

引用:付向婷,赵一慧,王婉盈,张文宗.经方调控NLRP3/Caspase-1通路对心房颤动大鼠炎症反应的影响[J].中医药导报,2025,31(11):31-37.

经方调控NLRP3/Caspase-1通路 对心房颤动大鼠炎症反应的影响*

付向婷¹,赵一慧¹,王婉盈¹,张文宗^{1,2}

(1.河南中医药大学第二临床医学院,河南 郑州 450002;2.河南省中医院,河南 郑州 450002)

[摘要] 目的:比较经方炙甘草汤、桂枝甘草汤、真武汤及苓桂术甘汤对大鼠心房颤动(简称房颤)发生的影响,筛选出效果最佳经方,并探讨效果最佳经方调控核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体3(NLRP3)/胱天蛋白酶-1(Caspase-1)通路对心房颤动大鼠炎症反应的影响。方法:将42只雄性SD大鼠为随机分为空白组、模型组、炙甘草汤组、桂枝甘草汤组、真武汤组、苓桂术甘汤组及维拉帕米组,每组6只。空白组尾静脉注射生理盐水,其6组通过连续7 d尾静脉注射乙酰胆碱(Acetylchoine,Ach)-氯化钙(CaCl₂)构建房颤模型。造模成功后各组予相应药物灌胃14 d。心电图监测各组大鼠房颤诱发时间与房颤持续时间,苏木精-伊红(HE)染色、马松(Masson)染色观察心房组织的病理变化及胶原生成情况,并计算心肌胶原体积百分比(CVF),酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定血清白细胞介素-1β(IL-1β)水平。确定效果最佳经方后,将30只雄性SD大鼠,随机分为空白组、模型组、真武汤高剂量组、真武汤低剂量组及维拉帕米组,每组6只。空白组尾静脉注射生理盐水,其4组通过连续7 d尾静脉注射Ach-CaCl₂构建房颤模型。造模成功后各组予相应药物灌胃14 d。通过Ⅱ导联心电图比较房颤诱发时间与持续时间,HE染色与Masson染色观察心房组织病理变化,ELISA检测血清IL-1β水平,蛋白质印迹(Western blotting)法检测心房组织NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白质(ASC)、Caspase-1蛋白表达。结果:真武汤组、维拉帕米组大鼠房颤诱发时间长于模型组,房颤持续时间短于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);炙甘草汤组、桂枝甘草汤组、真武汤组、苓桂术甘汤组、维拉帕米组大鼠CVF低于模型组($P<0.01$);炙甘草汤组、真武汤组、苓桂术甘汤组、维拉帕米组大鼠血清IL-1β水平低于模型组($P<0.01$)。真武汤高剂量组、维拉帕米组大鼠房颤诱发时间长于模型组($P<0.05$),房颤持续时间短于模型组($P<0.01$);真武汤高剂量组、真武汤低剂量组、维拉帕米组大鼠CVF、血清IL-1β水平均低于模型组($P<0.01$);真武汤高剂量组、真武汤低剂量组、维拉帕米组大鼠心房组织NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白相对表达量均低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:炙甘草汤、桂枝甘草汤、真武汤及苓桂术甘汤均能改善房颤大鼠症状,其中真武汤可以延长房颤诱发时间,缩短房颤持续时间,减轻心房组织病理损伤及纤维化。其作用机制可能与抑制NLRP3/Caspase-1信号通路有关。

[关键词] 心房颤动;真武汤;炙甘草汤;桂枝甘草汤;苓桂术甘汤;核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体3/胱天蛋白酶-1通路;炎症反应;大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)11-0031-07

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.11.006

Effect of Jingfang (经方) on the Inflammatory Response in Atrial Fibrillation Rats via Regulation of the NLRP3/Caspase-1 Pathway

FU Xiangting¹, ZHAO Yihui¹, WANG Wanying¹, ZHANG Wenzong^{1,2}

(1.The Second Clinical Medical College of He'nan University of Chinese Medicine, Zhengzhou He'nan 450002, China; 2.He'nan Province Hospital of TCM, Zhengzhou He'nan 450002, China)

[Abstract] Objective: To compare four Jingfang [Zhigancao decoction (炙甘草汤), Guizhigancao decoction (桂枝甘草汤), Zhenwu decoction (真武汤), Lingguizhugan decoction (苓桂术甘汤)] for their effects on rat atrial fibrillation (AF), identify the most effective formulation, and explore its impact on the inflammatory response via the nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3 (NLRP3)/Caspase-1 signaling pathway. Methods: A total of 42 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly allocated into blank group, model group, Zhigancao decoction group, Guizhigancao decoction group, Zhenwu decoction group, Lingguizhugan

*基金项目:河南省中医药科学研究专项课题(2022ZY1066,2024ZY2078)

