

【 实验研究 】

基于 RhoA/ROCK1/ATP5D 轴探讨大果木姜子油减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤及改善心肌能量代谢的作用机制

汤小芳¹, 李尧锋¹, 李 军², 黄朝霞¹, 褚春薇¹, 杨桃梅¹, 成婷婷², 陈向云^{1*}

1. 贵州中医药大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550025

2. 贵州中医药大学 中药民族药资源研究院, 贵州 贵阳 550025

摘要: **目的** 探讨大果木姜子油 (LLEO) 对大鼠心肌缺血再灌注损伤 (MIRI) 的保护作用及其对心肌能量代谢的影响, 并初步分析 Ras 同源家族成员 A (RhoA) /Rho 相关卷曲螺旋结构域蛋白激酶 1 (ROCK1) /ATP 合酶 δ 亚基 (ATP5D) 轴相关调控变化。**方法** SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 随机分为假手术组、模型组、复方丹参滴丸 (阳性药, $0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组及 LLEO 低、中、高剂量 (0.3 、 0.4 、 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组, 每组 10 只, 假手术组和模型组给予等体积溶媒 (含 1% 聚山梨酯-80 的 0.9% 氯化钠溶液), 连续 ig 14 d。末次给药后, 采用左前降支冠状动脉结扎 30 min、再灌注 60 min 建立 MIRI 模型, 各组最终纳入分析大鼠 8 只。采用生物机能实验系统检测心功能, 苏木素-伊红 (HE) 染色和透射电镜观察心肌病理及超微结构, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血清心肌损伤标志物, TUNEL 染色检测心肌细胞凋亡, Western blotting 检测凋亡相关蛋白及 RhoA、ROCK1、ATP5D 蛋白表达, 比色法检测氧化应激指标及 ATP 合酶活性, 试剂盒法检测三磷酸腺苷 (ATP)、二磷酸腺苷 (ADP)、一磷酸腺苷 (AMP) 水平并计算 ATP/ADP、ATP/AMP 值。**结果** 与模型组比较, LLEO 可改善心功能, 减轻心肌病理及超微结构损伤, 降低心肌损伤标志物水平、氧化应激水平和心肌细胞凋亡率, 升高 ATP/ADP、ATP/AMP 值及 ATP 合酶活性, 上调 ATP5D 表达, 作用在中、高剂量组均差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 中、高剂量组可显著下调 RhoA、ROCK1 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** LLEO 可减轻大鼠 MIRI 所致心功能障碍、心肌结构损伤、氧化应激和细胞凋亡, 并改善心肌能量代谢, 其作用可能与抑制 RhoA/ROCK1 异常激活、上调 ATP5D 表达并提高 ATP 合酶活性有关。

关键词: 大果木姜子油; 心肌缺血再灌注损伤; RhoA/ROCK1 信号通路; ATP 合酶; ATP5D; 能量代谢

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2026)10-3579-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.10.015

Investigating mechanism of *Litsea lancilimba* essential oil in attenuating myocardial ischemia-reperfusion injury and improving myocardial energy metabolism in rats with a focus on RhoA/ROCK1/ATP5D axisTANG Xiaofang¹, LI Yaofeng¹, LI Jun², HUANG Zhaoxia¹, CHU Chunwei¹, YANG Taomei¹, CHENG Tingting², CHEN Xiangyun¹

1. School of Basic Medical Sciences, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. Institute of Chinese Materia Medica and Ethnic Drug Resources, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To investigate the protective effects of *Litsea lancilimba* essential oil (LLEO) against myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) in rats and its effects on myocardial energy metabolism, and to preliminarily explore the regulatory changes related to the RhoA/ROCK1/ATP5D axis. **Methods** Sixty SPF-grade male SD rats were randomly divided into six groups: sham surgery group, model group, Compound Danshen Drip Pills group (positive control, $0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and LLEO low-, medium-, and high-

收稿日期: 2026-06-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82060770); 贵州中医药大学国家与省级科技创新人才团队培育项目 (贵中医[2024]002 号)

作者简介: 汤小芳, 女, 博士, 讲师, 研究方向为中药及民族药防治心血管疾病的药理学研究。E-mail: txf0113@163.com

*通信作者: 陈向云, 博士, 副教授, 研究方向为中西医结合防治心血管病。E-mail: chenxyunxy@163.com

dose groups (0.3, 0.4, and 0.5 mL·kg⁻¹), with 10 rats in each group. The sham and model groups received an equal volume of solvent (0.9% NaCl solution containing 1% polysorbate-80) by oral gavage for 14 consecutive days. After the final administration, myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) was induced by ligating the left anterior descending coronary artery for 30 minutes followed by 60 minutes of reperfusion. Eight rats from each group were included in the final analysis. Cardiac function was assessed using a biological function experimental system; myocardial pathology and ultrastructure were examined via hematoxylin-eosin (HE) staining and transmission electron microscopy; serum myocardial injury markers were measured by ELISA; myocardial cell apoptosis was detected by TUNEL staining; expression of apoptosis-related proteins, RhoA, ROCK1, and ATP5D was analyzed by Western blotting; oxidative stress indicators and ATP synthase activity were determined by colorimetric assays; levels of adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), and adenosine monophosphate (AMP) were measured using commercial kits, and the ATP/ADP and ATP/AMP ratios were calculated. **Results** compared to the model group, LLEO improved cardiac function, reduced myocardial pathological and ultrastructural damage, decreased levels of myocardial injury markers and oxidative stress, and lowered the rate of myocardial cell apoptosis. It also increased the ATP/ADP and ATP/AMP ratios and ATP synthase activity, upregulated ATP5D expression, with significant differences observed in the medium- and high-dose groups ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Moreover, the medium- and high-dose groups significantly downregulated RhoA and ROCK1 protein expression ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** LLEO can alleviate MIRI-induced cardiac dysfunction, myocardial structural injury, oxidative stress, and cardiomyocyte apoptosis, and improve myocardial energy metabolism in rats. Its effects may be associated with inhibition of abnormal RhoA/ROCK1 activation, upregulation of ATP5D expression, and enhancement of ATP synthase activity.

Key words: *Litsea lancilimba* essential oil; myocardial ischemia-reperfusion injury; RhoA/ROCK1 signaling pathway; ATP synthase; ATP5D; energy metabolism

缺血性心脏病是威胁人类健康的重要心血管疾病之一^[1]。经皮冠状动脉介入治疗、冠状动脉旁路移植术及溶栓治疗等血运重建手段可及时恢复缺血心肌灌注^[2]。然而,血流恢复本身也可诱发心律失常、心功能异常、能量代谢紊乱及心肌细胞死亡等继发性损伤,即心肌缺血再灌注损伤(MIRI)。MIRI是导致患者术后并发症发生率和死亡率上升的主要因素之一^[3-4]。目前临床上尚缺乏公认有效的MIRI防治策略,因此寻找兼具多靶点调节作用和较好安全性的干预药物具有重要意义^[5]。

