{b)}
参芪健心方组	3	5.07±0.40 ^{b)}	6.20±0.88 ^{b) c)}
参芪健心方+MCC950 组	3	2.16±0.81 ^{b) c) d)}	2.58±0.20 ^{b) c) d)}

注：NLRP3，NOD 样受体蛋白 3；Caspase-1，半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1。
a) 与假手术组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与 MCC950 组比较， $P<0.05$ ；d) 与参芪健心方组比较， $P<0.05$ 。

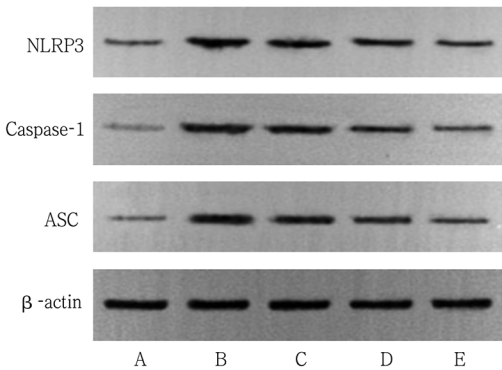
2.6 各组大鼠心肌组织 NLRP3、Caspase-1、ASC 蛋白表达比较

表 5 示，与假手术组比较，模型组大鼠心肌组织中 NLRP3、Caspase-1、ASC 蛋白表达均升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，参芪健心方组、MCC950 组、参芪健心方+MCC950 组大鼠 NLRP3、Caspase-1、ASC 蛋白表达均降低 ($P<0.05$)；与参芪健心方组比较，MCC950 组及参芪健心方+MCC950 组 NLRP3、Caspase-1 蛋白表达降低，且参芪健心方+MCC950 组 ASC 蛋白表达亦降低 ($P<0.05$)。MCC950 组与参芪健心方+MCC950 组各蛋白表达比较，差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。各组大鼠心肌组织 NLRP3、Caspase-1、ASC 蛋白表达电泳图见图 3。

表 5 各组大鼠心肌组织 NLRP3、Caspase-1、ASC 蛋白相对表达量比较
Table 5 Comparison of the relative expression levels of NLRP3 mRNA and Caspase-1 mRNA of rat myocardium in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	NLRP3	Caspase-1	ASC
假手术组	3	0.32±0.03	0.20±0.02	0.24±0.02
模型组	3	0.81±0.03 ^{a)}	0.83±0.05 ^{a)}	0.80±0.06 ^{a)}
MCC950 组	3	0.44±0.04 ^{b) c)}	0.39±0.04 ^{b) c)}	0.38±0.06 ^{b)}
参芪健心方组	3	0.60±0.07 ^{b)}	0.57±0.04 ^{b)}	0.55±0.05 ^{b)}
参芪健心方+MCC950 组	3	0.39±0.03 ^{b) c)}	0.25±0.05 ^{b) c)}	0.29±0.04 ^{b) c)}

注：NLRP3，NOD 样受体蛋白 3；Caspase-1，半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1；ASC，凋亡相关斑点样蛋白。
a) 与假手术组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与参芪健心方组比较， $P<0.05$ 。



注：NLRP3，NOD 样受体蛋白 3；Caspase-1，半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1；ASC，含 Caspase 募集结构域的凋亡相关斑点样蛋白；A，假手术组；B，模型组；C，参芪健心方组；D，MCC950 组；E，参芪健心方+MCC950 组。

图 3 各组大鼠心肌组织 NLRP3、Caspase-1、ASC 蛋白表达电泳图

Figure 3 Electrophoresis of NLRP3, Caspase-1 and ASC protein expression of rat myocardium in each group

