

桂枝通络片激活 PI3K/Akt 通路减轻心脏炎症改善小鼠心肌缺血再灌注损伤的作用及机制研究

张靖悦^{1,2,3}, 姚美丹^{1,2,3}, 庞淑瑾^{1,2,3}, 李静^{1,2,3}, 许芳^{1,2,3}, 关卓骥^{2,3},
吴辉^{2,3}, 方红城⁴, 王陵军^{1,2,3*}

(1. 广州中医药大学第一附属医院, 中医证候全国重点实验室, 广东 广州 510000;

2. 广东省中医临床研究院, 广东 广州 510000;

3. 广州中医药大学, 广东 广州 510000;

4. 深圳市中西医结合医院, 广东 深圳 518000)

[摘要] 探究桂枝通络片调节磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)通路抑制炎症对心肌缺血再灌注损伤(MIRI)的治疗作用及机制。将 60 只 SPF 级 C57BL/6J 雄性健康小鼠随机分为假手术组、模型组、桂枝通络片低剂量组、桂枝通络片中剂量组、桂枝通络片高剂量组、尼可地尔组, 结扎小鼠冠状动脉前降支 30 min 后恢复血流, 建立 MIRI 模型。术后 1 d 起, 桂枝通络片低、中、高剂量组小鼠分别给予桂枝通络片 0.51、1.03、2.06 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃, 尼可地尔组小鼠给予 2.28 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃, 假手术组及模型组小鼠给予等量生理盐水灌胃, 每日 1 次, 持续 4 周; 采用超声心动图检测小鼠心功能; 激光散斑血流成像仪分析各组小鼠微血管再灌注情况; 苏木精-伊红(HE)染色观察心脏病理变化; TUNEL 染色检测心肌细胞凋亡程度; qPCR 及酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测小鼠心脏炎症因子白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的表达水平; 转录组学测序方法寻找差异基因, 并利用京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析富集相关通路; Jess 全自动蛋白分析系统检测 PI3K/Akt 信号通路蛋白磷酸化磷脂酰肌醇-3-激酶(p-PI3K)、PI3K、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)、Akt 蛋白表达水平。结果显示, 与假手术组相比, 模型组小鼠左室射血分数(LVEF)、左室缩短分数(LVFS)显著降低, 心脏组织炎性细胞浸润显著增加, 心肌细胞排列紊乱, 心肌细胞凋亡显著增加, IL-1β、IL-6、TNF-α 表达量均明显升高, p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 水平明显降低; 与模型组对比, 桂枝通络片组小鼠心功能明显改善, 心脏炎性细胞浸润减少, 心脏结构有所恢复, 心肌细胞凋亡率和 IL-1β、IL-6、TNF-α 表达水平均明显下降, p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 水平明显升高。表明桂枝通络片能够有效防治 MIRI, 其作用机制可能是激活 PI3K/Akt 通路减轻心脏炎症。

[关键词] 桂枝通络片; 心肌缺血再灌注; 心脏炎症; PI3K/Akt 通路

Effect and mechanism of Guizhi Tongluo Tablets in alleviating cardiac inflammation and improving myocardial ischemia-reperfusion injury in mice by activating PI3K/Akt signaling pathway

ZHANG Jing-yue^{1,2,3}, YAO Mei-dan^{1,2,3}, PANG Shu-jin^{1,2,3}, LI Jing^{1,2,3}, XU Fang^{1,2,3}, GUAN Zhuo-ji^{2,3},
WU Hui^{2,3}, FANG Hong-cheng⁴, WANG Ling-jun^{1,2,3*}

(1. the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, National Key Laboratory of TCM Syndromes, Guangzhou 510000, China; 2. Guangdong Clinical Research Institute of Traditional Chinese Medicine,

[收稿日期] 2025-02-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82474403); 深圳市医疗卫生三名工程项目(SZZYSM202106006); 广东省基础与应用基础研究基金项目(2024A1515012171); 广州市科技局青年博士“启航”项目(2025A04J3792); 国家中医药传承创新中心青年项目(2023QN04); 国家中医药传承创新中心重点病种项目(心力衰竭)

[通信作者] * 王陵军, 博士, 主任医师, 研究方向为中医药防治心力衰竭, E-mail: smu868@163.com

[作者简介] 张靖悦, 博士研究生, 研究方向为中医药防治心力衰竭, E-mail: 1257344567@qq.com

Guangzhou 510000, China; 3. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China;
4. Shenzhen Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shenzhen 518000, China)

