

原儿茶酸对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠及缺氧/复氧 H9c2 细胞的保护作用及机制研究

郭慧琳¹, 韩雯², 王敏², 叶景学², 舒尊鹏¹, 孙桂波^{1,2*}, 曹丽^{2*}

1. 广东药科大学 中药学院, 广东 广州 510006

2. 中国医学科学院药用植物研究所 药理毒理研究中心, 北京 100193

摘要: 目的 探讨原儿茶酸 (PCA) 对心肌缺血再灌注损伤 (MIRI) 大鼠及缺氧/复氧 H9c2 细胞的影响及作用机制。方法 将心肌细胞 H9c2 分为对照组、模型组和 PCA (1.562、3.125、6.250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组, 预给药 24 h 后, 除对照组外厌氧箱缺氧 4 h、复氧 12 h 在体外构建 H9c2 细胞损伤模型; CCK8 法检测细胞存活率; JC-1 染色检测细胞内线粒体膜电位; DCFH-DA 荧光探针检测细胞中活性氧 (ROS); Calcein AM 荧光探针检测线粒体通透性转换孔 (mPTP) 开放程度; 试剂盒法检测腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 水平; FerroOrange 荧光探针检测 Fe^{2+} 水平检测。SD 大鼠随机分为假手术组、单给 PCA (100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组、模型组、阿司匹林 (100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组和 PCA 低、中、高剂量 (25、50、100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组, 假手术组和模型组 ig 给予 0.5% 羟甲基纤维素钠溶液, 其余组 ig 给药, 每天 1 次, 连续 2 周, 末次给药 24 h 后, 除假手术组和单给 PCA 组外, 采用冠状动脉左前降支结扎手术结扎 30 min 制备 MIRI 大鼠模型; 通过 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色分析心肌梗死面积; 苏木精-伊红 (HE) 染色分析各组心肌组织结构变化; 心脏超声评估射血分数 (EF) 和左室短轴缩短率 (FS); 通过 ELISA 法检测血清肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、乳酸脱氢酶 (LDH)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙二醛 (MDA) 和谷胱甘肽 (GSH) 水平; Western blotting 检测心脏组织中谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 和溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11) 蛋白表达情况。**结果** 细胞实验结果表明, 与模型组比较, PCA 显著升高 H9c2 细胞存活率 ($P < 0.01$), 升高线粒体膜电位 ($P < 0.01$), 抑制异常 mPTP 开放和 ROS 的大量产生 ($P < 0.01$), 改善线粒体 ATP 合成受损 ($P < 0.01$); 明显降低细胞内 Fe^{2+} 水平; 动物实验结果表明, 与模型组比较, PCA 组心肌梗死率显著降低 ($P < 0.01$), 心肌组织结构得到改善, EF 和 FS 显著升高 ($P < 0.01$), 心肌损伤标志物 CK-MB、LDH、AST、MDA 水平显著降低 ($P < 0.01$), GSH 水平和 GPX4、SLC7A11 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。**结论** PCA 可以改善 MIRI, 减轻心肌组织病理损伤, 调节体内铁死亡, 可能与升高 GPX4、SLC7A11 表达有关。

关键词: 原儿茶酸; 心肌缺血再灌注损伤; 缺氧/复氧; 铁死亡; GPX4; SLC7A11

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)10-2776-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.10.006

Study on protective effect and mechanism of protocatechuic acid on myocardial ischemia-reperfusion injury model rats and hypoxia/reoxygenation H9c2 cells

GUO Huilin¹, HAN Wen², WANG Min², YE Jingxue², SHU Zunpeng¹, SUN Guibo^{1,2}, CAO Li²

1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Pharmacology and Toxicology Research Center, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To explore the effects and mechanisms of protocatechuic acid (PCA) on myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) in rats and hypoxia/reoxygenation H9c2 cells. **Methods** H9c2 cells were divided into the control group, model group, and PCA (1.562, 3.125, and 6.250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) groups. After 24 h of pretreatment, except for the control group, the cells were subjected to 4 h of hypoxia and 12 h of reoxygenation in an anaerobic chamber to establish the H9c2 cell injury model *in vitro*. Cell viability was

收稿日期: 2025-03-11

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2021-I2M-1-071)

作者简介: 郭慧琳 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药效评价。E-mail: gh13093363170@163.com

*通信作者: 孙桂波 (1973—), 女, 研究员, 研究方向为中药及复方药效物质基础及分子机制。E-mail: sunguibo@126.com

曹丽, 女, 研究员, 研究方向为中药及天然产物药物药理。E-mail: lcao@implad.ac.cn

detected by CCK-8 assay; mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 staining; Reactive oxygen species (ROS) in cells were detected by DCFH-DA fluorescence probe; The opening degree of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) was detected by Calcein AM fluorescence probe; Adenine nucleoside triphosphate (ATP) levels were detected by kit method; Fe^{2+} levels were detected by FerroOrange fluorescence probe. SD rats were randomly divided into sham operation group, single PCA ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, model group, aspirin ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, and PCA low, medium, and high dose ($25, 50, 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups. The sham operation group and model control group were ig administered 0.5% sodium carboxymethyl cellulose solution, and the other groups were ig administered drugs once a day for two weeks. 24 h after the last administration, except for the sham operation group, the MIRI rat model was established by ligating the left anterior descending coronary artery for 30 min. Myocardial infarction area was analyzed by 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining; Myocardial tissue structure changes were analyzed by hematoxylin-eosin (HE) staining; Left ventricular ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) were evaluated by cardiac ultrasound; Serum creatine kinase isoenzyme (CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST), malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH) levels were detected by ELISA; The expression of glutathione peroxidase 4 (GPX4) and solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) proteins in cardiac tissue was detected by Western blotting. **Results** The cell experiment results showed that compared with the model group, PCA significantly increased the survival rate of H9c2 cells ($P < 0.01$), increased mitochondrial membrane potential ($P < 0.01$), inhibited abnormal mPTP opening and excessive ROS production ($P < 0.01$), improved mitochondrial ATP synthesis impairment ($P < 0.01$), and significantly reduced intracellular Fe^{2+} levels. The animal experiment results showed that compared with the model group, the myocardial infarction rate in the PCA group was significantly reduced ($P < 0.01$), myocardial tissue structure was improved, EF and FS were significantly increased ($P < 0.01$), myocardial injury markers CK-MB, LDH, AST, and MDA levels were significantly decreased ($P < 0.01$), and GSH levels and GPX4 and SLC7A11 protein expression levels were significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** PCA ameliorates myocardial reperfusion injury, attenuates myocardial histopathological damage, and regulates iron death *in vivo*, which may be related to the inhibition of GPX4 and SLC7A11 expression.

