基于 PI3K/PDK1/Akt 信号通路研究丹参-红花药对对寒凝血瘀型心肌缺血大鼠的保护作用及机制

王小平，薛志鹏，杜少兵，周慧慧，白吉庆，李　菁，王鹏飞，谢李红，陈　妮

陕西中医药大学药学院，陕西 咸阳　712046

摘　要：目的　研究丹参-红花药对对异丙肾上腺素（isoprenaline hydrochloride，ISO）诱导的心肌缺血大鼠的保护作用及其机制。**方法**　大鼠随机分为对照组、模型组、复方丹参滴丸（73 mg/kg）组和丹参-红花低、中、高剂量（4、8、16 g/kg）组，给予相应药物干预 7 d。于第 6 天开始 ig 药物 1 h 后，大鼠于 0 ℃的冰浴中寒冷刺激 4 min，sc ISO（85 mg/kg），连续 2 d。采用 2,3,5-氯化三苯基四氮唑（2,3,5-triphenyltetrazolium chloride，TTC）染色法测定各组大鼠心肌梗死面积；采用 TUNEL 法检测各组大鼠心肌细胞凋亡情况；采用苏木素-伊红（HE）染色法观察各组大鼠心肌组织病理变化；采用 ELISA 法检测各组大鼠血浆中肌酸激酶同工酶（creatine kinase，CK）、天冬氨酸转氨酶（aspartate aminotransferase，AST）、乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）、CK-肌红蛋白（myoglobin，MB）活性及心肌肌钙蛋白-I（cardiac troponin-I，CTn-I）、CTn-T、C 反应蛋白（C-reaction protein，CRP）、MB、*N* 末端利钠肽前体（*N*-terminal pro-brain natriuretic peptide，NT-proBNP）和 B 型脑利钠肽（B-brain natriuretic peptides，BNP）水平；采用 Western blotting 检测各组大鼠心肌组织中磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）、磷酸化 PI3K（phosphorylated PI3K，p-PI3K）、磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1（pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1，PDK1）、蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）、p-Akt、内皮型一氧化氮合酶（endothelial nitric oxide synthase，eNOS）、p-eNOS、B 淋巴细胞瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）、核因子-κB p65（nuclear factor-κB p65，NF-κB p65）、p-NF-κB p65、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）、细胞色素 C（cytochrome C，Cyt C）、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（cystein-asparate protease-3，Caspase-3）和 Caspase-9 蛋白表达。**结果**　丹参-红花药对显著抑制 ISO 诱导的心肌缺血模型大鼠的心肌梗死面积（$P<0.01$）；改善心肌组织病理变化；显著抑制心肌细胞的凋亡（$P<0.05$、0.01）；显著降低血浆中心肌酶活性以及心肌蛋白水平（$P<0.05$、0.01）；显著上调心肌组织中 Bcl-2、PDK1、p-eNOS、p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达水平（$P<0.05$、0.01），降低 Bax、Cyt C、剪切型 Caspase-3（cleaved Caspase-3）、cleaved Caspase-9 和 p-NF-κB p65 蛋白表达水平（$P<0.05$、0.01）。**结论**　丹参-红花药对能够通过调控 PI3K/PDK1/Akt 信号通路，从而发挥对 ISO 诱导的心肌缺血的保护作用。

关键词：丹参-红花药对；心肌缺血；磷脂酰肌醇 3-激酶/磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1/蛋白激酶 B 信号通路；心肌酶；心肌蛋白；丹参素；羟基红花黄色素 A；迷迭香酸；紫草酸；丹酚酸 B

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2022)16 - 5085 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.16.018

Protective mechanism of *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Carthami Flos* drug pair on myocardial ischemia rats with cold coagulation and blood stasis syndrome based on PI3K/PDK1/Akt signaling pathway

WANG Xiao-ping, XUE Zhi-peng, DU-Shao-bing, ZHOU Hui-hui, BAI Ji-qing, LI Jing, WANG Peng-fei, XIE Li-hong, CHEN Ni

College of pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Abstract: Objectives　To study the protective effect and mechanism of Danshen (*Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma*)-Honghua (*Carthami Flos*) on myocardial ischemia rats induced by isoprenaline hydrochloride (ISO). **Methods**　Rats were randomly divided

收稿日期：2022-04-06

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81974544）；陕西省科学技术厅资助项目（2019SF-286）；陕西省教育厅资助项目（18JS025）

