基于TLR4介导的细胞焦亡通路研究红景天苷预防心肌纤维化的作用机制Δ

温方军[1,2*]，高　磊[3]，胡益敏[2,4]，石开虎[1,2#]（1.南京中医药大学附属中西医结合医院心胸外科，南京　210028；2.江苏省中医药研究院，南京　210028；3.南京中医药大学中医学院/中西医结合学院，南京　210046；4.南京中医药大学附属中西医结合医院普外科，南京　210028）

中图分类号　R285；R542.2+3　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）09-1053-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.09.06

摘　要　目的　探讨红景天苷对小鼠心肌纤维化和焦亡的影响及潜在的作用机制。**方法**　将小鼠随机分为对照组、模型组和红景天苷低、中、高剂量组，每组各10只。除对照组外，其余各组小鼠皮下注射异丙肾上腺素5 mg/（kg·d）造模。自造模之日起，红景天苷低、中、高剂量组小鼠每日灌胃红景天苷10、30、50 mg/kg，对照组和模型组小鼠每日灌胃生理盐水10 mL/kg，连续14 d。末次给药后处死小鼠，以苏木素-伊红染色法观察小鼠心肌组织病理变化并计算心肌细胞横径，Masson、Sirius Red染色法观察小鼠心肌组织纤维化程度并计算心肌胶原容积分数（CVF），实时荧光定量PCR法检测小鼠心肌组织中Ⅰ型胶原蛋白（Col Ⅰ）、α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）、Toll样受体4（TLR4）、NOD样受体蛋白3（NLRP3）、半胱氨酸蛋白酶1（caspase-1）、消皮素D（GSDMD）的mRNA表达水平，Western blot法和免疫组织化学法检测小鼠心肌组织中Col Ⅰ、α-SMA、TLR4、NLRP3、caspase-1、GSDMD的总蛋白表达水平及蛋白阳性细胞积分。**结果**　与对照组比较，模型组小鼠心肌细胞体积增大，心肌纤维排列紊乱，细胞基质明显增加，心肌组织中CVF显著升高，Col Ⅰ、α-SMA、TLR4、NLRP3、caspase-1、GSDMD的mRNA、总蛋白表达水平及蛋白阳性细胞积分均显著升高（$P<0.01$）。与模型组比较，红景天苷中、高剂量组小鼠心肌细胞形态较清晰，心肌纤维化程度较低，心肌组织中以上指标水平均不同程度逆转，尤其是红景天苷高剂量组逆转程度最显著（$P<0.05$或$P<0.01$）。此外，红景天苷低剂量组部分纤维化和焦亡相关指标也在一定程度上逆转。**结论**　红景天苷对心肌纤维化的发生、发展有明显的预防作用，其机制可能是通过抑制TLR4介导的心肌细胞焦亡通路激活。

关键词　红景天苷；心肌纤维化；焦亡；Toll样受体4；NOD样受体蛋白3

Mechanism of salidroside preventing myocardial fibrosis based on TLR4-mediated pyroptosis pathway

WEN Fangjun[1,2], GAO Lei[3], HU Yimin[2,4], SHI Kaihu[1,2]（1. Dept. of Cardio-Thoracic Surgery, Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 2. Jiangsu Province Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 3. College of Traditional Chinese Medicine/College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 4. Dept. of General Surgery, Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effects of salidroside (Sal) on myocardial fibrosis and pyroptosis and its potential mechanism. **METHODS** The mice were randomly divided into control group, model group and Sal low-dose, medium-dose and high-dose groups, with 10 mice in each group. Except for the control group, the mice in other groups were injected subcutaneously with isoproterenol 5 mg/(kg·d) to prepare the myocardial fibrosis model. Since modeling, mice in the Sal low-dose, medium-dose and high-dose groups were given 10, 30 and 50 mg/kg of Sal by intragastric administration every day; control group and model group were given 10 mL/kg of normal saline by intragastric administration every day, for 14 consecutive days. After the last medication, the mice were sacrificed; hematoxylin-eosin staining was used to observe pathological change of myocardial tissue and calculate the diameter of myocardial cell; Masson and Sirius Red staining were used to observe the degree of myocardial fibrosis in mice and calculate the collagen volume fraction (CVF); quantitative real-time PCR was performed to detect the mRNA expressions of collagen type Ⅰ (Col Ⅰ), α-smooth muscle actin (α-SMA), Toll-like receptor 4 (TLR4), NOD-like receptor pyrin domain containing 3 (NLRP3), caspase-1 and gasdermin D (GSDMD) in myocardial tissues. The total protein expressions of Col Ⅰ, α-SMA, TLR4, NLRP3,

Δ**基金项目**　江苏省基础研究计划（自然科学基金）资助项目（No. BK20191503）；江苏省中医药研究院青年科学研究项目（No. QNKXYJ202109）

＊**第一作者**　硕士研究生。研究方向：房颤心肌纤维化。E-mail：1392201546@qq.com

＃**通信作者**　教授，主任医师，博士生导师，博士。研究方向：房颤心肌纤维化。E-mail：jsszxyskh@163.com

caspase-1 and GSDMD in myocardial tissues and protein-positive cell score were measured by Western blot assay and immunohistochemistry. **RESULTS** Compared with control group, the myocardial cells in the model group were enlarged, the arrangement of myocardial fibers was disordered, the matrix metabolism was significantly increased, the CVF in myocardial tissue was significantly increased, and the mRNA and protein expression levels of Col Ⅰ, α-SMA, TLR4, NLRP3, caspase-1 and GSDMD were elevated and protein-positive cell score was increased significantly ($P<0.01$). Compared with model group, the myocardial cell morphology was clearer, myocardial fibrosis was alleviated, and the levels of the above indicators in myocardial tissue of Sal medium-dose and high-dose groups had been reversed to varying degrees, especially in Sal high-dose group ($P<0.05$ or $P<0.01$). In addition, the Sal low-dose group also reversed some fibrosis and pyroptosis-related indicators to some extent. **CONCLUSIONS** Sal can significantly prevent the occurrence and development of myocardial fibrosis, and the mechanism of action may be related to the inhibition of TLR4-mediated pyroptosis pathway in myocardial tissue.