[Abstract] This study aimed to investigate the therapeutic effect and underlying mechanism of Guizhi Tongluo Tablets in myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) by regulating the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway and inhibiting inflammatory response. Sixty healthy SPF-grade male C57BL/6J mice were randomly divided into sham group, model group, low-dose Guizhi Tongluo Tablets group, medium-dose Guizhi Tongluo Tablets group, high-dose Guizhi Tongluo Tablets group, and nicorandil group. The MIRI model was established by ligating the left anterior descending coronary artery for 30 min followed by reperfusion. Beginning on day 1 after the operation, the mice in the low-, medium-, and high-dose Guizhi Tongluo Tablets groups received 0.51, 1.03, and 2.06 g·kg⁻¹·d⁻¹ by gavage, respectively. Mice in the nicorandil group were administered 2.28 mg·kg⁻¹·d⁻¹ by gavage. Mice in the sham group and the model group received an equal volume of normal saline once daily by gavage for four consecutive weeks. Cardiac function was assessed via echocardiography. Laser speckle contrast analysis (LASCA) was used to evaluate the microvascular reperfusion in each group. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in cardiac tissue, while TUNEL staining was used to detect the apoptosis of cardiomyocytes. The expression levels of inflammatory cytokines interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the myocardium were measured by qPCR and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Transcriptomic sequencing was conducted to identify differentially expressed genes, and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis was used to determine the related pathways. The protein expression levels of PI3K, phosphorylated PI3K (p-PI3K), Akt, and phosphorylated Akt (p-Akt) were analyzed using the Jess automated protein analysis system. The results showed that compared with the sham group, the model group exhibited significantly reduced left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular fractional shortening (LVFS), increased infiltration of inflammatory cells in the heart tissue, disorganized cardiomyocyte arrangement, and significantly increased cardiomyocyte apoptosis. Expression levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α were markedly upregulated, while the ratios of p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt were significantly decreased. Compared with the model group, mice in the Guizhi Tongluo Tablets groups showed significantly improved cardiac function, reduced inflammatory cell infiltration, partially restored cardiac structure, significantly decreased cardiomyocyte apoptosis and levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α , along with significantly increased p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt levels. These findings suggest that Guizhi Tongluo Tablets can effectively prevent and treat MIRI, possibly by activating the PI3K/Akt signaling pathway and alleviating cardiac inflammation.

[Key words] Guizhi Tongluo Tablets; myocardial ischemia-reperfusion; cardiac inflammation; PI3K/Akt pathway

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20250409.707

心肌梗死作为心血管系统的常见多发病,目前患病率处于持续上升阶段,是导致人类死亡的主要原因之一^[1-2]。及时再灌注治疗,如经皮冠状动脉介入治疗(PCI)等被认为是保护心脏功能和限制梗死面积的最有效的策略^[3]。然而大量临床和基础实验数据表明,再灌注治疗改善心肌供血的同时伴随着一系列病理生理反应,包括炎症、氧化应激、细胞钙超载等,最后出现心肌不可逆损伤,即发生心肌缺血再灌注损伤(MIRI)^[4-6]。目前,临床尚缺乏治疗MIRI的有效手段^[7]。炎症在MIRI的诱发和损伤加重过程中起重要作用,再灌注后,炎症细胞大量募集至局部损伤部位,随后多种信号通路被激活,最终导致许多促炎介质过度表达^[8]。因此,抑制炎症反应是治疗MIRI的重要手段。

桂枝通络片是本课题组温经通脉、活血化痰的

代表经验方,是广州中医药大学第一附属医院医疗机构制剂,目前在临床上用于动脉粥样硬化的治疗,疗效颇佳。前期基础研究发现桂枝通络片能够显著降低动脉粥样硬化小鼠白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎症因子的表达^[9-10],提示桂枝通络片能够抑制炎症反应,但桂枝通络片对MIRI的疗效及机制尚未有相关研究。因此本研究旨在探讨温经通脉、活血化瘀中药复方桂枝通络片对MIRI的治疗作用,并阐明其通过抑制炎症反应发挥改善MIRI的作用机制。

1 材料

1.1 动物 60只SPF级健康雄性C57BL/6J小鼠,8~10周龄,体质量20~25g,购自广州锐格生物科技有限公司[许可证号SYXK(粤)2021-0259],饲养于广州中医药大学SPF级实验动物中心[许可证号

SYXK(粤)2023-0347],饲养条件:室温 20~26 ℃,湿度 40%~70%,光照黑暗 12 h/12 h 交替,自由饮水和摄食,定时换气。适应性喂养 1 周后开始实验。本实验由广州中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理批号 20240523002)。

1.2 药物和试剂 桂枝通络片(包括桂枝、毛冬青、海藻,由广州中医药大学第一附属医院生产,批准文号粤药制字 Z20220002,批号 20230601);尼可地尔片(日本中外制药株式会社,进口药品注册证号 H20160539,批号 22J050Z)。

苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号 G1120);TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 C1089);DAPI 染色液(上海碧云天生物技术有限公司,批号 C1006);RNAzol(美国 MRC 公司,批号 RN190-500);SYBR™ Select Master Mix(美国 ThermoFisher Scientific 公司,批号 4472908);FastKing cDNA 第一链合成试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号 KR116];ExKine™ Pro 动物细胞/组织总蛋白提取试剂盒(柱式法)[亚科因(武汉)生物技术有限公司,批号 KTP3007-50T];BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 P0010);SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司,批号 AG11701);IL-1β、IL-6、TNF-α 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒[批号 E-EL-M0037、E-EL-M0044、E-EL-M3063,亚科因(武汉)生物技术有限公司];磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)抗体、磷酸化磷脂酰肌醇-3-激酶(p-PI3K)抗体、蛋白激酶 B(Akt)抗体及磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)抗体(批号 4257、4228、9272、4060,美国 CST 公司);β-actin 抗体、山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗(批号 66009-1-Ig、SA00001-2、SA00001-1,武汉三鹰生物技术有限公司);异氟烷(批号 R510-22-10,河北九派制药有限公司);苯巴比妥钠(批号 P5178,美国 Sigma 公司)。

1.3 仪器 Jess 全自动蛋白定量分析仪(美国 Protein Simple 公司);Inspira ASVv 型动物呼吸机(美国 Harvard 公司);Vevo2100 型小动物超声影像系统(加拿大 Visualsonics 公司);JB-P5 型石蜡包埋机(武汉俊杰电子有限公司);RM2016 型病理切片机(德国徕卡公司);MagNA Lyser 型组织匀浆仪(瑞士 Roche 公司);CFX96 Touch 型实时荧光定量 PCR

仪(美国 Bio-Rad 公司);IX73 型生物显微镜(日本 Olympus 公司);SIM BFI HR PRO 激光散斑血流成像仪(华中科技大学国家光电实验室)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 小鼠适应性喂养 1 周后随机分为假手术组、模型组、桂枝通络片低剂量组、桂枝通络片中剂量组、桂枝通络片高剂量组、尼可地尔组,每组各 10 只。按照 50 mg·kg⁻¹ 剂量腹腔注射 0.5%戊巴比妥钠溶液麻醉,麻醉成功后,左胸前区备皮,将小鼠仰卧位固定在恒温手术台上,术区消毒,经喉行气管插管,连接小动物呼吸机,设置呼吸机参数(潮气量 1.2 mL,呼吸频率每分钟 120 次)。连接心电图机记录小鼠心电活动。

沿胸骨左缘第 3、4 肋间斜行切开皮肤 1~2 cm,逐层钝性分离局部肌肉组织暴露心脏,用扩胸器扩大手术视野,撕开心包膜,在左心耳与动脉圆锥之间向下约 1 cm 处用 8-0 手术缝合线穿过左冠状动脉前降支下方,结扎血管,观察到左心室前壁及结扎部位局部的心肌组织变为灰白色,同时心电图显示 ST 段显著抬高,简易关胸,30 min 后用眼科剪剪断结扎线,此时小鼠心肌组织逐渐由灰白色恢复至淡红色,心电图显示 ST 段回落至正常。清理胸腔,逐层缝合胸壁肌肉及皮肤。待小鼠恢复正常呼吸后,拔除气管插管,将手术小鼠放至电热毯复温。假手术组只开胸进行相同的手术操作,但不结扎血管。术后连续 3 d 给予肌注青霉素 10 000 U 预防感染。

桂枝通络片成人剂量为 6.84 g·d⁻¹,尼可地尔片成人剂量为 15 mg·d⁻¹,参照第 3 版《中药药理研究方法学》折算方法(成人按 60 kg 计),得到小鼠每日低、中、高剂量药物质量浓度分别为 0.51、1.03、2.06 g·kg⁻¹。尼可地尔片药物质量浓度为 2.28 mg·kg⁻¹。将桂枝通络片及尼可地尔片于研钵中充分研碎,按每 10 g 体质量小鼠灌胃剂量为 0.1 mL 计算,充分溶解于适量无菌水中,并于摇床上摇匀过夜。假手术组及模型组小鼠给予等量生理盐水灌胃。小鼠造模 24 h 后开始给药,给药方法为每日灌胃 1 次,连续给药 4 周后评价相关指标。

2.2 超声心动图检测小鼠心功能 小鼠经鼻吸入 2.5%异氟烷气体麻醉,麻醉成功后,将小鼠仰卧固定于恒温操作台上,1.0%异氟烷气体维持麻醉,备皮,经超高分辨率小动物超声影像系统采集主要心功能指标:左室射血分数(LVEF)、左室缩短分数

(LVFS)、左心室舒张末期内径(LVIDd)、左心室收缩末期内径(LVIDs)等。

2.3 激光散斑血流分析仪检测小鼠微血管再灌注情况 按照前述造模方式将小鼠固定在恒温手术台上开胸,暴露心脏后,用激光散斑血流分析仪分析小鼠心脏微循环血管血流灌注量,每隔1 s采集1张图像,共采集30张图像,记录感兴趣区域(ROI)值。

2.4 心脏组织 HE 染色 将心脏组织灌洗分离,固定在4%多聚甲醛中,经过脱水、透明、石蜡包埋后,切成5 μm厚的薄片,将切片脱蜡、水化,分别用苏木精染液和伊红染液进行染色,染色结束后将切片脱水、透明,使用中性树胶将切片封固,利用光学显微镜观察组织病理切片。