3 讨论

中医学认为，CHF 病程长，迁延不愈导致患者正气亏虚，卫气不固，脾气不足，出现乏力汗出、气息喘促；气血相生，气虚血无以生，营血亏耗，日久乃至阳虚，则见面色无华、心悸气短，水湿不化则见下肢水肿；气虚血无以运，心脉瘀阻，则见胸闷胸痛、口唇青紫，为本虚标实之证^[14]。临床发现，CHF 患者前期常表现为气虚血瘀的证候特征，至中期逐渐发展为心肾阳虚^[15]。参芪健心方以黄芪、红参为君药，两药合用，甘温之性共奏补气健脾益气生血之功。臣以白术健脾燥湿，补土制水；茯苓健脾宁心，淡渗利湿；桂枝温阳化气，通脉化湿。佐以淫羊藿培补下元，补精化气，蒸腾肾水；丹参祛瘀生新，活血养血。使以葶苈子泻肺平喘，以苦寒之性制约全方辛温之性，全方共奏益气温阳、活血利水之效。

沙库巴曲缬沙坦是目前较新型的治疗 CHF 的药物^[16], MCC950 能够通过抑制心肌细胞焦亡改善 CHF 大鼠心肌纤维化^[17], BNP、CK-MB 是临床客观评价 CHF 的常用指标^[18]。本实验结果显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠血清 BNP 及 CK-MB 均升高, 提示模型组大鼠 CHF 造模过程中伴有心肌损伤。灌服参芪健心方后 CHF 模型大鼠 BNP 及 CK-MB 均降低, 与沙库巴曲缬沙坦、MCC950 干预后差异无统计学意义, 且参芪健心方联合 MCC950 干预的效果优于参芪健心方组, 提示参芪健心方能够改善模型大鼠 CHF 并可减少心肌损伤, 且联合 MCC950 疗效更加显著。病理结果显示, 模型组大鼠心肌细胞损伤增多, 心肌纤维化面积扩大; 经过参芪健心方、沙库巴曲缬沙坦、MCC950 干预后, CHF 大鼠心肌细胞损伤减轻, 心肌纤维化面积减少, 提示参芪健心方能够有效保护心肌细胞, 改善 CHF 的心肌纤维化。与其余三个干预组相比, 参芪健心方+MCC950 组能更有效地减少心肌纤维化, 说明联合治疗优于单一中药或西药治疗。

细胞焦亡主要由炎症小体触发^[19-20]。心肌梗死后心力衰竭时心肌细胞会诱导炎症反应上调, 激发细胞的保护效应, 而持续的心肌损伤将作为长久触发因素引发过度炎症反应导致心室重构^[21-22]。NLRP3 作为炎性传感器寡聚化并募集 ASC 衔接蛋白触发 Caspase-1 前体 (pro-Caspase-1) 自切割, 导致 Caspase-1 的自催化活化进而启动细胞焦亡^[23]。本研究结果显示, CHF 模型大鼠心肌内 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白及 NLRP3、Caspase-1 mRNA 含量明显上升, 说明在 CHF 造模过程中, 心肌细胞缺血缺氧导致 NLRP3 及 Caspase-1 的活化, 继而发生细胞焦亡。经过参芪健心方干预后, CHF 模型大鼠的 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白及 NLRP3、Caspase-1 mRNA 表达下降, 提示参芪健心方能够抑制 NLRP3、ASC、Caspase-1 的表达。此外, 心肌细胞内的 Caspase-1 活化后会进一步将无活性的 IL-1 β 前体 (pro-IL-1 β) 和 IL-18 前体 (pro-IL-18) 转化为具有生物活性的 IL-1 β 、IL-18, 释放到细胞膜外扩大炎症反应, 导致心室重构^[24]。本实验发现, 模型组大鼠血清 IL-1 β 、IL-18 含量明显升高, 说明 CHF 模型大鼠体内炎症反应增加; 经过参芪健心方干预后 IL-1 β 、IL-18 的含量明显降低, 提示参芪健心方能够抑制炎症反应, 且与 NLRP3/Caspase-1 信号通路相关。MCC950 对 NLRP3 炎症小体具有强烈抑制作用, 是 NLRP3 信号通路的特异性抑制剂^[25]。