MIRI的病理生理机制复杂,涉及线粒体功能受损、能量代谢障碍、氧化应激、钙超载、炎症反应、微血管损伤以及细胞凋亡等多个环节^[6]。其中,能量代谢障碍被认为是驱动MIRI发生和发展的核心因素^[7-9]。心肌细胞高度依赖线粒体氧化磷酸化供能^[10]。缺血期,由于氧气和代谢底物供应中断,心肌细胞被迫转向效率低下的无氧糖酵解,三磷酸腺苷(ATP)合成急剧减少,进而引发严重的细胞内能量代谢紊乱^[11]。作为能量代谢的最终执行者,位于线粒体内膜的ATP合酶(复合体V)是催化二磷酸腺苷(ADP)磷酸化生成ATP的关键酶^[12]。该酶由包括ATP合酶 δ 亚基(ATP5D)在内的多个亚基构成,其中ATP5D为位于催化核心F1部分的 δ 亚基^[13],对维持ATP合酶整体结构稳定性、保证质子转运与ATP合成偶联效率至关重要^[14]。在MIRI病

理条件下,ATP合酶的结构与功能极易受损,成为能量代谢障碍的关键节点^[12-13]。进入再灌注期后,血流的恢复虽然带来了氧气,但心肌细胞的能量匮乏状态并未立即缓解。再灌注时大量氧气涌入,功能尚未完全恢复的线粒体电子传递链发生电子“泄漏”,使氧被部分还原而产生过量活性氧(ROS),诱发强烈的氧化应激反应^[15]。过量的ROS一方面直接攻击线粒体呼吸链复合体及ATP合酶,进一步降低氧化磷酸化效率;另一方面通过改变ATP合酶亚基蛋白的表达,加剧其功能障碍^[16]。由此,在再灌注这一本应恢复能量供给的关键时期,ATP合成依然严重不足。ATP的持续匮乏一方面直接削弱心肌收缩功能,另一方面则诱发心肌细胞凋亡,加剧组织损伤^[17-18]。因此,靶向线粒体复合体V,保护其功能以改善能量代谢,已成为干预MIRI的重要潜在治疗策略^[19]。

Ras同源家族成员A(RhoA)/Rho相关卷曲螺旋结构域蛋白激酶1(ROCK1)信号通路广泛参与心血管病理过程,可通过调节细胞骨架重塑、线粒体动力学、内皮功能及基因表达等影响MIRI^[20-22]。已有研究证实RhoA/ROCK1通路的异常激活可下调心肌ATP5D的表达、影响线粒体能量代谢,而以天然产物三七皂苷R₁或ROCK特异性抑制剂Y-27632靶向抑制该通路,则可恢复ATP5D水平、改善能量代谢障碍并减轻心肌损伤^[23-24]。这提示

RhoA/ROCK1/ATP5D 调控轴是干预 MIRI 能量代谢紊乱的关键作用环节^[25]。靶向 RhoA/ROCK1 通路、保护 ATP 合酶功能已成为干预 MIRI、保护心肌能量代谢的重要研究方向。

大果木姜子 *Litsea lancilimba* Merr. 为贵州苗族地区常用民族药, 其干燥果实传统用于胸痹心痛、脘腹胀痛等证候, 挥发油为其重要活性成分, 主要含桉油精、柠檬烯、香桉烯等^[26-27]。课题组前期研究提示, 大果木姜子油 (*Litsea lancilimba* essential oil, LLEO) 可能具有心血管保护潜力^[28-29]。然而, LLEO 对 MIRI 的保护作用及其对心肌能量代谢的影响尚不明确。基于此, 本研究建立大鼠 MIRI 模型, 从心功能、组织病理、凋亡、氧化应激、能量代谢及 RhoA/ROCK1/ATP5D 相关蛋白表达等方面, 系统评价 LLEO 的心肌保护作用及机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量 180~220 g, 购自斯贝福(北京)生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK(京)2019-0010。于环境温度(22±2)℃、相对湿度(40±5)%、12 h/12 h 明暗交替条件下适应性饲养 7 d, 自由摄取食物和水。实验方案经贵州中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号 20210098)。

1.2 药物及主要试剂

LLEO(贵州益佰制药股份有限公司, 批号 20210619, 桉油精质量分数≥12.0%), 临用前以含 1%聚山梨酯-80 的 0.9%氯化钠溶液乳化, 并按各剂量配制成相应浓度乳液; 复方丹参滴丸(DDP, 天士力医药集团股份有限公司, 规格每丸 27 mg, 批号 210741), 临用前以 0.9%氯化钠溶液溶解稀释; 丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所, 货号 A003-1、A001-3、A005-1、A007-1); 核苷酸检测试剂盒(货号 BC5114)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号 PC0020), 购自北京索莱宝科技有限公司; TUNEL 试剂盒(货号 C1088)、RIPA 裂解液(货号 P0013B), 购自上海碧云天生物技术有限公司; ATP 合酶活性检测试剂盒(苏州格锐思生物科技有限公司, 货号 G0876W); 心肌肌钙蛋白 I(cTnI)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶 MB(CK-MB) ELISA 试剂盒(泉州市睿信生物科技有限公司, 货号 RX302639R、

RX300944R、RX301189R); 二抗为 HRP 标记山羊抗兔 IgG(货号 SA00001-2)及 HRP 标记山羊抗鼠 IgG(货号 SA00001-1), 一抗为 B 细胞淋巴瘤 2(Bcl-2, 货号 26593-1-AP, 稀释比 1:2 000)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax, 货号 50599-2-Ig, 稀释比 1:6 000)、RhoA(货号 10749-1-AP, 稀释比 1:2 000)、ROCK1(货号 21850-1-AP, 稀释比 1:2 000)、GAPDH(内参, 货号 60004-1-Ig, 稀释比 1:50 000), 均购自武汉三鹰生物技术有限公司; pro-天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白水解酶(Caspase)-3(货号 AF6311, 稀释比 1:2 000)、cleaved-Caspase-3(货号 AF7022, 稀释比 1:1 000)、pro-Caspase-9(货号 AF6348, 稀释比 1:2 000)、cleaved-caspase-9(货号 AF5240, 稀释比 1:1 000)、ATP5D(货号 DF12845, 稀释比 1:2 000), 购自江苏亲科生物研究中心有限公司。

1.3 实验仪器

HX-101E 小动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司); BL-420S 生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司); Nikon ECLIPSE Ci-L 光学显微镜、Nikon ECLIPSE 80i 荧光显微镜(日本尼康株式会社); JEOL JEM-1011 透射电镜(日本电子株式会社); BIOBASE-EL10A 自动酶标仪(济南博科生物科技股份有限公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司); Sorvall ST 16R 台式高速冷冻离心机(美国赛默飞世尔科技有限公司); Mini-PROTEAN Tetra 电泳系统及 Trans-Blot 转印系统(美国伯乐生命医学产品有限公司); Tanon 5200 化学发光成像仪(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 MIRI 模型建立与分组

按随机数字表法将大鼠分为假手术组、模型组、DDP(阳性药, 0.4 g·kg⁻¹^[30])组及 LLEO 低、中、高剂量(0.3、0.4、0.5 mL·kg⁻¹^[31])组, 每组 10 只。各组连续 ig 给药 14 d, 每天 1 次, ig 体积均为 10 mL·kg⁻¹; 假手术组与模型组给予等体积溶媒(含 1%聚山梨酯-80 的 0.9%氯化钠溶液)。末次给药后, 大鼠禁食 12 h, ip 25%乌拉坦(1 g·kg⁻¹)麻醉, 气管插管接 HX-101E 小动物呼吸机机械通气。造模大鼠经左胸第 3~4 肋间开胸暴露心脏, 以 5-0 无创丝线结扎左前降支冠状动脉(LAD) 30 min, 以心电图 ST 段抬高及局部发绀判定缺血成功, 随后松解结扎线再灌注 60 min, 建立 MIRI 模型; 假手术组仅于 LAD 下穿线而不结扎。造模过程中因麻醉死

