

# 丁香酚包合物对心肌缺血再灌注损伤大鼠心脏的保护作用及机制研究<sup>\*</sup>

韩运祺<sup>1</sup>, 王娜<sup>1</sup>, 石佳琦<sup>1</sup>, 李文妍<sup>2</sup>, 肖云峰<sup>1,3\*\*</sup>

(1. 内蒙古医科大学药学院 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古自治区人民医院药学处 呼和浩特 010110;

3. 内蒙古医科大学新药安全评价研究中心 呼和浩特 010110)

**摘要:**目的 探讨丁香酚包合物对心肌缺血再灌注损伤大鼠心脏的保护作用及机制研究。方法 将丁香酚与无水乙醇溶液按照(1:3)的比例混合互溶备用,采用超声法制备丁香酚包合物;将Wistar雄性大鼠,采用随机方法分为假手术组、模型组、包合物基质组、地尔硫革组、丁香酚包合物低、中、高剂量组,每组10只。假手术组、模型组灌胃CMC-Na,包合物基质组灌胃 $\beta$ -环糊精CMC-Na混悬液,地尔硫革组灌胃地尔硫革CMC-Na混悬液,丁香酚包合物低、中、高剂量组分别按0.125 g/kg/天、0.25 g/kg/天、0.5 g/kg/天(含有实际丁香酚含量95 mg、190.5 mg、381 mg)灌胃CMC-Na混悬液,每天给药1次,连续给药15天。末次给药1 h后,在大鼠的冠状动脉左前降支处结扎30 min,恢复再灌注24 h建立MIRI模型;采用BL-420S实验系统检测大鼠心电信号;采用全自动生化仪检测大鼠血清中肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)和谷草转氨酶(AST)的活力;采用试剂盒法测定大鼠心肌组织中丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)的活力;采用TTC染色法检测大鼠心肌梗死面积;采用蛋白免疫印迹法(Western blotting)法检测大鼠心肌缺血组织中GLUT4、cTnI、P-AMPK/AMPK的蛋白表达水平。结果 与模型组比较,丁香酚包合物高剂量组可显著降低大鼠血清中LDH、CK、CK-MB、AST的水平( $P<0.01$ ),显著增加大鼠心肌组织中SOD的水平( $P<0.01$ ),显著降低大鼠心肌组织中MDA的水平( $P<0.01$ ),显著下调P-AMPK/AMPK的蛋白表达含量( $P<0.01$ ),显著减少cTnI蛋白表达的含( $P<0.01$ ),显著增加GLUT4蛋白表达水平( $P<0.01$ )。结论 丁香酚包合物可缓解心肌缺血再灌注损伤,其保护作用可能与抑制磷酸化AMPK的表达以及cTnI的表达有关。

**关键词:**丁香酚包合物 心肌缺血再灌注损伤 腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK) 心肌肌钙蛋白(cTnI)

doi: 10.11842/wst.20210810011

中图分类号: R285.5

文献标识码: AA

心脏疾病目前是对人类生命和健康构成威胁的最常见疾病之一,也是大多数人的主要死亡原因之一<sup>[1]</sup>。冠心病的病理基础是冠状动脉狭窄或阻塞,导致心肌缺血或坏死。临床治疗心肌缺血的主要策略是缓解心绞痛症状,恢复冠状动脉血流。然而,再灌注治疗可导致显著的心肌损伤,这种现象称心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury,

MIRI)<sup>[2]</sup>。

目前,对MIRI的发病机制认为与细胞凋亡、心肌能量代谢障碍、氧自由基爆发、细胞内钙超载等有关<sup>[3-5]</sup>。然而研究表明,心肌能量代谢障碍又被认为是心肌缺血再灌注损伤的始发环节<sup>[6]</sup>,能量代谢也作为心肌细胞活动的重要参与者<sup>[7]</sup>。腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)作为调节能量代谢的核心分子,不仅能够调

收稿日期:2021-08-10

修回日期:2022-05-07

<sup>\*</sup> 内蒙古自治区科学技术厅内蒙古自治区自然科学基金项目(2020MS08117):基于JAK/STAT通路调控心肌细胞凋亡研究蒙药肉豆蔻-8散抗心肌缺血再灌注损伤的作用机制,负责人:肖云峰;内蒙古医科大学科技百万工程联合项目(YKD2018KJBW(LH)057);蒙药巴特日七味丸治疗酒精性急性胰腺炎的作用机制研究,负责人:李文妍。

<sup>\*\*</sup> 通讯作者:肖云峰,副研究员,硕士研究生导师,博士,主要研究方向:心血管药理。

节心脏功能,而且可以影响细胞能量代谢和细胞器功能<sup>[8]</sup>。AMPK参与了体内多种代谢过程的调节<sup>[9]</sup>。因此,通过调控信号通路来避免心肌细胞凋亡已被证明是有效的MIRI治疗策略<sup>[10]</sup>。

