

• 研究论文 •

葛根素通过 TLR4/Myd88/NF- κ B 抑制 NLRP3 炎症小体 抗大鼠心肌缺血再灌注损伤

王丹姝, 燕柳艳, 孙姝婵, 姜瑜, 阴苏月, 王守宝*, 方莲花*, 杜冠华

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室,
药物靶点研究与新药筛选北京市重点实验室, 北京 100050)

摘要: 本研究旨在探究葛根素对大鼠心肌缺血/再灌注 (myocardial ischemia/reperfusion, MI/R) 损伤的治疗作用及其机制。采用冠状动脉左前降支结扎 60 min 再灌注 24 h 制备大鼠 MI/R 损伤模型, 于再灌注前 20 min 灌胃给予葛根素 (10、30 及 100 mg·kg⁻¹)。考察葛根素对心功能、心肌梗死范围、心肌损伤标志物、炎症因子及细胞凋亡的影响, 并应用 Western blot 法检测 Nod 样受体蛋白 3 (Nod-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体和 Toll 样受体 4/髓样分化因子 88/激活核转录因子- κ B (TLR4/Myd88/NF- κ B) 通路相关蛋白。所有动物实验均遵循中国医学科学院药物研究所伦理委员会的规定。结果显示, 葛根素能够显著改善 MI/R 损伤大鼠的心功能, 减小心肌梗死范围, 降低血清中乳酸脱氢酶 (lactic dehydrogenase, LDH)、天冬氨酸转氨酶 (aspartate transaminase, AST)、肌酸激酶 MB 同工酶 (creatinase kinase-MB, CK-MB) 和心肌肌钙蛋白 T (cardiac troponin T, cTnT) 的含量, 抑制心肌细胞凋亡。此外, 葛根素可以显著降低心肌炎症因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的水平。Western blot 分析结果显示, 葛根素能够明显下调 MI/R 损伤大鼠心肌 TLR4、Myd88 及 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、切割型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cleaved-caspase 1)、切割型 gasdermin-D (cleaved-GSDMD)、IL-1 β 、IL-18 蛋白水平, 同时减少 NF- κ B 抑制蛋白 α (inhibitor of NF- κ B α , I κ B α)、I κ B 激酶 β (I κ B kinase β , IKK β) 和 NF- κ B 蛋白磷酸化。上述研究结果表明, 葛根素对大鼠 MI/R 损伤具有明显的改善作用, 其机制可能为通过下调 TLR4/Myd88/NF- κ B 通路抑制 NLRP3 炎症小体激活, 从而减轻炎症反应。

关键词: 葛根素; 心肌缺血再灌注损伤; Nod 样受体蛋白 3 炎症小体; TLR4/Myd88/NF- κ B 通路; 炎症反应
中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)05-1343-09

Puerarin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by suppressing NLRP3 inflammasome activation via TLR4/Myd88/ NF- κ B pathway in rats

WANG Dan-shu, YAN Liu-yan, SUN Shu-chan, JIANG Yu, YIN Su-yue, WANG Shou-bao*,
FANG Lian-hua*, DU Guan-hua

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Beijing Key Laboratory of Drug Target Identification and Drug Screening, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: This study was to investigate the protective effects of puerarin on myocardial ischemia/reperfusion (MI/R) injury and the underlying mechanism. The MI/R-model was established by ligating the left anterior descending

收稿日期: 2021-01-21; 修回日期: 2021-03-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773935, 81673422); 北京市自然科学基金资助项目 (7192131); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程创新团队 (2016-I2M-3-007); “重大新药创制”国家科技重大专项 (2018ZX09711001).

*通讯作者 Tel: 86-10-63165313, E-mail: shoubaowang@imm.ac.cn; fanglh@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0124

artery (LAD) for 60 min followed by 24 h reperfusion, puerarin (10, 30, and 100 mg·kg⁻¹) was orally administered 20 min before reperfusion. Cardiac function, myocardial infarct index, cardiac damage markers, inflammatory cytokines, and apoptosis index were measured to evaluate the protective effects of puerarin on MI/R injury. The activation of Nod-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome and Toll like receptor 4 (TLR4)/myeloid differentiation factor 88 (Myd88)/nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway were determined by Western blot. All animal experimental procedures were approved by the ethics committee of the Institute of Materia Medica, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences. The results showed that puerarin could significantly improve cardiac function, reduce myocardial infarct size, decrease the levels of lactic dehydrogenase (LDH), aspartate transaminase (AST), creatine kinase-MB (CK-MB), and cardiac troponin T (cTnT) and suppress cardiomyocyte apoptosis. Meanwhile, puerarin could notably decrease the levels of inflammatory cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Western blot analysis revealed that puerarin could downregulate the expression of TLR4, Myd88, NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), cleaved-caspase 1, cleaved-gasdermin-D (GSDMD), IL-1 β , and IL-18, as well as the phosphorylation levels of inhibitor of NF- κ B α (I κ B α), I κ B kinase β (IKK β), and NF- κ B. These findings demonstrated that puerarin could alleviate MI/R injury by suppressing NLRP3 inflammasome activation, possibly *via* TLR4/Myd88/NF- κ B pathway.

