

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2024.06.017

论著·基础

和厚朴酚通过 PI3K/AKT 信号通路调节线粒体凋亡对小鼠心肌缺血/再灌注损伤的影响及机制研究

王青瑛, 王相东, 邢文文, 闫颖, 王郁金



基金项目: 陕西省自然科学基金研究计划一般项目(面上)(2019JM-420); 陕西省科技厅自然科学基金研究计划一般项目(青年)(2019JQ-011); 陕西省中医药大学科学研究计划(2017QN25)

作者单位: 712046 陕西咸阳, 陕西中医药大学基础医学院

通信作者: 王郁金, E-mail: wangyujin411@126.com

【摘要】 目的 探讨和厚朴酚(HK)对心肌缺血/再灌注损伤(MIRI)小鼠心脏的保护作用及其机制。方法 2022年6月—2023年7月于陕西中医药大学基础医学院中医诊断实验中心进行实验。78只雄性C57BL/6J小鼠随机分为假手术(Sham)组、MIRI组和MIRI+HK组,每组26只。术前对MIRI+HK组小鼠给予HK($0.2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)腹腔注射,Sham组和MIRI组给予等量溶剂,连续14d。造模术中Sham组仅穿线不结扎,其余2组均结扎左前降支30min后,解开缝线再灌注2h,构建MIRI模型,再灌注结束后立即取血,剥离心脏。比较各组血清中肌酸激酶同工酶(CK-MB)和心肌肌钙蛋白T(cTnT)水平;超声心动图检测心功能;2,3,5-三苯基氯化四氮唑染色法计算心肌梗死面积;原位末端标记技术检测细胞凋亡水平;电镜观察线粒体结构损伤情况;Western-blot检测线粒体凋亡和磷酸肌醇-3激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)通路相关蛋白表达。**结果** 与Sham组比较,MIRI组小鼠血清CK-MB、cTnT和左心室收缩末期内径(LVESD)水平及心肌梗死面积、细胞凋亡率升高,左心室射血分数(LVEF)和左心室短轴缩短率(LVFS)降低($P<0.001$),心肌细胞线粒体大多肿胀,内外双层膜模糊,嵴畸形且减少或缺失,线粒体凋亡相关蛋白细胞色素(Cyto)-C、Bcl-2相关X蛋白(Bax)和活化半胱氨酸蛋白酶(Cleaved Caspase-9)表达升高,B淋巴细胞瘤2基因(Bcl-2)、p-AKT/AKT和p-PI3K/PI3K表达降低($P<0.001$);与MIRI组比较,MIRI+HK组小鼠血清CK-MB、cTnT和LVESD水平及心肌梗死面积、细胞凋亡率降低,LVEF和LVFS增加($P<0.001$),心肌细胞线粒体超微结构有所好转,结构较为完整,Cyto-C、Bax和Cleaved Caspase-9蛋白表达降低,Bcl-2、p-AKT/AKT和p-PI3K/PI3K表达升高($P<0.001$)。**结论** HK可通过激活PI3K/AKT信号通路抑制MIRI诱导的心肌细胞线粒体凋亡,从而发挥心肌保护作用。

【关键词】 心肌缺血/再灌注损伤;和厚朴酚;线粒体凋亡;PI3K/AKT信号通路;小鼠

【中图分类号】 R363.2⁺1;R541

【文献标识码】 A

The effect and mechanism of honokiol regulating mitochondrial apoptosis through the PI3K/AKT signaling pathway on myocardial ischemia/reperfusion injury in mice Wang Qingying, Wang Xiangdong, Xing Wenwen, Yan Ying, Wang Yujin. School of Basic Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Province, Xianyang 712046, China

Funding program: General Project of Shaanxi Provincial Natural Science Basic Research Program (General) (2019JM-420); General Project of Natural Science Basic Research Program of Shaanxi Provincial Department of Science and Technology (Youth) (2019JQ-011); Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine Scientific Research Program (2017QN25)

Corresponding author: Wang Yujin, E-mail: wangyujin411@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect and mechanism of honokiol (HK) on the heart of mice with myocardial ischemia/reperfusion injury (MIRI). **Methods** From June 2022 to July 2023, the experiment was conducted at the Traditional Chinese Medicine Diagnosis Experimental Center of the School of Basic Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine. 78 male C57BL/6J mice were randomly divided into sham group, MIRI group, and MIRI + HK group, with 26 mice in each group. Before surgery, the MIRI + HK group mice were given HK ($0.2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) intraperitoneal injection, while the Sham and MIRI groups were given equal amounts of solvent for 14 consecutive days. The Sham group only threaded without ligation, while the other groups ligated the left anterior descending branch for 30 minutes, then opened the suture and reperfusion for 2 hours to construct a MIRI model. After reperfusion, blood was immediately taken and the heart was stripped. Compare the levels of serum creatine kinase isoenzyme (CK-MB) and cardiac troponin T (cTnT) in each group.

