承 德 医 学 院 学 报
JOURNAL OF CHENGDE MEDICAL UNIVERSITY
Vol.42 No.4 2025

基础医学

泽泻调控细胞焦亡通路改善大鼠心肌纤维化机制

邹 润[1],宋 贺[2],杨 岚[1],崔海鹏[1],翟玉建[1*],赵 娟[1*]
(1.承德医学院基础医学院,河北承德 067000;2.承德医学院附属医院消化内科,河北承德 067000)

摘要: **目的** 以细胞焦亡通路为切入点,探究泽泻对盐酸异丙肾上腺素(ISO)所致SD大鼠心肌纤维化(MF)治疗作用及机制。**方法** 按照随机原则将大鼠分为对照(NC)组、模型(MF)组、卡托普利(CAP)组、泽泻低剂量(RAL)组、泽泻高剂量(RAH)组(每组8只),采用ISO构建MF模型。检测血清中CK-MB、α-HBDH和LDH水平;HE染色和Masson染色观察大鼠心脏组织形态变化;Western blot法检测心脏组织中α-SMA、NLRP3、Caspase-1、GSDMD蛋白的表达水平。激光共聚焦观察大鼠心脏组织中Collagen Ⅰ蛋白表达。**结果** 经ISO诱导后,大鼠发生了显著的MF,主要表现为心脏的胶原纤维沉积且组织中细胞焦亡相关蛋白NLRP3、Caspase-1和GSDMD显著升高;经泽泻干预后,血清CK-MB、α-HBDH和LDH水平降低,心脏损伤及胶原沉积减轻,NLRP3、Caspase-1和GSDMD蛋白表达显著降低。**结论** 泽泻可有效缓解ISO所致的MF,其机制可能与细胞焦亡密切相关。

关键词: 泽泻;心肌纤维化;细胞焦亡
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-6879(2025)04-0271-05

Rhizoma Alismatis Improves Myocardial Fibrosis in Rats via Modulation of Cell Pyroptosis Pathways

ZOU Run[1], SONG He[2], YANG Lan[1], CUI Hai-peng[1], ZHAI Yu-jian[1*], ZHAO Juan[1*]
(1.School of Basic Medical Sciences, Chengde Medical University, Chengde, Hebei, 067000, China; 2. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde, Hebei, 067000, China)

Abstract: **Objective** This study investigated the therapeutic efficacy of Rhizoma Alisma in isoproterenol(ISO)-induced myocardial fibrosis(MF) in SD rats, with a mechanistic focus on modulation of the pyroptotic pathway. **Methods** Rats were randomly allocated into five groups (n=8 per group): control(NC) group, MF group, Captopril(CAP) group, low-dose Rhizoma Alisma(RAL) group, and high-dose Rhizoma Alisma(RAH) group. MF was induced via ISO administration. Serum levels of CK-MB, α-HBDH, and LDH were quantified. Cardiac tissue morphology was assessed using HE and Masson staining. Western blot analysis determined the expression levels of α-SMA, NLRP3, Caspase-1, and GSDMD proteins, while laser confocal microscopy visualized Collagen I deposition in myocardial tissue. **Results** ISO induction triggered severe MF in rats, evidenced by histopathological collagen deposition and elevated NLRP3, Caspase-1, and GSDMD expression. Rhizoma Alisma treatment reduced serum levels of CK-MB, α-HBDH, and LDH, ameliorated tissue damage, downregulated collagen deposition, and significantly suppressed the expression of NLRP3, Caspase-1, and GSDMD. **Conclusion** Rhizoma Alisma demonstrates significant efficacy in attenuating ISO-induced MF, potentially through modulation of cell pyroptosis.

