

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.02.003  
网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190910.1636.022.html(2019-09-11)

# 芪苈强心胶囊通过 TLR4/NF-κB 通路减轻心力衰竭大鼠心肌炎性反应的研究<sup>\*</sup>

黄 政,方存明<sup>△</sup>,马小林,胡学俊  
(安徽省宣城市人民医院心内科 242000)

**[摘要]** **目的** 探讨芪苈强心胶囊对心力衰竭大鼠心肌 Toll 样受体 4(TLR4)/核因子-κB(NF-κB)信号通路及炎症细胞因子表达的影响。**方法** 经尾静脉注射阿霉素 2 mg/kg,1 次/周,连续 8 周,建立大鼠心力衰竭模型。将大鼠分为对照组、心力衰竭组(HF 组)及心力衰竭+芪苈强心胶囊组(HF+QLQX 组)。对照组、HF 组以蒸馏水 10 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 灌胃 4 周,HF+QLQX 组采用 1 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 芪苈强心胶囊药粉溶液灌胃 4 周。采用 Western blot 检测各组心肌细胞肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素(IL)-1β、IL-6、TLR4、NF-κB p65 蛋白表达水平,TUNEL 染色检测各组心肌细胞凋亡,苏木素-伊红染色检测各组心肌细胞形态学变化。**结果** HF 组心肌细胞 TNF-α、IL-1β、IL-6、TLR4、NF-κB p65 表达水平较对照组明显增多( $P<0.05$ ),细胞凋亡率明显升高[(35.23±1.67)% vs. (1.63±0.26)%, $P<0.05$ ];与 HF 组比较,HF+QLQX 组心肌细胞 TNF-α、IL-1β、IL-6、TLR4、NF-κB p65 表达水平明显减少( $P<0.05$ ),细胞凋亡率明显降低[(22.20±1.29)% vs. (35.23±1.67)%, $P<0.05$ ],心肌结构损伤减轻。**结论** 芪苈强心胶囊可能通过 TLR4/NF-κB 信号转导通路减轻心力衰竭大鼠心肌细胞炎性反应和损伤。

**[关键词]** 心力衰竭;强心药;炎症介导素类;Toll 样受体 4;NF-κB;细胞凋亡  
**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)02-0183-05

## Study on Qiliqiangxin capsule attenuating myocardial inflammation in rats with heart failure through TLR4/NF-κB signaling pathway<sup>\*</sup>

HUANG Zheng,FANG Cunming<sup>△</sup>,MA Xiaolin,HU Xuejun  
(Department of Cardiology,the People's Hospital of Xuancheng City,Xuancheng,Anhui 242000,China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of Qiliangxin capsule on myocardial Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor-κB (NF-κB) signaling pathway and inflammatory cytokine expression in rats with heart failure. **Methods** A model of heart failure in rats was established by intravenous tail injection of doxorubicin 2 mg/kg,once a week for 8 weeks. The rats were divided into the control group,the heart failure group (the HF group) and the heart failure+Qiliangxin capsule group (the HF+QLQX group). The control group and the HF group were intragastrically administered with distilled water 10 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> for 4 weeks. The HF+QLQX group was administered with 1 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> Qiliangxin capsule solution for 4 weeks. The expressions of tumor necrosis factor-α (TNF-α),interleukin (IL)-1β,IL-6,TLR4 and NF-κB p65 in the myocardium were detected by Western blot,cardiomyocyte apoptosis was detected by TUNEL staining,and morphological changes of myocardium were detected by hematoxylin-eosin staining. **Results** The HF group showed higher levels of TNF-α,IL-1β,IL-6,TLR4,NF-κB p65 expression ( $P<0.05$ ),and higher cardiomyocyte apoptosis rate[(35.23±1.67)% vs. (1.63±0.26)%, $P<0.05$ ] than the control group. Compared with the HF group,the expressions of TNF-α,IL-1β,IL-6,TLR4 and NF-κB p65 in the HF+QLQX group significantly decreased ( $P<0.05$ ),the rate of cardiomyocyte apoptosis decreased[(22.20±1.29)% vs. (35.23±1.67)%, $P<0.05$ ],myocardial structural damage alleviated. **Conclusion** Qiliangxin capsule attenuates myocardial inflammation and injury in rats with heart failure through TLR4/NF-κB signaling pathway.