Key words: protocatechuic acid; myocardial ischaemia-reperfusion injury; hypoxia/reoxygenation; iron death; GPX4; SLC7A11

心肌缺血再灌注损伤 (MIRI) 是全球范围内引发心脏相关疾病的主要原因之一^[1]。研究表明, MIRI 的发生可能与氧化应激、钙超载、中性粒细胞浸润、细胞凋亡、能量代谢障碍等多方面因素密切相关, 然而 MIRI 机制尚未完全阐明^[2]。MIRI 的发生率较高, 因此如何减轻 MIRI 成为急性心肌梗死 (AMI) 治疗中的难点。

铁死亡是一种铁依赖性的, 因细胞活性氧 (ROS) 和脂质过氧化物积累致使氧化还原平衡失调引起的细胞程序性死亡^[3]。近年来研究发现铁死亡与 MIRI 密切相关^[4], 通过氧化应激、铁代谢、脂质代谢、内质网应激、炎症反应等影响 MIRI, 干预再灌注过程中的铁死亡可以有效改善心功能, 减少心肌梗死面积^[5]。铁死亡通常发生在心肌的再灌注阶段, 而不是发生在缺氧缺血阶段。随着再灌注时间的延长, 二价铁、丙二醛 (MDA) 等铁死亡指标会逐渐升高, 而谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 水平则会降低^[6]。

以往研究表明, 原儿茶酸 (PCA) 通过抗炎、抗氧化应激和抑制细胞凋亡等多种机制缓解 MIRI。然而, PCA 是否可以调控铁死亡保护心肌免受缺血

再灌注损伤及具体机制尚不清楚。因此, 本研究基于铁死亡进一步探讨了 PCA 在 MIRI 中的作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 (200 ± 20) g, 购于北京华阜康实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2019-0010。于中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所动物实验中心喂养, 自由进食饮水, 饲养环境室温 (24 ± 2.0) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 (55.0 ± 3.0) %, 通风良好, 光照明暗周期 12 h/12 h, 预适应喂养 3 d。医学实验动物环境 SPF 级标准, 审查批号 SLXD-20240318011、SLXD-20241219013 和 SLXD-20240229016。

1.2 主要仪器

PL3516 型十六导电生理数据采集系统 (澳大利亚 Adinstruments Pty 公司); ALC-V8S 小动物呼吸机 (上海奥尔科特生物科技有限公司); AU480 全自动生化分析仪 (美国 Beckman Coulter 公司); TDL-5013 台式离心机 (上海安亭科学化学仪器厂); 5424R 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司);

Infinite M1000 酶标仪 (瑞士 Tecan 公司)。

1.3 细胞、受试物及主要试剂

心肌细胞 H9c2 (中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心); PCA (成都植标化纯生物技术有限公司, 货号 PCS0087, 质量分数 $\geq 98\%$); JC-1 染料 (货号 65-0851, 美国 Invitrogen 公司); 阿司匹林肠溶片 (拜耳医药保健有限公司, 批号 BJ72065); 一抗 GPX4 (货号 67763-1-ig, 武汉三鹰生物技术有限公司); 一抗溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11) α CT、鼠二抗 (货号 AS003), 武汉爱博泰克生物有限公司。

2 方法

2.1 细胞缺氧/复氧 (H/R) 模型的制备

H9c2 心肌细胞于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, H/R 模型制备: 细胞接种于孔板中培养 24 h 后更换为无糖培养基, 放入 37 °C 厌氧箱中缺氧 4 h, 诱导缺氧损伤。然后从厌氧箱中取出, 更换为无血清高糖培养基, 并置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中继续培养 12 h, 即为 H/R 模型。H/R 模型参考以往研究^[7], 使细胞死亡率保持在 50% 左右, 并根据实际造模环境观察细胞死亡率, 适当调整时间。

2.2 CCK-8 法检测细胞活力

取对数生长期的 H9c2 细胞以 1×10^5 个 \cdot mL⁻¹、每孔 200 μ L 接种于 96 孔板, 在 5% CO₂、37 °C 条件培养至 80% 后, 分为 5 组: 对照组和 PCA 0.781、1.562、3.125、6.250 μ mol \cdot L⁻¹ 组, 对照组不加药, PCA 组药物处理 24 h。

取对数生长期的 H9c2 细胞以 1×10^5 \cdot mL⁻¹、每孔 200 μ L 接种于 96 孔板, 在 5% CO₂、37 °C 条件培养至 80% 后, 分为 5 组: 对照组、模型组和 PCA 1.562、3.125、6.250 μ mol \cdot L⁻¹ 组, 对照组 H9c2 细胞常规培养; 模型组细胞缺氧 4 h 复氧 12 h; PCA 1.562、3.125、6.250 μ mol \cdot L⁻¹ 组预给药 24 h 后更换为无糖培养基缺氧 4 h, 复氧 12 h。

另设空白组, 不接种细胞。处理结束后, 每孔加入 8 μ L CCK8 溶液, 37 °C 孵育 2 h, 酶标仪在 450 nm 处测定吸光度 (*A*) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 Calcein AM 荧光探针检测线粒体通透性转换孔 (mPTP) 开放程度

取对数生长期的 H9c2 细胞以 1×10^5 \cdot mL⁻¹、每孔 1 mL 接种于 12 孔板, 在 5% CO₂、37 °C 条件培养至 80% 后, 分为 4 组: 对照组、单给 PCA (3.125 μ mol \cdot L⁻¹) 组、模型组、PCA (3.125 μ mol \cdot L⁻¹)

