



(扫描二维码查看原文)

· 论著 ·

香芹酚通过增强 PTEN 诱导激酶 1/Parkin 介导的自噬而减轻心肌缺血再灌注损伤的动物及细胞实验

闫莉, 杨光, 程功

【摘要】 背景 在心血管疾病中, PTEN 诱导激酶 1 (PINK1) /Parkin 介导的自噬通过有效地清除受损的线粒体和过量的活性氧 (ROS) 来维持细胞内线粒体的动态平衡。香芹酚具有减少心肌细胞中 ROS 生成和降低线粒体损伤的作用。然而, 目前尚不清楚香芹酚对心肌缺血再灌注损伤 (MIRI) 中自噬的影响。目的 通过动物及细胞实验探讨香芹酚对 MIRI 的治疗作用及其机制。方法 本研究时间为 2020 年 5 月至 2021 年 5 月。动物实验: 将成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠随机分为 Sham 组 (A 组)、MIRI 组 (B 组)、MIRI+20 mg/kg 香芹酚组 (C 组) 和 MIRI+60 mg/kg 香芹酚组 (D 组), 每组 12 只。B、C、D 组大鼠建立 MIRI 模型, A 组大鼠接受相同的手术, 但不结扎冠状动脉左前降支; 术前 15 min, C 组和 D 组大鼠腹腔注射相应剂量的香芹酚, A 组和 B 组大鼠给予等体积的 0.9% 氯化钠溶液。检测 A、B、C、D 组大鼠血清心肌钙蛋白 I (cTnI)、肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、乳酸脱氢酶 (LDH) 水平, 心肌梗死面积, 心肌病变情况, 心肌组织中 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白表达水平及微管相关蛋白轻链 3 (LC3) - II /LC3- I。细胞实验: 将 H9C2 细胞分为对照组 (E 组)、缺氧 / 复氧 (H/R) 组 (F 组, 进行 H/R 处理)、H/R+ 香芹酚组 (G 组, 用 100 μ mol/L 香芹酚预处理 6 h 后进行 H/R 处理)、H/R+ 香芹酚 + 阴性对照小干扰 RNA (NC-siRNA) 组 (H 组, 转染 NC-siRNA 后用 100 μ mol/L 香芹酚预处理 6 h, 然后进行 H/R 处理) 和 H/R+ 香芹酚 + 靶向 PINK1 的小干扰 RNA (PINK1-siRNA) 组 (I 组, 转染 PINK1-siRNA 后用 100 μ mol/L 香芹酚预处理 6 h, 然后进行 H/R 处理)。检测 E、F、G、H、I 组细胞活力、细胞凋亡率, H9C2 细胞中 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白表达水平及 LC3- II /LC3- I。结果 动物实验: B、C、D 组大鼠血清 cTnI、CK-MB、AST、LDH 水平高于 A 组 ($P < 0.05$); C、D 组大鼠血清 cTnI、CK-MB、AST、LDH 水平低于 B 组 ($P < 0.05$); D 组大鼠血清 cTnI、CK-MB、AST、LDH 水平低于 C 组 ($P < 0.05$)。A 组大鼠心肌梗死面积为 0。C、D 组大鼠心肌梗死面积小于 B 组 ($P < 0.05$); D 组大鼠心肌梗死面积小于 C 组 ($P < 0.05$)。HE 染色结果显示, A 组大鼠心肌细胞排列整齐, 细胞核明显, 无炎性细胞浸润; B 组大鼠心肌组织广泛坏死, 心肌纤维排列紊乱, 大量炎性细胞浸润; C、D 组大鼠心肌细胞排列较整齐, 细胞坏死程度和范围明显减轻。Masson 三色染色结果显示, A 组大鼠心肌组织以心肌细胞为主, 没有明显的胶原成分; B 组大鼠心肌组织心肌纤维化明显, 仅有少量心肌细胞存在; C、D 组大鼠心肌组织的胶原纤维含量明显减少。定量分析结果显示, B、C、D 组大鼠心肌纤维化百分比高于 A 组 ($P < 0.05$); C、D 组大鼠心肌纤维化百分比低于 B 组 ($P < 0.05$); D 组大鼠心肌纤维化百分比低于 C 组 ($P < 0.05$)。TUNEL 染色结果显示, B、C、D 组大鼠心肌组织 TUNEL 阳性率高于 A 组 ($P < 0.05$); C、D 组大鼠心肌组织 TUNEL 阳性率低于 B 组 ($P < 0.05$); D 组大鼠心肌组织 TUNEL 阳性率低于 C 组 ($P < 0.05$)。B、C、D 组大鼠心肌组织中 PINK1、Beclin1 蛋白表达水平低于 A 组, B、C 组大鼠心肌组织中 Parkin 蛋白表达水平低于 A 组, B 组大鼠心肌组织中 LC3- II /LC3- I 低于 A 组, C、D 组大鼠心肌组织中 LC3- II /LC3- I 高于 A 组 ($P < 0.05$); C、D 组大鼠心肌组织中 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白表达水平及 LC3- II /LC3- I 高于 B 组 ($P < 0.05$); D 组大鼠心肌组织中 Parkin、Beclin1 蛋白表达水平高于 C 组, ($P < 0.05$)。细胞实验: F、G、H、I 组细胞活力小于 E 组 ($P < 0.05$); G、H 组细胞活力大于 F 组 ($P < 0.05$); I 组细胞活力小于 G、H 组 ($P < 0.05$)。F、G、H、I 组细胞凋亡率高于 E 组 ($P < 0.05$); G、H、I 组细胞凋亡率低于 F 组 ($P < 0.05$); I 组细胞凋亡率高于 G、H 组 ($P < 0.05$)。F 组 H9C2 细胞中 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白表达水平及 LC3- II /LC3- I 低于 E 组 ($P < 0.05$); G、H 组 H9C2 细胞中 PINK1、Beclin1 蛋白表达水平低于 E 组、高于 F 组, Parkin 蛋白表达水平高于 F 组, LC3- II /LC3- I 高于 E、F 组 ($P < 0.05$); I 组 H9C2 细胞中 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白表达水平及 LC3- II /LC3- I 低于 E、G、H 组, Beclin1 蛋白表达水平高于 F 组 ($P < 0.05$)。结论 动物及细胞实验均表明, 香芹酚通过激活 PINK1/Parkin 通路增强自噬, 从而减轻 MIRI。

【关键词】 心肌再灌注损伤; 心肌缺血再灌注损伤; 香芹酚; 自噬; PTEN 诱导激酶 1; Parkin

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (2020JM-665)

710068 陕西省西安市, 陕西省人民医院心内二科

通信作者: 程功, E-mail: xianchenggong@163.com

【中图分类号】 R 542.2 【文献标识码】 A DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2021.00.256

闫莉, 杨光, 程功. 香芹酚通过增强 PTEN 诱导激酶 1/Parkin 介导的自噬而减轻心肌缺血再灌注损伤的动物及细胞实验 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2021, 29 (11): 69-78. [www.syxnf.net]

YAN L, YANG G, CHENG G. Carvacrol reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by activating PTEN induced putative kinase 1/Parkin-mediated autophagy: animal and cell experiments [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2021, 29 (11): 69-78.

