

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.08.002

## 黄檀素对心肌缺血 / 再灌注损伤的治疗作用及机制研究 \*

王 军<sup>1,2</sup> 曹 艳<sup>2</sup> 蒋 敢<sup>2</sup> 赵美娜<sup>1</sup> 牟 菲<sup>1</sup> 蔺 瑞<sup>1</sup> 常 盼<sup>3Δ</sup> 邵治泓<sup>1Δ</sup>

(1 空军军医大学第一附属医院药剂科 陕西 西安 710032; 2 武警陕西省总队医院麻醉科 陕西 西安 710054;

3 西安医学院第二附属医院中心实验室 陕西 西安 710038)

**摘要 目的:**探讨黄檀素(DAL)对小鼠心肌缺血 / 再灌注(MI/R)损伤心肌的治疗作用及其作用机制。 **方法:**选择成年雄性 C57 BL/6J 小鼠随机分为假手术组(Sham)、模型组(MI/R)、地尔硫组(Diltiazem)和 DAL 低、中、高剂量组(10、30、90 mg/kg/d), 每组 10 只。结扎小鼠冠状动脉左前降支(LAD), 缺血 30 min, 再灌注 1 h 建立小鼠 MI/R 损伤模型。术后第 1 天起, Sham 组、MI/R 组小鼠均灌胃等体积生理盐水, Diltiazem 组、DAL 各剂量组小鼠灌胃相应药液, 每日 1 次, 连续 7 d。给药结束后检测小鼠血清中肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)活性及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)含量; 检测小鼠心肌组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量; 苏木精-伊红染色(HE)检测心肌损伤病理形态; Western Blot 检测心肌组织中 Akt 和 P-Akt 的蛋白水平表达变化; 超声检测左室舒张末内径(ESD)、左室舒张末容积(EDV)、射血分数(EF)和短轴缩短率(FS)。 **结果:** DAL 可以减轻小鼠血清中 CK-MB、LDH 活性及 TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量; 升高小鼠心肌组织中 SOD 活性, 减少 MDA 生成; 增加 p-Akt 的蛋白水平表达, 减轻心肌组织病理损伤, 改善心脏功能。 **结论:** DAL 可以通过增加 Akt 磷酸化促进心肌细胞存活, 减轻心肌组织病理损伤, 进而抑制小鼠 MI/R 损伤, 改善心脏功能, 最终发挥心肌治疗作用。

**关键词:**黄檀素; 心肌缺血 / 再灌注损伤; 心肌细胞; 心脏功能

**中图分类号:**R-33; R541.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)08-1408-06

## Study on the Therapeutic Effect and Mechanism of Dalbergin on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury\*

WANG Jun<sup>1,2</sup>, CAO Yan<sup>2</sup>, JIANG Gan<sup>2</sup>, ZHAO Mei-na<sup>1</sup>, MU Fei<sup>1</sup>, LIN Rui<sup>1</sup>, CHANG Pan<sup>3Δ</sup>, SHAO Zhi-hong<sup>1Δ</sup>

(1 Department of Pharmacy, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Anesthesiology, Shaanxi Armed Police Corps Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710054, China;

3 Department of central laboratory, Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

**ABSTRACT Objective:** To explore the therapeutic effect of Dalbergin (DAL) on myocardial ischemia/reperfusion (MI/R) injury in mice and its mechanism. **Methods:** Adult male C57 BL/6J mice were randomly divided into sham operation group, model group, diltiazem group, DAL low, medium, and high dose groups (10, 30, 90 mg/kg/d), with 10 mice in each group. The mouse left anterior descending coronary artery (LAD) was ligated, ischemia for 30 minutes, and reperfusion for 1 hour to establish a mouse MI/R injury model. From the first day after the operation, mice in the sham operation group and model group were intragastrically administered with equal volume of normal saline, and mice in each dose group of DAL were intragastrically administered with the corresponding liquid once a day for 7 consecutive days. After the administration, the creatine kinase isoenzyme(CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) in the serum of mice were detected; The superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content in mouse myocardial tissue were detection; The myocardial injury pathology were detected by hematoxylin-eosin (HE) staining; Western Blot detection of Akt and P -Akt in myocardial tissue protein level expression changes; Ultrasound detection of left ventricular end diastolic diameter (ESD), left ventricular end diastolic volume (EDV), ejection fraction (EF) and short axis shortening rate (FS). **Results:** DAL can reduce the activity of CK-MB and LDH and the content of TNF- $\alpha$  and IL-6 in the serum of mice, increase the activity of SOD in mouse myocardial tissue and reduce the production of MDA ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ), increase the expression of p-Akt protein, reduce pathological damage of myocardial tissue, and improve cardiac function. **Conclusions:** DAL can promote myocardial cell survival by increasing Akt phosphorylation, reduce myocardial tissue pathological damage, inhibit MI/R damage in mice, improve cardiac function and ultimately play a role in myocardial therapy.