Echocardiography detects heart function. Calculate myocardial infarction area using 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride staining method; In situ end labeling technology was used to detect the level of cell apoptosis; Electron microscopy observation of mitochondrial structural damage. Western blot was used to detect mitochondrial apoptosis and protein expression related to the phosphoinositol-3 kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) pathway. **Results** Compared with the Sham group, the MIRI group mice showed higher levels of serum CK-MB, cTnT, left ventricular end systolic diameter (LVESD), myocardial infarction area, and cell apoptosis rate, while the left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular short axis shortening rate (LVFS) decreased ($P < 0.001$). Most myocardial mitochondria were swollen, with blurred inner and outer bilayers, reduced or absent cristae, and mitochondrial apoptosis related protein cytochrome (Cyto-C) The expression of Bcl-2 related X protein (Bax) and activated cysteine protease (Cleaved Caspase-9) increased, while the expression of B lymphocyte tumor 2 gene (Bcl-2), p-AKT/AKT, and p-PI3K/PI3K decreased ($P < 0.001$). Compared with the MIRI group, the serum CK-MB, cTnT, and LVESD levels, myocardial infarction area, and cell apoptosis rate of the MIRI + HK group mice decreased, while LVEF and LVFS increased ($P < 0.001$). The mitochondrial ultrastructure of myocardial cells improved and the structure was more complete. The expression of Cyto-C, Bax, and Cleaved Caspase-9 proteins decreased, while the expression of Bcl-2, p-AKT/AKT, and p-PI3K/PI3K increased ($P < 0.001$). **Conclusion** HK can inhibit MIRI induced mitochondrial apoptosis in cardiomyocytes by activating the PI3K/AKT signaling pathway, thereby exerting a cardioprotective effect.

【Key words】 Myocardial ischemia-reperfusion injury; Honokiol; Mitochondrial apoptosis; PI3K/AKT signaling pathway; Mice

心肌缺血/再灌注损伤(myocardial ischemia/reperfusion injury, MIRI)是指在心脏手术过程中进行血运重建治疗后引起的强烈心脏损伤^[1]。MIRI 促进活性氧(ROS)生成和钙超载,二者均可导致细胞色素-C(Cyto-C)进入细胞质^[2],随后激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase),导致线粒体功能障碍和肿胀,最终发生细胞凋亡^[3-4]。因此,探索减少线粒体损伤和细胞凋亡的有效药物进行预处理可能是缓解 MIRI 的有效疗法。和厚朴酚(honokiol, HK)是一种从传统中草药厚朴中提取的活性化合物,用于治疗多种血管疾病,包括心脏疾病、脑卒中和缺血^[5]。研究发现, HK 治疗可限制急性心肌梗死小鼠的梗死面积并保护心功能^[6]。此外, HK 在 1 型糖尿病大鼠合并 MIRI 损伤中具有增强心功能、减小梗死面积、降低心肌细胞凋亡和 ROS 水平的功能^[7]。而且,在 MIRI 大鼠模型中,使用 HK 预处理还显著降低了血清肌酸激酶(CK)、核因子(NF)- κ B、白介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 和乳酸脱氢酶(LDH)的水平^[8]。目前关于 HK 对 MIRI 心肌保护作用机制的研究主要指向炎症反应和氧化应激,但 HK 是否通过抑制 MIRI 心肌线粒体依赖的细胞凋亡产生保护作用尚不清楚。因此,本研究探讨了 HK 在预防 MIRI 中的作用及其减轻心肌细胞线粒体损伤的潜在机制,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器 (1)实验动物及分组:清洁级健康雄性 C57BL/6J 小鼠 78 只, 8~12 周龄, 体重 20~25 g, 购于陕西中医药大学实验动物中心。在稳

定温度($22 \pm 2^\circ\text{C}$)和湿度($45\% \pm 5\%$)环境下,常规颗粒饲料喂养, 12 h 光暗交替, 自由饮食。随机数字表法将小鼠分为假手术(Sham)组、MIRI 组和 MIRI + HK 组, 各 26 只。(2)主要试剂:和厚朴酚和 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)购自美国 Sigma 公司;BCA 蛋白定量检测试剂盒购于北京索莱宝生物科技有限公司;酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒购自南京建成科技有限公司;原位末端标记技术(TUNEL)染色试剂盒购自瑞士 Roche 公司;B 淋巴细胞瘤 2 基因(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、活化半胱氨酸蛋白酶(Cleaved Caspase-9)、细胞色素(Cyto)-C、磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)和丝苏氨酸蛋白激酶(AKT)抗体购自美国 CST 公司;p-PI3K 和 p-AKT 抗体购自美国 Abcam 公司。(3)仪器:小动物超声成像系统(Visualsonics Vevo3100, 日本 Fujifilm Corporation 公司);5804R 型高速低温离心机(德国 Eppendorf 公司);PowerPac™ Basic 蛋白垂直电泳仪、Trans-blot Turbo™ System 转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);Epoch 全波长酶标仪(美国 BioTek 公司);荧光倒置显微镜(德国 Leica 公司)。

1.2 实验方法 2022 年 6 月—2023 年 7 月于陕西中医药大学基础医学院中医诊断实验中心进行实验。小鼠 MIRI 模型建立:小鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉后,使用啮齿动物呼吸机经气管插管进行人工通气(110 次/min,潮气量 0.2 ml),然后在左胸第 4 肋间开胸,用 10-0 PROLENE® 缝线结扎左前降支(LAD)30 min 后,解开缝线再灌注 2 h。Sham 组小鼠仅穿线不结扎,其他操作与 MIRI 组相同。MIRI + HK 组