作者简介：王小平（1976—），女，硕士生导师，教授，博士，研究方向为中药药效物质基础研究。

Tel: (029)38185165　E-mail: wangxiaoping323@126.com

into control group, model group, Compound Danshen Dropping Pills (73 mg/kg) group and *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Carthami Flos* low-, medium-and high-dose (4, 8, 16 g/kg) groups, rats were given corresponding drug for 7 d. 1 h after ig drug on 6th day, rats were stimulated with cold in ice bath at 0 ℃ for 4 min and sc ISO (85 mg/kg) for 2 d. 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining was used to determine the myocardial infarction area of rats in each group; TUNEL method was used to detect myocardial cell apoptosis of rats in each group; Hematoxylin-eosin (HE) staining method was used to observe the pathological changes in myocardial tissue of rats in each group; ELISA method was used to detect creatine kinase (CK), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), CK-myoglobin (MB) activities and cardiac troponin-I (CTn-I), CTn-T , C-reaction protein (CRP), MB, *N*-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP), B-brain natriuretic peptides (BNP) levels in plasma of rats in each group; Western blotting was used to detect phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phosphorylated PI3K (p-PI3K), pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1 (PDK1), protein kinase B (Akt), p-Akt, endothelial nitric oxide synthase (eNOS), p-eNOS, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), nuclear factor-κB p65 (NF-κB p65), p-NF-κB p65, Bcl-2 associated X protein (Bax), cytochrome C (Cyt C), cysteine-aspartate protease-3 (Caspase-3) and Caspase-9 protein expressions in myocardial tissue of rats in each group. **Results** *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Carthami Flos* significantly inhibited the myocardial infarction area in ISO-induced myocardial ischemia model rats ($P < 0.01$), improved the pathological changes of myocardial tissue, significantly inhibited the apoptosis of cardiomyocytes ($P < 0.05$, 0.01), significantly decreased myocardial enzyme activities and myocardial protein levels in plasma ($P < 0.05$, 0.01), significantly increased protein expression levels of Bcl-2, PDK1, p-eNOS, p-PI3K and p-Akt in myocardial tissue ($P < 0.05$, 0.01), decreased protein expression levels of Bax, Cyt C, cleaved Caspase-3 (cleaved Caspase-3), cleaved Caspase-9 and p-NF-κB p65 ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Carthami Flos* drug pair can exert a protective effect on ISO-induced myocardial ischemia by regulating PI3K/PDK1/Akt signaling pathway.

Key words: *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Carthami Flos* drug pair; myocardial ischemia; PI3K/PDK1/Akt signaling pathway; myocardial enzymes; cardiac proteins; Danshensu; hydroxysafflor yellow A; rosmarinic acid; shikoric acid; salvianolic acid B

缺血性心脏病（ischemic heart disease，IHD）的发病率及死亡率逐年上升，给国家和人民带来沉重的经济负担，已成为全球性的公共卫生问题[1-3]。现代医学针对 IHD 主要采用药物干预及手术治疗，然而手术治疗可能出现心肌缺血-再灌注（myocardial ischemia-reperfusion，MI/R），造成不可逆的心肌二次损伤[4-5]。中药已有上千年的药用历史，能够有效地缓解 IHD 患者的症状，其多成分、多靶点治疗的特点及整体观念对病理机制复杂的 IHD 展现出较好的临床疗效[6-7]。

现代药理学研究表明，丹参具有改善微循环、增加冠脉血流、扩血管、清除自由基、抗炎、抗氧化、抑制血小板凝集等作用，临床常用于治疗心肌缺血、心肌梗死、脑缺血等心脑血管疾病[8-12]。红花具有降压、抗炎、抗心律失常、抗氧化、抗肿瘤、抗缺血等作用，临床常用于治疗冠心病、心绞痛、脑血栓等多种心脑血管疾病[13-15]。丹参-红花常作为活血化瘀药对被广泛用于治疗冠心病、心绞痛等缺血性心血管疾病，其药理作用及临床疗效显著[16]。复方丹参滴丸由丹参、三七、冰片组成，具有活血化瘀之功效，用于治疗冠心病心绞痛等症，且 *po* 给药，与丹参-红花药对的功效、临床应用及给药途径均一致，本研究以复方丹参滴丸为阳性对照药物，采用盐酸异丙肾上腺素（isoprenaline hydrochloride，ISO）构建急性心肌缺血大鼠模型，基于磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）/磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1（pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1，PDK1）/蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）信号通路探讨丹参-红花药对对心肌缺血的保护机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只，6 周龄，体质量 180～220 g，购自成都达硕实验动物有限公司，动物生产许可证号 SCXK（川）2020-030，动物质量合格证号 0043215，实验动物使用许可证号 SCXK（川）2020-030。动物饲养于陕西中医药大学药理实验中心的动物房，饲养环境为温度（25±2）℃，相对湿度（75±5）%，12 h 光照/黑暗交替，普通饲料喂养，自由饮水。所有动物实验操作均在陕西中医药大学实验动物伦理委员会批准下进行（批准号 SUCMDL-20190309001）。

1.2 药材

丹参饮片（产地山东，批号 160821）、红花饮片（产地新疆，批号 181012）购自安徽泽华国药饮片有限公司，经陕西中医药大学白吉庆教授鉴定分别为唇形科植物丹参 *Salvia miltrorrhiza* Bge.的干燥根

及根茎、菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L.的干燥花，均符合《中国药典》2020 年版规定。