2.5 心脏组织 TUNEL 染色 将2.4项的石蜡切片通过梯度乙醇进行脱蜡,滴加蛋白酶K工作液覆盖心脏组织,于37℃温箱孵育30 min,用PBS在脱色

摇床上晃动洗涤3次,每次5 min,滴加0.5% Triton X-100,常温下孵育20 min,再用PBS洗涤,按照试剂盒说明书配制TUNEL反应液,滴加至切片上,37℃恒温孵育1 h, PBS洗涤,滴加DAPI染色,室温避光孵育5 min后用抗荧光淬灭封片剂封片。利用荧光显微镜观察并采集图像。

2.6 qPCR 检测小鼠心脏炎症因子 用RNAzol法提取小鼠心脏组织总RNA,使用核酸分光光度计测定其浓度及纯度。按照FastKing cDNA第一链合成试剂盒说明书将RNA进行逆转录,得到cDNA。按照SYBR Green说明书配制qPCR反应体系,使用实时荧光定量PCR仪检测IL-1β、IL-6、TNF-α的mRNA表达水平。β-actin为内参基因,根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算mRNA相对表达量。qPCR引物在NCBI网站利用Primer BLAST工具进行设计及验证后委托生工生物工程(上海)有限公司合成,引物序列见表1。

表1 qPCR引物序列

Table 1 Primer sequences for qPCR

基因	正向序列(5'-3')	反向序列(5'-3')	产物长度/bp
IL-1β	TGGACCTTCCAGGATGAGGACA	GTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG	148
IL-6	TACCACTTCACAAGTCGGAGGC	CTGCAAGTCATCATCGTTGTTC	116
TNF-α	GGTGCTATGTCTCAGCCTCTT	GCCATAGAAGCTGATGAGAGGGAG	139
β-actin	CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG	TCCTGGAAGGTGGACAGTGAGG	244

2.7 ELISA 法检测小鼠血清炎症因子 用无菌EP管收集小鼠血清,室温静置2 h后收集上清液,4℃离心15 min。按照ELISA试剂盒说明书依次向包被单抗的酶标板中加入样品/对照品,37℃孵育90 min,使用洗涤缓冲液洗涤5次,去除未结合物质,向微孔中添加抗体37℃孵育60 min,形成抗原抗体结合物,再次洗涤后添加底物溶液37℃孵育15~30 min,加入终止液终止反应,在450 nm波长处检测吸光度。

2.8 转录组学测序技术(RNA-seq)检测各组小鼠心脏中差异表达基因和通路富集分析 利用RNAzol试剂提取心脏组织总RNA。使用Agilent 2100生物分析仪评估RNA的完整性。随后通过Oligo(dT)磁珠富集分离mRNA并进行随机片段化处理。用逆转录酶合成互补DNA(cDNA)。测序在Illumina Novaseq™ 6000平台进行。对原始测序读长进行过滤,获得干净测序读长。在NoveGene云平台上,使用R包FoldGene进行差异基因表达分

析,该包整合了每个基因的变化和 $P[P < 0.05, |\log_2(\text{fold change})| \geq 1]$,以识别差异表达基因(DEGs)。通过查询数据库并结合cluster Profiler工具检测差异基因在京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路中的富集情况。

2.9 Jess 全自动蛋白分析系统检测 PI3K/Akt 信号通路蛋白 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt 的表达 利用动物组织总蛋白试剂盒提取小鼠心脏总蛋白,BCA试剂盒测定蛋白浓度。按照Jess说明书依次将protein ladder、样品、p-PI3K抗体(1:50)、PI3K抗体(1:50)、p-Akt抗体(1:50)、Akt抗体(1:50)、β-actin抗体(1:100)、二抗、抗体稀释液、Streptavidin-HRP、Wash Buffer、发光液、洗脱液加入Jess测定板,机器自检完成后放入Jess板及对应的毛细管。利用Compass for Simple Western软件对检测数据进行定量分析,在条带图(lane)视图中创建蛋白条带。

2.10 统计学分析 应用SPSS 26.0和GraphPad

Prism 9.3 软件进行数据处理与分析, 计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据满足正态分布且方差齐, 多组间比较采用单因素方差 (One-way ANOVA) 分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 桂枝通络片对 MIRI 小鼠心功能的影响 与假

