

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2025.z20241202006

# 基于 AMPK-NF- $\kappa$ B 通路探讨三七总皂苷调控心肌缺血再灌注损伤炎症反应的机制

王翊瑄<sup>1</sup>, 姜 丽<sup>2</sup>, 宁 可<sup>2</sup>, 包怡敏<sup>2</sup>, 李勇枝<sup>1</sup>

1. 上海中医药大学中医学院(上海 201203); 2. 上海中医药大学中西医结合学院(上海 201203)

**【摘要】** **目的** 探讨三七总皂苷(PNS)通过腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)-核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)通路调控大鼠心肌缺血再灌注损伤(MIRI)炎症反应的作用机制。**方法** 82 只雄性 SD 大鼠随机分成:假手术(Sham)组( $n=11$ )、模型(I/R)组( $n=15$ )、模型+PNS(I/R+PNS)组( $n=12$ )、模型+AMPK 激活剂(I/R+AICAR)组( $n=15$ )、模型+PNS+AMPK 抑制剂(I/R+PNS+CC)组( $n=14$ )、模型+NF- $\kappa$ B 抑制剂(I/R+BAY)组( $n=15$ )。通过结扎冠状动脉左前降支 40 min、再灌注 60 min 制备大鼠心肌缺血再灌注(I/R)模型。Sham 组与 I/R 组于结扎前 40 min、30 min 分别腹腔注射 0.9% 的氯化钠溶液; I/R+PNS 组、I/R+AICAR 组、I/R+BAY 组于结扎前 40 min 腹腔注射 0.9% 的氯化钠溶液, 结扎前 30 min 分别腹腔注射 50 mg/kg PNS、10 mg/kg AICAR、10 mg/kg BAY-117082; I/R+PNS+CC 组于结扎前 40 min 颈静脉注射 0.25 mg/kg Compound C, 结扎前 30 min 腹腔注射 50 mg/kg PNS。检测血流动力学指标、心肌组织病理及髓过氧化物酶(MPO)活性; 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)法和酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测心肌组织肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)蛋白与 mRNA 表达; Western blot 法测定心肌组织磷酸化 AMPK(p-AMPK)、胞浆磷酸化 NF- $\kappa$ B 抑制蛋白激酶 $\alpha/\beta$ (p-IKK $\alpha/\beta$ )、磷酸化 NF- $\kappa$ B 抑制蛋白 $\alpha$ (p-I $\kappa$ B $\alpha$ )及细胞核内磷酸化 NF- $\kappa$ B(p-NF- $\kappa$ B)蛋白表达; 免疫荧光染色法观察 p-NF- $\kappa$ B 入核水平。**结果** 与 Sham 组相比, I/R 组大鼠心脏收缩与舒张功能降低( $P<0.05$ ), 心肌组织病理损伤加重, MPO 活性、炎症因子(TNF- $\alpha$  和 MCP-1)表达量升高( $P<0.05$ ), p-AMPK 表达量降低( $P<0.05$ ), NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白(p-IKK $\alpha/\beta$ 、p-I $\kappa$ B $\alpha$  及 p-NF- $\kappa$ B)表达量升高( $P<0.05$ )。与 I/R 组相比, I/R+PNS 组心功能改善( $P<0.05$ ), 心肌组织病理损伤减轻, MPO 活性及炎症因子表达量降低( $P<0.05$ ), p-AMPK 表达量升高( $P<0.05$ ), NF- $\kappa$ B 通路蛋白表达量减少( $P<0.05$ )。与 I/R+PNS 组相比, I/R+PNS+CC 组心功能下降( $P<0.05$ ), 病理损伤加重, MPO 活性、炎症因子及 NF- $\kappa$ B 通路蛋白表达量升高( $P<0.05$ ), p-AMPK 表达量降低( $P<0.05$ )。**结论** PNS 可通过抑制炎症反应发挥抗 MIRI 的作用, 其机制可能与调控 AMPK-NF- $\kappa$ B 信号通路有关。

**【关键词】** 心肌梗死; 缺血再灌注损伤; 三七总皂苷; 炎症反应; 作用机制; 中药研究

## Exploration on mechanism of panax notoginseng saponins in regulating inflammatory response in myocardial ischemia-reperfusion injury based on AMPK-NF- $\kappa$ B pathway

WANG Yixuan<sup>1</sup>, JIANG Li<sup>2</sup>, NING Ke<sup>2</sup>, BAO Yimin<sup>2</sup>, LI Yongzhi<sup>1</sup>

1. School of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. School of Integrative Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism of panax notoginseng saponins (PNS) in regulating inflammatory response in myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) via AMP-activated protein kinase (AMPK)-nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway. **Methods** Eighty-two male SD rats were randomly divided into Sham group ( $n=11$ ), model (I/R) group ( $n=15$ ), model+PNS (I/R+PNS) group ( $n=12$ ), model+AMPK activator (I/R+AICAR) group ( $n=15$ ), model+PNS+AMPK inhibitor (I/R+PNS+CC) group ( $n=14$ ), and model+NF- $\kappa$ B inhibitor (I/R+BAY) group ( $n=15$ ).

A rat myocardial ischemia-reperfusion (I/R) model was created by occluding the left anterior descending coronary artery for 40 min, followed by a 60-min reperfusion period. For the Sham and I/R groups, 0.9% sodium chloride solution was administered via intraperitoneal injection (ip) at 40 and 30 min before ligation. For the I/R+PNS, I/R+AICAR, and I/R+BAY groups, 0.9% sodium chloride solution was intraperitoneally injected at 40 min before ligation, followed by ip administration of 50 mg/kg PNS, 10 mg/kg AICAR,

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82274133, 81303256)

[作者简介] 王翊瑄, 女, 硕士研究生, 主要从事中医药防治心血管病研究工作

[通信作者] 李勇枝, 教授, 博士研究生导师; E-mail: Liyongzhi666@sina.com。包怡敏, 教授, 硕士研究生导师;

E-mail: yiminbao@163.com

and 10 mg/kg BAY-117082 at 30 min before ligation, respectively. The I/R+PNS+CC group received 0.25 mg/kg Compound C via jugular vein injection at 40 min before ligation, followed by ip injection of 50 mg/kg PNS at 30 min before ligation. Hemodynamic parameters, myocardial histopathological changes, and myeloperoxidase (MPO) activity were assessed. The protein and mRNA expressions of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in myocardial tissue were measured using real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blot was performed to detect the protein expressions of phosphorylated AMPK (p-AMPK), cytoplasmic phosphorylated NF- $\kappa$ B inhibitor kinase  $\alpha/\beta$  (p-IKK $\alpha/\beta$ ), phosphorylated NF- $\kappa$ B inhibitor  $\alpha$  (p-I $\kappa$ B $\alpha$ ), and nuclear phosphorylated NF- $\kappa$ B (p-NF- $\kappa$ B) in myocardial tissue. Immunofluorescence staining was used to observe the nuclear translocation of p-NF- $\kappa$ B. **Results** Compared with the Sham group, the I/R group showed decreased cardiac systolic and diastolic functions ( $P < 0.05$ ), aggravated myocardial pathological damage, increased MPO activity and expressions of inflammatory factors (TNF- $\alpha$  and MCP-1) ( $P < 0.05$ ), reduced p-AMPK expression ( $P < 0.05$ ), and elevated expressions of NF- $\kappa$ B pathway-related proteins (p-IKK $\alpha/\beta$ , p-I $\kappa$ B $\alpha$ , and p-NF- $\kappa$ B) ( $P < 0.05$ ). Compare with the I/R group, the I/R+PNS group exhibited improved cardiac function ( $P < 0.05$ ), alleviated myocardial pathological damage, decreased MPO activity and inflammatory factor expressions ( $P < 0.05$ ), increased p-AMPK expression ( $P < 0.05$ ), and reduced expressions of NF- $\kappa$ B pathway proteins ( $P < 0.05$ ). Compared with the I/R+PNS group, the I/R+PNS+CC group displayed declined cardiac function ( $P < 0.05$ ), exacerbated pathological damage, increased MPO activity, inflammatory factors, and NF- $\kappa$ B pathway protein expressions ( $P < 0.05$ ), as well as reduced p-AMPK expression ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** PNS can exert an anti-MIRI effect by inhibiting the inflammatory response, and its mechanism may be related to the regulation of the AMPK-NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**Keywords:** myocardial infarction; ischemia reperfusion injury; panax notoginseng saponins; inflammation reaction; mechanism of action; traditional Chinese medicine research

