

齿阿米素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究

付海荣¹, 谭家华², 邓雪松¹, 李晶³, 张永慧¹, 庞毅⁴ (1. 重庆三峡医药高等专科学校基础医学部, 重庆 404120; 2. 重庆三峡医药高等专科学校公共基础部, 重庆 404120; 3. 重庆三峡中心医院中心实验室, 重庆 404120; 4. 重庆三峡医药高等专科学校抗肿瘤天然药物工程中心, 重庆 404120)

摘要: **目的** 探讨齿阿米素对大鼠心肌缺血再灌注损伤(MI/RI)的保护作用及其机制。**方法** 将60只大鼠随机分为假手术组、模型组、复方丹参片组(阳性药组, 200 mg·kg⁻¹)及齿阿米素高、中、低剂量组(4、2、1 mg·kg⁻¹), 每组10只。大鼠灌胃给药, 每日1次, 连续7 d。末次给药后24 h, 采用左冠状动脉前降支结扎法建立MI/RI大鼠模型。造模2 h后, 记录各组大鼠的左室舒张末期内压(LVEDP)、左室收缩内压(LVSP)、左室内压最大上升/下降速率(LV±dp/dt_{max})及平均动脉压(MABP); 测定大鼠血清乳酸脱氢酶(LDH)、C反应蛋白(CRP)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)含量及大鼠心肌组织超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)及总抗氧化能力(T-AOC)水平; 采用HE染色法观察大鼠心肌组织病理学形态变化; RT-PCR法检测大鼠心肌组织核转录因子-κB(NF-κB)、NF-κB抑制蛋白α(IκBα)及IκB激酶β(IKKβ)mRNA的表达水平; Western Blot法检测大鼠心肌组织p65、p-p65、IκBα、p-IκBα、IKKβ及p-IKKβ蛋白的表达水平。**结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠心脏的LVEDP明显升高($P<0.01$), LV±dp/dt_{max}、LVSP及MABP明显下降($P<0.01$); 血清中的LDH、CRP、CK及CK-MB活性明显增加($P<0.01$); 心肌组织纤维排列紊乱, 有核固缩、溶解现象, 有炎性细胞浸润; 心肌组织的SOD、GSH-Px及T-AOC水平显著降低($P<0.01$), MDA含量显著增加($P<0.01$); 心肌组织的NF-κB、IKKβ mRNA表达水平显著上调($P<0.01$), IκBα mRNA表达水平显著下调($P<0.01$); 心肌组织的p-p65、p-IKKβ蛋白表达水平显著上调($P<0.01$), p-IκBα蛋白表达水平显著下调($P<0.01$)。与模型组比较, 齿阿米素高、中剂量组大鼠心脏的LVEDP明显降低($P<0.01$), LV±dp/dt_{max}、LVSP及MABP明显升高($P<0.05$, $P<0.01$); LDH、CRP、CK及CK-MB活性明显下降($P<0.01$); 心肌组织病理损伤明显改善; 心肌组织SOD、GSH-Px及T-AOC水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$), MDA含量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$); 心肌组织NF-κB、IKKβ mRNA表达水平明显下调($P<0.01$), IκBα mRNA表达水平明显上调($P<0.01$); 心肌组织p-p65、p-IKKβ蛋白表达水平明显下调($P<0.01$), p-IκBα蛋白表达水平明显上调($P<0.01$)。**结论** 齿阿米素对大鼠心肌缺血再灌注损伤具有保护作用, 其作用机制与抗氧化应激和抑制NF-κB信号通路有关。

关键词: 齿阿米素; 心肌缺血再灌注损伤; 氧化应激; NF-κB信号通路; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)09-1238-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.09.002

The Protective Effects of Visnagin on Rats with Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury and the Underlying Mechanism

FU Hairong¹, TAN Jiahua², DENG Xuesong¹, LI Jing³, ZHANG Yonghui¹, PANG Yi⁴ (1. Department of Basic Medicine, Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China; 2. Department of Pharmacy, Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China; 3. Central Laboratory, Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404120, China; 4. Center for Natural Anti-tumor Medicine Engineering, Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China)

收稿日期: 2020-12-02

作者简介: 付海荣, 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 心血管药理。Email: lemonfhr@163.com。通信作者: 谭家华, 男, 副教授, 研究方向: 运动生理学。Email: 183162834@qq.com。

