

扶正解毒方对病毒性心肌炎大鼠氧化应激及 Sirt1/FoxO3a 通路的影响

姜 花, 沈延梅, 马驯凯

(青海红十字医院心内科, 青海 西宁 810001)

摘要: 目的 基于沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (Sirt1) / 叉头蛋白 O3a (FoxO3a) 通路探究扶正解毒方对病毒性心肌炎 (VMC) 大鼠的影响。方法 大鼠腹腔注射柯萨奇 B3 病毒 (CVB3) 法建立 VMC 模型, 随机分为模型组、扶正解毒方低剂量组 (28 g/kg)、扶正解毒方高剂量组 (112 g/kg)、EX527 组 (Sirt1 抑制剂, 1 μg/kg)、扶正解毒方 (28 g/kg) + EX527 (1 μg/kg) 组, 每组 15 只, 另取未造模的正常大鼠 15 只为正常组, 连续给药 10 d。检测大鼠超声心动图 Tie 指数, HE 染色观察心肌组织病理损伤情况, ELISA 法检测血清心肌损伤标志物、氧化应激水平, TUNEL 法检测心肌组织细胞凋亡率, 免疫组化法检测心肌组织 Sirt1 表达, Western blot 法检测心肌组织 FoxO3a、磷酸化 FoxO3a (p-FoxO3a)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx)、过氧化氢酶 (CAT)、细胞周期抑制蛋白 p27、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 3 (caspase3) 表达。结果 与正常组比较, 模型组大鼠心肌细胞坏死加重, 大鼠出现死亡, Tie 指数、血清心肌损伤标志物、氧化应激指标水平均升高 ($P < 0.05$), Sirt1/FoxO3 通路蛋白及其介导的抗氧化应激、抗凋亡相关蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 扶正解毒方各剂量组大鼠无死亡, 心肌组织损伤得以缓解, Tie 指数、血清心肌损伤标志物、氧化应激指标水平均降低 ($P < 0.05$), Sirt1/FoxO3 通路蛋白及其介导的抗氧化应激、抗凋亡相关蛋白表达升高 ($P < 0.05$); EX527 可加重 VMC 大鼠的死亡及心肌细胞氧化损伤等症状, 并逆转扶正解毒方对抗病毒性心肌炎的作用 ($P < 0.05$)。结论 扶正解毒方可通过激活 Sirt1/FoxO3a 通路缓解 VMC 大鼠心肌氧化应激损伤。

关键词: 扶正解毒方; 病毒性心肌炎; 氧化应激; Sirt1/FoxO3a 通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)03-0992-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.03.044

病毒性心肌炎 (viral myocarditis, VMC) 指由病毒感染心脏, 引起的心肌实质性或弥漫性病变^[1-2], 其发病机制还未完全阐明。临床报道发现, VMC 患儿心脏损伤程度与氧化应激损伤程度呈正相关^[3], 体内外研究证实柯萨奇病毒 B3 (CVB3) 侵入心肌细胞, 引起的氧化应激、凋亡激活是造成心肌细胞损伤的关键因素之一^[4]。沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (Sirt1) 可与叉头蛋白 O3a (FoxO3a) 相互作用, 抵抗氧化应激损伤, 参与疾病的发生发展过程^[5], 但 Sirt1/FoxO3a 通路在 VMC 疾病过程中的作用研究较少。

近年来, 中医药开始被更多用于病毒性心肌炎的临床治疗, 可通过抗病毒、抗炎、抗氧化、调节免疫等机制发挥作用, 疗效颇为明显^[6-7]。扶正解毒方能够扶助正气, 清热解毒, 调节患者机体免疫功能, 常用于白血病、肝癌、肺癌等肿瘤患者放化疗后的辅助治疗。有研究表明扶正解毒方用于儿童病毒性肺炎也具有较好的疗效^[8-9], 能够减轻炎症, 改善症状, 但尚无该方剂用于 VMC 的报道。本院前期采用扶正解毒方治疗 VMC 取得了较好疗效, 但具体机制还不甚明确。因此, 本研究建立大鼠 VMC 模型, 从 Sirt1/FoxO3a 通路及氧化应激方面, 探究扶正解毒方缓解 VMC

症状的机制, 以期为扶正解毒方的开发应用提供参考。

1 材料

1.1 动物与病毒 Wistar 大鼠 90 只, 健康雄性, 清洁级, 6~8 周龄, 体质量 200~220 g, 购自吉林大学实验动物中心 [实验动物生产许可证号 SCXK (吉) 2020-0003]。CVB3 病毒悬液由中国科学院武汉病毒研究所王汉中教授实验室所馈赠。本实验经本院动物伦理委员会审批通过 (伦理号 IACUC-105000296), 实验过程遵循 3R 原则。