KEYWORDS salidroside; myocardial fibrosis; pyroptosis; Toll-like receptor 4; NOD-like receptor pyrin domain containing 3

目前，心血管疾病仍是造成人类死亡的主要原因之一，2019年全球约有1 860万人因心血管疾病死亡[1]。大多数心血管疾病的病因涉及心肌的病理性重构，而心肌纤维化是导致心肌病理性重构的重要原因之一[2-4]。虽然当前心肌纤维化的病因尚未完全明确，但炎症反应在心肌纤维化的发生、发展中起着关键作用[5-6]。细胞焦亡是由病原体相关分子或损伤相关分子激活、半胱氨酸蛋白酶1（caspase-1）介导的一种细胞炎性死亡，主要以细胞肿胀、细胞膜破裂、NOD样受体蛋白3（NOD-like receptor pyrin domain containing 3，NLRP3）为代表的炎症小体激活，细胞内容物和炎症介质释放为特征[7]。细胞焦亡的发生不仅会引起局部炎症反应，还会加重炎症反应[7]。本课题组前期研究发现，心肌成纤维细胞焦亡可加重心肌组织的纤维化[8-9]，而Toll样受体4（Toll-like receptor 4，TLR4）作为NLRP3的上游调控因子，在焦亡的发生、炎症因子的释放中起着重要作用[10-11]，TLR4/NLRP3焦亡通路的激活可加剧心肌纤维化程度[12]。因此，通过抑制TLR4介导的细胞焦亡通路的激活可能起到抑制心肌纤维化的作用。

红景天苷是中药红景天的重要组成成分，目前被证实对纤维化的发生、发展有明显的抑制作用[13-14]。实验研究显示，在内毒素引起炎症诱导的抑郁模型和巨噬细胞RAW264.7模型中，红景天苷抑制了TLR4蛋白的表达及相关炎症因子的释放[15-16]；此外，TLR4介导的细胞焦亡通路活化与炎症和心肌纤维化密切相关[17]。但红景天苷是否能通过TLR4/NLRP3焦亡通路抑制心肌组织焦亡，进而改善心肌纤维化目前尚不清楚。本实验使用异丙肾上腺素建立小鼠心肌纤维化模型，并使用红景天苷进行干预，探索红景天苷对小鼠心肌纤维化和焦亡的影响及潜在的作用机制，以期为红景天苷预防心肌纤维化提供实验参考。

1 材料

1.1 实验动物

8周龄成年健康雄性SPF级C57BL/6小鼠50只，体质量（20±2）g，购自北京斯贝福生物技术有限公司，生产许可证号为SCXK（京）2019-0010。小鼠饲养于南京中医药大学附属中西医结合医院动物房，许可证号为SYXK（苏）2021-0025。饲养期间环境温度（24±1）℃，相对湿度55%±10%，小鼠自由进食、饮水。

1.2 主要仪器

Heraeus Megafuge 8R型高速离心机购自美国Thermo Fisher Scientific公司；MS203DU型电子天平购自瑞士Mettler-Toledo公司；Research Plus型微量移液器购自德国Eppendorf公司；Synergy H1型酶标仪、164-5051型双向电泳仪；7500型实时荧光定量PCR扩增仪、iBright CL750型Western blot显影仪均购自美国Applied Biosystems公司；IX73型显微镜购自日本Olympus公司。

1.3 主要药物与试剂

红景天苷（货号WZY1006，纯度98%）购自陕西万植源生物科技有限公司；异丙肾上腺素（isoprenaline hydrochloride，ISO，批号H50020020）购自西南药业股份有限公司；戊巴比妥钠（货号P3761）购自美国Sigma公司；苏木素染液、伊红染液（货号分别为PH0516、PH0516）均购自福州飞净生物科技有限公司；Masson染色试剂盒、Sirius Red染色试剂盒（货号分别为BP-DL022、BP-DL030）和5%牛血清白蛋白溶液（5%BSA，货号BL-081）均购自南京森贝伽生物科技有限公司；TRIzol试剂（货号15596026CN）购自美国Thermo Fisher Scientific公司；RNA逆转录试剂盒（货号RR047A）购自日本Takara公司；SYBR Tag探针试剂盒（货号QPK-201）购自日本Toyobo公司；小鼠Ⅰ型胶原蛋白（collagen type Ⅰ，Col Ⅰ）、α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）、TLR4、NLRP3、caspase-1、消皮素D（gasdermin D，GSDMD）、β-肌动蛋白（β-actin）的PCR引物均购自生工生物工程（上海）股份有限公司；兔源Col Ⅰ抗体（批号14695-1-AP）购自美国Proteintech公司；RIPA裂解液（批号P0013B）、BCA蛋白检测试剂盒（批号P0012）购自上海碧云天生