丁香酚是从丁香或其它含丁香酚芳香油的植物中分离得到的淡黄色稠性油状液体。现代实验结果显示,丁香酚具有多种药理活性主要包括解热镇痛、抗炎抗氧化、麻醉、改善学习记忆和神经保互等作用<sup>[11]</sup>。丁香酚保护心脏的作用被广泛报道,但具体机制并未见详细阐述。马强等<sup>[12]</sup>报道指出丁香酚对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的H<sub>9</sub>C<sub>2</sub>心肌细胞损伤的影响中表明丁香酚可调节氧自由基的清除能力和脂质过氧化反应,从而增加SOD活力和减少MDA的产生以及LDH的释放,从而明显增加受损心肌细胞的存活率,减少细胞凋亡,但是其机制尚未阐述。因此,本研究以丁香酚包合物为研究对象,利用手术法建立MIRI模型,并基于AMPK能量代谢信号通路,探究丁香酚对MIRI大鼠心肌保护作用的机制,为丁香酚的临床应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物、试剂和主要仪器

丁香酚 Eugenol(罗恩试剂,质量分数≥99%,批号:RH206547);羧甲基纤维素钠(CMC-Na)(国药集团化学试剂有限公司,批号为20150026);水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,批号为20181217);SOD、MDA测试盒(南京建成科技有限公司,批号为20210624、20210624);LDH、CK、CKMB、AST试剂盒(宁波美康生物科技股份有限公司,批号190318102,190420101,190418201,190328201);β-环糊精(天津南开允公合成技术有限公司,批号:20201018);丁香酚/β-环糊精包合物(内蒙古医科大学实验室自己制备,批号:20210824);BCA蛋白质定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号080719200403);盐酸地尔硫革片(天津田边制药有限公司,批号:2007044)TTC染液(南京建成科技有限公司,批号:20200729);β-肌动蛋白(β-actin美国CST公司,批号13E5);山羊抗兔二抗(美国abbkine公司,批号ATTAP0801);抗体AMPK、p-AMPK、GLUT4、cTnI(英国CST公司,批号分别为#2532, #2535, #2213, #13083);RIPA裂解液(索莱宝科技有限公司,批号20180913);PMSF(上海碧云天生物技术有限公司,批号112520210223);台式高速冷

冻离心机(德国Sigma公司,型号3K15);Thermo-KS12生物安全柜(美国Thermo Fisher公司);小动物呼吸机(深圳市瑞沃德科技生命有限公司,型号RWD407);金属浴(北京天根生化科技有限公司,型号OSE-DB-01);组织研磨仪(北京天根生化科技有限公司,型号SN1002358);电泳仪(美国Bio-Rad公司,型号Mini Trans-Blot);Multiskan MK3全自动酶标仪(美国Thermo Fisher公司);全自动生化分析仪(爱尔兰Sapphire公司,型号ADS600);红外激光成像系统(美国LI-COR公司,型号ODYSSEY CLx)

### 1.2 丁香酚包合物的制备

精密称取10 g β-环糊精粉末于250 mL具塞广口瓶中,加入100 mL蒸馏水,水浴加热70℃直至完全溶解后溶液呈透明澄清,室温下降温,备用。将丁香酚标准品与无水乙醇按照(1:3)制备成丁香酚无水乙醇溶液充分溶解,备用。将冷却至室温的环糊精溶液置于25℃数显搅拌器上,滴加丁香酚无水乙醇溶液,边加边搅拌,滴加结束后置于超声仪器40 kHz超声45 min,取出置于4℃冰箱过夜。次日取出后抽滤,得到初始粉末,用适当蒸馏水洗涤抽滤,最后用石油醚溶液润洗抽滤,于真空干燥箱中,40℃烘干8 h,即得丁香酚/β-环糊精包合物,高效液相色谱法检测丁香酚包合物的含量为76.2%。

### 1.3 动物、分组和模型制备

清洁级雄性Wistar体重在200~220 g大鼠70只,购自内蒙古医科大学实验动物中心,动物生产许可证编号:SCXK(蒙)2020-0001。将70只大鼠随机为7组,假手术组、I/R组、包合物基质组、地尔硫革组和丁香酚包合物低剂量组(0.125 g/kg/天)、丁香酚包合物中剂量组(0.25 g/kg/天)、丁香酚包合物高剂量组(0.5 g/kg/天),每组10只。空白组与模型组灌胃给药CMC-Na,包合物基质组灌胃给予环糊 CMC-Na精混液,阳性药组灌胃给予地尔硫革 CMC-Na混悬液,丁香酚包合物低、中、高剂量组分别按0.125 g/kg/天、0.25 g/kg/天、0.5 g/kg/天(含有实际丁香酚含量95 mg、190.5 mg、381 mg)灌胃给予丁香酚包合物混悬液。各组每天给药1次,连续给药15天,末次给药1 h后开始建立MIRI模型。手术法建立MIRI模型,将各组大鼠手术前12 h禁食不禁水。用碘伏进行常规消毒,备皮,连接心电图仪器,气管插管连接小动物呼吸机,频率为60次/min,在左侧心脏搏动处往左稍偏切开一2 cm的纵行

切口,分离肌肉组织后剪断第3-4根肋骨,暴露心脏,在心脏冠状动脉左前降支,用7-0号线结扎左冠状动脉的前降支30 min,然后恢复再灌注24 h从内向外逐层缝合,并记录再灌注即刻心电图。再灌注24 h后取材心脏,记录再灌注24 h后心电图。假手术组开胸后,在冠脉左前降支处仅穿线不结扎。