Key words: puerarin; myocardial ischemia/reperfusion injury; Nod-like receptor protein 3 inflammasome; TLR4/Myd88/NF- κ B pathway; inflammation

急性心肌梗死仍然是全球范围内的主要死亡原因, 通过经皮冠状动脉介入或溶栓等治疗方式及时地恢复血供被认为是挽救缺血心肌最有效的方法^[1]。然而, 再灌注治疗会导致更严重的心肌损伤, 称为心肌缺血/再灌注 (myocardial ischemia/reperfusion, MI/R) 损伤^[2], 是当前临床心肌梗死治疗亟待解决的难题。由于 MI/R 损伤的病理生理机制尚不清楚, 目前针对 MI/R 损伤缺乏有效的干预手段, 因此迫切需要深入探索 MI/R 损伤的分子机制, 寻求新的治疗策略。

心肌炎症反应是 MI/R 损伤的重要病理特征, 因此抑制炎症反应成为防治 MI/R 损伤的重要策略之一^[3]。Nod 样受体蛋白 3 (Nod-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体是先天性免疫系统的重要组成部分, 是由 NLRP3、接头蛋白凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC) 和效应蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 前体 (procaspase 1) 组成的大分子蛋白复合物。NLRP3 炎症小体激活后介导 caspase 1 活化进而促进白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 及白细胞介素-18 (IL-18) 的成熟和分泌, 同时裂解 gasdermin-D (GSDMD) 诱导细胞焦亡^[4]。经典的 NLRP3 炎症小体激活途径包括启动和激活两个阶段, 启动阶段主要由 Toll 样受体 4 (Toll like receptor 4, TLR4) 识别胞外病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 或损伤相关分子模式 (damage/danger-associated molecular patterns, DAMPs), 通过下游信号分子髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, Myd88) 激活核转录因子- κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B), 最终诱导

NLRP3 和 IL-1 β 前体的表达; 激活阶段表现为多种刺激促进 NLRP3 炎症小体复合物的组装和活化^[5,6]。可见, TLR4/Myd88/NF- κ B 通路对于 NLRP3 炎症小体的激活至关重要。近年来, 越来越多的研究表明 TLR4/Myd88/NF- κ B 通路和 NLRP3 炎症小体介导 MI/R 损伤中炎症反应的发生导致心肌损伤。因此, 抑制 TLR4/Myd88/NF- κ B 通路和 NLRP3 炎症小体可以减轻炎症反应改善 MI/R 损伤^[7-9]。

葛根素 (puerarin, Puer) 是从中药葛根中提取的异黄酮类化合物, 具有多种药理活性, 如血管舒张、心脏保护、神经保护、抗癌、抗氧化和抗炎等^[10], 被广泛应用于心血管疾病的治疗中。已有多项报道证实, 葛根素通过抑制自噬、抗氧化和抑制细胞凋亡改善 MI/R 损伤^[11,12], 但是关于葛根素调控炎症反应减轻 MI/R 损伤的研究较少。最新研究发现, NLRP3 炎症小体参与葛根素对 MI/R 损伤的改善作用^[13]。亦有研究显示, 葛根素通过调控 TLR4/NF- κ B 通路减轻炎症反应抑制心肌纤维化^[14], 但是葛根素对 MI/R 损伤中 TLR4/Myd88/NF- κ B 通路的调控作用尚不清楚。因此, 本研究采用冠状动脉左前降支结扎及再灌注法建立大鼠 MI/R 损伤模型, 旨在探究葛根素抗 MI/R 损伤的作用是否与调控 TLR4/Myd88/NF- κ B 通路抑制 NLRP3 炎症小体激活相关。

材料与方法

动物 Sprague Dawley (SD) 大鼠, 雄性, 体重 240~260 g, SPF 级。购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证编号: SCXK (北京) 2016-0006。

药物及试剂 葛根素(晶V型,纯度98%,中国科学院药物研究所晶型中心);异氟烷(深圳瑞沃德生命科技有限公司);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)、伊文思蓝(美国Sigma公司);乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)、天冬氨酸转氨酶(aspartate transaminase, AST)、肌酸激酶同工酶(creatine kinase-MB, CK-MB)试剂盒(北京中生北控生物科技股份有限公司);白细胞介素-6(IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA检测试剂盒(上海吉泰依科赛生物科技有限公司);心肌肌钙蛋白T(cardiac troponin T, cTnT) ELISA检测试剂盒(武汉华美生物工程有限公司);末端脱氧核苷酸转移酶标记(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL)检测试剂盒(美国Promega公司);Bax、NLRP3、cleaved-caspase 1、cleaved-GSDMD、IL-1 β 、inhibitor of NF- κ B α (I κ B α)、phospho-I κ B α (Ser32)、I κ B kinase β (IKK β)、phospho-IKK α / β (Ser176/180)、NF- κ B p65及phospho-NF- κ B p65(Ser536)抗体(Cell Signaling Technology公司);Bcl-2、TMS1/ASC、IL-18、TLR4及Myd88抗体(美国Abcam公司); β -tubulin抗体(北京中衫金桥生物技术有限公司);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记山羊抗兔IgG、HRP标记山羊抗小鼠IgG、HRP标记兔抗山羊IgG、BCA蛋白定量试剂盒、ECL化学发光检测试剂盒(北京康为试剂生物科技有限公司)。其他试剂均为国产分析纯。

实验仪器 小动物专用吸入麻醉机(美国Matrx公司);高分辨率小动物超声成像系统Vevo 1100(加拿大Visual Sonics公司);TBA-420全自动生化仪(日本Toshiba公司);SpectraMax M5酶标仪(美国Molecular Devices公司);Allegra X-22R台式高速离心机(美国Beckman Coulter公司);Tanon天能化学发光仪(北京原平皓生物技术有限公司)。

