

秦皮甲素通过调节 TLR/NF- κ B 途径抑制脂多糖诱导的心肌损伤

吴暖¹, 黄婧文¹, 王志胜^{2*}, 段启龙², 张松兰³, 姚志灵⁴ (1. 青岛大学附属青岛市海慈医院/青岛市中医医院干部保健科, 山东 青岛 266033; 2. 山东医学高等专科学校医学系, 济南 250001; 3. 济南市市中区人民医院神经内科, 济南 250001; 4. 山东省立第三医院老年病科, 济南 250031)

摘要: 目的 研究秦皮甲素对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导大鼠心肌损伤及 TLR/NF- κ B 途径的影响。方法 构建 LPS 诱导心肌损伤模型, 将大鼠分为对照组、LPS 组、秦皮甲素低剂量组(20 mg·kg⁻¹)、秦皮甲素中剂量组(40 mg·kg⁻¹)、秦皮甲素高剂量组(80 mg·kg⁻¹)和阳性对照组(地塞米松 2 mg·kg⁻¹)。心脏超声检测心脏功能, HE 染色检测心脏组织损伤程度。ELISA 检测血液中肌钙蛋白(cardiac troponin I, cTnI), 肌酸激酶同工酶[creatin kinase(CK)-MB, CK-MB], 肌红蛋白(myoglobin, Mb), 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), 白介素-6(interleukin-6, IL-6), IL-1 β , 丙二醛(malondialdehyde, MDA), 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的含量。Western blotting 检测 Toll 样受体 2(Toll-like receptor 2, TLR2), TLR4, 骨髓分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88), 白介素 1 受体相关激酶(interleukin-1 receptor-associated kinases, IRAK1)和磷酸化核因子- κ B(phosphorylated-nuclear factor- κ B, p-NF- κ B)的蛋白相对表达量。结果 与 LPS 组相比, 在秦皮甲素治疗后, 心率、左室壁相对厚度和左心室射血分数均显著升高($P < 0.05$), 而左室收缩末容积显著降低($P < 0.05$)。心肌酶 cTnI、CK-MB 和 Mb 的表达量显著下调($P < 0.05$); 促炎细胞因子 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的表达量下调($P < 0.05$); 氧化应激标记物中 SOD 含量显著升高($P < 0.05$), 而 MDA 和 MPO 含量均显著降低($P < 0.05$); TLR2、TLR4、MyD88、IRAK1 和 p-NF- κ B 蛋白表达水平均显著下调($P < 0.05$)。结论 秦皮甲素对 LPS 诱导心肌损伤具有保护作用, 并抑制 TLR/NF- κ B 信号通路。

关键词: 秦皮甲素; LPS 诱导心肌损伤; 炎症; TLR/NF- κ B 途径

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)24-3143-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.24.015

引用本文: 吴暖, 黄婧文, 王志胜, 等. 秦皮甲素通过调节 TLR/NF- κ B 途径抑制脂多糖诱导的心肌损伤[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(24): 3143-3148.

Esculin Inhibits Lipopolysaccharide-induced Myocardial Injury by Regulating TLR/NF- κ B Pathway

WU Nuan¹, HUANG Jingwen¹, WANG Zhisheng^{2*}, DUAN Qilong², ZHANG Songlan³, YAO Zhiling⁴ (1. Department of Cadre Health Care, Qingdao Haici Hospital Affiliated to Qingdao University/Qingdao Traditional Chinese Medicine Hospital, Qingdao 266033, China; 2. Department of Medicine, Shandong Medical College, Jinan 250001, China; 3. Department of Neurology, People's Hospital of Central District of Jinan City, Jinan 250001, China; 4. Department of Geriatrics, The Third Hospital of Shandong Province, Jinan 250031, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of esculin on lipopolysaccharide(LPS)-induced myocardial injury and TLR/NF- κ B pathway in rats. **METHODS** The myocardial injury model induced by LPS was established. Rats were randomly divided into control group, LPS group, esculin low dose group(20 mg·kg⁻¹), esculin middle dose group(40 mg·kg⁻¹), esculin high dose group (80 mg·kg⁻¹) and positive control group(dexamethasone, 2 mg·kg⁻¹). Cardiac function was detected by echocardiography, and the degree of cardiac histological damage was detected by HE staining. The content of cardiac troponin I(cTnI), creatine kinase(CK)-MB(CK-MB), myoglobin(Mb), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-1 β , malondialdehyde(MDA), superoxide dismutase(SOD) and myeloperoxidase(MPO) in blood were detected by ELISA. The protein expressive levels of Toll-like receptor 2(TLR2), TLR4, myeloid differentiation factor 88(MyD88), interleukin-1 receptor-associated kinases(IRAK1) and phosphorylated-nuclear factor- κ B(p-NF- κ B) were detected by Western blotting in cardiac tissue. **RESULTS** Compared with the LPS group, the levels of heart rate, left ventricular wall thickness and left ventricular ejection fraction were significantly increased after esculin treatment($P < 0.05$), while left ventricular end systolic volume was significantly decreased($P < 0.05$). The expression of myocardial enzymes cTnI, CK-MB and Mb was significantly down-regulated($P < 0.05$). The expression of pro-inflammatory cytokines IL-6, TNF- α and IL-1 β were down-regulated($P < 0.05$). The oxidative stress markers SOD content was increased significantly($P < 0.05$), while MDA and MPO content was decreased