基金项目: 重庆市卫生计生委中医药科技项目(ZY201703078)。

Abstract: Objective To explore the protective effective of visnagin on rats with myocardial ischemia and reperfusion injury (MI/RI) and its mechanism. **Methods** Sixty rats were divided into 6 groups randomly: Sham control group, model group, positive control group (*Fufang Danshen*, 200 mg·kg⁻¹) and visnagin 4, 2 and 1 mg·kg⁻¹ groups. The rats in each group were given corresponding drugs once a day for 7 days. After 24 h of the last administration, the rat model of MI/RI was established by ligating the anterior descending branch of the left coronary artery. After 2 h of the modeling, the left ventricular end diastolic pressure (LVEDP), left ventricular systolic pressure (LVSP), left ventricular maximum rising/dropping rate (LV±dp/dt_{max}) and the mean arterial pressure (MABP) of the rats in each group were recorded. The biochemical methods were used to detect the contents of LDH, CRP, CK and CK-MB in serum of rats and the levels of SOD, GSH-Px, MDA and T-AOC in myocardium tissue of rats. H&E staining was used to observe the changes of myocardial morphology. The expression levels of NF-κB, IκBα and IKKβ mRNA in myocardial tissue of rats were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and p65, p-p65, IκBα, p-IκBα, IKKβ and p-IKKβ protein were detected by Western Blot. **Results** Compared with the Sham control group, the LVEDP of rats in model group was raised ($P < 0.01$), the LV±dp/dt_{max}, LVSP and MABP were reduced ($P < 0.01$); the contents of LDH, CRP, CK and CK-MB in serum were increased ($P < 0.01$); the arrangement of myocardial fiber was disordered, the nuclear pyknosis, dissolution and inflammatory cell were observed; the activities of SOD, GSH-Px and T-AOC in myocardial tissue were decreased ($P < 0.01$), the concentration of MDA was increased ($P < 0.01$); the expression levels of NF-κB and IKKβ mRNA in myocardial tissue were up-regulated ($P < 0.01$), IκBα mRNA was down-regulated ($P < 0.01$); p-p65 and p-IKKβ protein was up-regulated ($P < 0.01$), p-IκBα protein was down-regulated ($P < 0.01$). Compared with the model control group, the LVEDPs of the rats in visnagin 4 mg·kg⁻¹ group and 2 mg·kg⁻¹ group were reduced ($P < 0.01$), LV±dp/dt_{max}, LVSP and MABP were raised ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the contents of LDH, CRP, CK and CK-MB in serum were decreased ($P < 0.01$); the pathological injury of myocardial tissue was ameliorated obviously; the activities of SOD, GSH-Px and T-AOC in myocardial tissue were increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the concentrations of MDA were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the expression levels of NF-κB and IKKβ mRNA in myocardial tissue were down-regulated ($P < 0.01$), IκBα mRNA was up-regulated ($P < 0.01$), p-p65 and p-IKKβ protein was down-regulated ($P < 0.01$), p-IκBα protein was up-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion** Visnagin has protective effects on MI/RI in rats, and its mechanism may be related to antioxidant stress and inhibition of NF-κB signaling pathway.

Keywords: Visnagin; myocardial ischemia and reperfusion injury; oxidative stress; NF-κB signaling pathway; rats

心肌缺血是临床上常见的因心肌供血绝对或相对不足所导致的心血管疾病,表现为心前区疼痛、心悸、气短,甚至出现心肌坏死,若救治不及时,致残率、死亡率极高^[1-2]。目前,对于心肌缺血主要采取扩管、溶栓等恢复心脏血供的救治措施,但由于治疗过程中出现的缺血再灌注损伤,严重影响了治疗效果^[3-4]。因此,有效防止和缓解心肌缺血再灌注损伤(Myocardial ischemia and reperfusion injury, MI/RI),是提高心肌缺血救治效率亟需解决的问题。研究^[5-6]表明,MI/RI与炎症、凋亡、细胞自噬、钙超载及过氧化应激等因素密切相关。齿阿米素(Visnagin)又称甲氧苄圈素、阿密苄圈素等,为伞形科植物阿米芹(*Ammi visnaga* L.)和毛茛科植物兴安升

麻[*Cimicifuga dahurica* (Turz.) Maxim.]等中草药植物的根茎提取物,具有抗痉挛、抗凝血、扩张血管、抑制阿霉素引起的心脏毒性,以及抑制黑色素瘤细胞增殖等药理作用^[7-11]。本研究拟建立MI/RI大鼠模型,观察齿阿米素对大鼠MI/RI的保护作用,并探讨其对氧化应激和核转录因子-κB(NF-κB)信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 动物 健康雄性SD大鼠60只,9~10周龄,清洁级,体质量220~250 g,由成都达硕实验动物有限公司提供,生产许可证号:SCXK(川)2015-030。饲养条件:室温为22~25℃,湿度为55%~65%,

12 h/12 h 光暗循环, 自由摄食饮水, 适应性饲养 1 周后进行实验。

1.2 药物 齿阿米素(纯度 $\geq 98\%$), 批号: wkq-06947, 购自四川省维克奇生物科技有限公司, 临用前用 0.5%羧甲基纤维素钠溶液配制为混悬液。复方丹参片, 规格: 每片 0.32 g, 批号: E5A024, 由广州白云山和记黄埔中药有限公司提供, 临用前研磨为粉末, 用 0.5%羧甲基纤维素钠溶液配制为混悬液。戊巴比妥钠, 批号: SIGMA-P3761, 购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 临用前用生理盐水配制。

1.3 试剂 乳酸脱氢酶(LDH, 批号: 20190316)、C 反应蛋白(CRP, 批号: 20181205)、肌酸激酶(CK, 批号: 20190412)、肌酸激酶同工酶(CK-MB, 批号: 20190125)、超氧化物歧化酶(SOD, 批号: 20190328)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px, 批号: 20181115)、丙二醛(MDA, 批号: 20190502)、总抗氧化能力(T-AOC, 批号: 20190425)检测试剂盒, 均为南京建成生物工程研究所产品; BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号: 20190518)、NP-40 蛋白裂解液(批号: 20190107)、彩色预染蛋白 Marker(批号: 20190113)、SDS 凝胶套装(批号: 20190318)、超敏 ECL 显色液(批号: 20190519), 均购自武汉博士德生物工程有限公司; 兔抗 p65(批号: 20190506)、p-p65(批号: 20190610)、NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B α , 批号: 20190525)、p-I κ B α (批号: 20190602)、I κ B 激酶 β (IKK β , 批号: 20190615)、p-IKK β (批号: 20190320)、 β -actin(批号: 20190318)一抗及 HRP 标记的羊抗兔 IgG(H+L)二抗(批号: 20190110), 均由美国 Affinity Biosciences 公司提供; TriQuick Reagent 总 RNA 提取试剂盒(批号: 20190120)、逆转录试剂盒(批号: 20190115)及琼脂糖(批号: 20190220), 均购自北京索莱宝科技有限公司; RT-PCR 实验所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成。