MI/R损伤模型制备 大鼠适应性饲养1周后,参照文献^[15]制备大鼠冠脉结扎再灌致MI/R损伤模型:将大鼠固定,通过小动物麻醉机吸入2.5%异氟烷进行麻醉;将大鼠胸骨左侧区域脱毛并消毒,剪开胸部皮肤,逐层钝性分离肌肉,暴露胸骨;用蚊式止血钳插入并撑开胸骨左侧第4肋间,打开胸腔,同时撑破心包膜挤出心脏;使用带线缝合针(6-0线,3/8弧圆针)于左心耳下缘2 mm处进针,在肺动脉圆锥及左心耳之间系成活结,结扎冠状动脉左前降支;缺血60 min后,轻轻拉动结扎线打开活结,完成再灌注。假手术组大鼠仅穿针不予结扎,其余处理均相同。再灌注24 h后取材,检测各项指标。

动物分组及给药 冠状动脉左前降支结扎手术成功的60只大鼠随机分为5组,每组12只动物:假手术组(Sham)、模型组(I/R)、葛根素低剂量组(I/R+Puer, 10 mg·kg⁻¹)、葛根素中剂量组(I/R+Puer, 30 mg·kg⁻¹)、葛根素高剂量组(I/R+Puer, 100 mg·kg⁻¹)。在缺血40 min后采用固体灌胃技术给予大鼠葛根素粉末,假手术组及模型组给予淀粉^[16,17]。所有动物实验均通过中国科学院药物研究所实验动物管理与动物福利伦理委员会审查批准。

超声心动图测定 通过2.5%异氟烷吸入维持大鼠麻醉状态,采用高分辨率小动物超声成像系统Vevo 1100(MS250探头,频率为20 MHz,频宽为13~24 MHz)检测超声心动图。取左室胸骨旁短轴切面,应用M型超声记录左室运动情况,测量左室收缩末期内径(left ventricular internal dimension systole, LVIDs)和左室舒张末期内径(left ventricular end diastolic diameter, LVIDd),并计算射血分数(ejection fraction, EF)、缩短分数(fractional shortening, FS)及每搏输出量(stroke volume, SV)。

心肌梗死范围测定 采用伊文思蓝和TTC双染测定心肌梗死范围。腹腔注射10%水合氯醛麻醉大鼠,在原位置再次结扎冠状动脉左前降支,经主动脉逆行灌注1%伊文思蓝染料,将心脏分为蓝染区(非缺血远端区)和非蓝染区(缺血危险区)。取出心脏于-40℃下速冻30 min,在结扎线下平行于心室短轴将心室切成2 mm厚的切片,放入1% TTC溶液中于37℃避光染色20 min,正常心肌染为红色,梗死区域心肌呈淡白色。拍照,使用Image J软件分析缺血危险区、左心室和梗死区的面积,并以梗死区与缺血危险区的比值计算梗死面积百分比。

心肌损伤标志物测定 腹主动脉取血,室温凝聚2 h后,5 000 r·min⁻¹、4℃离心10 min,吸取上清。采用全自动生化仪检测LDH、AST和CK-MB的活性,用ELISA试剂盒检测cTnT的含量。

心肌组织IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量的测定 取适量左心室心肌组织,加入PBS缓冲液制成心肌匀浆,5 000 r·min⁻¹、4℃离心15 min,吸取上清。通过BCA法测定蛋白浓度,采用ELISA试剂盒检测心肌组织中IL-6、IL-1 β 及TNF- α 的含量。

细胞凋亡测定 采用TUNEL法检测心肌细胞凋亡。取心室组织于4%多聚甲醛中固定,制备石蜡切片,根据TUNEL凋亡检测试剂盒的说明进行TUNEL染色,并用DAPI进行细胞核染色。于荧光显微镜下观察绿色及蓝色荧光情况并拍照,使用Image J软件对TUNEL阳性细胞核和总细胞核进行计数,利用两者的

比值表示 TUNEL 阳性细胞核百分比。

Western blot 分析 取适量左心室心肌组织, 加入组织裂解液和蛋白酶抑制剂, 使用组织匀浆器制备心肌匀浆, 冰上裂解 30 min, 12 000 r·min⁻¹、4 °C 离心 10 min, 收集上清即心肌总蛋白。通过 BCA 法测定蛋白浓度, 加入样品缓冲液于 95 °C 煮沸 10 min。取 40 μg 蛋白上样, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳后, 将蛋白条带电转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入一抗 4 °C 孵育过夜, 洗膜后加入 HRP 标记的二抗室温孵育 2 h, 洗膜后采用 ECL 法检测蛋白条带。以 β-tubulin 为内参, 使用 Gel-Pro 32 软件分析目的蛋白的相对表达量。

统计学分析 采用 GraphPad Prism 6.0 软件统计分析并作图, 结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 多重比较采用 Dunnett 分析。P < 0.05 认为具有统计学意义。

结果

1 葛根素改善 MI/R 损伤大鼠心功能

超声心动图检测是评价心脏结构形态及功能变化的常用方法。本研究首先利用超声心动图探究葛根素对 MI/R 损伤大鼠心功能的影响。结果显示 (图 1), 与假手术组相比, 模型组大鼠 LVIDs 显著增加, EF、FS 和 SV 显著降低, LVIDd 无显著性差异, 提示模型组大鼠

左室壁收缩能力下降。与模型组相比, 葛根素低、中、高剂量组大鼠 LVIDs 明显减小, EF、FS 和 SV 显著增加, 差异具有统计学意义, 表明葛根素可以改善 MI/R 损伤大鼠的心功能。

