

本文引用: 陈洁, 尹凯敏, 何玲, 袁国强. 通心络胶囊通过 GRP78/XBP1/CHOP 途径调控内质网应激减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(3): 454–463.

通心络胶囊通过 GRP78/XBP1/CHOP 途径调控内质网应激减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用研究

陈洁, 尹凯敏, 何玲, 袁国强*

河北以岭医院心血管病科, 河北 石家庄 050091

[摘要] **目的** 基于葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)/X 盒结合蛋白 1(XBP1)/C/EBP 同源蛋白(CHOP)途径,探究通心络胶囊(TXL)通过调控内质网应激(ERS)减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤(MI/RI)的作用机制。**方法** 将 48 只雄性 SD 大鼠随机均分为 6 组:假手术(Sham)组、MI/RI 组、阳性对照组[MI/RI+阿托伐他汀(ATV), 7.2 mg/kg]、ERS 抑制剂组[MI/RI+4-苯基丁酸(4-PBA), 500 mg/kg]、TXL 组(MI/RI+TXL, 1 g/kg)、靶向 GRP78 抑制剂组(MI/RI+TXL, 1 g/kg+HA15, 15 mg/kg)。各组大鼠于造模前连续灌胃给药 7 d, 末次给药后 1 h 造模。采用左前降支冠状动脉结扎法建立 MI/RI 模型(缺血 50 min, 再灌注 4 h)。再灌注后, 采用超声心动图检测左室射血分数(LVEF)和左心室缩短分数(LVFS); 采用全自动生化分析仪配合相应试剂盒检测血清心肌酶谱[天冬氨酸转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)]; 采用 ELISA 检测血清炎症因子[白细胞介素(IL)-1 β 、IL-18]; 采用比色法检测血清氧化应激指标[谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)]; 采用 HE 染色观察心肌组织病理改变; 采用 Masson 染色检测心肌胶原沉积, 计算胶原体积分数(CVF); 采用透射电镜观察内质网超微结构; 采用免疫组织化学染色检测胶原蛋白 I、III 表达; 采用 Western blot 检测 GRP78/XBP1/CHOP 通路蛋白表达。**结果** 与 Sham 组比较, MI/RI 组 LVEF、LVFS 降低($P<0.01$); 血清 AST、LDH、CK、CK-MB、IL-1 β 、IL-18、MDA 升高($P<0.01$), T-SOD、GSH 降低($P<0.01$); 心肌纤维排列紊乱伴大量炎症细胞浸润; CVF 及胶原蛋白 I、III 表达升高($P<0.01$); 内质网扩张、肿胀; GRP78、CHOP 蛋白表达升高($P<0.01$), XBP1 蛋白表达降低($P<0.01$)。与 MI/RI 组比较, MI/RI+ATV 组、MI/RI+4-PBA 组、MI/RI+TXL 组、MI/RI+TXL+HA15 组 LVEF、LVFS 升高($P<0.01$); 血清 AST、LDH、CK、CK-MB、IL-1 β 、IL-18、MDA 降低($P<0.01$), T-SOD、GSH 升高($P<0.01$); 心肌纤维排列紊乱和炎症浸润均改善; CVF 及胶原蛋白 I、III 表达降低($P<0.01$); 内质网超微结构损伤减轻; GRP78、CHOP 蛋白表达降低($P<0.01$), XBP1 蛋白表达升高($P<0.01$)。与 MI/RI+TXL 组比较, MI/RI+TXL+HA15 组 LVEF、LVFS 升高($P<0.01$); 血清 AST、LDH、CK、CK-MB、IL-1 β 、IL-18、MDA 降低($P<0.05$), T-SOD、GSH 升高($P<0.05$); CVF 及胶原蛋白 I、III 表达降低($P<0.05$); GRP78、CHOP 蛋白表达降低($P<0.05$), XBP1 蛋白表达升高($P<0.05$)。**结论** TXL 可通过调控 ERS 减轻大鼠 MI/RI, 且可能与 GRP78/XBP1/CHOP 途径有关。

[关键词] 心肌缺血再灌注损伤; 通心络胶囊; 葡萄糖调节蛋白 78; X 盒结合蛋白 1; C/EBP 同源蛋白; 内质网应激

[中图分类号] R285

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.03.004

Effects of Tongxinluo Capsule on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats by modulating ERS through the GRP78/XBP1/CHOP pathway

CHEN Jie, YIN Kaimin, HE Ling, YUAN Guoqiang*

Department of Cardiovascular Diseases, Hebei Yiling Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050091, China

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of action of Tongxinluo Capsule (TXL) in alleviating myocardial

[收稿日期] 2025-10-29

[基金项目] 河北省医学科学研究课题计划(20251537)。

[通信作者] * 袁国强, 男, 博士, 主任中医师, E-mail: m13223401927@163.com。

ischemia-reperfusion injury (MI/RI) in rats by regulating endoplasmic reticulum stress (ERS) via the glucose-regulated protein 78 (GRP78)/X-box binding protein 1 (XBP1)/C/EBP homologous protein (CHOP) pathway. **Methods** Forty-eight male SD rats were randomly divided into six groups: Sham operation (Sham) group, MI/RI group, positive control group [MI/RI+Atorvastatin (ATV), 7.2 mg/kg], ERS inhibitor group [MI/RI+4-phenylbutyric acid (4-PBA), 500 mg/kg], TXL group (MI/RI+TXL, 1 g/kg), and targeted GRP78 inhibitor group (MI/RI+TXL, 1 g/kg+HA15, 15 mg/kg). Rats in each group received continuous intragastric administration for 7 days before modeling, with modeling performed 1 hour after the last dose. The MI/RI model was established by left anterior descending coronary artery ligation (50 minutes of ischemia followed by 4 hours of reperfusion). After reperfusion, left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular fractional shortening (LVFS) were measured using echocardiography. Serum myocardial enzyme profiles [aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), and creatine kinase myocardial band (CK-MB)] were tested using an automatic biochemical analyzer with corresponding kits. Serum inflammatory cytokines [interleukin (IL)-1 β and IL-18] were measured by ELISA. Serum oxidative stress indicators [glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), and total superoxide dismutase (T-SOD)] were determined using colorimetric assays. Myocardial tissue pathological changes were observed by HE staining. Myocardial collagen deposition was tested by Masson staining, and the collagen volume fraction (CVF) was calculated. Endoplasmic reticulum ultrastructure was observed by transmission electron microscopy. Collagen types I and III expressions were determined by immunohistochemical staining. GRP78/XBP1/CHOP pathway protein expression was measured by Western blot. **Results** Compared with the Sham group, the MI/RI group showed decreased LVEF and LVFS ($P<0.01$); increased serum AST, LDH, CK, CK-MB, IL-1 β , IL-18, and MDA ($P<0.01$); decreased T-SOD and GSH ($P<0.01$); disordered myocardial fibers with extensive inflammatory cell infiltration; increased CVF and collagen I/III expressions ($P<0.01$); dilated and swollen endoplasmic reticulum; increased protein expressions of GRP78 and CHOP ($P<0.01$); and decreased protein expression of XBP1 ($P<0.01$). Compared with the MI/RI group, the MI/RI+ATV group, MI/RI+4-PBA group, and MI/RI+TXL group showed increased LVEF and LVFS ($P<0.01$); decreased serum AST, LDH, CK, CK-MB, IL-1 β , IL-18, and MDA ($P<0.01$); increased T-SOD and GSH ($P<0.01$); improved myocardial fiber arrangement disorder and inflammatory infiltration; decreased CVF and collagen I/III expressions ($P<0.01$); alleviated endoplasmic reticulum ultrastructural damage; decreased protein expressions of GRP78 and CHOP ($P<0.01$); and increased XBP1 protein expression ($P<0.01$). Compared with the MI/RI+TXL group, the MI/RI+TXL+HA15 group showed increased LVEF and LVFS ($P<0.01$); decreased serum AST, LDH, CK, CK-MB, IL-1 β , IL-18, and MDA ($P<0.05$); increased T-SOD and GSH ($P<0.05$); decreased CVF and collagen I/III expressions ($P<0.05$); decreased protein expressions of GRP78 and CHOP ($P<0.05$); and increased XBP1 protein expression ($P<0.05$). **Conclusion** TXL can alleviate MI/RI in rats by regulating ERS, and this effect may be related to the GRP78/XBP1/CHOP pathway.

