

基于 TLR4/MAPK/NF- κ B 信号通路探讨红芪多糖对脂多糖诱导心肌细胞损伤的影响

徐艳妮^{1,2}, 孟楚滢^{1,2#}, 鲁美丽¹, 隋海娟², 张玲^{2*}

(1. 锦州医科大学心脑血管药物重点实验室, 辽宁锦州 121001; 2. 锦州医科大学基础医学院, 辽宁锦州 121001)

摘要: **目的** 探讨红芪多糖对脂多糖 (LPS) 诱导心肌细胞损伤的影响。**方法** 采用 MTT 法筛选红芪多糖对细胞的无毒性浓度 (20、40、80、160、320 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 分别确定 20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为红芪多糖低、中、高剂量。建立 LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 24 h) 诱导炎症损伤模型, 将细胞分为空白组、LPS 组、阳性对照药瑞沙托维组 (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 和红芪多糖低、中、高剂量组 (红芪多糖预处理 24 h 后给予 LPS 处理)。MTT 法检测细胞活性, ELISA 法检测细胞炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)、心肌损伤标志物 (LDH、CK) 水平, 免疫荧光法观察细胞 Toll 样受体 4 (TLR4) 膜定位及核因子 κ B (NF- κ B) 核转位, RT-qPCR 和 Western blot 法检测 TLR4/丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) /NF- κ B 信号通路基因、蛋白表达。**结果** 与空白组比较, LPS 组心肌细胞活性降低 ($P < 0.01$), TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、LDH、CK 水平升高 ($P < 0.01$), TLR4 膜表达与 NF- κ B 核转位水平升高 ($P < 0.01$), TLR4、p38 MAPK、ERK、JNK、NF- κ B mRNA 和 TLR4、p-p38 MAPK、p-ERK、p-JNK、p-NF- κ B、细胞核 NF- κ B 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), 细胞质 NF- κ B 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。与 LPS 组比较, 红芪多糖组及瑞沙托维组心肌细胞活性升高 ($P < 0.01$), TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、LDH、CK 水平降低 ($P < 0.01$), TLR4 膜表达与 NF- κ B 核转位水平降低 ($P < 0.01$), TLR4、p38 MAPK、ERK、JNK、NF- κ B mRNA 和 TLR4、p-p38 MAPK、p-ERK、p-JNK、p-NF- κ B、细胞核 NF- κ B 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 细胞质 NF- κ B 蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 红芪多糖可能通过抑制 TLR4/MAPK/NF- κ B 信号通路激活, 降低炎症反应, 从而改善 LPS 诱导心肌细胞损伤。

关键词: 红芪多糖; 脂多糖; 心肌损伤; 炎症反应; TLR4/MAPK/NF- κ B 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)05-1504-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.05.011

Effects of *Hedysarum polysaccharide* on lipopolysaccharide-induced cardiomyocyte injury based on TLR4/MAPK/NF- κ B signaling pathway

XU Yan-ni^{1,2}, MENG Chu-han^{1,2#}, LU Mei-li¹, SUI Hai-juan², ZHANG Ling^{2*}

(1. Key Laboratory for Cardiovascular and Cerebrovascular Drug Research, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effects of *Hedysarum polysaccharide* (HPS) on lipopolysaccharide (LPS) -induced cardiomyocyte injury. **METHODS** Cell viability was assessed using the MTT assay to determine non-toxic concentrations of HPS (20, 40, 80, 160, 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Among these, 20, 40 and 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were selected as low-dose (HPS-L), medium-dose (HPS-M), and high-dose (HPS-H) groups, respectively. An LPS-induced injury model was established with LPS at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h. Cells were divided into the control group, LPS group, positive control drug resatorvid group (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$), and HPS-L/-M/-H groups (cells were pre-treated with HPS for 24 h prior to LPS exposure). Cell viability was detected by the MTT assay; the levels of cellular

收稿日期: 2025-06-06

基金项目: 辽宁省科技厅自然科学基金指导计划项目 (2019-ZD-0837)