1.3 药品与试剂

复方丹参滴丸（批号 202012）购自天津天士力制药股份有限公司；戊巴比妥钠（批号 57-33-0）购自德国 Merck 公司；ISO（批号 I5627-5G）、2,3,5-三苯基氯化四唑（2,3,5-triphenyltetrazolium chloride，TTC，批号 T8877-100G）购自美国 Sigma 公司；苏木素（批号 517-28-2）购自北京索莱宝生物科技有限公司；醇溶性伊红 Y（批号 15086-94-9）购自山东西亚化学工业有限公司；肌红蛋白（myoglobin，MB）检测试剂盒（批号 ml016170）、肌酸激酶同工酶（creatine kinase，CK）检测试剂盒（批号 ml076416）、天冬氨酸转氨酶（aspartate aminotransferase，AST）检测试剂盒（批号 ml-E5734）、乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）检测试剂盒（批号 ml076592）、CK-MB 检测试剂盒（批号 ml-slisa-4870）、心肌肌钙蛋白-I（cardiac troponin-I，CTn-I）检测试剂盒（批号 ml092662）、CTn-T 检测试剂盒（批号 ml076416）、C 反应蛋白（C-reaction protein，CRP）检测试剂盒（批号 ml092609）、*N* 末端利钠肽前体（*N*-terminal pro-brain natriuretic peptide，NT-proBNP）检测试剂盒（批号 ml028489）和 B 型脑利钠肽（B-brain natriuretic peptides，BNP）检测试剂盒（批号 ml076416）购自上海酶联生物科技有限公司；TUNEL 检测试剂盒（批号 WLA029a）、BCA 蛋白定量试剂盒（批号 WLA004）、核因子-κB p65（nuclear factor-κB p65，NF-κB p65）抗体（批号 WL01980）、磷酸化 NF-κB p65（phosphorylated NF-κB p65，p-NF-κB p65）抗体（批号 WL02169）、B 淋巴细胞瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）抗体（批号 WL01556）、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）抗体（批号 WL01637）、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（cystein-asparate protease-3，Caspase-3）抗体（批号 WL02117）、Caspase-9 抗体（批号 WL03421）、内皮型一氧化氮合酶（endothelial nitric oxide synthase，eNOS）抗体（批号 WL01789）、Akt 抗体（批号 WL0003b）、p-Akt 抗体（批号 WLP001）、HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体（批号 WLA023）、β-actin 抗体（批号 WL01845）购自沈阳万类生物科技有限公司；p-eNOS 抗体（批号 9570）购自美国 CST 公司；细胞色素 C（cytochrome C，Cyt C）抗体（批号 AC909）购自碧云天生物；PI3K 抗体（批号 ab191606）、p-PI3K 抗体（批号 ab182651）、PDK1 抗体（批号 ab90444）购自英国 Abcam 公司。

1.4 仪器

KD-3358 型切片机（浙江金华科迪公司）；显微镜（日本 Nikon 公司）；DYCZ-24DN 型蛋白电泳仪、WD-9413B 型凝胶成像系统（北京六一公司）；H-2050R 型超速冷冻离心机（湖南湘仪公司）；BioTek ELx800 型全自动酶标仪（美国 Bio Tek 公司）。

2 方法

2.1 丹参-红花药对的制备

本课题组前期研究发现，丹参-红花药对（3∶1）时疗效最佳，故按照质量比 3∶1 取丹参、红花饮片适量，加 8 倍量的水室温浸泡 1 h，45 ℃浸泡提取 3 次，每次 2 h，滤过，合并滤液，减压浓缩至稠膏，真空干燥，采用 HPLC 法测定干燥后粉末中主要成分丹参素、羟基红花黄色素 A、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 的质量分数分别为 4.70、17.20、1.76、4.58、55.18 mg/g。取适量粉末，加水溶解至质量浓度为 1.6 g/mL（以生药量计）的溶液，作为高剂量组药液；按照 2 倍稀释得中、低剂量组药液。

2.2 动物分组与给药

SD 大鼠随机分为对照组、模型组、复方丹参滴丸（73 mg/kg）组和丹参-红花低、中、高剂量（4、8、16 g/kg，分别相当于临床剂量的 1、2、4 倍）组，每组 10 只。各给药组 ig 相应药物，对照组和模型组 ig 等体积纯净水，1 次/d，连续 7 d。于第 6 天开始 ig 药物 1 h 后造模，除对照组外，其余各组大鼠于 0 ℃的冰浴中寒冷刺激 4 min，然后 sc ISO（85 mg/kg），1 次/d，连续 2 d。

2.3 样本收集

末次 sc ISO 12 h 后，大鼠 ip 2%戊巴比妥钠（40 mg/kg）麻醉，腹主动脉取血，离心，用于心肌酶以及心肌蛋白的检测；取出心脏，用于苏木素-伊红（HE）、TTC、TUNEL 染色和相关蛋白检测。

2.4 丹参-红花对模型大鼠心肌梗死的影响

取各组大鼠心脏，切开后快速将心室部分切片，经 2% TTC 溶液室温处理 25 min，用 10%福尔马林溶液固定。未梗塞的心肌被染成红色，而梗塞的心肌未被染色。数码相机拍照，输入电脑，用 Image J 软件分析染色切片的图像，计算梗死面积[16]。

2.5 丹参-红花对模型大鼠心肌病理的影响

取固定的心脏，修块，自来水冲洗，梯度乙醇

脱水，二甲苯处理后石蜡包埋，切片（5 μm），温水展片并移到载玻片上，烘干，依次放入二甲苯 I、II 中进行脱蜡，进行 HE 染色，滴加中性树胶封片。于显微镜下观察并拍照[12,16]。

2.6　丹参-红花对模型大鼠心肌细胞凋亡的影响

取固定的心脏，梯度乙醇处理后，二甲苯浸泡至标本透明，石蜡包埋，切片（5 μm），温水展片并移至载玻片上，烘干，依次以二甲苯、梯度乙醇和蒸馏水处理，PBS 漂洗后，依次滴加 0.1% Triton X-100、3% H_2O_2、TUNEL 反应液、Converter-POD 和 DAB 底物处理，PBS 漂洗，浸入苏木素染色，自来水冲洗，浸入 1%盐酸乙醇中处理，自来水冲洗，依次浸入梯度乙醇和二甲苯中处理，中性树胶封片。于显微镜下观察并拍照，并计算细胞凋亡率[12,16]。