**Key words:** Dalbergin; Myocardial ischemia/reperfusion injury; Cardiomyocytes; Heart function

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R541.4 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2021)08-1408-06

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81903837); 陕西省科技厅项目(2018SF-129); 西安医学院第二附属医院院级课题(19KY0113)

作者简介: 王军, 硕士, 研究方向: 麻醉药物药理学研究, 电话: 029-84778201, E-mail: 396744196@qq.com

Δ 通讯作者: 邵治泓, 主管药师, 研究方向: 心血管药理学研究, 电话: 84778201, E-mail: 461198829@qq.com;

常盼, 博士, 研究方向: 心血管生理学, 电话: 029-83553664, E-mail: 83646858@qq.com

(收稿日期: 2020-09-29 接受日期: 2020-10-24)

## 前言

缺血性心脏病(Ischemic heart disease, IHD)是导致人类死亡的主要原因之一,据世界卫生组织报道,截至2013年,全球死亡人数已上升至810万人<sup>[1]</sup>,其也成为中国居民死亡率增长最快的疾病<sup>[2]</sup>。急性心肌梗死发生时,溶栓治疗或经皮冠状动脉介入治疗是目前临床上减少心肌梗死面积最为有效的手段,但随之而来的心肌缺血/再灌注(Myocardial ischemia/reperfusion, MI/R)损伤在改善心肌供血的同时又加重了单纯心肌缺血所造成的损伤并导致左心室重塑,这也是急性心肌梗死后频繁发生心力衰竭和急性心肌梗死后死亡率接近10%的最关键原因<sup>[3]</sup>。故寻找有效且安全的治疗方案去预防和处理MI/R损伤的发生是治疗IHD的重要手段<sup>[4]</sup>,探讨MI/R损伤的发病机制,寻找潜在的作用靶点和作用药物,是当前亟待解决的一个重要问题。

传统中药治疗心血管疾病有悠久历史和较好疗效,应用中草药防治MI/R损伤及其作用机制研究是近年来心血管疾病研究领域的热点之一。降香(*Dalbergia Odorifera*, DO)又名降真香、名紫藤等,是我国最常见的珍贵红木品种。其"入血分而降气,治怒气而止血,消肿毒,治肋痛,故内服能行血破滞",故常用治疗瘀血痹阻心脉的胸痹刺痛和气滞血瘀所致的胸肋疼痛。大量研究表明,降香具有抗血栓,改善由异丙肾上腺素诱发的急性心肌缺血<sup>[5]</sup>;改善心肌毛细血管生成,改善心肌梗死预后的心室重构等作用<sup>[6]</sup>。黄檀素(*Dalbergin*, DAL)是降香中黄酮类的化合物成分之一,研究表明,降香水提物黄酮类成分具有较强的抗氧化、抗炎及松弛血管等作用<sup>[7]</sup>。因此,本文旨在探讨DAL治疗小鼠MI/R损伤的潜在作用机制,为临床上使用中药单体治疗MI/R损伤提供初步实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物和试剂

黄檀素(DAL)购自中国药品生物制品检定所(批号:110817);肌酸激酶同工酶(Creatine kinase-MB, CK-MB)、乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(Malondialdehyde, MDA)均购自上海西唐生物科技有限公司;鼠抗Akt、p-Akt和 $\beta$ -actin多克隆抗体购自美国Cell Signaling Technologies公司;蛋白提取试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒购自南京建成生物工程公司;化学发光液和聚偏氟乙烯(poly vinylidene fluoride, PVDF)膜购自密理博中国有限公司;伊红染料购自武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.2 仪器

超声诊断仪(美国GE公司);酶标仪(美国Thermo Fisher公司);石蜡切片机(德国Zeiss公司);电泳仪、转移槽、化学发光成像系统(美国Bio-RAD公司);光学显微镜、-80℃冰箱(美国Thermo公司);4℃冰箱(青岛海尔股份有限公司);紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);小动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司)。

### 1.3 实验动物

C57BL/6J雄性小鼠60只,空军军医大学实验动物中心提

供,体重 $23.0 \pm 2.0$  g,年龄 $8 \pm 0.5$ 周;分组饲养,严格控制环境温度、湿度、光照。生产许可证号:SCXK-(军)-2019-009。实验动物的使用符合空军军医大学动物实验使用规范,同时参照了国家卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)动物实验指南。

### 1.4 小鼠分组及MI/R损伤模型建立

采用随机数字表法将60只C57BL/6J小鼠随机分为6组:假手术组(Sham)、模型组(MI/R)、地尔硫卓组(Diltiazem, 16 mg/kg/d)和DAL低剂量组(DAL low-dose, 10 mg/kg/d)、DAL中剂量组(DAL medial-dose, 30 mg/kg/d)、DAL高剂量组(DAL high-dose, 90 mg/kg/d)组,每组10只。给药剂量按照预实验结果而定,分别于造模后灌胃给药1次,连续7 d, Sham组和MI/R组小鼠灌胃等量生理盐水。

