

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.23.008

丹皮酚对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及对 TLR4、IL-23 及 SOD 活性的影响^{*}

丁华胜,王永剑[△]

南方医科大学深圳医院急诊科,广东深圳 518101

摘 要:**目的** 探讨丹皮酚对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及对 Toll 样受体 4(TLR4)、白细胞介素-23(IL-23)及超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响。**方法** 通过结扎大鼠左冠脉前降支 30 min 再灌注 3 h 建立大鼠心肌缺血再灌注损伤模型,将 SD 大鼠经随机方式划分成 4 组,各组均为 13 只 SD 大鼠,分为假手术组、模型组、丹皮酚低剂量组(15 mg/kg)、丹皮酚高剂量组(30 mg/kg),于术前 10 d 开始灌胃给药。再灌注 3 h 后取血清,采用比色法测定大鼠心肌 SOD 活性,通过 2,3,5-氯化三苯基四氮唑试剂染色法测定大鼠心肌梗死面积,免疫组化检测 TLR4 阳性细胞平均积分光密度(AIOD),蛋白质免疫印迹法测定大鼠心肌组织 IL-23 蛋白水平。**结果** 模型组、丹皮酚低剂量组、丹皮酚高剂量组大鼠心肌组织 IL-23 蛋白水平、TLR4 阳性细胞 AIOD、SOD 活性与假手术组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);丹皮酚低剂量组、丹皮酚高剂量组大鼠心肌组织 IL-23 蛋白、TLR4 阳性细胞 AIOD、SOD 活性与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 使用丹皮酚预处理可通过降低 TLR4 炎性作用,减少 IL-23 释放,增强 SOD 活性,从而实现对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护效能。

关键词:丹皮酚; 心肌缺血再灌注损伤; Toll 样受体 4; 白细胞介素-23; 超氧化物歧化酶

中图法分类号:R541.4

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)23-3417-04

Protective effect of paeonol on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats and its effects on TLR4, IL-23 and SOD activity^{*}

DING Huasheng, WANG Yongjian[△]

Department of Emergency, Shenzhen Hospital, Southern Medical University, Shenzhen, Guangdong 518101, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of paeonol on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats and its effects on Toll-like receptor 4 (TLR4), interleukin-23 (IL-23) and superoxide dismutase (SOD) activity. **Methods** The myocardial ischemia-reperfusion injury model of rats was established by ligating the descending branch of left coronary artery for 30 min and reperfusion for 3 h. SD rats were randomly divided into 4 groups, each consisting of 13 SD rats, which were divided into the sham operation group, the model group, the low-dose paeonol group (15 mg/kg) and the high-dose paeonol group (30 mg/kg). The rats were given orally 10 days before the operation. Serum was collected 3 h after reperfusion, and SOD activity in rat myocardium was determined by colorimetric method. Myocardial infarction area was determined by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining method, average integrated optical density of TLR4-positive cells was detected by immunohistochemistry, and IL-23 protein level in rat myocardium was determined by Western blot. **Results** Compared with the sham operation group, the model group, the low-dose paeonol group and the high-dose paeonol group, the levels of IL-23 protein, TLR4-positive cells AIOD and SOD activity were statistically significant ($P<0.05$). Compared with the model group, the activities of IL-23 protein, TLR4-positive cells AIOD and SOD activity in the rat myocardium of the low-dose paeonol group and high-dose paeonol group were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Pretreatment with paeonol can reduce the inflammatory effect of TLR4, reduce the release of IL-23, and enhance the activity of SOD, so as to realize the protective effect of myocardial ischemia reperfusion injury in rats.

Key words: paeonol; myocardial ischemia-reperfusion injury; Toll-like receptor 4; interleukin-23; superoxide dismutase

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(81401304);深圳市宝安区医疗卫生基础研究项目(2020JD276)。