小鼠在 MIRI 术前给予 HK(0.2 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)腹腔注射,连续 14 d;Sham 组和 MIRI 组小鼠给予等量溶剂(二甲基亚砜,DMSO)。

1.3 观察指标与方法

1.3.1 血清肌酸激酶同工酶(CK-MB)、肌钙蛋白(cTnT)检测:再灌注 2 h 后,取小鼠腹主动脉血 1 ml,室温静置 2 h,4℃ 3 000 r/min 离心 20 min,留取上层血清,-80℃ 保存。使用 ELISA 试剂盒检测 cTnT 水平;使用全自动生化分析仪检测 CK-MB 水平。全部操作根据试剂盒说明书进行。

1.3.2 超声心动图检测心功能:再灌注后,利用经胸超声心动图进行心脏功能的评估。使用 1.5% 异氟烷/氧气对小鼠进行麻醉,通过 M 型和二维超声心动图评估心脏变量,包括左心室射血分数(LVEF)、左心室短轴缩短率(LVFS)、左心室收缩末期内径(LVESD)、左心室舒张末期内径(LVEDD)等参数。

1.3.3 TTC 染色检测心肌梗死面积:再灌注后,使用 PROLENE[®]缝合线再次闭塞冠状动脉,快速取出心脏,-20℃ 下冰冻 20 min,随后切成 1 mm 的切片。使用 1% TTC 溶液孵育心脏切片 20 min。染色后,加入终止液,然后将切片固定在 10% 多聚甲醛 24 h。红染部分表示非梗死区,白色部分表示梗死区。利用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析梗死面积百分比,心肌梗死面积百分比(%) = 梗死区面积/心肌切片区总面积 × 100%。

1.3.4 TUNEL 染色检测心肌细胞凋亡:取心脏固定在 4% 多聚甲醛 24 h,常规石蜡包埋并以 5 μm 厚度切片。切片用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤 3 次,随后在蛋白酶 K 中透化 10 min。再次洗涤 3 次后,将切片在 TdT 缓冲液中 37℃ 下孵育 1 h。然后用 4,6-二氨基-2-苯基吲哚(DAPI)进行细胞核染色。每个切片随机选择 5 个区域,利用荧光显微镜拍照记录,并用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析细胞凋亡率,细胞凋亡率(%) = TUNEL 阳性细胞数/单个视野全部细胞数 × 100%。

1.3.5 电镜观察心肌线粒体结构:再灌注后,取心脏样本,迅速固定于 2.5% 戊二醛中 24 h(4℃),PBS 冲洗后固定于 1% 四氧化钨磷酸钠缓冲液中 2 h。依次以 30% 乙醇、50% 乙醇、70% 醋酸铀乙醇饱和液 12 h、80% 乙醇、95% 乙醇、无水乙醇和环氧丙烷的梯度顺序进行脱水,Epon812 环氧树脂包埋。超薄切片 70 nm 切片,使用醋酸铀饱和和枸橼酸铅双重染色,PBS 清洗 3 次,使用日立透射电子显微镜观察并拍照记录。

1.3.6 Western-blot 检测凋亡和 PI3K/AKT 信号通路

相关蛋白表达:使用 RIPA 蛋白裂解液裂解心脏组织,并使用 BCA 蛋白检测试剂盒进行浓度定量。用 SDS-PAGE 电泳分离 40 μg 蛋白,湿转至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 1 h;分别加入 Bcl-2、Bax、Cyto-C、Cleaved Caspase-9、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 和 GAPDH 一抗(1:200)4℃ 孵育过夜。次日,加入 HRP 山羊抗兔 IgG 二抗(1:10 000)37℃ 下孵育 1 h 后,使用红外成像扫描仪对条带进行可视化。

1.4 统计学方法 所有数据均采用 SPSS 26.0 统计学软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Turkey 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HK 预处理对 MIRI 小鼠血清 CK-MB 和 cTnT 的影响 与 Sham 组比较,MIRI 组小鼠血清 CK-MB 和 cTnT 水平升高(*P* < 0.01);与 MIRI 组比较,MIRI + HK 组小鼠血清 CK-MB 和 cTnT 水平明显降低(*P* < 0.01),见表 1。

表 1 各组小鼠血清 CK-MB 和 cTnT 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of serum CK-MB and cTnT levels among different groups of mice

组别	<i>n</i>	CK-MB(ng/L)	cTnT(ng/L)
Sham 组	10	1 983.45 ± 372.86	26.85 ± 10.21
MIRI 组	10	5 432.89 ± 1 212.45 ^a	73.52 ± 9.75 ^a
MIRI + HK 组	10	2 746.43 ± 864.58 ^b	43.92 ± 5.33 ^b
<i>F</i> 值		1169.263	209.541
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注:与 Sham 组比较,^a*P* < 0.001;与 MIRI 组比较,^b*P* < 0.001。