基金项目: 山东省中医药科技项目(2020Q076)

作者简介: 吴暖, 女, 主治医师 Tel: 13573826658 E-mail: shengcike21@sina.com *通信作者: 王志胜, 男, 硕士, 副教授 Tel: 16653196573 E-mail: zishaishenshi@sina.com

中国现代应用药学 2021 年 12 月第 38 卷第 24 期

Chin J Mod Appl Pharm, 2021 December, Vol.38 No.24

· 3143 ·

significantly ($P < 0.05$). Protein expression levels TLR2, TLR4, MyD88, IRAK1 and p-NF- κ B were significantly reduced ($P < 0.05$).

CONCLUSION Esculin has a protective effect on LPS-induced myocardial injury and inhibits TLR/NF- κ B signaling pathway.

KEYWORDS: esculin; LPS-induced myocardial injury; inflammation; TLR/NF- κ B pathway

脓毒症是由一系列不适当的免疫反应引起的致命综合征^[1]。脓毒症如果不及时控制,将发展为全身炎症反应综合征,最终导致多器官功能障碍^[2]。脓毒症引起的心肌病是脓毒症和脓毒症休克中普遍存在的并发症之一。脓毒症引起的心肌病患者最早的临床表现为心功能障碍,表现为左室扩张,射血分数下降,7~10 d可恢复^[3]。在细胞和分子水平上,炎症、凋亡和坏死被认为是脓毒症引起的心肌病的重要病理现象^[4]。目前,腹腔注射脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)已被广泛接受为脓毒症临床相关模型之一^[5]。因此,笔者利用该模型来确定秦皮甲素是否能预防 LPS 诱导的心肌损伤。秦皮甲素是一种香豆素衍生物,从木犀科白蜡(*Fraxinus chinensis* Roxb)中提取,广泛分布在亚洲东部,特别是中国南部。有研究表明秦皮甲素对小鼠的糖尿病和氧化应激相关的肾脏炎症过程有保护作用^[6]。也有研究表明秦皮甲素对 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤具有较强的抗炎作用,能减弱 LPS 诱导的炎症细胞浸润,改善肺功能^[7]。心肌细胞氧化应激反应被认为是脓毒症诱导的心脏毒性的标志,内源性抗氧化活性的增强已被证明具有显著的心脏保护作用^[8]。已有研究表明, Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)介导骨髓分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)依赖的 NF- κ B 信号通路的激活,并释放下游炎症因子包括肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-8、IL-1 β , 这些炎症因子在随后的脓毒症级联反应中发挥作用^[9-10]。病原菌侵入机体后,通过细胞膜,然后刺激细胞内信号通路从而促进炎症因子的级联反应,这在脓毒症心肌损伤的发病机制中起重要作用。而 TLR-4/NF- κ B 信号通路是脓毒症心肌损伤的重要环节^[11]。综上所述,本研究旨在研究秦皮甲素是否能缓解脓毒症诱导心肌炎症。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

秦皮甲素(批号: A0020)、地塞米松(批号: 50-02-2)均购自国家食品和药物管制研究所; LPS (美国 sigma-Aldrich, 批号: L2630); 肌钙蛋白(cardiac troponin I, cTnI, 批号: E019-1-1)、肌酸