2 葛根素改善 MI/R 损伤大鼠心肌损伤

伊文思蓝和 TTC 双染结果显示 (图 2A~C), 各組间缺血危险区 (area at risk, AAR) 占整个左心室 (left ventricle, LV) 的比例无显著性差异, 提示各組间结扎致缺血范围一致, 手术操作平行性较好。模型组大鼠心脏呈现广泛的白色梗死区域, 梗死面积 (infarcted area, INF) 显著增加, 给予葛根素低、中、高剂量可呈剂量依赖性地减小心肌梗死范围, 表明葛根素可以有效抑制 MI/R 损伤引起的心肌梗死。

临床上常用心肌损伤标志物作为心肌梗死早期的诊断指标。结果显示 (图 2D~G), 与假手术组相比, 模型组大鼠血清中 LDH、AST、CK-MB 及 cTnT 含量显著升高。与模型组相比, 葛根素低、中、高剂量组大鼠血清中 LDH、AST、CK-MB 及 cTnT 含量明显减少, 表明葛根素可以减轻 MI/R 损伤大鼠的心肌损伤。

3 葛根素减轻 MI/R 损伤大鼠心肌炎症反应

鉴于炎症反应在 MI/R 损伤中的重要作用, 本研究检测了葛根素对 MI/R 损伤大鼠心肌炎症因子的影响。ELISA 检测结果显示 (图 3), 模型组大鼠心肌组织中炎症因子 IL-6、IL-1β 及 TNF-α 水平显著高于假手术组。

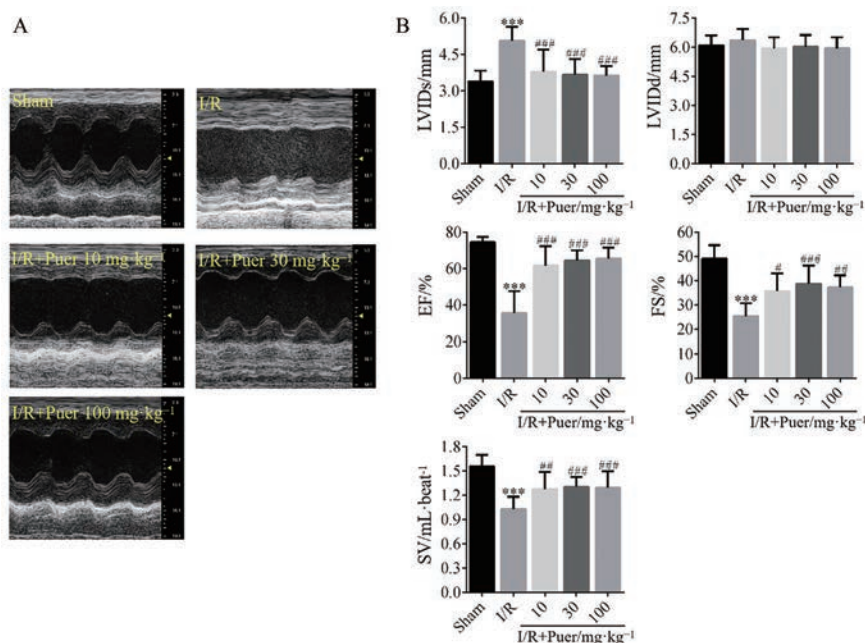


Figure 1 Puerarin (Puer) improved cardiac function in rats subjected to myocardial ischemia/reperfusion (MI/R) injury. A: Representative echocardiographic M-mode records of left ventricular; B: Effects of puerarin on LVIDs, LVIDd, EF, FS, and SV. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs Sham group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs I/R group. LVIDs: Left ventricular internal dimension systole; LVIDd: Left ventricular end diastolic diameter; EF: Ejection fraction; FS: Fractional shortening; SV: Stroke volume

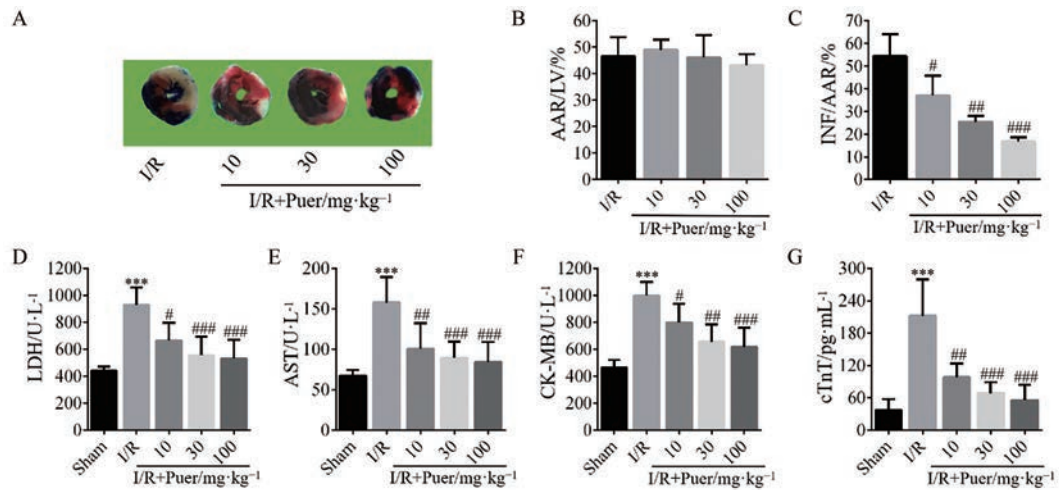


Figure 2 Puerarin reduced infarct size and cardiac damage markers in rats subjected to MI/R injury. A: Representative images of heart sections stained by Evans' blue and TTC; B: The percentage of AAR/LV; C: The percentage of INF/AAR; D: The level of serum LDH; E: The level of serum AST; F: The level of serum CK-MB; G: The level of serum cTnT. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs Sham group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs I/R group. AAR: Area at risk; LV: Left ventricle; INF: Infarcted area; LDH: Lactic dehydrogenase; AST: Aspartate transaminase; CK-MB: Creatine kinase-MB; cTnT: Cardiac troponin T