2.2 HK 预处理对 MIRI 小鼠心功能的影响 超声心动图结果显示,与 Sham 组比较,MIRI 组小鼠 LVEF 和 LVFS 降低,LVESD 增加(*P* < 0.01);与 MIRI 组比较,MIRI + HK 组小鼠 LVEF 和 LVFS 增加,LVESD 降低(*P* < 0.01)。而 3 组间 LVEDD 比较差异无显著统计学意义(*P* > 0.05),见图 1、表 2。

2.3 HK 预处理对 MIRI 小鼠心肌梗死面积的影响 TTC 染色评估心肌梗死范围发现,Sham 组、MIRI 组、MIRI + HK 组心肌梗死范围分别为(5.21 ± 0.75)%、(32.65 ± 8.95)% 和(13.67 ± 4.71)% ,3 组间比较差异有统计学意义(*F* = 176.531,*P* < 0.001)。与 Sham 组比较,MIRI 组小鼠心肌梗死面积显著增多(*P* < 0.001);与 MIRI 组比较,MIRI + HK 组小鼠心肌梗死面积显著减少(*P* < 0.001),见图 2。

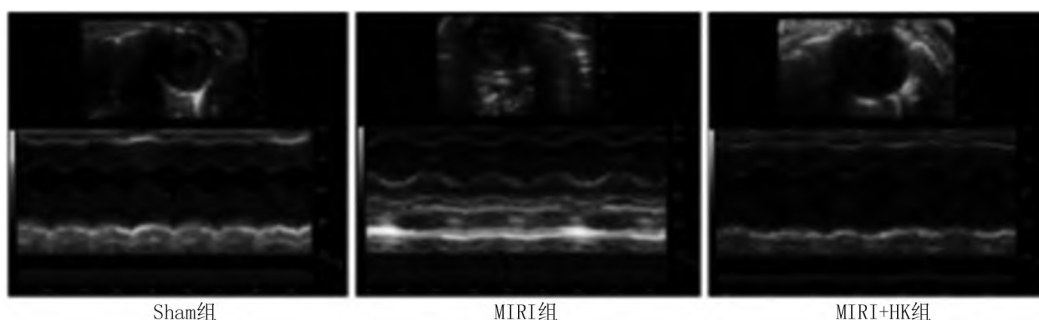


图 1 超声心动图检测各组小鼠心功能
Fig. 1 Echocardiographic detection of heart function in each group of mice

表 2 各组小鼠心功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of cardiac function among different groups of mice

组 别	n	LVEF (%)	LVFS (%)	LVESD (mm)	LVEDD (mm)
Sham 组	10	82.53 ± 6.76	58.33 ± 3.21	1.24 ± 0.36	2.67 ± 0.63
MIRI 组	10	45.87 ± 8.21 ^a	33.37 ± 5.33 ^a	2.43 ± 0.47 ^a	2.88 ± 0.89
MIRI + HK 组	10	83.85 ± 5.98 ^b	57.54 ± 2.47 ^b	1.55 ± 0.21 ^b	2.71 ± 0.53
F 值		241.761	197.564	12.653	0.086
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	0.970

注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.001$;与 MIRI 组比较,^b $P < 0.001$ 。

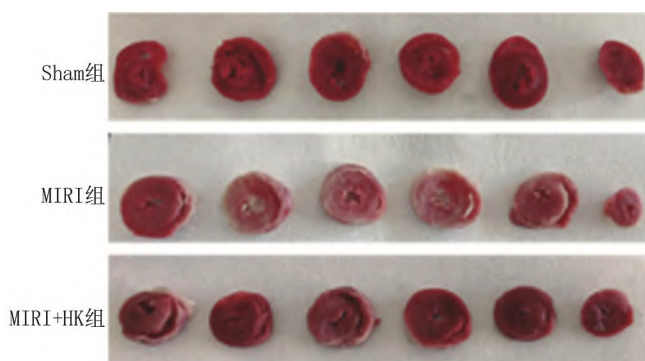


图 2 TTC 染色检测小鼠心肌梗死面积
Fig. 2 TTC staining for detecting myocardial infarction area in mice

2.4 HK 预处理对 MIRI 小鼠心肌细胞凋亡的影响

TUNEL 染色结果显示,Sham 组、MIRI 组、MIRI + HK 组细胞凋亡率分别为 $(1.03 \pm 0.11)\%$ 、 $(68.46 \pm 9.12)\%$ 和 $(33.45 \pm 4.68)\%$,3 组间比较差异有统计学意义 ($F = 64.241, P < 0.001$);与 Sham 组比较, MIRI 组小鼠心肌细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$);与 MIRI 组比较, MIRI + HK 组小鼠心肌细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.01$),见图 3。