近年来,心血管疾病已成为我国城乡居民疾病死亡构成比的重要组成部分<sup>[1]</sup>。缺血性心脏病是最常见的一类,其发病率呈逐年上升趋势,尤其是急性心肌梗死(AMI)的发病率增长尤为显著<sup>[2]</sup>。恢复灌注是治疗缺血性心脏病的主要手段,然而心肌在缺血后恢复血液供应时,可能会出现细胞代谢功能紊乱、组织结构破坏,甚至导致其他不可逆的损伤,此被称为心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)<sup>[3]</sup>。MIRI可引发心肌细胞凋亡、心肌损害、微血管内皮受损以及无复流现象等,对疾病的治疗进程及预后产生了显著不良影响,已成为临床亟待解决的难题<sup>[4]</sup>。MIRI病理机制十分复杂,其中炎症是导致MIRI进行性加重的关键因素之一<sup>[5]</sup>。研究<sup>[5]</sup>表明,MIRI与促炎因子和细胞因子的急性增加密切相关,减少再灌注时的过度炎症反应对于减轻缺血再灌注(I/R)损伤和保持MIRI后的心脏功能非常重要。在再灌注损伤及炎症反应过程中,腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)<sup>[6]</sup>和核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)<sup>[7]</sup>是两种具有重要调控作用的关键蛋白。AMPK-NF- $\kappa$ B通路在细胞能量调控和炎症反应中起关键作用,其在代谢性疾病、炎症性疾病、心血管疾病等许多疾病过程中具有重要意义,但对于抗MIRI的作用鲜有报道。三七总皂苷(panax notoginseng saponins, PNS)是三七的主要活性成分。已有临床研究和动物实验表明,PNS能够通过其抗炎作用有效减轻MIRI<sup>[8]</sup>,然而目前PNS对MIRI的抗炎和心脏保护作用具体的分子机制深入研究较少,因此本研究旨在探讨PNS能否通过调节AMPK-NF- $\kappa$ B信号传导通路来抑制MIRI引发的炎症反应。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 SD雄性大鼠82只,清洁级,体质量(250±20)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。动物生产许可证号:SCXK(沪)2022-0004;动物使用许可证号:SYXK(沪)2020-0009。动物在上海中医药大学实验动物中心饲养,饲养环境温度为20~25℃,相对湿度为50%~60%,动物自由摄食饮水。动物实验方案经上海中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理批号:PZSHUTCM2303180008)。

1.1.2 药物与试剂 血塞通注射液(批号:13HK03),昆明制药集团股份有限公司;AMPK激活剂AICAR(批号:6B/156564),英国Tocris公司;AMPK抑制剂Compound C(批号:D00164813),德国Calbiochem公司;NF- $\kappa$ B抑制剂BAY-117082(BAY)(批号:063M4620V),美国Sigma公司;逆转录试剂盒、PCR试剂盒(批号分别为RR047A、RR420A),日本Takara公司;髓过氧化物酶(MPO)测试盒(批号:A044),南京建成生物工程研究所;肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒、核蛋白抽提试剂盒(批号:KRC3011、pierce 78833),美国Thermo Fisher Scientific公司;单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)ELISA试剂盒(批号:KRC1011, KRC1012),美国Invitrogen公司;NF- $\kappa$ B p65抗体、山羊抗兔(Goat Anti-Rabbit)IgG H&L(批号分别为GR2188776-6、GR216608-1),美国Abcam公司;磷酸化NF- $\kappa$ B p65(p-NF- $\kappa$ B p65)抗体、AMPK $\alpha$ 抗体、磷酸化AMPK $\alpha$ (p-AMPK $\alpha$ )抗体、磷酸化NF- $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$

(p-IκBα)抗体、NF-κB抑制蛋白α(IκBα)抗体、磷酸化NF-κB抑制蛋白激酶α/β(p-IKKα/β)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、组蛋白H3抗体、山羊抗兔IgG-HRP、山羊抗小鼠IgG-HRP(批号分别为3033T、5832T、2535T、9246T、4812T、2697T、2118S、4499T、7074P2、7076P2),美国Cell Signaling Technology公司。

1.1.3 主要仪器 多道生理信号采集处理系统、动物呼吸机(型号分别为RM6240BD、DHX-300),成都仪器厂;Western blot电泳转膜装置(型号:PowerPacTMHC),美国Bio-Rad公司;化学发光成像系统(型号:FC-M),美国ProteinSimple公司;激光共聚焦显微镜(型号:Leica TCS SP8),德国Leica公司;多功能酶标仪(型号:Synergy2),美国BioTek公司;Light Cycler 96荧光定量PCR仪器(型号:05815916001L),瑞士Roche公司。

1.2 分组 将SD大鼠随机分成6组,即假手术(Sham)组( $n=11$ )、模型(I/R)组( $n=15$ )、模型+PNS(I/R+PNS)组( $n=12$ )、模型+AMPK激活剂(I/R+AICAR)组( $n=15$ )、模型+PNS+AMPK抑制剂(I/R+PNS+CC)组( $n=14$ )、模型+NF-κB抑制剂(I/R+BAY)组( $n=15$ )。

1.3 造模与干预 通过结扎左前降支(LAD)的方法<sup>[9]</sup>构建大鼠心肌I/R模型。腹腔注射2%的戊巴比妥钠(40 mg/kg)溶液进行麻醉,麻醉后呈仰卧位,四肢固定。颈部实施气管插管,并与呼吸机相连,设定呼吸频率为90次/min,吸气与呼气比为1:2,潮气量范围为10~12 mL。于胸骨左缘第3、第4肋间开胸,使心脏充分暴露,并用手术缝合线对左前降支进行结扎,缺血40 min后,解开线恢复血流1 h。以心电图显示ST段抬高和(或)T波高耸,肉眼观察到结扎线以下心肌颜色苍白,边缘发绀为缺血成功;再灌注后,可见ST段抬高和T波恢复(下降50%以上)且结扎线以下心肌颜色恢复正常。Sham组大鼠只穿线,不对其进行结扎,其余操作与I/R组相同。所有组别均于结扎前40 min和30 min分两次进行注射,除Compound C为颈静脉注射外,其余药物及0.9%的氯化钠溶液均为腹腔注射。具体干预方法:Sham组与I/R组两次注射均为0.9%的氯化钠溶液;I/R+PNS组于结扎前40 min注射0.9%的氯化钠溶液,前30 min时注射PNS(50 mg/kg<sup>[10]</sup>);I/R+AICAR组于结扎前40 min注射0.9%的氯化钠溶液,前30 min时注射AICAR(10 mg/kg<sup>[11]</sup>);I/R+PNS+CC组于结扎前40 min注射Compound C(0.25 mg/kg<sup>[12]</sup>),前30 min时注射PNS(50 mg/kg);I/R+BAY组于结扎前40 min注射0.9%的氯化钠溶液,前30 min时注射BAY-117082(10 mg/kg<sup>[13]</sup>)。所有注射用溶液均以5 mL/kg实施注射。