与 MCC950 组比较, 参芪健心方在降低 ACS 蛋白表达及 NLRP3 mRNA 表达方面与 MCC950 组无显著差异, 且参芪健心方联合 MCC950 干预后, NLRP3 mRNA 及 Caspase-1 mRNA 表达进一步降低, 说明联合治疗能够更显著地改善 CHF 模型大鼠心肌组织细胞焦亡水平及心肌损伤。

综上所述, 参芪健心方能够通过 NLRP3/Caspase-1 通路抑制 CHF 大鼠心肌细胞焦亡, 减轻心肌内炎症水平, 改善大鼠心肌细胞损伤及心肌纤维化。本研究不足之处在于 NLRP3 作为炎性传感器还受到上游信号的调控, 参芪健心方对其上游信号的调控仍待进一步研究; 且本研究观察时间短, 未来课题组将分阶段观察参芪健心方对 CHF 大鼠的长期疗效。

参考文献

- [1] DI PALO KE, BARONE NJ. Hypertension and heart failure: prevention, targets, and treatment[J]. Heart Fail Clin, 2020, 16(1): 99-106.
- [2] 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 2021》概述[J]. 中国心血管病研究, 2022, 20(7): 577-596.
- [3] 林冰冰, 王雳, 叶靖. 慢性心力衰竭的中西医研究进展[J]. 心血管病防治知识(学术版), 2020, 10(4): 93-96.
- [4] 卢健棋, 李苏依, 卢俊桑, 等. 中医药治疗慢性心力衰竭的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(12): 145-148.
- [5] 叶红, 李泽庚, 吴凡, 等. 新安固本培元派学术思想的渊源、脉络与启示[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(12): 7094-7097.
- [6] 施俊峰. 参芪健心方治疗气虚血瘀证慢性心力衰竭患者的临床观察[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2020.
- [7] 刘贝倍. 沙库巴曲缬沙坦联合参芪健心方治疗心肾阳虚型 HFrEF 患者的临床观察[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2021.
- [8] 赵永佳. 参芪健心方通过 TGF- β 1/Smad3 信号通路对慢性心力衰竭模型大鼠的保护作用及机制研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2022.
- [9] 赵美英. 参芪健心方对慢性心力衰竭模型大鼠心功能及钙调节蛋白水平的影响[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2021.
- [10] HIGASHIKUNI Y, LIU W, NUMATA G, et al. NLRP3 inflammasome activation through heart-brain interaction initiates cardiac inflammation and hypertrophy during pressure overload [J]. Circulation, 2023, 147(4): 338-355.

- [11]赵倩倩. 改良冠脉结扎术制备大鼠慢性心衰模型[J]. 生物化工, 2019, 5(4): 51-53.
- [12]李雪健, 张晓, 车运输, 等. 大鼠心力衰竭模型的建立与评估[J]. 心脏杂志, 2016, 28(6): 671-675.
- [13]陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [14]唐震, 张明雪. 中医药治疗慢性心力衰竭临床研究进展[J]. 实用中医内科杂志, 2022, 36(6): 8-11.
- [15]许秋雯. 慢性心衰不同中医证型心冲击图特征及其与心功能的相关性研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
- [16]MANN DL, GIVERTZ MM, VADER JM, et al. Effect of treatment with Sacubitril/Valsartan in patients with advanced heart failure and reduced ejection fraction: a randomized clinical trial[J]. JAMA Cardiol, 2022, 7(1): 17-25.
- [17]ZHANG L, JIANG YH, FAN C, et al. MCC950 attenuates doxorubicin-induced myocardial injury in vivo and in vitro by inhibiting NLRP3-mediated pyroptosis [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 143: 112133. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112133.
- [18]CASTIGLIONE V, AIMO A, VERGARO G, et al. Biomarkers for the diagnosis and management of heart failure[J]. Heart Fail Rev, 2022, 27(2): 625-643.
- [19]DEL RE DP, AMGALAN D, LINKERMANN A, et al. Fundamental mechanisms of regulated cell death and implications for heart disease [J]. Physiol Rev, 2019, 99(4): 1765-1817.
- [20]ZENG C, WANG R, TAN H. Role of pyroptosis in cardiovascular diseases and its therapeutic implications [J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(7): 1345-1357.
- [21]WANG F, LIANG Q, MA Y, et al. Silica nanoparticles induce pyroptosis and cardiac hypertrophy via ROS/NLRP3/Caspase-1 pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2022, 182: 171-181. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.
- [22]GAO Y, SHI H, DONG Z, et al. Current knowledge of pyroptosis in heart diseases [J]. J Mol Cell Cardiol, 2022, 171: 81-89. doi: 10.1016/j.yjmcc.2022.07.005.
- [23]COLL RC, SCHRODER K, PELEGRIÑ P. NLRP3 and pyroptosis blockers for treating inflammatory diseases [J]. Trends Pharmacol Sci, 2022, 3(8): 653-668.
- [24]ZENG C, DUAN F, HU J, et al. NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis contributes to the pathogenesis of non-ischemic dilated cardiomyopathy [J]. Redox Biol, 2020, 7(34): 101523.
- [25]ZHAO M, ZHANG J, XU Y, et al. Selective inhibition of NLRP3 inflammasome reverses pressure overload-induced pathological cardiac remodeling by attenuating hypertrophy, fibrosis, and inflammation [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 10(99): 108046.