**[Key words]** heart failure;cardiotonic agents;inflammation mediators;Toll-like receptor 4;NF-kappa B;apoptosis

<sup>\*</sup> 基金项目:安徽省宣城市科技计划项目(1817)。 作者简介:黄政(1982—),主治医师,硕士,主要从事心血管内科疾病研究。 <sup>△</sup>通信作者,E-mail:sshfang@126.com。

心力衰竭是各种心血管疾病的终末期表现和最主要死因。目前认为,肾素-血管紧张素-醛固酮系统及交感神经的激活在心力衰竭的发病过程中起关键作用。近年研究发现,免疫炎症反应的异常激活是促进心力衰竭进展的重要因素,抗炎治疗有可能成为心力衰竭治疗的新方向<sup>[1-3]</sup>。芪苈强心胶囊是被大量研究证实能够有效抑制心室重构、缓解心力衰竭症状并改善心力衰竭患者预后的中成药<sup>[4-6]</sup>,然而其抗心力衰竭作用的机制仍不清楚。本研究通过观察芪苈强心胶囊对心力衰竭大鼠心肌炎性细胞因子及相关信号转导通路的影响,探讨其治疗心力衰竭的机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只,体质量(230±20)g,购自广西医科大学医学实验动物中心。大鼠饲养条件:室温(22±2)℃,湿度 50%~60%,12 h 光照/12 h 黑暗节律。所有实验大鼠均为单笼饲养。

1.1.2 药物与试剂

阿霉素注射液购自北京索莱宝科技公司,芪苈强心胶囊购自石家庄以岭药业,大鼠肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素(IL)-1β、IL-6、Toll 样受体(TLR)4、核因子-κB(NF-κB)p65、β-actin 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司,苏木素-伊红(HE)染色、TUNEL 染色、BCA 蛋白水平检测试剂盒购自上海碧云天生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立

SD 大鼠经尾静脉注射阿霉素 2 mg/kg,1 次/周,连续 8 周。当大鼠出现进食减少,精神萎靡,反应迟钝,皮毛松软、脱毛,活动能力下降表现时提示发生心力衰竭,经心脏超声检查提示左心室短轴缩短率(FS)<30%可确定造模成功<sup>[7]</sup>。对照组大鼠经尾静脉注射等量生理盐水,1 次/周,连续 8 周。

1.2.2 实验分组及给药方法

将造模成功的大鼠分为心力衰竭组(HF 组,8 只)、心力衰竭+芪苈强心胶囊组(HF+QLQX 组,8 只),另设正常大鼠为对照组(8 只)。HF+QLQX 组处理方法参考韩安邦等<sup>[8]</sup>的研究方法,将芪苈强心胶囊药粉溶于蒸馏水中,配制成浓度为 100 g/L 的芪苈强心溶液,以 1 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 芪苈强心溶液灌胃 4 周。对照组、HF 组以蒸馏水 10 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 灌胃 4 周。

1.2.3 Western blot 检测蛋白水平

实验结束后取大鼠心肌组织 40 g 剪成碎块,加入 RIPA 裂解液于冰上裂解 30 min,玻璃匀浆器中充分匀浆。匀浆液 4℃,14 000 r/min 离心 10 min 后吸取上清液。采用 BCA 法测定蛋白浓度。取等量蛋白上样,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳后将蛋白转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,5%脱脂牛奶室温封闭 2 h。膜洗涤后加入一抗溶液中 4℃孵育过夜,洗膜后再加入二抗溶液中室温孵育 1 h。经洗涤、显影、灰度扫描后,采用 Image J 软件对蛋白条带进行灰度值测定,以目的条带与 β-actin 的灰度比值代表各目的蛋白的相对表达水平。

1.2.4 病理学检测

大鼠心肌组织以 4%多聚甲醛 4℃固定 24 h,常规石蜡包埋、切片。采用 TUNEL 染色观察心肌细胞凋亡情况,HE 染色观察心肌细胞形态学变化。所有操作方法均按照试剂盒说明书进行。