物技术有限公司；兔源α-SMA抗体、兔源TLR4抗体、兔源NLRP3抗体、兔源caspase-1抗体、兔源GSDMD抗体、辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的羊抗兔免疫球蛋白G（Ig G）二抗、HRP标记的羊抗小鼠IgG二抗（批号分别为#19245、#14358、#15101、#24232、#39754、#7074、#7076）均购自美国CST公司；兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）抗体（批号ab181602）购自美国Abcam公司；聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜购自美国Millipore公司；免疫组织化学试剂盒、DAB染色试剂盒（货号分别为SA1028、AR1022）均购自武汉博士德生物工程有限公司。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将50只雄性C57BL/6小鼠随机分为对照组、模型组和红景天苷低、中、高剂量组，每组各10只。除对照组外，其余各组小鼠皮下注射ISO 5 mg/（kg·d），连续注射14 d造模，所有小鼠均造模成功[18－20]。自造模之日起，红景天苷低、中、高剂量组小鼠每日灌胃红景天苷溶液10、30、50 mg/kg[21]，对照组和模型组小鼠每日灌胃生理盐水10 mL/kg，均连续灌胃14 d。

2.2 标本采集

末次给药后，小鼠禁食、禁水24 h，腹腔注射2.5%戊巴比妥钠45 mg/kg麻醉。打开小鼠胸腔，取出心脏，分离多余的血管和脂肪等组织后，将心脏切半，一半心肌组织置于4%多聚甲醛中固定保存备用，另一半置于冻存管中－80 ℃冻存备用。

2.3 小鼠心肌组织病理变化的观察

采用苏木素-伊红（HE）染色法。取出固定在4%多聚甲醛中的小鼠心肌组织，制成厚度约0.4 μm的石蜡切片，经烤片、脱水蜡化后进行HE染色、风干，在显微镜下观察并拍照。每个视野随机观察6个胞核居中的纵切面细胞，共随机观察20个视野。使用Image J软件测量心肌细胞横径，并计算平均值。

2.4 小鼠心肌组织纤维化程度的观察

采用Masson染色法检测小鼠心肌间质中的胶原沉积情况，并观察心肌细胞形态和排列的改变。取“2.3”项下石蜡切片，按照试剂盒说明书进行Masson染色，在显微镜下观察并拍照。每张切片随机选取5个不重复视野，采用Image J软件计算心肌胶原容积分数（collagen volume fraction，CVF），CVF（%）＝心肌胶原面积/所测视野面积×100%。

采用Sirius Red染色法进一步检测胶原纤维在小鼠心肌组织中的沉积情况。取“2.3”项下石蜡切片，经常规脱水蜡化、Sirius Red染色液滴染、蒸馏水清洗、苏木素染液染色、95%乙醇脱水、无水乙醇浸泡、二甲苯通透处理，最后用中性树胶封片，放通风橱风干后，在显微镜下观察并拍照。每张切片随机选取5个不重复视野，采用Image J软件计算CVF，计算方法同前。

2.5 心肌组织纤维化和焦亡相关指标mRNA表达的检测

采用实时荧光定量PCR法检测。每组小鼠中随机取5只小鼠的心肌组织（冻存于－80 ℃）作为实验样本，使用TRIzol试剂按照说明书步骤提取总RNA。使用逆转录试剂盒，根据说明书合成cDNA。使用SYBR Tag探针试剂盒进行PCR。PCR程序如下：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s，60 ℃退火延伸30～34 s，40个循环。用PCR基因扩增仪分析反应结果，以β-actin为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算每个心肌组织样本中Col Ⅰ、α-SMA、TLR4、NLRP3、caspase-1、GSDMD mRNA的表达水平。引物序列及产物长度见表1。

表1 PCR引物序列及产物长度

基因	引物序列（5′→3′）	产物长度/bp
Col I	上游引物：TGAACGTGGTGTACAAGGTC	20
	下游引物：CCATCTTTACCAGGAGAACCAT	22
α-SMA	上游引物：GCGTGGCTATTCCTTCGTGACTAC	24
	下游引物：CGTCAGGCAGTTCGTAGCTCTTC	23
TLR4	上游引物：GCCATCATTATGAGTGCCAATT	22
	下游引物：AGGGATAAGAACGCTGAGAATT	22
NLRP3	上游引物：GCCGTCTACGTCTTCTTCCTTTCC	24
	下游引物：CATCCGCAGCCAGTGAACAGAG	22
caspase-1	上游引物：AGAGGATTTCTTAACGGATGCA	22
	下游引物：TCACAAGACCAGGCATATTCTT	22
GSDMD	上游引物：CTAGCTAAGGCTCTGGAGACAA	22
	下游引物：GATTCTTTTCATCCCAGCAGTC	22
β-actin	上游引物：CTACCTCATGAAGATCCTGACC	22
	下游引物：CACAGCTTCTCTTTGATGTCAC	22

2.6 心肌组织纤维化和焦亡相关指标蛋白表达及定位情况的检测

采用Western blot法检测小鼠心肌组织中Col Ⅰ、α-SMA、TLR4、NLRP3、caspase-1、GSDMD总蛋白表达水平。取“2.5”项下每组同一批5只小鼠的心肌组织（冻存于－80 ℃）作为实验样本，放入配制好的RIPA缓冲液中裂解，裂解完成后高速离心，吸取上清液，根据BCA蛋白检测试剂盒说明书测定蛋白浓度，按照2 μg/μL的蛋白浓度配制上样体系。制备5%浓缩胶+10%分离胶，将样品按10 μL/孔上样。参照抗体说明书进行电泳、转膜、封闭、孵育相应一抗（Col Ⅰ、α-SMA、TLR4、NLRP3、caspase-1、GSDMD的稀释度均为1∶1 000，GAPDH的稀释度为1∶10 000，抗体稀释液为5%BSA）和二抗（稀释度均为1∶1 000），通过ECL显影液显影，使用Image J软件对蛋白条带进行量化处理，以目的蛋白与GAPDH（内参）条带灰度值的比值表示目的蛋白的总蛋白表达水平。