表 2 各组小鼠心功能比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Comparison of cardiac function of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量	LVEF/%	LVFS/%	LVIDd/mm	LVIDs/mm
假手术	-	74.62±1.53	41.93±1.63	2.84±0.30	1.65±0.13
模型	-	37.78±2.26 ²⁾	17.73±1.22 ²⁾	3.45±0.28 ²⁾	2.84±0.23 ²⁾
桂枝通络片	0.51 g·kg ⁻¹	46.70±4.66 ³⁾	22.70±2.61 ³⁾	3.41±0.26	2.68±0.25
	1.03 g·kg ⁻¹	53.10±0.97 ³⁾	26.45±0.27 ³⁾	3.22±0.30	2.37±0.21 ⁵⁾
	2.06 g·kg ⁻¹	69.95±3.01 ³⁾	38.30±2.43 ³⁾	3.11±0.30	1.92±0.22 ⁵⁾
尼可地尔	2.28 mg·kg ⁻¹	53.13±1.02 ³⁾	26.50±0.73 ³⁾	2.82±0.32 ⁵⁾	2.40±0.21 ⁴⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, ⁵⁾ $P < 0.001$ (表 3~7 同)。

3.2 桂枝通络片对 MIRI 小鼠心脏微血管再灌注血流的影响 利用激光散斑血流分析仪采集小鼠心脏微血管再灌注血流发现, 与假手术组相比, 模型组小鼠微血管再灌注血流量显著下降, 提示小鼠在发生 MIRI 后出现复流困难, 发生微循环障碍; 与模型组相比, 桂枝通络片中、高剂量组及尼可地尔组 ROI 值显著升高, 提示桂枝通络片能够发挥与尼可地尔片相似的增加血管再灌注血流、恢复血供的作用, 见表 3 和中国知网本文增强出版附加材料。

表 3 各组小鼠心脏微血管再灌注血流 ROI 值 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 3 Blood flow ROI of cardiac microvascular reperfusion of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量	ROI 值
假手术	-	716.56±55.09
模型	-	401.20±63.69 ²⁾
桂枝通络片	0.51 g·kg ⁻¹	438.67±24.45
	1.03 g·kg ⁻¹	509.81±43.00 ⁵⁾
	2.06 g·kg ⁻¹	551.09±30.32 ⁵⁾
尼可地尔	2.28 mg·kg ⁻¹	536.16±27.34 ⁵⁾

3.3 桂枝通络片对 MIRI 小鼠心脏组织病理变化的影响 利用 HE 染色观察小鼠心脏组织的病理变

化, 发现假手术组小鼠心脏结构完整, 心肌细胞排列整齐, 心肌纤维完整, 未见炎性细胞浸润; 而模型组小鼠心脏组织结构破坏, 部分心肌纤维排列紊乱甚至断裂, 炎症细胞浸润, 而桂枝通络片治疗能够减轻心脏组织的损伤, 见图 1。

手术组相比, 模型组小鼠 LVEF、LVFS 显著下降, LVIDs、LVIDd 显著升高, 提示小鼠造模 4 周后心功能明显下降; 与模型组比较, 桂枝通络片各剂量组及尼可地尔组小鼠 LVEF 显著升高, LVFS 显著升高; 中、高剂量组 LVIDs 显著降低, 尼可地尔组 LVIDs 明显降低; 桂枝通络片各剂量组 LVIDd 无明显差异, 而尼可地尔组 LVIDd 显著降低, 见表 2。

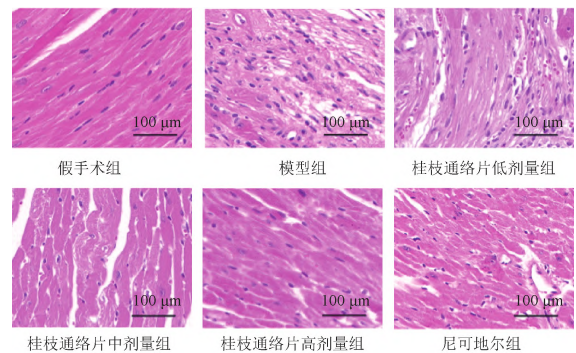


图 1 各组小鼠心脏组织 HE 染色 ($\times 200$)

Fig. 1 HE staining of heart tissue of mice in each group ($\times 200$)

3.4 桂枝通络片对 MIRI 小鼠心肌细胞凋亡率的影响 通过 TUNEL 染色标记凋亡的心肌细胞, 计算心肌细胞凋亡率, 结果发现, 与假手术组相比, 模型组小鼠心脏组织的心肌细胞凋亡率明显升高, 表明再灌注损伤会造成心肌细胞的凋亡; 与模型组比较, 桂

