

· 实验研究 ·

淫羊藿素通过 AMPK/NLRP3 通路改善 脓毒症小鼠心肌损伤的机制研究

孙凤霄¹, 王馨妍¹, 张敬¹, 董波^{2*}

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250013; 2. 山东第一医科大学附属省立医院, 山东 济南 250021

摘要 目的:探究淫羊藿素(ICT)对脓毒症心肌损伤的干预机制。方法:将小鼠随机分为对照组、模型组、AMPK 激活剂组(MET 组)、淫羊藿素组(ICT 组)、淫羊藿素组 + AMPK 抑制剂化合物 C 组(ICT + CC 组), 每组12 只。除对照组外,其余小鼠腹腔注射 LPS 造模。ICT 组造模前 30 min 腹腔注射 ICT, ICT + CC 组同时注射 AMPK 抑制剂 Compound C。造模 24 h 后,检测小鼠心功能、心肌病理变化、AMPK 通路和焦亡相关蛋白表达及血清炎症因子和心肌损伤标志物浓度。结果:ICT 和 AMPK 激活剂的干预明显提高了脓毒症小鼠生存率,心脏 LVEF、LVFS 值升高($P < 0.05$), LVIDD、LVIDS 降低($P < 0.05$);心肌组织损伤减轻,炎症细胞浸润减少;血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-18、CK-MB 以及 LDH 水平降低($P < 0.05$);蛋白 p-AMPK/AMPK 比值升高($P < 0.05$), NLRP3、ASC、Cleaved Caspase-1、GSDMD-NT、Cleaved IL-1 β 表达减少($P < 0.05$)。而 Compound C 可逆转 ICT 对心肌损伤的改善效果,炎症指标升高,焦亡蛋白表达增加。结论:ICT 可改善小鼠脓毒症心肌损伤和炎症反应,其作用机制可能与激活 AMPK 抑制 NLRP3 信号通路介导的细胞焦亡有关。

关键词 淫羊藿素;脓毒症;心肌损伤;细胞焦亡;AMPK/NLRP3 通路

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1002-2392(2026)07-0005-07

DOI:10.19664/j.cnki.1002-2392.260133

脓毒症心肌病作为脓毒症引发的严重并发症,严重威胁患者生命健康。临床上,伴有心功能不全的脓毒症患者病死率高达 50% ~ 70%,若治疗不及时,心肌损伤会持续恶化,严重影响患者预后^[1]。当前治疗手段如早期控制感染、液体复苏和血管活性药物应用等^[2],虽能在一定程度上缓解病情,但对心肌功能的改善有限,无法从根本上逆转心肌损伤,且目前尚缺乏针对脓毒症心肌病的精准治疗策略,患者病死率依然居高不下。因此深入探究发病机制,寻找有效治疗靶点迫在眉睫。

细胞焦亡在脓毒症心肌病的发病进程中扮演着关

键角色^[3]。细胞焦亡作为一种程序性细胞死亡,在脓毒症引发的过度炎症环境下被异常激活,对心肌细胞造成直接损伤。在前期脓毒症心肌损伤模型的相关研究中发现,5'-腺苷酸活化蛋白激酶(5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)与含 NLR 家族吡啶结构域含量 3 (NLR family pyrin domain containing 3, NLRP3) 所组成的信号通路,参与介导细胞焦亡过程。其中,AMPK 的激活可抑制 NLRP3 炎症小体的组装和激活,从而减少细胞焦亡的发生及炎症因子的释放^[4]。因而 AMPK 成为了一个重要的治疗靶点,而激活或抑制 AMPK 可能会对脓毒症心肌损伤的修复产生不同影响。深入研究这一机制,有望为脓毒症心肌病的治疗提供新的策略和有效靶点。

淫羊藿素(Icaritin, ICT)是从传统中草药淫羊藿中提取的活性成分,具有抗炎、抗氧化等多种生物学活性^[5],在心血管疾病体内模型研究表明,Zhang 等^[6]构建大鼠心肌缺血再灌注模型,给予淫羊藿素干预后心脏梗死面积缩小,血浆中肌酸激酶(Creatine Kinase, CK)、乳酸脱氢酶(Lactate Dehydrogenase, LDH)等心肌

收稿日期:2025-03-31 修回日期:2025-12-02

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82070382);山东省泰山学者基金项目(ts20190979)

作者简介:孙凤霄(1999-),女,硕士研究生,从事中西医结合心系疾病相关研究。

* 通信作者:董波(1964-),男,博士,教授,从事中西医结合心系疾病相关研究。

损伤标志物水平降低,促炎细胞因子肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) 表达降低,还可减少超氧化物生成和丙二醛形成,增强心肌组织抗氧化能力。另有淫羊藿素预防血管钙化的研究显示^[7],不同剂量干预后,小鼠血管钙化情况均有改善,能显著降低血管内钙含量、减少钙化面积并降低成骨标志物的表达水平。然而,关于淫羊藿素对脓毒症心肌病的作用却鲜见研究。本研究旨在探究淫羊藿素是否通过调控 AMPK/NLRP3 信号通路,影响细胞焦亡过程,从而对脓毒症心肌损伤小鼠发挥保护作用,为脓毒症心肌病的治疗寻找全新方向。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 60 只,体质量 18 ~ 22 g,周龄 6 ~ 8 周,济南朋悦实验动物繁殖有限责任公司所提供,动物合格证编号:SCXK(鲁)2022 0006。根据规定,每个笼子里放置 4 只动物,并将其单独放入通风的笼子中。温度(24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 50% ~ 60%,每天 12 h 明暗交替,由专人负责加料换水。经山东第一医科大学附属省立医院实验动物 EC 的批准(2023-91)。