[**Keywords**] myocardial ischemia-reperfusion injury; Tongxinluo Capsule; glucose-regulating protein 78; X-box-binding protein 1; C/EBP homologous protein; endoplasmic reticulum stress

再灌注治疗是当前急性心肌梗死患者的核心治疗手段,但该过程可能引发心肌功能障碍及细胞坏死,此现象被称为心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MI/RI)。MI/RI的病理机制是一个多因素参与的过程,涉及氧化应激、炎症反应、钙超载、线粒体功能障碍以及内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)等多种生物学过程^[1]。据报道,在再灌注全程采取有效措施预防MI/RI的发生,对改善患者心功能及预后具有重要意义^[1-2]。因此,深入探讨MI/RI的分子机制并寻找有效干预策略,具有重要临床意义。

内质网是细胞内负责蛋白质合成、折叠、修饰及钙稳态维持的关键细胞器,ERS作为细胞应对内外环境变化的重要应激反应,在MI/RI中被异常激活^[3]。

葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulating protein 78, GRP78)、X盒结合蛋白1(X-box-binding protein 1, XBP1)和C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)是ERS通路的核心分子:GRP78作为ERS的应激感应蛋白,在应激状态下与未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)激活下游信号;XBP1通过调控UPR相关基因表达,促进细胞适应应激;而CHOP则主要介导凋亡信号,过度激活可诱导心肌细胞凋亡。已有研究报道,GRP78/PERK/CHOP信号通路参与了缺血再灌注神经细胞损伤的保护过程^[4]。研究表明,ERS的过度激活可促进心肌细胞凋亡,加重MI/RI^[3]。因此,GRP78/XBP1/CHOP信号通路在ERS中扮演核心角色,靶向调控ERS通路成为干预MI/RI的潜在方向。

通心络胶囊(Tongxinluo capsule, TXL)作为一种中药复方制剂,由人参、水蛭、全蝎、土鳖虫、蜈蚣、蝉蜕、赤芍、冰片等组成,具有活血化瘀、通络止痛的功效,已广泛应用于冠心病、心绞痛、心肌梗死等心血管疾病的临床治疗^[5-7]。其安全性较高,临床中常在标准治疗的基础上联用 TXL,以进一步改善血清学和心功能指标,缓解炎症反应及心肌缺血状态,增强治疗效果^[8-10]。既往研究表明, TXL 可减轻 MI/RI、改善心功能^[11],但其是否通过调控 ERS 及其具体分子机制尚不明确。

因此,本研究基于 GRP78/XBP1/CHOP 信号通路,探讨 TXL 是否通过调控 ERS 减轻 MI/RI,旨在为 TXL 的心脏保护作用提供新的理论依据,并为临床防治 MI/RI 提供潜在的药物干预策略。

1 材料与方法

1.1 试验动物

48 只雄性 SD 大鼠,6~8 周龄,体质量(220±20) g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2021-0011。饲养于在 SPF 级屏障环境中,湿度 50%~60%,室温(22±1) °C,12 h/12 h 明暗间断照明,自由饮水和摄食。本研究动物实验符合河北以岭医院伦理要求,伦理审批号:2023 [L]0237。

1.2 主要药品、试剂

TXL(批号:T230515,石家庄以岭药业股份有限公司);阿托伐他汀(atorvastatin, ATV)(批号:H20051408,辉瑞制药有限公司);特异性靶向 GRP78 抑制剂 HA15(批号:HY-123332,美国 Med Chem Express 公司);ERS 抑制剂 4-苯基丁酸(4-phenylbutyric acid, 4-PBA)(批号:P21005,美国 Sigma-Aldrich 公司);天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶(creatine kinase, CK)、肌酸激酶心肌带(creatine kinase myocardial band, CK-MB)测定试剂盒(批号:20231015、20231022、20231018、20231025,南京建成生物工程研究所);白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-18 的 ELISA 试剂盒(批号:E-EL-R0012、E-EL-R0567,武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司);谷胱甘肽(glutathione, GSH)检测试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒、总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)检测试剂盒、

蛋白酶抑制剂混合物、磷酸酶抑制剂混合物(批号:S0053、S0131、S0101、P1005、P1081,上海碧云天生物技术研究所公司);HE 染色试剂盒、Masson 染色试剂盒(批号:G1120、G1340,北京索莱塔科技有限公司);RIPA 裂解缓冲液、BCA 试剂盒(批号:CW2333S、CW0014S,康为世纪生物科技股份有限公司);胶原蛋白 I、胶原蛋白 III(批号:ab34710、ab7778,美国 Abcam 公司);XBP1(批号:40435,美国 Cell Signaling Technology 公司);CHOP、GRP78(批号:15204-1-AP、11587-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司);甘油醛 3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphodehydrogenase, GAPDH)(批号:A19056,艾科瑞生物工程有限公司)。

1.3 主要仪器

超高分辨率小动物超声成像系统(型号:Vevo 1100,加拿大 VisualSonics 公司);全自动生化分析仪、透射电子显微镜(型号:Hitachi 7080、HT7800,日立高新技术公司);多功能酶标仪(型号:Spectra-Max M5,美国 Molecular Devices 公司);石蜡切片机、光学显微镜及成像系统(型号:RM2235、DM4000B,德国 Leica Microsystems 公司);垂直电泳槽及转印系统(型号:Mini-PROTEAN Tetra,美国 Bio-Rad Laboratories 公司);化学发光成像仪(型号:Tanon 5200 Multi,上海天能科技有限公司)。