通信作者:张文宗,男,副教授,研究方向为心血管内科

decoction group, and verapamil group, with 6 in each. Rats were injected with physiological saline via tail vein injection in blank group. AF was induced in other 6 groups by daily tail vein injections of an Ach–CaCl₂ mixture for seven days. Following model establishment, rats were orally administered the corresponding drug for 14 days. Electrocardiograms were recorded to determine AF initiation time and duration. Hematoxylin–eosin (HE) staining and Masson staining were performed to observe pathological changes and collagen deposition in atrial tissue, respectively. The collagen volume fraction (CVF) was also calculated. Serum interleukin-1β (IL-1β) level was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Comparative analysis of experimental data identified the most effective Jingfang. An additional 30 male SD rats were divided into blank group, model group, Zhenwu decoction low dose group, Zhenwu decoction high dose group, and verapamil group, with 6 in each. Rats were injected with physiological saline via tail vein injection in blank group. AF was induced in other 4 groups by daily tail vein injections of an Ach–CaCl₂ mixture for seven days. Following model establishment, rats were orally administered the corresponding drug for 14 days. Atrial fibrillation induction time and duration were compared via Lead II ECG. Pathological changes in atrial tissue were observed by HE and Masson staining. Serum IL-1β level was measured by ELISA. The protein expression of NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) and Caspase-1 in atrial tissue was detected by Western blotting. Results: The Zhenwu decoction group and verapamil group exhibited significantly longer AF induction time and shorter AF duration compared to the model group ($P<0.01$ or $P<0.05$). Zhigancao decoction group, Guizhigancao decoction group, Zhenwu decoction group, Lingguizhugan decoction group and verapamil group showed lower CVF than model group ($P<0.01$). Zhigancao decoction group, Zhenwu decoction group, Lingguizhugan decoction group and verapamil group showed lower serum IL-1β level than model group ($P<0.01$). Zhenwu decoction high dose group and verapamil group exhibited significantly longer AF induction time ($P<0.05$) and shorter AF duration compared to the model group ($P<0.01$). Zhenwu decoction high dose group, Zhenwu decoction low dose group and verapamil group showed lower CVF and serum IL-1β level than model group ($P<0.01$). Zhenwu decoction high dose group, Zhenwu decoction low dose group and verapamil group showed lower protein expression of NLRP3, ASC and Caspase-1 than model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Conclusion: Zhigancao decoction, Guizhigancao decoction, Zhenwu decoction and Lingguizhugan decoction can ameliorate AF symptoms in rats. Zhenwu decoction can extend AF initiation time, reduce AF duration, and improve pathological lesions and fibrosis, potentially through suppression of the NLRP3/Caspase-1 signaling pathway.

[Keywords] atrial fibrillation; Zhenwu decoction; Zhigancao decoction; Guizhigancao decoction; Lingguizhugan decoction; nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3/Caspase-1 signaling pathway; inflammatory reaction; rat

心房颤动(简称房颤)在临床中极为常见,2020年全球患病人数已达5 000万^[1-2]。房颤的治疗依赖于射频消融、电复律及药物维持,但仍有20%~30%的患者存在复发的情况^[3-4]。心房电生理重塑和组织结构重塑与房颤的发生发展密切相关。已有研究表明,房颤的发病与心房肌细胞中核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体3(nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3,NLRP3)炎症小体信号转导诱发的炎症有关^[5]。抑制心房成纤维细胞中NLRP3炎症小体活化可以拮抗心房纤维化,从而减轻房颤易感性^[6]。中医学将房颤归属为“心悸”“怔忡”“惊悸”等范畴。《伤寒杂病论》记载了心悸、怔忡等相关疾病的方药,但缺乏系统研究。基于此,本研究通过构建大鼠房颤模型,以炙甘草汤、桂枝甘草汤、真武汤、苓桂术甘汤灌胃干预,对比心电图中房颤诱发时间及持续时间,筛选出对房颤大鼠疗效最为显著的经方,并进一步探讨其对房颤大鼠炎症反应的调控机制,旨在为经方治疗房颤的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 72只无特定病原体(specific pathogen free,

SPF)级雄性SD大鼠,6~7周龄,体质量(216.29 ± 7.47)g,购自上海必凯科翼生物科技有限公司。动物生产许可证号:SCXK(沪)2023-0009;动物质量合格证号:20230009010004。大鼠饲养于上海中医药大学动物实验中心,温度(20 ± 2)℃,湿度50%~60%,12 h/12 h明暗交替,所有动物在研究期间自由饮食。本研究通过上海中医药大学实验动物伦理审查,伦理审查编号:PZSHUTCM2502180004。

1.2 药物与试剂 炙甘草汤组成:炙甘草12 g,生姜9 g,生地黄50 g,人参6 g,桂枝9 g,阿胶6 g,麦冬10 g,火麻仁10 g,大枣10 g。桂枝甘草汤组成:桂枝12 g,炙甘草6 g。真武汤组成:茯苓9 g,白芍9 g,白术6 g,生姜9 g,黑顺片9 g。苓桂术甘汤组成:茯苓12 g,桂枝9 g,白术9 g,炙甘草6 g。炙甘草(批号:2212006C)、生姜(批号:2308001C)、生地黄(批号:2205003S)、人参(批号:2202001C)、桂枝(批号:2308005C)、阿胶(批号:2305002C)、麦冬(批号:2304001C)、火麻仁(批号:2211002S)、大枣(批号:2208001S)、茯苓(批号:2306001W)、白芍(批号:2112030S)、白术(批号:2212013C)、生姜(批号:2308001C)、黑顺片(批号:2304004C)均购自华润三九有限公司。中药经陈苗苗药师鉴定均为正品,并委托华润三九有限公司按比例

[*m*(生药):*m*(颗粒剂)=2:1]调配制剂。维拉帕米(上海上药信谊药厂有限公司,批号:59240201);无水氯化钙(CaCl₂,批号:S24110-500)、氯化乙酰胆碱(Ach,批号:B24126-100)均购自上海源叶生物科技有限公司;2.5%三溴乙醇(上海雷乙医疗科技有限公司,批号:M2820);大鼠白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:SEKR-0002);免抗NLRP3抗体(批号:49012-2)、免抗凋亡相关斑点样蛋白质(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)抗体(批号:40618)均购自美国SAB公司;免抗胱天蛋白酶-1(cysteine aspartic acid specific protease-1,Caspase-1)抗体(批号:ab286125)、山羊抗兔免疫球蛋白G(immunoglobulin G,IgG)(批号:ab205718)均购自美国Abcam公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号:P001OS)。