1.4 主要仪器 BL-420F 型生物机能实验系统、HX-300S 型动物呼吸机, 成都泰盟科技有限公司; UV759 型紫外可见分光光度计, 上海高致精密仪器有限公司; FA2204B 型电子分析天平, 上海精科天平厂; 凝胶成像分析系统、水平电泳仪、垂直电泳仪及 PCR 仪, 均为美国 Bio-Rad 公司产品; BX43 型显微镜, 奥林巴斯(中国)有限公司。

1.5 分组、给药及模型复制 将 60 只 SD 雄性大鼠随机分为假手术组、模型组、复方丹参片组(阳性药

组, 200 mg $\cdot$ kg $^{-1}$)及齿阿米素高、中、低剂量组(4、2、1 mg $\cdot$ kg $^{-1}$)^[12], 每组 10 只。按照上述剂量灌胃给药, 每天 1 次, 连续 7 d; 假手术组和模型组大鼠灌胃给予 0.5%羧甲基纤维素钠溶液 10 mL $\cdot$ kg $^{-1}$ 。

末次给药后, 大鼠禁食不禁水 24 h, 采用左冠状动脉前降支结扎法建立 MI/RI 大鼠模型^[13]。具体操作如下: 用 4.0%戊巴比妥钠(1 mL $\cdot$ kg $^{-1}$)腹腔注射麻醉大鼠, 仰卧位固定于手术板上, 剪去颈部和胸部被毛, 并用碘伏消毒处理。于大鼠颈部正中纵切, 分离气管, 并与小动物呼吸机连接建立人工通气; 然后分离右侧颈总动脉, 并插管至左心室, 连接 BL-420F 型生物机能实验系统。记录大鼠左室舒张末期内压(LVEDP)、左室收缩内压(LVSP)、左室内压最大上升/下降速率(LV $\pm$ dp/dt $_{\max}$)及平均动脉压(MABP)。待大鼠血压记录平稳后, 在左胸部搏动明显处逐层打开胸腔和心包膜, 轻轻将心脏抬起, 于左冠状动脉前降支下穿线并结扎; 30 min 后将结扎线剪断, 再灌注 2 h; 记录大鼠再灌注后的血流动力学参数。假手术组大鼠进行气管插管、血流动力学测定等操作, 左冠状动脉进行分离、穿线, 但不进行结扎和再灌注。实验结束后, 取大鼠静脉血分离血清待测; 然后迅速摘取心脏, 用生理盐水冲洗干净后, -80 $^{\circ}$ C 冻存储备用。

1.6 大鼠血清生化指标检测 完全按照试剂盒说明书步骤操作, 测定大鼠血清 LDH、CRP、CK 及 CK-MB 的活性变化。

1.7 大鼠心肌组织病理学观察 取大鼠左心尖组织约 5 mm $\times$ 5 mm $\times$ 5 mm, 用生理盐水冲洗干净后, 迅速置于 10%福尔马林溶液中固定 48 h; 依次进行梯度乙醇脱水、浸蜡包埋、切片、HE 染色及封片等步骤; 于光学显微镜下观察大鼠心肌组织病理学形态变化。

1.8 大鼠心肌组织氧化应激指标测定 取大鼠心肌组织约 100 mg, 用生理盐水制成 10%组织匀浆, 完全按照试剂盒说明书步骤操作, 测定 SOD、GSH-Px、MDA 及 T-AOC 的水平变化。

1.9 RT-PCR 法检测大鼠心肌组织 NF- κ B、I κ B α 及 IKK β mRNA 的表达 取大鼠冻存心肌组织约 100 mg, 用无菌生理盐水冲洗干净; 迅速置入用 0.1% DEPC 溶液和高温处理过的研钵中, 加入液氮并快速研磨至粉末状; 然后加入 1.5 mL RNA 提取试剂, 按照说明书步骤提取总 RNA, 并转录为 cDNA, 加入引物进行 PCR 扩增反应。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 35 s, 58 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 35 s,

35 个循环; 72 ℃反应 15 min。取各待测基因扩增产物, 于 2.0%琼脂糖凝胶进行水平电泳; 以 β -actin 条带光密度值为内参, 分析各目的基因的相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	产物长度/bp
NF- κ B	CAGCTTCACTCGGAGACTGG	ACACGGAAGCTGGCTTTTGT	341
I κ B α	CGCCTAGACCCAGGCATTTT	TTGGGGCGGACTTTTAAGCA	279
IKK β	TTTCATGTCTCAGCGGGTG	TCCTGTGCGCATTCCTTGAT	214
β -actin	GTTGGAGCAAACATCCCCCA	CGCGACCATCCTCCTTAG	186