1.4 MI/RI 造模

除假手术组(Sham 组)外,其余各组均采用左前降支冠状动脉结扎法建立大鼠 MI/RI 模型^[12]。大鼠经 2%异氟醚吸入麻醉后行气管插管,连接小动物呼吸机(潮气量 2.5 mL/100 g,呼吸频率 80 次/min)。于左侧第 3~4 肋间开胸,暴露心脏,于左心耳下缘 2 mm 处穿线(6-0 丝线),置一小段聚乙烯管于血管上方,结扎左前降支冠状动脉。缺血持续 50 min 后,剪开结扎线实现再灌注,再灌注 4 h 后处死取材。Sham 组开胸后仅穿线不结扎,其余操作同模型组。造模成功标准为同时满足以下两个条件:肉眼观察结扎区域心肌颜色变苍白;再灌注后血清心肌酶(CK-MB、LDH)水平显著高于 Sham 组。

1.5 分组与干预

48 只 SD 大鼠随机分为 6 组,分别为 Sham 组、MI/RI 组、阳性对照组(MI/RI+ATV 组)、ERS 抑制剂组(MI/RI+4-PBA 组)、TXL 组(MI/RI+TXL 组)、靶向 GRP78 抑制剂组(MI/RI+TXL+HA15 组),每组 8 只。

所有药物干预均在造模前连续给药 7 d,末次给药后 1 h 进行 MI/RI 造模,具体给药方式及剂量如下。MI/RI+TXL 组:灌胃 TXL 混悬液,1 g/kg,该剂量通过参考相关文献^[12-14]设置;MI/RI+4-PBA 组:腹腔注射 4-PBA 溶液,500 mg/kg^[15];MI/RI+ATV 组:灌胃 ATV 混悬液,7.2 mg/kg^[12];MI/RI+TXL+HA15 组:灌胃 TXL(1 g/kg)联合灌胃 HA15 混悬液(15 mg/kg)^[16];Sham 组与 MI/RI 组:灌胃等体积生理盐水。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 超声心动图检测 再灌注 4 h 后,大鼠以 2% 异氟醚麻醉,使用 Vevo 1100 超高分辨率小动物超声成像系统进行 M 型超声心动图检测,并测量核心心功能指标左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)和左心室缩短分数(left ventricular fractional shortening, LVFS)。

1.6.2 血清 AST、LDH、CK、CK-MB 水平检测 大鼠予以腹腔注射 40 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉,立即行腹主动脉采血,在 4 ℃ 下 3000 r/min 离心 15 min(离心半径 10 cm)分离血清,并在 -80 ℃ 下冻存待测。采用全自动生化分析仪按试剂盒说明检测各组血清 AST、LDH、CK、CK-MB 水平。

1.6.3 血清炎症和氧化应激指标水平检测 采用 ELISA 检测各组大鼠血清 IL-1 β 、IL-18 水平。采用比色法分析 GSH、MDA 含量及 T-SOD 活性。实验均按照试剂盒的说明进行。

1.6.4 心肌组织 HE 染色观察形态学改变 处死大鼠后迅速开胸取出心脏,用预冷生理盐水冲洗残留血液,沿房室环剔除心房及右心室,保留左心室心肌组织,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h。固定后,组织经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋。将石蜡块连续切片,厚度 4 μ m,贴附于防脱载玻片上。切片常规脱蜡至水后,按照 HE 染色试剂盒说明书进行染色。光学显微镜下观察心肌纤维结构、排列及炎症细胞浸润情况,每张切片随机选取 5 个视野采集图像。

1.6.5 心肌组织 Masson 染色检测胶原沉积 取左心室心肌组织,固定、脱水、透明、石蜡包埋步骤同 1.6.4。石蜡连续切片,厚度 4 μ m,贴片后常规脱蜡至水。按照 Masson 染色试剂盒说明书进行染色。光学显微镜下观察胶原纤维(蓝色)沉积情况,每张切

片随机选取 5 个视野,使用 ImageJ 软件计算胶原体积分数(collagen volume fraction, CVF)。CVF=胶原面积/视野总面积 $\times$ 100%。

1.6.6 免疫组织化学染色检测胶原蛋白 I、III 表达

石蜡包埋块制备及切片方法同 1.6.4,取 4 μ m 厚切片脱蜡水化后,浸入过氧化氢溶液 10 min 以去除内源性过氧化氢酶。蒸馏水洗涤 2 次,将切片浸入柠檬酸钠溶液,并在微波炉中加热进行抗原修复。PBS 冲洗 3 次后,用 10% 正常山羊血清封闭切片 20 min。将切片在一抗溶液[胶原蛋白 I (1:100)、胶原蛋白 III (1:200)]中于 4 ℃ 下孵育过夜,加入对应二抗后室温孵育 30 min。最后,将切片与二氨基联苯胺一起孵育 30 s,用苏木精复染 2 min,脱水、封片,于显微镜下获取图像。

1.6.7 透射电镜观察心肌组织内质网超微结构 将大鼠心脏样本用预冷 PBS 快速冲洗,切成小块(约 3 mm $\times$ 3 mm),浸入含 2% 甲醛和 2.5% 戊二醛的 0.1 mol/L 二甲酸钠缓冲液(pH 7.4)中,室温固定 3 h 后,转移至 4 ℃ 静置过夜。经脱水、浸透、环氧树脂包埋聚合完成后,制备超薄切片,经 3% 醋酸铀和 2.7% 柠檬酸铅双重染色,使用透射电镜进行观察分析心肌组织内质网超微结构。

1.6.8 Western blot 检测心肌组织中 GRP78、XBP1、CHOP 蛋白表达 将心肌组织均质化处理后,加入含有蛋白酶抑制剂混合物和磷酸酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解缓冲液中裂解,在 4 ℃ 下以 12 000 r/min 离心 30 min(离心半径 8 cm),取上清液,使用试剂盒测定总蛋白浓度。加入 SDS-PAGE 上样缓冲液,沸水浴 10 min 使蛋白质变性。使用适当浓度的 SDS-PAGE 分离蛋白质,电转印到硝酸纤维素膜(100 V, 300 mA)上,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,分别与一抗[GRP78 (1:2 000)、XBP1 (1:1 000)、CHOP (1:2 000)、GAPDH (1:1 000)]在 4 ℃ 下孵育过夜。TBST 洗膜 3 次(每次 10 min),然后与二抗室温孵育 1.5 h。孵育后,再次 TBST 洗膜。最后,使用增强化学发光试剂盒显色,成像仪采集条带进行可视化。

1.7 统计学分析

实验过程中,每组最初纳入 8 只大鼠,但由于期间 MI/RI 组死亡 2 只大鼠,最终每组有效样本量均为 6 只。所有数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。两组间比较采用双尾独立样本 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,并以 Šídák