小鼠称重后,采用1%戊巴比妥(0.15 mL/25 g)腹腔注射麻醉后,仰卧位固定于鼠板,气管插管并连接于小动物呼吸机,设置呼吸机频率为150次/min;潮气量为2.2 mL;吸呼比为1:2。小鼠四肢连接心电监护仪,75%酒精消毒胸骨左缘,分肌肉,断第3~5肋骨,打开胸腔,挑起心包,暴露心脏,在体式显微镜以冠状动脉左前降支(Left anterior descending, LAD)为标志,采用6-0带线缝合针在左心耳下方1-2 mm处进针,观察到心电图ST段持续弓背抬高,确定心肌缺血成功,稳定结扎30 min后松脱结扎线再灌注3 h, Sham组在没有冠状动脉结扎的情况下接受了胸廓切开术和心脏暴露。再灌注结束后收集心脏和血液,进行相关指标检测。

### 1.5 生化指标检测

于小鼠模型结束后收集小鼠动脉血液和心肌组织,室温静置30 min,以3000 rpm于4℃离心15 min后,取上清分装于-80℃备用;心脏取心尖组织,用生理盐水制成10%的心肌匀浆,离心后取上清。根据CK-MB、LDH、TNF- $\alpha$ 、IL-6、SOD和MDA试剂盒说明书进行检测。

### 1.6 病理学检测

1%戊巴比妥腹腔注射麻醉后摘除小鼠心脏,将心脏组织置于4%多聚甲醛中固定24 h;应用不同浓度乙醇(80%、90%、95%、100%)溶液对心肌组织做脱水处理之后浸入石蜡包埋并切5  $\mu$ m的厚度,苏木精-伊红染色(Hematoxylin-eosin staining, HE)检测心肌损伤病理形态,光学显微镜下观察并拍照记录。

### 1.7 组织蛋白提取

用预冷的PBS洗涤组织匀浆三次,配置裂解液:1 mL RIPA裂解液中加入10  $\mu$ L浓度为100 mM的蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂,混匀后冰上保存数分钟待用。向组织中加入100  $\mu$ L裂解液,于冰上静置约15 min后将液体转移至1.5 mL离心管中,静置10 min使组织充分裂解。之后于4℃离心机中12000 rpm离心20 min,转移上清液至另一个1.5 mL离心管中,即为蛋白原液。取10  $\mu$ L上清液采用BCA法测蛋白浓度,其余上清液分装转移到1.5 mL离心管中放于-70℃保存,避免反复冻融。

### 1.8 免疫印迹分析

将制备好的蛋白样本在SDS-PAGE上等量进行电泳,后将凝胶蛋白半湿法转移到聚偏氟乙烯(Poly vinylidene fluoride, PVDF)膜上,用5%的脱脂奶粉在37℃下封闭30 min, PVDF膜经纯化水洗净、滤纸吸干、一抗体孵育过夜后TBST漂洗4次,

每次 6 min, 再经稀释好的二抗在 37 °C 下孵育 30 min, 再次 TBST 漂洗 4 次, 每次 6 min。最后用 ECL 化学试剂发光显影, 定影, 拍照。

### 1.9 心脏功能检测

将小鼠提前胸部脱毛, 经异氟烷和氧气混合麻醉后, 小鼠置于恒温台上, 固定四肢, 记录小鼠心电、呼吸灯生理参数。当心率维持在 400-500 次 /min, 调整超声探头, 以获得较清晰图像, 然后于左室乳头肌水平测得左室舒张末内径(End-systolic dimension, ESD)、左室舒张末容积 (Enddiastolic volume, EDV)、射血分数(Ejection fraction, EF)和短轴缩短率(Fractional shortening, FS), 至少连续检测六个心动周期, 分析三个心动周期的相关指数并取平均值作为最终的检测结果。

### 1.10 数据处理

数据表示为平均值± 标准差(mean± SD), 所有计算均使

用 GraphPad Prism 7.0 版进行分析。两组比较用 t 检验, 三组或三组以上比较使用单因素方差分析(One Way ANOVA), 对于研究组之间的统计学比较差异, 进行 Bonferroni 事后检验校正。以  $P < 0.05$  认定差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组心肌酶活性检测结果

心脏因 MI/R 损伤后, 细胞内的 CK-MB、LDH 因细胞膜通透性的增高而大量释放到血液中, 可以作为临床和实验辅助诊断的敏感指标。与 Sham 组相比, MI/R 组血清中 LDH、CK-MB 水平明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与 MI/R 组相比, Diltiazem 组和 DAL 低、中、高剂量组可降低小鼠血清中的 CK-MB、LDH 水平 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 且具有统计学意义, 详见表 1。

表 1 DAL 对小鼠 MI/R 损伤后血清 CK-MB、LDH 的影响 (mean± SD, n=10)  
Table 1 Effect of DAL on serum CK-MB and LDH in MI/R mice (mean± SD, n=10)

Groups	CK-MB	LDH
Sham	110± 2.12	210± 1.34
MI/R	456± 2.19**	869± 1.30**
Diltiazem	310± 2.10 <sup>#</sup>	354± 1.05 <sup>#</sup>
DAL low-dose	403± 2.10 <sup>#</sup>	603± 1.45
DAL medial-dose	359± 2.19 <sup>#</sup>	540± 1.56 <sup>#</sup>
DAL high-dose	320± 2.13 <sup>#</sup>	389± 1.45 <sup>#</sup>

Note: vs. sham group, \*\* $P < 0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>#</sup> $P < 0.01$ .