1.3 主要仪器 电子天平(德国Sartorius Stedim Biotech公司,型号:CP2251);多导生理记录仪(上海ADI Instruments公司,型号:PowerLab 8/35);倒置显微镜(日本Olympus株式会社,型号:CKX41/U-RFLT50);凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司,型号:Gel-Doc XR+);多功能酶标仪(美国Bio-Rad公司,型号:680);高速冷冻离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司,型号:Centrifuge 5810R)。

1.4 实验一(筛选防治大鼠房颤疗效最佳的经方)

1.4.1 分组与造模 42只SPF级雄性SD大鼠适应性饲养7 d后,将其随机分为空白组、模型组、炙甘草汤组、桂枝甘草汤组、真武汤组、苓桂术甘汤组及维拉帕米组,每组6只。称体质量后,除空白组外,其6组大鼠按照0.1 mL/100 g的给药剂量尾静脉注射含有Ach(66 μg/mL)和CaCl₂(10 mg/mL)的混合液构建房颤模型,空白组则注射等量的生理盐水^[7]。至造模第7天,各组大鼠通过腹腔注射2.5%三溴乙醇麻醉,随后连接多导生理记录仪,再次注射Ach-CaCl₂混悬液,并记录心电图。若心电图中P波消失,出现连续的锯齿状f波,且RR间期绝对不规则,则表明房颤模型构建成功。

1.4.2 给药 根据《药理实验方法学》中“等效剂量折算法”换算大鼠给药剂量,大鼠等效剂量约为成人的6.3倍,成人标准体质量按照70 kg计算^[8]。炙甘草汤、桂枝甘草汤、真武汤、苓桂术甘汤、维拉帕米剂量分别为12.78 g/(kg·d)、1.64 g/(kg·d)、3.78 g/(kg·d)、3.24 g/(kg·d)、3.60 mg/(kg·d)。灌胃干预14 d。空白组、模型组均以生理盐水灌胃干预,剂量为1 mL/100 g。末次干预后,大鼠禁食不禁水12 h,以6 mL/kg的给药剂量腹腔注射2.5%三溴乙醇麻醉,经腹主动脉采血,4 ℃,3 000 r/min(离心半径10 cm)离心12 min,分离血清并保存于-80 ℃冰箱。心脏灌流后分离心脏,取3~5 mm心房组织于4%多聚甲醛溶液中固定24 h以上,用于病理染色分析,剩余组织冻存于-80 ℃冰箱中备用。

1.4.3 观察指标 (1)心电图:腹腔注射2.5%三溴乙醇麻醉大鼠,连接多导生理记录仪,描记大鼠Ⅱ导联心电图,待波形趋于稳定后,开始注射Ach-CaCl₂混合液,记录大鼠房颤诱发时间和房颤持续时间。房颤起始标志为P波消失,连续的锯齿状f波取而代之,且RR间期绝对不规则;房颤终止标志则是P

波重新出现,f波消失,RR间期恢复规则。房颤诱发时间为开始注射Ach-CaCl₂混合液到房颤发生的时间段;房颤持续时间是指房颤出现至房颤终止的时间段。(2)大鼠心房组织病理组织学观察:固定24 h以上的心房组织经脱水、石蜡包埋后制成厚度为5 μm的切片,经苏木精-伊红(HE)染色、马松(Masson)染色后于显微镜下观察,通过Image J软件计算Masson染色后心肌胶原体积百分比(CVF)。CVF=胶原纤维面积/视野总面积×100%。(3)大鼠血清IL-1β水平:使用ELISA试剂盒测定大鼠血清IL-1β,操作步骤严格按照说明书进行,每个样本设置复孔。酶标仪检测450 nm波长下的OD值,EXCEL软件绘制标准曲线,计算血清IL-1β。

1.5 实验二(真武汤对房颤大鼠炎症因子的影响及其机制)

1.5.1 分组与造模 30只SPF级雄性SD大鼠,6~7周龄,体质量(221.42±9.38)g,适应性喂养7 d后,随机分为空白组、模型组、真武汤高剂量组、真武汤低剂量组和维拉帕米组,每组6只。称体质量后,除空白组外,其4组大鼠按照“1.4.1”项下方法造模,空白组则注射等量的生理盐水^[7]。至造模第7天,按照“1.4.1”项下方法鉴定房颤模型构建成功。

1.5.2 给药 根据《药理实验方法学》中“等效剂量折算法”换算大鼠用药等效剂量,大鼠等效剂量约为成人的6.3倍,成人标准体重按照70 kg计算^[8],真武汤高剂量组、真武汤低剂量组及维拉帕米组分别按照7.56 g/(kg·d)、3.78 g/(kg·d)、3.60 mg/(kg·d)的剂量灌胃干预14 d。空白组、模型组均以生理盐水灌胃,剂量为1 mL/100 g。末次干预后,按照“1.4.2”项下方法取材、处理标本、储存标本。