1.2 药物与试剂

淫羊藿素(批号:B21577,上海源叶);脂多糖 LPS(北京 Solarbio 公司);METformin(MET)、AMPK 通路抑制剂 Compound C、ASC 抗体,均购自美国 MedChemexpress 生物科技公司;TNF- α 、IL-18、IL-1 β ELISA 试剂盒购自中国武汉 BOSTER 生物工程有限公司;CK-MB、LDH 的 ELISA 试剂盒(上海江莱生物科技有限公司);细胞凋亡 TUNEL 检测(美国 APEX-BIO);山羊抗兔免疫球蛋白 G 重链和轻链荧光标记预吸附二抗、DAPI 封固剂购自中国上海艾博抗贸易有限公司;GAPDH 抗体(美国 Proteintech 公司);GSDMD 抗体(上海艾比马特有限公司);AMPK、p-AMPK、NLRP3、Caspase-1 和 IL-1 β 抗体购自上海亲合力生物医药科技股份有限公司。

1.3 主要仪器

Vevo770 小动物高分辨超声影像系统,加拿大 Visual Sonics 公司;微量移液器,德国 Eppendorf 公司;TP-1020 自动脱水机、RM-2145 石蜡切片机、EG-1160 石蜡包埋机,德国 Leica 公司;LX-300 袖珍低速离心机,中国其林贝尔公司;Mini Protean 3 Dodeca 电泳槽,美国伯乐公司;ECLIPSE Ni-U 942060 正置荧光手动显微镜,日本尼康公司;Amersham Imager 680 化学发光成像仪,美国通用电气公司。

1.4 动物分组、造模及给药

雄性 C57BL/6J 小鼠进行 7 d 适应性喂养后,将小鼠随机分成对照组、模型组、AMPK 激活剂组(MET 组)、淫羊藿素组(ICT 组)、淫羊藿素组 + AMPK 抑制剂化合物 C 组(ICT + CC 组),每组 12 只,小鼠腹膜注射 LPS(溶于生理盐水中),剂量为 10 mg/kg^[8],维持模型状态 24 h,诱导脓毒症心肌损伤。同时从 LPS 注射开始,持续观察记录各组小鼠 72 h 内的生存情况,每隔 12 h 检查小鼠状态并记录存活或死亡信息,用于绘制生存曲线评估造模及药物干预效果。对照组小鼠则接受等体积的生理盐水注射。为了验证淫羊藿素的保护作用,ICT 组小鼠在 LPS 注射前 30 min 腹腔注射 ICT(10 mg/kg),AMPK 激活剂组同样在造模前腹腔给予 METformin(100 mg/kg)。ICT + CC 组在给药的同时,小鼠在腹膜内注射 Compound C(20 mg/kg)。注射 LPS 24 h 后,再进行心功能评估的超声心动图。随后,通过腹膜内给予 45 mg/kg 剂量的戊巴比妥钠,对小鼠实施深度麻醉和处死,并采集血样和心脏组织。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 超声心电图

取材前,将小鼠置于麻醉箱中,持续吸入浓度为 1% 的异氟烷进行麻醉。待小鼠麻醉生效后,将其仰卧位固定于实验台上,使用脱毛膏小心清除小鼠前胸部毛发,随后用高解析度超声仪和 VEV0770 影像系统检测各组小鼠的心脏功能。在确定合适的测量角度后,针对表征心脏功能与形态的关键参数,包括左室射血分数(LVEF)、左室收缩末期内径(LVIDS)、左室短轴缩短率(LVFS)以及左心室舒张末期内径(LVIDD),进行测定。

1.5.2 HE 染色观察病理变化

获取心脏组织后,立即固定于 4% 多聚甲醛中 24 h,随后进行乙醇梯度脱水、二甲苯透明和石蜡包埋。切成 3 ~ 5 μm 切片后进行 HE 染色,最后脱水、透明并封片,使用光学显微镜观察。

1.5.3 TUNEL 染色观察心肌凋亡情况

组织切片先经历脱蜡步骤,随后采用 PBS 进行清洗。依据 TUNEL 试剂盒说明书,添加反应液,在适宜条件下孵育。之后在荧光显微镜下观察用 DAPI 复染细胞核的切片,对心肌细胞的凋亡进行分析。