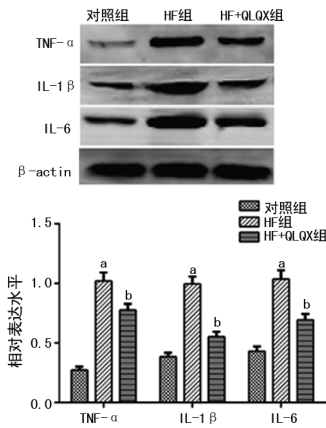
1.3 统计学处理

采用 SPSS24.0 软件进行数据分析,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法,组间两两比较采用 LSD 法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芪苈强心胶囊对心力衰竭大鼠心肌细胞炎性因子表达的影响

与对照组比较,HF 组大鼠心肌细胞 TNF-α、IL-1β、IL-6 表达水平明显增多( $P < 0.05$ );与 HF 组比较,HF+QLQX 组大鼠心肌细胞 TNF-α、IL-1β、IL-6 表达水平明显减少( $P < 0.05$ ),见图 1。

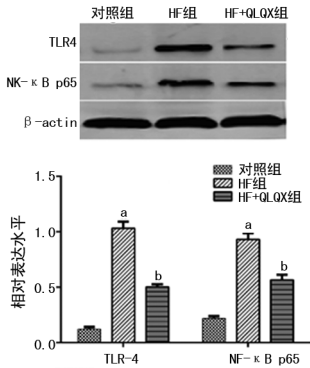


<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 HF 组比较。

图 1 各组大鼠心肌细胞 TNF-α、IL-1β、IL-6 表达情况

2.2 芪苈强心胶囊对心力衰竭大鼠心肌细胞 TLR4、NF-κB 表达的影响

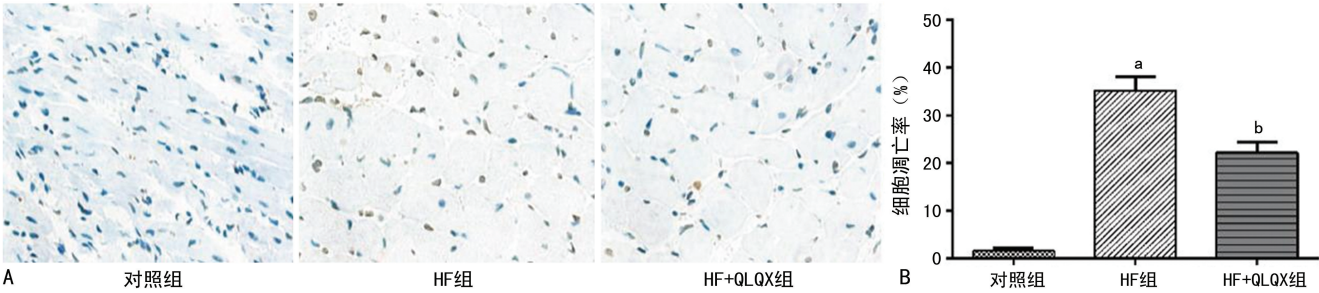
与对照组比较, HF 组大鼠心肌细胞 TLR4、NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平明显增多( $P<0.05$ ); 与 HF 组比较, HF+QLQX 组大鼠心肌细胞 TLR4、NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平明显减少( $P<0.05$ ), 见图 2。



<sup>a</sup>:  $P<0.05$ , 与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P<0.05$ , 与 HF 组比较。  
图 2 各组大鼠心肌细胞 TLR4、NF- $\kappa$ B 表达情况

2.3 芪苈强心胶囊对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响

正常心肌细胞 TUNEL 染色呈蓝色, 细胞核形



A: 各组大鼠心肌细胞 TUNEL 染色( $\times 400$ ); B: 各组细胞凋亡率柱形图; <sup>a</sup>:  $P<0.05$ , 与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P<0.05$ , 与 HF 组比较。