#### 1.4 全自动生化分析仪法检测大鼠血清中LDH、CK、CK-MB、AST含量

建模成功后,再灌注24 h,各组大鼠腹主动脉取血,采血管静置30 min。离心机参数设置为3500 r·min<sup>-1</sup>,离心10 min吸取血清。采用全自动生化分析仪检测LDH、CK、CK-MB、AST的活力。

#### 1.5 TBA、WST-1法检测心肌组织中MDA、SOD含量

再灌注24 h后,手术取出的心脏组织迅速置于预冷的生理盐水中,清洗组织血迹。心肌组织按质量体积比1:9加生理盐水剪碎,在低温研磨,离心机以3000 r·min<sup>-1</sup>,离心10 min,取上清即得匀浆液。BCA检测各组样品蛋白浓度。之后按照相关试剂盒操作说明书酶标仪测定心肌组织中SOD、MDA的活力。

#### 1.6 采用Western blotting法检测大鼠心肌组织中p-AMPK/AMPK、GLUT4、cTnI蛋白表达水平

Western blotting检测AMPK信号通路相关基因(AMPK、p-AMPK)和心肌相关基因(cTnI)的表达。将建模成功后,取缺血的心脏组织置于预冷的生理盐水中进行清洗,待组织清洗置无血迹,滤纸吸去附着于组织上的生理盐水,将组织剪成1-3 mm的碎块。称量组织,按组织:裂解液=1:10使用低温组织研磨仪器进行组织匀浆,充分研磨观察至无明显组织块,放置30 min,4℃离心,12000 rpm·min<sup>-1</sup>,10 min,吸取上清即得组织蛋白提取液,按照BCA试剂盒检测蛋白浓度,蛋白上样量为每孔20 μg,与5×loading buffer缓冲液混合、上样、转置PVDF膜上、封闭液封闭,分别将转膜成功的PVDF膜放于p-AMPK/AMPK、GLUT4、cTnI一抗溶液中(一抗按照1:1000稀释),4℃孵育过夜,TBST洗膜10 min重复三次,放入荧光二抗中(二抗按照1:1000稀释)室温避光孵育1 h。TBST洗膜重复三次,TBS洗膜一次,每次10 min。置于红外成像系统扫描并采集条带照片,Image-J软件分析目标条带并获得灰度值,各组条带与β-actin的比值作为蛋白相对表达量。

#### 1.7 采用TTC染色法检测MIRI大鼠心肌梗死面积

心肌缺血再灌注24 h之后,空白组、包合物基质组、阳性药对照组、丁香酚包合物低、中、高剂量组各组选两只建模成功的大鼠,腹腔注射10%水合氯醛溶液(注射剂量为0.3 mL/100 g)麻醉大鼠,麻醉后用手术剪慢慢地剪开大鼠的胸腔,剥离其心肌组织,用剪刀将心脏剪下并用0.9%氯化钠注射液冲洗干净,立刻置于-80℃冰箱中冷冻5 min,将冷冻后的心脏切成约1-2 mm的薄片,置于预热37℃的1%的TTC染液中,孵育15 min后,取出心脏用相机拍下并作相关记录,用IMAGE pro plus进行图像处理,分析并计算心肌梗死面积。

心肌梗死面积(%)=

$$\frac{\text{心肌梗死区域}}{\text{心肌梗死面积} + \text{心肌非梗死面积}} \times 100\%$$

#### 1.8 统计学分析

实验统计结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,图片使用Image-J软件分析,数据使用Graphpad Prism8.0软件以及SPSS 22.0软件进行统计学分析。方差齐时,使用one way ANOVA进行组间比较。方差不齐时,使用进行秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 心电信号检测结果

当心脏发生缺血时心电信号常伴有异常性特征,例如在ST段的形态变化,T波的幅值变化,心率及其变异性的变化等<sup>[13]</sup>。心电结果表明,大鼠进行心肌缺血再灌注手术后ST段明显抬高,显示大鼠心肌发生缺血损伤样改变,表明心肌缺血模型建立成功(图1)。

### 2.2 丁香酚包合物对MIRI大鼠血清中LDH、CK、CK-MB、AST含量的影响

与假手术组比较,I/R组大鼠血清中LDH、CK、CK-MB、AST活力均有显著提高( $P < 0.01$ )。与I/R组比较,各组丁香酚包合物血清中LDH、CK、CK-MB、AST活力呈剂量依赖性降低( $P < 0.01$ )。包合物基质组对心肌四种酶水平没有影响(表1)。

### 2.3 丁香酚包合物对MIRI大鼠心肌组织中MDA、SOD含量的检测

与假手术组比较,I/R组大鼠组织中心肌酶MDA活性升高( $P < 0.01$ ),SOD活性降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,丁香酚包合物呈剂量依赖性的降低组织中MDA