与模型组相比, 葛根素低剂量组大鼠心肌组织中IL-1 β 及TNF- α 含量明显降低, 葛根素中、高剂量组大鼠心肌组织中IL-6、IL-1 β 及TNF- α 水平均显著降低, 表明葛根素可以减轻MI/R损伤导致的心肌炎症反应。

4 葛根素减少MI/R损伤大鼠心肌细胞凋亡

细胞凋亡是MI/R损伤中的一个重要事件, 本研究通过TUNEL染色及测定Bax、Bcl-2蛋白水平探究葛根素对细胞凋亡的影响。结果显示(图4), 与假手术组相比, 模型组大鼠心肌切片细胞核可观察到明显的绿色荧光, TUNEL染色阳性细胞数显著增加, 且凋亡抑制蛋白Bcl-2明显减少, 凋亡促进蛋白Bax显著增加。给予葛根素低、中、高剂量可以显著降低大鼠心肌TUNEL阳性细胞核百分比, 同时能够升高Bcl-2并降低Bax蛋白水平, 表明葛根素可以抑制MI/R损伤导致的心肌细胞凋亡。

5 葛根素抑制MI/R损伤大鼠心肌NLRP3炎症小体激活和细胞焦亡

为了探究葛根素抗MI/R损伤的作用是否与NLRP3

炎症小体相关, 本研究检测了葛根素对NLRP3炎症小体和下游细胞焦亡相关蛋白的影响。Western blot结果显示(图5), 与假手术组相比, 模型组大鼠心肌组织中NLRP3、ASC、cleaved-caspase 1及下游效应物cleaved-GSDMD、IL-1 β 、IL-18蛋白显著增加, 提示MI/R损伤促进了NLRP3炎症小体的激活并启动了细胞焦亡。给予葛根素中、高剂量可以显著降低大鼠心肌NLRP3、ASC、cleaved-caspase 1、cleaved-GSDMD、IL-1 β 及IL-18水平, 其中葛根素低剂量组大鼠除ASC和IL-18外其余蛋白水平与模型组相比均明显下降, 表明葛根素可以抑制MI/R损伤介导的NLRP3炎症小体激活和细胞焦亡。

6 葛根素抑制MI/R损伤大鼠心肌TLR4/Myd88/NF- κ B通路

为了进一步探究葛根素抑制NLRP3炎症小体活化的机制, 本研究检测了葛根素对TLR4/Myd88/NF- κ B通路的影响。结果显示(图6), 模型组大鼠心肌组织中TLR4、Myd88的表达水平及IKK β 、I κ B α 、NF- κ B的磷

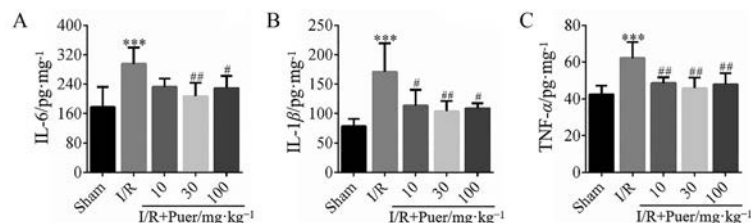


Figure 3 Puerarin decreased the levels of inflammatory cytokines in rats subjected to MI/R injury. The levels of IL-6 (A), IL-1 β (B), and TNF- α (C) in heart tissues were evaluated by ELISA. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs Sham group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs I/R group. IL: Interleukin; TNF- α : Tumor necrosis factor- α

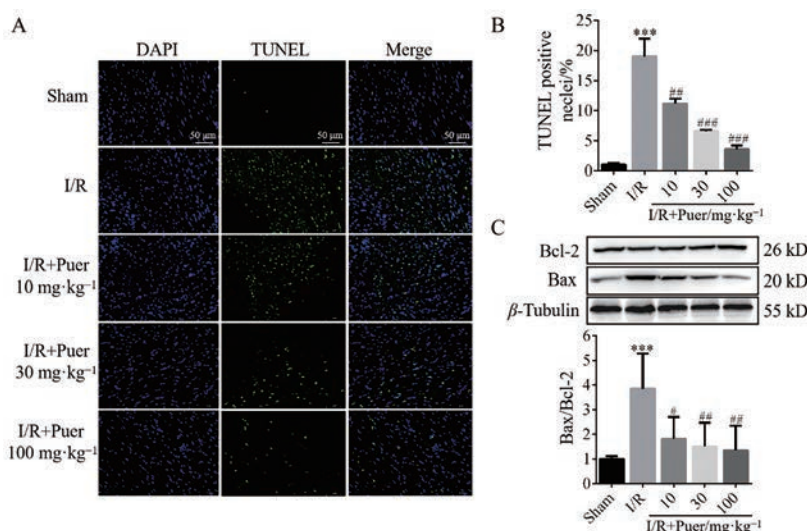


Figure 4 Puerarin suppressed cardiomyocyte apoptosis in rats subjected to MI/R injury. A: Representative images of heart sections stained by TUNEL assay (scale bar: 50 μm); B: The percentage of TUNEL positive nuclei to the total nuclei; C: Expression of Bcl-2 and Bax in heart tissues evaluated by Western blot. $n = 6, \bar{x} \pm s$. ^{***} $P < 0.001$ vs Sham group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ vs I/R group. TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