图 3 各组大鼠心肌细胞 TUNEL 染色及凋亡情况

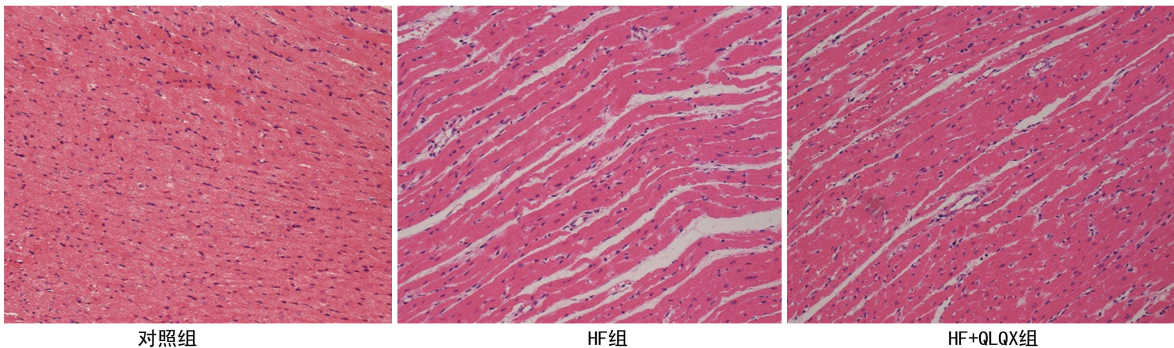


图 4 各组大鼠心肌细胞 HE 染色情况( $\times 200$ )

3 讨 论

扩张型心肌病是临床常见的心力衰竭病因之一, 目前仍缺乏十分有效的治疗手段。阿霉素是一种蒽醌类广谱抗肿瘤药, 长时间使用可导致不可逆性心肌损害, 诱导扩张型心肌病样心脏改变<sup>[9]</sup>。静脉或腹腔

态、大小较为一致。凋亡心肌细胞 TUNEL 染色呈棕色或棕褐色, 细胞核大小不一, 核内染色质浓缩呈蓝色颗粒状位于核膜下。对照组心肌组织可见极少量凋亡细胞; HF 组凋亡细胞较对照组明显增多 [ $(35.23\pm1.67)\%$  vs.  $(1.63\pm0.26)\%$ ,  $P<0.05$ ]; 与 HF 组比较, HF+QLQX 组凋亡细胞明显减少 [ $(22.20\pm1.29)\%$  vs.  $(35.23\pm1.67)\%$ ,  $P<0.05$ ], 见图 3。

2.4 芪苈强心胶囊对心力衰竭大鼠心肌细胞形态结构的影响

对照组心肌纤维排列整齐, 细胞核大小、形态基本一致, 心肌细胞间隙正常, 无炎性细胞浸润。HF 组心肌纤维排列紊乱, 可见心肌纤维溶解断裂, 细胞质呈溶解状态, 细胞核深染, 心肌细胞间隙明显增宽, 或有炎性细胞浸润。与 HF 组比较, HF+QLQX 组心肌纤维排列较为整齐, 心肌细胞溶解减轻, 心肌细胞间隙减小, 炎性细胞浸润减少, 见图 4。

注射阿霉素是较为理想的心力衰竭动物模型建立方法。本研究采用阿霉素诱导建立心力衰竭大鼠模型并进行药物干预, 观察芪苈强心胶囊对心力衰竭大鼠心肌细胞炎性因子表达的影响, 并探讨其抑制心肌免疫炎性反应的机制。结果表明, 芪苈强心胶囊能够明显降低心力衰竭大鼠心肌细胞炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TLR4 及 NF- $\kappa$ B 表达水平, 减少心肌细胞凋