采用免疫组织化学法检测纤维化和焦亡相关蛋白在小鼠心肌组织中的定位情况。取“2.5”项下每组同一批5只小鼠的心肌组织作为实验样本，经固定、切片、脱蜡、脱水处理后，用过氧化氢于37 ℃孵育30 min，以5% BSA于37 ℃恒温封闭1 h，向每个组织切片滴加50 μL配制好的一抗（Col Ⅰ、α-SMA、TLR4、NLRP3、caspase-1、GSDMD的稀释度分别为1∶300、1∶300、1∶50、1∶200、1∶200、1∶50），4 ℃孵育过夜，次日向各切片加入50 μL二

抗，37 ℃孵育 30 min。二抗孵育完成后向各切片加入 50 μL SABC 放大剂，37 ℃条件下加热 20 min，以 DAB 显色、苏木素复染，脱水、透明、封片后在显微镜下观察，目的蛋白在胞质中呈棕褐色。每张切片随机选取 5 个放大倍数为 100 倍的视野拍照，并用 Image J 软件分析蛋白阳性细胞积分[22]，软件自带计算结果。表达相关目的蛋白的细胞染色后会出现棕褐色颗粒，棕褐色程度越深说明该细胞表达某目的蛋白水平越高。

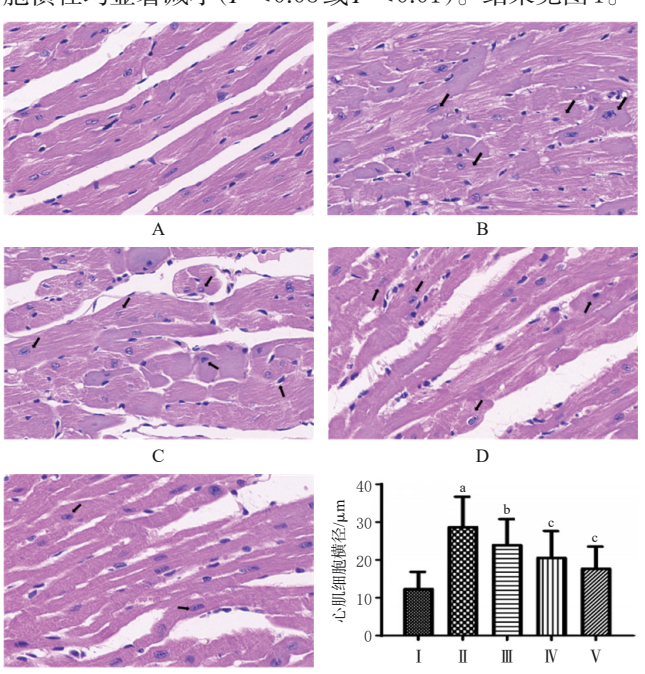
2.7 统计学分析

使用 SPSS 24.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间比较采用方差分析，进一步两两比较采用 LSD-t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 红景天苷对小鼠心肌组织病理变化的影响

HE 染色结果显示，与对照组比较，模型组小鼠心肌细胞间出现明显的炎性细胞浸润，心肌细胞体积明显增大，心肌纤维紊乱，细胞基质明显增加。与模型组比较，红景天苷中、高剂量组小鼠的炎性细胞浸润、心肌纤维紊乱、心肌细胞肥大、细胞基质增加程度均得到一定改善，红景天苷高剂量组效果更加明显。与对照组比较，模型组小鼠心肌组织中的心肌细胞横径显著增加（$P<0.01$）；与模型组比较，红景天苷各剂量组小鼠的心肌细胞横径均显著减小（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。结果见图 1。

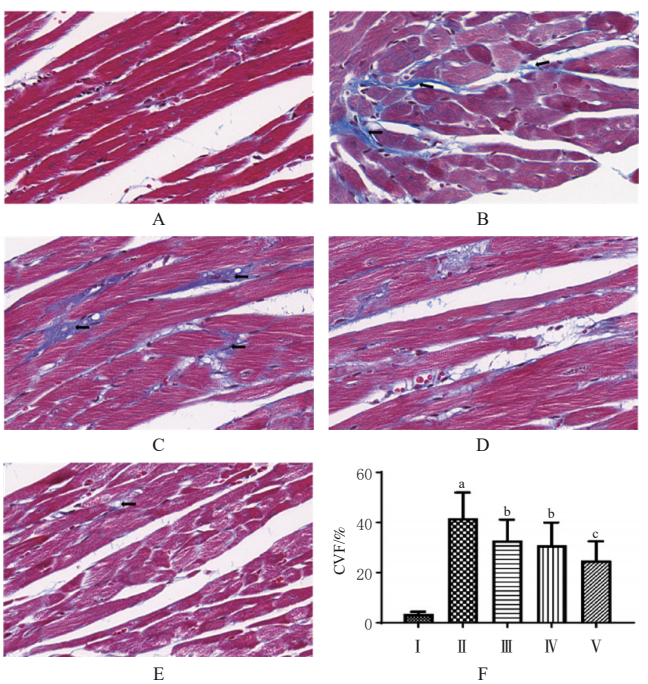


A～E：依次为对照组、模型组、红景天苷低剂量组、红景天苷中剂量组、红景天苷高剂量组显微图，箭头所指区域显示心肌细胞肥大、心肌纤维结构紊乱；F：心肌细胞横径柱状图；Ⅰ：对照组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：红景天苷低剂量组；Ⅳ：红景天苷中剂量组；Ⅴ：红景天苷高剂量组；a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$