亡、术中死亡或造模失败而剔除部分动物，各组最终纳入分析 8 只大鼠。

2.2 心功能检测

再灌注 60 min 后，经右颈总动脉将 PE-50 导管插入左心室并连接 BL-420S 生物机能实验系统，平衡 10 min 后连续记录左心室收缩压 (LVSP)、左心室舒张末压 (LVEDP) 及左心室内压最大上升/下降速率 ($\pm dp/dt_{\max}$)。

2.3 组织病理与超微结构观察

取缺血边缘区心肌组织，4%多聚甲醛固定后石蜡包埋、切片 (5 μm)，常规苏木精-伊红 (HE) 染色，光学显微镜下观察病理形态。另取缺血边缘区心肌组织，戊二醛-锇酸固定、梯度脱水、环氧树脂包埋，制备超薄切片 (60~80 nm)，醋酸铀-柠檬酸铅染色后经透射电镜观察线粒体等超微结构。

2.4 心肌损伤血清生物标志物

完成心功能检测后，经腹主动脉采集血样，室温静置 30 min，3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min，分离上层血清，-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待测。使用 ELISA 试剂盒，按照制造商说明书操作，检测血清 cTnI、CK 和 CK-MB 的质量浓度。每个样品设 3 个复孔，使用 BIOBASE-EL10A 自动酶标仪读取吸光度 (A) 值，根据标准曲线计算各指标浓度。

2.5 TUNEL 检测心肌细胞凋亡

按 TUNEL 试剂盒说明书检测石蜡切片中的心肌细胞凋亡，Hoechst 33342 复染细胞核，荧光显微镜下随机取 5 个视野拍照，Image J 计数，计算凋亡率。

$$\text{凋亡率} = \text{阳性细胞数} / \text{总细胞数}$$

2.6 Western blotting 检测

取缺血边缘区心肌，加 RIPA 裂解液冰上研磨裂解，离心取上清，BCA 法测定蛋白浓度。取等量蛋白 (每泳道 30 μg) 经 8%、10% SDS-PAGE 分离后转至 PVDF 膜，5%脱脂奶粉室温封闭 1.5 h，4 $^{\circ}\text{C}$ 与一抗孵育过夜。TBST 洗膜后，与对应种属的 HRP 标记二抗 (1:10 000) 室温孵育 1 h，ECL 显影，Image J 分析条带灰度值，以 GAPDH 为内参计算目标蛋白相对表达量。

2.7 氧化应激指标

取缺血边缘区心肌组织制备 10%匀浆，离心取上清，按生化试剂盒说明书以比色法测定 MDA 含量及 SOD、GSH-Px、CAT 活性，以 BCA 法测定的匀浆蛋白浓度校正。

2.8 心肌能量代谢物检测

取缺血边缘区心肌组织液氮速冻研磨，5%高氯酸沉淀蛋白，离心取上清经 KOH 中和、滤膜滤过后，按核苷酸检测试剂盒说明书检测 ATP、二磷酸腺苷 (ADP)、腺苷一磷酸 (AMP) 含量，计算 ATP/ADP 与 ATP/AMP 值。

2.9 ATP 合酶活性

取缺血边缘区心肌组织匀浆离心取上清，BCA 法测定蛋白浓度，按线粒体复合体 V/ATP 合酶试剂盒以比色法 (660 nm) 测定 ATP 合酶活性。

2.10 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9 软件分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较用单因素方差分析 (one-way ANOVA)，两两比较用 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

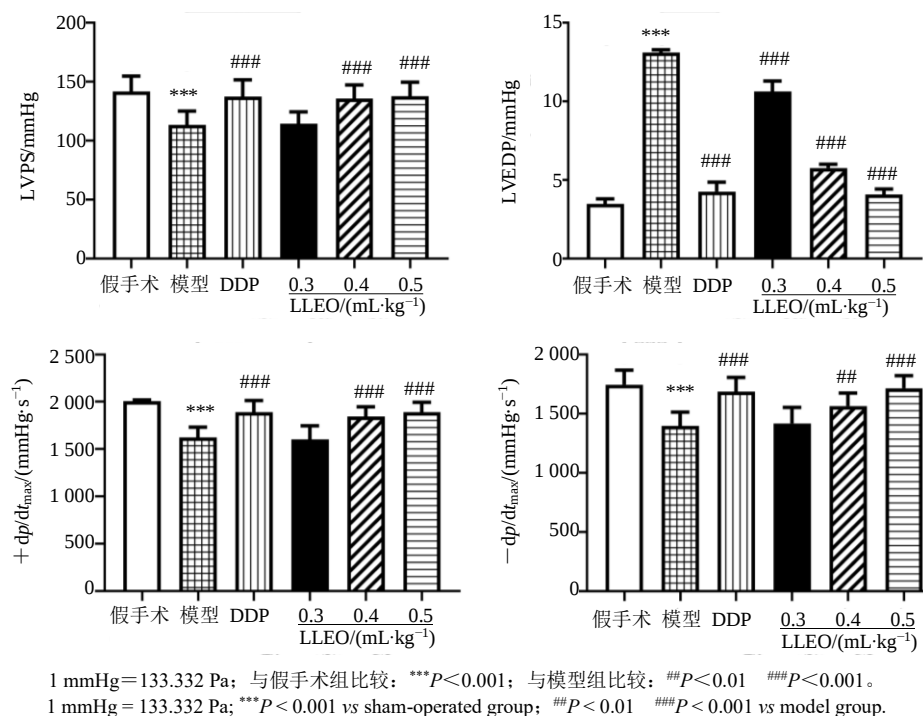
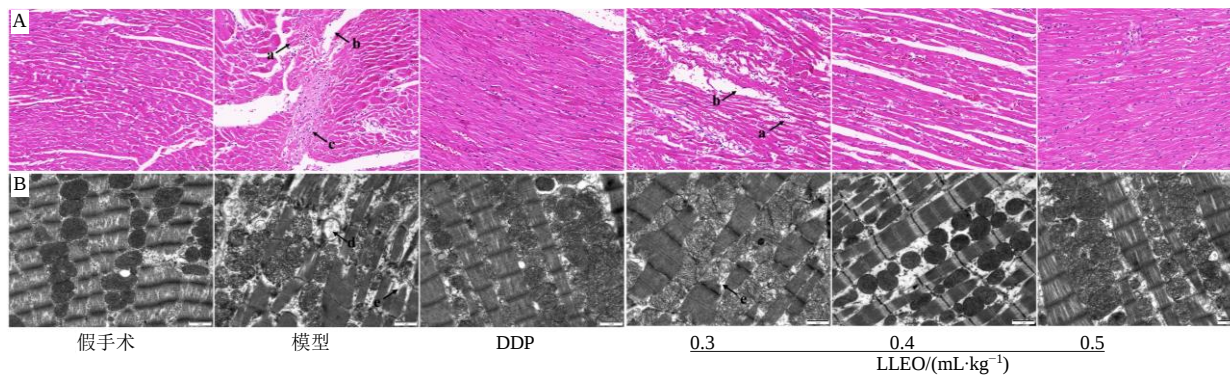
3.1 LLEO 对 MIRI 大鼠心功能的影响