Key words: Rhizoma Alisma; Myocardial fibrosis; Cell pyroptosis

心肌纤维化(Myocardial fibrosis,MF)是指心脏基质内胶原纤维大量聚集致使心肌僵硬和功能下降的病理

资助项目:河北省自然科学基金中医药联合基金重点项目(H2023406017);河北省教育厅高校重点学科建设项目(冀教高[2013]4号);承德医学院学科建设经费
*通讯作者

过程，严重影响患者的生命健康[1]。传统中医药在治疗心脏疾病方面具有悠久的历史，认为多与“心气不足”、“心血瘀阻”、“心阳不振”等病理状态有关，治疗上通过调理气血、平衡阴阳以改善功能。而《神农本草经》将泽泻列为上品，其记载泽泻能“养五脏，益气力”[2]。且现代医学研究发现[3-8]，泽泻对肺、肝、肾脏等多器官纤维化具有改善作用。本课题组前期研究已验证，泽泻汤加味方可缓解肾小球系膜细胞纤维化进程[9-10]。细胞焦亡是由Gasdermin家族蛋白GSDMD介导的程序性细胞死亡过程[11]，甚至可导致过度的炎症损伤，进而形成炎性小体。研究表明[12]，炎症小体可参与不良心肌重构诱导心力衰竭的发生。由此说明，泽泻可在防治MF进程中发挥着重要作用，但其机制可能与细胞焦亡密切相关。因此，本研究以细胞焦亡为切入点，探究泽泻在MF进程中的作用，以期为传统中药在疾病防治提供新的视角和数据支撑。

1 材料与方法

1.1 动物及模型制备

4周龄雄性SPF级SD大鼠40只（180~200 g），购自北京华阜康生物技术有限公司，实验动物许可证号：SCXK（京）2019-0008。适应性饲养1周，自由摄取饲料及饮水后，随机分为对照（NC）组、模型（MF）组、卡托普利（CAP）组、泽泻水煎剂低、高浓度组，每组8只。按照人-动物体表面积比等效剂量转换原则[13]，CAP组经灌胃给予卡托普利混悬液10 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$；RAL组和RAH组经灌胃分别给予泽泻5、9 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$；NC组和MF组给予等量生理盐水，连续预防性给药14 d。除NC组外，其余各组采用ISO按10 $mg\cdot kg^{-1}$体重，分5点一次皮下注射，复制MF大鼠模型，并继续给药14 d，禁食不禁水24 h后将大鼠处死并取材（病理固定和分子生物学检测各半）。动物实验中各项操作均符合3R原则以遵循实验动物福利伦理，本研究获得承德医学院动物伦理委员会批准（伦理审查编号：CDMULAC-20230301-005）。

1.2 药物和试剂

药物：盐酸异丙肾上腺素购于瑞威尔生物技术有限公司；卡托普利购于河北永丰制药有限公司；泽泻购于北京同仁堂承德中医医院（经煎煮制备至625 $g\cdot L^{-1}$水煎剂）。

试剂：RIPA组织/细胞蛋白裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、Masson三色染色试剂盒、DAPI溶液，购于北京索莱宝科技有限公司；ECL化学发光试剂盒购于白鲨生物科技有限公司；Collagen Ⅰ鼠单克隆抗体购于武汉三鹰生物科技有限公司；兔抗大鼠Caspase-1、NLRP3、α-Smooth Muscle Actin、GSDMD、HRP标记山羊抗兔（或鼠）二抗购于爱博泰克生物科技有限公司；兔抗大鼠GADPH购于赛维尔生物科技有限公司；荧光二抗FITC购于KPL公司。

1.3 血清学检测

经腹主动脉取血，室温放置30 min，以1 500g离心10 min取上清并送检（金域检验）；检测CK-MB、α-HBDH和LDH的含量。

1.4 心肌病理学形态

心脏组织经生理盐水清洗、4 %多聚甲醛固定后，经水洗、脱水、透明、浸蜡、包埋后制备成5 μm石蜡切片；经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后，进行HE染色和Masson染色（严格按照说明书操作）。

1.5 Western blot法检测大鼠心脏胶原和焦亡相关蛋白表达

RIPA裂解液提取心脏组织总蛋白并进行定量。60 μg蛋白于SDS-PAGE 分离并转膜，脱脂奶粉封闭后，加入Collagen Ⅰ（1∶1 000）、α-SMA（1∶1 000）、NLRP3（1∶1 000）、GSDMD（1∶1 000）和GAPDH（1∶5 000），4℃孵育过夜；次日洗膜后，加入HRP标记山羊抗兔（鼠）Ⅱ抗（1∶5 000）孵育，特超敏ECL化学发光试剂盒显影。各目的蛋白与GAPDH的条带灰度值的比值为各蛋白的相对表达水平。