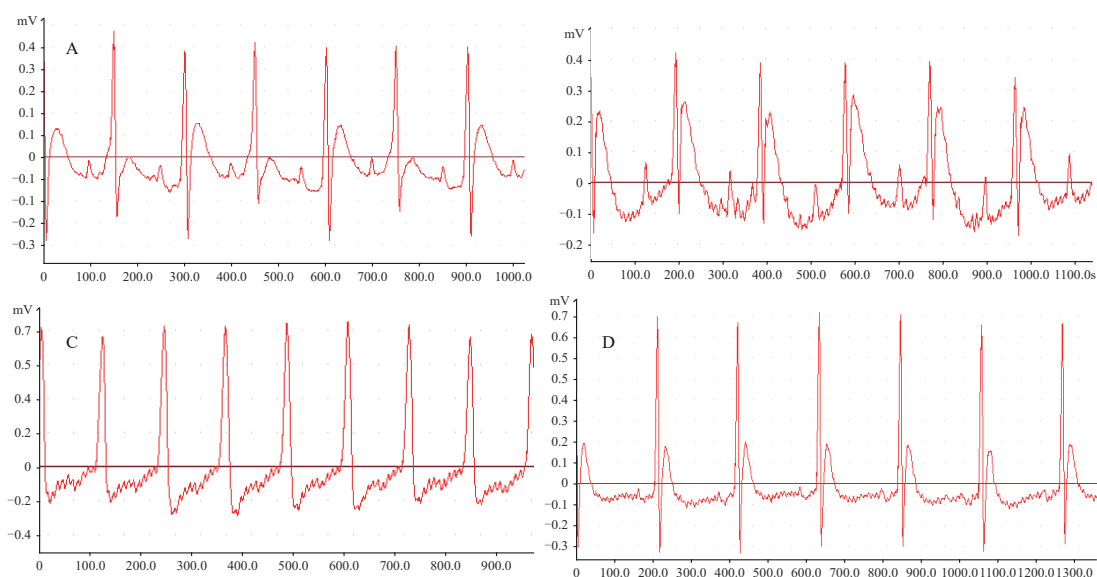


图1 大鼠造模不同时间心电图变化

注:A:正常ECG,B:结扎即刻ECG,C:再灌注即刻ECG,D:再灌注24 h。

表1 丁香酚包合物对心肌缺血再灌注损伤后LDH、CK、CK-MB和AST水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

| 组别                  | CK(U·L <sup>-1</sup> ) | LDH(U·L <sup>-1</sup> ) | AST(U·L <sup>-1</sup> ) | CK-MB(U·L <sup>-1</sup> ) |
|---------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| 空白                  | 143±6                  | 43±7                    | 128±12                  | 273±6                     |
| 模型                  | 699±48*                | 182±9**                 | 854±15**                | 164±13**                  |
| β-环糊精组(0.5 g/kg/天)  | 782±106**              | 195±15**                | 754±34**                | 165±13**                  |
| 阳性药(8.61 mg/kg/天)   | 403.2±12##             | 56±9##                  | 157±18##                | 223±6##                   |
| 丁香酚低剂(0.125 g/kg/天) | 581±36#                | 145±15#                 | 570±7#                  | 187±10##                  |
| 丁香酚中剂(0.25 g/kg/天)  | 453±45##               | 108±8##                 | 372±12##                | 212±15##                  |
| 丁香酚高剂(0.5 g/kg/天)   | 418±17##               | 68±7##                  | 267±7##                 | 218±16##                  |

注: \*与空白组相比,  $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; 与模型组相比, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ 。

水平( $P<0.01$ ), 升高SOD水平( $P<0.01$ ), 阳性药组降低组织中MDA水平( $P<0.01$ ), 升高SOD水平( $P<0.01$ ), 包合物基质组对心肌二种酶水平没有影响, 说明丁香酚包合物对心肌损伤具有保护作用(表2)。

#### 2.4 丁香酚包合物对MIRI大鼠心肌组织p-AMPK/AMPK、GLUT4、cTnI表达的影响

结果表明, 与假手术组比较, 模型组、包合物基质组心肌组织中P-AMPK/AMPK, 表达水平均有显著上调( $P<0.01$ )。与模型组比较, 不同浓度丁香酚包合物组心肌组织中P-AMPK/AMPK表达水平降低, 其中以丁香酚包合物高剂量表达减少明显, 其差异具有显著性( $P<0.01$ )。与假手术组比较, 模型组、包合物基质组的cTnI的表达水平升高, 其差异具有显著性( $P<0.01$ ), 表明心肌组织受到损伤, 模型建立成功。与模型组相比, 经不同浓度的丁香酚包合物预处理后的

表2 丁香酚包合物对心肌缺血再灌注损伤后MDA和SOD水平的影响

| 组别                  | MDA(U·mgprot <sup>-1</sup> ) | SOD(U·mgprot <sup>-1</sup> ) |
|---------------------|------------------------------|------------------------------|
| 空白                  | 10±0.93                      | 35±3.84                      |
| 模型                  | 16±1.14**                    | 16±0.91**                    |
| β-环糊精组(0.5 g/kg/天)  | 16±1.24**                    | 18±1.57**                    |
| 阳性药(8.61 mg/kg/天)   | 12±0.95##                    | 27±1.06##                    |
| 丁香酚低剂(0.125 g/kg/天) | 14±0.51##                    | 20±0.72##                    |
| 丁香酚中剂(0.25 g/kg/天)  | 13±0.84##                    | 23±1.25##                    |
| 丁香酚高剂(0.5 g/kg/天)   | 12±0.53##                    | 26±0.89##                    |