2.5 HK 预处理对 MIRI 小鼠心肌细胞线粒体超微结构的影响

电镜观察发现,Sham 组小鼠心肌细胞线粒体形态正常,轮廓清晰,内外膜完整,线粒体嵴排列整

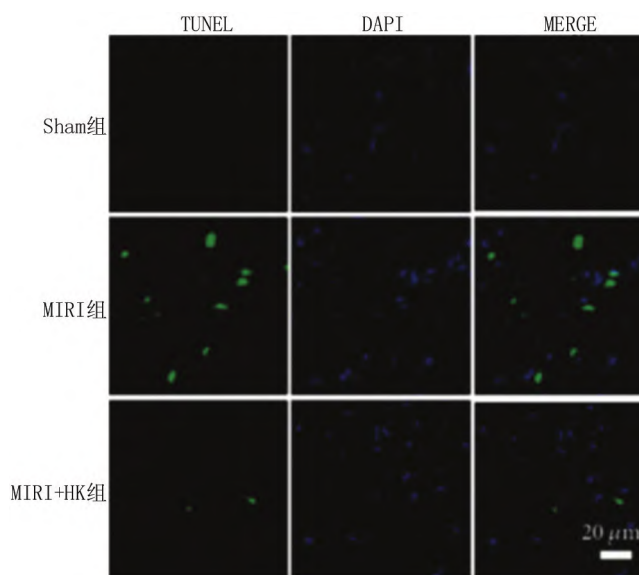


图 3 TUNEL 染色检测小鼠心肌细胞凋亡
Fig. 3 UNEL staining for detecting apoptosis of mice cardiomyocytes

齐,无肿胀或溶解;MIRI 组心肌细胞线粒体大多肿胀,内外双层膜模糊,嵴畸形且减少或缺失;MIRI + HK 组与 MIRI 组比较,线粒体数量增多,且超微结构有所好转,结构较为完整,仅有部分线粒体轻度肿胀,偶见线粒体嵴断裂,见图 4。

2.6 HK 预处理对 MIRI 小鼠心肌细胞线粒体凋亡相

关蛋白的影响 Western-blot 检测线粒体凋亡标志物表达,与 Sham 组比较,MIRI 组小鼠心肌 Cyto-C、Bax 和 Cleaved Caspase-9 蛋白表达显著升高,Bcl-2 蛋白表达明显降低($P < 0.01$);与 MIRI 组比较,MIRI + HK 组小鼠心肌 Cyto-C、Bax 和 Cleaved Caspase-9 蛋白表达降低,Bcl-2 蛋白表达升高($P < 0.01$),见图 5、表 3。

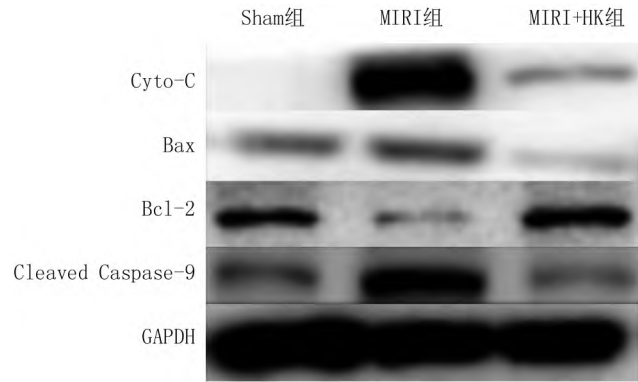


图 5 Western-blot 法检测小鼠心肌细胞线粒体凋亡相关蛋白表达

Fig. 5 Western-blot method for detecting mitochondrial apoptosis related protein expression in mice cardiomyocytes

2.7 HK 预处理对 MIRI 小鼠心肌 PI3K/AKT 信号通路的影响 与 Sham 组比较,MIRI 组小鼠心肌 p-PI3K/PI3K 和 p-AKT/AKT 降低($P < 0.01$);与 MIRI 组比较,MIRI + HK 组小鼠心肌 p-PI3K/PI3K 和

p-AKT/AKT 升高($P < 0.01$),见图 6、表 4。

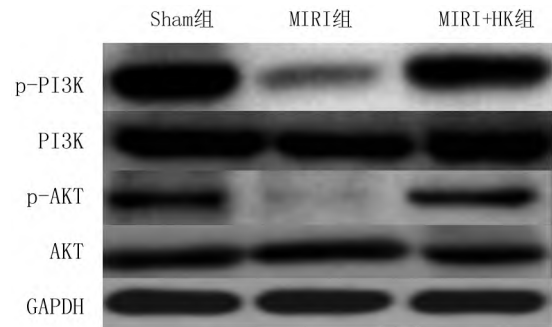


图 6 Western-blot 检测小鼠心肌细胞 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达

Fig. 6 Western blot detection of PI3K/AKT signaling pathway related protein expression in mice cardiomyocytes

表 4 各组小鼠心肌 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Comparison of protein expression related to the PI3K/AKT signaling pathway in the myocardium of mice in each group

组别	n	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT
Sham 组	6	1.05 ± 0.31	1.04 ± 0.26
MIRI 组	6	0.32 ± 0.13 ^a	0.18 ± 0.05 ^a
MIRI + HK 组	6	0.82 ± 0.23 ^b	0.62 ± 0.11 ^b
F 值		7.135	6.863
P 值		<0.001	<0.001

注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.001$;与 MIRI 组比较,^b $P < 0.001$ 。