凋亡率＝凋亡细胞数/总细胞数

2.7　丹参-红花对模型大鼠心肌酶以及心肌蛋白的影响

按试剂盒说明书测定大鼠血清中 CK、AST、LDH、CK-MB 活性及 CTn-I、CTn-T、CRP、MB、NT-proBNP、BNP 水平。

2.8　丹参-红花对模型大鼠 PI3K/PDK1/Akt 通路相关蛋白表达的影响

取各组大鼠心肌组织，切割成小块，液氮研磨，加入裂解液提取蛋白，采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度。蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，加入 5%脱脂牛奶，室温封闭 2 h；分别加入 NF-κB p65（1∶500）、p-NF-κB p65（1∶500）、Bax（1∶500）、Bcl-2（1∶1000）、Caspase-3（1∶500）、Caspase-9（1∶500）、eNOS（1∶500）、p-eNOS（1∶500）、PDK1（1∶500)、Cyt C（1∶500）、Akt（1∶1 000）、p-Akt（1∶500）、PI3K（1∶500）、p-PI3K（1∶500）、β-actin（1∶1000）抗体，4 ℃孵育过夜；分别加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体（1∶5000），室温孵育 2 h，加入 ECL 试剂显色，暗室曝光。使用 Gel Pro Analyzer 软件分析条带灰度值。

2.9　统计分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 17.0 软件进行统计和分析，采用单因素方差分析和组间独立样本 t 检验进行组间比较。

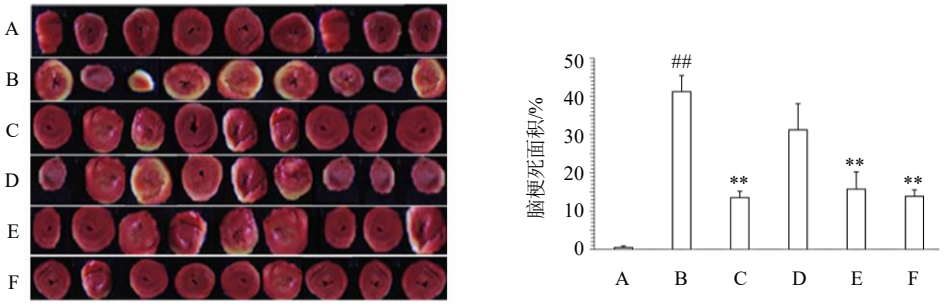
3　结果

3.1　丹参-红花对寒凝血瘀型心肌缺血模型大鼠心肌梗死的影响

如图 1 所示，与对照组比较，模型组大鼠心肌梗死面积显著升高（P＜0.01）；与模型组比较，复方丹参滴丸组和丹参-红花中、高剂量组大鼠心肌梗死面积均显著降低（P＜0.01）。

3.2　丹参-红花对寒凝血瘀型心肌缺血模型大鼠心肌病理的影响

如图 2 所示，对照组大鼠心肌形态结构正常，细胞排列整齐，染色均匀，胞核染清晰，纹理清晰，偶见心肌间质散在炎性细胞；模型组心肌形态结构紊乱，心肌细胞界限不清，心肌间质疏松、充血、肿胀，伴有多量炎性细胞浸润，肌纤维断裂，细胞核固缩、碎裂，有溢出，说明造模成功；与模型组比较，各给药组心肌形态结构均得到不同程度改善。



A-对照组　B-模型组　C-复方丹参滴丸组　D-丹参-红花低剂量组　E-丹参-红花中剂量组　F-丹参-红花高剂量组　与对照组比较：$^{\#}P$＜0.05　$^{\#\#}P$＜0.01；与模型组比较：$^{*}P$＜0.05　$^{**}P$＜0.01，下图同

A-control group　B-model group　C-Compound Danshen Dropping Pills group　D-*Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Carthami Flos* low-dose group　E-*Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Carthami Flos* medium-dose group　F-*Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Carthami Flos* high-dose group　$^{\#}P < 0.05$　$^{\#\#}P < 0.01$ *vs* control group; $^{*}P < 0.05$　$^{**}P < 0.01$ *vs* model group, same as below figures

图 1　丹参-红花对寒凝血瘀型心肌缺血模型大鼠心肌梗死的影响（$\bar{x} \pm s$，n = 9）

Fig. 1　Effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Carthami Flos* on myocardial infarction of myocardial ischemia model rats with cold coagulation and blood stasis syndrome ($\bar{x} \pm s$, n = 9)

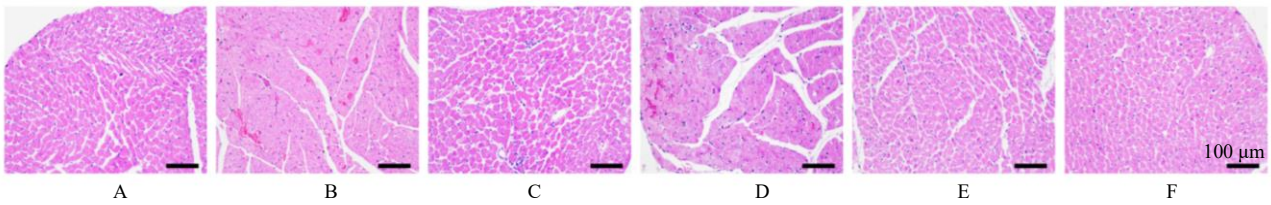


图 2 丹参-红花对寒凝血瘀型心肌缺血模型大鼠心肌病理的影响

Fig. 2 Effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Carthami Flos* on myocardial pathology of myocardial ischemia model rats with cold coagulation and blood stasis syndrome