桂枝通络片各剂量组能够明显降低心肌细胞的凋亡率,见图2、表4。

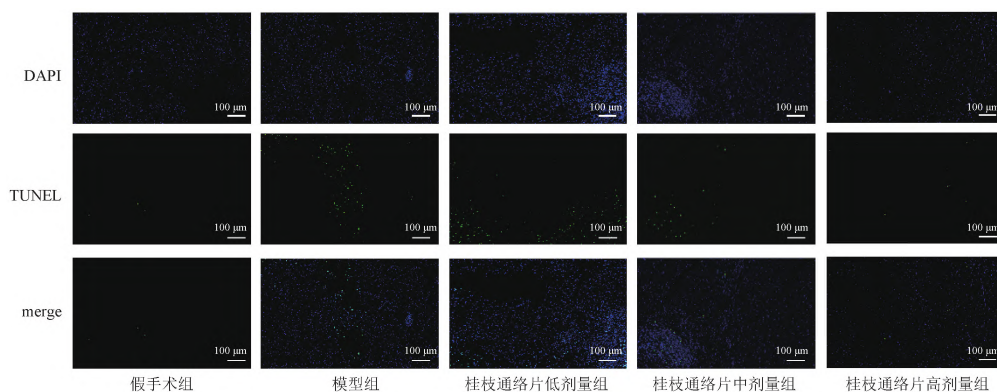


图2 各组小鼠心脏组织 TUNEL 染色($\times 200$)

Fig. 2 TUNEL staining of heart tissue of mice in each group ($\times 200$)

表4 各组小鼠心脏心肌细胞凋亡率($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Apoptosis rate of cardiac cardiomyocytes of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	心肌细胞凋亡率/%
假手术	-	1.54 ± 0.18
模型	-	$18.07 \pm 1.10^{2)}$
桂枝通络片	0.51	$14.22 \pm 0.77^{5)}$
	1.03	$10.57 \pm 0.62^{5)}$
	2.06	$6.61 \pm 0.54^{5)}$

3.5 桂枝通络片对 MIRI 小鼠心脏组织炎症因子表达水平的影响 与假手术组相比,模型组小鼠心脏组织中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的表达水平明显升高,这些促炎因子表达升高说明在 MIRI 过程中发生了

炎症反应;与模型组比较,桂枝通络片组能够降低 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的表达,抑制炎症的发生,见表5、6。

表5 各组小鼠心脏炎症因子 mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 5 mRNA expression levels of cardiac inflammatory factors of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	mRNA 相对表达		
		IL-1 β	IL-6	TNF- α
假手术	-	1.00 ± 0.35	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.29
模型	-	$2.13 \pm 0.27^{2)}$	$2.93 \pm 0.35^{2)}$	$6.80 \pm 0.70^{2)}$
桂枝通络片	0.51	$1.84 \pm 0.17^{3)}$	$2.35 \pm 0.19^{5)}$	$4.11 \pm 0.46^{5)}$
	1.03	$1.44 \pm 0.18^{5)}$	$1.85 \pm 0.15^{5)}$	$2.63 \pm 0.39^{5)}$
	2.06	$1.30 \pm 0.18^{5)}$	$1.50 \pm 0.12^{5)}$	$1.80 \pm 0.05^{5)}$

表6 各组小鼠心脏炎症因子表达水平($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 6 Expression levels of cardiac inflammatory factor of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-1 β / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	IL-6/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	TNF- α / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
假手术	-	77.12 ± 16.4	38.86 ± 10.55	8.97 ± 3.64
模型	-	$275.92 \pm 36.06^{2)}$	$789.83 \pm 106.00^{2)}$	$88.65 \pm 15.06^{2)}$
桂枝通络片	0.51	236.17 ± 26.93	$526.47 \pm 47.83^{5)}$	$68.19 \pm 12.30^{4)}$
	1.03	$158.51 \pm 36.95^{5)}$	$282.45 \pm 53.25^{5)}$	$45.61 \pm 9.10^{5)}$
	2.06	$118.37 \pm 26.05^{5)}$	$123.57 \pm 40.86^{5)}$	$16.92 \pm 1.93^{5)}$

3.6 基于转录组学测序分析桂枝通络片治疗 MIRI 的靶点和通路 取假手术组、模型组和桂枝通络片高剂量组小鼠心脏进行转录组学测序分析,Venn 图见中国知网本文增强出版附加材料,3 组间发现 363

个差异基因,对差异基因进行 KEGG 通路富集分析,发现这些差异基因参与了 Janus 激酶(JAK)/信号转导和转录激活因子(STAT)信号通路、核因子- κ B(NF- κ B)信号通路、PI3K/Akt 信号通路等,见图3。