作者简介:丁华胜,男,主治医师,主要从事冠心病的基础与临床研究。 [△] 通信作者, E-mail:wyjyub@163.com。

心肌缺血再灌注损伤是临床上最常见的病理生理过程之一,近年来有研究表明,在急性心肌缺血再灌注损伤时血浆中脂质过氧化物增多,而心肌中的超氧化物歧化酶(SOD)因合成减少、被灌注液冲洗及消耗增加而减少,当补充外源性的 SOD 时则减轻氧自由基的损伤,从而降低致死性心律失常^[1-2]。白细胞介素(IL)-23 是一种促炎细胞因子,作为 IL-12 家族成员,其广泛参与心肌梗死、银屑病、肿瘤等多种疾病过程并发挥着重要作用^[3-4]。Toll 样受体 4 (TLR4) 是天然免疫系统识别病原微生物的主要受体,有研究表明 TLR4 与 IL-23 参与了心肌缺血再灌注损伤中的致病过程^[5-7]。丹皮酚具有神经保护、抗过敏、抗肿瘤、抵抗脂质过氧化、镇痛消炎等效能,对于心肌缺血再灌注损伤大鼠的心肌组织,丹皮酚具备一定的保护性功能^[8-11]。本研究探讨丹皮酚对心肌缺血再灌注损伤保护中 TLR4、IL-23 及 SOD 的影响,分析其对心肌缺血再灌注损伤的保护作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 动物清洁级成年 SD 雄性大鼠 52 只,体重 230~300 g,全部购自武汉大学实验动物中心。

1.2 分组和给药 把实验大鼠随机分成假手术组、模型组、丹皮酚低剂量组(15 mg/kg)、丹皮酚高剂量组(30 mg/kg),每组 13 只 SD 大鼠。其中丹皮酚高、低剂量组在术前 10 d 均采用丹皮酚灌胃给药的方法建立大鼠心肌缺血再灌注损伤模型,每天给药 1 次。以上 4 组大鼠成功造模 3 h 后立即处死,采集、收集各组血液与心脏标本后进行相关指标检测。

1.3 仪器与试剂 TLR4 兔多克隆抗体、IL-23 兔多克隆抗体由英国 abcam 公司提供;水合氯醛为山东鲁南制药厂产品;99%纯度的丹皮酚,为 Sigma 公司产品,由 0.5%羧甲基纤维素钠(CMC)制备;2,3,5-氯化三苯基四氮唑试剂由浙江省华东医药股份公司提供。

1.4 大鼠心肌缺血再灌注损伤模型的建立 将戊巴比妥钠(用量为 30 mg/kg)注入大鼠腹腔内,进行麻醉处理,大鼠呈仰位固定,待完成气管插管并与人工呼吸机连接后,从胸骨左侧 3 mm 第 4 肋间处进行开胸操作,分离心包,暴露心脏,接着用 4-0 丝线穿过左心耳下缘冠脉前降支起始部约 3 mm 处,在结扎线下置入乳胶管直径 0.15 cm,之后收紧结扎线后打结,阻断 45 min 后,将结扎线松开,然后进行 3 h 再灌注^[11]。通过大鼠心电图结果来判断大鼠心肌缺血再灌注损伤模型是否建立成功,如果发现 ST-T 抬高,待放开丝线,ST-T 又有所降低则大鼠心肌缺血再灌注损伤模型建立成功。

1.5 检测方法

1.5.1 心肌缺血再灌注大鼠心肌梗死面积测定 再灌注 3 h 后立刻对冠状动脉进行结扎处理,并在颈动脉部位注入伊文斯蓝 1.5 mL,随后将心脏取下用磷酸盐缓冲液进行冲洗,将脂肪、心房、血管等无关组织

丢弃,用滤纸把左心室水分去除后放置在冰箱-20℃内进行冷冻处理。然后将心尖处朝上,对心脏进行切片处理,共切 5 片,厚度一致,采用 2,3,5-氯化三苯基四氮唑试剂染色法测定心肌缺血再灌注大鼠心肌梗死面积,无蓝染为危险区,灰白色为梗死区,由此计算出心肌梗死面积占危险区心肌面积百分比。

1.5.2 血清 SOD 活性测定 有效再灌注 3 h 后,在腹主动脉位置采集血液标本,然后实施以 2 500 r/min 15 min 离心处理,将获得的血清移至 EP 管内,置于冰箱-20℃内待检。借助分光光度计,通过比色法分别在 440 nm、660 nm 下对吸光度(A)值进行检测,同时对 SOD 活性进行测定,严格遵循试剂盒说明书操作。

1.5.3 TLR4 阳性细胞平均积分光密度(AIOD)测定 通过随机方式,在各组中选择 5 只 SD 大鼠,采用免疫组化检测 TLR4,若借助光镜,观察心肌细胞胞浆见均质颗粒,其显示为棕黄色,则判定为阳性细胞。借助显微图像采集系统,对各张免疫组化切片,通过随机方式确定出 5 个高倍视野($\times 400$),再通过专业图像分析软件 Image ProPlus 5.0 计算 TLR4 阳性细胞 AIOD。