采用 BL-420S 生物机能实验系统监测各组大鼠心功能相关指标，结果见图 1。与假手术组相比，模型组大鼠 LVSP、 $+dp/dt_{\max}$ 和 $-dp/dt_{\max}$ 均显著降低，LVEDP 显著升高 ($P < 0.001$)，提示 MIRI 导致大鼠心功能受损。与模型组相比，LLEO 预处理可不同程度改善上述指标，其中中、高剂量组均差异显著 ($P < 0.01, 0.001$)，说明 LLEO 能有效改善 MIRI 诱导的大鼠心功能障碍。

3.2 LLEO 对 MIRI 大鼠心肌组织损伤的影响

HE 染色结果 (图 2-A) 显示，假手术组大鼠心肌组织结构完整，心肌纤维排列规则有序。模型组心肌组织呈现典型的缺血再灌注损伤形态学特征，表现为心肌纤维排列紊乱伴断裂，间质明显水肿以及炎症细胞浸润。LLEO 预处理可不同程度减轻上述病理损伤改变，其中高剂量组心肌结构基本恢复正常，心肌纤维排列整齐，未见明显断裂、间质水肿及炎症细胞浸润。透射电镜观察心肌组织超微结构 (图 2-B) 发现，与假手术组相比，模型组心肌超微结构损伤严重，表现为肌原纤维排列紊乱、断裂，线粒体明显肿胀并出现空泡化。经 LLEO 中、高剂量组预处理后，心肌纤维超微结构得到明显改善，肌原纤维排列较整齐，线粒体肿胀减轻，结构趋于完整。

心肌损伤标志物检测结果 (图 3) 显示，与假手术组相比，模型组血清 cTnI、CK 及 CK-MB 水平显著升高 ($P < 0.001$)，提示 MIRI 造成心肌细胞

图 1 LLEO 对 MIRI 大鼠心功能的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)Fig. 1 Effects of LLEO on cardiac function in MIRI rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)图 2 LLEO 对 MIRI 大鼠心肌组织病理 (A, $\times 400$) 及超微结构 (B, $\times 5\,000$) 的影响Fig. 2 Effects of LLEO on myocardial histopathology (A, $\times 400$) and ultrastructure (B, $\times 5\,000$) in MIRI rats

损伤及细胞膜完整性破坏;与模型组比较,经 LLEO 预处理后,上述指标异常变化得到不同程度逆转 ($P<0.05$ 、 0.01),说明 LLEO 可减轻 MIRI 诱导的心肌损伤。

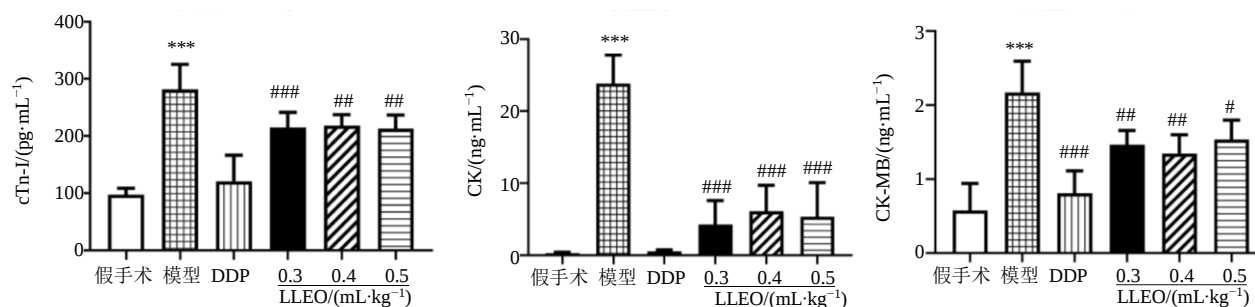
综合以上结果表明, LLEO 可在组织形态学、超微结构及生化标志物层面减轻 MIRI 所致心肌损伤。

3.3 LLEO 对 MIRI 大鼠心肌细胞凋亡的影响

采用 TUNEL 染色法检测心肌细胞凋亡情况,结果如图 4 所示。假手术组心肌组织中 TUNEL 阳性细胞较少,模型组 TUNEL 阳性细胞明显增多,凋亡率显著升高 ($P<0.001$);与模型组比较, LLEO

预处理后, TUNEL 阳性细胞数量及凋亡率不同程度降低 ($P<0.001$),提示其可抑制 MIRI 诱导的心肌细胞凋亡。

利用 Western blotting 技术检测凋亡相关蛋白表达水平,结果见图 5。与假手术组相比,模型组大鼠心肌组织中抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著降低,促凋亡蛋白 Bax 表达显著升高,cleaved Caspase-3/pro-Caspase-3、cleaved Caspase-9/pro-Caspase-9 值显著升高 ($P<0.001$)。与模型组比较, LLEO 预处理可不同程度逆转上述改变 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),进一步提示其具有抗心肌细胞凋亡作用。

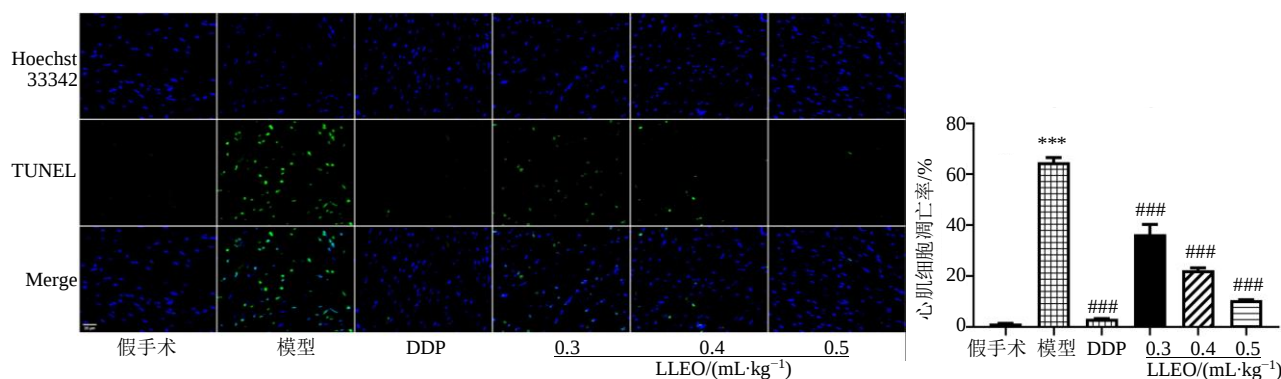


与假手术组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs sham-operated group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 3 LLEO 对 MIRI 大鼠血清心肌损伤标志物的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Fig. 3 Effects of LLEO on serum myocardial injury markers in MIRI rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