组, 对照组 H9c2 细胞常规培养; 模型组细胞缺氧 4 h 复氧 12 h; 单给 PCA 组: PCA (3.125 μ mol \cdot L⁻¹) 预给药 24 h 后更换为无血清高糖培养基正常培养; PCA 3.125 μ mol \cdot L⁻¹ 组: PCA 预给药 24 h 后更换为无糖培养基缺氧 4 h、复氧 12 h。各组细胞完成干预后用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 2 次, 避光加入 Calcein AM 染色液, 37 °C 培养箱中孵育 30 min。用 PBS 反复清洗 3 次, 加入检测缓冲液。在 OLYMPUS CKX53 荧光显微镜下观察, 最大激发光波长为 494 nm, 最大发射光波长为 517 nm, 用 Image J 软件进行分析。

2.4 腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 检测

取对数生长期的 H9c2 细胞以 1×10^5 \cdot mL⁻¹、每孔 2 mL 接种于 6 孔板, 待细胞长至 80%, 按照“2.3”项方法分组处理。细胞处理后, 吸除培养液, 每孔加入裂解液裂解细胞。裂解后 4 °C、12 000 \times g 离心 5 min, 后续按照说明书操作, 用化学发光仪测定相对光单位 (RLU) 值。

2.5 JC-1 染色检测线粒体膜电位 (MMP)

细胞接种、分组、造模、给药操作均按“2.3”项方法进行。各组细胞完成干预后用 PBS 清洗 2 次, 避光加入 JC-1 染料 (终浓度 2 μ mol \cdot L⁻¹), 37 °C 避光染色 30 min。用 PBS 反复清洗 3 次, 在荧光显微镜下观察细胞的荧光表达情况, 在最大激发光波长为 514 nm、最大发射光波长为 529 nm 下 JC-1 单体表现为绿色荧光, 在最大激发光波长为 585 nm、最大发射光波长为 590 nm 下 JC-1 聚合物表现为红色荧光, 用 Image J 软件进行分析。

2.6 DCFH-DA 荧光探针检测 ROS 水平

细胞接种、分组、造模、给药操作均按“2.3”项方法进行。各组细胞完成干预后用高糖培养基清洗 1 次, 避光加入 DCFH-DA 工作液, 置于 37 °C 培养箱中孵育 30 min。用高糖培养基反复冲洗 3 次, 加入 Hoechst 33342 溶液后避光孵育 10 min。孵育完成后用高糖培养基清洗 3 次, 在荧光显微镜下观察细胞的荧光表达情况, 最大激发光波长为 504 nm, 最大发射光波长为 529 nm, 用 Image J 软件进行分析。

2.7 FerroOrange 荧光探针检测 Fe²⁺ 水平检测

细胞接种、分组、造模、给药操作均按“2.3”项方法进行。在各组细胞完成干预后弃去培养基, 按说明书处理, 避光条件下加入适量 FerroOrange 工作液, 在 37 °C 培养箱中孵育 30 min。孵育完成后在激光共聚焦显微镜下观察各组细胞的荧光表达

情况,用 Image J 软件进行分析。

2.8 MIRI 大鼠造模及分组

SD 大鼠随机分为假手术组、单给 PCA ($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组、模型组、阿司匹林 ($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组和 PCA 低、中、高剂量 (25 、 50 、 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组,假手术组和模型对照组 ig 给予 0.5% 羟甲基纤维素钠溶液,其余组 ig 给药,每天 1 次,连续 2 周,末次给药 24 h 后,除假手术组外,采用冠状动脉左前降支结扎手术结扎 30 min 制备 MIRI 大鼠模型^[8]。术前禁食 12 h,正常饮水。造模前先麻醉大鼠,连接小动物呼吸机,呼吸稳定后连接心电图电极。使用脱毛膏在胸腔位置进行脱毛,然后剪开胸腔位置皮肤,暴露心脏,先找到左心耳,确定冠状左前降支位置,于左心耳与肺圆锥之间下方进针,用 6/0 号无创缝合针穿线结扎(假手术组只穿线不结扎),造成心肌缺血,肉眼观察结扎区域心肌颜色变苍白;ST 段显著抬高或出现异常 Q 波即为缺血成功。缺血 30 min 后进行血流再灌注,将胸腔缝合,待大鼠可以自主呼吸后撤下呼吸机,放在恒温垫上直到大鼠苏醒,放回笼子里,进行再灌注 24 h。如出现术中死亡或造模失败则将此鼠剔除实验。

2.9 心肌梗死面积测定

大鼠再灌注 24 h 后,麻醉,心脏取材,置于 0.9% 氯化钠溶液中清洗干净后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷冻 20 min,随即取出心肌组织,由心尖开始,沿结扎线方向,将心脏横切为 6 个薄片,厚度为 2 mm。放入 2% 的 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)溶液中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 10 min,着色后放入多聚甲醛中固定。用 Image J 软件统计梗死体积。

2.10 苏木精-伊红(HE)染色观察大鼠心肌组织病理变化

大鼠再灌注 24 h 后,麻醉,迅速开胸将心脏取出,完全剥离心包膜及附着结缔组织后,将心脏组织用多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋,制作厚度为 $5\text{ }\mu\text{m}$ 的石蜡切片进行 HE 染色,封片后于光镜下观察心肌组织病理学改变,并截取图片。

2.11 心脏超声评估大鼠心脏结构变化

大鼠随机分为假手术组、单给 PCA ($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组、模型组、PCA ($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组,造模及给药方法同“2.8”项。再灌注 24 h 后,采用 VisualSonics Vevo770 超高分辨率小动物超声影像系统评价大鼠心脏结构及功能。将大鼠麻醉仰卧固定在操作台上,涂耦合剂,将探头置于左胸前,调整探头,获

得左室长轴切面和 M 型曲线,计算射血分数(EF)和左室短轴缩短率(FS)。

2.12 ELISA 法检测血清生化指标

采血管收集大鼠腹主动脉血, $3\ 500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,吸取上层清液分装至 EP 管。并严格按照相应试剂盒说明书检测血清中肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、谷胱甘肽(GSH)、MDA、水平。