作者简介: 徐艳妮 (2001—), 女, 硕士在读, 研究方向为心血管药理。E-mail: 1953934522@qq.com

#共同第一作者: 孟楚滢 (1995—), 女, 硕士, 研究方向为心血管药理。E-mail: chuhan13940702370@163.com

*通信作者: 张玲 (1977—), 女, 教授, 研究方向为免疫药理与药品制剂。E-mail: fengling84@163.com

inflammatory factors (TNF- α , IL-1 β , IL-6) and myocardial injury markers (LDH, CK) were measured by ELISA; the membrane localization of Toll-like receptor 4 (TLR4) and nuclear translocation of nuclear factor κ B (NF- κ B) were observed by immunofluorescence assay; and the gene and protein expressions of the TLR4/mitogen-activated protein kinase (MAPK) /NF- κ B signaling pathway were detected by RT-qPCR and Western blot, respectively. **RESULTS** Compared with the control group, the LPS group showed decreased cardiomyocyte viability ($P < 0.01$), increased levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, LDH and CK ($P < 0.01$), increased TLR4 membrane expression and NF- κ B nuclear translocation ($P < 0.01$), and increased mRNA expressions of *TLR4*, *p38 MAPK*, *ERK*, *JNK* and *NF- κ B* as well as protein expressions of TLR4, p-p38 MAPK, p-ERK, p-JNK, p-NF- κ B and nuclear NF- κ B ($P < 0.01$), while the protein expression of cytoplasmic NF- κ B was decreased ($P < 0.01$). Compared with the LPS group, cardiomyocyte viability was increased in the HPS groups and the resatorvid group ($P < 0.01$), whereas the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, LDH and CK were also decreased ($P < 0.01$). TLR4 membrane expression and NF- κ B nuclear translocation were decreased ($P < 0.01$). Additionally, the mRNA expressions of *TLR4*, *p38 MAPK*, *ERK*, *JNK*, *NF- κ B* as well as the protein expressions of TLR4, p-p38 MAPK, p-ERK, p-JNK, p-NF- κ B and nuclear NF- κ B were all decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the protein expression of cytoplasmic NF- κ B was increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **CONCLUSION** HPS may improve LPS-induced cardiomyocyte injury by inhibiting the activation of the TLR4/MAPK/NF- κ B signaling pathway and reducing the inflammatory response.

KEY WORDS: *Hedysarum* polysaccharide; lipopolysaccharide; myocardial injury; inflammatory response; TLR4/MAPK/NF- κ B signaling pathway

脓毒症是由感染引发的全身炎症反应综合征^[1],其导致的脓毒症心肌病可使患者死亡率超过70%^[2]。脂多糖(lipopolaccharides, LPS)作为一种由脂质和多糖构成的内毒素^[3],是诱导心肌炎性损伤的关键致病因子,因其剂量可控性被广泛应用于实验模型的构建^[4]。目前,治疗脓毒症心肌病主要依赖抗微生物药、血管活性药物等,但长期使用易引发不良反应^[5]。近年来研究发现,中药活性成分在抗炎、抗氧化方面具有独特优势^[6-7],其中红芪多糖作为黄芪主要有效物质^[8],具有抗氧化^[9]、保护心肌^[10]作用,课题组前期发现它可改善LPS诱导的脓毒症心肌损伤^[11],但其具体机制仍需深入探索。本研究探索红芪多糖改善LPS诱导炎性心肌损伤的机制,以TLR4/MAPK/NF- κ B信号通路为核心研究靶点,旨在突破现有抗炎手段的局限,为开发基于天然多糖的新型心肌保护策略提供实验依据,并为其精准化应用与现代化研究注入新活力。

1 材料

1.1 药物 红芪多糖(货号A1583,纯度 $\geq 98\%$,成都曼斯特生物科技有限公司);瑞沙托维(货号IR0580,纯度 $\geq 98\%$,北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 细胞株 大鼠胚胎H9c2心肌细胞系,购自中国科学院上海细胞库,采用DMEM常规培养,

细胞密度达80%~90%时传代,取对数生长期者进行实验。

1.3 试剂 脂多糖、核蛋白提取试剂盒、DAPI溶液(货号L8880、EX1470、C0065,北京索莱宝科技有限公司);高糖DMEM细胞培养基(货号10-013-CM,美国Corning公司);BCA蛋白定量试剂盒(货号23227,美国赛默飞世尔科技公司);肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 ELISA检测试剂盒(货号H052-1-2、H002-1-2、H007-1-2,南京建成生物工程研究所);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶(creatine kinase, CK) ELISA检测试剂盒(货号ml059178、ml064272,上海酶联生物科技有限公司);反转录试剂盒[货号KR123,天根生化科技(北京)有限公司];Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)、GADPH、Lamin B抗体、HRP标记山羊抗兔IgG二抗(货号19811-1-AP、10494-1-AP、12987-1-AP、SA00001-2,武汉三鹰生物技术有限公司);核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)、细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinase, ERK)、c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal

kinase, JNK)、磷酸化-NF-κB (p-NF-κB)、磷酸化-p38 MAPK (p-p38 MAPK)、磷酸化-REK (p-REK) 和磷酸化-JNK (p-JNK) 抗体、Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (货号 AP0475、A0227、A4782、A4867、AP0475、AP0526、AP0472、AP0631、AS053, 武汉爱博泰克生物科技有限公司)。