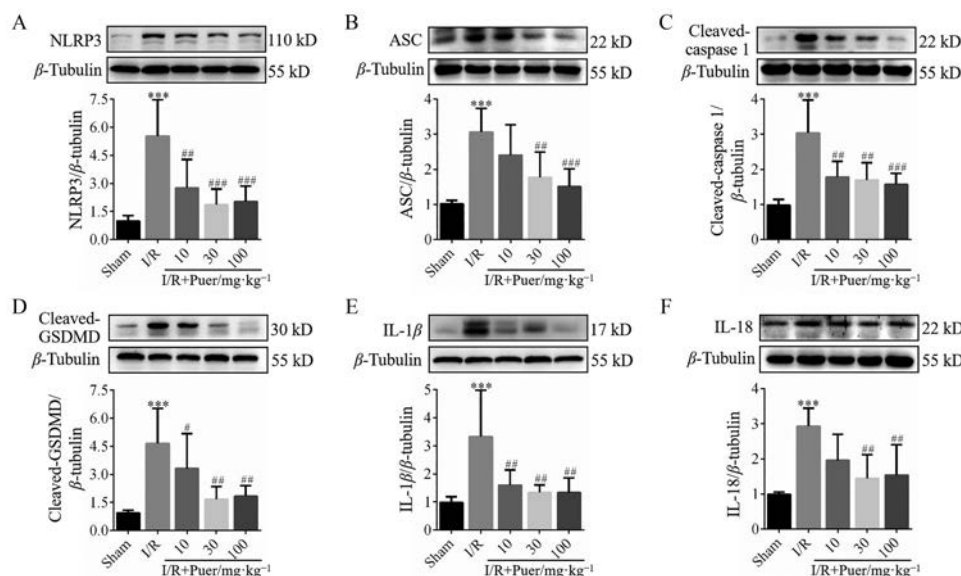


Figure 5 Puerarin inhibited the activation of NLRP3 inflammasome and pyroptosis in rats subjected to MI/R injury. The expression levels of NLRP3 (A), ASC (B), cleaved-caspase 1 (C), cleaved-GSDMD (D), IL-1β (E), and IL-18 (F) were analyzed by Western blot. $n = 6, \bar{x} \pm s$. ^{***} $P < 0.001$ vs Sham group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ vs I/R group. NLRP3: Nod-like receptor protein 3; ASC: Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD; GSDMD: Gasdermin D

酸化水平显著高于假手术组,提示MI/R损伤中TLR4/Myd88/NF-κB通路被激活。给予葛根素中、高剂量可以明显降低TLR4、Myd88的表达及IKKβ、IκBα、NF-κB的磷酸化水平,表明葛根素可以下调MI/R损伤大鼠心肌TLR4/Myd88/NF-κB通路。

讨论

近年来,中医药防治MI/R损伤已初步显现其独特

的优势,也展现广阔的应用前景。不过,仍需在传统中医药辨证论治思想指导下,借鉴现代医学研究方法和手段,充分利用细胞、动物模型和临床研究进行深入研究,以阐释中药防治MI/R损伤的物质基础和作用机制。葛根素系从中药葛根中提取出来的中药单体成分,随着对其药理作用、临床应用等方面的深入研究,葛根素防治多种疾病的价值,尤其对心血管疾病的应用日益引起人们的关注。由于葛根素的水溶性和脂溶

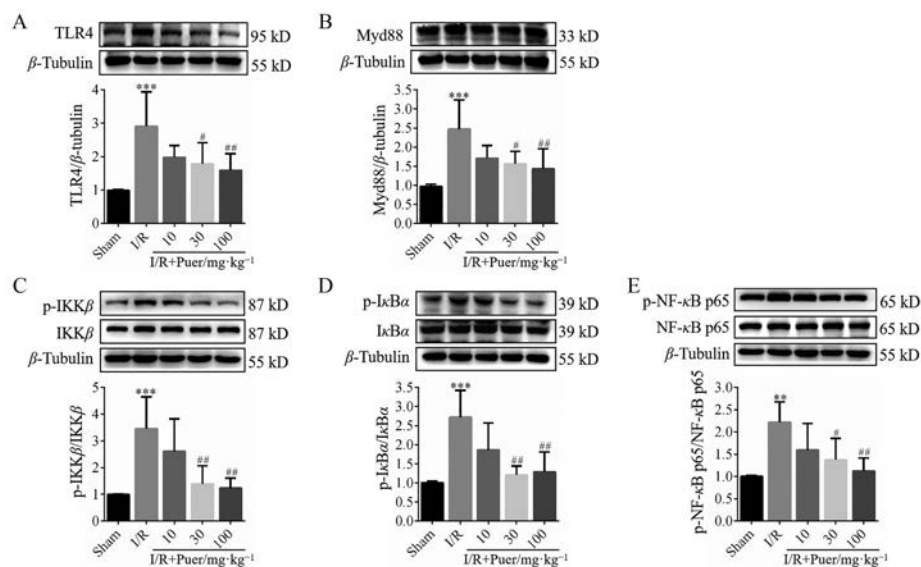


Figure 6 Puerarin suppressed the TLR4/Myd88/NF- κ B signaling pathway in rats subjected to MI/R injury. Western blot analysis of TLR4 (A), Myd88 (B), p-IKK β (C), p-I κ B α (D), and p-NF- κ B p65 (E) were conducted. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Sham group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs I/R group. TLR4: Toll like receptor 4; Myd88: Myeloid differentiation factor 88; NF- κ B: Nuclear factor kappa B; I κ B α : Inhibitor of NF- κ B α ; IKK β : I κ B kinase β