3.3 丹参-红花对寒凝血瘀型心肌缺血模型大鼠心肌细胞凋亡的影响

如图 3 所示，与对照组比较，模型组大鼠心肌细胞凋亡率显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，各给药组大鼠心肌细胞凋亡率均显著降低（$P<0.05$、0.01）。

3.4 丹参-红花对寒凝血瘀型心肌缺血模型大鼠心肌酶及心肌蛋白的影响

如图 4 所示，与对照组比较，模型组大鼠血浆中 CK、AST、LDH、CK-MB 活性及 CTn-I、CTn-T、

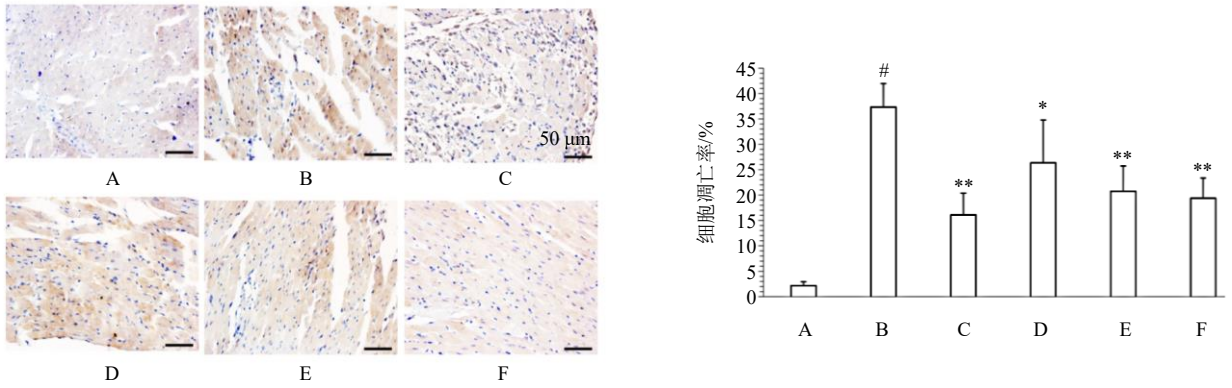


图 3 丹参-红花对寒凝血瘀型心肌缺血模型大鼠心肌细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 3 Effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Carthami Flos* on cardiomyocyte apoptosis of myocardial ischemia model rats with cold coagulation and blood stasis syndrome ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

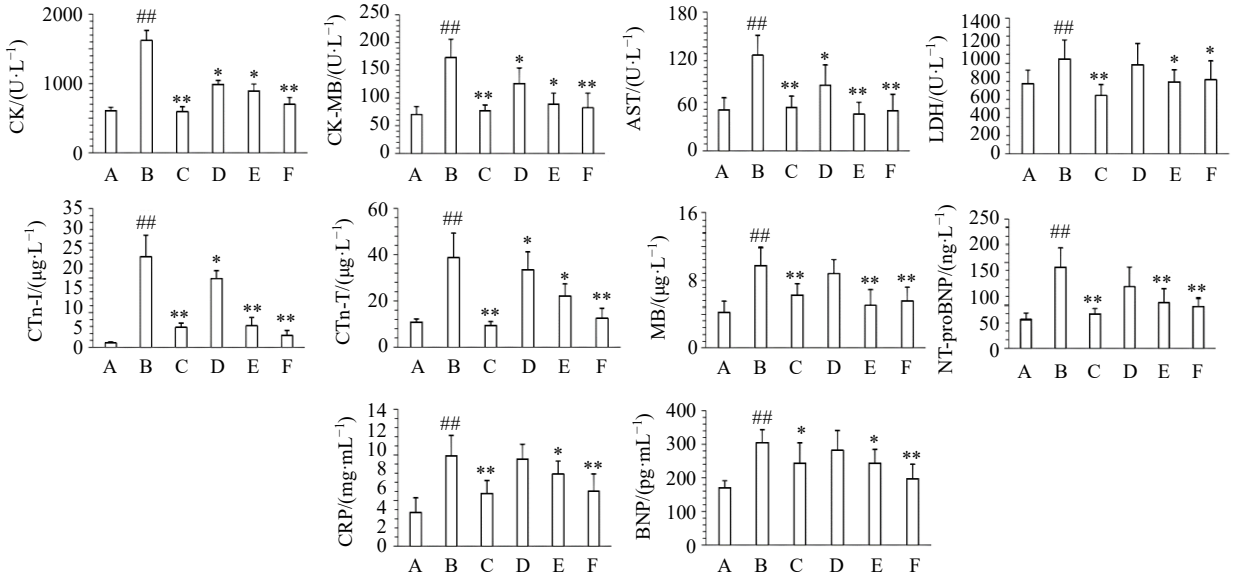


图 4 丹参-红花对寒凝血瘀型心肌缺血模型大鼠血浆中心肌酶活性以及心肌蛋白水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 4 Effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Carthami Flos* on cardiac enzyme activities and cardiac protein levels in plasma of myocardial ischemia model rats with cold coagulation and blood stasis syndrome ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

CRP、MB、NT-proBNP、BNP 水平均显著升高（P＜0.05、0.01）；与模型组比较，各给药组大鼠血浆中 CK、AST、CK-MB 活性及 CTn-T 水平均显著降低（P＜0.05、0.01）；复方丹参滴丸组和丹参-红花中、高剂量组大鼠血浆中 LDH 活性及 CTn-T、CRP、MB、NT-proBNP、BNP 水平均显著降低（P＜0.05、0.01）。