The Effect of *Shenqi Jianxin Formula* (参芪健心方) on Cardiomyocyte Pyroptosis in Chronic Heart Failure Model Rats Based on the NLRP3/Caspase-1 Signaling Pathway

LIANG Guoqing¹, XIA Ran², WANG Yinyan¹, LIU Pan³, ZHANG Jun², DAI Xiaohua¹

1. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, 230031; 2. School of Chinese Medicine, Anhui University of Chinese Medicine; 3. Anhui Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of *Shenqi Jianxin Formula* (参芪健心方) in the treatment of chronic heart failure (CHF) from the perspective of pyroptosis. **Methods** Fifty-two rats were randomly divided into sham operation group (n=8) and modeling group (n=44). In the modeling group, the anterior descending branch of the left coronary artery was ligated to construct CHF rat model. Forty successfully-modelled rats were randomly divided into model group, Entresto group, *Shenqi Jianxin Formula* group, MCC950 group and the combination group (*Shenqi Jianxin Formula* plus MCC950), with 8 rats in each group. In *Shenqi Jianxin Formula* group, 7.4 g/(kg·d) of *Shenqi Jianxin Formula* was given by gavage, while in Entresto group, 68 mg/(kg·d) of Entresto suspension was given by gavage; in MCC950 group, MCC950 was injected intraperitoneally with 10 mg/kg once every other day, and in the combination group, 7.4 g/(kg·d) of *Shenqi Jianxin Formula* was given by gavage, and MCC950 was injected intraperitoneally with 10 mg/kg once every other day; 10 ml/(kg·d) of saline was given by gavage in the sham operation group and the model group. After 3 weeks of continuous intervention, serum brain B-type natriuretic peptide (BNP), creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB), interleukin 1β (IL-1β), and interleukin 18 (IL-18) levels were detected by ELISA; HE staining and MASSON staining were used to observe pathological changes in rat myocardium. Except for the Entresto group, western blot technique was used to detect the expression of NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), caspase-1, and apoptosis-associated speck-like protein possessing a caspase-recruiting domain (ASC); RT-PCR was used to detect the expression of NLRP3 and caspase-1 mRNA. **Results** Compared with the sham operation group, HE staining of rats in the model group showed obvious myocardial injury, while MASSON staining