1.5.4 大鼠心肌组织 IL-23 蛋白水平检测 采用蛋白质免疫印迹法,对大鼠心肌组织 IL-23 蛋白水平进行测定。对实验动物进行 3 h 再灌注处理后,采集处于结扎线水平以下的左心室心肌组织,然后参照相对分子质量配制 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳后转膜,用 5%的脱脂奶粉封闭,4℃孵育一抗过夜,用 IL-23 蛋白对应的辣根过氧化物酶标记的二抗孵育后,采用电化学发光法显色,以 β -actin 为内参计算上述各组 IL-23 蛋白水平。

1.6 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 LSD-*t* 检验,经由单因素方差开展进行多组间对比, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丹皮酚对心肌缺血再灌注大鼠心肌梗死面积的影响 丹皮酚低剂量组梗死面积占危险区心肌面积百分比为(31.23 $\pm$ 2.81)%、丹皮酚高剂量组梗死面积占危险区心肌面积百分比为(27.92 $\pm$ 2.53)%,与模型组梗死面积占危险区心肌面积百分比[(36.48 $\pm$ 3.76)%]比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠心肌组织 IL-23 蛋白、TLR4 阳性细胞 AIOD、SOD 活性比较 模型组、丹皮酚低剂量组、丹皮酚高剂量组大鼠心肌组织 IL-23 蛋白水平、TLR4 阳性细胞 AIOD、SOD 活性与假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);丹皮酚低剂量组、丹皮酚高剂量组大鼠心肌组织 IL-23 蛋白、TLR4 阳性细胞 AIOD、SOD 活性与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠心肌组织 IL-23 蛋白、TLR4 阳性细胞 AIOD 及 SOD 活性比较($\bar{x}\pm s$)

组别	IL-23 蛋白	TLR4 阳性 细胞 AIOD	SOD 活性 (U/mL)
假手术组	0.154±0.010	3.18±0.24	92.37±18.36
模型组	0.432±0.013 [*]	20.59±2.57 [*]	46.50±10.44 [*]
丹皮酚低剂量组	0.354±0.011 ^{*#}	15.33±0.79 ^{*#}	57.23±15.26 ^{*#}
丹皮酚高剂量组	0.302±0.008 ^{*#}	12.12±0.72 ^{*#}	71.14±17.94 ^{*#}

注:与假手术组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

3 讨 论

心肌缺血再灌注损伤的机制复杂,在其病发过程中,氧自由基(OFR)、钙超载、炎性反应等均有所参与,在炎性反应发生的同时,数量可观的 OFR 及细胞因子产生,从而提高血管通透性以及引发水肿。药物预处理的实施,可促进血、氧供应不足下心脏耐受力的增强,使得由心肌缺血再灌注损伤造成的心肌损伤受到更为有效的保护^[12-13]。本研究中通过丹皮酚预处理保护心肌缺血再灌注损伤功能进行观察,发现在丹皮酚作用下,减少 TLR4 阳性细胞 AIOD 及前炎性细胞因子 IL-23 的释放、SOD 的合成增加使得减轻了氧自由基的释放,降低了心肌梗死的面积,实现对心肌缺血再灌注损伤的保护。

SOD 作为机体内主要的抗氧化酶及超氧自由基清除剂,此物质活性反映出在清除自由基方面组织所具备能力。本研究显示,与假手术组比较,模型组 SOD 活性明显减少,这是因为缺血再灌注中心肌中的 SOD 合成减少、消耗增加、甚至部分被灌注液冲洗,说明本研究制作的心肌缺血再灌注模型成功。另外,与模型组比较,发现丹皮酚低剂量组、丹皮酚高剂量组 SOD 活性均明显升高,说明高、低剂量丹皮酚能够增强缺血再灌注心肌中的 SOD 活性、减轻自由基的损伤,对心肌缺血再灌注损伤具有保护作用。

Toll 样受体在巨噬细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞等免疫细胞中大量存在,为各种病原微生物的识别受体启动宿主防卫反应。TLR4 是人类与免疫炎症密切相关的信号转导受体蛋白^[6,14]。IL-23 属于一类促炎细胞因子,其大多产生自巨噬细胞及激活态树突状细胞,其受体大量分布在自然杀伤细胞、巨噬细胞、T 细胞和树突状细胞等细胞表面,目前有研究证实,IL-23 经由 TLR4 对心肌缺血再灌注损伤施以调控作用^[15-17]。本研究结果表明丹皮酚能够明显降低模型组的心肌缺血 TLR4 阳性细胞的表达,防止缺血再灌注损伤进一步恶化。另外,丹皮酚能够使 IL-23 蛋白水平下调及 SOD 活性显著升高,对心肌缺血再灌注损伤起到保护作用,此保护效应在丹皮酚高剂量组优势更显著。