1.5.3 观察指标 (1)心电图:方法同“1.4.3”。(2)大鼠心房组织病理观察:方法同“1.4.3”。(3)大鼠血清IL-1β水平:方法同“1.4.3”。(4)心房组织NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白表达水平:采用称取约10 mg左心房组织,加组织裂解液于冰上匀浆,4 ℃,12 000 r/min(离心半径10 cm)离心15 min,取上清液,采用BCA蛋白浓度测定法检测样本总蛋白量,配平后蛋白变性,进行Western blotting实验。配制10%的蛋白凝胶,以90~120 V的电压进行电泳,当溴酚蓝移至凝胶底部后停止电泳,进行转膜,转膜参数为400 mA,40 min。转膜结束后按照封闭-洗膜—一抗(1:1 000)4 ℃孵育过夜-洗膜—二抗(1:5 000)室温孵育-洗膜的顺序进行操作,每次洗膜重复3次。ECL化学发光液显影曝光,通过ImageJ软件对条带进行半定量分析。

1.6 统计学方法 采用GraphPad Prism 9统计软件对数据进行统计分析,计量资料符合正态分布且方差齐以“均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-t检验。计量资料不符合正态分布或方差不齐则以中位数(四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示,多组间比较采用Kruskal-Wallis H检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 防治大鼠房颤效果最佳经方的筛选

2.1.1 7组大鼠心电图比较 空白组大鼠Ⅱ导联心电图P波直立向上,RR间期规则。模型组、炙甘草汤组、桂枝甘草汤组、真武汤组、苓桂术甘汤组及维拉帕米组大鼠Ⅱ导联心电图P波消失,出现连续的锯齿形f波,RR间期不规则,表现为典型房颤心电图。(见图1)

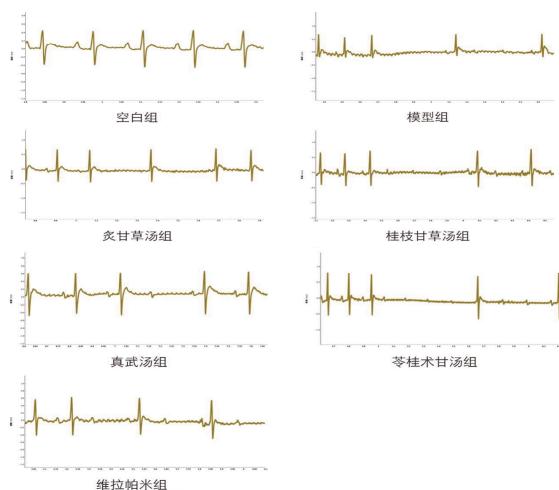


图 1 7组大鼠心电图比较

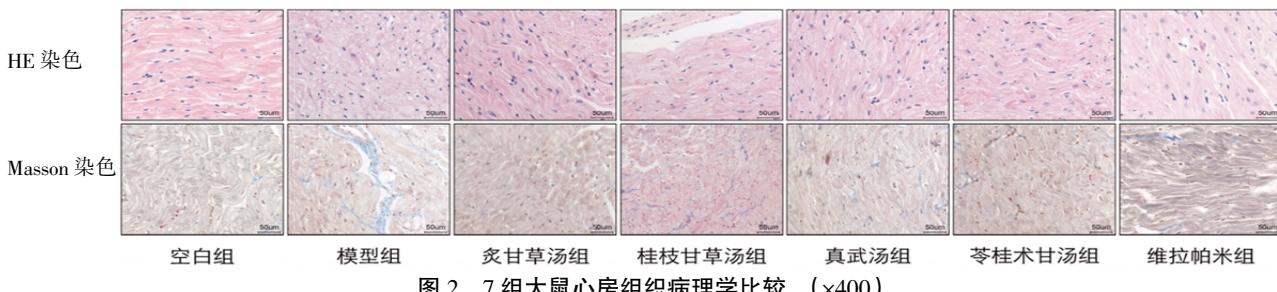
2.1.2 7组大鼠房颤诱发时间和房颤持续时间比较 空白组大鼠心电图正常。真武汤组、维拉帕米组大鼠房颤诱发时间长于模型组,房颤持续时间短于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);炙甘草汤组、桂枝甘草汤组、苓桂术甘汤组大鼠房颤诱发时间、房颤持续时间与模型组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);真武汤组、炙甘草汤组、桂枝甘草汤组、苓桂术甘汤组大鼠房颤诱发时间、房颤持续时间与维拉帕米组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见表1)

表 1 7组大鼠房颤诱发时间和房颤持续时间比较 [$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	n	给药剂量	房颤诱发时间/s	房颤持续时间/s
空白组	6			
模型组	6		4.18(3.10,4.67)	8.7(7.48,16.09)
炙甘草汤组	6	12.78 g/(kg·d)	4.51(4.27,4.74) ^{cd}	6.41(5.27,7.74) ^{cd}
桂枝甘草汤组	6	1.64 g/(kg·d)	4.49(4.30,5.80) ^{cd}	6.89(4.73,20.88) ^{cd}
真武汤组	6	3.78 g/(kg·d)	5.43(5.27,5.68) ^{bd}	4.61(3.78,4.79) ^{ad}
苓桂术甘汤组	6	3.24 g/(kg·d)	4.65(5.27,4.71) ^{cd}	6.75(5.74,24.07) ^{cd}
维拉帕米组	6	3.60 mg/(kg·d)	5.34(5.13,6.01) ^b	2.55(1.16,4.24) ^b
H			21.140	22.130
P			0.000	0.000

注:与模型组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$,^c $P>0.05$;与维拉帕米组比较,^d $P>0.05$ 。