1.10 Western Blot 法检测大鼠心肌组织 p65、p-p65、I κ B α 、p-I κ B α 、IKK β 、p-IKK β 蛋白的表达 取大鼠心肌组织约 100 mg, 剪碎后置入盛有 2.0 mL RIPA 蛋白裂解液(含磷酸酶抑制剂)的匀浆器中充分匀浆; 于冰上静置 60 min, 使其充分裂解。将裂解后的组织匀浆转移至 1.5 mL 的离心管中, 以 4 ℃、12 000 r·min⁻¹(离心半径 40 cm)离心 15 min; 取上清, 采用 BCA 法测定各样本蛋白浓度, 并调整至一致; 加入等体积蛋白上样缓冲液, 煮沸 5 min 使其变

性。取 10 μ L 蛋白样品上样, 依次进行 SDS 凝胶电泳、转膜、抗原封闭、一抗孵育、二抗孵育等步骤。最后, 采用 ECL 显色液显色, 于凝胶成像仪下显影、拍照; 以 β -actin 蛋白条带灰度值为内参, 采用 Quantity One 软件分析目的蛋白的相对表达水平。

1.11 统计学处理方法 采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析; 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 齿阿米素对 MI/RI 大鼠心脏 LVEDP、LVSP、LV $\pm$ dp/dt_{max} 及 MABP 的影响 结果见表 2。与假手术组比较, MI/RI 模型组大鼠心脏的 LVEDP 明显升高, LV $\pm$ dp/dt_{max}、LVSP 及 MABP 明显下降, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较, 复方丹参片组和齿阿米素高、中剂量组大鼠心脏的 LVEDP 明显降低, LV $\pm$ dp/dt_{max}、LVSP 及 MABP 明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 2 齿阿米素对 MI/RI 大鼠心脏 LVEDP、LVSP、LV $\pm$ dp/dt_{max} 及 MABP 的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	LVEDP/mmHg	(LV+dp/dt _{max})/(mmHg·s ⁻¹)	(LV-dp/dt _{max})/(mmHg·s ⁻¹)	LVSP/mmHg	MABP/mmHg
假手术组	-	-3.86 $\pm$ 1.44	5 488 $\pm$ 506	2 385 $\pm$ 336	121.34 $\pm$ 13.53	107.82 $\pm$ 10.66
模型组	-	5.86 $\pm$ 0.96**	2 650 $\pm$ 607**	1 263 $\pm$ 246**	65.36 $\pm$ 8.49**	54.52 $\pm$ 6.39**
复方丹参片组	200	-2.48 $\pm$ 0.47 $\Delta\Delta$	4 745 $\pm$ 290 $\Delta\Delta$	2 180 $\pm$ 251 $\Delta\Delta$	107.97 $\pm$ 8.10 $\Delta\Delta$	91.04 $\pm$ 6.08 $\Delta\Delta$
齿阿米素高剂量组	4	-1.63 $\pm$ 0.49 $\Delta\Delta$	4 043 $\pm$ 370 $\Delta\Delta$	1 840 $\pm$ 165 $\Delta\Delta$	97.12 $\pm$ 15.13 $\Delta\Delta$	85.20 $\pm$ 5.04 $\Delta\Delta$
齿阿米素中剂量组	2	1.77 $\pm$ 0.72 $\Delta\Delta$	3 473 $\pm$ 365 $\Delta\Delta$	1 648 $\pm$ 196 Δ	87.96 $\pm$ 10.60 $\Delta\Delta$	69.36 $\pm$ 6.98 $\Delta\Delta$
齿阿米素低剂量组	1	5.19 $\pm$ 1.07	2 955 $\pm$ 165	1 328 $\pm$ 155	73.40 $\pm$ 8.89	59.04 $\pm$ 5.20

注: 与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。1 mmHg $\approx$ 0.133 kPa

2.2 齿阿米素对 MI/RI 大鼠血清 LDH、CRP、CK 及 CK-MB 活性的影响 结果见表 3。与假手术组比较, MI/RI 模型组大鼠血清中的 LDH、CRP、CK 及 CK-MB 活性明显增加($P < 0.01$)。与模型组比较, 复

方丹参片组和齿阿米素高剂量组大鼠血清中的 LDH 活性明显下降($P < 0.01$); 复方丹参片组和齿阿米素高、中剂量组大鼠血清中的 CRP、CK 及 CK-MB 活性明显降低($P < 0.01$)。

表 3 齿阿米素对 MI/RI 大鼠血清 LDH、CRP、CK 及 CK-MB 活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)	CRP/(mg·L ⁻¹)	CK/(U·L ⁻¹)	CK-MB/(U·L ⁻¹)
假手术组	-	86.72 $\pm$ 7.37	2.56 $\pm$ 0.51	181.91 $\pm$ 14.26	127.81 $\pm$ 14.23
模型组	-	167.32 $\pm$ 15.45**	5.66 $\pm$ 0.78**	407.21 $\pm$ 38.63**	278.53 $\pm$ 17.80**
复方丹参片组	200	118.16 $\pm$ 9.25 $\Delta\Delta$	3.42 $\pm$ 0.56 $\Delta\Delta$	258.47 $\pm$ 40.19 $\Delta\Delta$	155.73 $\pm$ 17.29 $\Delta\Delta$
齿阿米素高剂量组	4	133.37 $\pm$ 9.83 $\Delta\Delta$	4.20 $\pm$ 0.35 $\Delta\Delta$	301.92 $\pm$ 25.35 $\Delta\Delta$	181.16 $\pm$ 12.52 $\Delta\Delta$
齿阿米素中剂量组	2	152.56 $\pm$ 12.31	4.43 $\pm$ 0.80 $\Delta\Delta$	347.96 $\pm$ 28.22 $\Delta\Delta$	226.42 $\pm$ 13.71 $\Delta\Delta$
齿阿米素低剂量组	1	159.10 $\pm$ 10.36	5.13 $\pm$ 0.71	390.52 $\pm$ 24.46	246.40 $\pm$ 18.06 $\Delta\Delta$