图 1 各组小鼠心肌组织病理形态学观察显微图（HE 染色，×100）及心肌细胞横径柱状图（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

3.2 红景天苷对小鼠心肌组织纤维化程度的影响

Masson 染色结合 Sirius Red 染色结果显示，对照组小鼠心肌细胞形态正常，细胞排列规则，胶原纤维沉积程度较低。与对照组比较，模型组小鼠心肌间质中大量胶原沉积，心肌细胞形态不规则、排列紊乱，2 种染色方法得出的心肌组织中 CVF 均显著升高（$P<0.01$）。与模型组比较，红景天苷各剂量组小鼠心肌间质中胶原沉积程度减轻，心肌细胞排列较为规则，形态有所恢复，2 种染色方法得出的心肌组织中 CVF 均显著降低（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。结果见图 2。

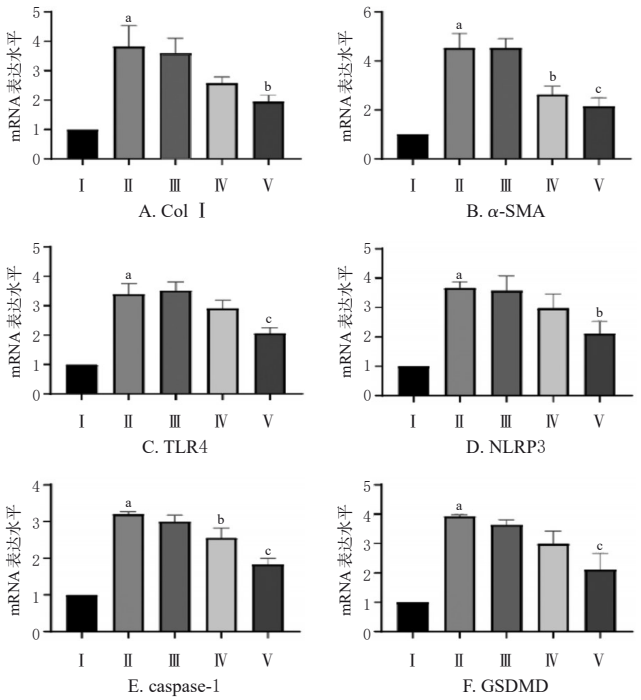


A～E：依次为对照组、模型组、红景天苷低剂量组、红景天苷中剂量组、红景天苷高剂量组显微图，箭头所指区域显示心肌胶原纤维堆积；F：CVF 柱状图；Ⅰ：对照组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：红景天苷低剂量组；Ⅳ：红景天苷中剂量组；Ⅴ：红景天苷高剂量组；a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$

图 2 各组小鼠心肌组织纤维化 Masson 染色显微图（×100）及 CVF 柱状图（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

3.3 红景天苷对小鼠心肌组织纤维化和焦亡相关指标 mRNA 表达的影响

与对照组比较，模型组小鼠心肌组织中 Col Ⅰ、α-SMA、TLR4、NLRP3、caspase-1、GSDMD 的 mRNA 表达水平均显著升高（$P<0.01$）。与模型组比较，红景天苷高剂量组小鼠心肌纤维化相关指标 Col Ⅰ、α-SMA 的 mRNA 表达水平和焦亡相关指标 TLR4、NLRP3、caspase-1、GSDMD 的 mRNA 表达水平均显著降低（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）；红景天苷中剂量组小鼠 α-SMA、caspase-1 的 mRNA 表达水平也显著降低（$P<0.05$）。结果见图 3。



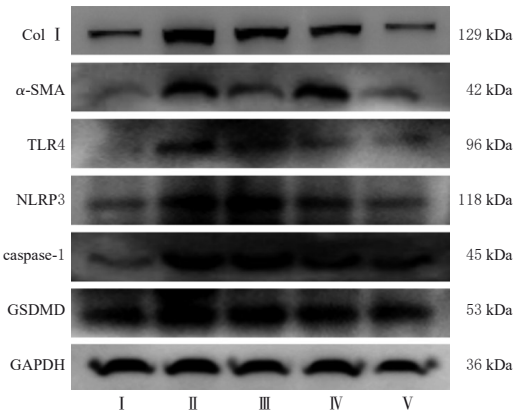
Ⅰ：对照组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：红景天苷低剂量组；Ⅳ：红景天苷中剂量组；Ⅴ：红景天苷高剂量组；a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$

图3　各组小鼠心肌组织纤维化和焦亡相关指标mRNA表达水平的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