2.1.3 7组大鼠心房组织病理学比较 空白组大鼠心房肌细胞呈现出完整的结构,排列有序;与空白组比较,模型组大鼠心房肌细胞形态不规则,结构异常,细胞之间的间隙显著增大,排列杂乱无章;与模型组比较,炙甘草汤组、桂枝甘草汤组、真武汤组、苓桂术甘汤组及维拉帕米组大鼠心房肌组织病理损伤有所减轻。(见图2)

图 2 7组大鼠心房组织病理学比较 ($\times 400$)

2.1.4 7组大鼠心房组织纤维化比较 空白组大鼠心房组织纤维化不显著;模型组大鼠CVF高于空白组,差异有统计学意义($P<0.01$);炙甘草汤组、桂枝甘草汤组、真武汤组、苓桂术甘汤组、维拉帕米组大鼠CVF均低于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$);炙甘草汤组、桂枝甘草汤组、真武汤组、苓桂术甘汤组大鼠CVF与维拉帕米组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见图2、表2)

表 2 7组大鼠 CVF 比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量	CVF/%
空白组	6		0.94±0.39
模型组	6		12.69±4.03 ^a
炙甘草汤组	6	12.78 g/(kg·d)	6.46±1.41 ^{bc}
桂枝甘草汤组	6	1.64 g/(kg·d)	6.56±1.12 ^{bc}
真武汤组	6	3.78 g/(kg·d)	8.05±0.87 ^{bc}
苓桂术甘汤组	6	3.24 g/(kg·d)	7.27±1.29 ^{bc}
维拉帕米组	6	3.60 mg/(kg·d)	5.47±2.21 ^b
F			18.920
P			0.000

注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$;与维拉帕米组比较,^c $P>0.05$ 。

2.1.5 7组大鼠血清IL-1 β 水平比较 模型组大鼠血清IL-1 β 水平高于空白组,差异有统计学意义($P<0.01$);炙甘草汤组、真武汤组、苓桂术甘汤组、维拉帕米组大鼠血清IL-1 β 水平均低于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$);炙甘草汤组、桂枝甘草汤组、真武汤组、苓桂术甘汤组大鼠血清IL-1 β 水平与维拉帕米组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见表3)

表 3 7组大鼠血清 IL-1 β 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量	IL-1 β /(pg/mL)
空白组	6		24.10±13.23
模型组	6		211.20±49.43 ^a
炙甘草汤组	6	12.78 g/(kg·d)	72.74±41.80 ^{bc}
桂枝甘草汤组	6	1.64 g/(kg·d)	166.40±40.62 ^c
真武汤组	6	3.78 g/(kg·d)	47.52±15.55 ^{bc}
苓桂术甘汤组	6	3.24 g/(kg·d)	84.45±72.67 ^{bc}
维拉帕米组	6	3.60 mg/(kg·d)	58.63±9.70 ^b
F			16.730
P			0.000

注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$;与维拉帕米组比较,^c $P>0.05$ 。

2.2 真武汤防治大鼠房颤的机制

2.2.1 5组大鼠房颤诱发时间和房颤持续时间比较 真武汤

高剂量组、维拉帕米组大鼠房颤诱发时间长于模型组($P<0.05$),房颤持续时间短于模型组($P<0.01$);真武汤高剂量组大鼠房颤诱发时间长于真武汤低剂量组,差异有统计学意义($P<0.05$);真武汤高剂量组大鼠房颤持续时间与真武汤低剂量组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);真武汤高、低剂量组大鼠房颤诱发时间、房颤持续时间与维拉帕米组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见表4)

表4 5组大鼠房颤诱发时间和房颤持续时间比较 [$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	n	给药剂量	房颤诱发时间/s	房颤持续时间/s
空白组	6			
模型组	6		3.46(2.29, 4.39)	7.40(6.23, 8.38)
真武汤低剂量组	6	3.78 g/(kg·d)	3.94(3.84, 4.01) ^d	5.65(4.85, 5.75) ^d
真武汤高剂量组	6	7.56 g/(kg·d)	5.24(4.56, 6.50) ^{aed}	4.45(1.58, 5.04) ^{bcd}
维拉帕米组	6	3.60 mg/(kg·d)	4.96(4.31, 6.02) ^a	2.42(1.17, 5.09) ^b
H			15.260	16.180
P			0.002	0.001

注:与模型组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与真武汤低剂量组比较,^c $P<0.05$;与维拉帕米组比较,^d $P>0.05$ 。

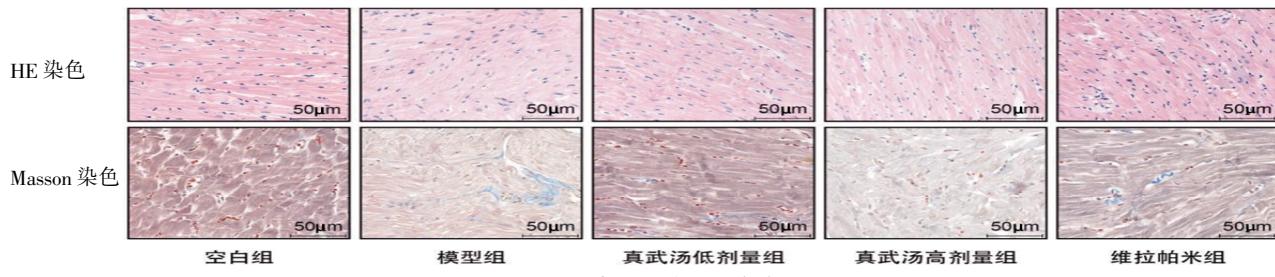
2.2.2 5组大鼠心房组织病理学变化比较 空白组大鼠心肌细胞形态未见明显变化,排列规则有序,细胞结构无明显改变;模型组大鼠心肌细胞扭曲变形,排列无序,细胞间隙增大;真武汤高剂量组、真武汤低剂量组和维拉帕米组大鼠心肌细胞病理损伤较模型组明显减轻,心肌细胞形态规则,排列整齐。(见图3)