### 2.2 各组生化指标检测结果

与 Sham 组相比, MI/R 组小鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量显著升高 ( $P < 0.01$ ), 心肌组织 SOD 含量显著降低 ( $P < 0.01$ ), 心肌组织 MDA 含量显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与 MI/R 组比较, Diltiazem 组

和 DAL 低、中、高剂量组可降低小鼠血清中的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 且具有统计学意义, 心肌组织 SOD 含量升高, 心肌组织 MDA 含量显著降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 详见表 2。

表 2 DAL 对小鼠 MI/R 损伤后 TNF- $\alpha$ 、IL-6、SOD、MDA 的影响 (mean± SD, n=10)  
Table 2 Effect of DAL on TNF- $\alpha$ , IL-6, SOD and MDA in MI/R mice (mean± SD, n=10)

Groups	TNF- $\alpha$	IL-6	SOD	MDA
Sham	22± 1.12	23± 1.30	269± 2.40	2.3± 0.30
MI/R	56± 1.19**	89± 1.30**	169± 2.30**	9.8± 0.30**
Diltiazem	31± 1.10 <sup>#</sup>	35± 1.00 <sup>#</sup>	235± 1.10 <sup>#</sup>	4.8± 1.00 <sup>#</sup>
DAL low-dose	48± 1.10 <sup>#</sup>	60± 1.00	180± 1.00	6.8± 1.00
DAL medial-dose	40± 1.19 <sup>#</sup>	54± 1.56 <sup>#</sup>	200± 1.56 <sup>#</sup>	5.9± 1.06 <sup>#</sup>
DAL high-dose	36± 1.13 <sup>#</sup>	44± 1.40 <sup>#</sup>	224± 1.40 <sup>#</sup>	5.5± 1.40 <sup>#</sup>

Note: vs. sham group, \*\* $P < 0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>#</sup> $P < 0.01$ .

### 2.3 各组心肌组织病理形态检测结果

Sham 组心肌组织的结构完整, 纹理清晰, 心肌纤维排列规则, 无明显细胞肿胀断裂, 核内物质分布均匀, 未见炎症细胞浸润, 无明显病理改变; 而 MI/R 组心肌呈局部坏死, 心肌组织出现断层, 纹理模糊, 心肌纤维走行紊乱, 间质重度肿胀, 并伴有大量炎性细胞浸润; Diltiazem 组和 DAL 高剂量组心肌细胞纹理清晰, 分布有序, 未见肿胀, 少见炎性细胞浸润。综上所述,

DAL 可以改善小鼠梗死区的心肌组织病理损伤, 见图 1。

### 2.4 各组心肌组织蛋白检测结果

Western blot 实验检测心肌组织蛋白 Akt 和 P-Akt 的信号通路。与 Sham 组相比, MI/R 组显著降低 P-Akt 蛋白水平的活性; 与 MI/R 组相比, Diltiazem 组和 DAL 高剂量组可上调 P-Akt 表达, 详见图 2。

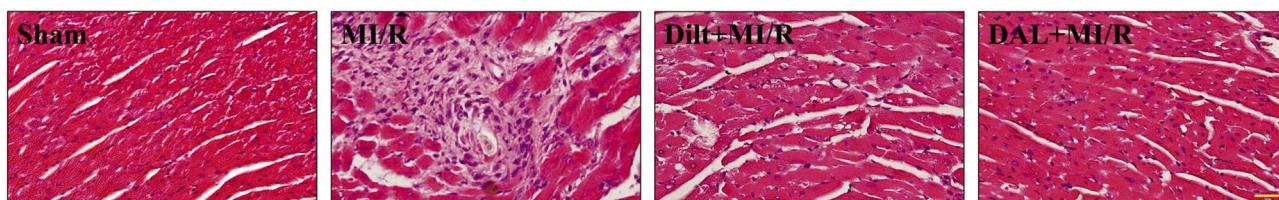


图1 DAL high-dose 对小鼠 MI/R 后心肌组织病理形态的影响(HE 染色, × 200)

Fig.1 Effect of DAL on myocardial pathological morphology in MI/R of mice. Representative photomicrographs of mice cardiac sections stained with hematoxylin and eosin (H&E× 200 magnification). n=2/group. Scale bar: 100 μm.