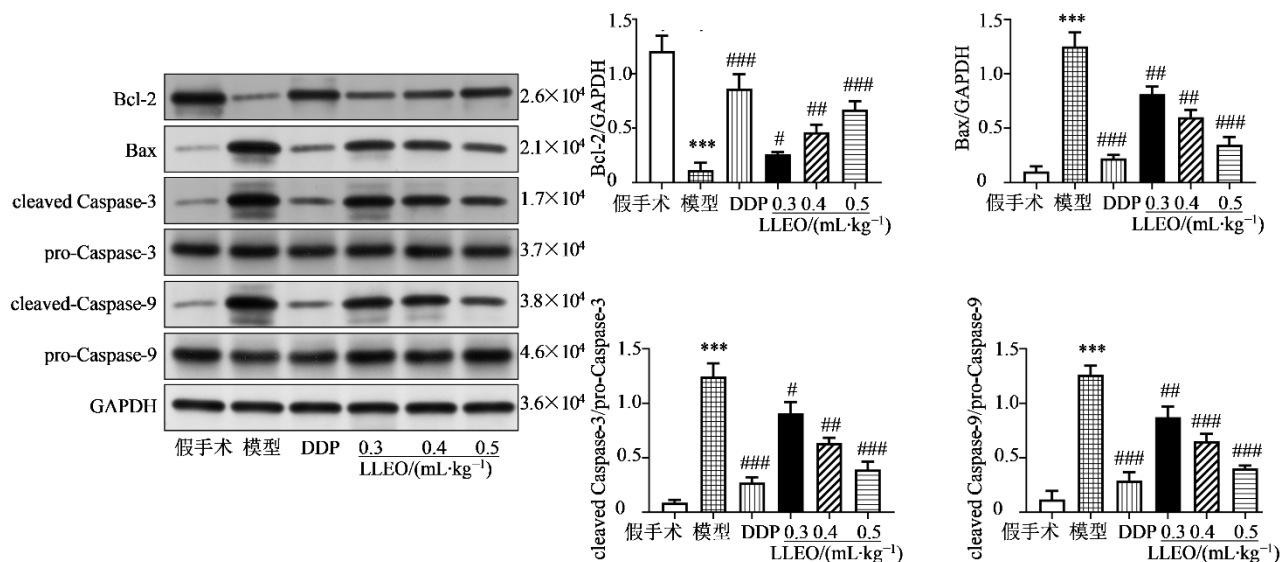


与假手术组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs sham-operated group; ### $P < 0.001$ vs model group.

图 4 LLEO 对 MIRI 大鼠心肌细胞凋亡的影响 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 4 Effects of LLEO on cardiomyocyte apoptosis in MIRI rats ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)



与假手术组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs sham-operated group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 5 LLEO 对 MIRI 大鼠心肌组织中凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effects of LLEO on apoptosis-related protein expression in myocardial tissue of MIRI rats ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.4 LLEO 对 MIRI 大鼠心肌氧化应激的影响

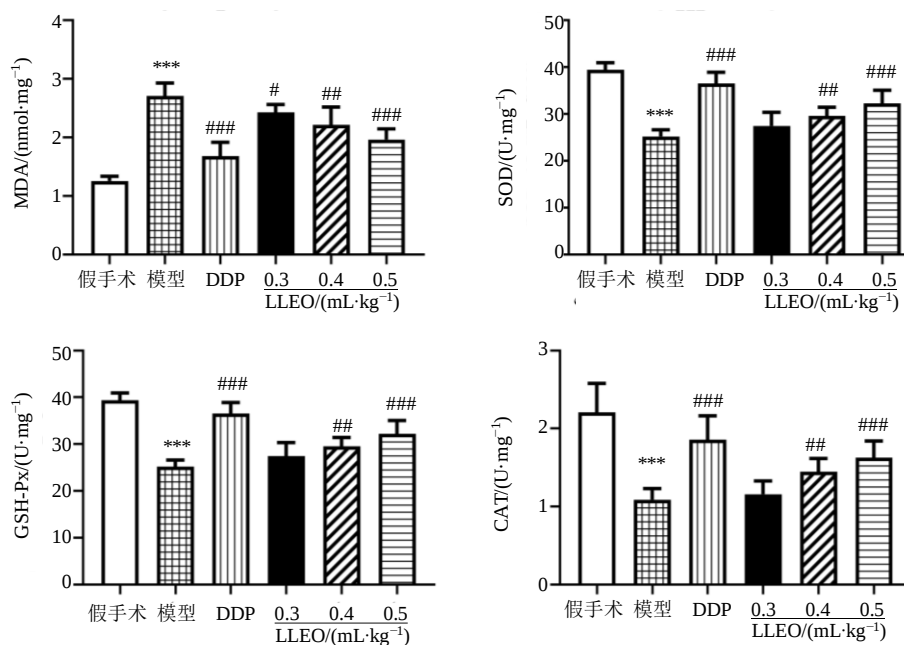
利用生化检测方法测定心肌组织中 MDA 含量及 SOD、GSH-Px、CAT 的活性,结果如图 6 所示。与假手术组相比, MIRI 模型组大鼠心肌组织中 MDA 含量显著升高, SOD、GSH-Px 及 CAT 活性均显著降低 ($P<0.001$), 提示 MIRI 诱导心肌细胞发生明显氧化应激。与模型组比较, LLEO 预处理后, MDA 水平下降, 抗氧化酶活性不同程度恢复, 高、中剂量组差异显著 ($P<0.01$ 、 0.001); 说明其可缓解 MIRI 所致心肌氧化应激。

3.5 LLEO 对 MIRI 大鼠能量代谢的影响

为探究 LLEO 对 MIRI 大鼠心肌能量代谢的影

响, 本研究检测心肌组织中 ATP、ADP、AMP 含量, 并以 ATP/ADP、ATP/AMP 值评价能量代谢状态 (图 7)。与假手术组相比, 模型组大鼠心肌组织中 ATP/ADP 及 ATP/AMP 值均显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001), 提示 MIRI 导致心肌能量代谢障碍; 与模型组比较, LLEO 预处理后, 上述比值不同程度回升, 高、中剂量组差异显著 ($P<0.01$ 、 0.001), 提示其可改善 MIRI 引起的能量代谢紊乱。

进一步采用比色法检测 ATP 合酶活性, 并通过 Western blotting 检测 ATP 合酶 δ 亚基 ATP5D 表达水平 (图 8)。与假手术组相比, 模型组 ATP 合酶活性及 ATP5D 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001);

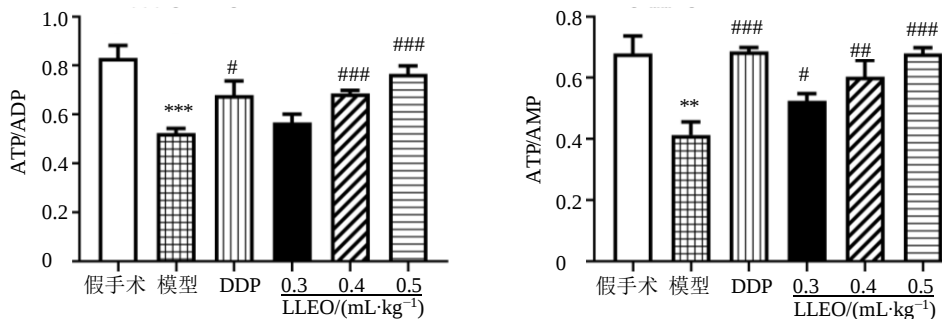


与假手术组比较: *** $P<0.001$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ 。

*** $P<0.001$ vs sham-operated group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group.

图 6 LLEO 对 MIRI 大鼠心肌氧化应激水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Fig. 6 Effects of LLEO on oxidative stress in MIRI rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)



与假手术组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ 。

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs sham-operated group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group.