1.5.4 ELISA 法检测血清各指标浓度

小鼠全血采集完毕后,静置 2 h,以确保血液能够完全凝固。低温离心取上清液,与样品稀释液 1:1 混合均匀。根据试剂盒的操作说明,每份样品采用酶联免疫吸附测定(ELISA)方法,依次测定 TNF- α 、IL-

1 β 、IL-18、CK-MB 和 LDH 的浓度。每个孔的吸光度值按照标准曲线进行计算,最终得出各组血清中各个生物标志物的浓度。

1.5.5 IHC 法检测 NLRP3 和 Caspase-1 的表达水平及分布情况

心脏组织切片经固定、包埋及脱蜡后,采用抗 NLRP3、Caspase-1 的一抗进行孵育,二抗标记后进行显色反应。通过光学显微镜观察染色结果,分析各组心肌组织中 NLRP3 和 Caspase-1 的表达水平及分布情况。

1.5.6 Western blot 法检测各指标蛋白含量

充分裂解组织进行总蛋白提取。定量上样电泳完成后将蛋白转移到 PVDF 膜上,电泳后转膜,在室温下封闭 1.5 h。接着将 PVDF 膜与 AMPK、p-AMPK、NLRP3、ASC、Cleaved Caspase-1、GSDMD-NT、Cleaved IL-1 β (均为 1:1 000)以及 GAPDH 一抗在 4℃下孵化过夜。在洗膜之后,室温下孵化二抗 1 h,随后洗净膜,显影并拍照片。

1.6 统计学分析

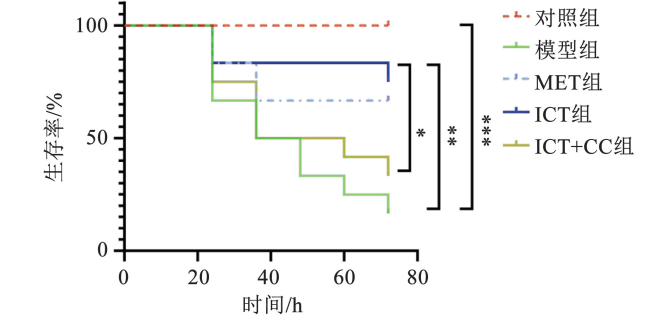
本研究数据均采用 Graphpad prism8.0 软件进行统计学分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Tukey's 事后检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ICT 提高小鼠生存率

在观察药物干预对小鼠生存情况的影响时,绘制了各组小鼠的生存曲线,如图 1 结果显示,相比于对照组,模型组小鼠生存率显著降低($P < 0.05$),表明脓毒症造模对小鼠生存产生明显负面影响。与模型组相比,ICT 组和 MET 组小鼠生存率有所提高($P < 0.05$),说

明淫羊藿素(ICT)和 AMPK 激活剂 MET 干预能改善脓毒症小鼠的生存状况。而 ICT + CC 组小鼠生存率低于 ICT 组($P < 0.05$),提示抑制 AMPK 通路会削弱 ICT 的保护作用,导致小鼠生存情况恶化。



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 1 各组小鼠 72 h 生存情况

2.2 ICT 对小鼠心功能的影响

与对照组相比,模型组的 LVFS 和 LVEF 显著下降($P < 0.05$),而 LVIDs 与 LVIDd 显著增加,差异具统计学意义($P < 0.05$)。与模型组相比,MET 组和 ICT 组 LVEF、LVFS 指标升高($P < 0.05$),LVIDD 和 LVIDS 指标降低($P < 0.05$),ICT + CC 组 LVEF、LVFS 较低,LVIDD、LVIDS 较高,差异具统计学意义($P < 0.05$)。见表 1、图 2。

表 1 各组小鼠心功能比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	LVEF/%	LVFS/%	LVIDD/mm	LVIDS/mm
对照组	80.89 $\pm$ 2.18	50.30 $\pm$ 2.16	2.53 $\pm$ 0.17	1.36 $\pm$ 0.19
模型组	68.92 $\pm$ 4.49 ^a	37.54 $\pm$ 3.14 ^a	3.09 $\pm$ 0.07 ^a	2.02 $\pm$ 0.14 ^a
MET 组	77.43 $\pm$ 1.56 ^b	46.73 $\pm$ 1.13 ^b	2.94 $\pm$ 0.12 ^b	1.78 $\pm$ 0.19 ^b
ICT 组	76.44 $\pm$ 2.81 ^b	47.28 $\pm$ 1.60 ^b	2.74 $\pm$ 0.12 ^b	1.63 $\pm$ 0.04 ^b
ICT + CC 组	69.79 $\pm$ 2.02 ^c	42.71 $\pm$ 1.76 ^c	3.09 $\pm$ 0.07 ^c	2.01 $\pm$ 0.08 ^c