1.4 仪器 超声破碎仪 (美国 Sonics & Materials 公司); 低温高速离心机、二氧化碳细胞孵箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DNM-9602G 酶标仪 (北京普朗新技术有限公司); 蛋白电泳仪、电泳槽、Trans-Blot SD Cell 型半干转仪、Universal Hood2 凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 第一阶段, 筛选红芪多糖有效质量浓度。分别采用不同质量浓度 (0、20、40、80、160、320 μg/mL) 红芪多糖处理细胞, 除空白组 (0 μg/mL) 外其余组均加入该类成分处理 24 h, 然后检测细胞活性。

第二阶段, 建立 LPS 损伤模型。将细胞分为空白组、LPS (1 μg/mL) 组、TLR4 抑制剂瑞沙托维组 (1 μmol/L) 和红芪多糖低、中、高剂量组 (20、40、80 μg/mL) 组。除空白组外其余各组预给药处理 24 h 后给予 LPS (1 μg/mL) 刺激 24 h^[12], 检测细胞活性、炎症因子水平及心肌酶指标。最终, 设置 4 个组别, 分别为空白组、LPS 组、红芪多糖 (80 μg/mL) 组及瑞沙托维组, 处理方案同第一阶段。

2.2 MTT 法检测细胞活性 每组设 5 个复孔, 细胞按“2.1”项下方法分组、处理, 每孔加入 10 μL MTT 溶液 (5 mg/mL) 孵育 2 h, 弃上清, 加入 150 μL

DMSO 振荡溶解甲瓩结晶, 在 570 nm 波长处测定光密度 (OD) 值, 计算细胞活性, 公式为细胞活性 = $[(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白对照}}) / (OD_{\text{空白组}} - OD_{\text{空白对照}})] \times 100\%$ 。

2.3 ELISA 法检测炎症因子水平 细胞按“2.1”项下方法分组、处理, 收集上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书, 根据标准曲线检测 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平。

2.4 ELISA 法检测心肌酶活性 按照 ELISA 试剂盒说明书, 根据标准曲线检测 LDH、CK 酶活性。

2.5 免疫荧光染色检测细胞中 TLR4、NF-κB 定位和表达 细胞接种于含玻片的培养板中, 按“2.1”项下方法分组、处理后固定, 检测 TLR4 时进行免通透处理, 检测 NF-κB 时采用 0.5% Triton X-100 通透 15 min, 5% BSA 封闭 30 min, 加入 TLR4 (1 : 100)、NF-κB (1 : 100) 一抗, 4 °C 孵育过夜, 再加入 Alexa Fluor 488 标记二抗 (1 : 200), 室温孵育 1 h。罗丹明标记的鬼笔环肽 (phalloidin, 1 : 80) 标记细胞骨架, 4', 6-二氨基-2-苯基吡啶 (DAPI, 10 μg/mL) 染核 10 min, 在荧光显微镜 (激发波长 DAPI 405 nm, Alexa Fluor 488 488 nm) 下观察, 采用 ImageJ 软件分析荧光强度。

2.6 RT-qPCR 法检测细胞中 TLR4、NF-κB、p38 MAPK、JNK、ERK mRNA 表达 细胞按“2.1”项下方法分组、处理后收集, TRIzol 法提取总 RNA 并逆转录为 cDNA, SYBR Green 法进行扩增, 反应条件为 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参, 2^{-ΔΔCT} 法计算目的基因 mRNA 相对表达量, 引物由北京天漠科技开发有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

| 基因 | 正向 | 反向 |
|----------|-----------------------------|------------------------------|
| TLR4 | 5'-TCTGAGCTTCAACCCCTGA-3' | 5'-TTGTCTCAATTTGACACCTGGA-3' |
| NF-κB | 5'-GAGACCTGGAGCAAGCCATT-3' | 5'-GGCTGCTCTCTATGGGAAGTTG-3' |
| p38 MAPK | 5'-GGCACTACAACCAGACAGTGG-3' | 5'-TCCCGCTCAGACGCATTATC-3' |
| JNK | 5'-CAGACCTAAGTACGCTGGCT-3' | 5'-TTCGCCTGACTGGCTTTAAGT-3' |
| ERK | 5'-TCGCCTGACTGGCTTTAAGT-3' | 5'-TTGGACCACATACACCATGCC-3' |
| GAPDH | 5'-CCCGCATCTTCTTGTGCACTG-3' | 5'-CGATACGGCCAAATCCGTTTC-3' |