1.6 免疫荧光法检测大鼠心脏Collagen Ⅰ蛋白表达

石蜡切片水化后经抗原修复并滴加10 %山羊血清封闭30 min，Collagen Ⅰ（1∶200）一抗4℃孵育过夜，复温后孵育荧光二抗FITC（1∶1 000），室温避光后DAPI染核，抗荧光淬灭封片，激光共聚焦显微镜下观察并采集图像。

1.7 统计学方法

用SPSS 21.0统计软件进行分析。数据均采用均数±标准差表示，组间比较采用独立样本t检验，多组间比较采用单因素方差分析。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠血清学指标变化

大鼠经ISO诱导后，血清中CK-MB、α-HBDH和LDH水平升高（$P<0.05$），经泽泻水煎剂干预后，CK-MB、α-HBDH和LDH水平降低（$P<0.05$），优于CAP组，见表1。

表1 各组大鼠血清中CK-MB、α-HBDH和LDH水平

（$\bar{\chi}\pm s$，mmol·L^{-1}）

组别	CK-MB	α-HBDH	LDH
NC组	1679.33±500.55	401.1±112.47	1290.67±370.35
MF组	1906.67±215.74[a]	557.5±57.84[a]	2029±219.12[a]
CAP组	1311±190.84[b]	373.27±36.28[b]	1325±140.98[b]
RAL组	927.67±249.0[bc]	256.13±150.98[bc]	898.67±487.29[bc]
RAH组	688±114.81[bc]	167.23±52.36[bc]	569.67±170.35[bc]

与NC组比较，[a]P<0.05；与MF组比较，[b]P<0.05；与CAP组比较，[c]P<0.05

2.2 大鼠心脏病理变化

组织形态学观察显示，NC组大鼠心肌细胞排列规整，大小和形态正常，细胞核呈椭圆形，位于细胞中央，胶原分布均匀且较少。经ISO诱导后，MF组较NC组相比，心肌细胞排列紊乱，心肌细胞肥大，胶原充斥于间质且表达明显增多，心脏病理评分和胶原表达面积均显著升高（P<0.05）。经泽泻水煎剂干预后，与MF组相比，心肌组织病理损伤有效改善，胶原表达减少，心脏病理评分和胶原表达面积均显著降低（P<0.05），其效果接近于CAP组，见图1。

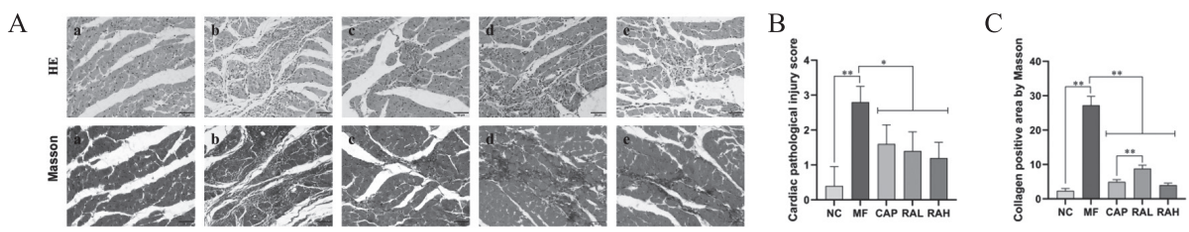

图1 大鼠心脏组织HE和Masson染色

A. HE和Masson染色结果；a：NC组；b：MF组；c：CAP组；d：RAL组；e：RAH组；B. 心脏病理损伤评分；C. 胶原阳性表达面积（Bar，50 μm）；$^{**}P$<0.01

2.3 各组大鼠心肌组织α-SMA蛋白和Collagen Ⅰ免疫定位

结果显示，经ISO诱导后，MF组心脏Collagen Ⅰ在细胞间质中阳性颗粒增多（红色），组织中α-SMA蛋白表达升高（P<0.01）；经泽泻水煎剂干预后，Collagen Ⅰ阳性颗粒减少，蛋白表达显著降低（P<0.01），其效果接近于CAP组。见图2。