3.4　红景天苷对小鼠心肌组织纤维化和焦亡相关指标蛋白表达及定位的影响

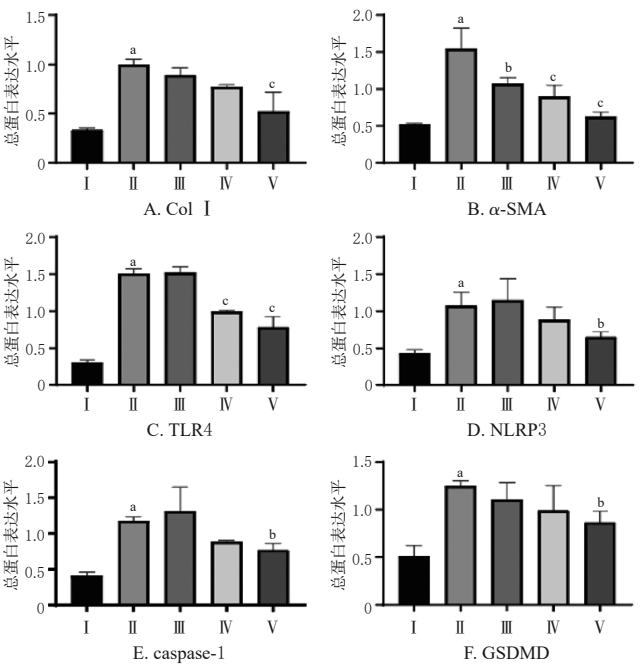
Western blot结果显示，与对照组比较，模型组小鼠心肌组织中Col Ⅰ、α-SMA、TLR4、NLRP3、caspase-1、GSDMD的总蛋白表达水平均显著升高（$P<0.01$）。与模型组比较，红景天苷高剂量组小鼠心肌组织中Col Ⅰ、α-SMA、TLR4、NLRP3、caspase-1、GSDMD的总蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）；红景天苷低剂量组小鼠心肌组织中α-SMA和红景天苷中剂量组小鼠心肌组织中α-SMA、TLR4的总蛋白表达水平也显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图4、图5。

免疫组织化学结果显示，与对照组比较，模型组小鼠心肌细胞胞质中纤维化和焦亡相关蛋白的表达明显增加，心肌组织中Col Ⅰ、α-SMA、TLR4、NLRP3、caspase-1、GSDMD的蛋白阳性细胞积分均显著升高（$P<0.01$）。与模型组比较，红景天苷高剂量组小鼠心肌细胞胞质中纤维化和焦亡相关蛋白的表达明显降低，心肌组织中Col Ⅰ、α-SMA、TLR4、NLRP3、caspase-1、GSDMD的蛋白阳性细胞积分均显著降低（$P<0.01$）；红景天苷低剂量组小鼠心肌组织中Col Ⅰ、α-SMA、TLR4和红景天苷中剂量组小鼠心肌组织中Col Ⅰ、α-SMA、TLR4、caspase-1、GSDMD的蛋白阳性细胞积分也显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图6、图7。



Ⅰ：对照组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：红景天苷低剂量组；Ⅳ：红景天苷中剂量组；Ⅴ：红景天苷高剂量组

图4　各组小鼠心肌组织纤维化和焦亡相关指标蛋白表达电泳图



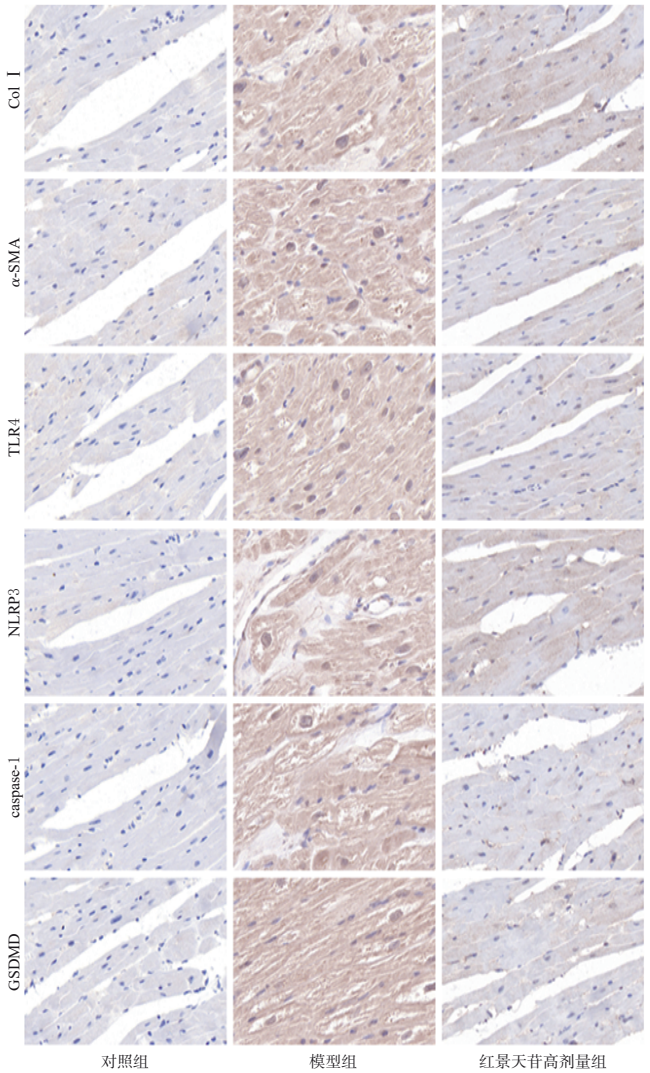
Ⅰ：对照组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：红景天苷低剂量组；Ⅳ：红景天苷中剂量组；Ⅴ：红景天苷高剂量组；a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$

图5　各组小鼠心肌组织纤维化和焦亡相关指标总蛋白表达水平的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

4　讨论

心肌纤维化是众多心脏疾病的病理表现，表现为心肌细胞的病理性重构和纤维化瘢痕的产生，导致心肌僵硬程度增加、心肌顺应性和射血分数降低，出现多种心脏功能障碍，如高血压性心肌肥厚、心肌病、心肌梗死等，甚至死亡[23]。因此，探讨心肌纤维化的发病机制及改善心肌纤维化是目前的重要研究方向。