Carvacrol Reduces Myocardial Ischemia-reperfusion Injury by Activating PTEN Induced Putative Kinase 1/Parkin-mediated Autophagy: Animal and Cell Experiments

YAN Li, YANG Guang, CHENG Gong

Department of Cardiology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China

Corresponding author: CHENG Gong, E-mail: xianchenggong@163.com

【Abstract】 Background In cardiovascular diseases, PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) /Parkin-mediated autophagy maintains the dynamic balance of intracellular mitochondria by effectively scavenging damaged mitochondria and excess reactive oxygen species (ROS). Carvacrol can reduce the production of ROS and mitochondrial damage in cardiomyocytes. However, the effect of carvacrol on autophagy in myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) is not clear. **Objective** To investigate the therapeutic effect of carvacrol on MIRI and its mechanism through animal and cell experiments. **Methods** The time of this study is from May 2020 to May 2021. Animal experiment: adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into Sham group (group A), MIRI group (group B), MIRI+20 mg/kg carvacrol group (group C) and MIRI+60 mg/kg carvacrol group (group D), with 12 rats in each group. The MIRI model was established in groups B, C and D, and the rats in group A received the same operation without ligating the left anterior descending branch of coronary artery. Fifteen min before operation, the rats in groups C and D were injected intraperitoneally with corresponding dose of carvacrol, and rats in groups A and B were given the same volume of 0.9% sodium chloride solution. The levels of serum cardiac troponin I (cTnI), creatine kinase isoenzyme (CK-MB), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), myocardial infarction area, myocardial pathological changes, expression level of PINK1, Parkin and Beclin1 protein and microtubule-associated protein 3 (LC3)-II /LC3-I in groups A, B, C and D were measured. Cell experiment: H9C2 cells were divided into control group (group E), hypoxia/reoxygenation (H/R) group (group F, treated with H/R), H/R + carvacrol group (group G, pretreated with 100 μ mol/L carvacrol for 6 h and then treated with H/R), H/R + carvacrol + negative control siRNA (NC-siRNA) group (group H, after transfection of NC-siRNA, 100 μ mol/L carvacrol was pretreated for 6 h, and then treated with H/R) and H/R + carvacrol + small interfering RNA targeting PINK1 (PINK1-siRNA) group (group I, after transfection of PINK1-siRNA, 100 μ mol/L carvacrol was pretreated for 6 h, and then treated with H/R). The cell viability, apoptosis rate, the expression levels of PINK1, Parkin and Beclin1 protein and LC3-II /LC3-I in H9C2 cells in groups E, F, G, H and I were detected. **Results** Animal experiments: the levels of serum cTnI, CK-MB, AST and LDH in groups B, C and D were higher than those in group A ($P < 0.05$); the levels of serum cTnI, CK-MB, AST and LDH in groups C and D were lower than those in group B ($P < 0.05$); the levels of serum cTnI, CK-MB, AST and LDH in group D were lower than those in group C ($P < 0.05$). The myocardial infarction area in group A was 0. The myocardial infarction area in groups C and D was smaller than that in group B ($P < 0.05$); the myocardial infarction area in group D was smaller than that in group C ($P < 0.05$). HE staining results showed that myocardial cells in group A were arranged neatly, with obvious nuclei and no inflammatory cell infiltration; rats in group B had extensive necrosis of myocardial tissue, disordered myocardial fiber arrangement, and a large number of inflammatory cell infiltration; the cardiomyocytes of rats in groups C and D were arranged neatly, and the degree and scope of cell necrosis were significantly reduced. The results of Masson's tricolor staining showed that the myocardial tissues of rats in group A were mainly composed of cardiomyocytes without obvious collagen components; the myocardial tissues of rats in group B had obvious myocardial fibrosis, with only a few cardiomyocytes present; the content of collagen fibers in myocardial tissue of rats in groups C and D were significantly reduced. The results of quantitative analysis showed that the myocardial fibrosis rate of rats in groups B, C and D was higher than that in group A ($P < 0.05$); the rate of myocardial fibrosis of rats in groups C and D was lower than that in group B ($P < 0.05$); the rate of myocardial fibrosis of rats in group D was lower than that in group C ($P < 0.05$). TUNEL staining results showed that the positive rate of TUNEL in myocardial tissue of rats in groups B, C and D was higher than that in group A ($P < 0.05$); the positive rate of TUNEL in myocardial tissue of rats in groups C and D was lower than that in group B ($P < 0.05$); the positive rate of TUNEL in myocardial tissue of rats in group D was lower than that in group C ($P < 0.05$). The expression levels of PINK1 and Beclin1 protein in myocardial tissues of rats in groups B, C and D were lower than those in group A, the expression levels of Parkin protein in myocardial tissues of rats in groups B and C were lower than those in group A, LC3-II

LC3- I in myocardial tissues of rats in group B was lower than that in group A, LC3- II /LC3- I in myocardial tissues of rats in groups C and D was higher than that in group A ($P < 0.05$); the expression levels of PINK1, Parkin and Beclin1 protein and LC3- II /LC3- I in myocardial tissues of rats in groups C and D were higher than those in group B ($P < 0.05$); the expression levels of Parkin and Beclin1 protein in myocardial tissues of rats in group D were higher than those in group C ($P < 0.05$). Cell experiment: the cell viability of groups F, G, H and I was lower than that of group E ($P < 0.05$); the cell viability of groups G and H was higher than that of group F ($P < 0.05$); the cell viability of group I was lower than that of groups G and H ($P < 0.05$). The apoptotic rate of groups F, G, H and I was higher than that of group E ($P < 0.05$); the apoptotic rate of groups G, H and I was lower than that of group F ($P < 0.05$); the apoptotic rate of group I was higher than that of groups G and H ($P < 0.05$). The expression levels of PINK1, Parkin, Beclin1 protein and LC3- II /LC3- I in H9C2 cells in group F were lower than those in group E ($P < 0.05$); the expression levels of PINK1 and Beclin1 protein in H9C2 cells in groups G and H were lower than those in group E, and higher than those in group F, the expression level of Parkin protein was higher than that in group F, LC3- II /LC3- I was higher than that in groups E and F ($P < 0.05$); the expression levels of PINK1, Parkin and Beclin1 protein and LC3- II /LC3- I in H9C2 cells in group I were lower than those in groups E, G and H, the expression levels of Beclin1 protein were higher than those in group F ($P < 0.05$). **Conclusion** Animal and cell experiments have shown that carvacrol enhances autophagy by activating the PINK1/Parkin pathway, thereby reducing MIRI.

【Key words】 Myocardial reperfusion injury; Myocardial ischemic reperfusion injury; Carvacrol; Autophagy; PTEN induced putative kinase 1; Parkin

缺血性心脏病是世界范围内严重的公共健康问题,其发病率和死亡率均较高^[1]。及时有效的心肌再灌注是挽救缺血心肌细胞、限制梗死面积的关键。然而,血流的突然恢复往往会加重缺血心肌的功能损伤,导致一系列不良后果,包括心肌细胞凋亡和坏死、心律失常和心脏收缩功能障碍,最终导致心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)^[2]。虽然MIRI的病理机制尚未完全阐明,但已有报道认为MIRI与线粒体功能障碍引起的钙离子超载、活性氧(reactive oxygen species, ROS)积聚、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)生成减少和线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)降低密切相关^[3]。

自噬是一种高度保守的溶酶体相关的降解过程,主要负责大蛋白聚集体和受损细胞器的降解,广泛参与包括心血管疾病在内的病理生理过程^[4]。自噬如何选择性地识别和清除受损的线粒体已成为最近研究的一个主要焦点。研究表明,在心血管疾病中,PTEN诱导激酶1(PTEN induced putative kinase 1, PINK1)/Parkin介导的自噬通过有效地清除受损的线粒体和过量的ROS来维持细胞内线粒体的动态平衡^[5]。PINK1/Parkin介导的自噬可以保护H9C2心肌细胞免受缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)损伤^[6]。因此,自噬调控被认为是治疗MIRI的有效策略。

香芹酚属于唇形科植物中的单萜酚类,在过去其作为食品添加剂被广泛应用于食品工业^[7]。一些研究表明,香芹酚具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤和抗微生物作用^[8-10]。另外,有学者报道香芹酚可通过减轻氧化应激及减少心肌细胞凋亡^[11]、减轻线粒体损伤^[12]来缓解MIRI。然而,

目前尚不清楚香芹酚对MIRI中自噬的影响。本研究旨在通过动物及细胞实验探讨香芹酚治疗MIRI的效果及其作用机制,从而为MIRI的治疗提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 实验时间 2020年5月至2021年5月。