激酶同工酶[creatin kinase (CK)-MB, CK-MB, 批号: H197-1-1]、肌红蛋白(myoglobin, Mb, 批号: H150)、TNF- α (批号: H052-1)、IL-6(批号: H007-1-1)、IL-1 β (批号: H002)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO, 批号: A044-1-1)、丙二醛(malondialdehyde, MDA, 批号: A003-1-2)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD, 批号: A001-3-2)均购于南京建成生物工程研究所; BCA 试剂盒(批号: P0012)、牛血清白蛋白(批号: S7023)购自上海碧云天生物技术有限公司; TLR2(1 : 1 000, 货号: 12276T)、TLR4(1 : 1 000, 货号: 14358S)、MyD88(1 : 1 000, 货号: 42835)、白介素 1 受体相关激酶(interleukin-1 receptor-associated kinases, IRAK1, 1 : 1 000, 货号: 45043)、磷酸化核因子- κ B(phosphorylated-Nuclear factor- κ B, p-NF- κ B, 1 : 1 000, 货号: 42395)均购自 Cell Signaling Technology。

BX43 显微镜(日本奥林巴斯公司); Bio-Rad iMark 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); Mini Protean 3 Dodeca 电泳仪及 Trans-Blot SD 半干转膜仪均购自美国伯乐公司; Gel View 6000 化学发光凝胶成像系统(广州云星仪器有限公司); Vevo 2100 小动物超声仪(加拿大 Visual Sonics 公司)。

1.2 动物

健康清洁级 SD 大鼠 90 只(♂, 鼠龄 7~8 周, 体质量 260~280 g), 购自山东大学实验动物中心, 动物生产许可证号: SCXK(鲁) 2019-0003。在 SPF 环境独立通气笼(温度: 25 °C; 相对湿度: 40%~70%)中常规饲养 1 周。试验严格遵循 3R 原则。

1.3 大鼠 LPS 诱导心肌损伤模型建立及治疗

大鼠随机分为以下 6 组: 对照组、LPS 组、秦皮甲素低剂量组(20 mg·kg⁻¹)、秦皮甲素中剂量组(40 mg·kg⁻¹)、秦皮甲素高剂量组(80 mg·kg⁻¹)^[12]和阳性对照组(地塞米松 2 mg·kg⁻¹)^[5]。对照组和 LPS 组灌胃相同体积的 0.9%氯化钠溶液。给药组大鼠连续灌胃 7 d 秦皮甲素, 末次给药 1 h 后, 大鼠腹腔注射 15 mg·kg⁻¹ LPS(大肠杆菌 055:B5)^[5]。LPS 处理 6 h 后, 用戊巴比妥钠(按体质量 60 mg·kg⁻¹)麻醉大鼠^[5]。采用心脏穿刺取血样进行分析。然后小心地采集心脏组织, 迅速冷冻在液氮中, 并在 -80 °C 下保存。

1.4 超声心动图

用2%异氟烷麻醉大鼠。然后,使用配有10 MHz线性阵列MyLab 30CV超声系统进行超声心动图检查,并记录每只大鼠的心脏结构和功能参数,包括心率(heart rate, HR),左室壁相对厚度(left ventricular wall thickness, LVWT),左室收缩末容积(left ventricular end systolic volume, LVESV)和左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)。

1.5 HE染色

采集大鼠心脏组织,用苏木精伊红染色,并在显微镜下进行观察。

1.6 酶联免疫吸附法

大鼠心脏取血2 mL并于4℃下以3 000 r·min⁻¹离心10 min,取血清。根据制造商的说明书,直接测量血清中cTnI、CK-MB、Mb、TNF-α、IL-6、IL-1β和MPO的含量。用iMark酶标仪测定光密度。使用ELISA试剂盒提供的细胞因子标准品建立测量的标准曲线。