综上所述,丹皮酚可使大鼠心肌缺血再灌注损伤的心肌组织内 TLR4、IL-23 蛋白水平下调,增加 SOD

活性,缩小大鼠心肌缺血再灌注损伤心肌梗死面积,可在一定程度上有效保护心肌缺血再灌注损伤。

参考文献

[1] TAKAHASHI M. Role of the inflammasome in myocardial infarction[J]. Trends Cardiovasc Med, 2011, 21(2): 337-341.

[2] YU M, WEN N, WENZHONG Z, et al. Effect of repeated ischaemic pre-conditioning on TLR4 and proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β in myocardial ischaemia reperfusion injury in a rat model[J]. Arch Med Sci, 2010, 6(6): 843-8471.

[3] UMEZAWA N, KAWAHATA K, MIZOGUCHI F, et al. Interleukin-23 as a therapeutic target for inflammatory myopathy[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 5498.

[4] CHEN L L, HE Z X, SLINGER E, et al. IL-23 activates innate lymphoid cells to promote neonatal intestinal pathology[J]. Mucosal Immunol, 2015, 8(2): 390-402.

[5] NEMOTO S, VALLEJO J G, KNUEFERMANN P, et al. Escherichia coli LPS-induced LV dysfunction: role of toll-like receptor-4 in the adult heart[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 282(1): 2316-2323.

[6] ZHAO Y, XU Y, ZHANG J H, et al. Cardioprotective effect of carvedilol: inhibition of apoptosis in H9c2 cardiomyocytes via the TLR4/NF- κ B pathway following ischemia/reperfusion injury[J]. Exp Ther Med, 2014, 8(4): 1092-1096.

[7] 张凯, 许卫攀, 金道群. IL-23 对大鼠心肌缺血再灌注损伤中心肌炎症反应及氧化应激的影响[J]. 海南医学院学报, 2017, 23(19): 2601-2608.

[8] ZHANG L, LI D C, LIU L F. Paeonol: pharmacological effects and mechanisms of action[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 72(1): 413-421.

[9] LIU J, WANG S, FENG L, et al. Hypoglycemic and antioxidant activities of paeonol and its beneficial effect on diabetic encephalopathy instreptozotocin-induced diabetic rats[J]. J Med Food, 2013, 16(7): 577-586.

[10] NIZAMUTDINOVA IT, JIN YC, KIM JS, et al. Paeonol and paeoniflorin, the main active principles of Paeonia albiflora, protect the heart from myocardial ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Planta Med, 2008, 74(1): 14-18.

[11] 黄鑫, 丁华胜. 丹皮酚对心肌缺血再灌注损伤保护中 HMGB1、IL-1 β 表达及心肌凋亡的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2019, 20(5): 522-524.

[12] 张宝红. 药物预处理与缺血预处理对心肌缺血再灌注损伤保护作用的实验研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2003.

[13] HUANG T T, ZOU Y, CORNIOLA R. Oxidative stress and adult neurogenesis—effects of radiation and superoxide dismutase deficiency[J]. Sem in Cell Dev Biol, 2012, 23(7): 738-744.

[14] DING H S, YANG J, CHEN P, et al. The HMGB1-TLR4 axis contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury via regulating cardiomyocyte apoptosis [J]. Gene, 2013, 527(1): 389-393.

date; the World Health Organization global status report on noncommunicable diseases 2014; one more landmark step in the combat against stroke and vascular disease [J]. *Stroke*, 2015, 46(5):121-122.

[2] 许景峰, 刘静, 许茜, 等. 抗高血压药物相关基因多态性在中国汉族人群中的分布与检测[J]. *解放军药学报*, 2011, 27(6):471-474.

[3] 陈淑妆, 吴婵清, 许实德, 等. 潮州市居民体质指数、血压、血脂及血糖水平分析[J]. *体育科技*, 2014, 35(4):113-115.

[4] 中国高血压防治指南修订委员会, 高血压联盟(中国), 中华医学会心血管病学分会, 等. 中国高血压防治指南(2018 年修订版)[J]. *中国心血管杂志*, 2019, 24(1):24-56.

[5] 李锐, 邱健. 细胞色素氧化酶 CYP2C9 基因多态性及其与心血管药物代谢及疾病关系研究进展[J]. *心血管病学进展*, 2010, 31(2):279-282.