3.5　丹参-红花对寒凝血瘀型心肌缺血模型大鼠心肌组织 PI3K/PDK1/Akt 通路相关蛋白表达的影响

如图 5 所示，各组 eNOS、NF-κB p65、PI3K、Akt、Caspase-3 前体（pro Caspase-3）和 pro Caspase-9 蛋白表达水平无显著差异。与对照组比较，模型组大鼠心肌组织中 p-PI3K、PDK1、p-Akt、p-eNOS 和 Bcl-2 蛋白表达水平均显著降低（P＜0.01），p-NF-κB p65、Bax、Cyt C、剪切型 Caspase-3（cleaved Caspase-3）和 cleaved Caspase-9 蛋白表达水平均显著升高（P＜0.01）；与模型组比较，各给药组大鼠心肌组织中 p-Akt 和 p-eNOS 蛋白表达水平均显著升高（P＜0.05、0.01），p-NF-κB p65 蛋白表达水平均显著降低（P＜0.01）；复方丹参滴丸组和丹参-红花中、高剂量组大鼠心肌组织中 p-PI3K、PDK1 和 Bcl-2 蛋白表达水平均显著升高（P＜0.05、0.01），Bax、Cyt C、cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 蛋白表达水平均显著降低（P＜0.05、0.01）。

4　讨论

机体功能性改变或器质性病变导致冠脉血流和心肌需求之间不平衡，会引起心肌缺血（主要包括急性心肌缺血和慢性心肌缺血），导致患者出现不同程度的心肌损害。引起 IHD 的原因较多，如血压波动范围大；心脏的血管畸形；冠脉硬化、闭塞、狭窄；情绪紧张、焦虑以及睡眠不足等。IHD 可刺激心肌细胞凋亡，产生纤维化，促进心肌间质重构，损伤心脏，同时当心肌缺血时，血浆中心肌酶活性以及心肌蛋白水平会异常升高，长时间的缺血会引发心肌梗死。血浆中心肌酶活性以及心肌蛋白水平的异常升高、心肌细胞凋亡、心肌梗死面积被认为是评价急性心肌缺血的主要指标。CK、AST、LDH、CK-MB、CTn-I、CTn-T、CRP、MB、NT-proBNP 和 BNP 是心肌梗死早期诊断的敏感指标，心肌损伤发病 6～9 h 后血浆中上述指标出现增高并持续数天，

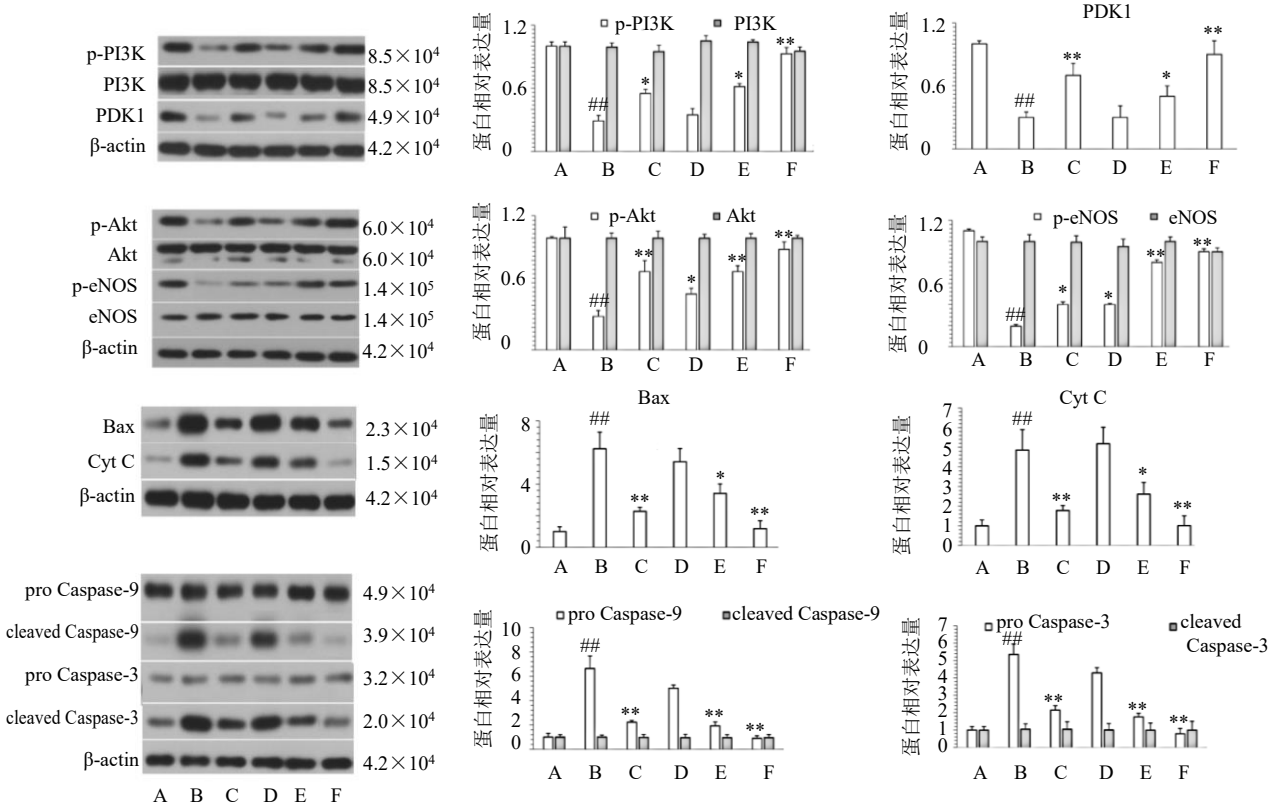


图 5　丹参-红花对寒凝血瘀型心肌缺血模型大鼠心肌组织 PI3K/PDK1/Akt 通路相关蛋白表达的影响（$\bar{x} \pm s$，n = 10）

Fig. 5　Effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Carthami Flos* on PI3K/PDK1/Akt pathway-related proteins expressions in myocardial tissue of myocardial ischemia model rats with cold coagulation and blood stasis syndrome ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