1.2 主要实验试剂 香芹酚购自美国Sigma-Aldrich公司;心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin I, cTnI)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自武汉菲恩生物科技有限公司;肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme, CK-MB)ELISA试剂盒购自上海心语生物科技有限公司;天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)ELISA试剂盒购自无锡云萃生物科技有限公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)ELISA试剂盒购自滁州仕诺达生物科技有限公司;2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)购自北京索莱宝科技有限公司;苏木精-伊红(hematoxylin eosin, HE)染色试剂盒、BCA蛋白分析试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;Masson三色染色试剂盒购自南京森贝伽生物科技有限公司;10%胎牛血清、Lipofectamine 3000购自美国Invitgen公司;青霉素、链霉素、DMEM培养基购自美国Gibco公司;TUNEL染色试剂盒购自美国罗氏公司;RIPA裂解缓冲液购自北京凯瑞基生物科技有限公司;PINK1、Parkin、Beclin1、微管相关蛋白轻链3(microtubule-associated protein 3, LC3)和抗 β -actin试剂盒购自美国Cell Signaling Technology公司;辣根过氧化物酶标记的免疫球蛋白(Ig)G购自英国Abcam公司;靶向PINK1的小干扰RNA(small interfering RNA targeting PINK1, PINK1-siRNA)和阴性

对照小干扰 RNA (negative control siRNA, NC-siRNA) 由上海吉玛制药技术有限公司合成。

1.3 实验动物和分组 成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠 48 只 [平均体质量 (230 ± 20) g], 购自南通特洛菲饲料科技有限公司。大鼠饲养在湿度为 40%~50%、温度为 25 °C、光照/黑暗周期为 12 h 的实验室中。大鼠可自由获取食物和水。将大鼠随机分为 Sham 组 (A 组)、MIRI 组 (B 组)、MIRI+20 mg/kg 香芹酚组 (C 组) 和 MIRI+60 mg/kg 香芹酚组 (D 组), 每组 12 只。

1.4 实验细胞和分组 大鼠心肌细胞 H9C2 细胞购自美国 ATCC。将 H9C2 细胞分为对照组 (E 组)、H/R 组 (F 组)、H/R+ 香芹酚组 (G 组)、H/R+ 香芹酚+NC-siRNA 组 (H 组) 和 H/R+ 香芹酚+PINK1-siRNA 组 (I 组)。

1.5 实验方法

1.5.1 动物实验

1.5.1.1 MIRI 模型的建立 B、C、D 组大鼠腹腔注射 5% 水合氯醛 (0.01 ml/g) 麻醉后, 连接动物呼吸机, 潮气量 2.0~2.5 ml, 呼吸频率为 120 次/min, 而后开胸暴露大鼠心脏。结扎冠状动脉左前降支造成心肌缺血。心肌缺血的标准是心电图上 ST 段抬高 0.2 mV 和心脏局部发紫。心肌缺血 30 min 后, 解除结扎恢复血流 2 h 进行再灌注。A 组大鼠接受相同的手术, 但不结扎冠状动脉左前降支。术前 15 min, C 组和 D 组大鼠腹腔注射相应剂量的香芹酚, A 组和 B 组大鼠给予等体积的 0.9% 氯化钠溶液。

1.5.1.2 血清 cTnI、CK-MB、AST、LDH 水平测定 再灌注结束后, 采集大鼠下腔静脉血, 1 000 r/min 离心 15 min (离心半径 15 cm), 收集血清。分别用相应的 ELISA 试剂盒按照制造商的方案测定大鼠血清 cTnI、CK-MB、AST、LDH 水平。

1.5.1.3 心肌梗死面积测定 再灌注结束后, 通过 TTC 染色确定心肌梗死面积。将大鼠左心室切成 2~3 mm 的切片, 放入含有 1% TTC 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH=7.4) 中, 于 37 °C 避光孵育 30 min。正常心肌为红色, 梗死心肌为灰白色。分别用电子天平称重梗死区和左心室重量, 梗死面积为梗死区重量占左心室重量的百分比。

1.5.1.4 心肌病变测定 (1) HE 染色: 将各组大鼠心脏在 4% 多聚甲醛中固定, 石蜡包埋, 切成 4 μ m 厚的切片, 按照 HE 染色试剂盒说明书进行 HE 染色, 观察心肌组织形态。(2) Masson 三色染色: 将各组大鼠心脏置于 4% 多聚甲醛中固定, 石蜡包埋, 切成 4 μ m 厚的切片, 按照 Masson 三色染色试剂盒说明书进行 Masson 三色染色, 观察心肌纤维化情况, 使用 Image-Pro Plus 6.0 软件计算心肌纤维化百分比。(3) TUNEL 染色: 将各组大鼠心脏置于 4% 多聚甲醛中固定, 石蜡包埋, 切成 4 μ m 厚的切片; 将心肌切片脱蜡和水化后,

置于蛋白酶 K 溶液中, 并于 37 °C 避光孵育 30 min, 然后将切片置于 TUNEL 工作液中于 37 °C 孵育 60 min; 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤并风干后, 滴加含有 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 的抗淬灭荧光封固剂封固, 置于荧光显微镜下观察, 激发波长范围为 450~500 nm, 发射波长为 515~565 nm。计算心肌组织 TUNEL 阳性率。

1.5.1.5 心肌组织中 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白表达水平及 LC3- II /LC3- I 检测 采用 Western blot 法检测心肌组织中 PINK1、Parkin、Beclin1、LC3 蛋白表达水平, 具体方法如下: 使用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液从心肌组织中分离蛋白, 采用 BCA 蛋白分析试剂盒测定总蛋白浓度。采用 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离 50 μ g 蛋白并电转移到聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上。采用 5% 脱脂牛奶封闭后, 将切片置于抗 PINK1、Parkin、Beclin1、LC3、 β -actin (均为 1 : 1 000 稀释) 中, 于 4 °C 孵育过夜。然后在室温下于辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗 (1 : 2 000 稀释) 中孵育 1 h。以 β -actin 作为内参。通过 Bio-Rad 凝胶成像系统进行成像, 并用 Image J 软件计算 PINK1、Parkin、Beclin1、LC3- I、LC3- II 蛋白条带的灰度值, 并计算 LC3- II /LC3- I。

1.5.2 细胞实验

1.5.2.1 细胞培养及干预方法 将 H9C2 细胞培养在含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 环境中培养。取各组对数生长期的 H9C2 细胞, E 组在正常环境 (37 °C、5% CO₂、95% 空气) 中于完全 DMEM 培养基中培养; F 组在 37 °C、5% CO₂、95% N₂ 的环境中于无糖 DMEM 培养基中培养, 进行缺氧处理 4 h 后将细胞在正常环境中于完全 DMEM 培养基中复氧培养; G 组用香芹酚 (100 μ mol/L) 预处理 6 h 后, 采用与 F 组相同的方法进行 H/R 处理; H 组和 I 组在转染 NC-siRNA 或 PINK1-siRNA 后, 分别用香芹酚 (100 μ mol/L) 预处理 6 h, 然后进行 H/R 处理。细胞转染方法如下: 将 H9C2 细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板上, 使用 Lipofectamine 3000 将 PINK1-siRNA 或 NC-siRNA 转染至 H9C2 细胞中, 转染方法按照说明书进行操作。

1.5.2.2 细胞活力检测 采用 MTT 法检测细胞活力, 具体方法如下: H/R 处理完成后, 向各培养孔中加入 50 μ l MTT 溶液, 于 37 °C、5% CO₂ 环境中培养 4 h。然后将培养板以 2 500 r/min 离心 5 min (离心半径 15 cm), 弃去上清液, 各孔加入 150 μ l 二甲基亚砷 (dimethyl

sulfoxide, DMSO)。振荡 30 s, 用酶标仪测量 550 nm 处吸光度值并计算细胞活力。实验重复 6 次。

1.5.2.3 细胞凋亡率检测 采用 TUNEL 染色法检测细胞凋亡率, 具体方法如下: 将 H9C2 细胞以 2×10^4 个/孔的密度接种到 24 孔板中, 采用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 采用 0.1% Triton X-100 在 0.1% 枸橼酸钠中渗透 H9C2 细胞 2 min。PBS 洗涤后, 将细胞与 TUNEL 反应混合物在 37 °C 下孵育 1 h, 然后用 DAPI 染核, 采用荧光显微镜观察染色的细胞。随机选择 6 个高倍视野, 计数每个视野中的总细胞数和 TUNEL 阳性细胞数 (绿色荧光), 之后计算 TUNEL 阳性率, 即细胞凋亡率。实验重复 6 次。