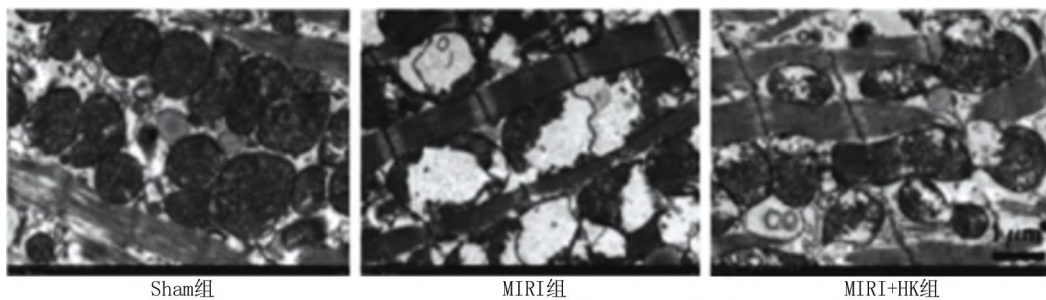


图 4 电子显微镜检测小鼠心肌细胞线粒体超微结构($\times 15\ 000$)

Fig. 4 Electron microscopy examination of mitochondrial ultrastructure in mice cardiomyocytes($\times 15\ 000$)

表 3 各组小鼠心肌细胞线粒体凋亡相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Comparison of mitochondrial apoptosis related protein expression in myocardial cells of mice in each group

组别	n	Cyto-C	Bax	Bcl-2	Cleaved Caspase-9
Sham 组	6	1.01 ± 0.22	0.95 ± 0.26	0.97 ± 0.33	0.91 ± 0.15
MIRI 组	6	14.37 ± 5.65 ^a	1.83 ± 0.47 ^a	0.58 ± 0.19 ^a	1.65 ± 0.25 ^a
MIRI + HK 组	6	7.43 ± 4.21 ^b	0.65 ± 0.47 ^b	1.31 ± 0.33 ^b	1.17 ± 0.21 ^b
F 值		27.368	3.832	4.821	7.134
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.001$;与 MIRI 组比较,^b $P < 0.001$ 。

3 讨论

早期再灌注一直被证明是改善急性心肌梗死患者病死率和预后的最有效方法,然而,再灌注期间伴随的 ROS 过度产生和钙超载对心脏造成额外的损害,导致梗死面积扩大和心功能恶化^[9]。因此,急需探索可保护心肌细胞的有效药物在术前进行预处理。

和厚朴酚(HK)是一种具有潜在治疗益处的生物活性天然化合物,具有多种药理学特性,包括抗炎、抗癌和抗心律失常等,且没有明显的毒副作用。此外, HK 也被认为在心脏疾病治疗中具有潜在的有效作用^[10]。研究显示,在 $\beta 1$ -AAB 诱导的心功能障碍模型中, HK 已被证明可增强心脏收缩能力并减少心肌变性^[11]。此外,在以往的研究中还显示, HK 预处理降低了兔颈动脉球囊损伤模型中的内膜—中膜面积比、内膜增生和胶原沉积^[12]。 Pillai 等^[13]发现, HK 具有抗肥大作用,并可能阻断心肌成纤维细胞增殖和向肌成纤维细胞分化。近年来, HK 被发现在包括心脏在内的多个器官缺血再灌注过程中具有保护功能^[7, 14-16]。然而,目前关于 HK 对 MIRI 影响的证据较少。以往的研究显示, HK 预处理通过减少细胞凋亡和氧化应激来改善患有 1 型糖尿病的大鼠 MIRI^[7],并可显著降低 MIRI 后的梗死面积、促炎细胞因子(TNF- α 、NF- κ B 和 IL-6)和心肌损伤指标(cTnT 和 CK-MB)水平^[8]。本研究结果与这些文献相似, HK 预处理可改善 MIRI 后的心功能损伤,降低心肌损伤指标水平,提示 HK 预处理对 MIRI 具有显著预防和保护作用。

越来越多的证据表明,氧化应激与 MIRI 密切相关^[17]。MIRI 过程中大量 ROS 的产生直接或间接影响心功能,引起心肌细胞功能障碍,促进心脏损伤。线粒体是 ROS 的主要内源性来源和靶点,由于心脏是高耗能器官,心肌细胞富含线粒体,因此心肌细胞对氧化应激信号非常敏感^[18]。生理条件下, ROS 的产生和内源性抗氧化系统之间存在动态平衡, MIRI 等病理状态打破平衡,促进 ROS 过量产生,导致线粒体膜脂质损伤,释放凋亡相关蛋白和 Cyto-C,激活线粒体依赖的凋亡途径,诱导细胞凋亡^[19]。促凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 属于 Bcl-2 蛋白家族,被认为是线粒体依赖的凋亡途径的重要调节因子^[20]。Edlich 等^[21]发现,在健康细胞中,已转位到线粒体的 Bax 通过线粒体上的抗凋亡蛋白(如 Bcl-2)不断向细胞质迁移,以预防线粒体外膜通透性增加。因此, Bcl-2/Bax 比值的变化将影响线粒体通透性和细胞命运。这些研究的发现与本研究相似, MIRI 损伤可诱导心肌细胞促凋亡蛋白表达上调和线粒体肿胀损伤,这提示线粒体依赖的凋亡途