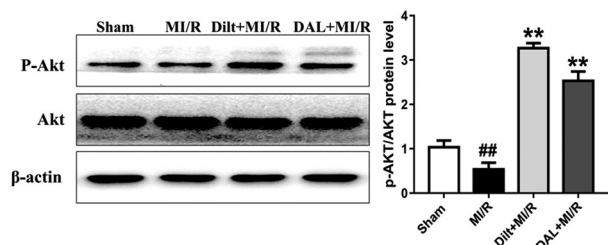


图2 DAL 对 P-Akt 蛋白表达的影响

Fig.2 The effect of DAL on the expression of P-Akt protein. Akt and P-Akt protein expressions were measured by western blot analysis. β-actin was used as a loading control. The protein signals were quantitated by densitometry, and the graph shows their relative levels. Values are represented as mean± SD from 3 independent experiments. ##*P*<0.01 vs. Sham, \*\**P*<0.05 vs. MI/R.

### 2.5 各组超声心动图检测结果

通过超声心动图检测小鼠 MI/R 后心脏功能, 与 Sham 组相比, MI/R 组 EF 和 FS 显著降低, EDV 和 ESD 显著增加, 可见心肌缺血引起小鼠左室收缩、舒张功能减弱、心功能紊乱; 与 MI/R 组相比, Diltiazem 组和 DAL 高剂量组小鼠左室心功能不同程度得到改善, 详见图 3。

### 3 讨论

伴随着冠脉内溶栓、冠脉搭桥手术和经皮冠状动脉介入等手段在临床治疗缺血性心脏病的广泛应用, 而继之出现的 MI/R 损伤又成为患者治疗后心脏功能恢复障碍的主要原因。部分患者冠脉再通成功后, 心肌由于遭受缺氧与缺血损失, 在恢复血液灌注期间, 受损的心肌不但不能恢复, 反而发生严重

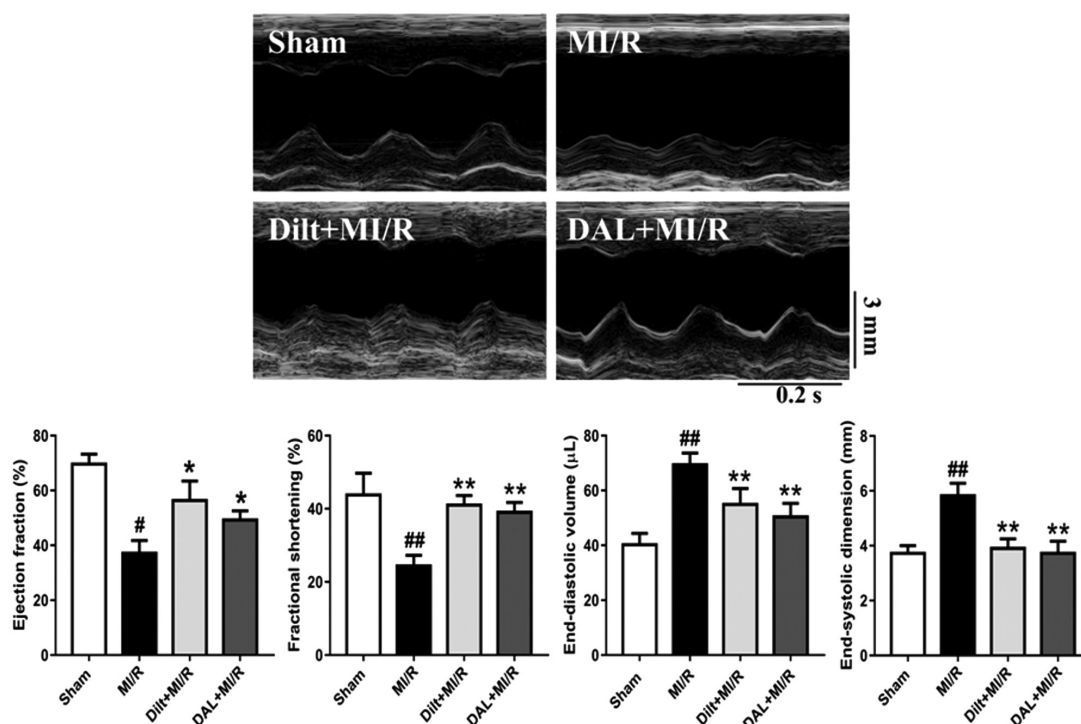


图3 DAL 对小鼠 MI/R 后心脏功能的影响

Fig.3 DAL improved cardiac functional in mice post-MI/R. Typical images of echocardiogram and parameters of heart function (EF, FS, ESD, EDV) assessed by echocardiography. Values are represented as mean± SD, n=8/group. #*P*<0.05, ##*P*<0.01 vs. Sham, \**P*<0.05, \*\**P*<0.01 vs. MI/R.