2.13 Western blotting 检测大鼠心肌组织 GPX4、SLC7A11 蛋白表达水平

取各组再灌注损伤区心肌组织,经冰上裂解、匀浆、离心后,BCA 法测定蛋白浓度,制备蛋白样品并保存。进行电泳分离,湿膜、封闭,加一抗 GPX4 ($1:2\ 000$)、SLC7A11 ($1:500$) 和内参 β -actin ($1:2\ 000$),封闭 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日清洗后加入稀释后的辣根过氧化物酶,孵育清洗后显色,凝胶成像仪下读取各条带灰度值,以 β -actin 作为内参,计算目的蛋白相对表达水平。

2.14 统计学分析

使用 Graphpad Prism 9 统计软件处理分析实验数据,实验数据均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组数据比较用单因素方差分析,两两比较则选用最小显著性差异法(LSD)检验。

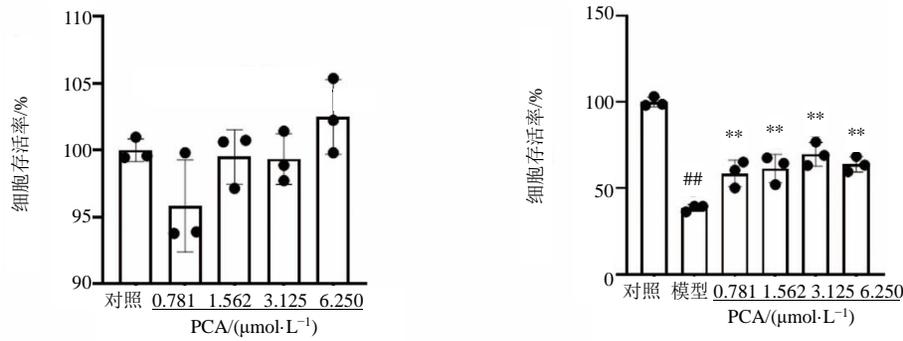
3 结果

3.1 PCA 对 H/R 诱导 H9c2 心肌细胞损伤的影响

如图 1 所示, $6.250\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下浓度的 PCA 对细胞活力没有明显影响。进一步检测了 PCA 对 H/R 损伤的心肌细胞活力的影响,与对照组比较,心肌细胞缺氧 4 h、复氧 12 h 会对细胞造成一定损伤,使细胞存活率下降到 50%左右 ($P<0.01$);与模型组比较,不同浓度的 PCA 预孵育 24 h 能明显提高 H9c2 细胞活力 ($P<0.01$)。 $3.125\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 效果最好,因此,采用 PCA $3.125\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 干预 24 h 进行后续实验。

3.2 PCA 可预防 H/R 诱导的 H9c2 细胞线粒体损伤

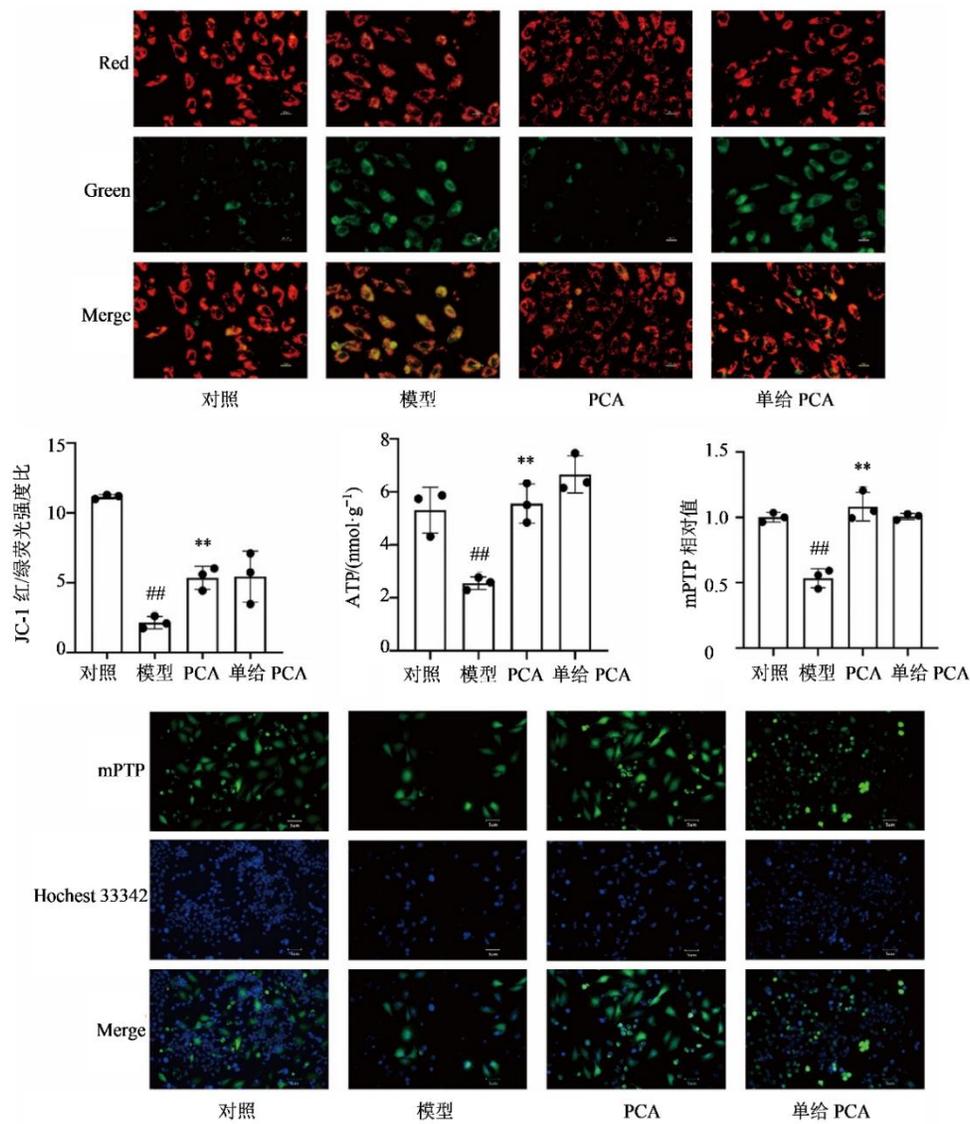
线粒体在心肌细胞能量代谢中起关键作用,并通过调控细胞凋亡、自噬、焦亡等细胞死亡参与 MIRI 的病理过程。检测细胞 MMP、ATP 水平以及 mPTP 开放程度,结果表明,与对照组相比,模型组 H9c2 细胞 MMP 和 ATP 水平显著降低, mPTP 开放程度显著升高 ($P<0.01$);与模型组相比,PCA 组 MMP 和 ATP 水平显著升高 ($P<0.01$), mPTP 开放程度显著降低 ($P<0.01$)。结果见图 2。



与对照组比较: $##P < 0.01$; 与模型组比较: $**P < 0.01$ 。
 $##P < 0.01$ vs control group; $**P < 0.01$ vs model group.