1.5.2.4 H9C2 细胞中 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白表达水平及 LC3- II /LC3- I 检测 采用 Western blot 法检测 H9C2 细胞中 Beclin1、LC3、PINK1、Parkin 蛋白表达水平, 方法同 1.5.1.5。实验重复 6 次。

1.6 统计学方法 使用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据分析。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 cTnI、CK-MB、AST、LDH 水平 A、B、C、D 组大鼠血清 cTnI、CK-MB、AST、LDH 水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。B、C、D 组大鼠血清 cTnI、CK-MB、AST、LDH 水平高于 A 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); C、D 组大鼠血清 cTnI、CK-MB、AST、LDH 水平低于 B 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); D 组大鼠血清 cTnI、CK-MB、AST、LDH 水平低于 C 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.2 心肌梗死面积 A、B、C、D 组大鼠心肌梗死面积分别为 0、21.35% \pm 2.60%、13.14% \pm 1.60%、7.54% \pm 0.92%。B、C、D 组大鼠心肌梗死面积比较, 差异有统计学意义 ($F=170.845, P < 0.001$)。C、

表 1 A、B、C、D 组大鼠血清 cTnI、CK-MB、AST、LDH 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 1 Comparison of serum levels of cTnI, CK-MB, AST and LDH of rats in groups A, B, C and D

组别	cTnI ($\mu\text{g/L}$)	CK-MB (U/L)	AST (U/L)	LDH (U/L)
A 组	212.54 \pm 27.63	98.57 \pm 12.81	227.88 \pm 29.62	219.43 \pm 28.53
B 组	417.478 \pm 54.27 ^a	378.49 \pm 49.20 ^a	677.43 \pm 88.07 ^a	897.53 \pm 116.68 ^a
C 组	331.36 \pm 43.08 ^{ab}	219.65 \pm 28.55 ^{ab}	388.49 \pm 50.50 ^{ab}	455.32 \pm 59.19 ^{ab}
D 组	278.35 \pm 36.19 ^{abc}	175.35 \pm 22.80 ^{abc}	316.32 \pm 41.12 ^{abc}	279.09 \pm 36.28 ^{abc}
F 值	26.190	85.402	70.651	117.200
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

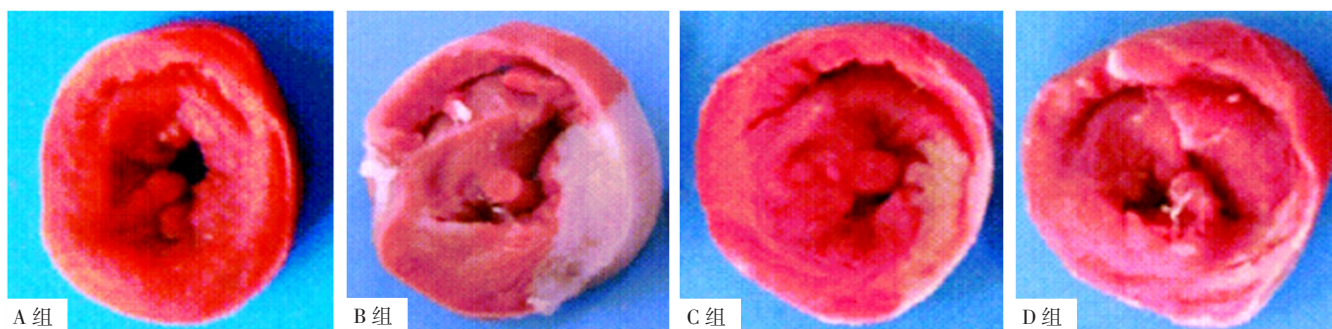
注: A 组为 Sham 组, B 组为心肌缺血再灌注损伤 (MIRI) 组, C 组为 MIRI+20 mg/kg 香芹酚组, D 组为 MIRI+60 mg/kg 香芹酚组; ^a 表示与 A 组比较, $P < 0.05$; ^b 表示与 B 组比较, $P < 0.05$; ^c 表示与 C 组比较, $P < 0.05$; cTnI= 心肌肌钙蛋白 I, CK-MB= 肌酸激酶同工酶, AST= 天冬氨酸氨基转移酶, LDH= 乳酸脱氢酶

D 组大鼠心肌梗死面积小于 B 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); D 组大鼠心肌梗死面积小于 C 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1。

2.3 心肌病变 HE 染色结果显示, A 组大鼠心肌细胞排列整齐, 细胞核明显, 无炎性细胞浸润; B 组大鼠心肌组织广泛坏死, 心肌纤维排列紊乱, 大量炎性细胞浸润; C、D 组大鼠心肌细胞排列较整齐, 细胞坏死程度和范围明显减轻, 见图 2。

Masson 三色染色结果显示, A 组大鼠心肌组织以心肌细胞为主, 没有明显的胶原成分; B 组大鼠心肌组织心肌纤维化明显, 仅有少量心肌细胞存在; C、D 组大鼠心肌组织的胶原纤维含量明显减少, 见图 3。定量分析结果显示, A、B、C、D 组大鼠心肌纤维化百分比比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。B、C、D 组大鼠心肌纤维化百分比高于 A 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); C、D 组大鼠心肌纤维化百分比低于 B 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); D 组大鼠心肌纤维化百分比低于 C 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2、图 3。

TUNEL 染色结果显示, A、B、C、D 组大鼠心肌组



注: A 组为 Sham 组, B 组为心肌缺血再灌注损伤 (MIRI) 组, C 组为 MIRI+20 mg/kg 香芹酚组, D 组为 MIRI+60 mg/kg 香芹酚组

图 1 A、B、C、D 组大鼠心肌组织 TTC 染色结果 ($\times 10$)

Figure 1 TTC staining results of myocardial tissue of rats in groups A, B, C and D

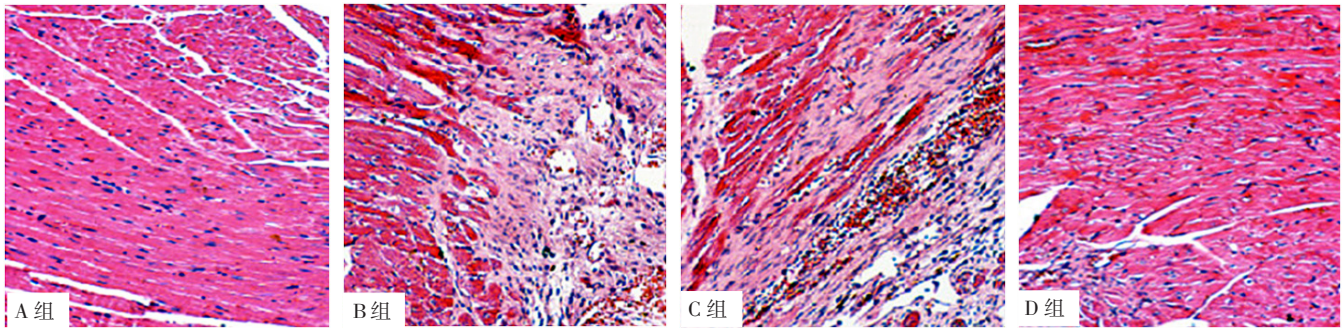


图2 A、B、C、D组大鼠心肌组织 HE 染色结果 (×200)
Figure 2 HE staining result of myocardial tissue of rats in groups A, B, C and D