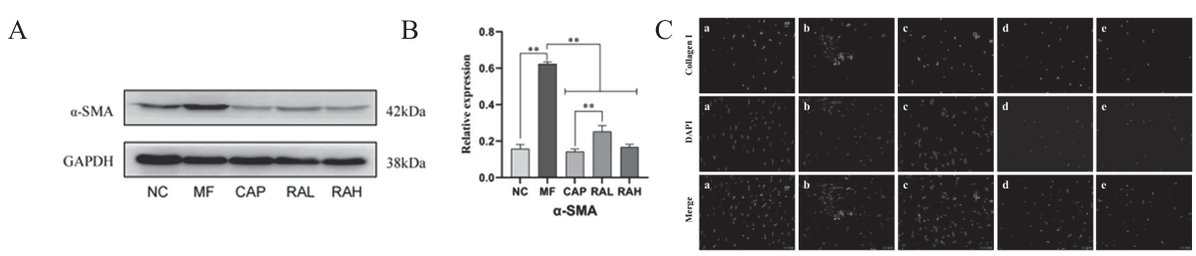

图2 大鼠心脏α-SMA蛋白Collagen Ⅰ免疫荧光定位

A. α-SMA蛋白条带；B. α-SMA表达水平；C. Collagen Ⅰ免疫荧光定位（Bar，50 μm）；a：NC组；b：MF组；c：CAP组；d：RAL组；e：RAH组；$^{**}P$<0.01

2.4 各组大鼠心脏中细胞焦亡相关蛋白表达

结果显示，经ISO诱导后，MF组大鼠心脏中NLRP3、Caspase-1、GSDMD蛋白表达显著升高（P<0.01）；经水煎剂干预后，心脏组织中NLRP3、Caspase-1和GSDMD蛋白表达显著降低（P<0.05），见图3。

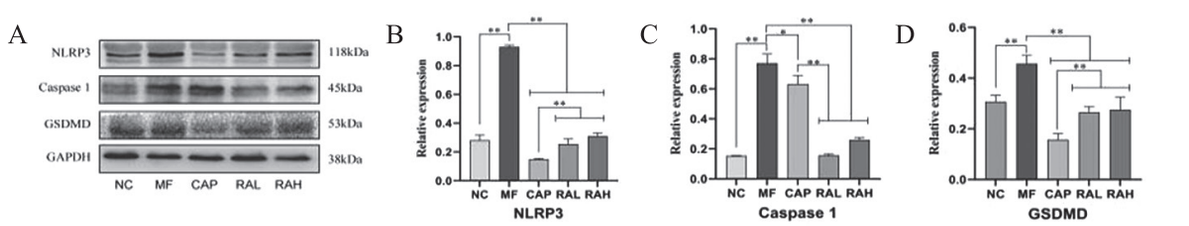

图3 大鼠心脏组织细胞焦亡相关蛋白表达

A. 蛋白条带；B. NLRP3蛋白表达水平；C. Caspase-1蛋白表达水平；D. GSDMD蛋白表达水平；$^{**}P$<0.01

3 讨论

MF尚未有明确对应中医病名，根据其具备胸闷、胸痛、心慌等临床症状，可将其归于“心悸”、“怔忡”、“胸痹心痛”等心系病证范畴[14]。MF是心肌的细胞外基质的胶原过度沉积所造成的，中医临床认为是气血运行不畅、瘀血阻滞的表现。因此，采用传统中医药可通过调和体内阴阳平衡，保证人体多器官的协调，维持人体健康，或可达到防治MF的目的。

研究发现[15-16]，心肌细胞损伤可表达α-SMA并分泌Collagen Ⅰ，促进MF进展。本研究验证了经ISO诱导后，α-SMA和Collagen Ⅰ表达显著增加，其变化与血清中CK-MB、α-HBDH和LDH水平及NLRP3、Caspase-1、GSDMD蛋白表达升高趋势相一致。由此表明，MF的进展可能与细胞焦亡相关。

现代医学研究发现[17]，泽泻具有利尿、降血脂血糖、抗氧化损伤、抗炎等生物学作用。泽泻等药物组成扶阳强心方具有扶阳益气、利水消肿的药效，主要用于治疗心阳亏虚证[18]。同时，泽泻作为成方的主要成分可有效缓解肺、肝、肾等器官纤维化进程[3-8]。本研究结果显示，经泽泻水煎剂干预后，大鼠血清中CK-MB、α-HBDH和LDH水平下调，病理损伤有效缓解，但其机制仍需进一步探究。