图 1 H9c2 细胞活力 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 H9c2 cell viability ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与对照组比较: $##P < 0.01$; 与模型组比较: $**P < 0.01$ 。
 $##P < 0.01$ vs control group; $**P < 0.01$ vs model group.

图 2 H9c2 心肌细胞内 MMP ($\times 40$) 和 mPTP 开放程度 ($\times 20$) 变化及 ATP 变化水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Changes in MMP ($\times 40$) and mPTP opening ($\times 20$) and levels of ATP changes in H9c2 cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s, n=3$)

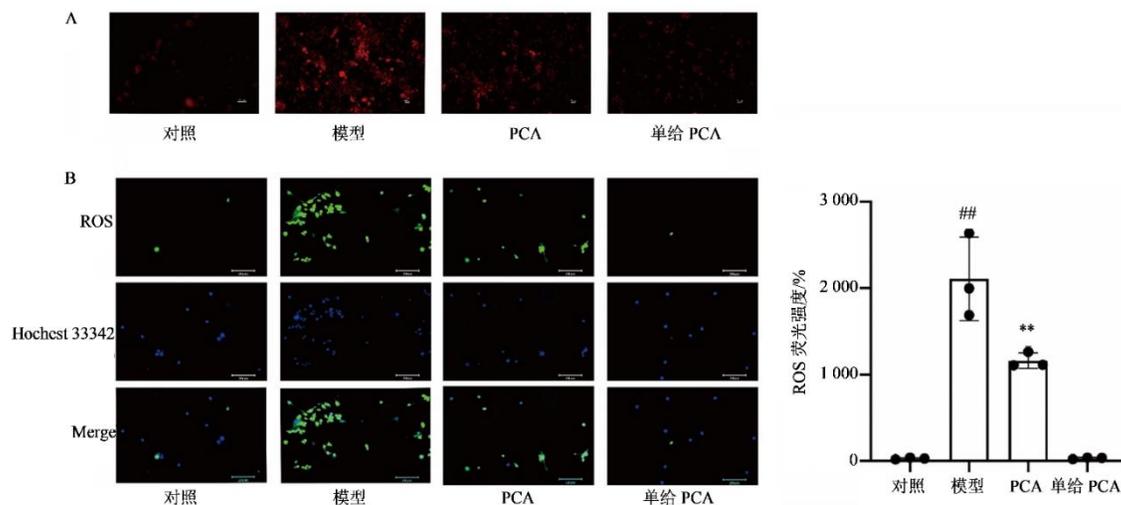
3.3 PCA 抑制 H/R 诱导的 H9c2 细胞铁死亡

铁超载和脂质过氧化是铁死亡的标志。与对照组比较,模型组 H9c2 细胞内亚铁离子水平明显增加,ROS 水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组相比,PCA 组 H9c2 细胞亚铁离子水平明显降低,ROS 水

平显著降低 ($P < 0.01$)。结果见图 3。

3.4 PCA 改善大鼠 MIRI 损伤

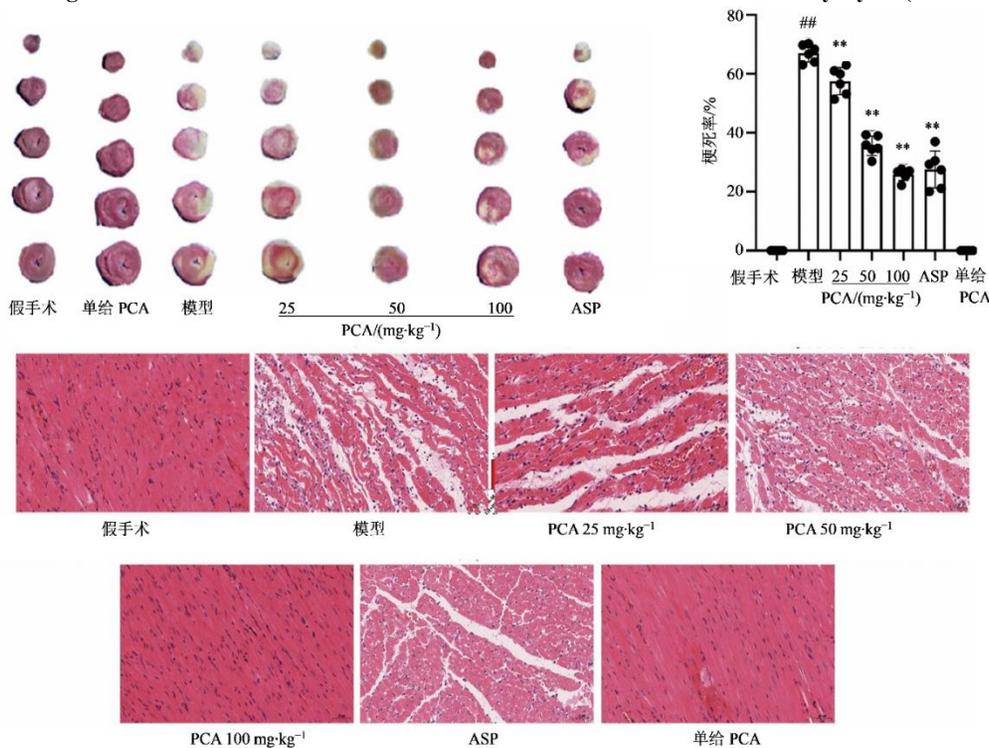
如图 4 所示,与对照组比较,模型组 TTC 染色显示心肌梗死率显著增加 ($P < 0.01$),病理结果显示,心肌组织表现出心肌纤维和细胞排列遭受损



A-细胞亚铁离子水平 ($\times 40$); B-细胞内 ROS 水平 ($\times 40$); 与对照组比较: $##P < 0.01$; 与模型组比较: $**P < 0.01$ 。
A-cellular ferrous ion levels ($\times 40$); B-intracellular ROS levels ($\times 40$); $##P < 0.01$ vs control group; $**P < 0.01$ vs model group.