1.7 试剂盒检测MDA和SOD的含量

MDA浓度和SOD活性根据制造商的说明使用检测试剂盒。

1.8 Western blotting 检测TLR2、TLR4、MyD88 IRAK1和p-NF-κB蛋白相对表达量

心脏组织加入液氮研磨,并用裂解缓冲液裂解在4℃并以14 000 r·min⁻¹离心15 min,形成浓缩蛋白质。其中蛋白浓度由BCA试剂盒检测。然后20 μg总蛋白在12%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,并转移至聚偏二氟乙烯膜。将膜在37℃下用1 h封闭5%的牛血清白蛋白,然后与抗TLR2(1:1 000)、TLR4(1:1 000)、MyD88(1:1 000)、IRAK1(1:1 000)和p-NF-κB(1:1 000)在4℃过夜。用TTBS洗涤后缓冲液(含Tween-20的Tris缓冲盐水),加入辣根过氧化物酶标记的山羊

抗兔IgG(二抗,1:5 000)37℃反应1 h;洗膜后ECL曝光成像并应用Quantity One软件分析蛋白条带的灰度值。

1.9 统计分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,然后用SPSS 22.0进行统计分析,不同处理之间用Duncan法多重性比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 秦皮甲素对LPS诱导的心肌损伤大鼠心脏功能影响

与对照组相比,LPS组大鼠的HR、LVWT和LVEF均显著降低,而LVESV显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在秦皮甲素治疗后,与LPS组相比,秦皮甲素中、高剂量组HR、LVWT和LVEF均显著升高,而LVESV显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在地塞米松治疗后,与LPS组相比,阳性对照组HR、LVWT和LVEF均显著升高,而LVESV显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表1。

2.2 秦皮甲素对LPS诱导的心肌损伤大鼠心脏损伤标记物影响

与对照组相比,LPS组cTnI、CK-MB和Mb均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在秦皮甲素治疗后,与LPS组相比,秦皮甲素中、高剂量组cTnI、CK-MB和Mb均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在地塞米松治疗后,与LPS组相比,阳性对照组cTnI、CK-MB和Mb均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表2。

2.3 秦皮甲素对LPS诱导的心肌损伤大鼠心脏损伤标记物的影响

与对照组相比,LPS组HE染色结果表明心肌间隙增宽,心肌细胞严重肿胀,附着炎症细胞增加,结构变得模糊。在秦皮甲素和地塞米松治疗后,与LPS组相比,以上现象均得到缓解。结果见图1。

表1 秦皮甲素对LPS诱导的心肌损伤大鼠心脏功能影响($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

Tab. 1 Effect of esculin on cardiac function in LPS-induced myocardial injury rats($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

分组	每分钟HR/次	LVWT/mm	LVESV/ μ L	LVEF/%
对照组	425.36 $\pm$ 35.04	0.79 $\pm$ 0.04	26.21 $\pm$ 3.57	54.26 $\pm$ 4.52
LPS组	289.98 $\pm$ 31.57 ¹⁾	0.56 $\pm$ 0.03 ¹⁾	54.59 $\pm$ 5.09 ¹⁾	31.59 $\pm$ 3.98 ¹⁾
秦皮甲素低剂量组(20 mg·kg ⁻¹)	317.64 $\pm$ 28.45	0.62 $\pm$ 0.04	45.63 $\pm$ 4.21	34.49 $\pm$ 4.26
秦皮甲素中剂量组(40 mg·kg ⁻¹)	348.07 $\pm$ 30.82 ²⁾	0.68 $\pm$ 0.03 ²⁾	36.48 $\pm$ 4.02 ²⁾	40.37 $\pm$ 4.09 ²⁾
秦皮甲素高剂量组(80 mg·kg ⁻¹)	390.13 $\pm$ 27.49 ²⁾	0.74 $\pm$ 0.03 ²⁾	30.05 $\pm$ 3.88 ²⁾	46.57 $\pm$ 4.77 ²⁾
阳性对照组	389.16 $\pm$ 29.78 ²⁾	0.77 $\pm$ 0.03 ²⁾	31.84 $\pm$ 3.91 ²⁾	50.19 $\pm$ 3.62 ²⁾

注:与对照组相比,¹⁾ $P < 0.05$;与LPS组相比,²⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with the LPS group, ²⁾ $P < 0.05$.