性均较差,口服生物利用度较低,因此临床上只能注射给药,葛根素注射液虽然疗效明确,但是存在不良反应明显、患者顺应性差等缺点,限制其临床应用。为了提高葛根素的口服生物利用度,中国医学科学院药物研究所晶型中心制备获得了一种优势晶型,即葛根素晶V型。药代动力学研究发现,与其他晶型相比,晶V型葛根素具有给药后吸收速度快、最大血药浓度高及有效浓度维持时间长等优点^[18],因此本研究选用晶V型葛根素进行研究。同时,为了避免晶型药物与溶剂之间复杂的化学对晶型状态方面的影响,本研究采用固体灌胃技术将固体状药物直接送至动物胃部,确保了实验的准确性^[16,17]。

本研究结果显示,葛根素显著改善MI/R损伤大鼠的心功能,减小心肌梗死面积,降低心肌损伤标志物水平,抑制心肌细胞凋亡,表明葛根素可以有效地减轻MI/R损伤。炎症反应在MI/R损伤的发生发展中扮演着重要角色。心肌缺血初期会触发炎症反应,从梗死区域清除坏死细胞碎片,再灌注导致这种炎症反应加剧,诱导各种促炎因子的释放和炎性细胞的浸润,导致进一步的心肌功能障碍和细胞死亡,是诱发心肌梗死患者左心室不良重构的关键因素^[19],因此抑制炎症反应成为减轻MI/R损伤改善心肌梗死患者预后的重要策略。本研究结果发现,葛根素显著降低MI/R损伤大鼠心肌炎症因子IL-6、IL-1 β 及TNF- α 的水平,表明葛根素可以减轻MI/R损伤介导的心肌炎症反应。

NLRP3炎症小体是介导免疫反应的关键调节因

子,作为传感器识别机体多种危险信号,引发炎症反应和细胞焦亡。研究表明,在MI/R损伤过程中,NLRP3炎症小体成分的表达上调,使用siRNA诱导NLRP3、ASC及caspase-1基因沉默或采用NLRP3抑制剂干预可以减轻MI/R损伤。另有数据显示,与野生型小鼠相比,NLRP3基因敲除小鼠在经受MI/R损伤后能够显著减小心肌梗死范围并改善心功能^[20,21]。因此,NLRP3炎症小体可能成为治疗MI/R损伤的潜在靶点。最近的一项研究表明,葛根素通过调控Sirt1/NF- κ B信号通路抑制NLRP3炎症小体减轻MI/R损伤^[13]。在本研究中,葛根素处理抑制NLRP3、ASC、cleaved-caspase 1水平及下游IL-1 β 、IL-18的成熟、释放。此外,葛根素还下调细胞焦亡的关键执行蛋白cleaved-GSDMD的水平,提示葛根素对NLRP3炎症小体调控的细胞焦亡也存在抑制作用。这些结果表明,葛根素抗MI/R损伤的作用与抑制NLRP3炎症小体激活相关。

NLRP3炎症小体活化包括启动和激活两个独立的步骤,TLR4/Myd88/NF- κ B通路是启动阶段的主要调控通路^[22]。TLR4是非特异性免疫系统中的重要模式识别受体,被机体内PAMPs或DAMPs激活,随后启动Myd88依赖性信号转导途径激活NF- κ B信号通路^[23]。在静息状态下,NF- κ B以二聚体的形式与抑制因子I κ B结合在一起而呈现无活性的状态。当Myd88依赖性信号途径被激活后,Myd88通过下游衔接分子激活I κ B激酶并使I κ B发生磷酸化和降解,NF- κ B活化并易位进入细胞核^[24],启动NLRP3和IL-1 β 前体的转

录和表达。随后, PAMPs 或 DAMPs 诱导 NLRP3 炎症小体的激活, 从而引发一系列炎症级联反应。因此, TLR4/Myd88/NF- κ B 通路对于 NLRP3 炎症小体介导炎症反应具有重要作用。研究表明, 一些从天然产物中分离出来的化合物如木犀草素、丹酚酸 B 和鹰嘴豆芽素 A 等可以通过抑制 TLR4/NF- κ B 通路和 NLRP3 炎症小体减轻 MI/R 损伤^[25-27]。此外, 采用 TLR4 特异性抑制剂 TAK-242 干预可以抑制 MI/R 损伤介导的 NLRP3 炎症小体激活^[25,28], 提示 TLR4/Myd88/NF- κ B 通路和 NLRP3 炎症小体共同介导 MI/R 损伤中炎症反应的发生。因此, 本研究进一步探讨了葛根素对 MI/R 损伤中 TLR4/Myd88/NF- κ B 通路的作用。结果显示, 葛根素显著抑制 MI/R 损伤介导的 TLR4、Myd88 蛋白表达上调和 IKK β 、I κ B α 、NF- κ B 蛋白磷酸化, 提示 TLR4/Myd88/NF- κ B 通路参与葛根素对 MI/R 损伤的改善作用, 葛根素对 NLRP3 炎症小体的抑制作用在一定程度上是通过下调 TLR4/Myd88/NF- κ B 通路发挥的。