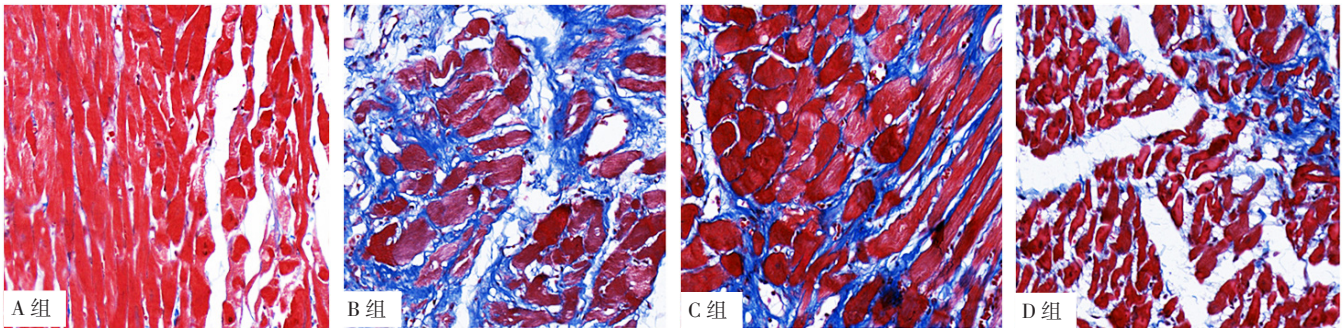


图3 A、B、C、D组大鼠心肌组织 Masson 三色染色结果 (×400)
Figure 3 Masson trichrome staining result of myocardial tissue of rats in groups A, B, C and D

织 TUNEL 阳性率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。B、C、D 组大鼠心肌组织 TUNEL 阳性率高于 A 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); C、D 组大鼠心肌组织 TUNEL 阳性率低于 B 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); D 组大鼠心肌组织 TUNEL 阳性率低于 C 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2、图 4。

表 2 A、B、C、D 组大鼠心肌纤维化百分比、心肌组织 TUNEL 阳性率比较 ($\bar{x} \pm s$, %, $n=12$)

Table 2 Comparison of rat myocardial fibrosis rate and myocardial tissue TUNEL positive rate in groups A, B, C and D

组别	心肌纤维化百分比	心肌组织 TUNEL 阳性率
A 组	0.54 ± 0.07	0.27 ± 0.03
B 组	61.43 ± 7.49 ^a	22.43 ± 2.74 ^a
C 组	32.56 ± 3.97 ^{ab}	6.75 ± 0.82 ^{ab}
D 组	20.65 ± 2.52 ^{abc}	2.21 ± 0.27 ^{abc}
F 值	198.803	293.712
P 值	< 0.001	< 0.001

注: ^a表示与 A 组比较, $P < 0.05$; ^b表示与 B 组比较, $P < 0.05$; ^c表示与 C 组比较, $P < 0.05$

2.4 心肌组织中 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白表达水平及 LC3- II /LC3- I A、B、C、D 组大鼠心肌组织中 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白表达水平及 LC3- II /LC3- I 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。B、C、

D 组大鼠心肌组织中 PINK1、Beclin1 蛋白表达水平低于 A 组, B、C 组大鼠心肌组织中 Parkin 蛋白表达水平低于 A 组, B 组大鼠心肌组织中 LC3- II /LC3- I 低于 A 组, C、D 组大鼠心肌组织中 LC3- II /LC3- I 高于 A 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); C、D 组大鼠心肌组织中 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白表达水平及 LC3- II /LC3- I 高于 B 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); D 组大鼠心肌组织中 Parkin、Beclin1 蛋白表达水平高于 C 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3、图 5。

表 3 A、B、C、D 组大鼠心肌组织中 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白表达水平及 LC3- II /LC3- I 比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 3 Comparison of expression levels of PINK1, Parkin and Beclin1 protein and LC3- II /LC3- I in the myocardial tissues of rats in groups A, B, C and D

组别	PINK1 蛋白	Parkin 蛋白	Beclin1 蛋白	LC3- II /LC3- I
A 组	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.08
B 组	0.23 ± 0.02 ^a	0.24 ± 0.03 ^a	0.18 ± 0.03 ^a	0.24 ± 0.04 ^a
C 组	0.76 ± 0.11 ^{ab}	0.86 ± 0.11 ^{ab}	0.57 ± 0.09 ^{ab}	1.26 ± 0.17 ^{ab}
D 组	0.83 ± 0.08 ^{ab}	0.97 ± 0.08 ^{bc}	0.70 ± 0.02 ^{abc}	1.35 ± 0.14 ^{ab}
F 值	68.982	101.655	156.986	106.612
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: ^a表示与 A 组比较, $P < 0.05$; ^b表示与 B 组比较, $P < 0.05$; ^c表示与 C 组比较, $P < 0.05$; PINK1=PTEN 诱导激酶 1, LC3= 微管相关蛋白轻链 3

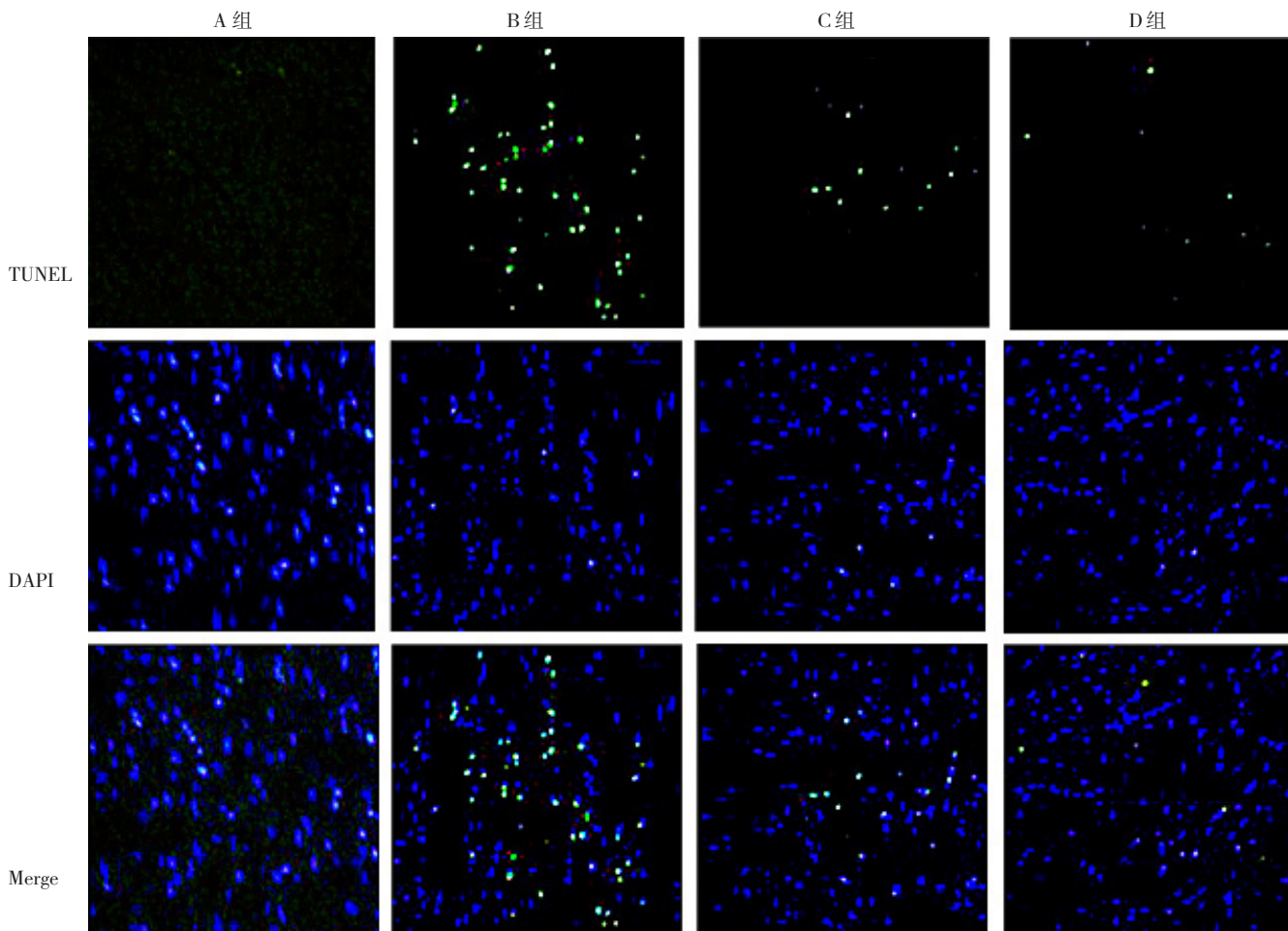


图4 A、B、C、D组大鼠心肌组织 TUNEL 染色结果 (×200)
Figure 4 TUNEL staining result of myocardial tissue of rats in groups A, B, C and D