表 2 秦皮甲素对 LPS 诱导的心肌损伤大鼠心脏损伤标记物的影响($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

Tab. 2 Effect of esculin on cardiac injury markers in LPS-induced myocardial injury rats($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

分组	cTnI/ng·mL ⁻¹	CK-MB/U·L ⁻¹	Mb/ng·mL ⁻¹
对照组	0.08±0.03	26.34±2.47	32.15±3.78
LPS 组	0.54±0.09 ¹⁾	84.29±7.59 ¹⁾	105.09±17.61 ¹⁾
秦皮甲素低剂量组 (20 mg·kg ⁻¹)	0.42±0.07	78.16±6.48	99.82±15.34
秦皮甲素中剂量组 (40 mg·kg ⁻¹)	0.32±0.05 ²⁾	56.12±5.83 ²⁾	67.27±8.75 ²⁾
秦皮甲素高剂量组 (80 mg·kg ⁻¹)	0.16±0.04 ²⁾	38.05±4.15 ²⁾	46.33±4.99 ²⁾
阳性对照组	0.12±0.02 ²⁾	30.12±3.60 ²⁾	40.41±3.56 ²⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与 LPS 组相比, ²⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the LPS group, ²⁾ $P<0.05$.

2.4 秦皮甲素对 LPS 诱导的心肌损伤大鼠心脏细胞因子的影响

与对照组相比,在 LPS 组 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 蛋白表达水平均显著上调,差异有统计学意义($P<0.01$)。在秦皮甲素治疗后,与 LPS 组相比,秦皮甲素中、高剂量组 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 蛋白表达水平均显著下调,差异有统计学意义($P<0.01$)。在地塞米松治疗后,与 LPS 组相比,IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 蛋白表达水平均显著下调,差异有统计学意义($P<0.05$)。结果见表 3。

2.5 秦皮甲素对 LPS 诱导的心肌损伤大鼠心脏氧化应激的影响

与对照组相比, LPS 组 SOD 含量显著降低,而 MDA 和 MPO 含量均显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。在秦皮甲素治疗后,与 LPS 组相比,秦皮甲素中、高剂量组 SOD 含量显著升高,而 MDA 和 MPO 含量均显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。在地塞米松治疗后,与 LPS 组相比, SOD 含量显著升高,而 MDA 和 MPO 含量均显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。结果见表 4。

2.6 秦皮甲素对 LPS 诱导的心肌损伤大鼠 TLR/NF- κ B 途径影响

与对照组相比, LPS 组 TLR2、TLR4、MyD88、IRAK1 和 p-NF- κ B 蛋白的表达量显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。在秦皮甲素治疗后,与 LPS 组相比,秦皮甲素中、高剂量组 TLR2、TLR4、MyD88、IRAK1 和 p-NF- κ B 蛋白表达水平均显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。在地塞米松治疗后,与 LPS 组相比,TLR2、TLR4、MyD88、IRAK1 和 p-NF- κ B 蛋白表达水平均显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。结果见图 2。

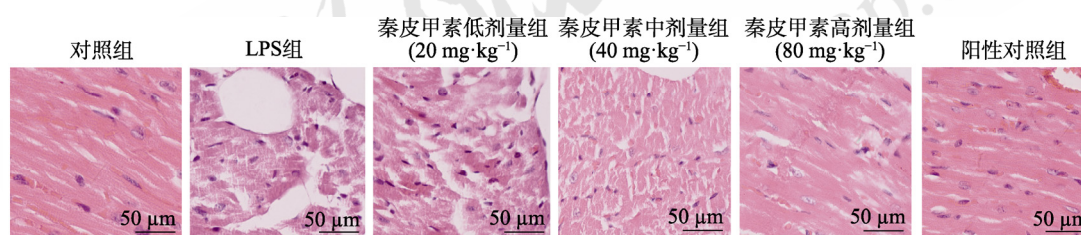


图 1 心脏病理切片(HE, 400×)

Fig. 1 Heart pathology section(HE, 400×)