#### 1.4 观察指标

1.4.1 血流动力学指标检测 利用生理信号采集处理

系统,经右颈总动脉插管至左心室,监测心肌I/R后的左室内压(LVP)曲线。检测血流动力学指标,包括室内压最大上升与下降速率( $\pm dp/dt_{max}$ )、左心室压力上升到最大速率的时间( $t-dp/dt_{max}$ ),并计算出左心室发展压(DP)。DP(mmHg)=左心室收缩压(LVSP)-左心室舒张压(LVDP)。

1.4.2 心肌形态学观察 再灌注结束后迅速取出心脏,切取左心室缺血再灌注区域心肌,采用4%的多聚甲醛溶液固定。通过石蜡包埋、切片、苏木精-伊红(HE)染色等步骤,在光学显微镜下观察心肌的病理学变化情况。

1.4.3 MPO活性检测 选取心肌组织30 mg左右制成质量分数为5%的组织悬浮液。参照MPO试剂盒说明书进行检测,计算MPO活力。

1.4.4 ELISA法检测TNF-α和MCP-1蛋白水平 依据试剂盒说明书,对心肌组织中TNF-α和MCP-1蛋白水平进行检测,在酶标仪上测定光密度(OD)。

1.4.5 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)法检测TNF-α和MCP-1 mRNA水平 取大鼠心肌组织50~100 mg,加入1 mL TRIzol试剂及200 μL氯仿提取总RNA,根据试剂盒说明书操作将RNA逆转录成cDNA,以GAPDH为内参进行荧光定量PCR扩增,引物序列来自文献<sup>[14-16]</sup>,由美国Thermo Fisher Scientific公司合成,见表1。反应条件:95℃、30 s,循环1次;95℃、5 s,循环40次;60℃、30 s,循环40次。各组均设3个复孔,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算TNF-α和MCP-1 mRNA基因的相对表达量。

表1 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
TNF-α <sup>[14]</sup>	上游:GCCAATGGCATGGATCTCAAAG
	下游:CAGAGCAATGACTCCAAAGT
MCP-1 <sup>[15]</sup>	上游:AATGGGTCCAGAAGTACATTAGAAA
	下游:GGTGCTGAAGTCCTTAGGGTTG
GAPDH <sup>[16]</sup>	上游:GCTGGGGCTCACCTGAAGG
	下游:GGATGACCTTGCCACAGCC

注:TNF-α为肿瘤坏死因子-α基因,MCP-1为单核细胞趋化蛋白-1基因,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因。

1.4.6 Western blot法检测AMPK和NF-κB相关蛋白表达 首先提取心肌组织全细胞、核蛋白以及胞浆蛋白,采用二辛可酸(BCA)法检测蛋白浓度。每孔上样量为50~80 μg,用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白(浓缩胶80 V,45 min;分离胶120 V,90 min),将分离后的蛋白转印(250 mA,90 min)于聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。之后用质量分数为5%的牛血清白蛋白(BSA)或质量分数为5%的脱脂奶粉室温封闭1 h。加入一抗[p-NF-κB p65(1:1 000)、NF-κB p65(1:1 000)、p-AMPKα(1:

1 000)、AMPK $\alpha$ (1:1 000)、p-I $\kappa$ B $\alpha$ (1:1 000)、I $\kappa$ B $\alpha$ (1:1 000)、p-IKK $\alpha/\beta$ (1:1 000)、GAPDH(1:3 000)、组蛋白 H3(1:3 000)]在 4 °C 条件下孵育过夜。用含吐温-20 的 Tris-HCl 溶液(TBST)洗涤 10 min $\times$ 3 次。加入相应二抗(1:5 000),室温孵育 1 h,洗涤 10 min $\times$ 3 次,随后使用增强型化学发光试剂(ECL)曝光显影,用 AlphaView SA 软件进行条带灰度分析。

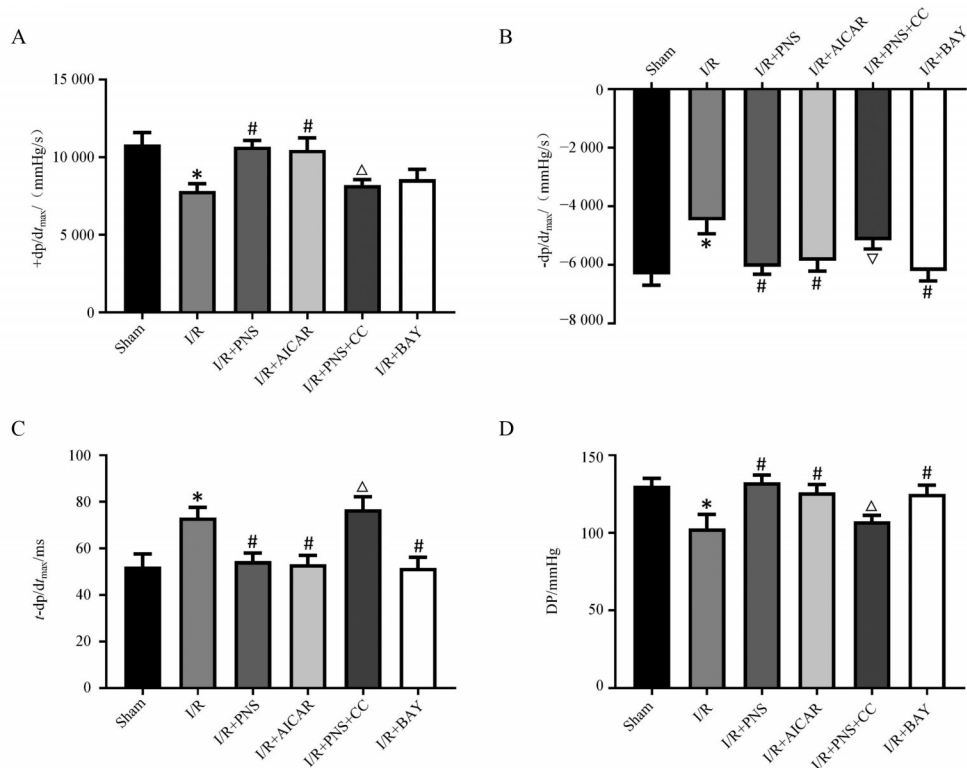
1.4.7 免疫荧光染色法检测 p-NF- $\kappa$ B 入核水平 取预先制备的心肌组织石蜡切片进行脱蜡处理,随后进行复水化、抗原修复、染色、孵育与复染,然后进行封片操作,最后在激光共聚焦显微镜下观察。

1.5 统计学方法 本研究数据使用 GraphPad Prism 9.5.0 软件进行统计分析,计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示。所有数