1.2 试剂与药物 扶正解毒方 (党参 20 g、白术 15 g、茯苓 15 g、黄芪 15 g、黄芩 12 g、连翘 10 g、败酱草 15 g、薏苡仁 30 g、西洋参 10 g、北沙参 12 g、白芍 12 g、五味子 10 g、麦冬 15 g、瓜蒌 15 g、漏芦 10 g、干姜 10 g、炙甘草 9 g) 药材购自张仲景大药房, 参考文献 [9] 报道进行常规煎药, 浓缩成含生药量 2.8、11.2 g/mL 的药液 (即成人用量的 1、4 倍), 备用。HE 染色液 (货号 G1122, 上海信帆生物科技有限公司); TUNEL 染色液 (货号 XYA114, 上海信裕生物科技有限公司); 肌酸激酶同工酶 (货号 SND-M192, 滁州仕诺达生物科技有限公司); 肌钙蛋白 (货号 MM-0427M1, 杭州铂赛生物科技有限公司); 肌红蛋白等

收稿日期: 2023-01-20

基金项目: 青海省重点研发与转化计划项目 (175110013106445)

作者简介: 姜 花 (1977—), 女, 副主任医师, 从事心血管内科各类疾病的诊断与治疗。Tel: 18997168690, E-mail: huan67445@163.com

ELISA 试剂盒 (货号 XG-E101848, 上海西格生物科技有限公司); 丙二醛 (MDA) ELISA 试剂盒 (货号 YS-E8429, 上海研生实业有限公司); 超氧化物歧化酶 (SOD) ELISA 试剂盒 (货号 NS7247, 上海江莱生物科技有限公司); 晚期氧化蛋白产物 (AOPP) ELISA 试剂盒 (货号 LCS30824, 厦门仑昌硕生物科技有限公司); Sirt1、FoxO3a、磷酸化 FoxO3a (p-FoxO3a)、SOD、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx)、过氧化氢酶 (CAT)、细胞周期抑制蛋白 p27、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 3 (caspase3) 抗体 (货号 ab189494、ab109629、ab154786、ab83108、ab256470、ab32572、ab32034、ab184787, 英国 Abcam 公司)。

1.3 仪器 Gel Doc EZ 型化学发光仪 (美国伯乐公司); CX43 荧光显微镜 (日本奥林巴斯公司)。

2 方法

2.1 模型建立及分组 参考文献 [10] 报道方法制备 VMC 模型。通过超声心动图检测大鼠 Tie 指数, 若 Tie 指数高于正常值, 则认定造模成功。本研究共 75 只大鼠造模成功, 随机分为模型组、扶正解毒方低剂量组 (28 g/kg)、扶正解毒方高剂量组 (112 g/kg)、EX527 组 (1 μg/kg)、扶正解毒方 + EX527 组 (28 g/kg 扶正解毒方 + 1 μg/kg EX527), 每组 15 只, 另取 15 只大鼠, 腹腔注射 0.1 mL 生理盐水, 作为正常组。扶正解毒方组大鼠灌胃给予 2.8、11.2 g/mL 药液, 剂量 10 mL/kg, 每天 1 次; EX527 组大鼠尾静脉注射 1 μg/kg EX527^[10], 每 3 d 注射 1 次; 扶正解毒方 + EX527 组在灌胃给予低剂量扶正解毒方的基础上尾静脉注射 EX527, 各组均连续给药 1 周。给药期间, 监测大鼠一般状态及死亡数量等。

2.2 心功能检测 大鼠末次给药结束后, 麻醉, 通过彩色多普勒超声心动图检测心脏等容收缩时间 (ICT)、等容舒张时间 (IRT) 及射血时间 (ET), 计算 Tei 指数用以评估心肌损伤程度, 公式为 Tei 指数 = (ICT+IRT) / ET。

2.3 血清学指标检测 大鼠麻醉后, 腹主动脉采血 6 mL, 按 ELISA 法检测肌酸激酶同工酶、肌钙蛋白、肌红蛋白水平, 以及氧化应激指标丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、晚期氧化蛋白产物 (AOPP) 水平。

2.4 HE 及 TUNEL 法检测心肌组织病理变化和心肌细胞凋亡率 大鼠处死后, 迅速解剖获取心脏, 一部分装于冻存盒冻存于-80 ℃冰箱; 另一部分采用 4% 多聚甲醛固定, 包埋, 制备 5 μm 切片。取心肌组织切片, 行 HE 及 TUNEL 染色后, 于显微镜下观察并拍照, 计算细胞凋亡率。

2.5 免疫组化法检测心肌组织 Sirt1 表达 取心肌组织切片, 经脱蜡、抗原修复等处理后, 加入 Sirt1 一抗抗体 (1:500) 室温孵育 3 h, 加入山羊抗兔 IgG 二抗抗体 (1:500) 室温孵育 2 h, DAB 显色, 于光镜下观察并拍照, 通过 ImagePro plus 6.0 图像系统检测单位面积内 Sirt1 阳性染色 (红棕色) 的平均光密度值。