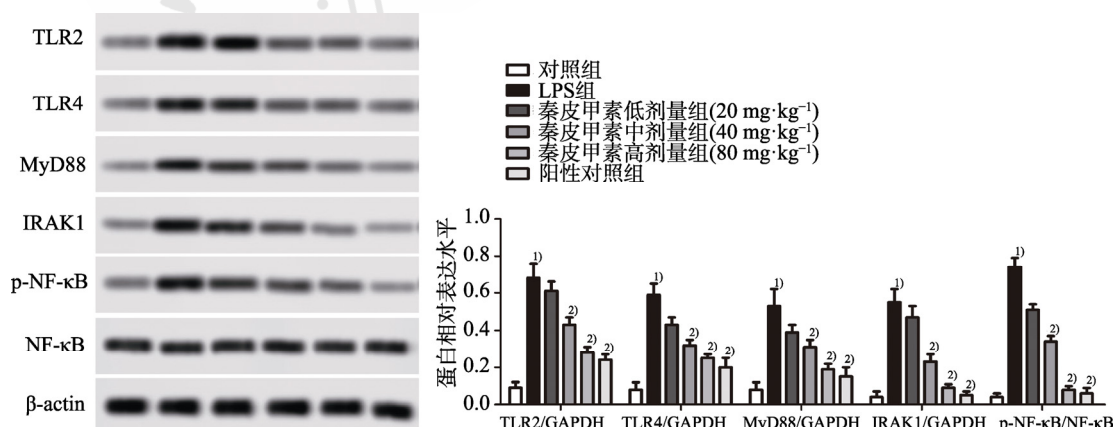


图 2 秦皮甲素对 LPS 诱导的心肌损伤大鼠 TLR/NF- κ B 途径影响($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与 LPS 组相比, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 2 Effect of esculin on TLR/NF- κ B pathway in LPS-induced myocardial injury rats($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the LPS group, ²⁾ $P<0.05$.

表 3 秦皮甲素对 LPS 诱导的心肌损伤大鼠心脏细胞因子影响($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

Tab. 3 Effect of esculin on cardiac cytokines in LPS-induced myocardial injury rats($\bar{x} \pm s$, $n=15$) $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$

分组	IL-6	TNF- α	IL-1 β
对照组	22.41 $\pm$ 3.48	7.45 $\pm$ 3.19	12.45 $\pm$ 4.20
LPS 组	126.72 $\pm$ 18.26 ¹⁾	87.45 $\pm$ 7.23 ¹⁾	94.16 $\pm$ 9.63 ¹⁾
秦皮甲素低剂量组 (20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	112.52 $\pm$ 15.67	80.16 $\pm$ 6.88	89.52 $\pm$ 9.04
秦皮甲素中剂量组 (40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	78.33 $\pm$ 9.81 ²⁾	49.75 $\pm$ 4.34 ²⁾	62.05 $\pm$ 7.67 ²⁾
秦皮甲素高剂量组 (80 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	45.25 $\pm$ 5.49 ²⁾	27.24 $\pm$ 3.86 ²⁾	34.32 $\pm$ 5.08 ²⁾
阳性对照组	36.79 $\pm$ 4.17 ²⁾	20.66 $\pm$ 3.86 ²⁾	15.67 $\pm$ 3.74 ²⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与 LPS 组相比, ²⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the LPS group, ²⁾ $P<0.05$.

表 4 秦皮甲素对 LPS 诱导的心肌损伤大鼠心脏氧化应激的影响($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

Tab. 4 Effect of esculin on oxidative stress in the heart of LPS-induced myocardial injury rats($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

分组	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	MDA/ $\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$	MPO/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$
对照组	61.23 $\pm$ 8.47	8.51 $\pm$ 3.21	10.09 $\pm$ 3.88
LPS 组	15.61 $\pm$ 4.05 ¹⁾	24.55 $\pm$ 5.16 ¹⁾	32.75 $\pm$ 4.82 ¹⁾
秦皮甲素低剂量组 (20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	21.34 $\pm$ 4.74	21.53 $\pm$ 4.91	28.75 $\pm$ 5.15
秦皮甲素中剂量组 (40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	40.76 $\pm$ 5.97 ²⁾	15.46 $\pm$ 3.58 ²⁾	17.59 $\pm$ 4.08 ²⁾
秦皮甲素高剂量组 (80 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	51.61 $\pm$ 5.80 ²⁾	10.42 $\pm$ 3.11 ²⁾	12.71 $\pm$ 3.89 ²⁾
阳性对照组	50.77 $\pm$ 5.80 ²⁾	11.09 $\pm$ 3.07 ²⁾	11.20 $\pm$ 2.59 ²⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与 LPS 组相比, ²⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the LPS group, ²⁾ $P<0.05$.