据均进行正态性检验和方差齐性检验,两组间的比较采用独立样本  $t$  检验,多组间比较采用单因素方差分析。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 PNS 对大鼠心肌 I/R 后血流动力学的影响 血流动力学检测结果显示,与 Sham 组相比,I/R 组大鼠 +dp/dt<sub>max</sub>、-dp/dt<sub>max</sub>、DP 减小( $P<0.05$ ), $t$ -dp/dt<sub>max</sub> 延长( $P<0.05$ )。与 I/R 组相比,I/R+PNS 组和 I/R+AICAR 组的 +dp/dt<sub>max</sub>、-dp/dt<sub>max</sub>、DP 显著增大( $P<0.05$ ), $t$ -dp/dt<sub>max</sub> 显著减少( $P<0.05$ );I/R+BAY 组的 -dp/dt<sub>max</sub>、DP 增大( $P<0.05$ ), $t$ -dp/dt<sub>max</sub> 减少( $P<0.05$ )。与 I/R+PNS 组相比,I/R+PNS+CC 组的 +dp/dt<sub>max</sub>、-dp/dt<sub>max</sub>、DP 减小( $P<0.05$ ), $t$ -dp/dt<sub>max</sub> 延长( $P<0.05$ )。见图 1。



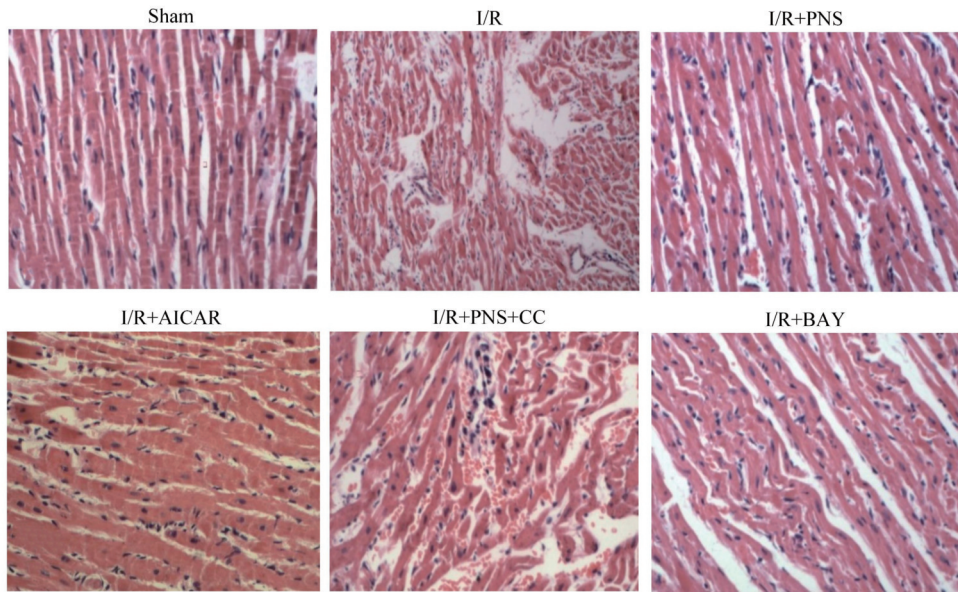
注: $\pm dp/dt_{max}$  为室内压最大上升与下降速率, $t-dp/dt_{max}$  为左心室压力上升到最大速率的时间,DP 为左心室发展压。Sham 为假手术组,I/R 为模型组,I/R+PNS 为模型+三七总皂苷组,I/R+AICAR 为模型+AMPK 激活剂组,I/R+PNS+CC 为模型+三七总皂苷+AMPK 抑制剂组,I/R+BAY 为模型+核因子- $\kappa$ B 抑制剂组。与 Sham 比较,\* $P<0.05$ ;与 I/R 比较,# $P<0.05$ ;与 I/R+PNS 比较, $\Delta P<0.05$ ;n=6~10, $\bar{x}\pm s$ 。

图 1 各组大鼠血流动力学指标比较

2.2 PNS 对心肌组织形态学病理变化的影响 HE 结果显示,Sham 组心肌组织形态学无明显改变。与 Sham 组相比,I/R 组心肌组织纤维排列紊乱,甚至出现断裂,心肌纤维间隙明显变宽,组织间隙内存在少量炎症细胞,提示心肌细胞受损明显;同时存在大量红细胞,提示有局部出血。与 I/R 组相比,I/R+PNS 组、I/R+AICAR 组、I/R+BAY 组心肌细胞损伤均得到一定程度改善。与 I/R+PNS 组相比,I/R+PNS+CC 组心肌损伤程度较高。见图 2。

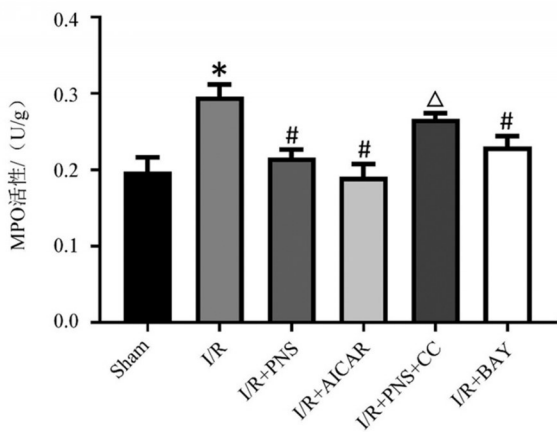
2.3 PNS 对 I/R 后 MPO 活性的影响 MPO 活性检测结果显示,与 Sham 组相比,I/R 组心肌组织的 MPO 活性明显升高( $P<0.05$ );与 I/R 组相比,I/R+PNS 组、I/R+AICAR 组、I/R+BAY 组的 MPO 活性均明显降低( $P<0.05$ )。I/R+PNS+CC 组 MPO 活性明显高于 I/R+PNS 组( $P<0.05$ )。见图 3。

2.4 PNS 对大鼠心肌组织 I/R 后 TNF- $\alpha$ 、MCP-1 蛋白及 mRNA 表达的影响 ELISA 和 RT-qPCR 结果显示,与 Sham 组比较,I/R 组 TNF- $\alpha$ 、MCP-1 的蛋白及 mRNA 表



注:Sham为假手术组,I/R为模型组,I/R+PNS为模型+三七总皂苷组,I/R+AICAR为模型+腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)激活剂组,I/R+PNS+CC为模型+三七总皂苷+AMPK抑制剂组,I/R+BAY为模型+核因子-κB抑制剂组。

图2 各组大鼠心肌组织光镜照片(苏木精-伊红染色,×200)



注:MPO为髓过氧化物酶。Sham为假手术组,I/R为模型组,I/R+PNS为模型+三七总皂苷组,I/R+AICAR为模型+腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)激活剂组,I/R+PNS+CC为模型+三七总皂苷+AMPK抑制剂组,I/R+BAY为模型+核因子-κB抑制剂组。与Sham比较,\* $P<0.05$ ;与I/R比较,# $P<0.05$ ;与I/R+PNS比较,Δ $P<0.05$ ;n=9,  $\bar{x}\pm s$ 。

图3 各组大鼠心肌组织MPO活性比较

达量均显著升高( $P<0.05$ )。与I/R组比较,I/R+PNS组、I/R+BAY组TNF-α、MCP-1的蛋白及mRNA表达量显著降低( $P<0.05$ );I/R+AICAR组TNF-α、MCP-1的蛋白表达量及TNF-α mRNA表达量显著降低( $P<0.05$ )。与I/R+PNS组比较,I/R+PNS+CC组TNF-α、MCP-1蛋白及mRNA表达量显著升高( $P<0.05$ )。见图4。