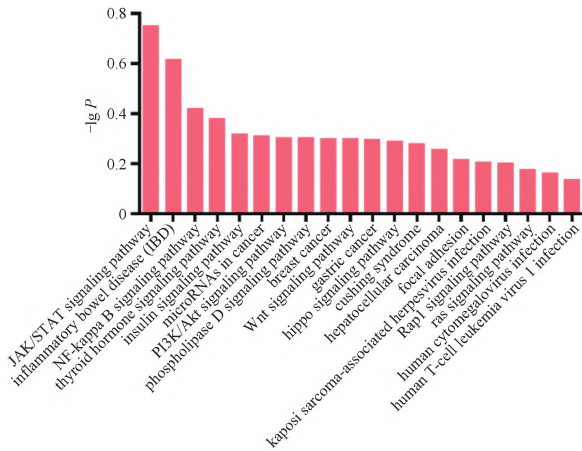


图3 KEGG 通路分析
Fig.3 KEGG pathway analysis

3.7 桂枝通络片对 MIRI 小鼠心脏组织中 PI3K/Akt 通路的影响 利用 Jess 全自动蛋白系统检测 PI3K/Akt 通路蛋白的表达水平,与假手术组比较,模型组小鼠心脏组织中 p-PI3K/PI3K 及 p-Akt/Akt 的比值明显下降,证明 MIRI 发生后,PI3K/Akt 通路被抑制;相较于模型组,桂枝通络片不同剂量干预后小鼠心脏组织的 p-PI3K/PI3K 及 p-Akt/Akt 的比值不同程度升高,证明桂枝通络片能够激活 MIRI 后 PI3K/Akt 通路,见图 4、表 7。

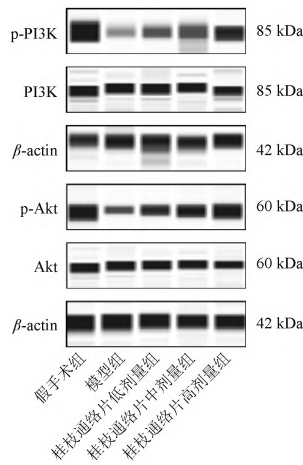


图4 各组小鼠心脏 p-PI3K/PI3K 及 p-Akt/Akt 的蛋白条带
Fig.4 Protein band of p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt in the hearts of mice in each group

4 讨论

再灌注是挽救心肌梗死的关键治疗策略,然而再灌注治疗伴随的缺血再灌注损伤会造成心肌梗死面积扩大、心律失常、心力衰竭等,是心肌梗死患者

表7 各组小鼠心脏 p-PI3K/PI3K 及 p-Akt/Akt 的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 Expression levels of p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt in the hearts of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
假手术	-	1.00±0.22	1.00±0.19
模型	-	0.32±0.14 ¹⁾	0.23±0.01 ²⁾
桂枝通络片	0.51	0.37±0.08	0.36±0.02 ⁴⁾
	1.03	0.48±0.09 ³⁾	0.45±0.01 ⁵⁾
	2.06	0.62±0.04 ⁴⁾	0.77±0.12 ⁵⁾

发生长期不良事件的重要危险因素^[11]。MIRI 涉及多种病理因素,其中炎症反应是其发生发展的重要环节。MIRI 发生时,促炎单核/巨噬细胞分泌大量炎症因子,如 IL-1 β 、IL-6 等迅速浸润至损伤部位,表现出强烈的炎症表型,甚至暴发炎症风暴,造成心肌的严重损伤^[12-13]。然而,目前临床对 MIRI 的治疗手段十分有限,且缺乏通过调节炎症反应来改善 MIRI 的药物^[7]。

中医理论认为,MIRI 因本虚标实而发病,阳虚瘀阻为其主要病机^[14]。温阳活血中药能够多靶点、多途径作用于 MIRI 炎症反应的多个病理环节,有效阻断炎症级联反应,保护缺血心肌组织^[15-16]。桂枝通络片是本课题组温经通脉、活血化瘀的代表验方,目前已获批为广东省医疗机构制剂,由桂枝、毛冬青、海藻 3 味中药组成,其中,桂枝辛温,温经通脉;毛冬青性平,微甘,活血通脉;海藻咸寒,化痰散结,3 味药相辅相成,共奏温经通脉、活血化瘀之效。前期临床和基础研究发现,桂枝通络片能够有效降低动脉粥样硬化小鼠炎症因子的水平^[9],提示桂枝通络片发挥临床疗效可能与抗炎相关。

为进一步扩展桂枝通络片的临床应用,研究桂枝通络片对 MIRI 的疗效和机制,本研究构建 MIRI 小鼠模型,予不同剂量桂枝通络片干预,发现 MIRI 小鼠心功能下降,心脏组织炎性细胞浸润增加,心脏纤维排列紊乱,心肌细胞凋亡率及促炎因子表达升高;而桂枝通络片干预后能够改善 MIRI 小鼠心功能,减轻 MIRI 造成的心肌损伤、心肌细胞凋亡及炎症反应,表明桂枝通络片能够有效抑制 MIRI 后炎症反应的发生进而改善 MIRI。

MIRI 的发病机制涉及多个信号通路,如 PI3K/Akt 信号通路、JAK/STAT 信号通路和核因子 E2 相

关因子(Nrf2)/NF- κ B 信号通路等^[17]。本研究对差异基因的 KEGG 通路分析与此一致。其中 PI3K/Akt 信号通路已被证明能够调节与 MIRI 进展相关分子通路之间的相互作用,可能是新的治疗靶点^[18]。有研究证明,在 MIRI 小鼠模型中,激活 PI3K/Akt 通路,上调 p-PI3K 和 p-Akt 的表达,能够抑制心脏组织 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的释放进而减轻心脏炎症,同时能够抑制 B 细胞淋巴瘤-2 蛋白家族-2 相关 X 蛋白(Bax)和半胱天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)的表达而减轻心肌细胞凋亡^[19-20]。本研究结果表明,桂枝通络片干预后,MIRI 小鼠心脏的 p-PI3K/PI3K 比值及 p-Akt/Akt 比值升高,PI3K/Akt 信号通路被激活,证明桂枝通络片可能是通过 PI3K/Akt 信号通路发挥抑制心脏炎症和心肌细胞凋亡进而改善 MIRI 的作用。