多种研究证实[19]，细胞焦亡在MF中发挥关键作用，其为炎症小体介导的一种新形式的程序性细胞死亡[20]，其中，NLRP3炎症小体被证明在心肌病、动脉粥样硬化等多种疾病中发挥重要作用[21-22]。本研究亦证实了MF组大鼠心脏中NLRP3炎症小体表达显著增多，与他人研究结果一致[23-24]。NLRP3炎症小体通过激活Caspase-1切割GSDMD产生GSDMD-N端，使细胞膜发生破裂，从而进一步促进细胞焦亡的发生，并且诱发炎症[25-26]。本研究结果亦证实，MF组大鼠心脏NLRP3/Caspase-1/GSDMD通路相关的蛋白表达增加，而经泽泻水煎剂干预后，通路相关的蛋白表达下降，其趋势与组织形态、胶原表达和血清指标相一致。由此说明，细胞焦亡参与了MF进展过程。本研究推断泽泻可通过减缓细胞焦亡进程抑制心脏组织间质胶原沉积，从而发挥防治MF的作用。

综上所述，泽泻能够减少心肌胶原沉积以显著改善ISO诱导的MF，其机制可能与抑制NLRP3/Caspase-1/GSDMD细胞焦亡通路相关，但其具体分子作用机制仍需进一步探究。

参考文献

[1] 霍雨佳，阳远舟，邹成丽，等. 汉黄芩素调节Hippo/YAP信号通路对慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2024，22(15)：2740-2745.

[2] 郑振涛，袁红霞.《神农本草经》与经方应用之泽泻篇[J]. 山东中医药大学学报，2024，48(4)：428-433.

[3] 刘本佼. 猪苓、泽泻及其合用对肺纤维化大鼠肺组织TGF-β_1、TNF-α影响的实验研究[D]. 济南：山东中医药大学，2013.

[4] 江雯，叶晨，胡熳，等. 基于网络药理学和分子对接探讨泽泻三萜抗肝纤维化的作用机制[J]. 中草药，2022，53(4)：1100-1111.

[5] 陆孝良. 泽泻汤通过Nrf2通路抗氧化应激干预NASH肝纤维化的机制研究[D]. 上海：上海中医药大学，2020.

[6] 吴小溪，陆孝良，蒋元烨，等. 泽泻汤通过抗氧化应激干预NASH肝纤维化的机制研究[J]. 时珍国医国药，2022，33(1)：39-43.

[7] 陈华. 泽泻抗肾纤维化的物质基础及其作用机制研究[D]. 西安：西北大学，2019.

[8] 张瑞芳，许艳芳，万建新，等. 泽泻对单侧输尿管梗阻大鼠肾组织补体C_3及肾纤维化的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志，2012，13(8)：672-674，755-756.

[9] 崔海鹏，刘玉玲，刘凯，等. 泽泻汤加味方对盐敏感性HBZY21细胞中AngⅡ-NADPH-ROS信号通路的影响[J]. 湖南中医药大学学报，2019，39(3)：331-336.

[10] 刘凯，赵娟，刘玉玲，等. 泽泻汤加味方通过AT1R通路抑制高盐和AngⅡ诱导HBZY-1中NOX4表达的研究[J]. 湖南中医药大学学报，2019，39(5)：590-595.

[11] 董娜，邵峰. 细胞焦亡的机制和功能[J]. 中国科学：生命科学，2019，49(12)：1606-1634.

[12] 马明仁，陈俏梅，蔡晓庆，等. NLRP3炎症小体抑制剂在心血管疾病应用中的研究进展[J]. 心脏杂志，2023，35(1)：88-93，98.

[13] Song M, Mihara K, Chen Y, et al. Mitochondrial fission and fusion factors reciprocally orchestrate mitophagic culling in mouse hearts and cultured fibroblasts[J]. Cell Metab, 2015, 21(2): 273-286.

[14] 阚晨静. 基于细胞焦亡NLRP3/Caspase-1通路探究人参皂苷Rg1对心肌纤维化的作用机制[D]. 南京：南京中医药大学，2022.