3 讨论

LPS 又被称为内毒素, 是革兰氏阴性菌细胞壁重要的致病成分, 易诱发内毒素血症^[13], 本研究通过 LPS 诱导大鼠心肌损伤模型, 研究心肌损伤机制。脓毒症是一种全身性的炎症反应, 脓毒症心肌损伤是常见的脓毒症连续过程。研究显示, 脓毒症发生时, 心肌细胞释放大量的炎症因子, 从而促进炎症损伤。LPS 是脓毒症的促进因子, 是造成心肌功能障碍的主要原因之一^[14]。TNF- α 、IL-6、IL-1 β 是常见的脓毒症炎症因子, 其可以促进炎症发生, 诱导心肌损伤^[15]。在本实验中, 经秦皮甲素治疗后, LPS 诱导的心肌损伤大鼠的 HR, LVWT 和 LVEF 升高, LVESV、心脏损伤标记物水平和炎症细胞因子降低。以上研究结果表明, 秦皮甲素能缓解 LPS 造成心肌损伤的炎性损伤。

心肌细胞氧化应激反应被认为是脓毒症诱导的心脏毒性的标志, 内源性抗氧化活性的增强已

被证明具有显著的心脏保护作用^[8]。SOD 和 MDA 活性是评价自由基代谢的主要病理参数。MDA 通常作为氧化损伤的指标, 用于评估生物体内的脂质过氧化程度, 也可用于间接测量细胞损伤。SOD 是一种重要的心肌抗氧化酶, 能够清除氧自由基, 将超氧自由基转化为过氧化氢, 过氧化氢代谢为氧和水^[16-17]。研究表明 LPS 能诱导 H9c2 细胞氧化应激^[18]。在本试验中, 与对照组相比, 在 LPS 组 SOD 显著降低, 而 MDA 和 MPO 均显著升高。在秦皮甲素治疗后, 与 LPS 组相比, SOD 显著升高, 而 MDA 和 MPO 均显著降低。以上研究结果表明, 秦皮甲素能缓解 LPS 造成心肌损伤的氧化应激。

炎症反应的过度刺激在脓毒症的发病机制中具有重要意义。已有研究表明, TLR-4 介导 MyD88 依赖的 NF- κ B 信号通路的激活, 并释放下游炎症因子包括 TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-1 β , 这些炎症因子在随后的脓毒症级联反应中发挥作用^[19]。病原菌侵入机体后, 通过细胞膜, 然后刺激细胞内信号通路从而促进炎症因子的级联反应, 这在脓毒症心肌损伤的发病机制中起重要作用。而 TLR-4/NF- κ B 信号通路是脓毒症心肌损伤的重要环节^[11]。研究表明, miR-146a 可能通过负反馈机制调控 TLR-4/NF- κ B 信号通路, 从而改善脓毒症心肌病炎症反应和心功能障碍^[20]。过表达 miR-132-3p 通过抑制 MyD88/NF- κ B 通路的活化来减弱脓毒症介导的心肌损伤^[21]。已经有研究表明秦皮甲素通过调节 TLR/NF- κ B 途径抑制 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤的炎症^[7]。在本试验中, 与对照组相比, LPS 组 TLR2、TLR4、MyD88、IRAK1 和 p-NF- κ B 蛋白的表达量显著增加。在秦皮甲素治疗后, 与 LPS 组相比, TLR2、TLR4、MyD88、IRAK1 和 p-NF- κ B 蛋白表达水平均显著降低。以上研究结果表明, 秦皮甲素通过抑制 TLR/NF- κ B 信号通路缓解 LPS 诱导心肌损伤。

综上所述, 秦皮甲素能减轻 LPS 诱导大鼠心肌损伤, 保护大鼠心肌细胞, 其机制可能与负反馈调节 TLR/NF- κ B 信号通路, 减轻抑制炎症反应和氧化应激有关。

REFERENCES

- [1] DEUTSCHMAN C S, TRACEY K J. Sepsis: current dogma and new perspectives[J]. Immunity, 2014, 40(4): 463-475.
- [2] VAN ENGELEN T S R, WIERSINGA W J, SCICLUNA B P,