图 3 H9c2 心肌细胞内亚铁含量和 ROS 含量变化情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Changes in intracellular ferrous iron content and ROS content in H9c2 cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s, n=3$)



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

$##P < 0.01$ vs sham-operation group; $**P < 0.01$ vs model group.

图 4 SD 大鼠心肌梗死面积与 HE 染色 ($\times 20$) 结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 4 Myocardial infarction area in SD rats with HE staining ($\times 20$) results ($\bar{x} \pm s, n=6$)

伤；与模型组比较，各剂量 PCA 及 ASP 显著降低梗死率 ($P < 0.01$)，缓解心肌受损情况，其中高剂量组效果最好，后续采用 PCA 高剂量进行实验。

3.5 PCA 对 MIRI 大鼠心功能的影响

与假手术组相比，模型组 EF 和 FS 显著降低 ($P < 0.01$)，CK-MB、LDH 和 AST 水平显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组相比，PCA 组 EF 和 FS 显著

升高 ($P < 0.01$)，CK-MB、LDH 和 AST 水平显著降低 ($P < 0.01$)。结果见图 5。

3.6 PCA 对 MIRI 大鼠 GSH、MDA 水平的影响

与假手术组相比，模型组 GSH 水平显著降低 ($P < 0.01$)，MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组相比，PCA 组 GSH 水平显著升高 ($P < 0.01$)、MDA 水平显著降低 ($P < 0.01$)。结果表明，PCA 提高了 I/R 大鼠抗氧化能力。结果见图 6。

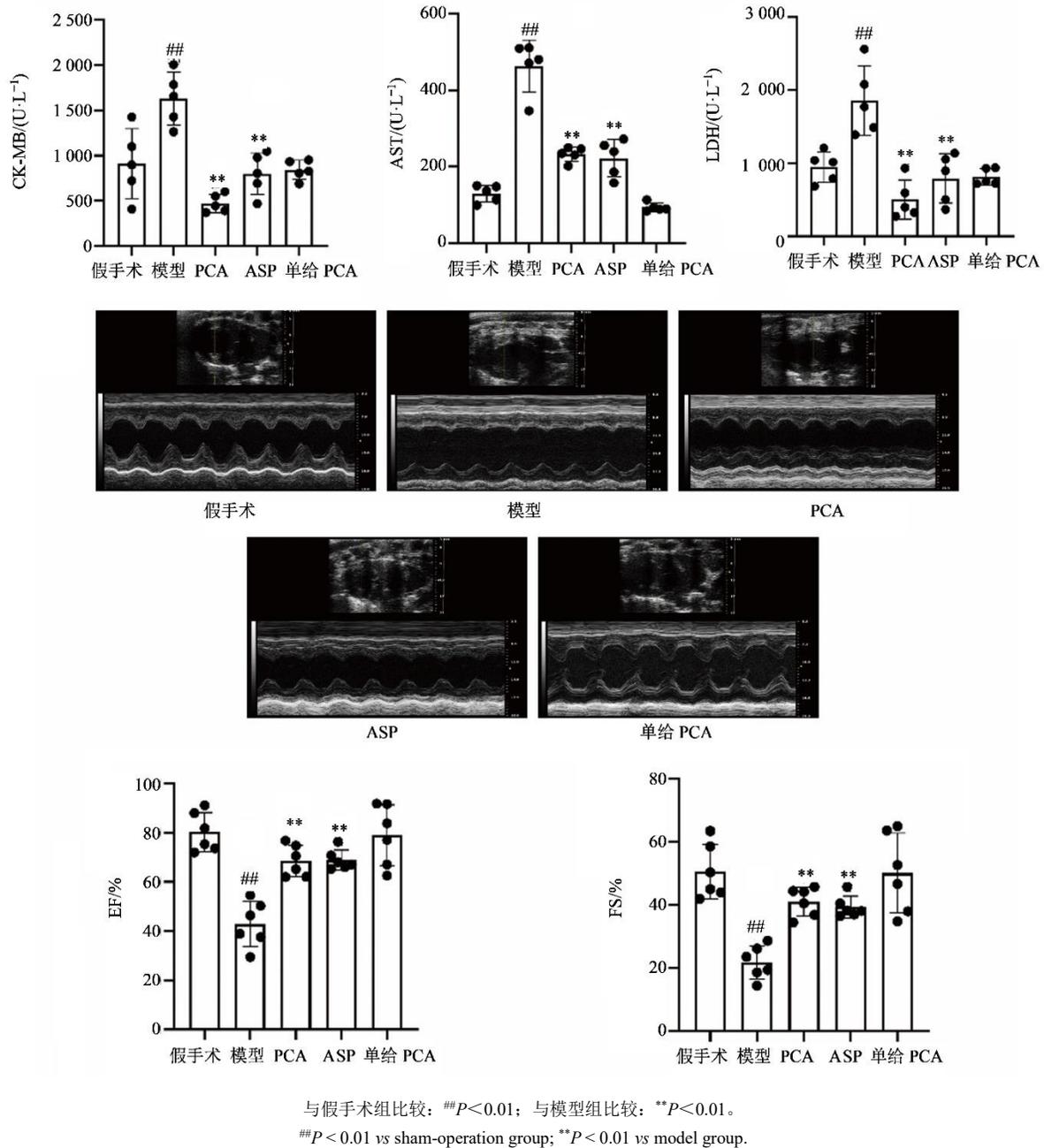
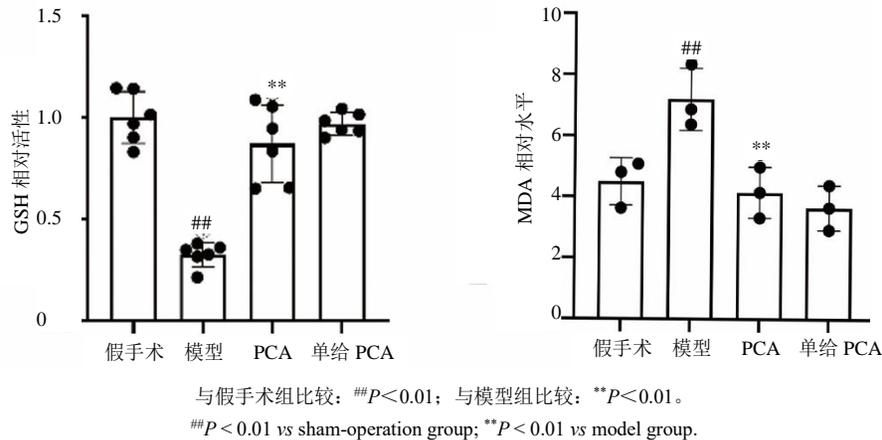