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$;与 ICT 组相比,^c $P < 0.05$ 。

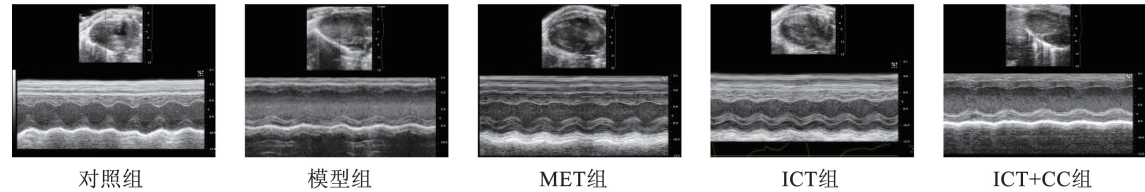


图 2 各组小鼠心脏超声图像和心功能各指标变化

2.3 ICT 对脓毒症心肌损伤小鼠心肌病理变化的影响

HE 染色结果显示如图 3,模型组小鼠心肌组织明显水肿,炎症细胞浸润,心肌细胞间隙红细胞增多,心肌纤维断裂。与模型组相比,ICT 组和 MET 组小鼠的

心肌病理变化均有所改善,炎症细胞和红细胞的浸润量减少,心肌纤维排列较为整齐。与 ICT 组相比,ICT + CC 组小鼠的心肌病理变化趋于严重,水肿、炎症细胞浸润以及心肌纤维断裂的程度均有所增加。

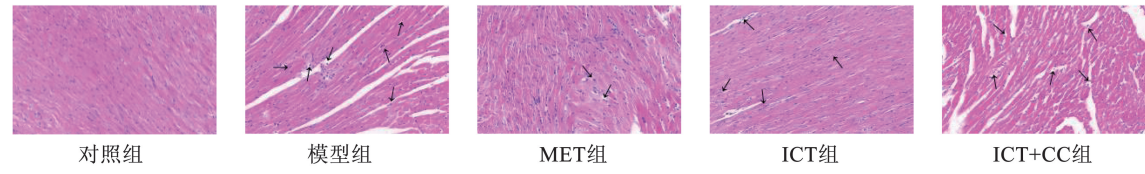


图 3 各组小鼠心肌组织 HE 结果($\times 400$,箭头表示炎症细胞浸润)

2.4 ICT 对脓毒症心肌损伤小鼠细胞凋亡的影响

TUNEL 染色结果如图 4 显示,与对照组相比,模型组小鼠心肌组织中绿色荧光增强,凋亡指数显著增加,差异具统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比,ICT 组和 MET 组一样,小鼠心肌细胞凋亡数量减少,差异具统计学意义($P < 0.05$);与 ICT 组相比,ICT + CC 组小鼠心肌细胞凋亡数量显著增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 2、图 4。

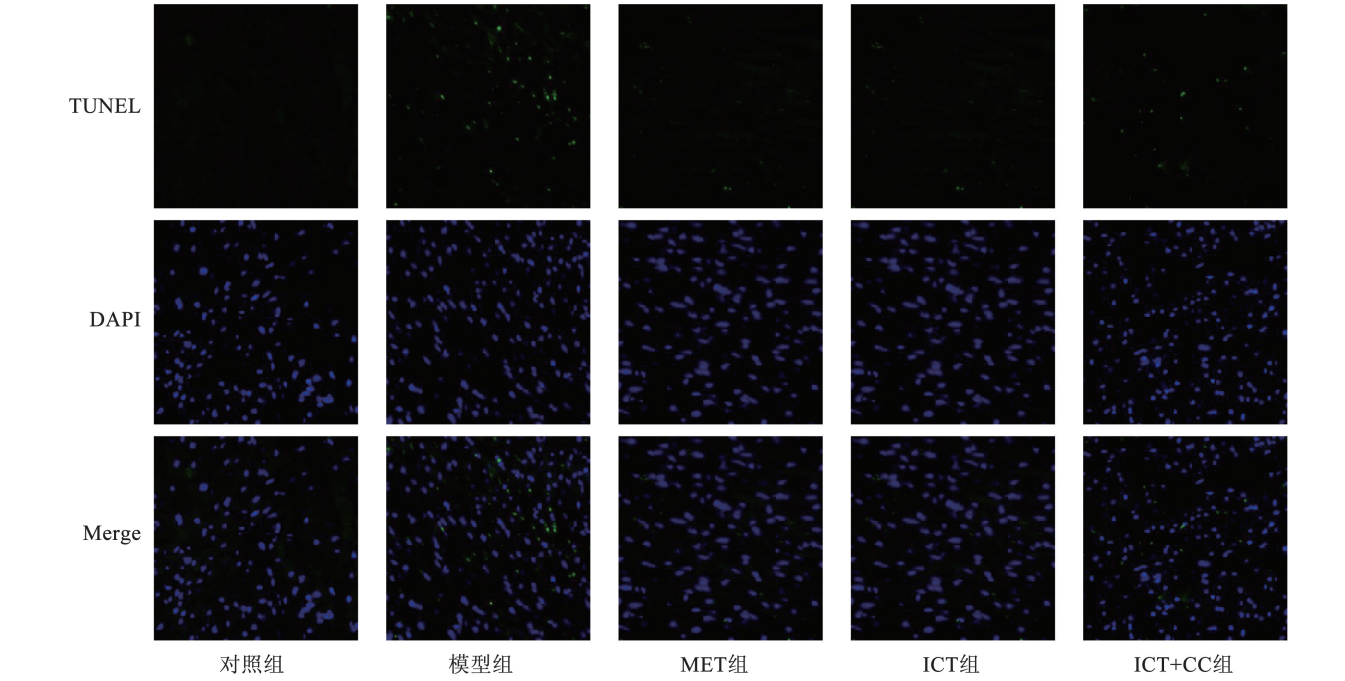


图 4 各组小鼠心肌 TUNEL 染色(×400)