损伤甚至是不可逆的损伤<sup>[8]</sup>, 并出现进行性心脏功能下降, 同时病理报告结果显示心肌组织出现细胞肿胀以及炎症细胞浸润、肌纤维挛缩、断裂等病理变化, 即 MI/R 损伤<sup>[10]</sup>。目前, 临床上对 MI/R 损伤的防治措施主要是尽快消除心肌缺血的原因, 并及时有效地进行低压、低流和低温再灌注, 防止心肌由可逆

性损伤发展为不可逆性损伤。但 MI/R 损伤的病理生理过程复杂, 其发生机制尚未完全阐明, 但有大量文献显示 MI/R 的发生可能与细胞内活性氧的大量产生、中心粒细胞浸润、能量代谢障碍、心肌细胞凋亡等因素密切相关, 并涉及多种与细胞存活, 损伤修复和细胞因子释放有关的分子机制和信号通路<sup>[11]</sup>。因

此,探讨 MI/R 损失的病理机制,寻找有效的干预靶点和作用药物是治疗 MI/R 损伤的关键所在<sup>[12]</sup>。应用中药防治 MI/R 损伤及其作用机制研究是近年来心血管疾病研究领域的热点之一。现代药理学研究认为<sup>[13,14]</sup>,传统中药在治疗 MI/R 损伤时具有降低血液粘度、抗氧化、抑制炎症损伤、减少心肌细胞凋亡、促进血管新生和抑制钙超载等途径,发挥心肌保护作用。DAL 是从我国传统具有止血化痰,理气止痛作用的中药--降香中提取的主要的黄酮类化合物,具有抗凝血作用,可以明显提高冠脉流量、轻度增加心跳振幅、降低心率、改善心律不齐等确切疗效<sup>[15]</sup>。

本研究建立的小鼠 MI/R 损伤模型,监测心电图表现为 ST 段抬高,心率异常,T 波倒置或 Q 波异常,并且肉眼可见心肌左室前壁局部呈现苍白,提示模型建立成功<sup>[16]</sup>。研究表明,当心肌细胞膜的完整性遭到破坏后,细胞的通透性增加,胞内多种心肌酶会释放入血液中,其含量和消除时间不同,因此检测多种心肌酶能提供更全面的诊断信息,从而影响临床诊断和治疗心血管疾病<sup>[17]</sup>。此外,LAD 动脉堵塞使 CK-MB 和 LDH 等心肌酶水平明显升高<sup>[18]</sup>,所以,目前临床上将血清中 CK-MB 和 LDH 含量升高诊断为心肌缺血或心肌梗死的早期症状<sup>[19]</sup>。本研究表明,与 Sham 组相比,MI/R 组小鼠发生了一定程度的心肌损伤,血清 CK-MB、LDH 水平明显升高,与 MI/R 组相比,DAL 低、中、高剂量组可以显著降低小鼠 CK-MB、LDH 水平。除此之外,在小鼠 MI/R 损伤模型中,当心肌处于氧化应激时,直接可以引起脂质过氧化,间接激活促缺血和促凋亡的途径<sup>[20]</sup>。释放入血清中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 含量的增加均可导致心肌细胞凋亡和心脏功能异常;SOD 是保护心肌过氧化的抗氧化剂之一,维持机体氧化和抗氧化平衡,其活力的高低间接反映机体抗氧化能力的强弱<sup>[21]</sup>,心肌缺血时,活性氧的大量释放也使血液和组织中 SOD 含量减少,加重心肌细胞的损伤<sup>[22]</sup>;MDA 为脂质过氧化终产物,其水平不仅反应脂质过氧化速率和程度,还反应细胞损伤程度<sup>[23]</sup>。实验结果显示,与 Sham 组相比,MI/R 组小鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量显著升高,心肌组织 SOD 含量显著降低,MDA 含量升高;而与 MI/R 组比较,DAL 低、中、高剂量组可降低小鼠血清中的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量,升高心肌组织 SOD 含量,显著降低 MDA 含量。DAL 可改善心肌缺血损伤,发挥心肌保护作用。

心肌缺血能引起心肌组织超显微结构改变,可直观反映药物治疗 MI/R 损伤的有效性。本研究通过 HE 染色观察心肌组织形态变化,与 MI/R 组相比,DAL 高剂量组能明显改善小鼠心肌缺血病理损伤,减轻心肌坏死程度进而保护心肌细胞。

Akt 信号通路是生物体内信号转导的重要途径之一,参与调节细胞增殖、细胞存活和周期、葡萄糖代谢、蛋白质合成、分化和凋亡等一系列重要生命活动。Akt 信号通路通过其在心脏生长,血管生成和肥大中的作用,也是代谢性疾病和心血管系统疾病的关键参与者<sup>[24]</sup>,通过激活 Akt 信号通路可以调节脂质代谢、减轻炎症反应、缓解心肌纤维化和保护心肌细胞<sup>[25]</sup>。研究表明,在细胞实验中,通过腺病毒转入活性 Akt 基因后,可以明显地减少在缺氧缺血环境下的心肌细胞凋亡<sup>[26]</sup>;在动物实验中,转染大鼠心肌组织中腺病毒介导的 Akt 基因,可以明显减轻 MI/R 损伤后心肌梗死面积<sup>[27]</sup>。作为通路中心环节的 Akt,通过调控下游的多种效应分子和靶点对保护器官的 MI/R 中发挥