2.2.3 5组大鼠心房组织纤维化比较 空白组大鼠胶原纤维无明显增生现象;模型组大鼠CVF高于空白组,差异有统计学意义($P<0.01$);真武汤高剂量组、真武汤低剂量组、维拉帕米组大鼠CVF均低于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$);真武汤高、低剂量组大鼠CVF与维拉帕米组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见图3、表5)

表5 5组大鼠CVF比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量	CVF/%
空白组	6		1.29±0.41
模型组	6		7.86±1.59 ^a
真武汤低剂量组	6	3.78 g/(kg·d)	3.53±1.69 ^{b,c}
真武汤高剂量组	6	7.56 g/(kg·d)	2.06±0.82 ^{b,c}
维拉帕米组	6	3.60 mg/(kg·d)	1.99±0.33 ^b
F			33.300
P			0.000

注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$;与维拉帕米组比较,^c $P>0.05$ 。

图3 5组大鼠心房组织病理形态变化 ($\times 400$)

2.2.4 5组大鼠血清IL-1 β 水平比较 模型组大鼠血清IL-1 β 水平高于空白组,差异有统计学意义($P<0.01$);真武汤高剂量组、真武汤低剂量组、维拉帕米组大鼠血清IL-1 β 水平均低于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$);真武汤低剂量组、维拉帕米组大鼠血清IL-1 β 水平与真武汤高剂量组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见表6)

表6 5组大鼠血清IL-1 β 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量	IL-1 β /(pg/mL)
空白组	6		22.01±16.03
模型组	6		240.30±19.67 ^a
真武汤低剂量组	6	3.78 g/(kg·d)	115.90±69.28 ^{b,c}
真武汤高剂量组	6	7.56 g/(kg·d)	69.06±50.96 ^b
维拉帕米组	6	3.60 mg/(kg·d)	105.90±47.03 ^{b,c}
F			19.350
P			0.000

注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$;与真武汤高剂量组比较,^c $P>0.05$ 。

2.2.5 5组大鼠心房组织NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白相对表达量比较 模型组大鼠心房组织NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白相对表达量高于空白组,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);真武汤低剂量组、真武汤高剂量组、维拉帕米组大鼠心房组织NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白相对表达量均低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);真武汤高、低剂量组大鼠心房组织NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白相对表达量与维拉帕米组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见图4、表7)

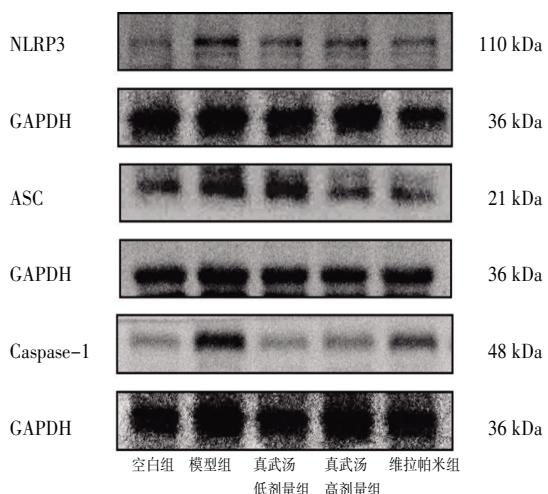


图4 大鼠心房组织NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白表达Western blotting图

表8 5组大鼠心房组织NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	给药剂量	NLRP3/GAPDH	ASC/GAPDH	Caspase-1/GAPDH
空白组	6		1.00±0.29	1.00±0.17	1.00±0.37
模型组	6		1.82±0.07 ^b	1.44±0.07 ^b	1.46±0.10 ^a
真武汤低剂量组	6	3.78 g/(kg·d)	1.24±0.11 ^{d,e}	1.24±0.11 ^{c,e}	0.95±0.29 ^{d,e}
真武汤高剂量组	6	7.56 g/(kg·d)	1.31±0.23 ^{d,e}	1.18±0.07 ^{d,e}	0.93±0.12 ^{d,e}
维拉帕米组	6	3.60 mg/(kg·d)	1.21±0.15 ^d	1.20±0.11 ^d	1.05±0.15 ^e
F			16.020	11.520	5.259
P			0.000	0.000	0.003