2.6 Western blot 法检测心肌组织相关蛋白表达 取于-80 ℃冰箱保存的心肌组织, 解冻、剪碎后匀浆, 提取蛋

白, BCA 法检测蛋白浓度, 取 100 μg 蛋白进行电泳、转膜, 滴加一抗 FoxO3a、p-FoxO3a、SOD、GPx、CAT、p27、caspase-3 (稀释比例均为 1:1000) 及 β-actin 内参抗体 (1:2000), 4 ℃孵育过夜, 次日滴加山羊抗兔 IgG 二抗 (1:2000), 37 ℃孵育 1.5 h, 显影曝光, 通过 Image J 软件对条带相对灰度值进行定量分析。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较用 SNK-q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 扶正解毒方对 VMC 大鼠一般行为的影响 正常组大鼠状态正常, 无死亡出现; 模型组及扶正解毒方 + EX527 组大鼠有 4 只死亡, 解剖死亡大鼠发现心脏呈白色点状或条索状病变; 扶正解毒方各剂量组大鼠无死亡, 其饮食活动均趋于正常; EX527 组大鼠死亡 8 只, 死亡大鼠心脏条索状病变加重, 其饮食及活动量减少。

3.2 扶正解毒方对 VMC 大鼠 Tie 指数的影响 与正常组比较, 模型组大鼠 Tie 指数升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 扶正解毒方各剂量组大鼠 Tie 指数均降低 ($P < 0.05$), EX527 组大鼠 Tie 指数进一步升高 ($P < 0.05$); 与扶正解毒方低剂量组比较, 扶正解毒方 + EX527 组 Tie 指数升高 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 各组大鼠 Tie 指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	Tie 指数
正常组	15	0.28 ± 0.01
模型组	11	1.82 ± 0.14 [△]
扶正解毒方低剂量组	15	0.87 ± 0.10 [●]
扶正解毒方高剂量组	15	0.52 ± 0.05 ^{●▲}
EX527 组	7	2.58 ± 0.22 [●]
扶正解毒方 + EX527 组	11	1.89 ± 0.13 [▲]

注: 与正常组比较, [△] $P < 0.05$; 与模型组比较, [●] $P < 0.05$; 与扶正解毒方低剂量组比较, [▲] $P < 0.05$ 。

3.3 扶正解毒方对 VMC 大鼠心肌损伤标志物的影响 与正常组比较, 模型组大鼠血清肌酸激酶同工酶、肌红蛋白、肌钙蛋白水平均升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 扶正解毒方各剂量组大鼠血清肌酸激酶同工酶、肌红蛋白、肌钙蛋白水平均降低 ($P < 0.05$), EX527 组大鼠血清肌酸激酶同工酶、肌红蛋白、肌钙蛋白水平进一步升高 ($P < 0.05$); 与扶正解毒方低剂量组比较, 扶正解毒方 + EX527 组大鼠血清肌酸激酶同工酶、肌红蛋白、肌钙蛋白水平均升高 ($P < 0.05$), 但低于 EX527 组, 见表 2。

3.4 扶正解毒方对 VMC 大鼠心肌组织病理变化及心肌细胞凋亡率的影响 HE 染色可见模型组大鼠心肌细胞水肿、胞浆疏松、坏死且淡染; TUNEL 染色可见模型组大鼠凋亡细胞核染色颜色加深, 心肌细胞凋亡率高于正常组 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 扶正解毒方各剂量组大鼠心肌细胞水肿、坏死缓解, 心肌细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$), EX527 组大鼠心肌细胞水肿、坏死进一步加重, 心肌细胞凋亡率进一步升高 ($P < 0.05$); 与扶正解毒方低剂量组比

较, 扶正解毒方+EX527组大鼠心肌细胞水肿、坏死缓解, 心肌细胞凋亡率升高 ($P<0.05$), 但低于EX527组, 见图

1、表3。

表2 各组大鼠心肌损伤标志物水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	肌酸激酶同工酶/(U·mL ⁻¹)	肌红蛋白/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	肌钙蛋白/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
正常组	15	31.24±1.54	82.02±4.31	14.23±1.34
模型组	11	126.64±5.02 [△]	484.22±20.34 [△]	69.37±4.76 [△]
扶正解毒方低剂量组	15	93.39±3.33 [●]	303.66±15.31 [●]	40.27±3.12 [●]
扶正解毒方高剂量组	15	62.18±2.04 ^{●▲}	163.53±8.36 ^{●▲}	28.82±2.04 ^{●▲}
EX527组	7	245.11±8.02 [●]	864.39±48.53 [●]	89.19±6.13 [●]
扶正解毒方+EX527组	11	129.23±5.11 [▲]	488.09±20.35 [▲]	68.15±4.16 [▲]