注: 与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.3 齿阿米素对 MI/RI 大鼠心肌组织病理学形态的影响 结果见图 1。假手术组大鼠心肌组织纤维排列整齐, 结构完整, 心肌细胞结构清晰, 胞核染色均匀; MI/RI 模型组大鼠心肌纤维排列紊乱, 有部分断裂, 可见大量细胞结构缺损, 有核固缩、溶解现象, 有炎性细胞浸润。与模型组比较, 复方丹参片和齿阿米素高、中剂量组大鼠心肌组织损伤有明显改善, 细胞结构较为完整, 偶见心肌纤维肿胀、萎缩或部分断裂。

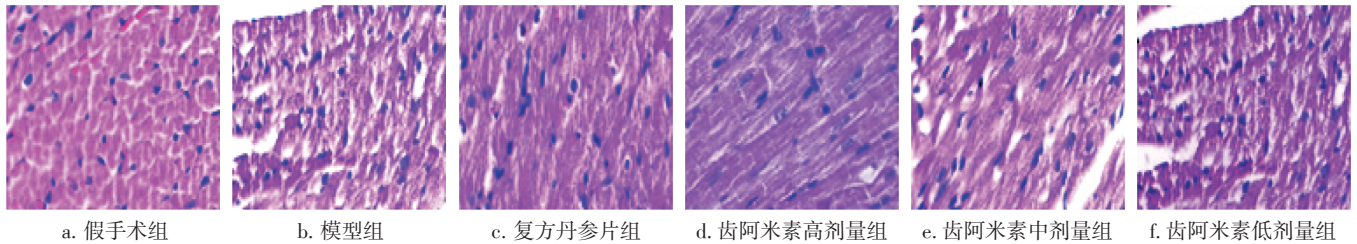


图 1 齿阿米素对 MI/RI 大鼠心肌组织病理学形态的影响(HE 染色, $\times 200$)

Figure 1 Effect of visnagin on myocardial histomorphology in MI/RI rats(HE staining, $\times 200$)

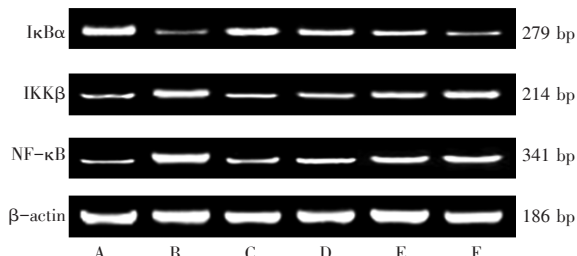
表 4 齿阿米素对 MI/RI 大鼠心肌组织 SOD、MDA、GSH-Px 及 T-AOC 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 4 Effects of visnagin on the levels of SOD, MDA, GSH-Px and T-AOC in myocardial tissue of MI/RI rats($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	GSH-Px/(U·mg ⁻¹)	T-AOC/(U·mg ⁻¹)
假手术组	-	239.59 $\pm$ 30.04	6.89 $\pm$ 1.53	296.26 $\pm$ 16.71	51.71 $\pm$ 7.13
模型组	-	88.96 $\pm$ 11.92 ^{**}	24.89 $\pm$ 4.07 ^{**}	117.08 $\pm$ 17.29 ^{**}	23.47 $\pm$ 5.97 ^{**}
复方丹参片组	200	207.82 $\pm$ 19.74 ^{△△}	9.84 $\pm$ 2.62 ^{△△}	228.13 $\pm$ 15.57 ^{△△}	44.26 $\pm$ 5.80 ^{△△}
齿阿米素高剂量组	4	181.56 $\pm$ 16.72 ^{△△}	14.87 $\pm$ 4.42 ^{△△}	196.01 $\pm$ 21.16 ^{△△}	37.44 $\pm$ 8.35 ^{△△}
齿阿米素中剂量组	2	147.86 $\pm$ 13.27 ^{△△}	19.90 $\pm$ 4.21 [△]	157.03 $\pm$ 18.85 ^{△△}	31.08 $\pm$ 6.68 [△]
齿阿米素低剂量组	1	100.31 $\pm$ 9.84 [△]	22.27 $\pm$ 4.11	140.03 $\pm$ 12.42 ^{△△}	25.65 $\pm$ 5.50

注: 与假手术组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

2.5 齿阿米素对 MI/RI 大鼠心肌组织 NF- κ B、IKK β 、I κ B α mRNA 表达水平的影响 结果见图 2、表 5。与假手术组比较, MI/RI 模型组大鼠心肌组织的 NF- κ B、IKK β mRNA 表达水平显著上调, I κ B α mRNA 表达水平显著下调, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与