2.5 ICT 对脓毒症心肌损伤小鼠血清炎症因子的影响

与对照组比较,模型组血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-18、CK-MB、LDH 水平均比对照组显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比,ICT 组和 MET 组血清中的 TNF- α 、IL-18、IL-1 β 显著降低

表 2 各组小鼠心肌凋亡情况($\bar{x} \pm s, n = 6$)	
组别	凋亡指数
对照组	1.26 $\pm$ 0.13
模型组	10.19 $\pm$ 0.67 ^a
MET 组	5.01 $\pm$ 0.26 ^b
ICT 组	2.76 $\pm$ 0.31 ^b
ICT + CC 组	7.29 $\pm$ 0.46 ^c

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$;与 ICT 组相比,^c $P < 0.05$ 。

($P < 0.05$),CK-MB 和 LDH 水平也有所下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);而与 ICT 组相比,ICT + CC 组小鼠血清中的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-18、CK-MB 和 LDH 水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组小鼠血清 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、CK-MB、LDH 水平的变化($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	IL-1 β /(pg/mL)	IL-18/(pg/mL)	TNF- α /(pg/mL)	LDH/(ng/mL)	CK-MB/(ng/mL)
对照组	82.85 $\pm$ 6.15	25.63 $\pm$ 7.89	22.69 $\pm$ 2.31	189.91 $\pm$ 23.71	18.18 $\pm$ 2.71
模型组	155.02 $\pm$ 19.97 ^a	110.16 $\pm$ 13.23 ^a	47.77 $\pm$ 2.43 ^a	320.85 $\pm$ 33.46 ^a	34.43 $\pm$ 5.13 ^a
MET 组	106.11 $\pm$ 9.96 ^b	77.31 $\pm$ 12.56 ^b	34.92 $\pm$ 2.96 ^b	233.93 $\pm$ 30.07 ^b	24.18 $\pm$ 3.58 ^b
ICT 组	110.42 $\pm$ 5.99 ^b	73.93 $\pm$ 8.50 ^b	34.61 $\pm$ 1.74 ^b	223.77 $\pm$ 34.26 ^b	23.46 $\pm$ 1.74 ^b
ICT + CC 组	148.13 $\pm$ 11.27 ^c	103.40 $\pm$ 5.98 ^c	41.76 $\pm$ 3.54 ^c	305.05 $\pm$ 26.68 ^c	31.74 $\pm$ 2.04 ^c

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$;与 ICT 组相比,^c $P < 0.05$ 。

2.6 ICT 对小鼠心肌组织 NLRP3 和 IL-1 β 蛋白的表达影响

结果表明,与对照组相比,模型组小鼠心肌组织中 NLRP3 和 IL-1 β 蛋白表达显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);ICT 组和 MET 组心肌组织中 NLRP3

和 IL-1 β 的表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 ICT 组比较,ICT + CC 组 NLRP3 和 IL-1 β 的表达明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),结果见表 4、图 5。

表 4 各组小鼠心肌组织 NLRP3、IL - 1β 蛋白
表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	NLRP3	IL - 1β
对照组	6.26 ± 0.86	5.56 ± 0.6
模型组	11.36 ± 1.22 ^a	8.60 ± 0.62 ^a
MET 组	8.40 ± 1.03 ^b	6.67 ± 0.6 ^b
ICT 组	8.12 ± 0.82 ^b	6.95 ± 0.55 ^b
ICT + CC 组	10.29 ± 0.93 ^c	8.32 ± 0.31 ^c

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$;与 ICT 组相比,^c $P < 0.05$ 。

2.7 ICT 对小鼠心肌组织 AMPK/NLRP3 通路焦亡相关蛋白表达的影响

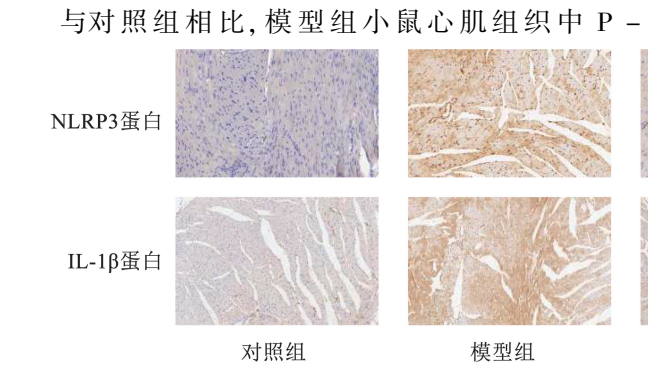


图 5 IHC 检测各组小鼠心肌组织 NLRP3、IL - 1β 蛋白表达水平 (×400)