重要作用。可见,Akt 信号通路的激活可以减轻心肌细胞凋亡,进而缓解心肌缺血损伤,改善心脏功能。本研究通过 Western blot 检测心肌组织蛋白 Akt 和 P-Akt 的信号分子,DAL 高剂量组可明显上调 P-Akt 表达。

超声心动图是一种无创、准确度高的检查方法,在临床诊断冠心病中发挥着重要的作用。心脏功能正常状态下,心脏有节奏的舒张和收缩,一旦心肌受到损伤,心脏的舒张和收缩功能受限,则可引起运动异常。本研究超声心动图结果显示,与 Sham 组比较,MI/R 组小鼠左室张力减退,收缩减弱,提示左室运动减弱。DAL 治疗后,EF 和 FS 值显著升高,EDV 和 ESD 水平降低,表明 DAL 能调节心脏舒张和收缩功能,改善心脏功能异常。

综上所述,本研究证实 DAL 可以通过增加 Akt 磷酸化促进心肌细胞存活,减轻心肌组织病理损伤,进而抑制小鼠 MI/R 损伤,改善心脏功能,最终发挥心肌治疗作用。这些结果提示 DAL 可能是 MI/R 损伤治疗的潜在靶向作用药物之一,也为 DAL 临床治疗心肌损伤提供新的理论依据。

#### 参考文献(References)

- [1] Shepard D, VanderZanden A, Moran A, et al. Ischemic Heart Disease Worldwide, 1990 to 2013: Estimates From the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*, 2015, 8(4): 455-456
- [2] Yu D, Shu X O, Rivera E S, et al. Urinary Levels of Trimethylamine-N-Oxide and Incident Coronary Heart Disease: A Prospective Investigation Among Urban Chinese Adults [J]. *J Am Heart Assoc*, 2019, 8(1): e10606
- [3] Yellon D M, Hausenloy D J. Myocardial reperfusion injury[J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(11): 1121-1135
- [4] Monassier J P. Reperfusion injury in acute myocardial infarction. From bench to cath lab. Part I: Basic considerations [J]. *Arch Cardiovasc Dis*, 2008, 101(7-8): 491-500
- [5] 王洪波,梁晓光,史克勇,等.双香油的处方筛选及双香油对心肌缺血的影响[J].*沈阳药科大学学报*, 2006, (10): 663-667
- [6] Zheng X, Zhao X, Wang S, et al. Co-administration of *Dalbergia odorifera* increased bioavailability of *Salvia miltiorrhizae* in rabbits[J]. *Am J Chin Med*, 2007, 35(5): 831-840
- [7] Sehrawat A, Kumar V. Butein imparts free radical scavenging, anti-oxidative and proapoptotic properties in the flower extracts of *Butea monosperma*[J]. *Biocell*, 2012, 36(2): 63-71
- [8] Yellon D M, Hausenloy D J. Myocardial reperfusion injury[J].*N Engl J Med*, 2007, 357(11): 1121-1135
- [9] Benjamin E J, Virani S S, Callaway C W, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2018, 137(12): e67-e492
- [10] Hausenloy D J, Yellon D M. Targeting Myocardial Reperfusion Injury The Search Continues[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(11): 1073-1075
- [11] 梁丽梅,黄照河.心肌缺血再灌注损伤发生机制及防治的研究进展[J].*右江医学*, 2017, 45(03): 365-368
- [12] 王凯燕,刘振华,王渊博,等.激活 $\kappa$ -阿片受体抑制小鼠心肌缺血再灌注损伤的作用及机制 [J]. *现代生物医学进展*, 2019, 19(24): 4624-4627
- [13] Mu F, Duan J, Bian H, et al. Metabonomic Strategy for the Evalua-