- et al. Biomarkers in sepsis[J]. Crit Care Clin, 2018, 34(1): 139-152.
- [3] SATO R, NASU M. A review of sepsis-induced cardiomyopathy[J]. J Intensive Care, 2015(3): 48. Doi: 10.1186/s40560-015-0112-5.
- [4] LI N, ZHOU H, WU H, et al. STING-IRF₃ contributes to lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction, inflammation, apoptosis and pyroptosis by activating NLRP3[J]. Redox Biol, 2019(24): 101215. Doi: 10.1016/j.redox.2019.101215.
- [5] CHEN L, LIU P, FENG X, et al. Salidroside suppressing LPS-induced myocardial injury by inhibiting ROS-mediated PI3K/Akt/mTOR pathway *in vitro* and *in vivo*[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(12): 3178-3189.
- [6] WANG Y H, LIU Y H, HE G R, et al. Esculin improves dyslipidemia, inflammation and renal damage in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. BMC Complement Altern Med, 2015(15): 402. Doi: 10.1186/s12906-015-0817-y.
- [7] TIANZHU Z, SHUMIN W. Esculin inhibits the inflammation of LPS-induced acute lung injury in mice via regulation of TLR/NF- κ B pathways[J]. Inflammation, 2015, 38(4): 1529-1536.
- [8] XU J, LIN C, WANG T, et al. Ergosterol attenuates LPS-induced myocardial injury by modulating oxidative stress and apoptosis in rats[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 48(2): 583-592.
- [9] YANG S F, ZHUANG T F, SI Y M, et al. *Coriolus versicolor* mushroom polysaccharides exert immunoregulatory effects on mouse B cells via membrane Ig and TLR-4 to activate the MAPK and NF- κ B signaling pathways[J]. Mol Immunol, 2015, 64(1): 144-151.
- [10] KIM E, KIM H C, LEE S, et al. Dexmedetomidine confers neuroprotection against transient global cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting inflammation through inactivation of the TLR-4/NF- κ B pathway[J]. Neurosci Lett, 2017(649): 20-27.
- [11] CIMOLAI M, ALVAREZ S, BODE C, et al. Mitochondrial mechanisms in septic cardiomyopathy[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(8): 17763-17778.
- [12] SERRALHA R S, RODRIGUES I F, BERTOLINI A, et al. Esculin reduces P2X7 and reverses mitochondrial dysfunction in the renal cortex of diabetic rats[J]. Life Sci, 2020(254): 117787.
- [13] DAI T, YANG P, ZHAO Q, et al. Research of protective mechanism of *Polygala fallax* Hemsl on LPS-induced rat cardiomyocyte injury by down-regulating miR-369[J]. Chin J Immunol(中国免疫学杂志), 2020, 36(20): 2462-2467.
- [14] REN Q, ZHAO S, REN C, et al. *Astragalus* polysaccharide alleviates LPS-induced inflammation injury by regulating miR-127 in H9c2 cardiomyoblasts[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2018(32): 2058738418759180. Doi: 10.1177/2058738418759180.
- [15] JI Z R, XUE W L, ZHANG L. Schisandrin B attenuates inflammation in LPS-induced sepsis through miR-17-5p downregulating TLR4[J]. Inflammation, 2019, 42(2): 731-739.
- [16] SINGH A, RAMNATH R D, FOSTER R R, et al. Reactive oxygen species modulate the barrier function of the human glomerular endothelial glycocalyx[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55852. Doi: 10.1371/journal.pone.0055852.
- [17] SENTHIL S, CHANDRAMOHAN G, PUGALENDI K V. Isomers(oleanolic and ursolic acids) differ in their protective effect against isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats[J]. Int J Cardiol, 2007, 119(1): 131-133.
- [18] WANG L, GAN X D. Sanguinarine attenuates H9c2 cardiomyocytes oxidative stress *in vitro* induced by lipopolysaccharide[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(10): 1451-1456.
- [19] HAN C Y, ZHANG X L, GUAN Q B, et al. Regulate effect of butylphthalide on the inflammatory response of HBMEC under glucose and oxygen deprivation[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(7): 804-808.
- [20] XIE J, ZHANG L, FAN X, et al. MicroRNA-146a improves sepsis-induced cardiomyopathy by regulating the TLR-4/NF- κ B signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2019, 18(1): 779-785.
- [21] WANG L, ZHANG J, QIAN F H, et al. Effects of Shengjiang Powder on lipopolysaccharide induced myocardial injury in septic rats via TLR-4/NF- κ B signaling pathway[J]. Shanghai J Tradit Chin Med(上海中医药杂志), 2018, 52(10): 82-86.

收稿日期: 2021-03-26

(本文责编: 陈怡心)