注: \*与空白组相比,  $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; 与模型组相比, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ 。

cTnI的表达降低( $P<0.01$ ), 且具有剂量依赖性; 与假手术组相比, 模型组、包合物基质组GLUT4蛋白表达明显减少, 其差异具有显著性( $P<0.01$ ), 丁香酚包合物低、中、高剂量组GLUT4蛋白表达水平明显升高, 其差异具有显著性( $P<0.01$ )。表明丁香酚能够对心肌

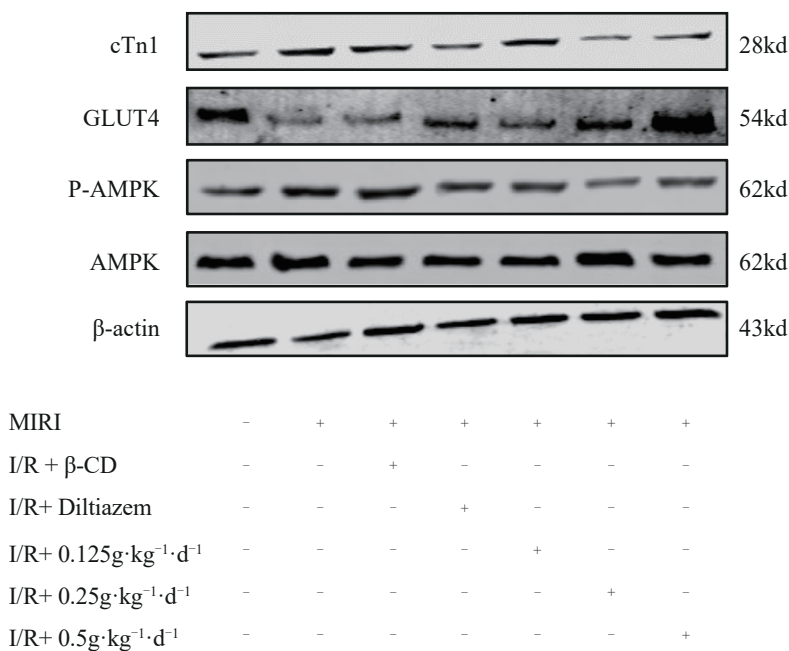


图2 丁香酚包合物对 MIRI 大鼠心肌组织 P-AMPK/AMPK、GLUT4 和 cTnI 蛋白表达的影响

表3 丁香酚包合物对 MIRI 大鼠心肌组织 P-AMPK/AMPK、GLUT4 和 cTnI 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别                  | P-AMPK/AMPK  | GLUT4/β-actin | CTnI/β-actin |
|---------------------|--------------|---------------|--------------|
| 空白                  | 0.78±0.026   | 0.33±0.026    | 0.63±0.042   |
| 模型                  | 1.18±0.127** | 0.22±0.027**  | 1.25±0.040** |
| β-环糊精组(0.5 g/kg/天)  | 1.21±0.124** | 0.19±0.031**  | 1.18±0.075** |
| 阳性药(8.61 mg/kg/天)   | 0.77±0.040## | 0.23±0.026##  | 0.67±0.105## |
| 丁香酚低剂(0.125 g/kg/天) | 1.13±0.186   | 0.18±0.030    | 1.07±0.058## |
| 丁香酚中剂(0.25 g/kg/天)  | 1.06±0.165#  | 0.23±0.028#   | 0.92±0.041## |
| 丁香酚高剂(0.5 g/kg/天)   | 0.81±0.080## | 0.29±0.034##  | 0.82±0.030## |

注:\*与空白组相比, $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组相比,## $P<0.05$ ,### $P<0.01$ 。

缺血再灌注损伤具有与保护作用。实验结果见图2、表3。

2.5 丁香酚包合物对 MIRI 大鼠心肌梗死面积的影响

实验结果表明,与假手术组相比,模型组心肌出现梗死症状;与模型组相比,丁香酚包合物低、中、高剂量组出现的心肌梗死症状均有改善,其中丁香酚包合物高剂量组的心肌梗死面积与模型组相比差异明显( $P<0.01$ );地尔硫革组可减少心肌缺血导致的心肌梗死面积。说明丁香酚包合物对心肌缺血再灌注所引起的心肌梗死症状有缓解作用,实验结果如图3。

3 讨论

大量数据表明心血管疾病已经成为危害人类生

命健康、生活质量甚至死亡的主要原因之一,根据世界卫生组织发布的《2019 全球健康预测》概要表明,心血管现患病人数量以及死亡率居首位,占由疾病构成死亡人数的40%以上<sup>[14]</sup>。由于近年来对丁香酚药理作用的深入研究,其抗氧化作用受到重视。有研究表明,丁香酚可通过调节各项生化指标来缓解连二亚硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ )导致的心肌细胞缺氧/复氧损伤模型<sup>[15]</sup>。因此本课题以心肌缺血再灌注为模型,探讨丁香酚对缺血、缺氧后能量代谢信号通路 AMPK 的影响。

丁香酚为天然的药物,作为挥发油类物质现多见于临床应用,但是由于丁香酚具有挥发性和不稳定性,不利于保存且对肠道存在刺激作用<sup>[16]</sup>。β-环糊精具有特殊的空间结构,常作为药用辅料使用,不仅可以提高药物生物利用度而且可掩盖丁香酚的不良气味<sup>[17]</sup>。所以本课题组将丁香酚制成β-环糊精包合物