注:与空白组比较,^aP<0.05,^bP<0.01;与模型组比较,^cP<0.05,^dP<0.01;与维拉帕米组比较,^eP>0.05。

3 讨 论

临床研究表明,炙甘草汤、桂枝甘草汤、真武汤及苓桂术甘汤均能改善房颤患者临床症状^[9],减少出血^[10],稳定心室率^[11],降低复发^[12],改善西药治疗及手术治疗所引起的不良反应及并发症^[13]。炙甘草汤联合常规西药治疗房颤能减轻患者心悸、胸闷、胸痛等症状^[14],降低血浆同型半胱氨酸和超敏C反应蛋白等炎症因子水平^[11]。桂枝甘草汤主要用于治疗心阳亏虚之心悸。研究表明桂枝甘草汤在减少房颤发生次数、改善心房电生理指标方面效果显著^[10]。苓桂术甘汤主治脾阳虚水湿内停之心悸。苓桂术甘汤联合常规西药治疗能有效控制心室率^[9]。真武汤具有温阳利水之功,常用于治疗肾阳虚水饮内停导致的心悸。方中附子的有效成分关附甲素能有效抑制房颤大鼠心房氧化应激损伤,减少房颤发生次数^[15]。此外,有研究表明,附子的提取物二酯乌头碱不仅能显著减少心力衰竭大鼠心脏组织中胶原蛋白的沉积,抑制心肌纤维化,还能通过抑制核因子κB(nuclear factor kappa-B, NF-κB)信号通路降低炎症因子的表达,抑制心肌炎症反应^[16]。

目前,动物房颤模型的构建主要采用尾静脉注射Ach-CaCl₂混悬液的方法。Ach能与心房肌M型受体结合,活化钾通道,增加钾离子外排,加速复极,从而导致心肌细胞内Ca²⁺超载,钙通道短时失活,ICa内流降低。Ach与CaCl₂联用,能协同增加房颤易感性,诱发房颤多源折返,加速房颤进展^[17-18]。据此,本研究选用Ach-CaCl₂作为造模药物,构建房颤大鼠模型。给药组采用炙甘草汤、桂枝甘草汤、真武汤和苓桂术甘汤灌胃干预。维拉帕米属于钙离子拮抗剂,可作为阳性对照药物。结果表明,与模型组比较,经方干预后大鼠心房组织病理性损伤显著改善,纤维生成明显减少。而真武汤在延长房颤诱发时间,缩短房颤持续时间方面具有突出的作用,能促使大鼠更快恢复窦性心律。

炎症在房颤发病中至关重要,是导致心房电生理重塑和结构重塑的关键因素之一,且炎症与房颤易感性的增加密切相关^[19-20]。发作性房颤会引起心房炎症细胞浸润及巨噬细胞群增加。浸润性炎症细胞的分泌体激活会触发心房肌细胞及周围细胞发生稳定的促纤维化改变,进一步诱发心房组织纤维化^[21]。真武汤联合西药治疗心力衰竭可显著提高心功能,抑制炎症反应^[22]。本研究结果显示,模型组大鼠血清中促炎因子IL-1β显著升高,心肌间质中胶原纤维生成增加。与模型组比

较,炙甘草汤组、真武汤组和苓桂术甘汤组大鼠血清IL-1β水平下降,同时胶原纤维生成减少。炙甘草汤、真武汤、苓桂术甘汤具有抑制炎症反应的作用。

NLRP3炎症小体是目前研究和验证最为充分的炎症小体类型。NLRP3炎症小体由感受器蛋白NLRP3、接头蛋白ASC和效应子Caspase-1组成。NLRP3炎症小体的激活可介导IL-18和IL-1β释放,引起炎症反应。临幊上,IL-1β和IL-18等炎症指标的表达水平被认为与房颤的发展有关,可以作为消融后房颤复发的预测指标^[23]。在心肌细胞特异性NLRP3敲入小鼠模型中,活性增强的NLRP3炎症小体具有促心律失常作用,主要表现为缩短心房不应期、促进舒张期肌浆网异常Ca²⁺泄漏以及增加自发房性早搏^[24]。研究表明,房颤患者和房性心动过速犬模型中有活化的NLRP3炎症小体,进一步研究证实心肌细胞中NLRP3炎症小体特异性激活会促使异位放电和房颤持续底物形成^[24-25]。另一方面,特异性激活心脏成纤维细胞中NLRP3炎症小体可增加心肌成纤维细胞的活性,从而引起连接素过度表达,心房组织纤维化,并损害自主细胞功能^[6]。真武汤能改善糖尿病肾脏病小鼠模型肾组织炎症损伤,抑制NLRP3/Caspase-1信号通路中关键分子的表达,减轻肾脏的病理损伤^[26]。真武汤减轻炎症反应的潜在机制可能与调控NLRP3/Caspase-1通路相关。但真武汤能否通过该通路减轻房颤的炎症反应尚不明确。

综上所述,真武汤能延长房颤大鼠房颤诱发时间,缩短房颤持续时间,改善心房组织纤维化,降低IL-1β水平。这一过程可能与调控NLRP3/Caspase-1通路有关。

参考文献

- [1] TSAO C W, ADAY A W, ALMARZOOQ Z I, et al. Heart disease and stroke statistics: 2023 update: A report from the American heart association [J]. Circulation, 2023, 147(8):e93-e621.
- [2] CHUGH S S, HAVMOELLER R, NARAYANAN K, et al. Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: A global burden of disease 2010 study[J]. Circulation, 2014, 129(8): 837-847.
- [3] HINDRICKS G, POTPARA T, DAGRES N, et al. 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The task force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC[J]. Eur Heart J, 2021, 42(5):373-498.
- [4] BRUNDEL B J J M, AI X, HILLS M T, et al. Atrial fibrillation[J]. Nat Rev Dis Primers, 2022, 8:21.
- [5] NATTEL S, SAGER P T, HÜSER J, et al. Why translation from basic discoveries to clinical applications is so difficult for atrial fibrillation and possible approaches to