[6] JARRAR Y B, LEE S J. Molecular functionality of CYP2C9 polymorphisms and their influence on drug therapy[J]. *Drug Metabol Drug Interact*, 2014, 29(4):211-220.

[7] 李锐, 邱健, 毕媛, 等. 广东汉族原发性高血压患者 CYP2C9 和 ACE 基因多态性的分布特征[J]. *心脏杂志*, 2010, 20(3):365-368.

[8] 徐承华, 杨玉雯, 曹衡. β_1 肾上腺素受体与 CYP2D6 基因多态性对美托洛尔抗高血压治疗的影响[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2011, 16(12):1414-1418.

[9] SUN F, HE N, ZHANG K, et al. Association of ACE gene A2350G and I/D polymorphisms with essential hypertension in the northernmost province of China[J]. *Clin Exp Hypertens*, 2018, 40(1):32-38.

[10] LI Y. Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and essential hypertension in the Chinese population: a meta-analysis including 21,058 participants[J]. *Intern Med J*, 2012, 42(4):439-444.

[11] 佟俊旺, 王颖, 田璐, 等. 中国汉族人群血管紧张素转换酶基因多态性与原发性高血压关系的 Meta 分析[J]. *环境与职业医学*, 2017, 34(2):118-123.

[12] 符艳, 曾祥洁, 王少玲, 等. 海南黎汉族人群中高血压与 ACE 基因多态性的研究[J]. *中国热带医学*, 2013, 13(9):1149-1150.

[13] VARAKANTHAM V, KURAKULA SAILOO A K, NAGALLA B, et al. mRNA expression profile in peripheral blood mononuclear cells based on ADRB1 Ser49Gly and Arg389Gly polymorphisms in essential hypertension-a case-control pilot investigation in South Indian population[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2018, 56(8):1230-1237.

[14] CHEN L, XIAO T, CHEN L, et al. The association of ADRB1 and CYP2D6 polymorphisms with antihypertensive effects and analysis of their contribution to hypertension risk[J]. *Am J Med Sci*, 2018, 355(3):235-239.

[15] 楼煜清, 刘雅, 吴海, 等. 中国汉族人群 β_2 肾上腺素能受体基因多态性与原发性高血压关联的 Meta 分析[J]. *中华预防医学杂志*, 2011, 45(2):136-142.

[16] CELOLOTTO G, PAPPARELLA I, BORTOLUZZI A, et al. Interplay between miR-155, AT1R A1166C polymorphism, and AT1R expression in young untreated hypertensives[J]. *Am J Hypertens*, 2011, 24(2):241-246.

[17] NIU W, QI Y. Association of the angiotensin II type I receptor gene +1166 A>C polymorphism with hypertension risk: evidence from a meta-analysis of 16474 subjects[J]. *Hypertens Res*, 2010, 33(11):1137-1143.

[18] 李雪冬, 孟令梅, 李娟. AGTR1 基因多态性与原发性高血压易患因素的研究进展[J]. *微量元素与健康研究*, 2018, 20(1):61-62.

[19] 彭澍, 彭健, 龚五星, 等. 不同性别高血压病患者肾素-血管紧张素系统多基因多态性关联研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2010, 8(6):643-645.

[20] 张冬梅, 于丽华. ACE 基因插入/缺失多态性与 228 例原发性高血压的相关性研究[J]. *中国疗养医学*, 2013, 22(12):1059-1061.

[21] 薛探, 梁晓雨, 李娟. 原发性高血压患者 ACE 基因 I/D 多态性和性别之间的相关研究[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2015, 23(10):1457-1458.

(收稿日期:2020-01-09 修回日期:2020-10-18)

(上接第 3419 页)

[15] CHOW C K, REDFERN J, HILLIS G S, et al. Effect of lifestyle-focused text messaging on risk factor modification in patients with coronary heart disease: a randomized clinical trial[J]. *JAMA*, 2015, 314(12):1255-1263.

[16] DAWBER T R, MOORE F E, MANN G V. II. Coronary heart disease in the framingham study[J]. *Int J Epidemiol*, 2015, 44(6):1767-1780.

[17] YAN B L, CHEN F, XU L J, et al. HMGB1-TLR4-IL-23-IL17A axis promotes paraquat-induced acute lung injury by mediating neutrophil infiltration in mice, scientific reports[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):597.

(收稿日期:2020-03-30 修回日期:2020-10-18)