[15] Hinderer S, Schenke-Layland K. Cardiac fibrosis–a short review of causes and therapeutic strategies[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2019, 146: 77-82.
[16] Jellis C, Martin J, Narula J, et al. Assessment of nonischemic myocardial fibrosis[J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 56(2): 89-97.
[17] 刘珊珊，郭杰，李宗艾，等. 泽泻化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志，2020，45(7)：1578-1595.
[18] 黎军宏，莫雪妮，郑景辉，等. 扶阳强心方通过调节ERK1/2信号通路改善CHF血流动力参数[J]. 中华中医药学刊，2018，36(3)：599-602.
[19] 徐盛松. DNMT3A甲基化介导LncRNA NEAT1调控心肌成纤维细胞焦亡在房颤心肌纤维化中的作用机制以及人参皂苷Rg1干预研究[D]. 南京：南京中医药大学，2022.
[20] 张蒙，王新东. 黄芪丹参配伍调控ASIC1a/CaMKⅡδ信号抑制酸性微环境中心肌细胞焦亡[J]. 南京中医药大学学报，2023，39(2)：138-145.
[21] 刘旋，赵福森，徐启耀，等. 基于管周脂肪炎性微环境的黄芩汤调控NEK7-NLRP3/IL-1β保护肥胖高血压大鼠血管内皮功能研究[J]. 南京中医药大学学报，2024，40(9)：896-905.
[22] 葛凡，王文恺，朱景天，等. 黄芪甲苷通过NLRP3炎性小体调节糖尿病动脉粥样硬化早期大鼠血脂及炎症因子的研究[J]. 南京中医药大学学报，2021，37(3)：383-387.
[23] 闫景顺，朱林平，张红霞，等. 中医药调控心肌纤维化相关信号通路研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2024，30(13)：230-239.
[24] Artlett CM. The role of the NLRP3 inflammasome in fibrosis[J]. Open Rheumatol J, 2012, (6): 80.
[25] He W, Wan H, Hu L, et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1β secretion[J]. Cell Res, 2015, 25(12): 1285-1298.
[26] Shi J, Zhao Y, Wang K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death[J]. Nature, 2015, 526(7575): 660-665.

（收稿日期：2024-07-18）

RRM2在非小细胞肺癌中生物学行为的研究

黎传奎，杨逸凡，李其才，汪国文，陶　涛，李理响
（蚌埠医科大学第一附属医院胸外科，安徽蚌埠　233000）

摘要：目的 探讨核糖核苷酸还原酶调节亚基M2(RRM2)在非小细胞肺癌(NSCLC)中的表达和生物学行为。**方法** 从癌症基因组图谱(TCGA)数据库中获取NSCLC患者的基因表达数据和临床数据，分析RRM2基因在正常组织和NSCLC组织中的表达，利用NSCLC患者的临床数据绘制生存曲线；实时荧光定量PCR(qPCR)检测RRM2基因在细胞系中的表达情况以及验证RRM2基因在细胞系中的沉默和过表达效率；蛋白质免疫印迹法检测RRM2基因在细胞系中的蛋白表达，以及验证其在细胞系中沉默和过表达效率；Cell Counting Kit-8(CCK-8)、流式细胞术和Transwell实验检测细胞的增值、凋亡、侵袭和迁移能力。**结果** RRM2在肺鳞状细胞癌(LUSC)和肺腺癌(LUAD)患者组织中比在正常组织中显著升高($P<0.05$)；K-M曲线结果显示，在肺癌中RRM2高表达患者较低表达患者的总生存期显著降低($P<0.001$)；人支气管上皮细胞(HBE1)RRM2表达水平显著低于NSCLC的CALU3和H1299细胞系的表达水平($P<0.05$)；与对照组和si-NC组相比，si-RRM2-1组培养48 h和72 h后OD450值、凋亡率和增值迁移能力下降($P<0.05$)；与对照组和pc-NC组相比，pc-RRM2-2组培养48 h和72 h后OD450值和增值迁移能力增加($P<0.05$)。**结论** 沉默RRM2可以抑制NSCLC细胞的过表达效率、增殖活性、迁移和侵袭的能力。反之，过表达RRM2可以增强NSCLC细胞的过表达效率、增殖活性、迁移和侵袭的能力。

关键词：非小细胞肺癌；RRM2；生物学行为
中图分类号：R34　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1004-6879(2025)04-0275-07

资助项目：蚌埠医学院自然科学重点项目(2022byzd031)