径激活在 MIRI 过程中发挥关键作用。

已发现多种信号通路参与 HK 的心肌保护作用, HK 对 NF- κ B 通路的调控可能降低 STZ 诱导的糖尿病大鼠心肌组织 ROS 水平、内皮细胞凋亡和炎症反应^[22]。此外, HK 可能通过 AMPK/ULK 通路影响心肌细胞自噬,以及通过 PI3K/AKT 通路影响间质纤维化和心肌肥厚^[11, 13]。本研究表明, PI3K/AKT 通路在 HK 预处理的 MIRI 小鼠中发生了改变,表明它参与了 HK 对 MIRI 的心肌保护作用。研究发现, PI3K/AKT 通路激活可降低促凋亡蛋白 Bax 水平,并促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 的释放^[23]。此外, Caspase 的激活可刺激 Cyto-C 的释放,有助于调节线粒体凋亡^[24]。本研究结果还表明, HK 预处理导致 MIRI 中 Cyto-C、Bax 和 Cleaved Caspase-9 的水平下降,并保护线粒体结构,进一步表明 HK 可能通过 PI3K/AKT 信号通路抑制线粒体凋亡来保护 MIRI。

综上所述, HK 预处理可明显改善 MIRI 引起的心功能损伤,并对线粒体超微结构和心肌细胞凋亡具有较好的保护作用,机制可能与其通过激活 PI3K/AKT 信号通路有关。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

王青瑛:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;王相东:实施研究过程,资料搜集整理,论文撰写;邢文文:分析实验数据,进行统计学分析;闫颖:课题设计,论文审核;王郁金:提出研究思路,论文修改

参考文献

- [1] Wu Y, Liu H, Wang X. Cardioprotection of pharmacological preconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Life Sci*, 2021, 264(3):118628. DOI:10.1016/j.lfs.2020.118628.
- [2] Panconesi R, Widmer J, Carvalho MF, et al. Mitochondria and ischemia reperfusion injury [J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2022, 27(5):434-445. DOI:10.1097/MOT.0000000000001015.
- [3] Bugger H, Pfeil K. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(7):165768. DOI:10.1016/j.bbdis.2020.165768.
- [4] 魏成露, 冯庆敏, 陈宋程, 等. 心肌缺血再灌注损伤分子机制的研究进展 [J]. *海南医学院学报*, 2022, 16(3):1268-1274. DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20210507.002.
- [5] Rauf A, Olatunde A, Imran M, et al. Honokiol: A review of its pharmacological potential and therapeutic insights [J]. *Phytomedicine*, 2021, 90(5):153647. DOI:10.1016/j.phymed.2021.153647.
- [6] Liu J, Tang M, Li T, et al. Honokiol ameliorates post-myocardial infarction heart failure through Ucp3-mediated reactive oxygen species inhibition [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13(8):811682. DOI:10.3389/fphar.2022.811682.
- [7] Zhang B, Zhai M, Li B, et al. Honokiol ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in type 1 diabetic rats by reducing oxidative stress and apoptosis through activating the SIRT1-Nrf2 signaling

pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018(1):3159801. DOI: 10.1155/2018/3159801.

[8] Wang Y, Zhang ZZ, Wu Y, et al. Honokiol protects rat hearts against myocardial ischemia reperfusion injury by reducing oxidative stress and inflammation[J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5(1):315-319. DOI: 10.3892/etm.2012.766.

[9] Sánchez-Hernández CD, Torres-Alarcón LA, González-Cortés A, et al. Ischemia/reperfusion injury: Pathophysiology, current clinical management, and potential preventive approaches[J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020(2):8405370. DOI:10.1155/2020/8405370.

[10] Yuan Y, Zhou X, Wang Y, et al. Cardiovascular modulating effects of magnolol and honokiol, two polyphenolic compounds from traditional Chinese medicine-magnolia officinalis[J]. *Curr Drug Targets*, 2020, 21(6):559-572. DOI:10.2174/1389450120666191024175727.

[11] Wei XQ, Zhang HS, Wei GH, et al. Honokiol protects against anti- β 1-adrenergic receptor autoantibody-induced myocardial dysfunction via activation of autophagy[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018(6):1640804. DOI:10.1155/2018/1640804.

[12] Wang Y, Zhao D, Sheng J, et al. Local honokiol application inhibits intimal thickening in rabbits following carotid artery balloon injury[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1):1683-1689. DOI:10.3892/mmr.2017.8076.

[13] Pillai VB, Samant S, Sundaresan NR, et al. Honokiol blocks and reverses cardiac hypertrophy in mice by activating mitochondrial Sirt3[J]. *Nat Commun*, 2015, 6(3):6656. DOI:10.1038/ncomms7656.

[14] Tan Z, Liu H, Song X, et al. Honokiol post-treatment ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury by enhancing autophagic flux and reducing intracellular ROS production[J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 307:82-90. DOI:10.1016/j.cbi.2019.04.032.

[15] Park EJ, Dusabimana T, Je J, et al. Honokiol protects the kidney from renal ischemia and reperfusion injury by upregulating the glutathione biosynthetic enzymes[J]. *Biomedicines*, 2020, 8(9):352. DOI:10.3390/biomedicines8090352.