2.5 细胞活力 E、F、G、H、I组细胞活力比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。F、G、H、I组细胞活力小于E组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); G、H组细胞活力大于F组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); I组细胞活力小于G、H组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表4、图6。

2.6 细胞凋亡率 E、F、G、H、I组细胞凋亡率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。F、G、H、I组细胞凋亡率高于E组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); G、H、I组细胞凋亡率低于F组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); I组细胞凋亡率高于G、H组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表4。

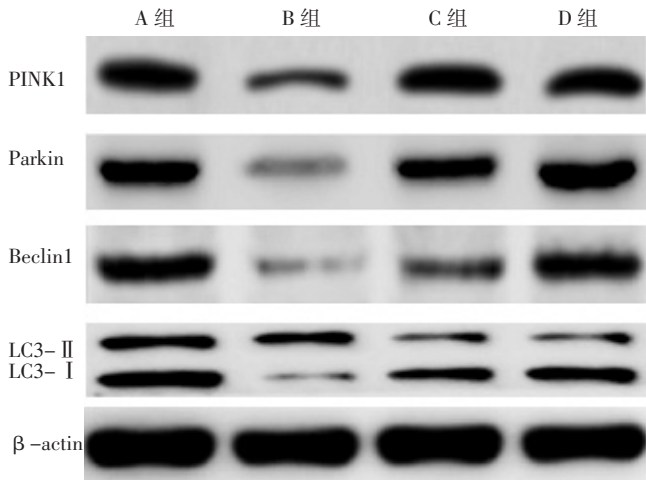
2.7 H9C2 细胞中 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白表达水平及 LC3-II/LC3-I E、F、G、H、I组 H9C2 细胞中 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白表达水平及 LC3-II/LC3-I 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。F组 H9C2 细胞中 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白表达水平及 LC3-II/LC3-I 低于E组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); G、H组 H9C2 细胞中 PINK1、Beclin1

表4 E、F、G、H、I组细胞活力、细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 4 Comparison of cell viability and apoptosis rate in groups E, F, G, H, I

组别	细胞活力	细胞凋亡率 (%)
E组	1.00 ± 0.15	2.06 ± 0.10
F组	0.50 ± 0.08 ^a	31.94 ± 3.68 ^a
G组	0.77 ± 0.11 ^{ab}	7.36 ± 0.93 ^{ab}
H组	0.72 ± 0.12 ^{ab}	8.50 ± 0.81 ^{ab}
I组	0.53 ± 0.04 ^{acd}	16.34 ± 1.87 ^{abcd}
F值	21.557	218.452
P值	< 0.001	< 0.001

注: E组为对照组, F组为缺氧/复氧(H/R)组, G组为H/R+香芹酚组, H组为H/R+香芹酚+阴性对照小干扰RNA(NC-siRNA)组, I组为H/R+香芹酚+靶向PINK1的小干扰RNA(PINK1-siRNA)组; ^a表示与E组比较, $P < 0.05$; ^b表示与F组比较, $P < 0.05$; ^c表示与G组比较, $P < 0.05$; ^d表示与H组比较, $P < 0.05$

蛋白表达水平低于E组、高于F组, Parkin蛋白表达水平高于F组, LC3-II/LC3-I高于E、F组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); I组 H9C2 细胞中 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白表达水平及 LC3-II/LC3-I 低于E、



注: PINK1=PTEN 诱导激酶 1, LC3= 微管相关蛋白轻链 3

图 5 Western blot 检测 A、B、C、D 组大鼠心肌组织中 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白表达水平及 LC3- II、LC3- I 的 SDS-PAGE 图
Figure 5 SDS-PAGE images of PINK1, Parkin, Beclin1 protein expression level and LC3- II /LC3- I detected by Western blot in myocardial tissues of rats in groups A, B, C, D

G、H 组, Beclin1 蛋白表达水平高于 F 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 5、图 7。

3 讨论

香芹酚是一种单萜酚类化合物, 具有广泛的生物活性, 包括抗菌^[13]、抗病毒^[14]、抗氧化^[15]、改善免疫反应^[16]等。香芹酚由于具有调味功能和抗菌活性已被用作食品工业的天然食品防腐剂^[17]。此外, 已有研究报道, 香芹酚在 MIRI 的预防方面具有重要作用, 然而尚不清楚其主要药理学机制。因此, 本研究深入考察了香芹酚防治 MIRI 的可能分子机制。

表 5 E、F、G、H、I 组 H9C2 细胞中 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白表达水平及 LC3- II /LC3- I 比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

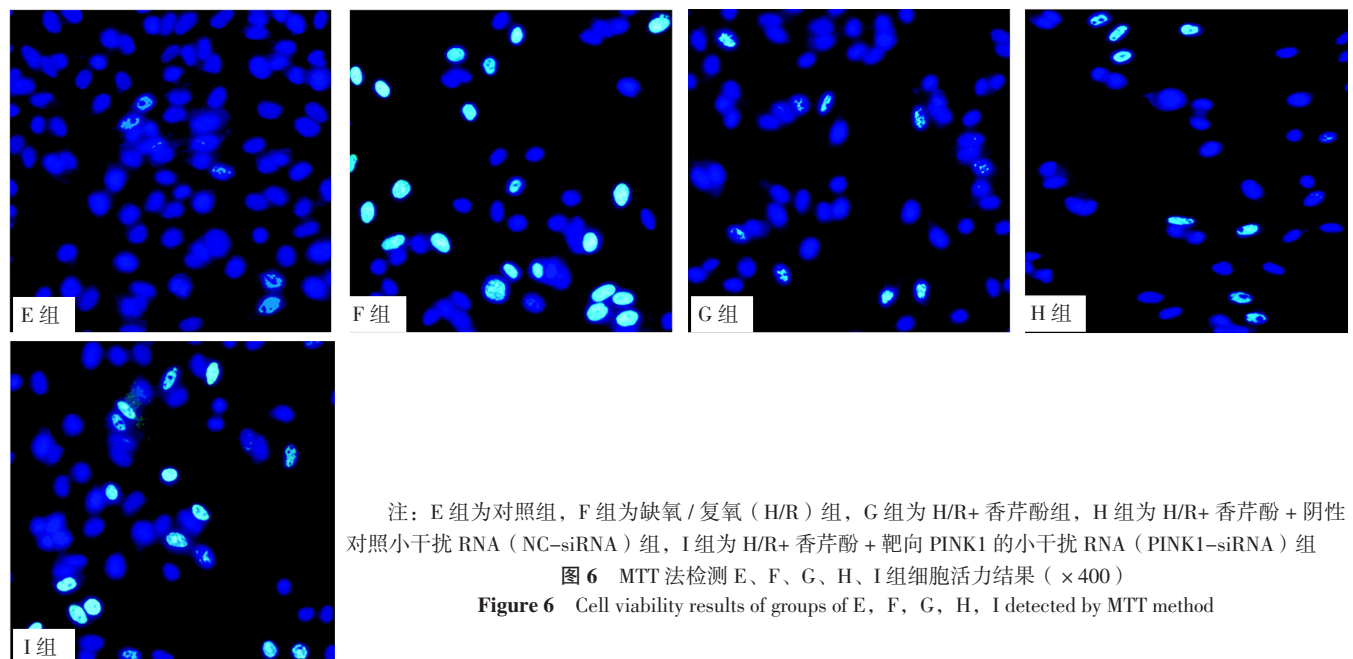
Table 5 Comparison of PINK1, Parkin, Beclin1 protein expression level and LC3- II /LC3- I in H9C2 cells in groups E, F, G, H, I