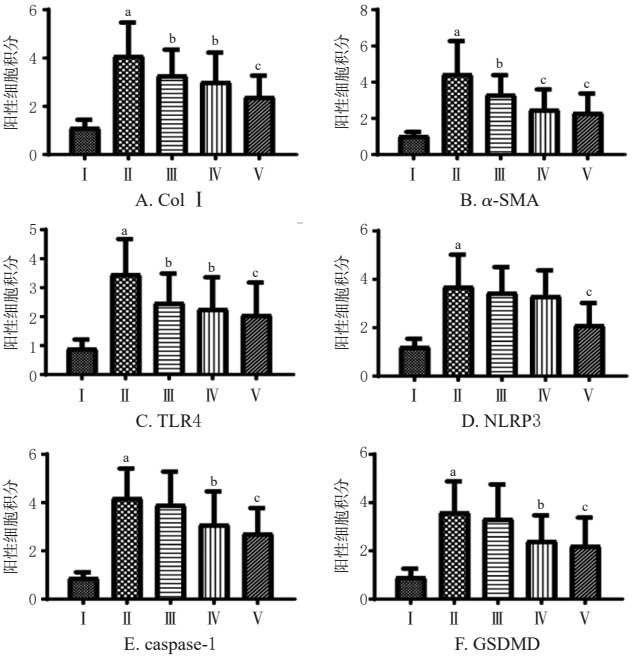
α-SMA和Col Ⅰ是心肌纤维化发生、发展过程中的重要标志物[24—25]。细胞焦亡是一种依赖caspase和GSDMs



注：棕褐色程度越深，代表蛋白表达水平越高；红景天苷低、中剂量组图略

图6　各组小鼠心肌组织纤维化和焦亡相关指标蛋白的定位情况和表达水平的比较（DAB染色，×100）

蛋白家族并伴有大量促炎性因子释放的程序性细胞死亡方式。细胞焦亡所产生的NLRP3炎症小体是一种可维持成纤维细胞促纤维化表型、促进胶原蛋白沉积的胞质蛋白复合物，同时还可使休眠的caspase-1酶原被水解切割成活跃的caspase-1[26—27]。caspase-1作为一种半胱氨酸蛋白酶可切割GSDMD，切割后产生的GSDMD蛋白氮端水解片段可促进焦亡的发生[28—29]。TLR4是一种在细胞表面表达的Ⅰ型跨膜蛋白，可识别不同的病原体相关分子模式。在小鼠巨噬细胞焦亡模型中，TLR4可通过调控NLRP3的表达来抑制焦亡的发生[17]。同时也有研究提示，抑制TLR4/NLRP3通路可缓解心肌缺血/再灌注损伤引起的焦亡[30]。本实验采用ISO诱导建立小鼠心肌纤维化模型，通过HE、Masson、Sirius Red染色进行病理学观察，结果表明，与对照组比较，模型组小鼠表现出明显的心肌纤维化，心肌细胞体积增大，心肌纤维排列紊乱，细胞基质明显增加，心肌组织中CVF显著升高；



Ⅰ：对照组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：红景天苷低剂量组；Ⅳ：红景天苷中剂量组；Ⅴ：红景天苷高剂量组；a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$

图7　各组小鼠心肌组织纤维化和焦亡相关指标蛋白阳性细胞积分柱状图（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

与此同时，模型组小鼠心肌组织中Col Ⅰ、α-SMA、TLR4、NLRP3、caspase-1、GSDMD蛋白的表达水平均显著高于对照组，其mRNA表达水平也有同样的趋势。这提示心肌组织纤维化和心肌组织的焦亡发生有一定关联。

中医药治疗心肌纤维化是目前临床重要的补充方法，红景天苷作为中药红景天的重要成分，已被证实能够治疗心脏疾病和纤维化疾病[13—14]，但红景天苷对心肌纤维化及TLR4介导的焦亡通路激活的研究报道甚少。本实验中，与模型组比较，经红景天苷治疗的小鼠心肌纤维化程度明显减轻，心肌细胞外基质减少，心肌细胞排列较为规则；红景天苷中、高剂量组小鼠心肌组织中纤维化和焦亡相关指标（Col Ⅰ、α-SMA、TLR4、NLRP3、caspase-1、GSDMD）的mRNA表达水平、总蛋白表达水平、蛋白阳性细胞积分均不同程度降低，且均以高剂量组下降程度最为显著。此外，红景天苷低剂量组部分纤维化和焦亡相关指标也在一定程度上逆转。以上结果提示红景天苷可抑制TLR4介导的焦亡通路活化引起的心肌纤维化。

综上所述，红景天苷对心肌纤维化的发生、发展有明显的预防作用，其机制可能是通过抑制TLR4介导的心肌细胞焦亡通路激活，但其在心肌组织中对TLR4的具体作用机制尚不清楚，有待进一步研究。

参考文献

[1] ROTH G A, MENSAH G A, JOHNSON C O, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990—2019: update from the GBD 2019 study[J]. J Am