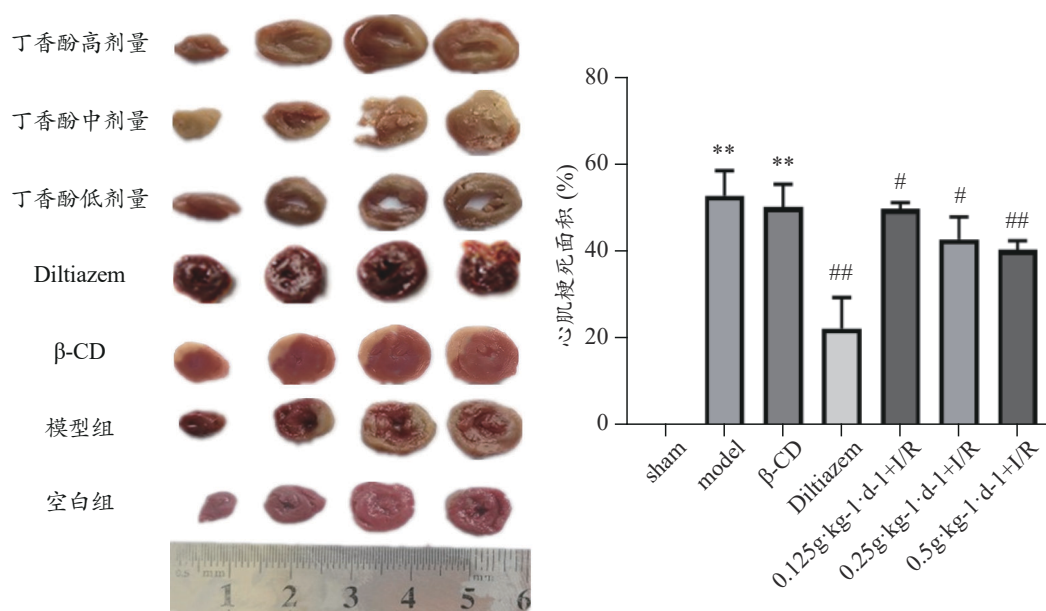


图4 丁香酚包合物对大鼠心机的TTC染色结果

注: \*与空白组相比,  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ 。

供体内实验使用不仅可减少丁香酚的肠道刺激作用而且将丁香酚液体药物固体化利于保存。Xiaowei Sun 等人研究表明<sup>[18]</sup>, 100 mg 的丁香酚可缓解脑缺血再灌注损伤后 P-mTOR/mTOR 的表达, 因此本研究以心肌缺血再灌注损伤为研究对象, 探讨丁香酚对 MIRI 的作用是否与能量代谢通路 AMPK 有关, 并以 100 mg 丁香酚作为研究剂量。本研究以地尔硫草作为阳性对照药是因为在前期研究中刘英<sup>[19]</sup>等人得出结论地尔硫草可通过减少炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  的浸润起到心脏的保护作用, 并且 Chunxia Chen<sup>[20]</sup>等人研究证明地尔硫草可减少心肌梗死面积和心律失常, 并降低氧化应激, 衰减钙超载, 降低了 Bax 蛋白的表达, 并相应增加了 Bcl-2 与 Bax 的比率, 抑制凋亡。本实验研究结果显示, 通过结扎大鼠冠状动脉左前降支 30 min, 再灌注 24 h 发现可使大鼠心电信号 S-T 段抬高, 说明大鼠 MIRI 模型建立成功, 但是结扎即刻时心电信号显示出明显的 P 波和 T 波, 得知 P 波是由心房除极化活动而产生, 文中出现情况课题组考虑心房除极化活动产生 P 波, 但是该 P 波与其前面发生的波形的位置发生重叠, 因而导致 P 波消失。以往的研究中发现临床上心肌缺血是一个发展较慢的过程而 ST-T 段的变化 T 波由直立至倒置、ST 段由平直延伸至 ST 段压低, 易与冠心病的 ST-T 改变混淆在一起<sup>[21]</sup>。模型建立成功后各给药组与 MIRI 模型组比较, 丁香酚包合物

低、中、高剂量组均能够不同程度降低大鼠血清中 CK、CK-MB、LDH 和 AST 的活力, 并且呈剂量依赖性。SOD 是体内氧自由基清除系统的主要酶, MDA 作为反应自由基对机体损伤程度的重要指标也在缺氧复氧时起到重要作用<sup>[22]</sup>。本研究结果表明, 不同浓度的丁香酚包合物可减少 MIRI 大鼠心肌组织中 MDA 的水平, 提高 SOD 水平。因此证明, 丁香酚包合物对 MIRI 起到保护作用。