表 5 各组小鼠心肌组织 AMPK/NLRP3 通路蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	P - AMPK/AMPK	NLRP3	GSDMD - NT	ASC	Cleaved Caspase - 1	Cleaved IL - 1β
对照组	1.12 ± 0.03	0.80 ± 0.10	0.66 ± 0.31	0.78 ± 0.11	0.76 ± 0.10	0.53 ± 0.13
模型组	0.79 ± 0.12 ^a	1.51 ± 0.16 ^a	1.25 ± 0.27 ^a	1.17 ± 0.20 ^a	1.27 ± 0.28 ^a	1.23 ± 0.31 ^a
MET 组	0.96 ± 0.14 ^b	1.25 ± 0.10 ^b	0.95 ± 0.27 ^b	0.89 ± 0.12 ^b	0.97 ± 0.11 ^b	0.88 ± 0.13 ^b
ICT 组	0.94 ± 0.18 ^b	1.18 ± 0.12 ^b	0.93 ± 0.22 ^b	0.88 ± 0.08 ^b	0.82 ± 0.14 ^b	0.84 ± 0.11 ^b
ICT + CC 组	0.69 ± 0.09 ^c	1.42 ± 0.12 ^c	1.20 ± 0.18 ^c	1.10 ± 0.22 ^c	1.17 ± 0.22 ^c	1.07 ± 0.11 ^c

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$;与 ICT 组相比,^c $P < 0.05$ 。

3 讨论

脓毒症是由感染引起的全身性炎症反应综合征,其病理过程中心肌损伤的发生与炎症因子的过度释放有密切的关系^[9]。在实验研究中,作为革兰阴性菌外膜的重要组成部分,LPS 可以通过模拟脓毒症的炎症反应和病理过程,强力激活免疫系统,诱导机体释放大量的促炎因子^[10]。在本研究中,脓毒性心肌损伤动物模型的成功构建,采用了经典的脓毒症模型—腹腔注射 LPS 方法。临床上通常表现为心脏收缩和舒张功能的减退,心输出量的降低,进而影响全身循环^[11]。经心脏功能检测发现,注射 LPS 后的小鼠心脏功能出现显著异常,收缩功能方面,LVFS、LVEF 显著降低,舒张功能方面,LVIDs、LVIDd 显著增大,表明小鼠心脏收缩和舒张功能均受到明显抑制。此外,心脏组织中的组织学检查结果也显示,心肌纤维断裂、红细胞渗漏和炎症细胞浸润这些结果与文献报道一致^[12-13],表明脓毒症小鼠模型成功复制了脓毒性心肌损伤的主要病理特征,为进一步的干预实验奠定了基础。

在中医理论中,脓毒症心肌损伤可归属于“心悸”“胸痹”“喘证”等范畴^[14],从其临床表现和发展历程分析,与《伤寒论》《温病条辨》等书籍所描述的温热病有很大的相似性。多数学者认为引起脓毒症的原因主要是正气不足,邪气入侵^[15]所致。特别是脓毒症引发的心肌损伤,邪毒留恋,病机叠加,导致心阳虚、脾肾不足。淫羊藿作为一味传统的补肾壮阳中药,在中医临床上常用于治疗与心肾相关的病症,其性温,味甘、辛,具有补肾阳、强心力、益精血的作用,因此,淫羊藿对于心血管疾病的预防和治疗有着广阔的应用潜力。ICT 作为从淫羊藿中提取的异戊二烯类黄酮衍生物,包括调节免疫功能、抗骨质疏松、抗肿瘤及抗衰老作用^[15],近期实验显示,雾化吸入 ICT 能够显著缓解哮喘小鼠气道与肺血管周边炎症细胞的浸润情况,减少对杯状

细胞的增生现象,进而有效减轻气道所产生的炎症反应。与临床使用的激素相当,长期吸入 ICT 能减少气道胶原沉积和气道平滑肌增生,改善气道重塑,减轻气道高反应性^[16]。另有研究发现,ICT 能降低大脑中动脉闭塞大鼠脑梗死体积,改善神经功能和运动协调能力,减少了促炎因子(如 IL-1 β 、TNF- α)的水平,增加了抗炎因子 IL-10 的水平,经 GPER-ERK-NF- κ B 信号通路,抑制小胶质细胞的激活和 M1 极化,促进 M2 极化^[17]。这些实验结果证明,淫羊藿素能够通过多途径、多靶点调节炎症细胞因子生成,发挥抗炎潜能。在本研究中,淫羊藿素的介入使得炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-18 和 TNF- α 水平下降,提示 ICT 可能通过其抗炎作用缓解心肌损伤,同时降低了 CK-MB 和 LDH 水平,减少了心肌细胞凋亡,提示淫羊藿素可以改善脓毒症导致的心肌的病理损害。