2.7 Western blot 法检测细胞中 TLR4/MAPK/NF-κB 通路相关蛋白表达 细胞裂解后分步提取胞质或核蛋白, 胞质蛋白提取液冰浴裂解 10 min, 4 °C 离心, 获取胞质上清; 沉淀经核蛋白提取液重悬后再次离心, 获取核蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶

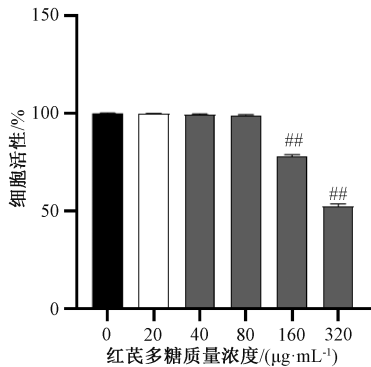
电泳分离后转至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 依次加入一抗磷酸化蛋白抗体 p-p38 MAPK (1 : 600)、p-JNK (1 : 3 000)、p-ERK (1 : 3 000)、p-NF-κB (1 : 600) 及非磷酸化蛋白抗体 TLR4 (1 : 2 000)、p38 MAPK (1 : 2 000)、JNK (1 : 1 000)、ERK (1 : 800)、NF-κB (1 : 1 000)、

GAPDH (1 : 2 000)、Lamin B (1 : 2 000), 4 ℃ 孵育过夜, 次日加 HRP 标记二抗 (1 : 3 000), 室温孵育 1.5 h, 化学发光显影, 采用 ImageJ 软件分析目标蛋白条带灰度值。以 GAPDH 或 Lamin B 为内参, 计算目的蛋白相对表达量。

2.8 统计学分析 通过 SPSS 25.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 2 组间比较采用 *t* 检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD 检验和 Games-Howell 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

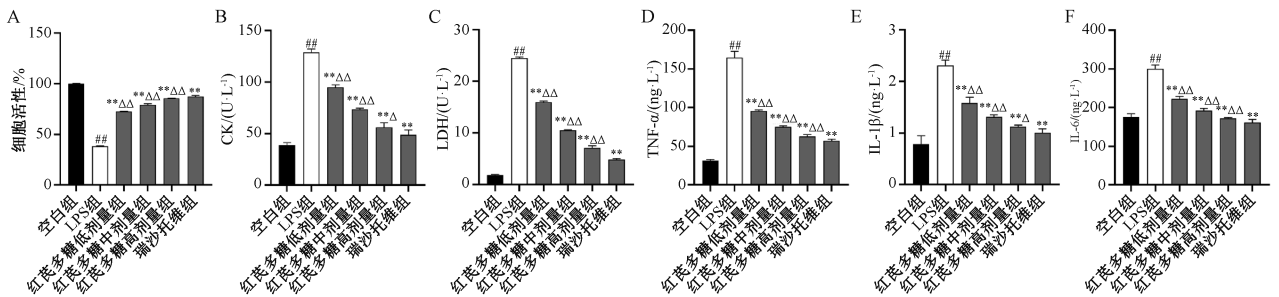
3.1 红芪多糖对 H9c2 心肌细胞活性的影响 如图 1 所示, 160、320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 红芪多糖处理 24 h 后抑制了细胞活性 ($P < 0.01$), 而 20~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 无细胞毒性 ($P > 0.05$), 故选择该质量浓度范围进行后续实验。



注: 与空白组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 1 红芪多糖对 H9c2 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Effect of *Hedysarum polysaccharide* on the viability of H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



注: 与空白组比较, ## $P < 0.01$; 与 LPS 组比较, ** $P < 0.01$; 与瑞沙托维组比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 2 红芪多糖对 LPS 诱导 H9c2 细胞活性、心肌酶活性、炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Effects of *Hedysarum polysaccharide* on viability, myocardial enzyme activities and inflammatory factor levels in LPS-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

比较, LPS 组细胞核内 NF- κ B 荧光表达升高 ($P < 0.01$); 与 LPS 组比较, 红芪多糖组和瑞沙托维组 NF- κ B 荧光表达降低 ($P < 0.01$); 瑞沙托维作用优

3.2 红芪多糖对 LPS 诱导 H9c2 细胞活性、心肌酶活性和炎症因子水平的影响 如图 2A 所示, 与空白组比较, LPS 组细胞活性降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 红芪多糖各剂量组和瑞沙托维组细胞活性升高 ($P < 0.01$); 瑞沙托维组作用优于红芪多糖各剂量组 ($P < 0.01$)。