注: 与正常组比较, [△] $P<0.05$; 与模型组比较, [●] $P<0.05$; 与扶正解毒方低剂量组比较, [▲] $P<0.05$ 。

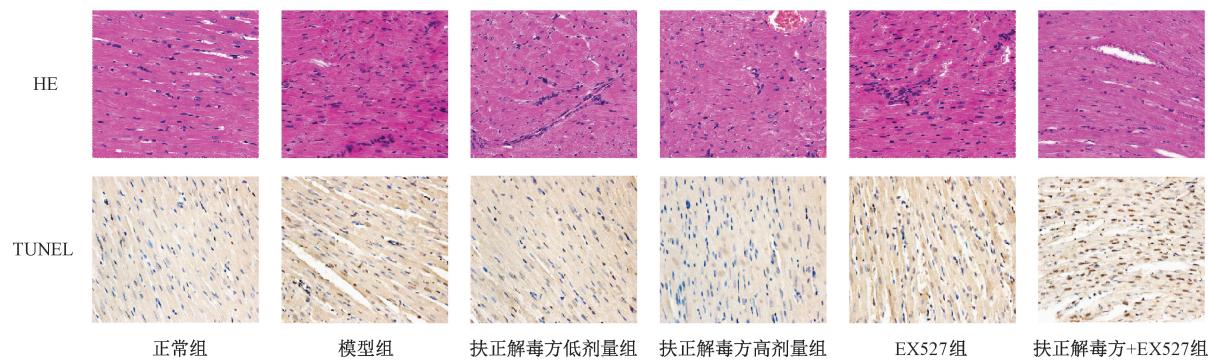


图1 各组大鼠心肌组织HE及TUNEL染色图 ($\times 200$)

表3 各组大鼠心肌细胞凋亡率比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	凋亡率/%
正常组	15	9.19±0.91
模型组	11	35.63±2.24 [△]
扶正解毒方低剂量组	15	26.25±1.49 [●]
扶正解毒方高剂量组	15	18.18±1.04 ^{●▲}
EX527组	7	46.24±2.72 [●]
扶正解毒方+EX527组	11	36.29±1.43 [▲]

注: 与正常组比较, [△] $P<0.05$; 与模型组比较, [●] $P<0.05$; 与扶正解毒方低剂量组比较, [▲] $P<0.05$ 。

表4 各组大鼠血清MDA、AOPP、SOD水平比较 (ng/mL, $\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	MDA	AOPP	SOD
正常组	15	1.16±0.04	1.42±0.12	30.42±1.12
模型组	11	100.12±10.46 [△]	43.33±4.20 [△]	8.30±0.80 [△]
扶正解毒方低剂量组	15	63.36±6.35 [●]	26.91±2.14 [●]	18.93±1.18 [●]
扶正解毒方高剂量组	15	22.09±2.24 ^{●▲}	15.71±1.11 ^{●▲}	25.76±2.13 ^{●▲}
EX527组	7	350.99±30.09 [●]	82.57±8.10 [●]	1.07±0.77 [●]
扶正解毒方+EX527组	11	102.11±10.26 [▲]	41.72±4.10 [▲]	8.72±0.80 [▲]

注: 与正常组比较, [△] $P<0.05$; 与模型组比较, [●] $P<0.05$; 与扶正解毒方低剂量组比较, [▲] $P<0.05$ 。

3.6 扶正解毒方对VMC大鼠心肌组织Sirt1阳性表达的影响 正常组比较, 模型组大鼠心肌细胞胞浆中Sirt1阳性表达降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 扶正解毒方各剂量组大鼠心肌细胞Sirt1阳性表达升高 ($P<0.05$), EX527组大鼠心肌细胞Sirt1阳性表达进一步降低 ($P<0.05$); 与扶正解毒方低剂量组比较, 大鼠心肌细胞Sirt1阳性表达降低 ($P<0.05$), 但高于EX527组, 见图2、表5。

3.5 扶正解毒方对VMC大鼠氧化应激水平的影响 与正常组比较, 模型组大鼠血清MDA、AOPP水平升高 ($P<0.05$), SOD水平降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 扶正解毒方各剂量组大鼠血清MDA、AOPP水平降低 ($P<0.05$), SOD水平升高 ($P<0.05$), EX527组大鼠血清MDA、AOPP水平进一步升高 ($P<0.05$), SOD水平进一步降低 ($P<0.05$); 与扶正解毒方低剂量组比较, 扶正解毒方+EX527组血清MDA、AOPP水平升高 ($P<0.05$), 但低于EX527组, SOD水平降低 ($P<0.05$), 但高于EX527组 ($P<0.05$), 见表4。

表5 各组大鼠心肌组织Sirt1阳性表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	Sirt1平均光密度值
正常组	15	1.19±0.11
模型组	11	0.33±0.04 [△]
扶正解毒方低剂量组	15	0.65±0.04 [●]
扶正解毒方高剂量组	15	0.92±0.08 ^{●▲}
EX527组	7	0.14±0.01 [●]
扶正解毒方+EX527组	11	0.39±0.03 [▲]