图 5 大鼠血清心肌酶 ($\bar{x} \pm s, n=5$) 和大鼠心脏超声心动 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

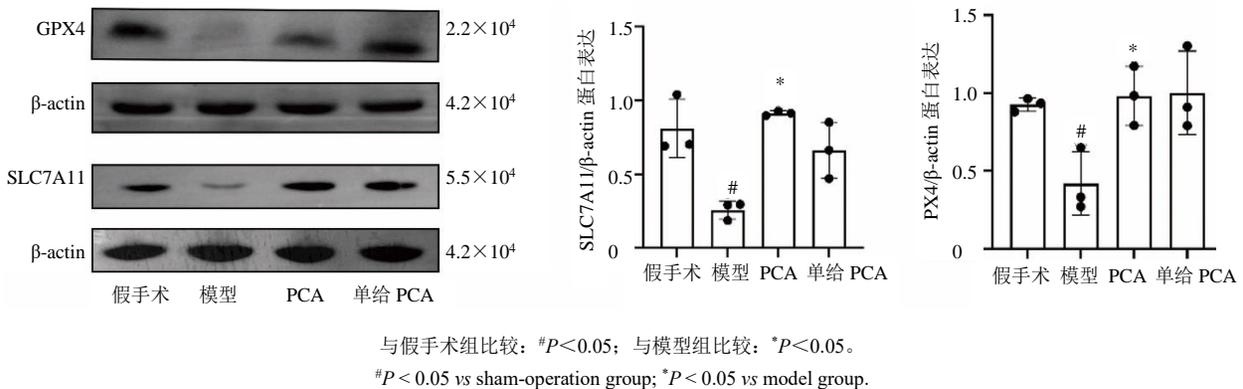
Fig. 5 Serum cardiac enzymes ($\bar{x} \pm s, n=5$) and echocardiography of rat heart ($\bar{x} \pm s, n=6$)

图 6 血清 GSH、MDA 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 6 Serum GSH and MDA levels ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.7 PCA 对 GPX4、SLC7A11 蛋白表达的影响

与假手术组相比, 模型组 GPX4、SLC7A11 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组比

较, PCA 组 GPX4、SLC7A11 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。结果表明 PCA 可能通过对铁死亡的调节, 改善 MIRI。结果见图 7。

图 7 大鼠心脏组织铁死亡相关蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 7 Expression of iron death related proteins in rat heart tissue ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

MIRI 是一种危及生命的心脏疾病, 是指心肌血流中断后恢复血液再灌注引起的心肌损伤加重、心脏功能障碍等现象^[9]。左冠状动脉结扎术造模是公认的 MIRI 经典模型^[10]。本研究体外实验采用 H9c2 心肌细胞进行, 检测了 mPTP、ROS、JC-1 以及细胞内亚铁离子水平, 结果显示, PCA 显著抑制了缺氧/复氧诱导的心肌细胞 H9c2 凋亡, 并改善了异常 MPTP 开放和 ROS 的大量产生, 缓解了线粒体 ATP 合成受损。这一结果在 JC-1 检测中得到了验证, 表明 PCA 通过维持线粒体功能完整性来防止细胞凋亡。在本研究中, 还发现 PCA 组相较于模型组, 显著减少了心肌梗死面积, 并改善了心肌组织结构。这一结果与先前研究中 PCA 在保护心肌

细胞免受缺血再灌注损伤中的作用一致。此外, PCA 组中心肌损伤标志物 (CK-MB、LDH、AST) 水平的降低进一步证实了 PCA 心肌保护作用, 即 PCA 通过减少氧化应激来减轻心肌损伤, 这与以往研究一致^[11-12]。本研究发现 PCA 还能显著提升 GPX4 和 SLC7A11 的蛋白表达水平, 这可能与通过调控铁死亡通路来保护心肌细胞的机制有关, 这为进一步探索其具体机制提供了线索。

铁死亡在心肌病中起着至关重要的作用, 由于过量的铁含量是心肌细胞死亡的重要原因, 因此抑制铁死亡是减少心肌细胞死亡和改善心脏病状况的新策略^[13]。在心血管疾病中, SLC7A11 和 GPX4 的表达或功能往往同时受到抑制, 导致 GSH 耗竭、GPX4 失活, 最终引发脂质过氧化和铁死亡^[14]。当

铁死亡加重时，细胞内铁积累导致脂质过氧化物 ROS 升高，氧化应激水平增高^[15]。SLC7A11 主要负责将胞外胱氨酸及胞内谷氨酸等比例交换，使胞内有充足的半胱氨酸来合成 GSH，GSH 可与 GPX4 协同作用，减少细胞内脂质氧化物的累积，从而抑制铁死亡进一步发展减轻心肌损伤^[16]。