亡,减轻心肌结构损伤。

心肌细胞具有完整的天然免疫系统。心力衰竭时,缺血、缺氧、氧化应激、血流动力学紊乱等多种有害因素导致心肌细胞结构、功能损害。受损心肌细胞释放的损伤相关分子模式(damage associated molecular patterns,DAMPs)或内源性配体可被 TLR、补体等模式识别受体(pattern recognition receptor,PRR)识别,启动天然免疫应答,促进炎症因子释放,介导免疫炎症反应<sup>[10]</sup>。研究发现,TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等炎症因子在衰竭心肌细胞中表达显著增多,通过负性肌力作用,诱导心肌细胞凋亡、坏死,促进心肌纤维化等途径参与心室重构和心力衰竭的进展<sup>[11-12]</sup>。有研究表明,炎症因子的表达水平与心力衰竭患者的心功能分级、危险分层及预后密切相关,抑制心肌免疫炎症的激活有可能成为心力衰竭治疗的新靶标<sup>[13-16]</sup>。已有研究证实,芪苈强心胶囊能够明显降低慢性心力衰竭患者血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、高敏 C 反应蛋白等炎症因子表达水平,改善心脏功能<sup>[17]</sup>。然而,芪苈强心胶囊对心力衰竭心肌细胞局部炎症因子的表达是否具有调节作用,目前少有研究报道。本研究发现,芪苈强心胶囊能够明显下调心力衰竭大鼠心肌组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达,同时心肌细胞凋亡及心肌结构损伤显著减轻,提示芪苈强心胶囊的抗心力衰竭作用可能与其抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达有关。

目前,芪苈强心胶囊调节心肌细胞炎症因子表达的具体机制仍不清楚。HAN 等<sup>[18]</sup>研究发现,芪苈强心胶囊可抑制 TGF- $\beta$ 1/Smad3 和 NF- $\kappa$ B 信号转导通路,减少心肌梗死大鼠心肌细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-6 表达水平,减轻心肌纤维化和心室重构。FU 等<sup>[19]</sup>研究发现,芪苈强心胶囊能够上调心力衰竭大鼠心肌血管生成素样蛋白-4(Angpt-4)表达,降低氧化脂类和脂多糖表达,促进脂质代谢,减轻心肌炎症反应和心室重构。另外,芪苈强心胶囊的多个组方成分如黄芪、葶苈子、人参、丹参等已被研究证实可通过多种机制调节心肌细胞炎症因子表达,抑制心脏免疫炎症反应,从而发挥心脏保护作用<sup>[20-22]</sup>。因此,芪苈强心胶囊的抗炎作用可能涉及对多个炎症反应相关信号转导通路的调节。

TLR 是天然免疫系统最重要的 PRR,与其配体结合后通过 NF- $\kappa$ B、JNK、PKC 等多种信号转导通路促进 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、ICAM-1 等炎症因子表达,促进免疫炎症反应,诱导靶细胞凋亡。TLR4 及其相关信号转导通路已被许多研究证实参与心力衰竭的发生、发展<sup>[10]</sup>。芪苈强心胶囊能否作用于 TLR,减轻 TLR 介导的心脏免疫炎症反应和心肌损伤,此前尚无报道。在本研究中,HF 组大鼠心肌细胞 TLR4、

NF- $\kappa$ B p65 表达水平明显增多,而 HF+QLQX 组 TLR4、NF- $\kappa$ B p65 表达水平较 HF 组明显减少,提示芪苈强心胶囊能够抑制心力衰竭大鼠心肌细胞 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号转导通路激活。本研究证实芪苈强心胶囊对心力衰竭心肌细胞 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号转导通路具有调节作用,研究结果提示芪苈强心胶囊可能通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号转导通路减少心肌细胞炎症因子表达,减轻心脏免疫炎症反应和心肌细胞凋亡,对心力衰竭发挥保护作用。

综上所述,本研究结果提示,芪苈强心胶囊通过抑制心肌细胞炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达,减轻心肌细胞凋亡和心肌结构损伤,其抗炎、抗凋亡作用可能与其抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号转导通路有关。