综上所述, 葛根素可能通过下调 TLR4/Myd88/NF- κ B 通路抑制 NLRP3 炎症小体激活进而减轻炎症反应改善 MI/R 损伤。本研究加深了对葛根素抗炎和抗 MI/R 损伤作用机制的了解, 有利于葛根素的进一步合理开发与利用, 提高临床疗效, 也为临床防治 MI/R 损伤提供了新靶点和新思路。

作者贡献: 王丹姝负责研究观察、结果分析及文章撰写; 燕柳艳和孙姝婵参与实验操作与数据采集; 姜瑜和阴苏月参与文献检索和数据分析; 王守宝和方莲花负责实验设计、结果分析、论文修改和基金获得; 杜冠华负责实验监督及论文审阅。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Anderson JL, Morrow DA. Acute myocardial infarction [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376: 2053-2064.
- [2] Wang J, Toan S, Zhou H. New insights into the role of mitochondria in cardiac microvascular ischemia/reperfusion injury [J]. *Angiogenesis*, 2020, 23: 299-314.
- [3] Silvis MJM, Kaffka Genaamd Dengler SE, Odille CA, et al. Damage-associated molecular patterns in myocardial infarction and heart transplantation: the road to translational success [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 599511.
- [4] Wang L, Hauenstein AV. The NLRP3 inflammasome: mechanism of action, role in disease and therapies [J]. *Mol Aspects Med*, 2020, 76: 100889.
- [5] Kelley N, Jeltema D, Duan YH, et al. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 3328.
- [6] Fu SB, Xu G, Gao Y, et al. Inhibitory effect and mechanism of licochalcone A on NLRP3 inflammasome [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2018, 53: 2050-2056.
- [7] Toldo S, Mauro AG, Cutter Z, et al. Inflammasome, pyroptosis, and cytokines in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, 315: H1553-H1568.
- [8] Dai YX, Wang S, Chang SF, et al. M2 macrophage-derived exosomes carry microRNA-148a to alleviate myocardial ischemia/reperfusion injury via inhibiting TXNIP and the TLR4/NF- κ B/NLRP3 inflammasome signaling pathway [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 142: 65-79.
- [9] Xue JY, Ge HW, Lin ZY, et al. The role of dendritic cells regulated by HMGB1/TLR4 signalling pathway in myocardial ischaemia reperfusion injury [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23: 2849-2862.
- [10] Wei SY, Chen Y, Xu XY. Progress on the pharmacological research of puerarin: a review [J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12: 407-414.
- [11] Xu HX, Pan W, Qian JF, et al. MicroRNA21 contributes to the puerarin-induced cardioprotection via suppression of apoptosis and oxidative stress in a cell model of ischemia/reperfusion injury [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20: 719-727.
- [12] Tang HX, Song XD, Ling YN, et al. Puerarin attenuates myocardial hypoxia/reoxygenation injury by inhibiting autophagy via the Akt signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15: 3747-3754.
- [13] Wang ZK, Chen RR, Li JH, et al. Puerarin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting inflammation and the NLRP3 inflammasome: the role of the SIRT1/NF- κ B pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 89: 107086.
- [14] Ni SY, Zhong XL, Li ZH, et al. Puerarin alleviates lipopolysaccharide-induced myocardial fibrosis by inhibiting PARP-1 to prevent HMGB1-mediated TLR4-NF- κ B signaling pathway [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2020, 20: 482-491.
- [15] Wang DS, Yan LY, Yang DZ, et al. Formononetin ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats by suppressing the ROS-TXNIP-NLRP3 pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 525: 759-766.
- [16] Yang SY, Zhou J, Zhang L, et al. Present situation and progress of the research for polymorphic chemical drugs in China [J]. *Her Med* (医药导报), 2019, 38: 177-182.
- [17] Du GH. Gavage needle: CN, 201870770U [P]. 2011-06-22.
- [18] Lv Y, Du GH, Chang Y, et al. The preparation method and application for preponderant pharmaceutical polymorphs of puerarin: CN, 101899041A [P]. 2010-12-01.
- [19] Ong SB, Hernández-Reséndiz S, Crespo-Avilan GE, et al. Inflammation following acute myocardial infarction: multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 186: 73-87.
- [20] Toldo S, Abbate A. The NLRP3 inflammasome in acute myocardial

- dial infarction [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15: 203-214.
- [21] Qiu Z, Lei SQ, Zhao B, et al. NLRP3 inflammasome activation-mediated pyroptosis aggravates myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic rats [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 9743280.
- [22] Gros Lambert M, Py BF. Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway [J]. *J Inflamm Res*, 2018, 11: 359-374.
- [23] Firmal P, Shah VK, Chattopadhyay S. Insight into TLR4-mediated immunomodulation in normal pregnancy and related disorders [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 807.
- [24] Shih RH, Wang CY, Yang CM. NF- κ B signaling pathways in neurological inflammation: a mini review [J]. *Front Mol Neurosci*, 2015, 8: 77.
- [25] Zhang X, Du QM, Yang Y, et al. The protective effect of luteolin on myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury through TLR4/NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 91: 1042-1052.
- [26] Hu Y, Li QJ, Pan YZ, et al. Sal B alleviates myocardial ischemic injury by inhibiting TLR4 and the priming phase of NLRP3 inflammasome [J]. *Molecules*, 2019, 24: 4416.
- [27] Bai YJ, Li ZG, Liu WH, et al. Biochanin A attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway [J]. *Acta Cir Bras*, 2019, 34: e201901104.
- [28] Su Q, Li L, Sun YH, et al. Effects of the TLR4/Myd88/NF- κ B signaling pathway on NLRP3 inflammasome in coronary microembolization-induced myocardial injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47: 1497-1508.