近些年,大量的研究揭示了脓毒症心肌病与细胞的程序性死亡和过度的炎症反应有着紧密的联系,特别是 NLRP3 炎症小体的激活被视为脓毒症性心肌损伤的主要原因之一^[18]。细胞焦亡是以细胞膨胀破裂释放大量促炎因子,进而引起局部和全身炎症反应为特征的程序性细胞死亡形式^[19]。据研究,LPS 能够利用 Toll 样受体(TLR)刺激 NLRP3 炎症小体,从而触发 Caspase-1,导致细胞分解,并产生 IL-1 β 与 IL-18 的炎症反应^[20]。本研究以细胞焦亡的关键分子 NLRP3 炎症小体为研究重点,探讨其对心肌损伤脓毒症的影响机制。经过 LPS 的处理,NLRP3 炎症小体的数量显著增加,同时,通过吸引 ASC 来构建复合体,这也进一步刺激了下游的 Caspase-1 进行剪切,从而推动 GSDMD 的分解为 GSDMD-NT,最终在细胞膜上产生孔洞。这样就会产生大量的 IL-1 β 、IL-18 等促炎性物质。这个步骤对心脏细胞造成的破坏更为严重,同时也使得整个体系的炎症反应更为强烈。尽管如此,淫羊藿素的干预显著地减少了 NLRP3、ASC、Cleaved Caspase-1 和 GSDMD-NT 的表达,同时也减少了 IL-1 β 和 IL-18 的释放,因此,LPS 引发的心肌细胞焦亡过程得到了抑制。这一作用不仅保护了心肌细胞结构的完整性,而且通过调控细胞的焦亡,进一步验证了淫羊藿素改善脓毒症心肌损伤的潜在机制,有效地缓解了炎症反应对细胞的影响,使心肌损伤得以改善。

作为细胞内能量稳态的重要调控因子,AMPK 也在炎症反应中扮演着关键角色^[21]。近几年的研究表明,AMPK 的活化对 NLRP3 炎症小体的活化有明显的抑制作用,从而使促炎因子的释放减少^[22]。本研究通过使用 AMPK 的激活剂进一步验证了其在脓毒症心

肌损伤中的作用。实验结果显示,AMPK 激活剂能够显著减轻 LPS 诱导的心肌损伤,并且 ICT 在本研究中表现出 AMPK 激活剂样的作用。具体而言,ICT 干预显著提高了心肌组织中 AMPK 的磷酸化水平,并降低了 NLRP3 小体以及焦亡蛋白的表达。而与 AMPK 抑制剂 Compound C 联合使用时,ICT 的心脏保护作用被抑制,导致心功能的进一步下降,且 NLRP3 炎症小体的激活得到了恢复,诱导细胞焦亡导致心肌损伤加重。上述结果证实了淫羊藿素能够激活 AMPK 信号通路,对 NLRP3 炎症小体进行调控,从而改善脓毒症心肌受损的观点。以上研究结果为 ICT 治疗脓毒症心肌病提供了潜在研究机制,但仍有一些局限性。首先,尽管本研究采用小鼠模型来验证,但应用在脓毒症临床病人身上,效果如何,还有待进一步考察。其次,不同剂量 ICT 的作用差异研究不够深入,未来可开展剂量梯度实验,明确最佳治疗剂量范围。今后的研究应聚焦于 ICT 的全身效应及其与其他治疗策略的联合应用,为临床治疗脓毒症提供更多的证据。

综上所述,本研究利用 LPS 成功制备出脓毒症心肌损伤模型,验证了淫羊藿素在脓毒症心肌损伤中的防护效果。同时,推测淫羊藿素有可能是通过刺激 AMPK/NLRP3 信号途径,以阻止焦亡引起的细胞死亡而起到效果。

参考文献:

- [1] LIU A B, LI S J, YU Y Y, et al. Current insight on the mechanisms of programmed cell death in sepsis - induced myocardial dysfunction[J]. Front Cell Dev Biol, 2023, 11: 1309719.
- [2] BOISSIER F, AISSAOUI N. Septic cardiomyopathy: diagnosis and management[J]. J Intensive Med, 2021, 2(1): 8-16.
- [3] ZHENG X T, CHEN W W, GONG F C, et al. The role and mechanism of pyroptosis and potential therapeutic targets in sepsis: a review[J]. Front Immunol, 2021, 12: 711939.
- [4] DUAN F Q, LI L, LIU S J, et al. Cortistatin protects against septic cardiomyopathy by inhibiting cardiomyocyte pyroptosis through the SSTR2 - AMPK - NLRP3 pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2024, 134: 112186.
- [5] HUONG N T, SON N T. Icaritin: a phytochemical with enormous pharmacological values[J]. Phytochemistry, 2023, 213: 113772.
- [6] ZHANG W, XING B, YANG L, et al. Icaritin attenuates myocardial ischemia and reperfusion injury via anti-inflammatory and anti-oxidative stress effects in rats[J]. Am J Chin Med, 2015, 43(6): 1083-1097.
- [7] 任璐, 王尊, 华清钟, 等. 淫羊藿素预防小鼠血管钙化[J]. 中南大学学报(医学版), 2019, 44(1): 35-39.
- [8] DAI S S, YE B Z, CHEN L W, et al. Emodin alleviates LPS - induced myocardial injury through inhibition of NLRP3 inflammasome activation[J]. Phytother Res, 2021, 35(9): 5203-5213.
- [9] BI C F, LIU J, YANG L S, et al. Research progress on the mechanism