### 2.5 PNS对I/R心肌组织AMPK蛋白表达的影响

Western blot结果显示,与Sham组比较,I/R组p-AMPK表达量明显减少( $P<0.05$ );与I/R组比较,I/R+PNS组、I/R+AICAR组p-AMPK和总AMPK表达量均显著升高( $P<0.05$ );与I/R+PNS组比较,I/R+PNS+CC组

p-AMPK表达量明显减少( $P<0.05$ )。见图5。

### 2.6 PNS对大鼠心肌组织I/R后NF-κB通路蛋白表达的影响

大鼠心肌组织胞浆蛋白的Western blot结果显示,与Sham组相比,I/R组胞浆p-IKKα/β表达量显著降低、p-IκBα表达量明显增加( $P<0.05$ );与I/R组相比,I/R+PNS组、I/R+AICAR组的p-IKKα/β表达量显著增加、p-IκBα表达量显著降低( $P<0.05$ );I/R+BAY组的p-IκBα表达量显著降低( $P<0.05$ )。大鼠心肌组织核蛋白Western blot结果显示,与Sham组相比,I/R组核内p-NF-κB表达量明显增加( $P<0.05$ );与I/R组相比,I/R+PNS组、I/R+AICAR组以及I/R+BAY组细胞核内p-NF-κB的表达量显著降低( $P<0.05$ )。与I/R+PNS组相比,I/R+PNS+CC组的p-IKKα/β、p-IκBα以及核内p-NF-κB的表达量差异均具有统计学意义( $P<0.05$ )。见图6。

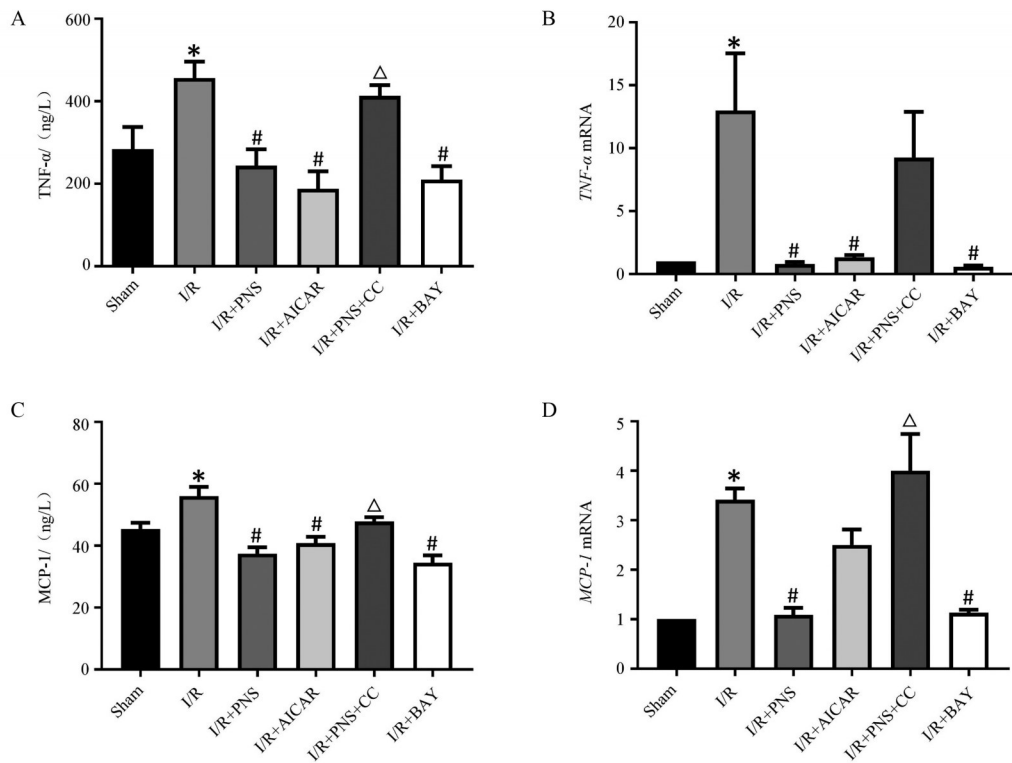
### 2.7 PNS对心肌组织p-NF-κB核内表达的影响

免疫荧光染色法结果显示,与Sham组相比,I/R组大鼠心肌组织p-NF-κB核内表达量明显增加( $P<0.05$ );与I/R组相比,I/R+PNS组、I/R+AICAR组以及I/R+BAY组的p-NF-κB入核程度明显降低( $P<0.05$ );I/R+PNS+CC组p-NF-κB核内表达量明显高于I/R+PNS组( $P<0.05$ )。见图7。

## 3 讨论

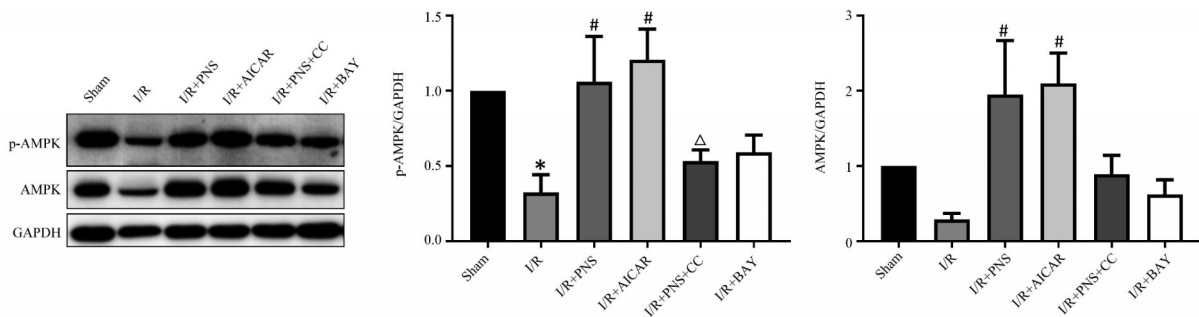
缺血心肌在恢复血流供应的过程中会引起额外的损伤,并且MIRI后的急性炎症性损伤和慢性心力衰竭仍然是AMI后死亡的主要原因<sup>[17-18]</sup>。因此,抑制炎症反应在MIRI的防治中十分关键。

三七具有良好的止血和活血化瘀双重功效,而



注:TNF- $\alpha$ 为肿瘤坏死因子- $\alpha$ ,MCP-1为单核细胞趋化蛋白-1,Sham为假手术组,I/R为模型组,I/R+PNS为模型+三七总皂苷组,I/R+AICAR为模型+腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)激活剂组,I/R+PNS+CC为模型+三七总皂苷+AMPK抑制剂组,I/R+BAY为模型+核因子- $\kappa$ B抑制剂组。A为酶联免疫吸附试验(ELISA)检测TNF- $\alpha$ 蛋白统计图,B为TNF- $\alpha$  mRNA相对表达量统计图,C为ELISA检测MCP-1蛋白统计图,D为MCP-1 mRNA相对表达量统计图。与Sham比较,\* $P$ <0.05;与I/R比较,# $P$ <0.05;与I/R+PNS比较, $\Delta P$ <0.05; $n$ =6~10, $\bar{x}\pm s$ 。