注: 与正常组比较, [△] $P<0.05$; 与模型组比较, [●] $P<0.05$; 与扶正解毒方低剂量组比较, [▲] $P<0.05$ 。

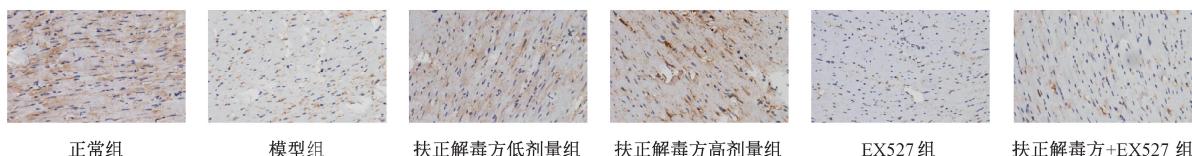


图2 各组大鼠心肌组织 Sirt1 免疫组化染色图 (×200)

3.7 扶正解毒方对 VMC 大鼠抗氧化应激蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠心肌组织 SOD、GPx、CAT 蛋白表达降低 ($P<0.05$);与模型组比较,扶正解毒方各剂量组大鼠心肌组织 SOD、GPx、CAT 蛋白表达升高 ($P<0.05$),EX527 组大鼠心肌组织 SOD、GPx、CAT 蛋白表达进一步降低 ($P<0.05$);与扶正解毒方低剂量组比较,扶正解毒方+EX527 组大鼠心肌组织 SOD、GPx、CAT 蛋白表达降低 ($P<0.05$),但高于 EX527 组,见图 3、表 6。

3.8 扶正解毒方对 VMC 大鼠 FoxO3a、p-FoxO3a、p27、caspase3 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠心肌组织 p-FoxO3a/FoxO3a、p27 蛋白表达降低 ($P<0.05$),caspase3 蛋白表达升高 ($P<0.05$);与模型组比较,扶正解毒方各剂量组大鼠心肌组织 p-FoxO3a/FoxO3a、p27 蛋白表达升高 ($P<0.05$),caspase3 蛋白表达降低 ($P<0.05$),见图 4、表 7。

表6 各组大鼠心肌组织 SOD、GPx、CAT 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	SOD/β-actin	GPx/β-actin	CAT/β-actin
正常组	15	1.19±0.14	1.16±0.13	1.11±0.09
模型组	11	0.31±0.04 [△]	0.38±0.03 [△]	0.43±0.04 [△]
扶正解毒方低剂量组	15	0.68±0.05 [●]	0.56±0.05 [●]	0.72±0.05 [●]
扶正解毒方高剂量组	15	0.90±0.09 ^{●▲}	0.99±0.09 ^{●▲}	0.92±0.06 ^{●▲}
EX527 组	7	0.17±0.01 [●]	0.11±0.02 [●]	0.10±0.01 [●]
扶正解毒方+EX527 组	11	0.39±0.04 [▲]	0.36±0.03 [▲]	0.40±0.05 [▲]

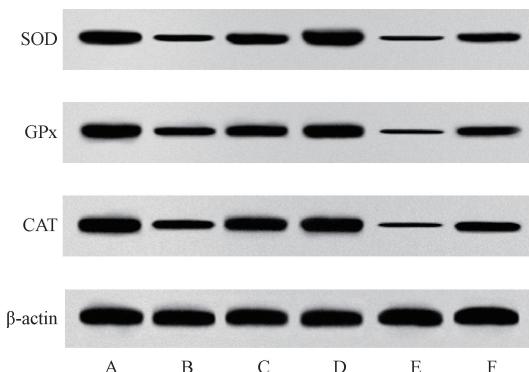
注:与正常组比较,[△] $P<0.05$;与模型组比较,[●] $P<0.05$;与扶正解毒方低剂量组比较,[▲] $P<0.05$ 。

EX527 组大鼠心肌组织 p-FoxO3a/FoxO3a、p27 蛋白表达进一步降低 ($P<0.05$),caspase3 蛋白表达进一步升高 ($P<0.05$);与扶正解毒方低剂量组比较,扶正解毒方+EX527 组大鼠心肌组织 p-FoxO3a/FoxO3a、p27 蛋白表达降低 ($P<0.05$),但高于 EX527 组,caspase3 蛋白表达升高 ($P<0.05$),但低于 EX527 组,见图 4、表 7。