法进行事后多重比较。均以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心功能比较

与 Sham 组相比,MI/RI 组大鼠 LVEF、LVFS 均显著降低($P<0.01$)。与 MI/RI 组相比,MI/RI+ATV 组、MI/RI+4-PBA 组、MI/RI+TXL 组、MI/RI+TXL+HA15 组大鼠 LVEF、LVFS 均显著升高($P<0.01$)。与 MI/RI+TXL 组相比,MI/RI+TXL+HA15 组大鼠 LVEF、LVFS 均显著升高($P<0.01$)。详见表 1。

2.2 各组大鼠血清 AST、LDH、CK、CK-MB 水平比较

与 Sham 组相比,MI/RI 组大鼠血清 AST、LDH、CK、CK-MB 水平均显著升高($P<0.01$)。与 MI/RI 组相比,MI/RI+ATV 组、MI/RI+4-PBA 组、MI/RI+TXL 组、MI/RI+TXL+HA15 组大鼠上述指标水平均显著降低($P<0.01$)。与 MI/RI+TXL 组相比,MI/RI+TXL+HA15 组大鼠上述指标水平均降低($P<0.05$, $P<0.01$)。详见表 2。

2.3 各组大鼠血清炎症和氧化应激指标比较

与 Sham 组相比,MI/RI 组 IL-1 β 、IL-18、MDA

表 1 各组大鼠 LVEF 和 LVFS 比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 1 Comparison of LVEF and LVFS of rats among groups ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

分组	LVEF/%	LVFS/%
Sham 组	85.36 $\pm$ 2.85	63.48 $\pm$ 2.12
MI/RI 组	50.78 $\pm$ 1.69**	31.25 $\pm$ 1.04**
MI/RI+ATV 组	66.28 $\pm$ 2.52 ^{##}	42.97 $\pm$ 1.43 ^{##}
MI/RI+4-PBA 组	65.43 $\pm$ 2.18 ^{##}	43.92 $\pm$ 1.50 ^{##}
MI/RI+TXL 组	62.50 $\pm$ 3.09 ^{##}	41.02 $\pm$ 1.50 ^{##}
MI/RI+TXL+HA15 组	67.39 $\pm$ 2.05 ^{##&&}	44.92 $\pm$ 1.37 ^{##&&}
<i>F</i> 值	147.425	281.732
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

注:与 Sham 组比较,** $P<0.01$;与 MI/RI 组比较,^{##} $P<0.01$;与 MI/RI+TXL 组比较,^{&&} $P<0.01$ 。

水平均显著升高($P<0.01$),T-SOD、GSH 水平均显著降低($P<0.01$)。与 MI/RI 组相比,MI/RI+ATV 组、MI/RI+4-PBA 组、MI/RI+TXL 组、MI/RI+TXL+HA15 组大鼠 IL-1 β 、IL-18、MDA 水平均显著降低($P<0.01$),T-SOD、GSH 水平均显著升高($P<0.01$)。与 MI/RI+TXL 组相比,MI/RI+TXL+HA15 组大鼠 IL-1 β 、IL-18、MDA 水平均降低($P<0.05$),T-SOD、GSH 水平均升高($P<0.05$)。详见表 3。

表 2 各组大鼠血清 AST、LDH、CK 和 CK-MB 水平比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$, U/L)

Table 2 Comparison of serum AST, LDH, CK, and CK-MB levels of rats among groups ($\bar{x}\pm s$, $n=6$, U/L)

分组	AST	LDH	CK	CK-MB
Sham 组	9.45 $\pm$ 0.43	53.59 $\pm$ 2.43	46.14 $\pm$ 2.51	61.59 $\pm$ 2.79
MI/RI 组	32.25 $\pm$ 1.46**	197.11 $\pm$ 8.94**	134.97 $\pm$ 6.12**	181.03 $\pm$ 8.21**
MI/RI+ATV 组	21.26 $\pm$ 0.96 ^{##}	70.85 $\pm$ 3.21 ^{##}	57.86 $\pm$ 2.77 ^{##}	84.57 $\pm$ 3.84 ^{##}
MI/RI+4-PBA 组	22.08 $\pm$ 1.00 ^{##}	71.76 $\pm$ 3.25 ^{##}	56.04 $\pm$ 2.54 ^{##}	82.57 $\pm$ 3.74 ^{##}
MI/RI+TXL 组	24.25 $\pm$ 1.10 ^{##}	75.39 $\pm$ 3.42 ^{##}	61.31 $\pm$ 2.62 ^{##}	89.48 $\pm$ 4.06 ^{##}
MI/RI+TXL+HA15 组	21.80 $\pm$ 0.99 ^{##&&}	69.03 $\pm$ 3.13 ^{##&}	55.59 $\pm$ 2.09 ^{##&&}	82.93 $\pm$ 3.76 ^{##&}
<i>F</i> 值	300.335	394.661	561.759	478.208
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Sham 组比较,** $P<0.01$;与 MI/RI 组比较,^{##} $P<0.01$;与 MI/RI+TXL 组比较,^{&&} $P<0.05$,[&] $P<0.01$ 。

表 3 各组大鼠血清炎症与氧化应激指标比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 3 Comparison of serum inflammatory and oxidative stress indicators of rats among groups ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

分组	IL-1 β /(pg/mL)	IL-18/(pg/mL)	MDA/(μ mol/L)	T-SOD/(U/mL)	GSH/(μ mol/gprot)
Sham 组	50.31 $\pm$ 3.56	88.05 $\pm$ 6.22	2.42 $\pm$ 0.17	281.36 $\pm$ 19.89	61.49 $\pm$ 4.35
MI/RI 组	95.96 $\pm$ 6.78**	232.92 $\pm$ 16.46**	6.15 $\pm$ 0.43**	163.97 $\pm$ 11.59**	26.09 $\pm$ 1.84**
MI/RI+ATV 组	57.76 $\pm$ 4.08 ^{##}	156.52 $\pm$ 11.06 ^{##}	4.85 $\pm$ 0.34 ^{##}	227.33 $\pm$ 16.07 ^{##}	38.20 $\pm$ 2.70 ^{##}
MI/RI+4-PBA 组	58.70 $\pm$ 4.15 ^{##}	155.59 $\pm$ 11.00 ^{##}	4.66 $\pm$ 0.33 ^{##}	231.99 $\pm$ 16.40 ^{##}	39.13 $\pm$ 2.77 ^{##}
MI/RI+TXL 组	64.29 $\pm$ 4.54 ^{##}	162.19 $\pm$ 4.91 ^{##}	5.22 $\pm$ 0.37 ^{##}	220.46 $\pm$ 11.20 ^{##}	38.74 $\pm$ 2.07 ^{##}
MI/RI+TXL+HA15 组	56.83 $\pm$ 4.02 ^{##&}	152.55 $\pm$ 9.24 ^{##&}	4.67 $\pm$ 0.31 ^{##&}	235.05 $\pm$ 11.64 ^{##&}	41.32 $\pm$ 2.75 ^{##&}
<i>F</i> 值	73.908	114.822	80.190	38.641	92.012
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Sham 组比较,** $P<0.01$;与 MI/RI 组比较,^{##} $P<0.01$;与 MI/RI+TXL 组比较,[&] $P<0.05$ 。