如图 2B~2C 所示, 与空白组比较, LPS 组 LDH、CK 活性升高 ($P < 0.01$); 与 LPS 组比较, 红芪多糖各剂量组和瑞沙托维组 LDH、CK 活性降低 ($P < 0.01$); 瑞沙托维组作用优于红芪多糖各剂量组 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

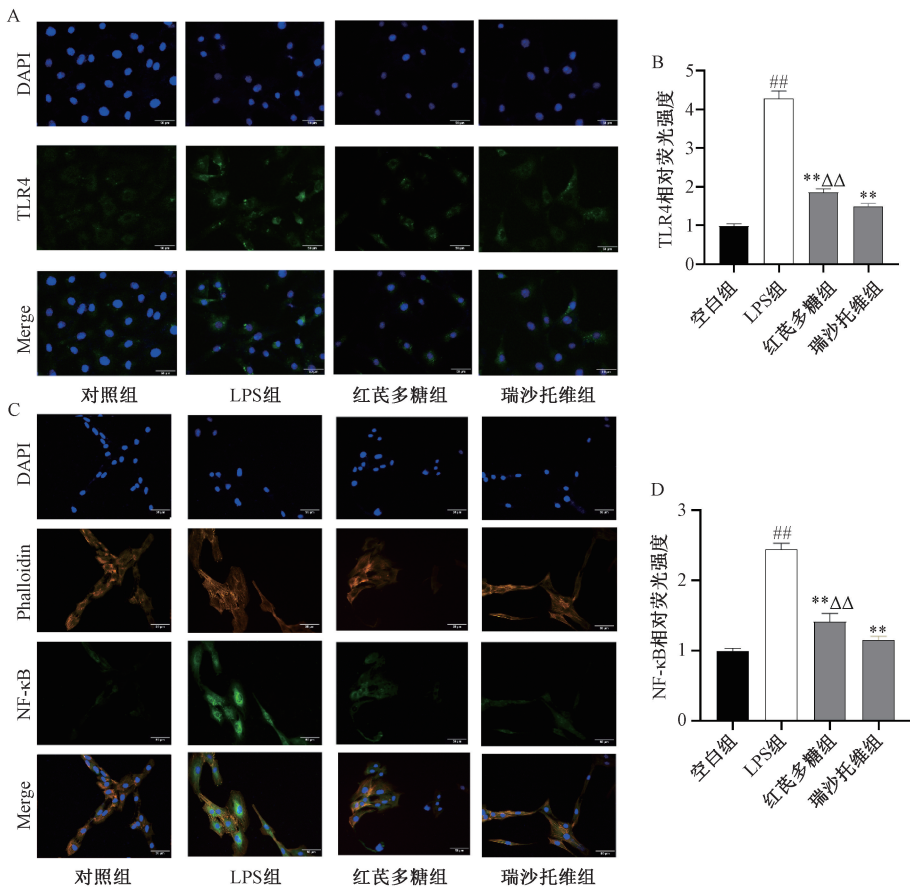
如图 2D~2F 所示, 与空白组比较, LPS 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平升高 ($P < 0.01$); 与 LPS 组比较, 红芪多糖各剂量组和瑞沙托维组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平降低 ($P < 0.01$); 瑞沙托维组作用优于红芪多糖各剂量组 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

3.3 红芪多糖对 LPS 诱导 H9c2 细胞中 TLR4、NF- κ B 细胞定位及荧光表达的影响 通过对细胞活性、心肌酶活性、炎症因子水平检测发现, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 红芪多糖干预效果较好, 故选择该质量浓度进行后续实验。

如图 3A~3B 所示, 蓝色为 DAPI 标记的细胞核, 绿色为相应抗体标记的 TLR4; 与空白组比较, LPS 组细胞膜上 TLR4 荧光表达升高 ($P < 0.01$); 与 LPS 组比较, 红芪多糖组和瑞沙托维组 TLR4 荧光表达降低 ($P < 0.01$); 瑞沙托维作用优于红芪多糖 ($P < 0.01$)。如图 3C~3D 所示, 蓝色为 DAPI 标记的细胞核, 橘红色为罗丹明鬼笔环肽标记的细胞骨架, 绿色为相应抗体标记的 NF- κ B; 与空白组