综上,本研究显示,桂枝通络片能够显著改善 MIRI 小鼠心功能,恢复血管再灌注血流,减轻心肌细胞的凋亡,其机制可能是通过激活 PI3K/Akt 信号通路减轻心脏炎症反应,为桂枝通络片的临床应用提供了一定的科学依据,但其潜在机制及桂枝通络片的有效成分仍需进一步研究。

[参考文献]

- [1] HANSON I D, RUSIA A, PALOMO A, et al. Treatment of acute myocardial infarction and cardiogenic shock: outcomes of the RECOVER III postapproval study by society of cardiovascular angiography and interventions shock stage [J]. *J Am Heart Assoc*, 2024, 13(3): e31803.
- [2] 刘明波,何新叶,杨晓红,等.《中国心血管健康与疾病报告 2023》概要(心血管疾病流行及介入诊疗状况) [J]. *中国介入心脏病学杂志*, 2024, 32(10): 541.
- [3] LAWTON J S, TAMIS-HOLLAND J E, BANGALORE S, et al. 2021 ACC/AHA/SCAI guideline for coronary artery revascularization: a report of the american college of cardiology/american heart association joint committee on clinical practice guidelines [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2022, 79(2): e21.
- [4] HEUSCH G. Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17(12): 773.
- [5] GE X, MENG Q, WEI L, et al. Myocardial ischemia-reperfusion induced cardiac extracellular vesicles harbour proinflammatory features and aggravate heart injury [J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(4): e12072.
- [6] HAUSENLOY D J, YELLON D M. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(1): 92.
- [7] DEL B M, MONTONE R A, CAMILLI M, et al. Coronary microvascular dysfunction across the spectrum of cardiovascular diseases: JACC state-of-the-art review [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2021, 78(13): 1352.
- [8] TIMMERS L, PASTERKAMP G, DE HOOG V C, et al. The innate immune response in reperfused myocardium [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 94(2): 276.
- [9] PAN X, XU H, DING Z, et al. Guizhitongluo Tablet inhibits atherosclerosis and foam cell formation through regulating Piezo1/NLRP3 mediated macrophage pyroptosis [J]. *Phytomedicine*, 2024, 132: 155827.
- [10] 何星灵,李思静,李姿儒,等.桂枝通络片通过抑制 CD72hi 巨噬细胞缓解动脉粥样硬化的疗效与机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2025, 50(5): 1298.
- [11] MA L, ZOU R, SHI W, et al. SGLT2 inhibitor dapagliflozin reduces endothelial dysfunction and microvascular damage during cardiac ischemia/reperfusion injury through normalizing the XO-SERCA2-CaMK II-cofflin pathways [J]. *Theranostics*, 2022, 12(11): 5034.
- [12] SAXENA A, RUSSO I, FRANGOGIANNIS N G. Inflammation as a therapeutic target in myocardial infarction: learning from past failures to meet future challenges [J]. *Transl Res*, 2016, 167(1): 152.
- [13] CAO Y, XU Y, AUCHOYBUR M L, et al. Regulatory role of IKK α in myocardial ischemia/reperfusion injury by the determination of M1 versus M2 polarization of macrophages [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 123: 1.
- [14] 朱文叶,王肖龙,高俊杰,等.中医药在防治急性心肌缺血/再灌注损伤中的研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2015, 12(29): 31.
- [15] 唐丹丽,张华敏,佟琳,等.中医不同治法对心肌缺血再灌注损伤大鼠炎症相关细胞因子的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2013, 20(1): 40.
- [16] 赵志成,梁国英.麦冬皂苷 D 调节 SphK1/S1P/S1PR1 信号通路对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌炎症的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 11(35): 1698.
- [17] XING X, GUO S, ZHANG G, et al. miR-26a-5p protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2020, 53(2): e9106.
- [18] TANG F, WANG Y, HEMMINGS B A, et al. PKB/Akt-dependent regulation of inflammation in cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 48: 62.
- [19] ZHAO C, YANG Y, AN Y, et al. Cardioprotective role of phyllanthin against myocardial ischemia-reperfusion injury by alleviating oxidative stress and inflammation with increased adenosine triphosphate levels in the mice model [J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36(1): 33.
- [20] YANG B, WANG J, ZHAO Y, et al. Attenuating ischemia/reperfusion injury in rat cardiac transplantation by intracoronary infusion with siRNA cocktail solution [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(8): BSR20193937.

[责任编辑 陈玲]