图 7 LLEO 对 MIRI 大鼠心肌能量代谢的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Fig. 7 Effects of LLEO on energy metabolism in MIRI rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

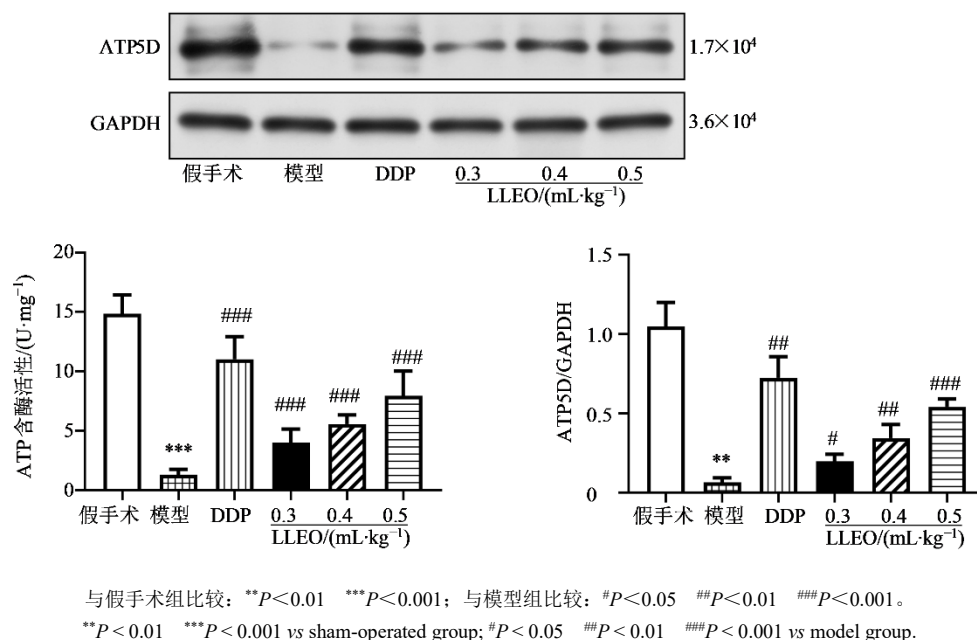


图 8 LLEO 对 MIRI 大鼠 ATP 合酶活性 ($n=8$) 及 ATP5D 蛋白表达 ($n=3$) 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 8 Effects of LLEO on ATP synthase activity ($n=8$) and ATP5D protein expression ($n=3$) in MIRI rats ($\bar{x} \pm s$)

与模型组比较, LLEO 预处理后, ATP 合酶活性提高, ATP5D 表达不同程度上调 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 提示其改善能量代谢的作用可能与保护 ATP 合酶功能有关。

3.6 LLEO 对 MIRI 大鼠 RhoA/ROCK1 通路相关蛋白表达的影响

本研究进一步探讨 LLEO 对 RhoA/ROCK1 信号通路的影响。Western blotting 结果显示 (图 9), 与假手术组相比, MIRI 模型组心肌组织中 RhoA 和

ROCK1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, LLEO 中、高剂量组可显著下调二者表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结合 ATP5D 表达及 ATP 合酶活性变化, 上述结果提示 RhoA/ROCK1/ATP5D 轴相关改变可能参与 LLEO 改善 MIRI 所致心肌能量代谢障碍的过程。

4 讨论

本研究发现, LLEO 预处理能够显著改善 MIRI 大鼠的心功能, 减轻心肌组织病理损伤, 抑制心肌

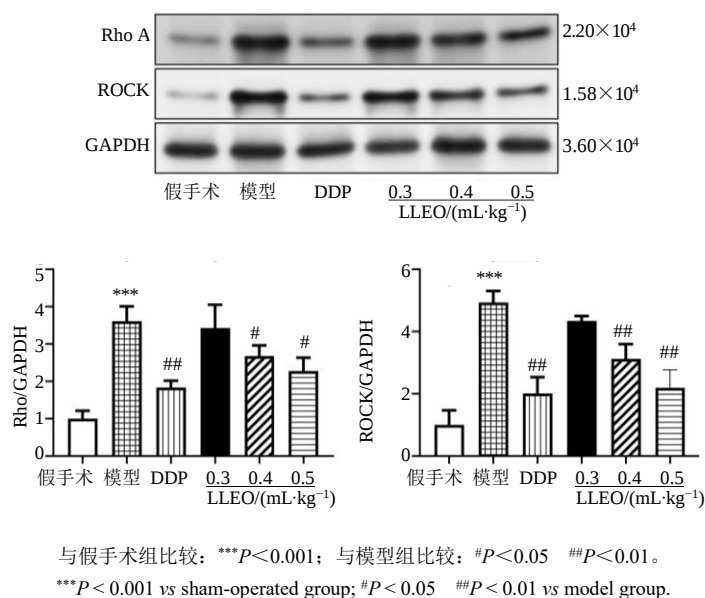


图 9 LLEO 对 MIRI 大鼠心肌组织 RhoA/ROCK1 通路相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 9 Effects of LLEO on RhoA/ROCK1 pathway-related proteins in myocardial tissue of MIRI rats ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

细胞凋亡, 缓解氧化应激, 并改善能量代谢障碍。上述保护效应可能与抑制 RhoA/ROCK1 信号通路异常激活、上调 ATP5D 表达并提高 ATP 合酶活性有关。与既往 LLEO 心肌保护研究多聚焦于整体药理学效应不同^[32-33], 本研究在分子层面初步提示 RhoA/ROCK1/ATP5D 相关改变可能参与 LLEO 抗 MIRI 的作用, 为进一步阐明其潜在作用机制及能量代谢相关保护效应提供了新的实验线索。

能量代谢障碍是 MIRI 的核心病理环节^[10-11]。MIRI 模型大鼠心肌组织 ATP/ADP、ATP/AMP 值显著降低, ATP 合酶活性及 ATP5D 蛋白表达显著下降, 与既往多项 MIRI 研究中能量代谢异常的结果一致^[34-35]; LLEO 预处理后上述指标显著改善, 提示其能有效保护 ATP 合酶功能、保障再灌注期心肌能量供给。心肌收缩功能高度依赖充足的 ATP 供给, 该药在改善能量代谢的同时显著改善心功能, 提示能量代谢的恢复可能是其减轻 MIRI 心功能障碍的重要物质基础。ATP5D 表达下调可导致复合体 V 装配异常及 ATP 生成减少^[13,23]。本研究观察到 LLEO 可上调 ATP5D 表达并提高 ATP 合酶活性, 提示 ATP5D 相关变化可能参与其改善心肌能量代谢的过程。