注: A. 假手术组; B. 模型组; C. 复方丹参片组; D. 齿阿米素高剂量组; E. 齿阿米素中剂量组; F. 齿阿米素低剂量组

图 2 齿阿米素对 MI/RI 大鼠心肌组织 NF- κ B、I κ B α 、IKK β mRNA 表达水平的影响

Figure 2 Effect of visnagin on the expression levels of NF- κ B, I κ B α and IKK β mRNA in myocardial tissue of MI/RI rats

2.4 齿阿米素对 MI/RI 大鼠心肌组织 SOD、GSH-Px、MDA 及 T-AOC 水平的影响 结果见表 4。与假手术组比较, MI/RI 模型组大鼠心肌组织的 SOD、GSH-Px 及 T-AOC 水平显著降低, MDA 含量显著增加, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较, 复方丹参片组和齿阿米素中、高剂量组大鼠心肌组织的 SOD、GSH-Px 及 T-AOC 水平明显升高, MDA 含量明显降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

模型组比较, 复方丹参片组和齿阿米素各剂量组大鼠心肌组织的 NF- κ B、IKK β mRNA 表达水平均明显下调, I κ B α mRNA 表达水平明显上调, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

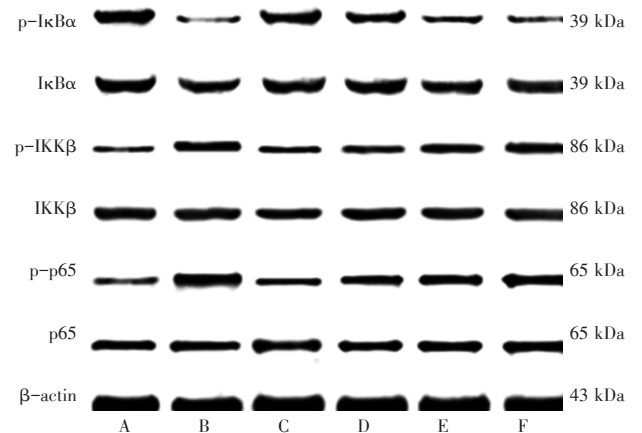
表 5 齿阿米素对 MI/RI 大鼠心肌组织 NF- κ B、IKK β 、I κ B α mRNA 表达水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 5 Effect of visnagin on the expression levels of NF- κ B, I κ B α and IKK β mRNA in myocardial tissue of MI/RI rats($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	NF- κ B/ β -actin	IKK β / β -actin	I κ B α / β -actin
假手术组	-	0.126 $\pm$ 0.028	0.262 $\pm$ 0.042	0.751 $\pm$ 0.037
模型组	-	0.812 $\pm$ 0.043 ^{**}	0.703 $\pm$ 0.038 ^{**}	0.132 $\pm$ 0.026 ^{**}
复方丹参片组	200	0.203 $\pm$ 0.026 ^{△△}	0.306 $\pm$ 0.032 ^{△△}	0.617 $\pm$ 0.055 ^{△△}
齿阿米素高剂量组	4	0.286 $\pm$ 0.015 ^{△△}	0.417 $\pm$ 0.035 ^{△△}	0.497 $\pm$ 0.028 ^{△△}
齿阿米素中剂量组	2	0.481 $\pm$ 0.037 ^{△△}	0.509 $\pm$ 0.037 ^{△△}	0.304 $\pm$ 0.031 ^{△△}
齿阿米素低剂量组	1	0.583 $\pm$ 0.047 ^{△△}	0.629 $\pm$ 0.033 ^{△△}	0.179 $\pm$ 0.023 ^{△△}

注: 与假手术组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{△△} $P < 0.01$

2.6 齿阿米素对 MI/RI 大鼠心肌组织 p65、p-p65、IKKβ、p-IKKβ、IκBα 及 p-IκBα 蛋白表达水平的影响 结果见图 3、表 6。与假手术组比较，MI/RI 模型组大鼠心肌组织的 p-p65、p-IKKβ 蛋白表达水平显著上调，p-IκBα 蛋白表达水平显著下调，差异均有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较，复方丹参片组与齿阿米素中、高剂量组大鼠心肌组织的 p-p65、p-IKKβ 蛋白表达水平明显下调，p-IκBα 蛋白表达水平明显上调，差异均有统计学意义($P<0.01$)。



注：A. 假手术组；B. 模型组；C. 复方丹参片组；D. 齿阿米素高剂量组；E. 齿阿米素中剂量组；F. 齿阿米素低剂量组

图 3 齿阿米素对 MI/RI 大鼠心肌组织 p65、p-p65、IκBα、p-IκBα、IKKβ、p-IKKβ 蛋白表达水平的影响

Figure 3 Effect of visnagin on the expression levels of p65, p-p65, IκBα, p-IκBα, IKKβ and p-IKKβ protein in myocardial tissue of MI/RI rats

3 讨论

心肌缺血再灌注损伤(MI/RI)是临床上心脏缺血性疾病救治过程中出现的常见病理性损伤，可加重心肌缺血缺氧损伤，诱发心肌细胞坏死，进一步造成心功能恶化^[14-15]。LDH、CRP、CK 及 CK-MB 等血液生化指标是临床上判断心肌缺血损伤的重要参