2.4 各组大鼠心肌组织形态学变化

HE 染色显示, Sham 组心肌纤维结构完整、排列整齐; MI/RI 组心肌纤维出现明显排列紊乱、断裂, 并伴有大量炎症细胞浸润; MI/RI+ATV 组、MI/RI+4-PBA 组、MI/RI+TXL 组、MI/RI+TXL+HA15 组经药物干预后, 心肌纤维结构破坏和炎症浸润得到明显改善。详见图 1。

2.5 各组大鼠心肌纤维化比较

通过 Masson 染色评估心肌组织胶原沉积情况, 与 Sham 组相比, MI/RI 组 CVF 显著升高 ($P<0.01$)。免疫组织化学染色结果进一步显示, 与 Sham 组相比, MI/RI 组胶原蛋白 I、III 表达均显著升高 ($P<0.01$); 与 MI/RI 组相比, MI/RI+ATV 组、MI/RI+4-

PBA 组、MI/RI+TXL 组大鼠 CVF 及胶原蛋白 I、III 表达均显著降低 ($P<0.01$); 与 MI/RI+TXL 组相比, MI/RI+TXL+HA15 组大鼠 CVF 及胶原蛋白 I、III 表达均降低 ($P<0.05, P<0.01$)。详见图 2—4、表 4。

2.6 各组大鼠心肌组织内质网超微结构情况

透射电镜观察结果显示, Sham 组心肌细胞内质网结构清晰, 线粒体形态正常; MI/RI 组则表现为内质网明显扩张、肿胀, 线粒体肿胀、嵴断裂或消失; MI/RI+ATV 组、MI/RI+4-PBA 组、MI/RI+TXL 组、MI/RI+TXL+HA15 组经药物干预后, 上述超微结构的损伤均能不同程度地改善。详见图 5。

2.7 各组大鼠心肌组织 GRP78、XBP1、CHOP 蛋白表达比较

与 Sham 组相比, MI/RI 组大鼠心肌组织中 GRP78、

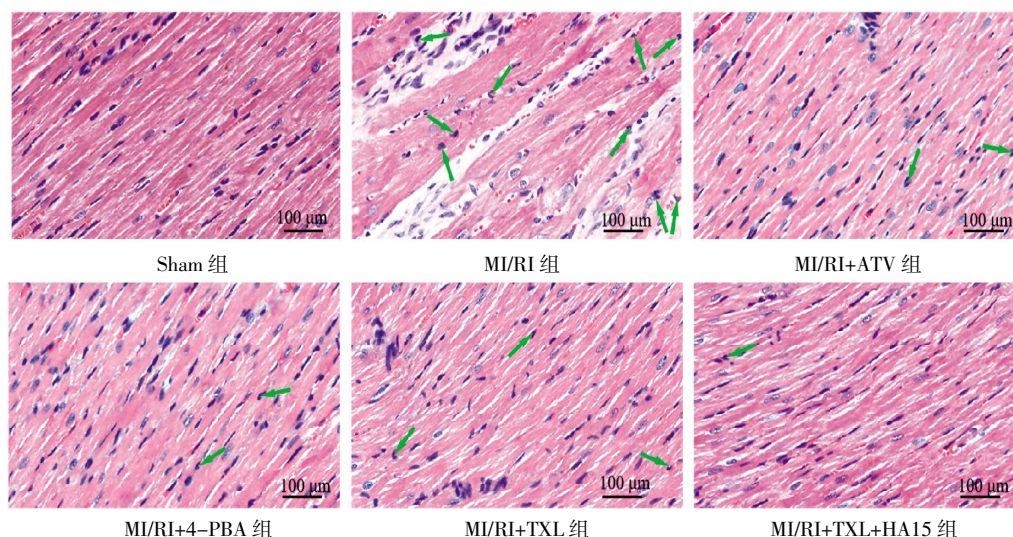


图 1 各组大鼠心肌组织形态学变化(HE, ×300)

Fig.1 Histomorphological changes of myocardial tissue of rats in each group (HE, ×300)

注:绿色箭头表示炎症细胞。

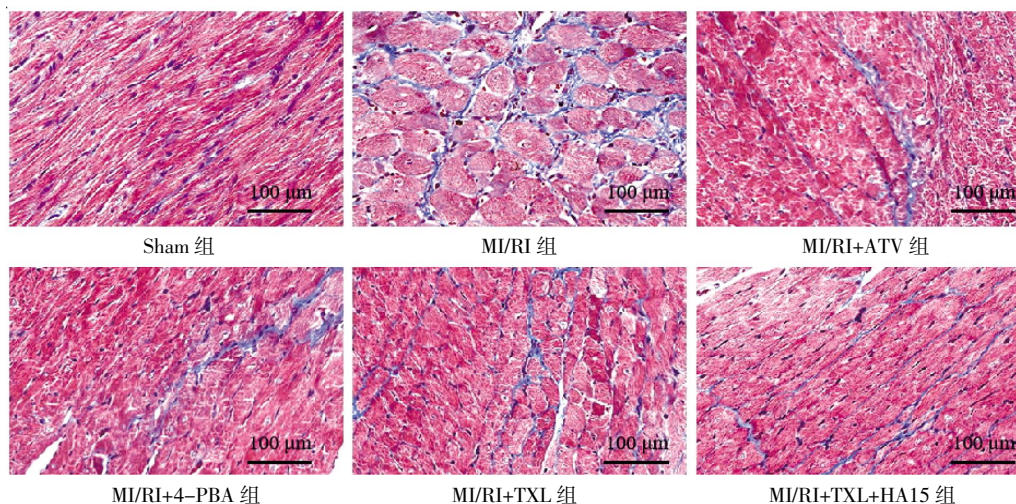


图 2 各组大鼠心肌组织胶原沉积情况(Masson 染色, ×300)

Fig.2 Collagen deposition in myocardial tissue of rats in each group (Masson staining, ×300)

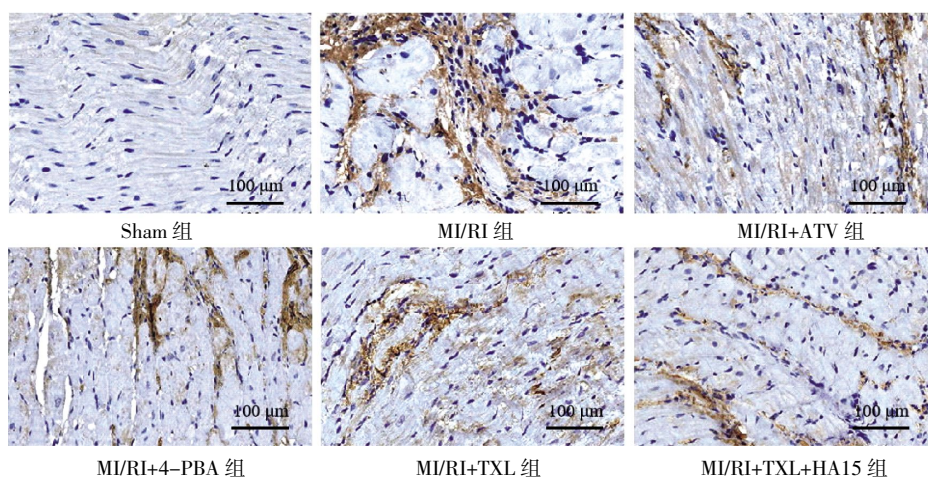


图 3 各组大鼠心肌组织胶原蛋白Ⅲ阳性区域免疫组织化学结果($\times 300$)