辛铭秀<sup>[23]</sup>研究结果显示, 心肌细胞的缺氧/复氧损伤可通过调节能量代谢通路 AMPK 来起到保护作用。当细胞或动物出现缺血或者缺氧时 AMPK 信号通路被高度激活, 这表明 AMPK 信号通路对 MIRI 具有重要的意义<sup>[24-25]</sup>。AMPK 作为能量代谢的重要信号通路, 参与多种能量代谢调节的过程, 相关研究显示, 心肌缺血再灌注后处于应激状态的心肌细胞由于供氧的缺乏, 使得 ATP 产生不足进而 AMP 含量增加, 从而使 AMPK 被磷酸化激活<sup>[26]</sup>。被激活的 AMPK (即 p-AMPK) 对下游多种底物产生作用, 其中最主要包括抑制了 ATP 的消耗, 并重新将 ATP 的产生途径激活以维持机体能量代谢平衡。PGC-1 $\alpha$  作为调节抗氧化酶的活性的重要物质, 不仅能减少 MDA 及活性氧 (ROS) 的含量, 而且还能发挥抗氧化应激作用, 从而达到保护心肌缺血性损伤的作用<sup>[27-28]</sup>。然而被磷酸化活化的 AMPK 则可进一步影响下游 PGC-1 $\alpha$  的表达。心肌肌

钙蛋白I,是心肌损伤的重要标示物,在血清中含量极少,但是在心肌梗死时含量明显升高<sup>[29]</sup>。另外本实验证明,与MIRI模型组相比,经过丁香酚包合物处理后P-AMPK/AMPK、cTnI蛋白表达水平明显上调,并且呈剂量依赖性。TTC染色显示心肌梗死面积减少。因此,体内实验结果表明,丁香酚包合物可减轻MIRI的作用与抑制磷酸化AMPK相关。

综上所述,本实验将挥发性、不稳定性药物丁香酚经过 $\beta$ -环糊精包合后增加药物稳定性,供体内实验使用。实验得出结论经过丁香酚包合物处理后大鼠MIRI得到缓解,其机制可能与有效抑制磷酸化的AMPK蛋白表达和心肌肌钙蛋白cTnI的表达有关。研究结果有望为丁香酚减轻MIRI的治疗及机制研究提供一定的实验数据。

## 参考文献

- Writing Group Members, Dariush M, Emelia J B, *et al.* Heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the American heart association. *Circulation*, 2016, 133(4):e38-360.
- Basgut B, Kayki G, Bartosova L, *et al.* Cardioprotective effects of 44Bu, a newly synthesized compound, in rat heart subjected to ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*, 2010, 640(1-3):117-123.
- 陈福晖,刘达兴,容松. 心肌缺血再灌注损伤发生机制的研究进展. *安徽医药*, 2017, 21(12):2145-2148.
- 袁晓峰,王军,周丹. 原儿茶醛对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用研究. *陕西中医*, 2013, 34(8):1091-1093.
- 任耀龙,郑刚,赵明君,等. 丹参饮预处理对缺血/再灌注损伤大鼠心肌细胞的保护作用及对血浆氧化三甲胺水平的影响. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2021, 19(12):1996-1999.
- Jager S, Handschin C, St-Pierre J, *et al.* AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(29):12017-12022.
- Wang S M, Ye L F, Wang L H. Protective mechanism of shenmai on myocardial ischemia-reperfusion through the energy metabolism pathway. *Am J Transl Res*, 2019, 11(7):4046-4062.
- 赵云丽,袁勇,马晓莉,等. 基于AMPK/SIRT1/PGC-1 $\alpha$ 信号通路研究香青兰总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护机制. *中国药房*, 2021, 32(3):278-283.
- Qi D, Yong L H. AMPK:energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26(8):422-429.
- Zhu J, Wang Y F, Chai X M, *et al.* Exogenous NADPH ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats through activating AMPK/mTOR pathway. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(4):535-545.
- 杨亚军,刘希望,赵晓乐,等. 丁香酚解热作用机理研究进展. *中兽医医药杂志*, 2016, 35(5):24-27.
- 马强,吴文宁,陈荣. 丁香酚对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导H9C2心肌细胞损伤的保护作用. *安徽医学*, 2017, 38(11):1369-1373.
- 钱新宇. 基于JAK2/STAT3信号通路探讨蒙药肉豆蔻-8散对大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用机制. 呼和浩特:内蒙古医科大学硕士研究生学位论文, 2020.
- 张钦钦. 基于知行模式的健康教育对急性心肌梗死患者PCI术后康复的效果评价. 郑州:河南大学硕士研究生学位论文, 2020.
- 袁德俊. 丁香酚对体外培养心肌细胞缺氧/复氧损伤的影响. 广州:广州中医药大学硕士研究生学位论文, 2009.
- 李梦蝶. 丁香酚 $\beta$ -环糊精包合物水凝胶的制备及其对糖尿病伤口修复的研究. 锦州:锦州医科大学硕士研究生学位论文, 2020.
- 魏晓嘉,万国慧,李佳园,等. 中药制剂矫味技术及评价方法的研究进展. *中国药房*, 2021, 32(8):1009-1013.
- Sun X W, Wang D Y, Zhang T T, *et al.* Eugenol attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury by enhancing autophagy AMPK-mTOR-P70S6K pathway. *Front Pharmacol*, 2020, 11:84.
- 刘英,程翔,廖玉华. 地尔硫革对心脏缺血/再灌注后心肌炎症的影响. *中国药理学通报*, 2010, 26(1):56-59.
- Guleken Z, Kuruca S E, Ünübol B, *et al.* Biochemical assay and spectroscopic analysis of oxidative/antioxidative parameters in the blood and serum of substance use disorders patients. *A methodological comparison study. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2020, 240: 118625.
- 陈清启. 心电图ST-T改变的临床问题. *江苏实用心电学杂志*, 2013, 22(1):465-471.
- Chen C X, Lu W S, Wu G W, *et al.* Cardioprotective effects of combined therapy with diltiazem and superoxide dismutase on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Life Sci*, 2017, 183: 50-59.
- 辛铭秀. 七氟醚后处理通过MIF-AMPK通路调控线粒体能量代谢对抗心肌缺氧复氧损伤的机制研究. 乌鲁木齐:新疆医科大学硕士研究生学位论文, 2021.
- 唐丹丽,石晓雯,周明眉,等. 痰瘀同治方对缺氧复氧诱导心肌细胞AMPK-mTOR自噬信号通路的影响及机制. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38(4):435-440.
- Salt I P, Hardie D G. AMP-activated protein kinase: an ubiquitous signaling pathway with key roles in the cardiovascular system. *Circ Res*, 2017, 120(11):1825-1841.
- Yu L, Liang H, Dong X, *et al.* Reduced silent information regulator 1 signaling exacerbates myocardial ischemia-reperfusion injury in type 2 diabetic rats and the protective effect of melatonin. *J Pineal Res*, 2015, 59(3):376-390.
- Solomon J M, Pasupuleti R, Xu L, *et al.* Inhibition of SIRT1 catalytic activity increases p53 acetylation but does not alter cell survival following DNA damage. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(1):28-38.