[16] Yaman Tunc S, Agacayak E, Goruk NY, et al. Protective effects of honokiol on ischemia/reperfusion injury of rat ovary: An experimental study[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10:1077-1083. DOI:10.2147/DDDT.S93768.

[17] Cadenas S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 117:76-89. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.024.

[18] 谭雪峰, 丁志敏, 郭成根, 等. 运动调节线粒体功能改善心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 14(27):2242-2248. DOI:10.12307/2023.180.

[19] Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, et al. Mitochondrial dynamics: Overview of molecular mechanisms[J]. *Essays Biochem*, 2018, 62(3):341-360. DOI:10.1042/EBC20170104.

[20] Yi C, Song M, Sun L, et al. Asiatic acid alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting the ROS-mediated mitochondria-dependent apoptosis pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022(14):3267450. DOI:10.1155/2022/3267450.

[21] Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, et al. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol[J]. *Cell*, 2011, 145(1):104-116. DOI:10.1016/j.cell.2011.02.034.

[22] Qiu L, Xu R, Wang S, et al. Honokiol ameliorates endothelial dysfunction through suppression of PTX3 expression, a key mediator of IKK/I κ B/NF- κ B, in atherosclerotic cell model[J]. *Exp Mol Med*, 2015, 47(7):e171. DOI:10.1038/emm.2015.37.

[23] Shi X, Jie L, Wu P, et al. Calycosin mitigates chondrocyte inflammation and apoptosis by inhibiting the PI3K/AKT and NF- κ B pathways[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 297(28):115536. DOI:10.1016/j.jep.2022.115536.

[24] Duan Z, Ouyang Y, Fu Y, et al. Optical and electrochemical probes for monitoring cytochrome c in subcellular compartments during apoptosis[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2023, 62(18):e202301476. DOI:10.1002/anie.202301476.

(收稿日期:2023-07-09)

(上接 728 页)

[13] 张立阳, 杜宇舒, 李佳钊, 等. 复发性流产患者妊娠早期绒毛膜下血肿的危险因素分析[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2022, 38(10):1013-1015. DOI:10.19538/j.fk2022100113.

[14] Khan RI, Taimoor A, Nazir A, et al. Association of subchorionic hematoma with preterm labour in patients with threatened abortion[J]. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 2021, 33(3):451-455.

[15] Günay T, Yardımcı OD. How does subchorionic hematoma in the first trimester affect pregnancy outcomes[J]. *Arch Med Sci*, 2022, 18(3):639-646. DOI:10.5114/aoms/113645.

[16] Liang W, Yan X, Shi Y, et al. Association between graded subchorionic hematoma and adverse pregnancy outcomes in singleton pregnancies: A prospective observational cohort study[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2024, 309(2):541-549. DOI:10.1007/s00404-023-06943-8.

[17] Inman ER, Miranian DC, Stevenson MJ, et al. Outcomes of subchorionic hematoma-affected pregnancies in the infertile population[J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2022, 159(3):743-750. DOI:10.1002/ijgo.14162.

[18] 张建平. 复发性流产诊治专家共识[J]. *中华妇产科杂志*, 2016, 51(1):3-9. DOI:10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2016.01.002.

[19] Loi K, Tan KT. Massive pre-placental and subchorionic haematoma[J]. *Singapore Med J*, 2006, 47(12):1084-1086.

[20] 胡慧, 胡春花, 何培芝, 等. 早期妊娠重度绒毛膜下血肿患者病因探讨及个体化治疗效果研究[J]. *中国计划生育和妇产科*, 2020, 12(8):33-38. DOI:10.3969/j.issn.1674-4020.2020.08.09.

[21] 张凤悦, 乔宠. 妊娠合并绒毛膜下大血肿病例报道 2 例-出血性/缺血性[J]. *中国计划生育和妇产科*, 2020, 12(8):80-81. DOI:10.3969/j.issn.1674-4020.2020.08.21.

[22] 刘倩, 梁婵玉, 朱燕莉, 等. 血尿素氮、D-二聚体联合胆固醇测定对重度子痫前期的辅助诊断价值[J]. *海南医学*, 2022, 33(2):175-179. DOI:10.3969/j.issn.1003-6350.2022.02.011.

[23] 赵倩, 杨雪梅, 唐海燕. Hey D-D UA 水平联合检测在子痫前期诊断及重度子痫前期预测中的应用[J]. *安徽医学*, 2022, 43(11):1276-1280. DOI:10.3969/j.issn.1000-0399.2022.11.007.

[24] 李甜甜, 高金菊, 黄启玉. 妊娠期糖尿病患者血清 D-D、NO、NOS 水平及预测产后出血[J]. *中国计划生育学杂志*, 2023, 31(5):1196-1199. DOI:10.3969/j.issn.1004-8189.2023.05.041.

[25] Tower CL, Regan L. Intrauterine haematomas in a recurrent miscarriage population[J]. *Human reproduction (Oxford)*, 2001, 16(9):2005-2007. DOI:10.1093/humrep/16.9.2005.

(收稿日期:2024-02-06)