4 讨论

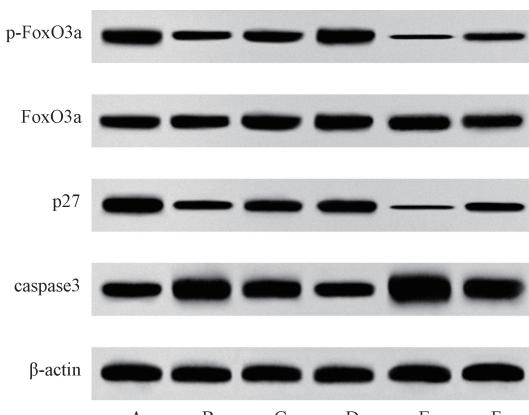
传统医学中,病毒性心肌炎属于“心悸”“怔仲”“心水”等范畴。本病为本虚标实之证,本虚是气阴两虚,标实是温热毒邪侵袭^[11-12]。扶正解毒方中党参、黄芪补中益气;白术、茯苓、薏苡仁、干姜健脾燥湿;黄芩、连翘、败酱草、漏芦四药合用,清热解毒;北沙参、西洋参补气养阴;白芍、五味子、麦冬滋阴敛阴、养血柔肝;炙甘草调和诸药。上述药物相互配伍,扶正与驱邪兼顾,治疗病毒性心肌炎尤为合适。

CVB3 病毒直接侵犯心肌细胞,引起细胞水肿、破裂、坏死,是引起 VMC 发生的重要病因^[13-14]。Tei 指数可综合评价心肌收缩和舒张功能,在评估 VMC 患儿心肌损伤程度中具有较高的应用价值^[15-16]。VMC 造模后,大鼠出现死



注: A 为正常组, B 为模型组, C~D 分别为扶正解毒方低、高剂量组, E 为 EX527 组, F 为扶正解毒方+EX527 组。

图3 各组大鼠心肌组织 SOD、GPx、CAT 蛋白表达免疫印迹图



注: A 为正常组, B 为模型组, C~D 分别为扶正解毒方低、高剂量组, E 为 EX527 组, F 为扶正解毒方+EX527 组。

图4 各组大鼠心肌组织 FoxO3a、p-FoxO3a、p27、caspase3 蛋白表达免疫印迹图

亡、心肌细胞坏死及凋亡严重现象,Tei 指数异常升高,且心肌损伤标志物水平异常升高,提示造模成功。扶正解毒方中黄芩、连翘、败酱草等具有清热解毒作用,石哲玮

表7 各组大鼠心肌组织 p-FoxO3a/FoxO3a、p27、caspase3 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	p-FoxO3a/FoxO3a	p27/β-actin	caspase3/β-actin
正常组	15	1.15±0.09	1.13±0.10	0.92±0.10
模型组	11	0.34±0.03 [△]	0.43±0.04 [△]	1.99±0.20 [△]
扶正解毒方低剂量组	15	0.51±0.06 [●]	0.72±0.07 [●]	1.62±0.16 [●]
扶正解毒方高剂量组	15	0.89±0.09 ^{●▲}	0.96±0.08 ^{●▲}	1.36±0.12 ^{●▲}
EX527组	7	0.18±0.01 [●]	0.10±0.01 [●]	2.65±0.22 [●]
扶正解毒方+EX527组	11	0.30±0.03 [▲]	0.44±0.04 [▲]	2.08±0.20 [▲]

注: 与正常组比较, [△] $P<0.05$; 与模型组比较, [●] $P<0.05$; 与扶正解毒方低剂量组比较, [▲] $P<0.05$ 。

等^[17]已证实黄芩中的活性成分汉黄芩苷可抑制 CVB3 病毒引起的 VMC 小鼠心肌炎症反应; 曹灿等^[18]证实连翘、败酱草为治疗新冠病毒方剂中使用频率较高的中药, 提示扶正解毒方在治疗 VMC 领域有潜在的价值。本研究建立 VMC 模型后采用扶正解毒方进行干预, 发现扶正解毒方可抑制 VMC 大鼠死亡, 缓解心肌细胞水肿、死亡及凋亡现象, 扶正解毒方剂量越高, 心肌损伤标志物水平释放及 Tei 指数降低越显著, 提示扶正解毒方可缓解 VMC 大鼠心肌损伤程度。

CVB3 除直接引起心肌细胞损伤外, 还促进心肌细胞内氧自由基释放, 通过激活氧化应激反应来加重心肌细胞损伤^[19]。匡秀锋等^[3]发现 VMC 患者血清中氧化应激产物 MDA、AOPP 水平与 Tei 指数升高成正比, 并认为氧化应激指标与 VMC 病情程度关系密切。本研究发现, 模型组大鼠心肌细胞组织中氧化应激产物 MDA、AOPP 水平升高, 而抗氧化物 SOD、GPx、CAT 等水平降低, 提示 VMC 大鼠心肌组织中存在氧化应激反应。扶正解毒方各剂量组大鼠心肌组织抗氧化应激水平升高、氧化应激产物分泌减少, 且高剂量效果更佳, 提示扶正解毒方可能通过提高抗氧化应激反应来缓解 VMC 大鼠心肌损伤作用。