- 28 Song M Y, Jung H W, Kang S Y, *et al.* Atractylenolide III enhances energy metabolism by increasing the SIRT-1 and PGC1 $\alpha$  expression with AMPK phosphorylation in C2C12 mouse skeletal muscle cells.

*Biol Pharm Bull*, 2017, 40(3):339–344.

- 29 吴杰华. 心肌损伤相关蛋白检测在急性冠状动脉综合征诊断中的价值. 心血管病防治知识(学术版), 2017(6):26–28.

## Study on the Protective Effect and Mechanism of Eugenol Inclusion Compound on the Heart of Rats with Myocardial Ischemia-reperfusion Injury

Han Yunqi<sup>1</sup>, Wang Na<sup>1</sup>, Shi Jiaqi<sup>1</sup>, Li Wenyan<sup>2</sup>, Xiao Yunfeng<sup>1,3</sup>

(1. College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 2. Department of Pharmacy, People's Hospital of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010110, China; 3. New Drug Safety Evaluation Research Center, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

**Abstract:** Objective To explore the protective effect and mechanism of eugenol inclusion compound on the heart of myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. Methods Wistar male rats were randomly divided into sham operation group, model group, and package group. Compound matrix group, diltiazem group, and eugenol inclusion compound low, medium and high dose groups, with 10 rats in each group. The blank group and the model group were intragastrically administered with CMC-Na, the inclusion compound matrix group was intragastrically administered with  $\beta$ -cyclodextrin CMC-Na suspension, and the diltiazem group was intragastrically administered with diltiazem CMC-Na suspension and eugenol. The low, medium and high dose groups of the inclusion compound were calculated according to 0.125 g/kg/d, 0.25 g/kg/d, 0.5 g/kg/d (contains the actual eugenol content 95 mg, 190.5 mg, 381 mg) CMC-Na suspension was intragastrically administered once a day for 15 consecutive days. One hour after the last administration, the rat's left anterior descending coronary artery was ligated for 30 minutes and reperfusion was restored for 24 hours to establish the MIRI model; the BL-420S experimental system was used to detect the rat's ECG signal; the automatic biochemical analyzer was used to detect the rat serum of the activity of creatine kinase (CK), creatine kinase isoenzyme (CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH) and aspartate aminotransferase (AST); the kit method was used to determine malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) activity; TTC staining method was used to detect rat myocardial infarction area; Western blotting method was used to detect GLUT4, cTnI, P-AMPK/AMPK in rat myocardial ischemic tissue/AMPK protein expression level. Results Compared with the model group, the high-dose eugenol inclusion compound group can significantly reduce the levels of LDH, CK, CK-MB, and AST in rat serum ( $P < 0.01$ ), and significantly increase the level of SOD in rat myocardial tissue ( $P < 0.01$ ), significantly reduce the level of MDA in rat myocardial tissue ( $P < 0.01$ ), significantly decrease the protein expression content of P-AMPK/AMPK ( $P < 0.01$ ), and significantly reduce the protein expression content of cTnI ( $P < 0.01$ ), significantly increased the expression level of GLUT4 protein ( $P < 0.01$ ). Conclusion Eugenol inclusion compound can alleviate myocardial ischemia-reperfusion injury, and its protective effect may be related to the inhibition of the expression of phosphorylated AMPK and the expression of cTnI.

**Keywords:** Eugenol inclusion complex, Myocardial ischemia-reperfusion injury, Adenylate activated protein kinase (AMPK), Cardiac troponin (cTnI)

(责任编辑: 周阿剑、刘玥辰, 责任译审: 周阿剑, 审稿人: 王瑀、张志华)