Fig.3 Immunohistochemical findings of collagen III-positive areas in myocardial tissue of rats in each group ($\times 300$)

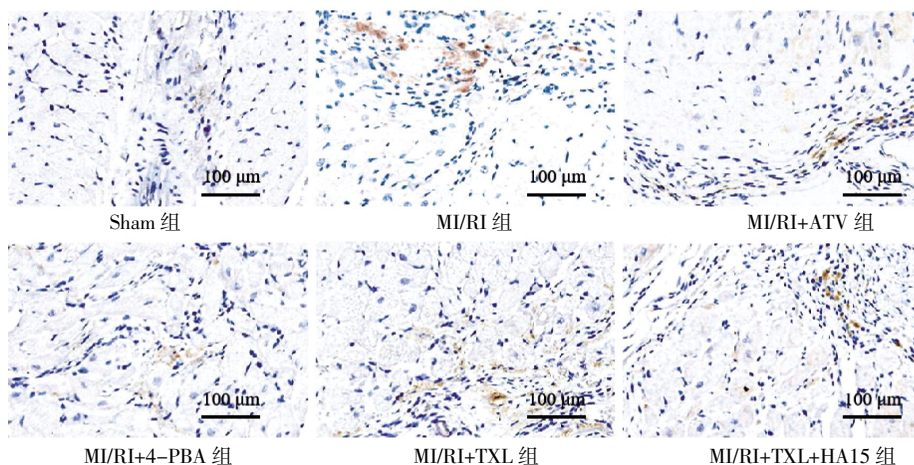


图 4 各组大鼠心肌组织胶原蛋白Ⅰ阳性区域免疫组织化学结果($\times 300$)

Fig.4 Immunohistochemical findings of collagen I-positive areas in myocardial tissue of rats in each group ($\times 300$)

表 4 各组大鼠心肌组织纤维化定量分析结果比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Comparison of quantitative analysis of myocardial fibrosis in rats among groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	CVF/%	胶原蛋白Ⅲ阳性区域/%	胶原蛋白Ⅰ阳性区域/%
Sham 组	4.03 $\pm$ 0.15	3.81 $\pm$ 0.14	0.23 $\pm$ 0.01
MI/RI 组	14.24 $\pm$ 0.54**	14.33 $\pm$ 0.54**	1.37 $\pm$ 0.05**
MI/RI+ATV 组	6.24 $\pm$ 0.24 ^{##}	6.05 $\pm$ 0.23 ^{##}	0.73 $\pm$ 0.03 ^{##}
MI/RI+4-PBA 组	7.02 $\pm$ 0.26 ^{##}	5.27 $\pm$ 0.20 ^{##}	0.70 $\pm$ 0.02 ^{##}
MI/RI+TXL 组	7.41 $\pm$ 0.28 ^{##}	5.06 $\pm$ 0.21 ^{##}	0.71 $\pm$ 0.01 ^{##}
MI/RI+TXL+HA15 组	6.34 $\pm$ 0.19 ^{###}	5.85 $\pm$ 0.22 ^{###}	0.68 $\pm$ 0.02 ^{###}
F 值	504.805	391.542	408.356
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Sham 组比较,** $P<0.01$;与 MI/RI 组比较,^{##} $P<0.01$;与 MI/RI+TXL 组比较,^{*} $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

CHOP 蛋白表达显著升高($P<0.01$),而 XBP1 蛋白表达显著降低($P<0.01$)。与 MI/RI 组相比,MI/RI+ATV 组、MI/RI+4-PBA 组、MI/RI+TXL 组、MI/RI+TXL+HA15 组 GRP78、CHOP 蛋白表达显著降低($P<0.01$),

而 XBP1 蛋白表达显著升高($P<0.01$)。与 MI/RI+TXL 组相比,MI/RI+TXL+HA15 组大鼠 GRP78、CHOP 蛋白表达降低($P<0.05$, $P<0.01$),而 XBP1 蛋白表达升高($P<0.05$)。详见图 6、表 5。

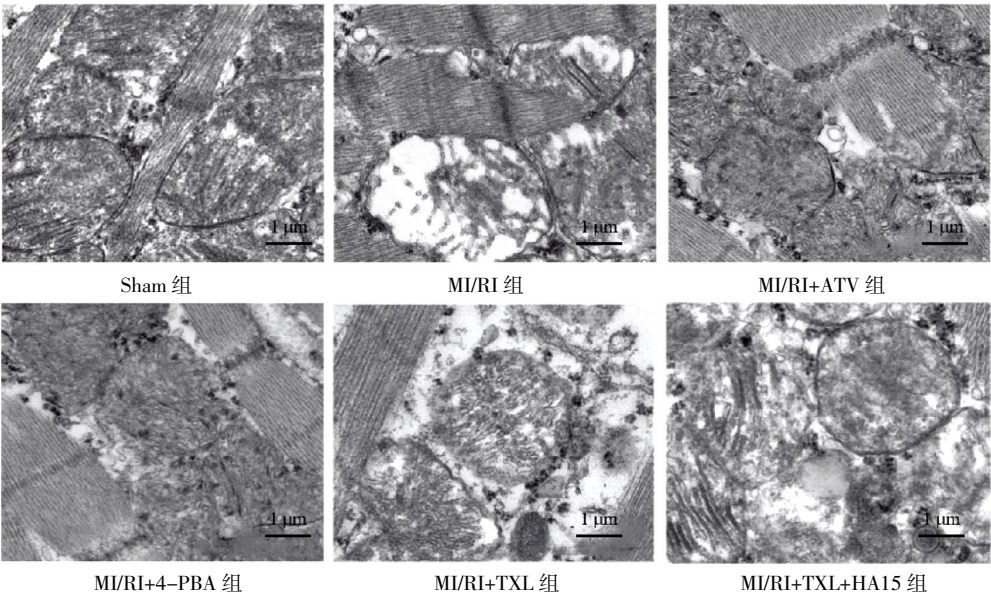


图 5 各组大鼠心肌组织内质网超微结构透射电镜图($\times 15\ 000$)

Fig.5 TEM images of endoplasmic reticulum ultrastructure in myocardial tissue of rats in each group ($\times 15\ 000$)