图4 各组大鼠心肌组织TNF- $\alpha$ 、MCP-1蛋白及mRNA表达比较



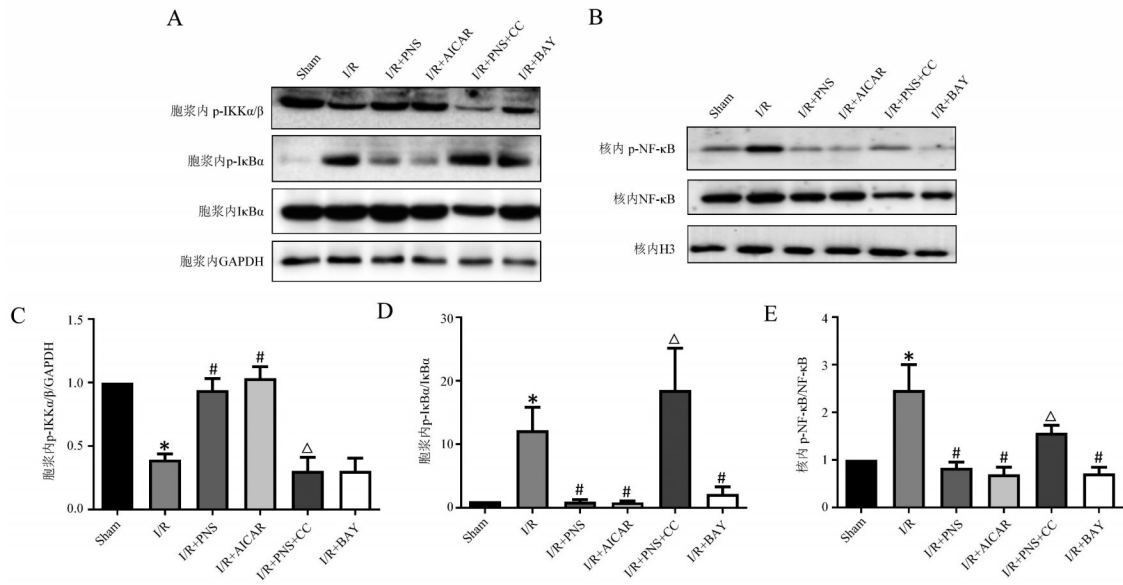
注:AMPK为腺苷酸活化蛋白激酶,p-AMPK为磷酸化AMPK,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。Sham为假手术组,I/R为模型组,I/R+PNS为模型+三七总皂苷组,I/R+AICAR为模型+AMPK激活剂组,I/R+PNS+CC为模型+三七总皂苷+AMPK抑制剂组,I/R+BAY为模型+核因子- $\kappa$ B抑制剂组。与Sham比较,\* $P$ <0.05;与I/R比较,# $P$ <0.05;与I/R+PNS比较, $\Delta P$ <0.05; $n$ =3, $\bar{x}\pm s$ 。

图5 各组大鼠再灌注心肌AMPK通路相关蛋白表达比较

PNS作为三七的重要活性成分,多用于各类心血管疾病,具有明显的疗效。以往研究<sup>[19-20]</sup>显示,PNS具有减轻心肌组织炎症反应、抑制心肌细胞凋亡、降低血脂水平等作用。本研究观察了PNS对再灌注心脏血流动力学和形态学的保护作用,并探讨其抗心肌组织炎症反应的机制。血流动力学结果显示,PNS可使MIRI大鼠+dp/dt<sub>max</sub>、-dp/dt<sub>max</sub>、DP增大,并使t-dp/dt<sub>max</sub>缩短,即改善再灌注心肌的收缩和舒张功能。同时,HE染色结果显示,PNS减轻了大鼠I/R心肌组织的病理损伤。上述实验结果表明,PNS能够改善由MIRI引发的心功能受损

情况,对心肌组织病理变化有减轻作用,显示出对再灌注心肌的保护作用。

中性粒细胞介导的炎症反应,连同炎症因子的参与,构成了MIRI发生的重要机制,是造成MIRI的中介环节<sup>[21]</sup>。MPO主要存在于中性粒细胞中<sup>[22]</sup>,其水平及活性变化可反映炎症反应的程度。因此,I/R+PNS组心肌组织MPO活性水平的降低说明PNS可通过减轻炎症反应,发挥抗MIRI作用。TNF- $\alpha$ 是关键的炎症因子,能够诱导其他炎症介质的产生;MCP-1是一种趋化因子,主要吸引单核细胞和淋巴细胞迁移至炎症病灶区域,



注:p-IKK $\alpha$ / $\beta$ 为磷酸化核因子(NF)- $\kappa$ B抑制蛋白激酶 $\alpha$ / $\beta$ ,p-I $\kappa$ B $\alpha$ 为磷酸化NF- $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ ,I $\kappa$ B $\alpha$ 为NF- $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ ,p-NF- $\kappa$ B为磷酸化核因子- $\kappa$ B,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶,H3为组蛋白H3。Sham为假手术组,I/R为模型组,I/R+PNS为模型+三七总皂苷组,I/R+AICAR为模型+AMPK激活剂组,I/R+PNS+CC为模型+三七总皂苷+AMPK抑制剂组,I/R+BAY为模型+NF- $\kappa$ B抑制剂组。A为胞浆内相关蛋白表达条带图,B为核内相关蛋白表达条带图,C为胞浆内p-IKK $\alpha$ / $\beta$ 相对表达量统计图,D为胞浆内p-I $\kappa$ B $\alpha$ 相对表达量统计图,E为核内p-NF- $\kappa$ B相对表达量统计图。与Sham比较,\* $P$ <0.05;与I/R比较,# $P$ <0.05;与I/R+PNS比较, $\Delta P$ <0.05; $n$ =3, $\bar{x}\pm s$ 。