因此，上述指标对心肌损伤的敏感性和特异性都较高。虽然上述指标在心肌梗死后开始升高的时间和持续的时间存在差异，但在心肌梗死 12 h 后，上述指标仍处于异常水平，因此本研究在末次 sc ISO 后 12 h 取血测定上述心肌酶活性和心肌蛋白水平，结果显示，模型组 CK、AST、LDH、CK-MB 活性以及 CTn-I、CTn-T、CRP、MB、NT-proBNP、BNP 水平均显著高于对照组，表明心肌梗死 12 h 后，上述指标仍处于异常水平。

中医中药治疗 IHD 有着几千年的经验积累，其治疗效果显著，越来越受到人们的重视，然而中药“方-证”的对应关系及其作用机制尚不明确。采用适宜的动物模型研究中医药理论是提高中医药临床疗效、提高中医诊疗水平、促进中医药发展和中药现代化的有效途径[17-18]。目前主要通过开胸结扎冠状动脉左前降支或药物诱导复制心肌缺血模型。然而开胸手术实验动物存活率低，实验难度大，要求技术人员要有丰富的心导管实验经验和娴熟的技术；药物诱导法操作简单，与人心脏阵发性疼痛的病理处境接近，ISO 是常用的药物之一，复制的心肌缺血模型不但具有心绞痛的病理状态而且模型的病理状态稳定[19-20]。中医认为心肌缺血多为心脾肝肾虚，心脉失养，血瘀、寒凝、气滞，痹阻心脉，其中血瘀是病理关键[18,21]。本研究参考寒凝血瘀证动物模型[22]和心肌缺血动物模型[12]的制备，结合寒凝血瘀型心肌缺血疾病的冬季发病特点，采用 ISO 和寒冷刺激联合的方法，建立大鼠寒凝血瘀证心肌缺血模型，结果显示，模型大鼠爪尾部呈现紫色，身体蜷缩、少动，甚至出现寒战等症状，心肌组织病理、血浆中心肌酶活性和心肌蛋白水平与对照组比较均有显著性差异，表明建立的寒凝血瘀心肌缺血大鼠模型符合中医证侯特点，因此本研究参照文献方法[12,22]和前期实验积累，选用 ISO 同时联合寒冷刺激制备寒凝血瘀型的心肌缺血大鼠模型，研究丹参-红花活血化瘀药对抗心肌缺血的作用机制。

研究发现，PI3K/PDK1/Akt 信号通路通过调节心肌细胞凋亡、血管内皮生成等保护心脏[23-24]。激活的 PI3K 不能直接使 Akt 磷酸化，需要和 PDK1 结合，最终激活 Akt，活化的 Akt 可使 eNOS 磷酸化，进而促进内源性 NO 的产生。NO 具有促进内皮再生、血管舒张等作用，从而改善动脉粥样硬化和冠心病引起的心肌缺血、缺氧或坏死；激活的 Akt 通过激活抗凋亡蛋白 Bcl-2 或激活 NF-κB p65 使其进入细胞核，转录抗凋亡基因，进而抑制细胞凋亡。研究表明，PI3K/Akt 途径可以调控药物对 ISO 引起的心肌缺血性损伤的保护作用[25]。本研究发现，模型组大鼠心肌组织中 PI3K/Akt 通路被抑制，导致 p-PI3K、PDK1 和 p-Akt 蛋白表达水平降低；丹参-红花药对能够显著上调 ISO 诱导的 p-PI3K、PDK1 和 p-Akt 蛋白表达的降低。表明丹参-红花可能通过调控 PI3K/PDK1/Akt 信号通路来保护心肌缺血。

PI3K/PDK1/Akt 信号通路能够通过调控 Bcl-2 蛋白家族和 Caspase 蛋白家族。Bcl-2 蛋白家族包括抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax，能够控制线粒体外膜的通透性，与细胞凋亡密切相关。线粒体释放 Cyt C 并激活 Caspase-9，随后激活 Caspase-3[26]。Caspase-3 是凋亡的关键执行者，是 Caspase 家族的关键成员。本研究结果显示，模型组大鼠心肌组织中 Caspase-3、Caspase-9 和 Bax 蛋白表达上调，Bcl-2 蛋白表达下调，进而诱发心肌细胞凋亡，与细胞凋亡的特征一致。TTC 结果显示丹参-红花对 ISO 诱导的心肌缺血具有显著的抑制作用，进一步通过 HE 染色结果看出，模型组大鼠心肌细胞核出现皱缩等凋亡的现象，丹参-红花可以显著改善心肌细胞形态，推测丹参-红花能够抑制 ISO 诱导的心肌细胞凋亡。为了验证此推测，本研究进一步通过 TUNEL 染色检测丹参-红花药对抗心肌细胞凋亡的作用，结果发现模型组大鼠心肌细胞凋亡率显著升高，而丹参-红花药对能够显著降低 ISO 诱导的心肌细胞凋亡，证实了丹参-红花对 ISO 诱导的心肌细胞凋亡的保护作用。此外，Western blotting 结果显示，模型组大鼠心肌组织中促凋亡蛋白 Bax、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 表达水平显著升高，抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平显著降低；丹参-红花能够显著降低促凋亡蛋白 Bax、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 表达，升高抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达，表明其可能通过调控凋亡蛋白表达，从而发挥抗 ISO 诱导的心肌细胞凋亡作用。