组别	PINK1 蛋白	Parkin 蛋白	Beclin1 蛋白	LC3- II /LC3- I
E 组	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.14
F 组	0.19 ± 0.01 ^a	0.25 ± 0.02 ^a	0.24 ± 0.03 ^a	0.65 ± 0.08 ^a
G 组	0.85 ± 0.07 ^{ab}	1.01 ± 0.12 ^b	0.75 ± 0.09 ^{ab}	1.34 ± 0.16 ^{ab}
H 组	0.89 ± 0.11 ^{ab}	0.99 ± 0.16 ^b	0.71 ± 0.09 ^{ab}	1.38 ± 0.17 ^{ab}
I 组	0.14 ± 0.03 ^{acd}	0.22 ± 0.03 ^{acd}	0.36 ± 0.04 ^{abcd}	0.67 ± 0.08 ^{acd}
F 值	222.636	118.251	83.557	48.775
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: ^a 表示与 E 组比较, $P < 0.05$; ^b 表示与 F 组比较, $P < 0.05$; ^c 表示与 G 组比较, $P < 0.05$; ^d 表示与 H 组比较, $P < 0.05$

血清 cTnI、CK-MB、AST、LDH 是诊断心肌损伤的常见标志物。本研究结果显示, C、D 组大鼠血清 cTnI、CK-MB、AST、LDH 水平低于 B 组; D 组大鼠血清 cTnI、CK-MB、AST、LDH 水平低于 C 组, 提示香芹酚以剂量依赖性方式减轻了 MIRI 大鼠的心肌损伤。C、D 组大鼠心肌梗死面积小于 B 组, D 组大鼠心肌梗死面积小于 C 组。此外, HE 染色结果显示, B 组大鼠心肌组织广泛坏死, 心肌纤维排列紊乱, 大量炎性细胞浸润; C、D 组大鼠心肌细胞排列较整齐, 细胞坏死程度和范围明显减轻。Masson 三色染色结果显示, C、D 组大鼠心肌纤维化百分比低于 B 组; D 组大鼠心肌纤维化百分比低于 C 组。这些结果进一步证实香芹酚以剂量依赖性方式减轻了 MIRI 大鼠的心肌损伤及纤维化程度。

本研究 TUNEL 染色结果显示, B、C、D 组大鼠心肌组织 TUNEL 阳性率高于 A 组; C、D 组大鼠心肌组



注: E 组为对照组, F 组为缺氧 / 复氧 (H/R) 组, G 组为 H/R+ 香芹酚组, H 组为 H/R+ 香芹酚 + 阴性对照小干扰 RNA (NC-siRNA) 组, I 组为 H/R+ 香芹酚 + 靶向 PINK1 的小干扰 RNA (PINK1-siRNA) 组

图 6 MTT 法检测 E、F、G、H、I 组细胞活力结果 ($\times 400$)

Figure 6 Cell viability results of groups of E, F, G, H, I detected by MTT method

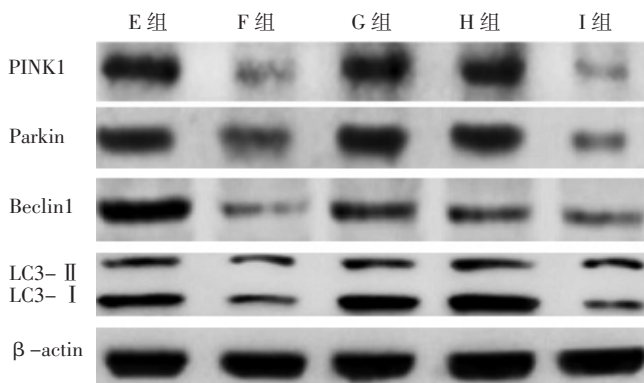


图7 Western blot 检测 E、F、G、H、I 组 H9C2 细胞中 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白表达水平及 LC3- II、LC3- I 的 SDS-PAGE 图
Figure 7 SDS-PAGE images of PINK1, Parkin, Beclin1 protein expression level and LC3- II /LC3- I in H9C2 cells in groups E, F, G, H, I detected by Western blot

织 TUNEL 阳性率低于 B 组; D 组大鼠心肌组织 TUNEL 阳性率低于 C 组; 提示香芹酚以剂量依赖性方式减轻了 MIRI 大鼠心肌细胞凋亡。已知细胞凋亡是心脏疾病发展过程中细胞死亡的主要形式之一, 并且心肌细胞凋亡也是 MIRI 的重要决定因素^[18]。因此, 减少细胞凋亡是预防 MIRI 的主要措施。本研究结果显示, F、G、H、I 组细胞活力小于 E 组, G、H 组细胞活力大于 F 组, I 组细胞活力小于 G、H 组; F、G、H、I 组细胞凋亡率高于 E 组, G、H、I 组细胞凋亡率低于 F 组, I 组细胞凋亡率高于 G、H 组; 提示香芹酚通过抑制 MIRI 大鼠心肌细胞的凋亡来保护心肌结构。宋旭东等^[11]研究显示, 香芹酚预处理可减轻 MIRI 小鼠的氧化应激及心肌细胞凋亡。王先宝等^[12]研究显示, 香芹酚预处理可减轻 MIRI 小鼠的线粒体损伤, 从而减小心肌梗死面积。因此, 推测香芹酚减轻心肌细胞凋亡的机制可能与改善动物体内氧化-抗氧化平衡有关。

越来越多的证据表明, 自噬是 MIRI 期间心肌细胞凋亡的关键因素^[19]。通过 PINK1/Parkin 途径上调自噬可以保护心肌细胞免受 MIRI^[20]。本研究推测香芹酚的心肌保护作用可能与自噬和 PINK1/Parkin 通路有关。为了验证这一观点, 本研究检测了 PINK1/Parkin 通路及自噬相关蛋白的表达, 结果显示, B、C、D 组大鼠心肌组织中 PINK1、Beclin1 蛋白表达水平低于 A 组, B、C 组大鼠心肌组织中 Parkin 蛋白表达水平低于 A 组, B 组大鼠心肌组织中 LC3- II /LC3- I 低于 A 组, C、D 组大鼠心肌组织中 LC3- II /LC3- I 高于 A 组; C、D 组大鼠心肌组织中 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白表达水平及 LC3- II /LC3- I 高于 B 组; D 组大鼠心肌组织中 Parkin、Beclin1 蛋白表达水平高于 C 组; F 组 H9C2 细胞中 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白表达水平及 LC3- II /LC3- I 低于 E 组; G、H 组 H9C2 细胞中 PINK1、

Beclin1 蛋白表达水平低于 E 组、高于 F 组, Parkin 蛋白表达水平高于 F 组, LC3- II /LC3- I 高于 E、F 组; 表明香芹酚上调了 MIRI 大鼠心肌组织及 H/R 处理的 H9C2 细胞中 PINK1、Parkin、Beclin-1 蛋白表达水平和 LC3- II /LC3- I, 提示香芹酚激活了 PINK1/Parkin 信号通路并增强了自噬能力。自噬是一个涉及清除受损的蛋白质和细胞器的降解过程, 这个过程有助于维持心肌功能。据报道, 抑制自噬可加重 MIRI^[21]。研究显示, PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬在心血管疾病中通过有效地清除受损的线粒体和过量的 ROS 来确保细胞内线粒体的稳定性^[5]。PINK1/Parkin 可检测到伴有功能障碍的线粒体并招募自噬小体对其进行降解^[22]。研究表明, PINK1/Parkin 诱导的自噬调节了心肌细胞中线粒体的动力学和功能^[23]。随着年龄增长, Parkin 的缺失导致心肌细胞中的线粒体功能发生紊乱, 从而导致氧化应激和线粒体呼吸功能障碍^[24]。本研究结果显示, I 组 H9C2 细胞中 PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白表达水平及 LC3- II /LC3- I 低于 E、G、H 组, Beclin1 蛋白表达水平高于 F 组, 提示转染 PINK1-siRNA 后 H9C2 细胞中 PINK1 蛋白表达被抑制, 并且也逆转了香芹酚对自噬的上调作用和对 PINK1/Parkin 通路的激活作用。这些结果说明, 激活 PINK1/Parkin 通路促进自噬是香芹酚抗 MIRI 的主要机制。