本研究不仅验证了 PCA 在减少心肌梗死面积和改善心肌损伤方面的作用，还发现其在调控铁死亡通路和线粒体功能中的潜在机制，通过 SLC7A11/GPX4 轴来抑制铁死亡发生，从而改善 MIRI。但由于铁死亡机制复杂。这些结果丰富了 PCA 在心血管疾病中的研究内涵，并为后续研究提供了理论基础。然而，本研究仍存在一些局限性，PCA 的作用机制尚未完全阐明，特别是在铁死亡和线粒体功能调控中的具体信号通路仍需进一步探讨。此外，阿司匹林作为抗血小板药物与所研究的铁死亡机制存在差异。下一步研究中，计划选用已知具有抗铁死亡作用的药物与 PCA 进行深入对比，通过基因敲除或过表达实验，进一步验证 PCA 在 GPX4 和 SLC7A11 表达调控中的作用，并探索其与铁死亡通路的具体关联。此外，还将通过体外和体内实验，深入研究 PCA 对 mPTP 开放和线粒体功能的影响，以期全面揭示其心肌保护作用的分子机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 赵元彬, 胡龙龙, 余作忠, 等. 心肌缺血再灌注损伤模型复制方法的研究进展 [J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(7): 46-54.
Zhao Y B, Hu L L, Yu Z Z, et al. Research progress in establishing myocardial ischemia-reperfusion injury model [J]. China J Mod Med, 2023, 33(7): 46-54.

[2] 黄媛恒, 何阳, 黄晓亮, 等. 红景天苷对心肌缺血-再灌注损伤大鼠内质网应激与 Cx43 的作用 [J]. 医药导报, 2025, 44(3): 366-371.
Huang Y H, He Y, Huang X L, et al. Effect of salidroside on endoplasmic reticulum stress and connexin 43 in rats with myocardial ischemia reperfusion injury [J]. Her Med, 2025, 44(3): 366-371.

[3] Stockwell B R, Jiang X J, Gu W. Emerging mechanisms and disease relevance of ferroptosis [J]. Trends Cell Biol, 2020, 30(6): 478-490.

[4] 寇世杰, 陈士萍. 药物抑制铁死亡抗心肌缺血-再灌注损伤及机制研究进展 [J]. 医药导报, 2023, 42(4): 519-523.

Kou S J, Chen S P. Research progress on the mechanism of drugs inhibiting ferroptosis for the treatment of myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Her Med, 2023, 42(4): 519-523.

[5] 王梦然, 尤晓晨, 徐兴丽, 等. 铁死亡用于心肌缺血再灌注损伤治疗的研究进展 [J]. 实用临床医药杂志, 2024, 28(9): 123-128, 133.
Wang M R, You X C, Xu X L, et al. Advances for ferroptosis in treating myocardial ischemia reperfusion injury [J]. J Clin Med Pract, 2024, 28(9): 123-128, 133.

[6] 谭睿敏, 闫娅婷, 葛晨, 等. 铁死亡机制及其在缺血/再灌注损伤中的研究进展 [J]. 中国急救医学, 2025, 45(2): 163-170.
Tan R M, Yan Y T, Ge C, et al. Mechanisms of ferroptosis and its application in ischemia/reperfusion injury [J]. Chin J Crit Care Med, 2025, 45(2): 163-170.

[7] Wang D, Chen T Y, Liu F J. Betulinic acid alleviates myocardial hypoxia/reoxygenation injury via inducing Nrf2/HO-1 and inhibiting p38 and JNK pathways [J]. Eur J Pharmacol, 2018, 838: 53-59.

[8] Yang F, Wang W, Zhang Y L, et al. Effects of ferroptosis in myocardial ischemia/reperfusion model of rat and its association with Sestrin 1 [J]. Adv Clin Exp Med, 2023, 32(2): 219-231.

[9] 洪名扬, 富路. 冠心病心肌缺血再灌注损伤机制研究的进展 [J]. 心血管康复医学杂志, 2022, 31(2): 241-245.
Hong M Y, Fu L. Research progress on mechanism of myocardial ischemia-reperfusion injury in coronary heart disease [J]. Chin J Cardiovasc Rehabil Med, 2022, 31(2): 241-245.

[10] 曾蕾, 席晓荣, 孙承霞, 等. 基于氧化应激及其相关凋亡蛋白研究苓桂术甘汤预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(6): 60-64, 后插 9-后插 12.
Zeng L, Xi X R, Sun C X, et al. Based on oxidative stress and its related apoptotic proteins, the protective effect and mechanism of Linggui Zhugan decoction pretreatment on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats were studied [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2024, 42(6): 60-64, insert 9 backwards and insert 12 backwards.

[11] 覃华, 张琰, 杜小燕, 等. 原儿茶酸对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用 [J]. 西北药学杂志, 2015, 30(6): 709-712.
Qin H, Zhang Y, Du X Y, et al. Protective effect of protocatechuic acid on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Northwest Pharm J, 2015, 30(6): 709-712.

- [12] Li L, Ma H, Zhang Y C, et al. Protocatechuic acid reverses myocardial infarction mediated by β -adrenergic agonist via regulation of Nrf2/HO-1 pathway, inflammatory, apoptotic, and fibrotic events [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2023, 37(3): e23270.
- [13] Fang X X, Wang H, Han D, et al. Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(7): 2672-2680.
- [14] 龚玉栓, 王新强, 王倩, 等. 铁死亡在心肌缺血再灌注损伤的作用机制及中医药研究现状 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(22): 3333-3337.
- Gong Y S, Wang X Q, Wang Q, et al. Research status of iron death on myocardial ischemia reperfusion injury and research progress of traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2024, 40(22): 3333-3337.
- [15] 黄铭, 张艺馨, 曹国栋, 等. 穿心莲内酯调控铁死亡中 SLC7A11/GPX4 轴减轻脓毒症肠损伤 [J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(12): 2094-2100.
- Huang M, Zhang Y X, Cao G D, et al. Andrographolide regulates SLC7A11/GPX4 axis in ferroptosis to attenuate intestinal injury in sepsis [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(12): 2094-2100.
- [16] Koppula P, Zhuang L, Gan B. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: Ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy [J]. *Protein Cell*, 2021, 12(8): 599-620.

[责任编辑 兰新新]