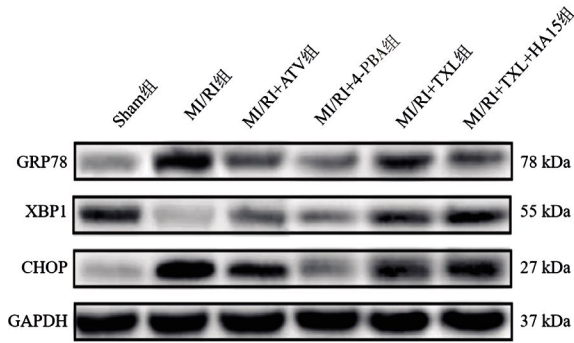


图 6 各组大鼠心肌组织 GRP78、XBP1、CHOP 蛋白电泳条带

Fig.6 Electrophoretic bands of GRP78, XBP1, and CHOP in myocardial tissue of rats in each group

表 5 各组大鼠心肌组织 GRP78、XBP1、CHOP 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Comparison of GRP78, XBP1, and CHOP protein expressions in myocardial tissue of rats among groups ($\bar{x}\pm s, n=6$)

分组	GRP78/GAPDH	XBP1/GAPDH	CHOP/GAPDH
Sham 组	0.20±0.01	0.55±0.03	0.15±0.01
MI/RI 组	0.79±0.04**	0.26±0.01**	0.84±0.03**
MI/RI+ATV 组	0.56±0.03 ^{##}	0.38±0.04 ^{##}	0.70±0.01 ^{##}
MI/RI+4-PBA 组	0.35±0.02 ^{##}	0.36±0.01 ^{##}	0.52±0.02 ^{##}
MI/RI+TXL 组	0.43±0.05 ^{##}	0.42±0.04 ^{##}	0.56±0.03 ^{##}
MI/RI+TXL+HA15 组	0.31±0.01 ^{##&Δ}	0.48±0.02 ^{##&Δ}	0.51±0.05 ^{##&Δ}
F 值	375.706	128.634	377.616
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Sham 组比较, ** $P<0.01$;与 MI/RI 组比较, ^{##} $P<0.01$;与 MI/RI+TXL 组比较, ^Δ $P<0.05$, ^{&Δ} $P<0.01$ 。

3 讨论

MI/RI 是急性心肌梗死再灌注治疗后的主要并发症,严重影响患者预后^[1]。其病理机制涉及氧化应激、炎症反应、钙超载及 ERS 等多重因素交互作用^[2]。ERS 作为细胞应对应激的核心应答机制,在 MI/RI 过程中被过度激活,并通过调控 GRP78/XBP1/CHOP 信号通路介导心肌细胞凋亡与纤维化^[3-4]。因此,靶向 ERS 通路已成为干预 MI/RI 的潜在策略。

TXL 作为临床上广泛应用于冠心病、心绞痛及心肌梗死治疗的中药复方,具有活血化瘀、通络止痛的功效^[5-7]。既往研究证实, TXL 可通过抗炎、抗氧化、抗凋亡及抗纤维化等多重途径减轻 MI/RI^[17-20],但其是否通过调控 ERS 发挥作用尚不明确。基于此,本研究设计阳性对照组(ATV)、ERS 抑制剂组(4-PBA)、GRP78 特异性抑制剂联合组(HA15),旨在系统探究 TXL 对 MI/RI 的保护作用及其与 GRP78/XBP1/CHOP 通路的相关性。ATV 作为临床一线调脂药物,已被证实具有独立于调脂之外的心血管保护作用,包括抗炎、抗氧化及改善内皮功能^[12],因此可作为阳性对照药物验证 MI/RI 模型的可靠性及干预效果的可比性。4-PBA 作为经典的小分子 ERS 抑制剂,能够通过稳定蛋白质构象、减轻内质网负荷,抑制 ERS 过度激活^[15],其在本研究中的应用有助于明确 ERS 在 MI/RI 中的病理作用,并为 TXL 的效应

机制提供参照。HA15 作为一种新型 GRP78 特异性抑制剂,可竞争性结合 GRP78 的底物结合域,阻断其分子伴侣功能,从而调控 UPR 信号输出^[16]。通过 TXL 与 HA15 的联合干预,可进一步验证 GRP78 在 TXL 药理通路中的关键节点作用。

本研究首先通过心功能与心肌酶学指标评估 TXL 的心脏保护效应。结果显示,与 Sham 组相比,MI/RI 组大鼠 LVEF 与 LVFS 显著降低,血清 AST、LDH、CK、CK-MB 水平显著升高,表明缺血再灌注造成了严重的心功能损伤与心肌细胞坏死,模型建立成功。与 MI/RI 组相比,TXL 干预可显著提升 LVEF 与 LVFS,降低心肌酶水平,效果与 ATV 及 4-PBA 相当,提示 TXL 具有明确的心功能保护作用。这一结果与既往研究一致^[7,17],进一步证实 TXL 在 MI/RI 中的治疗潜力。此外,TXL 与 HA15 联合应用后,心功能改善及心肌酶降低效应显著优于 TXL 单用组,提示抑制 GRP78 可能增强 TXL 的保护作用。

氧化应激与炎症反应是 MI/RI 病理进程中的核心驱动因素^[1]。本研究显示,MI/RI 组血清 IL-1 β 、IL-18 及 MDA 水平显著升高,T-SOD 及 GSH 水平显著下降,表明氧化/抗氧化失衡及炎症级联反应被激活。TXL 干预可显著逆转上述变化,降低炎症因子与脂质过氧化产物水平,提高抗氧化酶活性,提示 TXL 具有抗炎与抗氧化双重作用。这一发现与既往网络药理学预测相符,TXL 中的人参皂苷、芍药苷等成分可能通过多靶点调控氧化应激与炎症通路^[18-21]。TXL 联合 HA15 后,抗炎、抗氧化效应进一步增强,提示 GRP78 可能参与调控氧化应激与炎症反应的交互作用。

心肌纤维化是 MI/RI 后心室重构的重要病理基础^[17]。Masson 染色与免疫组织化学结果显示,MI/RI 组 CVF 及胶原蛋白 I、III 表达显著增加,表明缺血再灌注诱导了心肌间质胶原沉积。TXL 干预可显著降低 CVF 及胶原蛋白表达,效果与 ATV 及 4-PBA 相当,提示 TXL 具有抗纤维化作用。透射电镜观察进一步显示,TXL 可改善 MI/RI 诱导的内质网肿胀、脱颗粒及线粒体空泡化等超微结构损伤,提示其保护作用与维持内质网稳态密切相关。

为深入探讨 TXL 调控 ERS 的分子机制,本研究检测了 GRP78/XBP1/CHOP 通路蛋白表达。结果显示,MI/RI 组 GRP78 与 CHOP 表达显著上调、XBP1