在 MIRI 病理过程中, RhoA/ROCK1 通路被异常激活, 通过下游效应器 ROCK1 磷酸化 MYPT1、MLC、Drp1 等底物, 介导心肌过度收缩、线粒体过度分裂及内皮功能障碍, 进而加重能量代谢紊乱^[22,36-37]。结果显示, MIRI 模型大鼠心肌组织中 RhoA、ROCK1 蛋白表达显著升高, LLEO 中、高剂量组可显著下调二者表达。结合前述 ATP5D 表达与 ATP 合酶活性的变化, 提示 LLEO 改善心肌能量代谢的作用可能与抑制 RhoA/ROCK1 通路异常激活、上调 ATP5D 表达并提高 ATP 合酶活性有关。这与既往靶向 RhoA/ROCK 通路 (如 ROCK 抑制剂 Y-27632) 可改善 MIRI 心功能、缩小梗死面积、保护线粒体能量代谢的报道具有一定一致性^[24,38-39], 也提示 RhoA/ROCK1 通路可能是 MIRI 能量代谢紊乱干预的重要潜在靶点。

心肌细胞凋亡和氧化应激同样是 MIRI 导致心功能损害的重要机制^[40-42]。MIRI 模型大鼠 TUNEL 阳性细胞增多, Bcl-2 表达降低, Bax 表达升高, cleaved Caspase-3/pro-Caspase-3、cleaved Caspase-9/pro-Caspase-9 值升高, 同时 MDA 水平升高, SOD、GSH-Px、CAT 活性下降。LLEO 可不同程

度逆转上述改变, 提示其具有抗凋亡和抗氧化作用。考虑到线粒体能量代谢障碍可促进 ROS 生成和 Caspase 级联激活, 而过量 ROS 又可进一步损伤呼吸链和 ATP 合酶^[16,43], LLEO 可能通过改善线粒体能量代谢、降低氧化应激及抑制凋亡形成综合保护效应。

本研究中, DDP 在部分心功能、心肌损伤标志物、氧化应激及能量代谢指标上的改善幅度优于 LLEO。对此应从药物属性和研究定位加以理解。DDP 为临床应用较成熟的复方中成药, 含有丹参、三七、冰片等多种活性成分, 具有改善微循环、抗氧化、抗炎和保护心肌等多靶点作用, 因此在 MIRI 模型中表现出较强的综合保护效应。相比之下, LLEO 为民族药挥发油, 本研究主要旨在评价其抗 MIRI 药效及其与能量代谢相关的潜在保护作用。虽然其总体药效强度在部分指标上低于 DDP, 但中、高剂量 LLEO 仍可改善心功能、减轻心肌损伤, 并提高 ATP 合酶活性、上调 ATP5D 表达, 提示其具有进一步开发和深入研究的价值。后续可通过明确活性成分、优化制剂工艺及完善给药方案, 进一步提高其药效稳定性和应用潜力。

本研究仍存在一定局限性。首先, 虽然观察到 LLEO 可下调 RhoA、ROCK1 表达, 上调 ATP5D 表达并提高 ATP 合酶活性, 但本研究尚未采用 ROCK 特异性抑制剂、RhoA/ROCK1 基因干预或 ATP5D 沉默/救援实验等方法进行因果验证。因此, 目前结果仅能提示 RhoA/ROCK1/ATP5D 相关调控可能参与 LLEO 改善 MIRI 能量代谢的过程, 尚不能证明该通路为其直接作用机制。其次, 本研究主要采用在体动物模型, LLEO 对心肌细胞的直接作用及其分子机制尚需在原代心肌细胞或 H9c2 细胞缺氧/复氧 (H/R) 模型中进一步验证。再次, LLEO 含有多种活性成分, 究竟何种成分发挥主要心肌保护作用, 抑或多种成分间存在协同效应, 仍有待通过成分分离、活性追踪及单体药效验证进一步阐明。

LLEO 可减轻大鼠 MIRI 所致心功能障碍、心肌结构损伤、氧化应激和细胞凋亡。其保护作用可能与抑制 RhoA/ROCK1 异常激活、上调 ATP5D 表达并提高 ATP 合酶活性、进而改善心肌能量代谢有关。本研究为将 LLEO 开发为 MIRI 的预防性干预药物提供了重要的实验依据, 也为靶向能量代谢环节干预缺血性心脏病提供了新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Tsao C W, Aday A W, Almarazooq Z I, et al. Heart disease and stroke statistics-2023 update: A report from the American heart association [J]. *Circulation*, 2023, 147(8): 93-621.
- [2] Rao S V, O'Donoghue M L, Ruel M, et al. 2025 ACC/AHA/ACEP/NAEMSP/SCAI guideline for the management of patients with acute coronary syndromes: A report of the American college of cardiology/American heart association joint committee on clinical practice guidelines [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2025, 85(22): 2135-2237.
- [3] Faro D C, Laudani C, Agnello F G, et al. Complete percutaneous coronary revascularization in acute coronary syndromes with multivessel coronary disease: A systematic review [J]. *JACC Cardiovasc Interv*, 2023, 16(19): 2347-2364.
- [4] Algoet M, Janssens S, Himmelreich U, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury and the influence of inflammation [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2023, 33(6): 357-366.
- [5] Welt F G P, Batchelor W, Spears J R, et al. Reperfusion injury in patients with acute myocardial infarction: JACC scientific statement [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2024, 83(22): 2196-2213.
- [6] Zhang S, Yan F, Luan F, et al. The pathological mechanisms and potential therapeutic drugs for myocardial ischemia reperfusion injury [J]. *Phytomedicine*, 2024, 129: 155649.
- [7] 葛腾, 齐鸿飞, 姚彬, 等. 中医药靶向调控线粒体质量控制系统治疗心肌缺血再灌注损伤研究进展 [J]. *中草药*, 2024, 55(15): 5331-5341.
Ge T, Qi H F, Yao B, et al. Research progress on traditional Chinese medicine in treatment of myocardial ischemia reperfusion injury through targeted regulation of mitochondrial quality control system [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(15): 5331-5341.
- [8] Li Q Y, Luo Y, Guo H B, et al. Compound Danshen Tablets ameliorate myocardial ischemia/reperfusion injury-induced ventricular remodeling by regulating autophagy via AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *Chin Herb Med*, 2025, 17(3): 548-554.
- [9] Zhu M M, Li Y W, Xu Q, et al. Acute myocardial infarction: Molecular pathogenesis, diagnosis, and clinical management [J]. *MedComm*, 2025, 6(10): e70418.
- [10] Sun Q Y, Karwi Q G, Wong N, et al. Advances in myocardial energy metabolism: Metabolic remodelling in heart failure and beyond [J]. *Cardiovasc Res*, 2024, 120(16): 1996-2016.
- [11] Lopaschuk G D, Karwi Q G, Tian R, et al. Cardiac energy metabolism in heart failure [J]. *Circ Res*, 2021, 128(10): 1487-1513.
- [12] He J F, Liu D Y, Zhao L X, et al. Myocardial ischemia/reperfusion injury: Mechanisms of injury and implications for management (Review) [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 23(6): 430.
- [13] Oláhová M, Yoon W H, Thompson K, et al. Biallelic mutations in ATP5F1D, which encodes a subunit of ATP synthase, cause a metabolic disorder [J]. *Am J Hum Genet*, 2018, 102(3): 494-504.
- [14] Bou-Teen D, Fernandez-Sanz C, Miro-Casas E, et al. Defective dimerization of FoF1-ATP synthase secondary to glycation favors mitochondrial energy deficiency in cardiomyocytes during aging [J]. *Aging Cell*, 2022, 21(3): e13564.
- [15] Hernandez-Resendiz S, Prakash A, Loo S J, et al. Targeting mitochondrial shape: At the heart of cardioprotection [J]. *Basic Res Cardiol*, 2023, 118(1): 49.
- [16] Kuzmiak-Glancy S, Glancy B, Kay M W. Ischemic damage to every segment of the oxidative phosphorylation cascade elevates ETC driving force and ROS production in cardiac mitochondria [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2022, 323(3): H499-H512.
- [17] Tong C, Zhou B Y. Cardioprotective strategies in myocardial ischemia-reperfusion injury: Implications for improving clinical translation [J]. *J Mol Cell Cardiol Plus*, 2024, 11: 100278.
- [18] Zouein F A, Booz G W. Targeting mitochondria to protect the heart: A matter of balance [J]. *Clin Sci*, 2025, 139(23): 1591-1596.
- [19] Chen Z L, Tan X, Jin T T, et al. Pharmaceutical manipulation of mitochondrial F0F1-ATP synthase enables imaging and protection of myocardial ischemia/reperfusion injury through stress-induced selective enrichment [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(9): 2307880.
- [20] Shimokawa H, Sunamura S, Satoh K. RhoA/rho-kinase in the cardiovascular system [J]. *Circ Res*, 2016, 118(2): 352-366.
- [21] Hartmann S, Ridley A J, Lutz S. The function of rho-associated kinases ROCK1 and ROCK2 in the