- improving it[J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(7):1616–1631.
- [6] YUAN Y, ZHANG H, XIA E W, et al. BMP2 diminishes angiotensin II-induced atrial fibrillation by inhibiting NLRP3 inflammasome signaling in atrial fibroblasts [J]. *Biomolecules*, 2024, 14(9): 1053.
- [7] 陈春林, 巩甜甜, 汤依群, 等. SD大鼠房颤模型的建立[J]. 实验动物科学, 2009, 26(3): 1–4.
- [8] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [9] 梁立男. 桂枝甘草汤联合稳心颗粒对房颤患者心功能及左心房电生理指标的影响[J]. 现代电生理学杂志, 2023, 30(1): 31–34.
- [10] TAO Q Q, XIAO G X, WANG T Y, et al. Identification of linoleic acid as an antithrombotic component of Wenxin Keli via selective inhibition of p-selectin-mediated platelet activation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 153: 113453.
- [11] 孙闪闪, 许祖建. 炙甘草汤对房颤患者左房重构及心功能的影响[J]. 云南中医中药杂志, 2023, 44(4): 55–59.
- [12] 王曾鹏, 匡志聃. 苓桂术甘汤加味治疗慢性心衰合并房颤60例[J]. 浙江中医杂志, 2023, 58(7): 508–509.
- [13] 朱怡怡, 王振兴. 中西医治疗心房颤动的研究进展[J]. 基层中医药, 2024, 3(10): 119–124.
- [14] 李哲山. 炙甘草汤对持续性心房颤动患者中医证候积分与心功能的影响[J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2023, 7(10): 81–83.
- [15] 郭巧, 孙建国, 黄璐, 等. 关附甲素抗氧化和抗房颤作用[J]. 中国药大学学报, 2015, 46(2): 235–241.
- [16] LIANG X, SU W Y, ZHANG W M, et al. An overview of the research progress on Aconitum carmichaelii Debx. Active compounds, pharmacology, toxicity, detoxification, and applications[J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 337 (Pt2): 118832.
- [17] 卢少平, 杜日映, 郑强荪. 乙酰胆碱对电刺激诱发房颤的影响[J]. 心脏杂志, 2002, 14(4): 290–291, 295.
- [18] GOETTE A, HONEYCUTT C, LANGBERG J J. Electrical remodeling in atrial fibrillation. Time course and mechanisms[J]. *Circulation*, 1996, 94(11): 2968–2974.
- [19] LI N, BRUNDEL B J J M. Inflammasomes and proteostasis novel molecular mechanisms associated with atrial fibrillation[J]. *Circ Res*, 2020, 127(1): 73–90.
- [20] HU Y F, CHEN Y J, LIN Y J, et al. Inflammation and the pathogenesis of atrial fibrillation[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2015, 12(4): 230–243.
- [21] COPPINI R, SANTINI L, PALANDRI C, et al. Pharmacological inhibition of serine proteases to reduce cardiac inflammation and fibrosis in atrial fibrillation[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1420.
- [22] 宋现丽, 韩金国, 张明建. 真武汤联合沙库巴曲缬沙坦治疗心力衰竭的效果观察[J]. 中国医学创新, 2024, 21(15): 14–18.
- [23] CABARO S, CONTE M, MOSCHETTA D, et al. Epicardial adipose tissue-derived IL-1 β triggers postoperative atrial fibrillation[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 893729.
- [24] YAO C X, VELEVA T, SCOTT L Jr, et al. Enhanced cardiomyocyte NLRP3 inflammasome signaling promotes atrial fibrillation[J]. *Circulation*, 2018, 138(20): 2227–2242.
- [25] XING Y X, YAN L M, LI X Y, et al. The relationship between atrial fibrillation and NLRP3 inflammasome: A gut microbiota perspective[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1273524.
- [26] 赵哲, 陈光顺, 白敏, 等. 基于NLRP3/ASC/Caspase-1通路探讨真武汤改善脾肾阳虚型糖尿病肾病炎症损伤的机制[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(7): 853–863.

(收稿日期: 2025-04-02 编辑: 蒋凯彪)

(上接第30页)

- [16] SHARMA D, SANDELSKIM M, TING J, et al. Correlations in trends of sinusitis-related online google search queries in the United States[J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2020, 34(4): 482–486.
- [17] 张秋莹, 李立明, 王帅星. 全凭静脉麻醉与吸入麻醉在慢性鼻窦炎患者鼻内窥镜手术中的应用研究[J]. 中国实用医刊, 2023, 50(21): 43–46.
- [18] 宋雪娇, 刘晓琳, 金安妍, 等. 木犀草素抗菌及消除耐药作用的研究进展[J]. 中国家禽, 2015, 37(17): 44–46.
- [19] GENDRISCH F, ESSERP R, SCHEMPP M, et al. Luteolin as a modulator of skin aging and inflammation[J]. *Biofactors*, 2021, 47(2): 170–180.

- [20] LI Q J, WU P, DU Q J, et al. cGAS-STING, an important signaling pathway in diseases and their therapy[J]. *Med Comm*, 2024, 5(4): e511.
- [21] WU Y R, ZHANG M, YUAN C, et al. Progress of cGAS-STING signaling in response to SARS-CoV-2 infection[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1010911.
- [22] ZHOU X M, WANG X H, LU L D, et al. Fibroblast growth factor 21 improves lipopolysaccharide-induced pulmonary microvascular endothelial cell dysfunction and inflammatory response through SIRT1-mediated NF- κ B deacetylation[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2022, 100(6): 492–499.

(收稿日期: 2025-07-06 编辑: 罗英姣)