Sirt1/FoxO3a 通路与细胞氧化应激损伤及凋亡关系密切^[20]。Sirt1 能够去乙酰化或磷酸化蛋白并调控多种转录因子, 参与细胞氧化应激、凋亡、DNA 损伤修复等过程的调控^[21]; FoxO3a 蛋白可被 Sirt1 磷酸化、乙酰化和泛素化修饰降解, 调控抗氧化应激指标 SOD 及细胞周期抑制蛋白如 p27 等表达, 参与细胞氧化应激过程^[22]。Sirt1 上调能够促进 FoxO3a 磷酸化, 进而增强抗氧化应激、抗凋亡反应, 缓解组织及细胞损伤^[23]。但 Sirt1/FoxO3a 是否参与 VMC 心肌损伤过程, 还未见报道。本研究发现, Sirt1 在 VMC 大鼠心肌细胞胞浆中呈弱阳性表达, FoxO3a 磷酸化水平也降低, 其介导的抗氧化应激相关蛋白表达降低, 心肌细胞凋亡率及凋亡相关蛋白表达异常升高; 进一步抑制 Sirt1 表达后, 大鼠死亡增加, 心肌损伤程度、氧化应激反应及凋亡反应进一步加重, 提示 Sirt1/FoxO3a 通路介导的抗氧化、抗凋亡途径抑制, 可能是加重 VMC 大鼠心肌损伤的关键机制。扶正解毒方剂量越高, 大鼠 Sirt1/FoxO3a 通路激活越显著, 抗氧化应激、抗凋亡效果越明显, 提示扶正解毒方可通过激活 Sirt1/FoxO3a 介导的抗氧化、抗凋亡途径, 缓解 VMC 大鼠心肌氧化应激损伤。

综上所述, 扶正解毒方可通过促进 Sirt1/FoxO3a 介导

的抗氧化、抗凋亡途径激活, 缓解 VMC 大鼠心肌氧化应激损伤, 本研究为阐明扶正解毒方治疗 VMC 的可能机制提供一定的参考。但 VMC 心肌损伤机制复杂, Sirt1/FoxO3a 通路还可能与心肌细胞自噬有关, 扶正解毒方缓解 VMC 的其他可能机制还有待进一步探究。

参考文献:

- [1] Zhang W, Ma K, Han N, et al. Probucol recovers pathological damage in viral myocarditis through improvement of myocardium-related proteins [J]. *Microb Pathog*, 2020, 147 (1): 1042-1057.
- [2] Sharma A N, Stultz J R, Bellamkonda N, et al. Fulminant myocarditis: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management [J]. *Am J Cardiol*, 2019, 124(12): 1954-1960.
- [3] 匡秀锋, 贺亭, 卜德华, 等. 病毒性心肌炎患儿超声心动图 Tei 指数与心肌氧化应激损伤程度的相关性分析 [J]. 中国妇幼保健, 2020, 35(23): 4618-4620.
- [4] Song F, Kong F, Zhang H, et al. Ulinastatin protects against CVB3-induced acute viral myocarditis through Nrf2 activation [J]. *Inflammation*, 2018, 41(3): 803-810.
- [5] Samadi M, Aziz S G, Naderi R, et al. The effect of tropisetron on oxidative stress, SIRT1, FOXO3a, and claudin-1 in the renal tissue of STZ-induced diabetic rats [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2021, 26(1): 217-227.
- [6] 金信垚, 刘强. 中医药治疗病毒性心肌炎的研究进展 [J]. 中国中医急症, 2019, 28(11): 2050-2053.
- [7] 陈婷, 祝小芬, 漆良琴, 等. 炙甘草汤辨证论治病毒性心肌炎的临床研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2019, 43(5): 460-464.
- [8] 李琳, 雷军宁, 张佳, 等. 瓜蒌黄芪桂枝汤治疗病毒性心肌炎(气阴两虚证)临床疗效及对中医症状积分及心功能影响研究 [J]. 四川中医, 2021, 39(8): 63-66.
- [9] 陆汉明, 任明星, 张黎雯, 等. 扶正解毒方治疗儿童病毒性肺炎 40 例 [J]. 环球中医药, 2020, 13(4): 741-743.
- [10] 纪琳琳, 姜大钧, 祝明浩. 养心活血解毒方对病毒性心肌炎模型大鼠炎症因子、相关蛋白表达及氧化应激的影响 [J]. 中国中医急症, 2019, 28(7): 1163-1166.
- [11] 武蓓蓓, 魏孟玲. 基于“阳化气, 阴成形”理论辨治心律失常气虚血瘀证 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(24): 4393-4395.
- [12] 魏江, 孙华. 参麦注射液联合 1, 6-二磷酸果糖对病毒性心肌炎患儿心电图及心肌酶的影响 [J]. 贵州医药, 2019, 43(10): 1562-1563.