图6 各组心肌NF- $\kappa$ B通路蛋白磷酸化水平比较

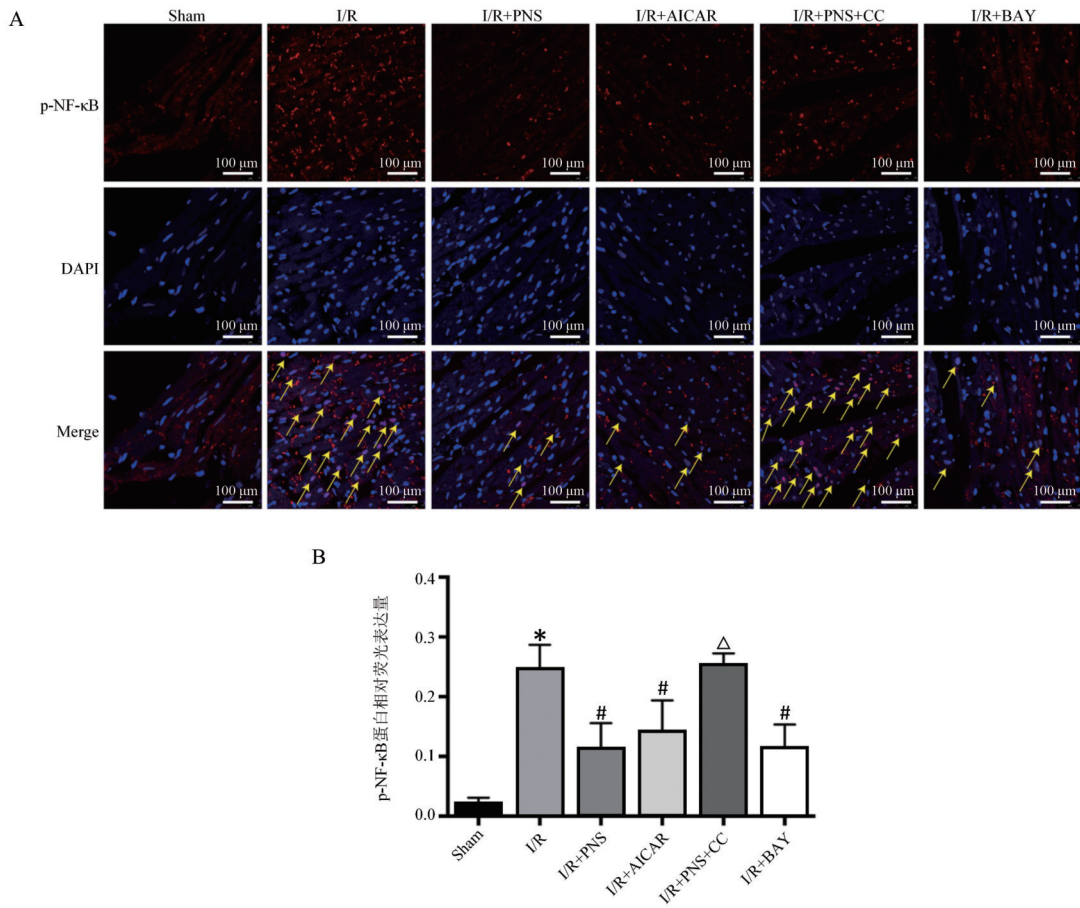
两者在调节炎症反应过程中起着至关重要的作用<sup>[23]</sup>。本研究通过测定TNF- $\alpha$ 与MCP-1蛋白及基因转录表达情况来反映I/R期间炎症反应程度。实验结果显示,I/R组TNF- $\alpha$ 、MCP-1的蛋白和mRNA表达均显著增加,表明炎症反应增加;I/R+PNS组上述各指标与I/R组比较均明显下降,说明PNS能够降低TNF- $\alpha$ 、MCP-1蛋白表达和基因转录,从而起到抗炎的效果。

作为细胞能量代谢的关键调节因子,AMPK与心肌缺血及再灌注损伤后细胞能量的调控和利用密切相关<sup>[24]</sup>,并参与再灌注心肌的多种病理机制。AMPK的磷酸化程度反映其活化水平。本研究结果显示,PNS能增加再灌注心肌胞浆p-AMPK及AMPK总蛋白的表达,其效果与AMPK激活剂AICAR相似,并可被AMPK抑制剂Compound C阻断,说明促进AMPK蛋白表达与磷酸化程度是PNS发挥抗MIRI作用的潜在机制之一。

NF- $\kappa$ B作为炎症信号传导途径中的核心转录因子,调控多种炎症相关基因的表达<sup>[25]</sup>。生理状态下,NF- $\kappa$ B和NF- $\kappa$ B抑制蛋白(I $\kappa$ B)形成复合物,以无活性形式存在于胞浆中;当细胞受到病理因素的刺激时,会激活NF- $\kappa$ B抑制蛋白激酶(IKK)复合物,使I $\kappa$ B磷酸化并发生结构改变,NF- $\kappa$ B被游离出来,磷酸化并迅速转移至细胞核内,触发下游炎症因子、细胞因子等的转录,进而促进炎症的发生<sup>[26]</sup>。Western blot结果显示,PNS能够使再灌注心肌胞浆中的p-I $\kappa$ B $\alpha$ 以及细胞核内的p-NF- $\kappa$ B表达量有所降低;免疫荧光染色法结果显

示,PNS能显著减少心肌p-NF- $\kappa$ B入核水平,作用与NF- $\kappa$ B抑制剂BAY-117082相同。由此说明PNS可通过抑制I $\kappa$ B $\alpha$ 磷酸化、减少p-NF- $\kappa$ B入核来对NF- $\kappa$ B信号通路起到抑制作用,进而减轻炎症反应,最终发挥其抗MIRI的作用。

已有研究<sup>[27]</sup>表明,AMPK通过多种途径抑制NF- $\kappa$ B信号传导。AMPK可通过调节NF- $\kappa$ B活性抑制缺氧应激介导的炎症反应,激活AMPK可阻断IKK/I $\kappa$ B通路来减少炎症,从而阻止NF- $\kappa$ B的核易位<sup>[28-30]</sup>。AMPK激活后可使下游的沉默信息调节因子1(SIRT1)表达上调,抑制NF- $\kappa$ B信号通路,减轻氧化应激、炎症和纤维化<sup>[31]</sup>。此外,AMPK还可通过调节自噬间接抑制NF- $\kappa$ B关联的NLRP3炎性小体激活,削弱NF- $\kappa$ B通路对NLRP3炎性小体激活的促进作用,减轻炎症<sup>[32]</sup>。然而AMPK-NF- $\kappa$ B通路在MIRI中的作用报道很少,且PNS能否通过此通路发挥抗MIRI作用尚未见报道。故本研究采用3种工具药(AMPK激活剂AICAR、AMPK抑制剂Compound C以及NF- $\kappa$ B抑制剂BAY-117082)作为对照,进一步探讨PNS的具体机制。本研究发现,PNS与AICAR和BAY-117082作用相同,说明PNS可通过AMPK和NF- $\kappa$ B通路减轻I/R大鼠的炎症反应。为进一步验证该结论,我们在PNS作用之前提前用Compound C进行干预,结果发现大鼠I/R心肌的3种炎症标志物(TNF- $\alpha$ 、MCP-1、MPO)的水平与PNS组比较显著增加,这表明Compound C可以抑制PNS的抗炎作用;同时



注: p-NF-κB 为磷酸化核因子(NF)-κB, DAPI 为 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶, Merge 为合并。A 为 p-NF-κB 表达和核转位变化的免疫荧光结果, p-NF-κB 用红色荧光标记, 黄色箭头表示 p-NF-κB 与细胞核共定位。B 为 p-NF-κB 相对荧光表达量统计图。Sham 为假手术组, I/R 为模型组, I/R+PNS 为模型+三七总皂苷组, I/R+AICAR 为模型+腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)激活剂组, I/R+PNS+CC 为模型+三七总皂苷+AMPK 抑制剂组, I/R+BAY 为模型+NF-κB 抑制剂组。与 Sham 比较, \*P<0.05; 与 I/R 比较, #P<0.05; 与 I/R+PNS 比较, △P<0.05; n=5,  $\bar{x} \pm s$ 。

图7 各组大鼠心肌组织 p-NF-κB 核内表达比较

AMPK-NF-κB 通路的各蛋白表达也与 PNS 组相反, 显示 Compound C 能够阻断 PNS 对再灌注心肌的保护作用。上述结果证明了 AMPK 可能是 PNS 在 I/R 损伤大鼠心脏中抗炎作用的关键靶点。与此同时, AICAR 能够抑制 NF-κB 信号转导; 当 AMPK 的激活受到抑制时, NF-κB 的磷酸化水平呈现上升趋势, 提示 AMPK 信号转导可通过抑制 NF-κB 信号通路引起的炎症反应来减轻 MIRI。以上结果表明, AMPK-NF-κB 通路介导了 PNS 对再灌注心肌的抗炎作用。

综上所述, PNS 可通过调控 AMPK-NF-κB 信号通路发挥抗炎作用, 从而提高 I/R 心肌收缩与舒张的功能, 减轻心肌组织形态学病理改变, 最终起到保护心肌的作用。

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 2023 概要[J]. 中国循环杂志, 2024, 39(7): 625-660.  
 [ 2 ] SOLOLA NUSSBAUM S, HENRY S, YONG C M, et al. Sex-specific considerations in the presentation, diagnosis, and management of

ischemic heart disease: JACC focus seminar 2/7 [J]. J Am Coll Cardiol, 2022, 79(14): 1398-1406.