- of sepsis induced myocardial injury [J]. J Inflamm Res, 2022, 15: 4275 – 4290.
- [10] CIESIELSKA A, MATYJEK M, KWIATKOWSKA K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS – induced pro – inflammatory signaling [J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(4): 1233 – 1261.
- [11] LIU H R, XU C Q, HU Q, et al. Sepsis – induced cardiomyopathy: understanding pathophysiology and clinical implications [J]. Arch Toxicol, 2025, 99(2): 467 – 480.
- [12] WU B, SONG H X, FAN M M, et al. Luteolin attenuates sepsis – induced myocardial injury by enhancing autophagy in mice [J]. Int J Mol Med, 2020, 45(5): 1477 – 1487.
- [13] QI Z, WANG R R, LIAO R H, et al. Neferine ameliorates sepsis – induced myocardial dysfunction through anti – apoptotic and antioxidative effects by regulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 706251.
- [14] 李豆豆, 倪琦, 林化. 中医药治疗脓毒症心肌病的研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2024, 22(7): 1270 – 1273.
- [15] GUO R, YAN Z P, WANG R, et al. Advances in pharmacological research on icaritin: a comprehensive review [J]. Am J Chin Med, 2025, 53(1): 179 – 203.
- [16] HE Y T, CUI J, XIAO B, et al. Atomized inhalation of Icaritin reduces airway inflammation and remodeling in asthmatic mice [J]. J Asthma, 2024, 61(9): 930 – 939.
- [17] YU Z N, SU G J, ZHANG L M, et al. Icaritin inhibits neuroinflammation in a rat cerebral ischemia model by regulating microglial polarization through the GPER – ERK – NF – κ B signaling pathway [J]. Mol Med, 2022, 28(1): 142.
- [18] FAN Y X, GUAN B Y, XU J X, et al. Role of toll – like receptor – mediated pyroptosis in sepsis – induced cardiomyopathy [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 167: 115493.
- [19] SU Z D Z, WEI X B, FU Y B, et al. Melatonin alleviates lipopolysaccharide – induced myocardial injury by inhibiting inflammation and pyroptosis in cardiomyocytes [J]. Ann Transl Med, 2021, 9(5): 413.
- [20] LI Q, ZHANG M M, ZHAO Y, et al. Irisin protects against LPS – stressed cardiac damage through inhibiting inflammation, apoptosis, and pyroptosis [J]. Shock, 2021, 56(6): 1009 – 1018.
- [21] YUMOTO T, COOPERSMITH C M. Targeting AMP – activated protein kinase in sepsis [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2024, 15: 1452993.
- [22] LIU B H, WANG Z, HE R Y, et al. Buformin alleviates sepsis – induced acute lung injury via inhibiting NLRP3 – mediated pyroptosis through an AMPK – dependent pathway [J]. Clin Sci (Lond), 2022, 136(4): 273 – 289.

Mechanism of Icaritin in Improving Myocardial Injury in Septic Mice via the AMPK/NLRP3 Pathway

SUN Fengxiao¹, WANG Qingyan¹, ZHANG Jing¹, DONG Bo²

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250013, China;

2. Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250021, China

Abstract Objective: To explore the intervention mechanism of icaritin (ICT) on myocardial injury in sepsis. Methods: Mice were divided into control group, model group, AMPK activator (MET) group, icaritin (ICT) group and icaritin + AMPK inhibitor compound C (ICT + CC) group, with 12 mice in each group. Except for the control group, the other mice were intraperitoneally injected with LPS. ICT group was intraperitoneally injected with ICT 30 minutes before modeling, and ICT + CC group was injected with AMPK inhibitor Compound C at the same time. After 24 hours of modeling, cardiac function, myocardial pathological changes, AMPK pathway and pyroptosis – related protein expression, serum inflammatory factors and myocardial injury markers were detected. Results: The intervention of ICT and AMPK activators significantly improved the survival rate of mice, increased cardiac LVEF and LVFS, and decreased LVIDD and LVIDS. Tissue damage was reduced and inflammatory cell infiltration was reduced. The levels of serum TNF – α , IL – 1 β , IL – 18, CK – MB and LDH were decreased. The ratio of p – AMPK/AMPK was increased, and the expression of NLRP3, ASC, Cleaved Caspase – 1, GSDMD – NT and Cleaved IL – 1 β was decreased ($P < 0.05$). Compound C could reverse the improvement effect of ICT on myocardial injury, increase inflammation index and pyroptosis protein expression ($P < 0.05$). Conclusion: ICT can improve myocardial injury and inflammatory response in sepsis mice, and its mechanism may be related to the activation of AMPK to inhibit pyroptosis mediated by NLRP3 signaling pathway.

Key words Icaritin; Sepsis; Myocardial injury; Pyroptosis; AMPK/NLRP3 pathway