showed increased area of collagen fibrosis, and serum BNP, CK-MB, IL-1 β , IL-18, myocardial tissue NLRP3, caspase-1, ASC protein expression and NLRP3, caspase-1 mRNA expression were all elevated ($P<0.05$). Compared with those in the model group, cardiomyocyte injury of rats and collagen fibrosis area were reduced, and serum BNP, CK-MB, IL-1 β , and IL-18 contents were all reduced in *Shenqi Jianxin Formula* group, Entresto group, MCC950 group, and the combination group; except for Entresto group, myocardial tissue NLRP3, caspase-1, ASC protein expression and NLRP3, caspase-1 mRNA expression were reduced in the remaining three medication group ($P<0.05$). Compared with *Shenqi Jianxin Formula* group, the MCC950 group and the combination group showed decreased serum IL-1 β and IL-18 content, collagen fibrosis area, myocardial tissue NLRP3, caspase-1 protein expression, and caspase-1 mRNA expression, and decreased ASC and NLRP3 mRNA expression was shown in the combination group ($P<0.05$). Compared with MCC950 group, collagen fibrosis area was reduced, and serum IL-18 content, NLRP3, caspase-1 mRNA expression were reduced in the combination group ($P<0.05$). **Conclusion** *Shenqi Jianxin Formula* can effectively improve the myocardial injury and heart failure in rats with CHF, and its mechanism may be related to the inhibition of cardiomyocyte pyroptosis through NLRP3/Caspase-1 pathway to reduce the level of intramyocardial inflammation. The combined use of MCC950 with *Shenqi Jianxin Formula* could more effectively inhibit myocardial pyroptosis, with better therapeutic result than single use of each part.

Keywords chronic heart failure; *Shenqi Jianxin Formula* (参芪健心方); pyroptosis; NLRP3/Caspase-1 pathway; MCC 950

(收稿日期: 2023-08-06; 修回日期: 2023-10-16)

[编辑: 王利芬]

《中医杂志》第五届编委会名单

顾问 (按姓氏笔画排序)

王琦 王永炎 邓铁涛 石学敏 刘志明 严世芸 吴咸中 沈自尹 张大宁
张学文 陈可冀 周仲瑛 周岱翰 姚乃礼 翁维良 唐由之 路志正 薛伯寿

主编 张伯礼

副主编 吴以岭 黄璐琦 王辰 刘保延 王国辰 刘良 唐旭东

委员 (按姓氏笔画排序)

马融 马建伟 王平 王伟 王阶 王辰 王健 王舒 王键 王忆勤
王传航 王庆国 王拥军 王国辰 王昌恩 王垂杰 王玲玲 王振国 王笑民 王晞星
王融冰 毛静远 卞兆祥 方剑乔 方祝元 东贵荣 叶永安 田金洲 史大卓 仝小林
曲韵智 吕晓东 朱江 朱立国 朱明军 乔明琦 刘良 刘中勇 刘长喜 刘凤斌
刘志顺 刘国正 刘金民 刘建平 刘保延 刘铜华 刘清国 刘清泉 池晓玲 孙增涛
花宝金 杜宝俊 李平 李宁 李军 李杰 李怡 李梢 李冀 李元文
李光熙 李宇航 李军祥 李灿东 李春梅 杨明 杨关林 杨志波 杨叔禹 杨明会
杨晋翔 连方 肖小河 吴伟 吴强 吴以岭 吴焕淦 何丽云 余曙光 汪受传
沈洪 张宁 张伟 张炜 张允岭 张声生 张伯礼 张念志 张学智 张俊龙
张俊华 张洪春 陆金根 陈明 陈士林 陈日新 陈立典 陈达灿 陈志强 陈家旭
范永升 林琳 林丽珠 林洪生 罗颂平 冼绍祥 郑锦 房敏 赵百孝 赵进喜
赵英凯 荣培晶 胡玲 胡义扬 胡镜清 侯炜 姜泉 秦裕辉 贾玉森 贾英杰
夏有兵 钱丽旗 倪青 徐浩 高云 高月 高颖 高秀梅 高希言 郭义
郭利平 唐旭东 黄煌 黄熙 黄燕 黄璐琦 曹洪欣 阎小萍 景向红 喻晓春
程海波 谢鸣 窦永起 裴晓华 翟双庆 戴昭宇 魏玮 魏军平