## 参考文献

- [1] GRANDINETTI V,CARLOS F P,ANTONIO E L, et al. Photobiomodulation therapy combined with carvedilol attenuates post-infarction heart failure by suppressing excessive inflammation and oxidative stress in rats[J]. Sci Rep, 2019,9(1):9425.
- [2] WANG H W,AHMAD M,JADAYEL R,et al. Inhibition of inflammation by minocycline improves heart failure and depression-like behaviour in rats after myocardial infarction [J]. PLoS One,2019,14(6):e0217437.
- [3] CAGLAR TORUN A,TUTUNCU S. Assessing the therapeutic effect of resveratrol in heart failure following blunt chest trauma and the potential role of endocan as a biomarker of inflammation using rats[J]. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg,2019,25(4):343-349.
- [4] LI X,ZHANG J,HUANG J, et al. A multicenter, randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of the effects of qili qiangxin capsules in patients with chronic heart failure[J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 62 (12):1065-1072.
- [5] 姜婷,王魏魏,梅勇,等. 芪苈强心胶囊联合西药治疗慢性心力衰竭疗效的 Meta 分析[J]. 临床心血管病杂志,2015,31(8):868-874.
- [6] 胡霜,蔡莉,张川平,等. 美托洛尔联合芪苈强心胶囊治疗慢性心力衰竭的疗效观察[J]. 重庆医学,2017,46(5):119-121.
- [7] XU K,GEORGE I,KLOTZ S, et al. Erythro-

- poietin derivate improves left ventricular systolic performance and attenuates left ventricular remodeling in rats with myocardial infarct-induced heart failure[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010, 56(5):506-512.
- [8] 韩安邦,张健,路迎冬,等. 芪苈强心胶囊对心肌梗死大鼠心肌纤维化及 TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号通路的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2017, 40(1):41-47.
- [9] LENNEMAN A J, WANG L, WIGGER M, et al. Heart transplant survival outcomes for adriamycin-dilated cardiomyopathy[J]. *Am J Cardiol*, 2013, 111(4):609-612.
- [10] YU L, FENG Z. The role of Toll-like receptor signaling in the progression of heart failure[J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018:9874109.
- [11] SCHUMACHER S M, NAGA PRASAD S V. Tumor necrosis factor-alpha in heart failure; an updated review[J]. *Curr Cardiol Rep*, 2018, 20(11):117.
- [12] SZEKELY Y, ARBEL Y. A Review of interleukin-1 in heart disease; where do we stand today? [J]. *Cardiol Ther*, 2018, 7(1):25-44.
- [13] LI L, LUO W, QIAN Y, et al. Luteolin protects against diabetic cardiomyopathy by inhibiting NF-kappaB-mediated inflammation and activating the Nrf2-mediated antioxidant responses [J]. *Phytomedicine*, 2019, 59:152774.
- [14] ERGATOUDIS C, THUNSTROM E, HANSSON P O, et al. Natriuretic and inflammatory biomarkers as risk predictors of heart failure in middle-aged men from the general population; a 21-year follow-up[J]. *J Card Fail*, 2018, 24(9):594-600.
- [15] LIU W, RU L, SU C, et al. Serum levels of inflammatory cytokines and expression of BCL2 and BAX mRNA in peripheral blood mononuclear cells and in patients with chronic heart failure[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25:2633-2639.
- [16] SHAO T, ZHANG Y, TANG R, et al. Effects of milrinone on serum IL-6, TNF-alpha, Cys-C and cardiac functions of patients with chronic heart failure[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(5):4162-4166.
- [17] 薛龙,孙永红. 芪苈强心胶囊对慢性心力衰竭患者炎性细胞因子的影响[J]. *心血管病防治知识(学术版)*, 2014, 4(5):64-67.
- [18] HAN A, LU Y, ZHENG Q, et al. Qiliqiangxin attenuates cardiac remodeling via inhibition of TGF-beta1/Smad3 and NF-kappaB signaling pathways in a rat model of myocardial infarction[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(5):1797-1806.
- [19] FU J, CHANG L, HARMS A C, et al. A metabolomics study of Qiliqiangxin in a rat model of heart failure; a reverse pharmacology approach[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):3688.
- [20] LIU T, ZHANG M, NIU H, et al. Astragalus polysaccharide from astragalus melittin ameliorates inflammation via suppressing the activation of TLR-4/NF-kappaB p65 signal pathway and protects mice from CVB3-induced virus myocarditis[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 126:179-186.
- [21] CHEN R C, WANG J, YANG L, et al. Protective effects of ginsenoside Re on lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction in mice[J]. *Food Funct*, 2016, 7(5):2278-2287.
- [22] WANG L, YU J, FORDJOUR P A, et al. Danshen injection prevents heart failure by attenuating post-infarct remodeling[J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 205:22-32.

(收稿日期:2019-02-18 修回日期:2019-05-02)