于红芪多糖 ($P < 0.01$)。

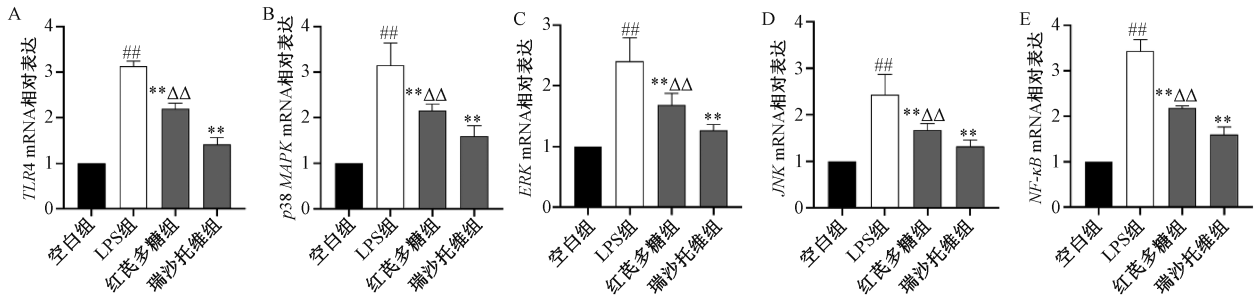
3.4 红芪多糖对 LPS 诱导 H9c2 细胞 TLR4/MAPK/NF- κ B 信号通路中相关基因表达的影响 如图 4 所



与空白组比较, $^{##}P < 0.01$; 与LPS组比较, $^{**}P < 0.01$; 与瑞沙托维组比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。

图3 红芪多糖对LPS诱导H9c2细胞中TLR4、NF-κB定位及荧光表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Effects of *Hedysarum* polysaccharide on the localization and fluorescence expressions of TLR4 and NF-κB in LPS-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



注: 与空白组比较, $^{##}P < 0.01$; 与LPS组比较, $^{**}P < 0.01$; 与瑞沙托维组比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。

图4 红芪多糖对LPS诱导的H9c2细胞TLR4 (A)、p38 MAPK (B)、ERK (C)、JNK (D)、NF-κB (E) mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

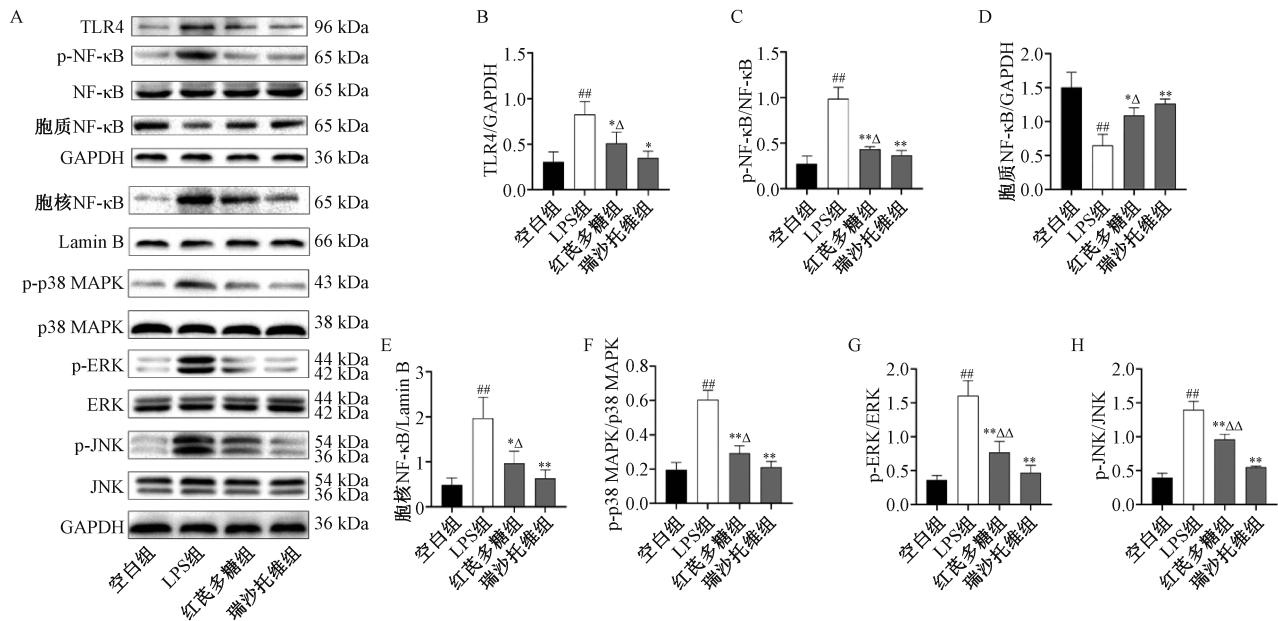
Fig. 4 Effects of *Hedysarum* polysaccharide on the mRNA expressions of TLR4 (A), p38 MAPK (B), ERK (C), JNK (D) and NF-κB (E) in LPS-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