本研究尚存在一定局限性: (1) 虽然本研究使用了两种剂量的香芹酚来治疗 MIRI 大鼠, 然而其最佳使用剂量尚未确定, 需要在接下来的研究中进一步揭示; (2) 参与调节 MIRI 发生发展的信号通路非常多, 并且自噬也受多种信号通路直接或间接调节, 因此, PINK1/Parkin 介导的自噬通路仅是香芹酚防治 MIRI 的主要机制之一, 还需要进一步研究香芹酚对其他通路的影响; (3) 本研究动物实验中, 香芹酚为预处理给药, 因此, 需要在今后的研究中探讨后处理给药方式是否对 MIRI 大鼠具有相同的治疗效果。

综上所述, 动物及细胞实验均表明, 香芹酚通过激活 PINK1/Parkin 通路增强自噬, 从而减轻 MIRI, 香芹酚在防治 MIRI 中具有多种机制, 有望成为缺血性心脏病的潜在治疗药物。

作者贡献: 闫莉进行文章的构思与设计、研究的实施与可行性分析, 撰写论文; 闫莉、杨光进行数据收集与整理、统计学处理、结果的分析与解释; 程功进行论文的修订, 负责文章的质量控制及审校, 对文章整体负责、监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] XU L J, CHEN R C, MA X Y, et al. Scutellarin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by suppressing NLRP3

- inflammasome activation [J]. *Phytomedicine*, 2020, 68: 153169. DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153169.
- [2] HUANG Z Q, XU W, WU J L, et al. MicroRNA-374a protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in mice by targeting the MAPK6 pathway [J]. *Life Sci*, 2019, 232: 116619. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116619.
- [3] SULAIMAN D, LI J Y, DEVARAJAN A, et al. Paraoxonase 2 protects against acute myocardial ischemia-reperfusion injury by modulating mitochondrial function and oxidative stress via the PI3K/Akt/GSK-3 β RISK pathway [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 129: 154-164. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2019.02.008.
- [4] WU H, YE M, LIU D, et al. UCP2 protect the heart from myocardial ischemia/reperfusion injury via induction of mitochondrial autophagy [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120 (9) : 15455-15466. DOI: 10.1002/jcb.28812.
- [5] LI Y, QIU L X, LIU X P, et al. PINK1 alleviates myocardial hypoxia-reoxygenation injury by ameliorating mitochondrial dysfunction [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484 (1) : 118-124. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.01.061.
- [6] ZHU W J, LIU F, WANG L, et al. pPolyHb protects myocardial H9C2 cells against ischemia-reperfusion injury by regulating the Pink1-Parkin-mediated mitochondrial autophagy pathway [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47 (1) : 1248-1255. DOI: 10.1080/21691401.2019.1594243.
- [7] SHARIFI-RAD M, VARONI E M, IRITI M, et al. Carvacrol and human health: a comprehensive review [J]. *Phytother Res*, 2018, 32 (9) : 1675-1687. DOI: 10.1002/ptr.6103.
- [8] MBESE Z, ADERIBIGBE B A. Biological efficacy of carvacrol analogues [J]. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 2018, 13 (3) : 207-216. DOI: 10.2174/1574891X14666181205111821.
- [9] SILVA E R, DE CARVALHO F O, TEIXEIRA L G B, et al. Pharmacological effects of carvacrol in in vitro studies: a review [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24 (29) : 3454-3465. DOI: 10.2174/1381612824666181003123400.
- [10] SPALLETTA S, FLATI V, TONIATO E, et al. Carvacrol reduces adipogenic differentiation by modulating autophagy and ChREBP expression [J]. *PLoS One*, 2018, 13 (11) : e0206894. DOI: 10.1371/journal.pone.0206894.
- [11] 宋旭东, 陈爱华, 刘映峰, 等. 香芹酚预处理减轻小鼠心肌缺血再灌注时氧化应激及细胞凋亡 [J]. *南方医科大学学报*, 2013, 33 (11) : 1624-1627. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2013.11.013.
- [12] 王先宝, 宋旭东, 杨平珍, 等. 香芹酚预处理对心肌缺血再灌注时线粒体损伤的作用 [J]. *热带医学杂志*, 2013, 13 (6) : 674-676, 715.
- [13] CHAVAN P S, TUPE S G. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts [J]. *Food Control*, 2014, 46: 115-120. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.05.007.
- [14] SÁNCHEZ C, AZNAR R, SÁNCHEZ G. The effect of carvacrol on enteric viruses [J]. *Int J Food Microbiol*, 2015, 192: 72-76. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.028.
- [15] ARISTATILE B, AL-NUMAIR K S, VEERAMANI C, et al. Effect of carvacrol on hepatic marker enzymes and antioxidant status in D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2009, 23 (6) : 757-765. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2009.00721.x.
- [16] KHAZDAIR M R, GHORANI V, ALAVINEZHAD A, et al. Pharmacological effects of *Zataria multiflora* Boiss L. and its constituents focus on their anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2018, 32 (1) : 26-50. DOI: 10.1111/fcp.12331.
- [17] SALEHI B, ZUCCA P, SHARIFI-RAD M, et al. Phytotherapeutics in cancer invasion and metastasis [J]. *Phytother Res*, 2018, 32 (8) : 1425-1449. DOI: 10.1002/ptr.6087.
- [18] ZHANG W Y, ZHANG Q L, XU M J. Effects of propofol on myocardial ischemia reperfusion injury through inhibiting the JAK/STAT pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23 (14) : 6339-6345. DOI: 10.26355/eurrev_201907_18457.
- [19] YU S Y, DONG B, FANG Z F, et al. Knockdown of lncRNA AK139328 alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury in diabetic mice via modulating miR-204-3p and inhibiting autophagy [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22 (10) : 4886-4898. DOI: 10.1111/jemm.13754.
- [20] YANG H X, WANG P, WANG N N, et al. Tongxinluo ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury mainly via activating parkin-mediated mitophagy and downregulating ubiquitin-proteasome system [J]. *Chin J Integr Med*, 2021, 27 (7) : 542-550. DOI: 10.1007/s11655-019-3166-8.
- [21] LV W, JIANG J P, LI Y, et al. MiR-302a-3p aggravates myocardial ischemia-reperfusion injury by suppressing mitophagy via targeting FOXO3 [J]. *Exp Mol Pathol*, 2020, 117: 104522. DOI: 10.1016/j.yexmp.2020.104522.
- [22] ANZELL A R, MAIZY R, PRZYKLENK K, et al. Mitochondrial quality control and disease: insights into ischemia-reperfusion injury [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55 (3) : 2547-2564. DOI: 10.1007/s12035-017-0503-9.
- [23] DORN G W 2nd. Parkin-dependent mitophagy in the heart [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 95: 42-49. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.11.023.
- [24] KUBLI D A, ZHANG X X, LEE Y, et al. Parkin protein deficiency exacerbates cardiac injury and reduces survival following myocardial infarction [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288 (2) : 915-926. DOI: 10.1074/jbc.M112.411363.

(收稿日期: 2021-06-10; 修回日期: 2021-09-17)

(本文编辑: 崔丽红)