

# 沙库巴曲缬沙坦钠通过调控氧化应激对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠的治疗作用

赵文卿<sup>1</sup>, 姚树青<sup>2\*</sup>, 任星星<sup>1</sup>, 唐华亮<sup>1</sup>, 薛雯原<sup>1</sup>

1. 包头医学院第一附属医院 心血管内科, 内蒙古 包头 014040

2. 包头医学院人体解剖学教研室, 内蒙古 包头 014040

DOI:10.61369/MRP.2026030034

**摘要:** 目的: 评价沙库巴曲缬沙坦钠 (sacubitril valsartan sodium, SVS) 对心肌缺血再灌注损伤 (Myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI) 模型大鼠的治疗作用。方法: 采用左冠状动脉前降支结扎闭塞30 min, 恢复血流再灌注120 min制备 MIRI 动物模型, 再灌注结束后给予 SVS 灌胃处理 (60 mg/kg), 观察 SVS 的治疗效果。HE 染色观察心肌纤维形态变化; 采用酶联免疫吸附试验 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA), 对血清样本中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 活性及丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 含量进行定量检测; 利用蛋白免疫印迹技术 (Western Blot) 检查心肌结蛋白、核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid related factor 2, Nrf2)、Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 及醌氧化还原酶 1 (quinone oxidoreductase 1, NQO1) 的表达水平进行检测。结果: 与假手术组相比, 模型组的心肌纤维出现过度增生、扭曲、局部断裂甚至溶解; 血清 SOD、GSH-Px 的活性显著降低 ( $P < 0.05$ ), MDA 含量显著增高 ( $P < 0.05$ ); 结蛋白、Nrf2、Keap1 及 NQO1 的表达量均显著降低 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比, SVS 组心肌纤维的分布均变得较为规律; 血清 SOD、GSH-Px 的活性显著升高 ( $P < 0.05$ ), MDA 的含量明显降低 ( $P < 0.05$ ); 结蛋白、Nrf2、Keap1 及 NQO1 的表达量均增加 ( $P < 0.05$ ); SVS 组上述检测指标均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。结论: SVS 可减轻 MIRI 模型大鼠心肌损伤, 发挥心肌保护作用, 其机制可能通过调控 Nrf2-Keap1 信号通路抑制氧化应激与增加结蛋白表达有关。

**关键词:** 沙库巴曲缬沙坦钠; 心肌缺血再灌注; 结蛋白; 氧化应激

## The Therapeutic Effect of Sacubitril Valsartan Sodium on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats by Regulating Oxidative Stress

Zhao Wenqing<sup>1</sup>, Yao Shuqing<sup>2\*</sup>, Ren Xingxing<sup>1</sup>, Tang Hualiang<sup>1</sup>, Xue Wenyan<sup>1</sup>

1. Department of Cardiovascular, the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014040

2. Department of Human Anatomy, Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014040

**Abstract:** Objective: To evaluate the therapeutic effect of sacubitril valsartan sodium (SVS) on rats with myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI). Methods: An MIRI animal model was established by ligating and occluding the left anterior descending coronary artery for 30 minutes, followed by 120 minutes of reperfusion. After reperfusion, rats received oral administration of SVS (60 mg/kg) to observe its therapeutic effects. Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to examine myocardial fiber morphological changes. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to measure superoxide dismutase (SOD) activity and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity in serum samples. ELISA to quantify superoxide dismutase (SOD) activity, glutathione peroxidase (GSH-Px) activity, and malondialdehyde (MDA) content in serum samples; Western blot analysis was performed to examine the expression levels of cardiac myosin, nuclear factor erythroid-related factor 2 (Nrf2), and Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1). Results: Compared with the sham-operated group, the model group exhibited excessive proliferation, distortion, localized rupture, and even dissolution of myocardial fibers. Serum SOD and GSH-Px activities were significantly reduced ( $P < 0.05$ ), while MDA levels were markedly elevated ( $P < 0.05$ ). Expression levels of myosin, Nrf2, and Keap1 were all significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, myocardial fibers in the SVS group exhibited more regular distribution; serum SOD and GSH-Px activities were significantly increased ( $P < 0.05$ ), while MDA content was markedly decreased ( $P < 0.05$ ); expression levels of desmin, Nrf2,

作者简介: 赵文卿 (1979.09-), 女, 内蒙古巴彦淖尔人, 汉族, 研究生, 副主任医师, 从事心肌缺血再灌注损伤研究。

and Keap1 were all elevated ( $P<0.05$ ). No significant differences were observed in the SVS group for the aforementioned indicators ( $P>0.05$ ). Conclusion: SVS alleviates myocardial injury in MIRI model rats, exerting a cardioprotective effect. This mechanism may involve regulating the Nrf2-Keap1 signaling pathway to suppress oxidative stress and increase desmin expression.

**Keywords :** sacubitril valsartan sodium; myocardial ischemia-reperfusion injury; densin; oxidative stress

## 引言

急性心肌梗死作为冠心病最危重的临床表型之一, 及时实现缺血心肌的有效再灌注, 可显著缩小心肌梗死面积并改善心脏功能。然而, 血流再过程中往往伴随 MIRI 这一继发性损伤。结蛋白属于细胞骨架蛋白, 主要位于 Z 带与闰盘处, 对维持心肌细胞的形态结构起着重要作用。因此, 结蛋白的分布和含量状况能够反映出心肌再灌注后受损伤的严重程度。MIRI 引起代谢、功能、电生理方面及超微结构发生进一步的损伤<sup>[1]</sup>。在 MIRI 防治中, 西药优势显著, 并非传统认知的“作用单一”。机制上, 西药靶点精准、作用高效, 能针对氧自由基爆发、钙超载等关键病理环节, 通过明确分子通路快速干预, 阻断 MIRI 进展。疗效上, 有大量多中心随机对照试验支撑, 疗效参数明确且剂量-效应关系清晰, 可个体化调整, 还能通过监测血药浓度控风险。紧急救治时, 西药起效快, 如急诊 PCI 围手术期用药数分钟见效, 术后口服可持续保护, 降低并发症。虽植物药有多靶点潜力, 但机制、疗效证据不足, 西药仍是 MIRI 防治核心手段。