- [13] Wei L, Liu B, Yao Z, et al. Sirtuin 1 inhibitor EX527 suppresses morphine-induced behavioral sensitization [J]. *Neurosci Lett*, 2021, 744(1): 135599.
- [14] Nie S, Dong B, Gao S, et al. The protective effect of interfering TLR9-IRF5 signaling pathway on the development of CVB3-induced myocarditis [J]. *Clin Immunol*, 2019, 207(1): 24-35.
- [15] 李志林. 超声心动图在诊断病毒性心肌炎的临床应用价值 [J]. 现代医用影像学, 2020, 29(11): 2142-2144.
- [16] 潘光毅. 心电图、超声心动图联合心肌酶谱在小儿病毒性心肌炎中的应用价值 [J]. 现代电生理学杂志, 2020, 27(3): 174-176.
- [17] 石哲玮, 刘胜新, 詹嘉琛, 等. 汉黄芩苷对柯萨奇B3病毒诱导的病毒性心肌炎小鼠炎症反应的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(3): 427-432.
- [18] 曹 灿, 崔 瑛, 楚玉玺, 等. 基于网络药理学与分子对接方法的疏风解毒胶囊治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的作用机制与活性成分研究 [J]. 中草药, 2020, 51(9): 2283-2296.
- [19] Ai F, Zheng J, Zhang Y, et al. Inhibition of 12/15-LO ameliorates CVB3-induced myocarditis by activating Nrf2 [J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 272(1): 65-71.
- [20] Ruankham W, Suwanjang W, Wongchirat P, et al. Sesamin and sesamol attenuate H₂O₂-induced oxidative stress on human neuronal cells via the SIRT1-SIRT3-FOXO3a signaling pathway [J]. *Nutr Neurosci*, 2021, 24(2): 90-101.
- [21] Zhang T, Chi Y, Ren Y, et al. Resveratrol reduces oxidative stress and apoptosis in podocytes via Sir2-related enzymes, Sirtuins1 (SIRT1) /peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α (PGC-1 α) axis [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 1220-1231.
- [22] Ni Y, Deng J, Liu X, et al. Echinacoside reverses myocardial remodeling and improves heart function via regulating SIRT1/FOXO3a/MnSOD axis in HF rats induced by isoproterenol [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(1): 203-216.
- [23] Donniciu M, Urbanek K, Nebbioso A, et al. Cardioprotective effect of a moderate and prolonged exercise training involves sirtuin pathway [J]. *Life Sci*, 2019, 222: 140-147.

甘草联合顺铂对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤抑制作用及肾损伤保护作用

连小龙¹, 张尚龙¹, 邓毅^{1,2*}, 张楠¹, 叶礼巧¹, 马趣环^{1,3}, 杨志军¹

(1. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃兰州 730000; 2. 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室, 甘肃兰州 730000; 3. 甘肃省医学科学研究院药物研究所, 甘肃兰州 730050)

摘要: 目的 探讨甘草联合顺铂对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤抑制作用及肾损伤保护作用。方法 小鼠接种 H₂₂ 肝癌细胞, 建立异位荷瘤模型。荷瘤小鼠随机分为模型组、顺铂组 (3 mg/kg) 和顺铂联合甘草低、中、高剂量组 (3 mg/kg+0.65、1.30、2.60 g/kg)。HE 染色观察肿瘤组织和肾组织病理形态变化, 免疫组化法检测肿瘤组织 Bcl-2、Bax 蛋白表达, ELISA 法检测血清 BUN、Cr 水平和肾组织 MDA 水平、SOD 活性。结果 与模型组比较, 各给药组小鼠肿瘤体积和质量减小 ($P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达、SOD 活性降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), Bax 蛋白表达、肾损伤评分和 BUN、Cr、MDA 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与顺铂组比较, 顺铂联合甘草各剂量组小鼠肿瘤体积和质量减小 ($P<0.05$, $P<0.01$), 肾损伤评分和 BUN、Cr、MDA 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), SOD 活性升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 甘草能够协同升高顺铂的化疗效果并减轻 H₂₂ 荷瘤小鼠的肾损伤, 具有增效和减毒的作用。

关键词: 甘草; 顺铂; 肝癌; 肾损伤; 增效减毒

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)03-0997-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2024.03.045

收稿日期: 2022-11-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81960723); 甘肃省自然科学基金项目 (21JR11RA145, 22JR11RA112); 甘肃省中医药管理局项目 (GZK2022-37); 兰州市科技计划项目 (2022-3-21)

作者简介: 连小龙 (1992—), 男, 博士生, 从事中药及复方临床应用基础研究。Tel: 18919127209, E-mail: 1028980450@qq.com

* 通信作者: 邓毅 (1964—), 男, 教授, 博生导师, 从事中药及复方临床应用基础研究。Tel: 13919289773, E-mail: dengyi@gszy.edu.cn

网络出版日期: 2023-05-31

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20230530.1646.004.html>