- tion of Chinese Medicine *Salvia miltiorrhiza* and *Dalbergia odorifera* Interfering with Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rats[J]. *Rejuvenation Res*, 2017, 20(4): 263-277
- [14] Liu Q, Li J, Wang J, et al. Effects and mechanisms of chinese herbal medicine in ameliorating myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 925625
- [15] 高原, 咸玥桐, 张晓萌, 等. 降香化学成分与心血管药理作用研究进展 [C]. 中国商品学会第五届全国中药商品学术大会论文集, 2017
- [16] Gao E, Lei Y H, Shang X, et al. A novel and efficient model of coronary artery ligation and myocardial infarction in the mouse [J]. *Circ Res*, 2010, 107(12): 1445-1453
- [17] Solymoss B C, Bourassa M G, Fortier A, et al. Evaluation and risk stratification of acute coronary syndromes using a low cut-off level of cardiac troponin T, combined with CK-MB mass determination[J]. *Clin Biochem*, 2004, 37(4): 286-292
- [18] Li X, Shao D, Wang G, et al. Effects of different LAD-blocked sites on the development of acute myocardial infarction and malignant arrhythmia in a swine model[J]. *J Thorac Dis*, 2014, 6(9): 1271-1277
- [19] Zhang R, Fang W, Han D, et al. Clematichinenoside attenuates myocardial infarction in ischemia/reperfusion injury both in vivo and in vitro[J]. *Planta Med*, 2013, 79(14): 1289-1297
- [20] Gonzalez-Montero J, Brito R, Gajardo A I, et al. Myocardial reperfusion injury and oxidative stress: Therapeutic opportunities[J]. *World J Cardiol*, 2018, 10(9): 74-86
- [21] Duan J L, Wang J W, Guan Y, et al. Safflor yellow A protects neonatal rat cardiomyocytes against anoxia/reoxygenation injury in vitro[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(4): 487-495
- [22] Di Filippo C, Marfella R, Cuzzocrea S, et al. Hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rat increases infarct size associated with low levels of myocardial HO-1 during ischemia/reperfusion [J]. *Diabetes*, 2005, 54(3): 803-810
- [23] Franssen M, Lismont C. Peroxisomes and Cellular Oxidant/Antioxidant Balance: Protein Redox Modifications and Impact on Inter-organelle Communication[J]. *Subcell Biochem*, 2018, 89: 435-461
- [24] Very N, Vercoutter-Edouart A S, Lefebvre T, et al. Cross-Dysregulation of O-GlcNAcylation and PI3K/AKT/mTOR Axis in Human Chronic Diseases[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 602
- [25] 范亮亮, 马立宁, 彭元亮, 等. PI3K/AKT 信号通路与心力衰竭[J]. *生命科学研究*, 2015, 19(01): 85-90
- [26] Matsui T, Tao J, Del M F, et al. Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo [J]. *Circulation*, 2001, 104(3): 330-335
- [27] Westhoff M A, Faham N, Marx D, et al. Sequential dosing in chemosensitization: targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in neuroblastoma[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83128

(上接第 1501 页)

- [17] Fan M, Wang Q, Fang W, et al. Early Enteral Combined with Parenteral Nutrition Treatment for Severe Traumatic Brain Injury: Effects on Immune Function, Nutritional Status and Outcomes [J]. *Chin Med Sci J*, 2016, 31(4): 213-220
- [18] Vieira LV, Pedrosa LAC, Souza VS, et al. Incidence of diarrhea and associated risk factors in patients with traumatic brain injury and enteral nutrition[J]. *Metab Brain Dis*, 2018, 33(5): 1755-1760
- [19] Swann OG, Kilpatrick M, Breslin M, et al. Dietary fiber and its associations with depression and inflammation[J]. *Nutr Rev*, 2020, 78(5): 394-411
- [20] Mahmood T, Guo Y. Dietary fiber and chicken microbiome interaction: Where will it lead to?[J]. *Anim Nutr*, 2020, 6(1): 1-8
- [21] 任传斌, 徐莉蓉, 邢鲁艳, 等. 早期肠内营养支持对重型颅脑损伤患者的临床效果观察[J]. *西北国防医学杂志*, 2013, 34(1): 42-44
- [22] 王瑞刚, 邱涵坤, 程爱斌, 等. 膳食纤维对弥漫性脑损伤大鼠肠黏膜屏障的保护作用[J]. *肠外与肠内营养*, 2012, 19(3): 164-167
- [23] 田拂晓, 王兆娟, 朱智云, 等. 含谷氨酰胺肠内营养及奥曲肽对老年重症急性胰腺炎患者肠黏膜屏障的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2020, 40(15): 3221-3224
- [24] Kadry MO, Megeed RA. Probiotics as a Complementary Therapy in the Model of Cadmium Chloride Toxicity: Crosstalk of  $\beta$ -Catenin, BDNF, and StAR Signaling Pathways[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2018, 185(2): 404-413
- [25] Lahner E, Bellisario C, Hassan C, et al. Probiotics in the Treatment of Diverticular Disease. A Systematic Review [J]. *J Gastrointest Liver Dis*, 2016, 25(1): 79-86
- [26] Fontan  L, Benaiges D, Goday A, et al. Influence of the microbiota and probiotics in obesity [J]. *Clin Investig Arterioscler*, 2018, 30(6): 271-279
- [27] P rtty A, Rautava S, Kalliom ki M. Probiotics on Pediatric Functional Gastrointestinal Disorders[J]. *Nutrients*, 2018, 10(12): 1836
- [28] Lee ES, Song EJ, Nam YD, et al. Probiotics in human health and disease: from nutraceuticals to pharmabiotics[J]. *J Microbiol*, 2018, 56(11): 773-782
- [29] 白东, 王永红, 全海波. 重型颅脑损伤患者术后应用益生菌联合膳食纤维的肠内营养对肠黏膜屏障的保护作用[J]. *中国药物与临床*, 2018, 18(7): 1152-1154
- [30] Agamennone V, Krul CAM, Rijkers G, et al. A practical guide for probiotics applied to the case of antibiotic-associated diarrhea in The Netherlands[J]. *BMC Gastroenterol*, 2018, 18(1): 103