数，心脏 LVEDP、LVSP、LV±dp/dt_{max} 及 MABP 等血流动力学参数是评价心脏功能的重要指标^[16-17]。齿阿米素为阿米芹和兴安升麻等中药植物的根茎提取物，这 2 种中药均具有抗炎、舒张血管等作用。本研究发现，齿阿米素可显著改善 MI/RI 大鼠心脏血流动力学，降低大鼠血清 LDH、CRP、CK 及 CK-MB 等指标水平，明显缓解心肌组织病理损伤。结果提示，齿阿米素对 MI/RI 模型大鼠具有保护作用。

研究^[18-20]表明，氧化应激、炎症反应等病理因素是诱发 MI/RI 的主要原因。在 MI/RI 的病理过程中，由于缺血缺氧导致过氧化应激反应，使活性氧的产生多于消除，大量氧自由基集聚于细胞膜，产生脂质过氧化反应，破坏细胞膜结构的完整性，加剧了缺血心肌细胞的病理性损伤。因此，抑制过氧化应激反应是缓解和防治 MI/RI 的主要措施之一^[21-22]。SOD、GSH-Px 是体内清除自由基的主要酶系，而 T-AOC 是反映机体抗氧化能力的重要指标之一，MDA 是具有细胞毒性的过氧化反应的终产物，检测上述指标可初步判断细胞过氧化应激反应的损伤程度^[23-24]。

NF-κB 信号通路与炎症反应密切相关，生理状态下，NF-κB 以无活性的 p50/p65/IκB 聚合体形式存在于胞质中^[25]。MI/RI 不断促进氧自由基的生成，刺激心肌组织持续释放炎症介质，激活 IKKβ，使其发生磷酸化；p-IKKβ 与 p50/p65/IκB 聚合体结合，使 IκBα 发生磷酸化和泛素化，诱发 p50/p65/IκB 聚合体解聚，p65 发生磷酸化激活或游离；游离的 p65 能够迅速通过核膜进入细胞核，与 DNA 上其相应的靶因子(如 TNF-α、IL-1β 等炎症因子)作用元件结合，启动靶基因的转录，使炎症因子生成不断增多，产生瀑布式炎症级联反应，加重心肌组织的病理性损伤^[26-27]。

表 6 齿阿米素对 MI/RI 大鼠心肌组织 p65、p-p65、IKKβ、p-IKKβ、IκBα、p-IκBα 蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 6 Effect of visnagin on the expression levels of p65, p-p65, IκBα, p-IκBα, IKKβ and p-IKKβ protein in myocardial tissue of MI/RI rats($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	p65/β-actin	p-p65/β-actin	IKKβ/β-actin	p-IKKβ/β-actin	IκBα/β-actin	p-IκBα/β-actin
假手术组	—	0.412±0.028	0.286±0.024	0.539±0.041	0.328±0.037	0.731±0.050	0.846±0.043
模型组	—	0.405±0.047	0.861±0.040**	0.540±0.049	0.652±0.046**	0.715±0.033	0.363±0.040**
复方丹参片组	200	0.439±0.028	0.343±0.038 ^{△△}	0.510±0.030	0.372±0.034 ^{△△}	0.756±0.026	0.819±0.049 ^{△△}
齿阿米素高剂量组	4	0.409±0.037	0.419±0.020 ^{△△}	0.508±0.028	0.416±0.032 ^{△△}	0.726±0.020	0.684±0.039 ^{△△}
齿阿米素中剂量组	2	0.431±0.040	0.557±0.034 ^{△△}	0.548±0.035	0.512±0.033 ^{△△}	0.742±0.024	0.460±0.033 ^{△△}
齿阿米素低剂量组	1	0.445±0.020	0.628±0.036 ^{△△}	0.515±0.033	0.605±0.021	0.733±0.012	0.413±0.050

注：与假手术组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，^{△△} $P<0.01$

本研究结果发现, 齿阿米素可以提高 MI/RI 模型大鼠心肌组织的 SOD、GSH-Px 及 T-AOC 水平, 降低 MDA 含量; 下调心肌组织 NF- κ B、IKK β mRNA 表达水平, 上调 I κ B α mRNA 表达水平; 下调心肌组织 p-p65、p-IKK β 蛋白表达水平, 上调 p-I κ B α 蛋白表达水平。结果表明, 齿阿米素对大鼠 MI/RI 的保护作用与其抗氧化应激和抑制 NF- κ B 信号通路有关(见图 4)。

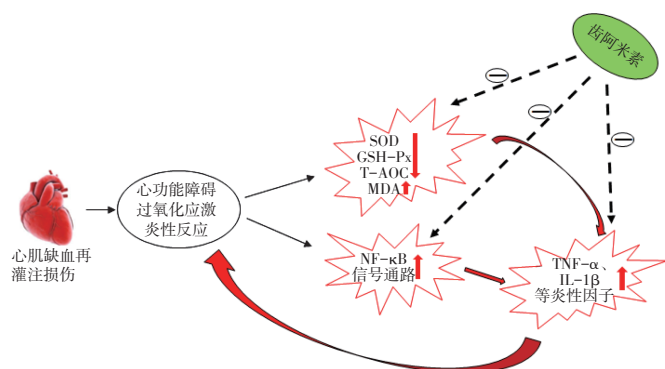


图 4 齿阿米素对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用的机制示意图

Figure 4 Mechanism of protective effect of visnagin on MI/RI in rats

参考文献:

- [1] 张文娟, 董林娟, 宋道, 等. 复方龙脉宁提取液对小鼠急性心肌梗死缺氧损伤的保护作用[J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(5): 618-622.
- [2] LÉVY S. Bundle branch blocks and/or hemiblocks complicating acute myocardial ischemia or infarction[J]. J Interv Card Electrophysiol, 2018, 52(3): 287-292.
- [3] ELTZSCHIG H K, ECKLE T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation[J]. Nat Med, 2011, 17(11): 1391-1401.
- [4] 罗峰, 苏强. 心肌梗死再灌注损伤防治的研究现状及展望[J]. 广东医学, 2019, 40(2): 305-307.
- [5] BINDER A, ALI A, CHAWLA R, et al. Myocardial protection from ischemia-reperfusion injury post coronary revascularization[J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2015, 13(9): 1045-1057.
- [6] 刘红, 张玲燕, 薛杨. 血府逐瘀汤通过PI3K/Akt通路缓解大鼠心肌梗死再灌注损伤的实验研究[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(5): 11-15.
- [7] LIU Y, ASNANI A, ZOU L, et al. Visnagin protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy through modulation of mitochondrial malate dehydrogenase[J]. Sci Transl Med, 2014, 6(266): e3010189.
- [8] PASARI L P, KHURANA A, ANCHI P, et al. Visnagin attenuates acute pancreatitis via Nrf2/NF κ B pathway and abrogates associated multiple organ dysfunction[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 112: e108629.
- [9] AYDOĞMUŞ-ÖZTÜRK F, JAHAN H, BEYAZIT N, et al. The anticancer activity of visnagin, isolated from *Ammi visnaga* L., against the human malignant melanoma cell lines, HT 144[J]. Mol Biol Rep, 2019, 46(2): 1709-1714.
- [10] LEE J K, JUNG J S, PARK S H, et al. Anti-inflammatory effect of visnagin in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglial cells

- [J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(11): 1843-1850.
- [11] DUARTE J, PÉREZ-VIZCAÍNO F, TORRES A I, et al. Vasodilator effects of visnagin in isolated rat vascular smooth muscle[J]. Eur J Pharmacol, 1995, 286(2): 115-122.
- [12] FU H, LI X, TAN J. NIPAAm-MMA nanoparticle-encapsulated visnagin ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury through the promotion of autophagy and the inhibition of apoptosis[J]. Oncol Lett, 2018, 15(4): 4827-4836.
- [13] 郑亚萍, 刘春杰. 白芍总苷对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡及NLRP3炎症小体表达的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(8): 910-914.
- [14] KURIAN G A, RAJAGOPAL R, VEDANTHAM S, et al. The role of oxidative stress in myocardial ischemia and reperfusion injury and remodeling: revisited[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: e1656450.
- [15] 李尧锋, 陈向云, 彭芳, 等. 苗药理气活血滴丸对心肌缺血再灌注大鼠左心室肌细胞损伤的防护作用[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(3): 157-161.
- [16] 李峰杰, 李贻奎, 何萍, 等. 双龙方对大鼠心肌梗死/再灌注后无复流影响的研究[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(4): 583-588.
- [17] 钱善军, 杨冬梅, 阚晶, 等. 白藜芦醇调控细胞自噬对大鼠心肌梗死再灌注无复流的改善作用研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(24): 3204-3207.
- [18] TIAN L, CAO W, YUE R, et al. Pretreatment with Tiliandine improves mitochondrial energy metabolism and oxidative stress in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury via AMPK/SIRT1/PGC-1 α signaling pathway[J]. J Pharmacol Sci, 2019, 139(4): 352-360.
- [19] XU Z, WANG D, ZHOU Z, et al. Dexmedetomidine attenuates renal and myocardial ischemia/reperfusion injury in a dose-dependent manner by inhibiting inflammatory response[J]. Ann Clin Lab Sci, 2019, 49(1): 31-35.
- [20] 郭阳, 徐巧巧, 代金枝. 参芍片对大鼠心肌梗死再灌注损伤的保护作用[J]. 中成药, 2019, 41(12): 2882-2887.
- [21] 卢秋玉, 苏金妹, 唐爱存, 等. 木棉花总黄酮对大鼠心肌梗死再灌注损伤的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(6): 664-668.
- [22] XU G, ZHAO X, FU J, et al. Resveratrol increase myocardial Nrf2 expression in type 2 diabetic rats and alleviate myocardial ischemia/reperfusion injury (MIRI) [J]. Ann Palliat Med, 2019, 8(5): 565-575.
- [23] ZHOU C N, YAO W, GONG Y N, et al. 22-oxacalcitriol protects myocardial ischemia-reperfusion injury by suppressing NF- κ B/TNF- α pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(12): 5495-5502.
- [24] ZHANG J, WANG H, ZHENG Q. Cardioprotective effect of Aralia elata polysaccharide on myocardial ischemic reperfusion (IR) injury in rats[J]. Int J Biol Macromol, 2013, 59: 328-332.
- [25] 王婷婷, 冷承浩, 郭昆鹏, 等. 槲皮素对小鼠金黄色葡萄球菌肺炎的防治作用及IKK/NF- κ B/I κ B信号通路机制研究[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(4): 53-57.
- [26] WU M Y, YANG G T, LIAO W T, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(4): 1650-1667.
- [27] 赵桂峰, 黄欣玮, 吴丽玉. 基于NF- κ B通路的参芍胶囊保护大鼠心肌梗死再灌注损伤的机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(12): 145-150.

(编辑: 邹元平)