表达下调,表明 ERS 被过度激活并倾向于促凋亡方向。TXL 干预可显著逆转这一异常表达模式:下调 GRP78 与 CHOP,上调 XBP1,提示 TXL 可能通过平衡 UPR 的适应性与凋亡性分支,将细胞命运导向生存。TXL 联合 HA15 后,对 GRP78 和 CHOP 的下调作用及对 XBP1 的上调作用均优于 TXL 单用组,这不仅印证了 GRP78 在该通路的核心地位,也提示在 TXL 基础上进一步抑制 GRP78 可能产生协同增效作用。HA15 作为 GRP78 特异性抑制剂,可竞争性结合其底物结合域,阻断 GRP78 与未折叠蛋白的相互作用,从而调控 UPR 信号输出^[16]。本研究发现,TXL 与 HA15 联用后,在减弱促凋亡信号(CHOP 下调)的同时,并行强化了促生存信号(XBP1 上调),提示二者可能通过协同优化 UPR 输出结果,实现对 ERS 网络更全面、更高效的调控。这一发现与 LUO 等^[16]在食管鳞癌研究中观察到 HA15 可增强放疗敏感性的结果相呼应,提示靶向 GRP78 在多种疾病中均具有治疗潜力。

本研究仍存在一定局限性。首先,所有实验均在大鼠模型中进行,其与人类病理生理存在差异,后续需开展临床研究进一步验证。其次,ERS 与线粒体功能障碍、自噬、焦亡等其他细胞死亡途径之间存在交互调控^[22-23],TXL 是否通过多途径协同发挥作用尚需深入探讨。此外,TXL 作为中药复方,其多组分、多靶点的特点是发挥综合疗效的基础^[21,24],但具体有效成分及作用靶点仍需进一步分离与鉴定。未来可结合网络药理学预测与实验验证,筛选 TXL 中调控 ERS 的关键活性成分,并探索其与 GRP78 的相互作用模式。

综上所述,TXL 可通过调控 GRP78/XBP1/CHOP 信号通路抑制内质网应激,减轻心肌缺血再灌注损伤,改善心功能与心肌结构。本研究为 TXL 的临床应用提供了新的理论基础,也为开发针对 ERS 的心肌保护药物提供了重要参考。

参考文献

- [1] ZHANG S, YAN F, LUAN F, et al. The pathological mechanisms and potential therapeutic drugs for myocardial ischemia reperfusion injury[J]. *Phytomedicine*, 2024, 129: 155649.
- [2] LUO Q, SUN W, LI Z B, et al. Biomaterials-mediated targeted therapeutics of myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Biomaterials*, 2023, 303: 122368.

- [3] LIANG W L, CAI M R, ZHANG M Q, et al. Chinese herbal medicine alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating endoplasmic reticulum stress[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2021, 2021: 4963346.
- [4] 张云. 羟基红花黄色素A抑制GRP78/PERK/CHOP信号通路保护脑缺血再灌注损伤模型大鼠[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2023.
- [5] 刘一颖. 通心络胶囊干预治疗气虚血瘀型稳定性心绞痛队列研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2024.
- [6] WANG J, LI T L, CHANG P F, et al. Clinical effects and mechanisms of a Chinese patent medicine, Tongxinluo capsule, as an adjuvant treatment in coronary heart disease[J]. Heliyon, 2024, 10(6): e27460.
- [7] YANG Y J, LI X D, CHEN G H, et al. Traditional Chinese medicine compound (Tongxinluo) and clinical outcomes of patients with acute myocardial infarction: The CTS-AMI randomized clinical trial[J]. JAMA, 2023, 330(16): 1534-1545.
- [8] 张爱爱, 刘伟, 杜美玲, 等. 通心络胶囊联合增强型体外反搏对缺血性心脏病心力衰竭患者临床疗效研究[J]. 中国医药, 2025, 20(8): 1223-1227.
- [9] 马晓伟, 贺敬丰, 李珑, 等. 通心络胶囊联合阿罗洛尔治疗冠心病心绞痛的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2025, 40(7): 1694-1699.
- [10] 陈坤伦, 张定宝, 陈应辉. 通心络胶囊联合瑞舒伐他汀治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病临床观察[J]. 中国药业, 2024, 33(15): 102-105.
- [11] 易文驹. 基于Meta分析对通心络胶囊治疗急性心肌梗死再灌注损伤的研究[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2023.
- [12] YANG H X, WANG P, WANG N N, et al. Tongxinluo ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury mainly via activating parkin-mediated mitophagy and downregulating ubiquitin-proteasome system[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2021, 27(7): 542-550.
- [13] 袁星宝, 戴世杰, 郑娅. 通心络胶囊联合阿托伐他汀预处理对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2023, 25(9): 983-987.
- [14] 杨红星. 通心络干预大鼠心肌缺血再灌注损伤的自噬机制及其相关microRNA途径[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [15] JIMÉNEZ-GONZÁLEZ S, DELGADO-VALERO B, ISLAS F, et al. The detrimental role of galectin-3 and endoplasmic reticulum stress in the cardiac consequences of myocardial ischemia in the context of obesity[J]. FASEB Journal, 2024, 38(14): e23818.
- [16] LUO H, WANG L X, ZHANG D J, et al. HA15 inhibits binding immunoglobulin protein and enhances the efficacy of radiation therapy in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cancer Science, 2023, 114(4): 1697-1709.
- [17] WEI Y R, HOU Y L, YIN Y J, et al. Tongxinluo activates PI3K/AKT signaling pathway to inhibit endothelial mesenchymal transition and attenuate myocardial fibrosis after ischemia-reperfusion in mice[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2024, 30(7): 608-615.
- [18] 汪余嘉, 许李月, 蒋诗情, 等. 基于网络药理学与分子对接技术探究通心络防治心肌缺血再灌注损伤的作用机制[J]. 临床合理用药, 2024, 17(35): 1-6.
- [19] 闫文瑞, 张常喜, 张晓晋, 等. 通心络胶囊调控转化生长因子- $\beta 1$ 表达改善糖尿病心脏病大鼠心肌纤维化损伤机制研究[J]. 陕西中医, 2023, 44(12): 1683-1687, 1697.
- [20] ZHOU Y, MURUGAN D D, KHAN H, et al. Roles and therapeutic implications of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cardiovascular diseases[J]. Antioxidants, 2021, 10(8): 1167.
- [21] XIN J J, WANG T X, HOU B, et al. Tongxinluo capsule as a multi-functional traditional Chinese medicine in treating cardiovascular disease: A review of components, pharmacological mechanisms, and clinical applications[J]. Heliyon, 2024, 10(13): e33309.
- [22] WU X, HOU Y L, WANG T X, et al. Tongxinluo alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting the pyroptosis of endothelial cells via the NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway[J]. Journal of Molecular Histology, 2025, 56(5): 302.
- [23] 马强, 欧阳心怡, 颜思阳, 等. 芒柄花素通过影响ACSL4/LP-CAT3/GPX4表达缓解脑缺血再灌注损伤中神经元铁死亡[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(6): 989-999.
- [24] 高志杰, 王立新. 通心络胶囊对脑缺血再灌注损伤小鼠的保护作用及作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(11): 93-99.

(本文编辑 匡静之)