综上所述，丹参-红花药对能够通过调控 PI3K/PDK1/Akt 信号通路，抑制心肌细胞凋亡，进而实现对心肌缺血的保护作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Zhou M G, Wang H D, Zeng X Y, *et al*. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of

Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2019, 394(10204): 1145-1158.

[2] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2020 概要 [J]. 中国循环杂志, 2021, 36(6): 521-545.

[3] GBD Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *Lancet*, 2020, 396(10258): 1204-1222.

[4] 张桂欢, 田海. 胚胎干细胞移植治疗缺血性心脏病研究的进展 [J]. 心血管康复医学杂志, 2021, 30(3): 360-363.

[5] 李泽华, 关贤颂, 蒋路平. 黄芪甲苷通过 NRF2/HO-1 信号通路减轻小鼠心肌缺血再灌注损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(12): 2147-2153.

[6] 甘家丽, 曾妙, 黄洋, 等. 中药基于 PI3K/Akt 信号通路防治心肌缺血/再灌注损伤的研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(7): 3527-3529.

[7] Zhang K J, Zheng Q, Zhu P C, *et al*. Traditional Chinese medicine for coronary heart disease: Clinical evidence and possible mechanisms [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 844.

[8] 王云龙, 房岐, 郑超. 丹参化学成分、药理作用及质量控制研究进展 [J]. 中国药业, 2020, 29(15): 6-10.

[9] 万新焕, 王瑜亮, 周长征, 等. 丹参化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(3): 788-798.

[10] 郝晨伟, 李正翔, 张铭慧, 等. 丹参及其配伍制剂治疗冠心病的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(13): 4096-4106.

[11] 冯科冉, 李伟霞, 王晓艳, 等. 丹参化学成分、药理作用及其质量标志物 (Q-Marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2022, 53(2): 609-618.

[12] Wang X P, Wang P F, Bai J Q, *et al*. Investigating the effects and possible mechanisms of Danshen-Honghua herb pair on acute myocardial ischemia induced by isoproterenol in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109268.

[13] Wang C L, Gao Y, Zhang Z K, *et al*. Safflower yellow alleviates osteoarthritis and prevents inflammation by inhibiting PGE2 release and regulating NF-κB/SIRT1/AMPK signaling pathways [J]. *Phytomedicine*, 2020, 78: 153305.

[14] Chen H F, Ma Y N, Chen M, *et al*. Safflower extract improves depression in mice by inhibiting the TLR4-NLRP3 inflammation signaling pathway [J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10(7): 8015-8023.

[15] Sun L P, Shi F F, Zhang W W, *et al*. Antioxidant and anti-inflammatory activities of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) honey extract [J]. *Foods*, 2020, 9(8): E1039.

[16] Bai J Q, Wang X P, Du S B, *et al*. Study on the protective effects of Danshen-Honghua herb pair (DHHP) on myocardial ischaemia/reperfusion injury (MIRI) and potential mechanisms based on apoptosis and mitochondria [J]. *Pharm Biol*, 2021, 59(1): 335-346.

[17] 王珊珊, 范乃兵, 鞠晓云, 等. 动物模型在中医药领域的研究 [J]. 今日畜牧兽医, 2019, 35(12): 57-58.

[18] 冯雨菲, 何贵新, 申永艳, 等. 心肌缺血中医动物模型制备及中医药防治新进展 [J]. 海南医学院学报, 2022, 28(7): 555-560.

[19] 范英兰, 胡丽萍, 朱竟赫, 等. 心肌缺血动物模型实验研究进展 [J]. 实验动物科学, 2018, 35(1): 72-75.

[20] 闫阳, 姚禹, 陈起帆. 药物致心肌损伤的方法举例与评估 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(31): 6125-6126.

[21] 李思成, 王华, 吴松, 等. “心与小肠相表里”理论在心肌缺血疾病中的运用 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(1): 153-155.

[22] 杨延泽, 邓毅, 杨秀娟, 等. 当归配伍不同药对寒凝血瘀模型大鼠活血作用研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(20): 2626-2630.

[23] 赵丹丹, 瞿惠燕, 杨涛, 等. 鹿红方调节 PI3K/Akt 通路抑制心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡机制研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(7): 67-72.

[24] 周瑞, 唐志书, 苏洁, 等. 正源方通过调控 PI3K/AKT 通路对过氧化氢诱导的血管内皮细胞凋亡的保护作用研究 [J]. 中药材, 2022, 45(2): 462-466.

[25] 刘晨杰, 姚丽, 张力, 等. B 型钠尿肽对急性心肌缺血损伤发挥保护作用的机制 [J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(3): 1356-1361.

[26] Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals-A review [J]. *Braz J Biol*, 2021, 81(4): 1133-1143.

[责任编辑 李亚楠]