- pathogenesis of cardiovascular disease [J]. Front Pharmacol, 2015, 6: 276.
- [22] Li Y Y, Xiong Z Y, Jiang Y F, et al. Klf4 deficiency exacerbates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice via enhancing ROCK1/DRP1 pathway-dependent mitochondrial fission [J]. J Mol Cell Cardiol, 2023, 174: 115-132.
- [23] He K, Yan L, Pan C S, et al. ROCK-dependent ATP5D modulation contributes to the protection of notoginsenoside NR1 against ischemia-reperfusion-induced myocardial injury [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014, 307(12): H1764-H1776.
- [24] Dong L Y, Qiu X X, Zhuang Y, et al. Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Int J Mol Med, 2019, 43(4): 1911-1919.
- [25] Cui Y C, Pan C S, Yan L, et al. Ginsenoside Rb₁ protects against ischemia/reperfusion-induced myocardial injury via energy metabolism regulation mediated by RhoA signaling pathway [J]. Sci Rep, 2017, 7: 44579.
- [26] 中国药典 [S]. 一部. 2025.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2025.
- [27] Hoch C C, Petry J, Griesbaum L, et al. 1, 8-cineole (eucalyptol): A versatile phytochemical with therapeutic applications across multiple diseases [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 167: 115467.
- [28] 陈向云, 汤小芳, 李军, 等. 基于网络药理学的大果木姜子油治疗心力衰竭作用机制研究 [J]. 亚太传统医药, 2022, 18(1): 143-151.
Chen X Y, Tang X F, Li J, et al. Study on the mechanism of oil of *Cinnamomum migao* H.W. Li in the treatment of heart failure based on network pharmacology [J]. Asia Pac Tradit Med, 2022, 18(1): 143-151.
- [29] 孙恒灿, 张丽艳, 李军, 等. 大果木姜子油调控 *miR-328* 基因抗心律失常 H9c2 细胞的机制研究 [J]. 中药材, 2024, 47(1): 168-175.
Sun H C, Zhang L Y, Li J, et al. Study on mechanism of *Cinnamomi Oleum* anti-arrhythmia of H9c2 cells by regulating *miR-328* gene [J]. J Chin Med Mater, 2024, 47(1): 168-175.
- [30] Zhao N, Liu Y Y, Wang F, et al. Cardiotonic pills, a compound Chinese medicine, protects ischemia-reperfusion-induced microcirculatory disturbance and myocardial damage in rats [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010, 298(4): H1166-H1176.
- [31] 张瑶, 李尧锋, 钟颢, 等. 大果木姜子油对异丙肾上腺素致心肌缺血大鼠心功能变化的影响 [J]. 中国民族民间医药, 2022, 31(9): 30-33.
Zhang Y, Li Y F, Zhong X, et al. Effect of oil of *Cinnamomum migao* H. W. Li on cardiac function in rats with myocardial ischemia induced by isoproterenol [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm, 2022, 31(9): 30-33.
- [32] 王健, 魏晴, 徐文芬, 等. 大果木姜子精油及浸膏对心肌损伤大鼠的保护作用 [J]. 实用医学杂志, 2023, 39(7): 804-812.
Wang J, Wei Q, Xu W F, et al. Protective effect of essential oil and extract from *Cinnamomum migao* based on myocardial injury in rats [J]. J Pract Med, 2023, 39(7): 804-812.
- [33] 朱小婷, 徐剑, 郭江涛, 等. 基于熵权法研究不同来源米槁挥发油对心肌损伤模型大鼠的治疗作用及机制 [J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(17): 2318-2327.
Zhu X T, Xu J, Guo J T, et al. Research on therapeutic effect and mechanism of volatile oil from different sources of *Cinnamomum migao* H. W. Li based on entropy weight method in myocardial injury model rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2024, 41(17): 2318-2327.
- [34] Wu J W, Hu H, Hua J S, et al. ATPase inhibitory factor 1 protects the heart from acute myocardial ischemia/reperfusion injury through activating AMPK signaling pathway [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(2): 731-741.
- [35] Nikolaou P E, Lambrinidis G, Georgiou M, et al. Hydrolytic activity of mitochondrial F(1)F(O)-ATP synthase as a target for myocardial ischemia-reperfusion injury: Discovery and *in vitro* and *in vivo* evaluation of novel inhibitors [J]. J Med Chem, 2023, 66(22): 15115-15140.
- [36] Liu L, Liu J, Wang J S, et al. Ulinastatin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats via Rho/ROCK signaling pathway [J]. Cell Mol Biol, 2023, 69(15): 249-253.
- [37] Brand C S, Tan V P, Brown J H, et al. RhoA regulates Drp1 mediated mitochondrial fission through ROCK to protect cardiomyocytes [J]. Cell Signal, 2018, 50: 48-57.
- [38] Gao J, Min F, Wang S S, et al. Effect of rho-kinase and autophagy on remote ischemic conditioning-induced cardioprotection in rat myocardial ischemia/reperfusion injury model [J]. Cardiovasc Ther, 2022, 2022:

- 6806427.
- [39] Sun Y, Jiao B Y, Liu Y Z, et al. Shexiang Tongxin dropping pills ameliorate myocardial ischemia-reperfusion injury progression via the S1PR2/RhoA/ROCK pathway [J]. *J Tradit Chin Med Sci*, 2025, 12(1): 31-43.
- [40] Del Re D P, Amgalan D, Linkermann A, et al. Fundamental mechanisms of regulated cell death and implications for heart disease [J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(4): 1765-1817.
- [41] Sies H, Jones D P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(7): 363-383.
- [42] Sagris M, Apostolos A, Theofilis P, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury: Unraveling pathophysiology, clinical manifestations, and emerging prevention strategies [J]. *Biomedicines*, 2024, 12(4): 802.
- [43] Peng Y J, Tao Y C, Liu L X, et al. Crosstalk among reactive oxygen species, autophagy and metabolism in myocardial ischemia and reperfusion stages [J]. *Aging Dis*, 2024, 15(3): 1075-1107.

[责任编辑 兰新新]