Coll Cardiol，2020，76(25)：2982-3021.
[2] BAUDINO T A，CARVER W，GILES W，et al. Cardiac fibroblasts：friend or foe?[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol，2006，291(3)：H1015-H1026.
[3] PORTER K E，TURNER N A. Cardiac fibroblasts：at the heart of myocardial remodeling[J]. Pharmacol Ther，2009，123(2)：255-278.
[4] HILL J A，OLSON E N. Cardiac plasticity[J]. N Engl J Med，2008，358(13)：1370-1380.
[5] MANN D L. Stress-activated cytokines and the heart：from adaptation to maladaptation[J]. Annu Rev Physiol，2003，65：81-101.
[6] BROWN R D，AMBLER S K，MITCHELL M D，et al. The cardiac fibroblast：therapeutic target in myocardial remodeling and failure[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol，2005，45：657-687.
[7] WANG Q，WU J F，ZENG Y C，et al. Pyroptosis：a pro-inflammatory type of cell death in cardiovascular disease[J]. Clin Chim Acta，2020，510：62-72.
[8] SHI P，ZHAO X D，SHI K H，et al. MiR-21-3p triggers cardiac fibroblasts pyroptosis in diabetic cardiac fibrosis via inhibiting androgen receptor[J]. Exp Cell Res，2021，399(2)：112464.
[9] SHE Q，SHI P，XU S S，et al. DNMT1 methylation of lncRNA GAS5 leads to cardiac fibroblast pyroptosis via affecting NLRP3 axis[J]. Inflammation，2020，43(3)：1065-1076.
[10] ZAMYATINA A，HEINE H. Lipopolysaccharide recognition in the crossroads of TLR4 and caspase-4/11 mediated inflammatory pathways[J]. Front Immunol，2020，11：585146.
[11] TRUONG R，THANKAM F G，AGRAWAL D K. Immunological mechanisms underlying sterile inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis：potential sites for intervention[J]. Expert Rev Clin Immunol，2021，17(1)：37-50.
[12] CÁCERES F T，GASPARI T A，SAMUEL C S，et al. Serelaxin inhibits the profibrotic TGF-β1/IL-1β axis by targeting TLR-4 and the NLRP3 inflammasome in cardiac myofibroblasts[J]. FASEB J，2019，33(12)：14717-14733.
[13] 王文聪，谢春毅. 红景天苷对糖尿病心肌病MAPK信号通路作用机制[J]. 世界中西医结合杂志，2016，11(10)：1365-1368，1404.
[14] 刘行仁，白义凤，梁良，等. 红景天苷下调组织蛋白酶B和NF-κB p65水平改善大鼠肺纤维化[J]. 中南大学学报(医学版)，2017，42(2)：128-133.
[15] 莫菁莲，陈思丹，符乃光，等. 红景天苷介导TLR4调控小胶质细胞激活对小鼠抑郁样行为的改善作用[J]. 药物评价研究，2021，44(9)：1869-1875.
[16] 李鑫. 隐丹参酮和红景天苷抑制内毒素引起的炎症反应[D]. 延吉：延边大学，2011.
[17] WANG L，PENG Y F，SONG L J，et al. Colchicine-containing nanoparticles attenuates acute myocardial infarction injury by inhibiting inflammation[J]. Cardiovasc Drugs Ther，2022，36(6)：1075-1089.
[18] CAITLIN M. Differential expression of embryonic epicardial progenitor markers and localization of cardiac fibrosis in adult ischemic injury and hypertensive heart disease[J]. J Mol Cell Cardiol，2013，65：108-119.
[19] YANG H X，SUN J H，YAO T T，et al. Bellidifolin ameliorates isoprenaline-induced myocardial fibrosis by regulating TGF-β1/Smads and p38 signaling and preventing NR4A1 cytoplasmic localization[J]. Front Pharmacol，2021，12：644886.
[20] LI X H，TENG Y，TIAN M，et al. Enhancement of lncRNA-HFRL expression induces cardiomyocyte inflammation，proliferation，and fibrosis via the sequestering of miR-149-5p-mediated collagen 22A inhibition[J]. Ann Transl Med，2022，10(9)：523.
[21] 杜丽. 红景天苷对模拟高海拔缺氧条件下心肌自噬相关通路AMPK的影响[D]. 兰州：甘肃中医药大学，2020.
[22] 李姗姗，田春雨，张国伟，等. 芍药苷对2型糖尿病模型大鼠心肌损伤的改善作用及机制研究[J]. 中国药房，2021，32(23)：2846-2853.
[23] WANG J Y，CHEN P W，CAO Q Y，et al. Traditional Chinese medicine ginseng Dingzhi Decoction ameliorates myocardial fibrosis and high glucose-induced cardiomyocyte injury by regulating intestinal flora and mitochondrial dysfunction[J]. Oxid Med Cell Longev，2022，2022：9205908.
[24] DAVIS J，MOLKENTIN J D. Myofibroblasts：trust your heart and let fate decide[J]. J Mol Cell Cardiol，2014，70：9-18.
[25] WORKE L J，BARTHOLD J E，SEELBINDER B，et al. Densification of type Ⅰ collagen matrices as a model for cardiac fibrosis[J]. Adv Healthc Mater，2017，6(22)：1-33.
[26] ARTLETT C M. The role of the NLRP3 inflammasome in fibrosis[J]. Open Rheumatol J，2012，6：80-86.
[27] HE Y，HARA H，NÚÑEZ G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation[J]. Trends Biochem Sci，2016，41(12)：1012-1021.
[28] HE W T，WAN H Q，HU L C，et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1β secretion[J]. Cell Res，2015，25(12)：1285-1298.
[29] SHI J J，ZHAO Y，WANG K，et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death[J]. Nature，2015，526(7575)：660-665.
[30] CHEN X D，LIN S，DAI S S，et al. Trimetazidine affects pyroptosis by targeting GSDMD in myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Inflamm Res，2022，71(2)：227-241.

（收稿日期：2022-10-31　修回日期：2022-12-20）
（编辑：舒安琴）