[ 3 ] HE J F, LIU D Y, ZHAO L X, et al. Myocardial ischemia/reperfusion injury: mechanisms of injury and implications for management (Review)[J]. Exp Ther Med, 2022, 23(6): 430.  
 [ 4 ] LI J Y, LIU S Q, YAO R Q, et al. A novel insight into the fate of cardiomyocytes in ischemia-reperfusion injury: from iron metabolism to ferroptosis[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 799499.  
 [ 5 ] YE J X, LU S, WANG M, et al. Hydroxysafflor yellow a protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via suppressing NLRP3 inflammasome and activating autophagy[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 1170.  
 [ 6 ] 胡雅琪, 刘建和. 中医药调控 AMPK 信号通路治疗心肌缺血再灌注损伤研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(13): 213-221.  
 [ 7 ] 赵桂峰, 张运娇, 唐耿义. 基于 NF-κB 信号通路探讨中医药防治心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 天津中医药, 2018, 35(9): 714-717.  
 [ 8 ] DUAN L, XIONG X J, HU J Y, et al. Panax notoginseng saponins for treating coronary artery disease: a functional and mechanistic overview [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 702.

- [9] 王飘, 郑晴, 胡婷, 等. 三七总皂苷抗大鼠缺血再灌注损伤作用及对心肌自噬水平的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(8): 1249-1252, 1285.
- [10] NING K, JIANG L, HU T, et al. ATP-sensitive potassium channels mediate the cardioprotective effect of Panax notoginseng saponins against myocardial ischaemia-reperfusion injury and inflammatory reaction[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 3039184.
- [11] 陈瑞娟, 郑永先, 汤旺, 等. 红景天苷调控 AMPK/Drp1 信号通路对急性脑出血大鼠的神经功能的保护机制[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(11): 2069-2075.
- [12] 赵心丽, 袁勇, 马晓莉, 等. 基于 AMPK/SIRT1/PGC-1 $\alpha$  信号通路研究香青兰总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护机制[J]. 中国药房, 2021, 32(3): 278-283.
- [13] LIU Z N, WANG X K, WANG Y, et al. NLRP3 inflammasome activation regulated by NF- $\kappa$ B and DAPK contributed to paraquat-induced acute kidney injury [J]. Immunol Res, 2017, 65(3): 687-698.
- [14] LU Z K, YE J X, CHEN W C. Vasoactive intestinal peptide promotes gut barrier function against severe acute pancreatitis [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(4): 3557-3563.
- [15] HONG T Y, TZENG T F, LIOU S S, et al. The ethanol extract of Zingiber zerumbet rhizomes mitigates vascular lesions in the diabetic retina[J]. Vascul Pharmacol, 2016, 76: 18-27.
- [16] 刘青, 戴德哉. 氯苄基四氢小檗碱对大鼠肥厚心肌中 KATP 通道表达的影响[J]. 华侨大学学报(自然科学版), 2008, 29(3): 395-398.
- [17] WELT F G P, BATCHELOR W, SPEARS J R, et al. Reperfusion injury in patients with acute myocardial infarction: JACC scientific statement[J]. J Am Coll Cardiol, 2024, 83(22): 2196-2213.
- [18] LI Y L, CHEN B Y, YANG X Y, et al. S100a8/a9 signaling causes mitochondrial dysfunction and cardiomyocyte death in response to ischemic/reperfusion injury[J]. Circulation, 2019, 140(9): 751-764.
- [19] YANG H, LIU Z D, HU X K, et al. Protective effect of Panax notoginseng saponins on apolipoprotein-E-deficient atherosclerosis-prone mice[J]. Curr Pharm Des, 2022, 28(8): 671-677.
- [20] WANG L L, CHEN X Q, WANG Y C, et al. MiR-30c-5p mediates the effects of Panax notoginseng saponins in myocardial ischemia reperfusion injury by inhibiting oxidative stress-induced cell damage [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 125: 109963.
- [21] WAN Q, XU C S, ZHU L Y, et al. Targeting PDE4B (phosphodiesterase-4 subtype B) for cardioprotection in acute myocardial infarction via neutrophils and microcirculation [J]. Circ Res, 2022, 131(5): 442-455.
- [22] HARTMAN C L, FORD D A. MPO (myeloperoxidase) caused endothelial dysfunction[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018, 38(8): 1676-1677.
- [23] 徐向前, 袁汇, 孔守芳, 等. 血清 IL-8、TLR4、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1、MCP-1 与老年输尿管结石碎石后尿路感染的关系[J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(8): 1863-1867.
- [24] 卢圣锋, 丁亚娟, 于美玲, 等. 电针减轻大鼠心肌缺血损伤的 AMPK $\alpha$ -HDAC5-HIF-1 $\alpha$  信号级联机制[J]. 中国针灸, 2018, 38(9): 978-983.
- [25] NIU L, ZHAO Y Q, LIU S M, et al. Silencing of long non-coding RNA HRIM protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via inhibition of NF- $\kappa$ B signaling[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(6): 5454-5462.
- [26] ALHARBI K S, FULORIA N K, FULORIA S, et al. Nuclear factor- $\kappa$ B and its role in inflammatory lung disease [J]. Chem Biol Interact, 2021, 345: 109568.
- [27] SALMINEN A, HYTTINEN J M, KAARNIRANTA K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- $\kappa$ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan [J]. J Mol Med (Berl), 2011, 89(7): 667-676.
- [28] WEI H Q, GUO X H, YAN J, et al. Neuregulin-4 alleviates isoproterenol (ISO)-induced cardiac remodeling by inhibiting inflammation and apoptosis via AMPK/NF- $\kappa$ B pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2024, 143(Pt 2): 113301.
- [29] CHEN X, LI X, ZHANG W Y, et al. Activation of AMPK inhibits inflammatory response during hypoxia and reoxygenation through modulating JNK-mediated NF- $\kappa$ B pathway [J]. Metabolism, 2018, 83: 256-270.
- [30] LU Z Y, WANG H Z, ISHFAQ M, et al. Quercetin and AMPK: a dynamic duo in alleviating MG-induced inflammation via the AMPK/SIRT1/NF- $\kappa$ B pathway[J]. Molecules, 2023, 28(21): 7388.
- [31] GU T J, ZHOU Y, WANG Q, et al. Downregulation of miR-410-3p via the METRNL-mediated AMPK/SIRT1/NF- $\kappa$ B signaling axis inhibits oxidative stress and inflammation in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Cell Signal, 2025, 130: 111667.
- [32] LIU Z Y, CHU A C, BAI Z Q, et al. Nobiletin ameliorates monosodium urate-induced gouty arthritis in mice by enhancing AMPK/mTOR-mediated autophagy to inhibit NF- $\kappa$ B/NLRP3 inflammasome activation[J]. Immunol Lett, 2025, 274: 106982.

编辑:杨轶舜

收稿日期:2024-12-02