示, 与空白组比较, LPS组TLR4、p38 MAPK、ERK、JNK、NF-κB mRNA表达升高 ($P < 0.01$); 与LPS组比较, 红芪多糖组和瑞沙托维组TLR4、p38 MAPK、ERK、JNK、NF-κB mRNA表达降低 ($P < 0.01$); 瑞沙托维作用优于红芪多糖 ($P < 0.01$)。

3.5 红芪多糖对LPS诱导H9c2细胞TLR4/MAPK/NF-κB信号通路相关蛋白表达的影响 如图5所示, 与空白组比较, LPS组TLR4、p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK、p-NF-κB/NF-κB和胞核内NF-κB蛋白表达升高 ($P < 0.01$), 胞浆内

NF- κ B 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)；与 LPS 组比较，红芪多糖组和瑞沙托维组 TLR4、p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK、p-NF- κ B/NF- κ B 和胞核内 NF- κ B 蛋白表达降低 ($P < 0.05$,

$P < 0.01$)，胞浆内 NF- κ B 蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；瑞沙托维作用优于红芪多糖 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。



注：A 为蛋白条带，B~H 分别为 TLR4、p-NF- κ B/NF- κ B、胞质 NF- κ B、胞核 NF- κ B、p38 MAPK/p-p38 MAPK、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 蛋白表达。与空白组比较， $\#P < 0.01$ ；与 LPS 组比较， $*P < 0.01$ ；与瑞沙托维组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 5 红芪多糖对 LPS 诱导 H9c2 细胞 TLR4、NF- κ B、p38 MAPK、ERK、JNK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 5 Effects of *Hedysarum polysaccharide* on protein expressions of TLR4, NF- κ B, p38 MAPK, ERK and JNK in LPS-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

4 讨论

脓毒症心肌病的病理进程与 TLR4 介导的过度炎症反应密切相关，而针对该通路的调控策略已成为重要研究方向^[5]，细胞活性降低、心肌酶活性升高表明心肌细胞受到损伤^[13]，并且炎症因子水平升高可促进炎症发生。本研究结果显示，LPS 组心肌细胞活性降低，心肌酶 (LDH、CK) 释放增加，炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) 水平升高，与 Chen 等^[14-15] 研究一致，表明心肌细胞炎性损伤模型制备成功。作为 TLR4 抑制剂，瑞沙托维可减少由 LPS 特异性激活 TLR4 而引起的炎症因子释放^[16]，故选择其作为阳性对照药。本研究结果显示，红芪多糖和瑞沙托维均可升高细胞活性，降低心肌酶活性和炎症因子水平，但前者效果不及后者，可能与中药成分起效慢、药效温和有关。

TLR4 是一种 Toll 样受体，在心肌细胞、巨噬细胞、树突状细胞等细胞表面均有表达，可直接识别结合某些病原体或其产物，激活下游信号通路。LPS 是 TLR4 最重要的配体^[17]，可在激动 TLR4 后激活下游 MAPK 家族的 p38 MAPK、ERK 和 JNK^[18]。

其中，p-p38 MAPK 和 p-ERK 可促进炎症因子表达；p-JNK 是胞浆内重要的信号分子，转移到细胞核后介导 MAPK 相关基因表达、炎症因子水平升高，从而导致心肌组织出现严重损伤^[19-20]；p-ERK 还可与 JNK 相互作用，促进 NF- κ B 入核与 DNA 结合，增强其转录活性，诱导促炎因子产生，导致炎症反应加剧^[21]，可见抑制 TLR4/MAPK/NF- κ B 信号通路可降低促炎因子水平，从而达到抑制炎症反应的目的^[22-23]。本研究结果显示，红芪多糖可降低 LPS 诱导心肌细胞 TLR4 基因、蛋白表达，降低 p38 MAPK、ERK、JNK、NF- κ B mRNA 表达，抑制 TLR4/MAPK/NF- κ B 信号通路相关蛋白的磷酸化，特别是降低 NF- κ B 在胞核内的表达。

综上所述，红芪多糖可通过抑制 TLR4/MAPK/NF- κ B 信号通路活化，抑制 NF- κ B 核转位，从而减少炎症因子释放，发挥抗炎作用，改善 LPS 诱导心肌细胞损伤。本研究首次揭示了红芪多糖通过干预 TLR4/MAPK/NF- κ B 信号通路来缓解心肌炎症损伤的作用机制，为拓展该类成分临床应用提供了新的理论支持。

参考文献:

- [1] 曹 钰, 柴艳芬, 邓 颖, 等. 中国脓毒症/脓毒性休克急诊治疗指南 (2018) [J]. 感染、炎症、修复, 2019, 20(1): 3-22.
- [2] Ravikumar N, Sayed M A, Poonsuph C J, *et al.* Septic cardiomyopathy: from basics to management choices[J]. *Curr Probl Cardiol*, 2021, 46(4): 100767.
- [3] Fux A C, Casonato Melo C, Michelini S, *et al.* Heterogeneity of lipopolysaccharide as source of variability in bioassays and LPS-binding proteins as remedy[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(9): 8395.
- [4] 李 潇, 颜海鹏, 肖政辉. 脓毒症动物模型的制备方法及其影响因素[J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(3): 207-212.
- [5] 胡 青, 曹小平, 黄 钰, 等. 脓毒性心肌病的发病机制及治疗[J]. 华西医学, 2020, 35(11): 1380-1385.
- [6] 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.
- [7] 黄 坡, 胡 晓, 方晓磊, 等. 中医药治疗脓毒性心肌病——从基础到临床带给我们的机遇和挑战[J]. 中国中医急症, 2023, 32(10): 1857-1861.
- [8] Xu C, Chen Y, Liu Z, *et al.* *Hedysarum polybotrys* polysaccharide attenuates renal inflammatory infiltration and fibrosis in diabetic mice by inhibiting the HMGB1/RAGE/TLR4 pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2023, 26(4): 493.
- [9] 刘善茹, 李成义, 刘书斌, 等. 红芪多糖提取、分离纯化及药理作用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(1): 261-269.
- [10] 侯剑飞, 罗雅月, 董能斌, 等. 红芪多糖对急性心肌梗死大鼠心肌氧化损伤及 ERK/Nrf2/HO-1 通路的影响[J]. 内科急危重症杂志, 2020, 26(2): 143-147.
- [11] 张 玲, 孙 媛, 高春华, 等. 红芪多糖对脂多糖诱导小鼠脓毒症心肌病的保护作用[J]. 中成药, 2022, 44(11): 3488-3492.
- [12] 孙芳园, 孟佳磊, 马宇慧, 等. 川芎嗪对脂多糖诱导大鼠心肌细胞炎症及氧化应激的作用[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(20): 3253-3258.
- [13] Chen X S, Wang S H, Liu C Y, *et al.* Losartan attenuates sepsis-induced cardiomyopathy by regulating macrophage polarization *via* TLR4-mediated NF- κ B and MAPK signaling[J]. *Pharmacol Res*, 2022, 185: 106473.
- [14] Chen X S, Cui J R, Meng X L, *et al.* Angiotensin- (1-7) ameliorates sepsis-induced cardiomyopathy by alleviating inflammatory response and mitochondrial damage through the NF- κ B and MAPK pathways[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 2.
- [15] Jian W, Ma H, Wang D, *et al.* Omaveloxolone attenuates the sepsis-induced cardiomyopathy *via* activating the nuclear factor erythroid 2-related factor 2[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 111: 109067.
- [16] Wu Y, Zhang Y, Tang X, *et al.* Synergistic anti-oxidant and anti-inflammatory effects of ceria/resatorvid co-decorated nanoparticles for acute lung injury therapy[J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 502.
- [17] Aluri J, Cooper M A, Schuettelpelz L G. Toll-like receptor signaling in the establishment and function of the immune system[J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1374.
- [18] 周文娜, 欧阳 健, 王洪伦. 脂多糖诱导大鼠心肌细胞 H9c2 炎症反应中 MAPKs 通路的时效关系研究[J]. 华西药理学杂志, 2022, 37(5): 503-506.
- [19] 单 莉, 黄 旭, 于 宁. TLR4/JNK 信号通路对高糖诱导的肾小球系膜细胞增殖、凋亡及炎症反应的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2022, 23(2): 142-145.
- [20] 胡 青, 曹小平, 黄 钰, 等. 脓毒性心肌病的发病机制及治疗[J]. 华西医学, 2020, 35(11): 1380-1385.
- [21] Plastira I, Bernhart E, Joshi L, *et al.* MAPK signaling determines lysophosphatidic acid (LPA) -induced inflammation in microglia[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 127.
- [22] Cai S, Chen J, Li Y. Dioscin protects against diabetic nephropathy by inhibiting renal inflammation through TLR4/NF- κ B pathway in mice[J]. *Immunobiology*, 2020, 225(3): 151941.
- [23] Liu T, Zheng W, Wang L, *et al.* TLR4/NF- κ B signaling pathway participates in the protective effects of apocynin on gestational diabetes mellitus induced placental oxidative stress and inflammation[J]. *Reprod Sci*, 2020, 27(2): 722-730.