沙库巴曲缬沙坦钠 (Sacubitril/Valsartan Sodium, SVS) 是由沙库巴曲和缬沙坦以 1:1 摩尔比组成的复方制剂, 属于血管紧张素受体脑啡肽酶抑制剂 (ARNI) 类药物, 其药理作用涵盖抑制脑啡肽酶活性、阻断血管紧张素 II 1 型受体、调节肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS) 与利钠肽系统平衡、减轻心肌重构、改善血管弹性等多个方面。实验研究证实, SVS 对心力衰竭患者的心肌功能具有很好的改善作用, 能有效延缓心室重构进程, 降低心肌耗氧量; 临床也已证明 SVS 具有降低心血管死亡风险、减少心力衰竭住院率、改善患者运动耐量、缓解呼吸困难与乏力等临床症状, 以及降低高血压患者血压 (尤其适用于难治性高血压) 等多种药理性作用。本实验旨在观察 SVS 对 MIRI 模型大鼠心肌的保护作用及可能机制, 从而为临床防治 MIRI 提供科学有效的理论和实验依据。

## 一、实验材料和方法

### (一) 实验动物

清洁级 Sprague Dawley 大鼠 (体重 230-280 g), 购自北京斯贝福实验动物中心, 雌雄各半。饲养室环境温度为  $23\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 光照充足, 相对湿润环境。常规喂食、饮水, 实验前禁食 12 h。54 只实验动物随机分为三组 (18 只/组): (1) 假手术组: 动物进行 MIRI 手术, 但不结扎左冠状动脉前降支; (2) 模型组: 动物进行 MIRI 手术, 结扎左冠状动脉前降支闭塞缺血 30 min, 恢复血流再灌注 120 min; (3) SVS 组: 在 MIRI 手术再灌注 120 min 后灌胃 SVS (60 mg/kg)。

### (二) 实验试剂

SVS 购自北京四环科宝制药有限公司; 结蛋白 (货号: No. 16520-1-AP)、Nrf2 (货号: No. 33123-1-AP) 及 Keap1 (货号: No. 60027-1-Ig) 抗体购自美国 Proteintech 公司; 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色试剂盒 (货号: T8170)、超氧化物歧化酶 (货号: BC5165)、谷胱甘肽过氧化物酶 (货号: BC1195)、丙二醛 (货号: BC0025) 试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

### (三) MIRI 大鼠模型制作过程

实验前大鼠禁食 12 h, 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠麻醉。大鼠颈部备皮, 正中纵向皮肤切口, 钝性分离颈部肌肉及筋膜暴露气

管, 在甲状软骨下方剪一个倒“T”字型切口, 后进行气管插管并连接小动物呼吸机。采用 BL-420S 生物机能实验系统, 将电极插入大鼠四肢皮下从而引导出大鼠的标准 II 导联心电图, 持续记录大鼠心电图。大鼠第 3-4 肋间隙距胸骨左缘约 0.5 cm 处开胸, 剪开心包膜暴露心脏, 充分暴露左冠状动脉, 距离左心耳下方约 1-2 mm 处对左冠状动脉左前降支进针穿线, 进针深度约 1.5 mm, 宽度约 1.8 mm。结扎前降支缺血 30 min 内, 心室肌由鲜红逐渐变成白色, 然后逐渐变暗, 且心电图显示 ST 段弓背抬高  $> 0.1\text{ mV}$  以上或伴随 T 波抬高, 即为左前降支闭塞致左室前壁心肌缺血成功标志; 30 min 后松开结扎线, 观察到大鼠左室前壁心肌缺血区的暗色逐渐淡去, 且再灌注 20 min 内心电图 ST 段下降  $> 1/2$  幅度, 即为再灌注成功标志。

### (四) 标本的收集与制备

实验结束后, 动物腹腔注射 2% 戊巴比妥钠麻醉。抽取血液约 3 ml 注入 EP 管, 置于室温下 30 min, 3500 g 离心 10 min, 取上清, 用于血清 ELISA 检测。采血完毕后, 将心脏从胸腔取出并流水冲洗, 以结扎线作为标志, 去掉心房, 每组半数动物心脏用 4% 多聚甲醛固定 24 h, 用于组织学染色; 半数动物心脏置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱, 用于蛋白免疫印迹实验。

### (五) HE 染色

标本经梯度酒精脱水后, 二甲苯透明处理,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温浸蜡 6 h 以实现充分渗透, 随后进行石蜡包埋与组织切片。切片处理流程

为脱蜡水化,苏木素染色5min,清水冲洗3次;然后以1%盐酸酒精分化30s,清水冲洗3次;再经伊红染液染色6min,清水冲洗3次;后续通过梯度酒精脱水、二甲苯透明,用中性树脂封片,最终置于光镜下观察。

#### (六) 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

检测大鼠血清 SOD、GSH-Px、MDA 等理化指标,ELISA 操作步骤根据制造商(北京索莱宝科技有限公司)试剂盒说明书进行。

#### (七) 蛋白免疫印迹 (Western blot)

取心肌组织称重后放入 EP 管并加入 RIPA 蛋白裂解液,冰浴条件下超声波破碎4-5次,冰上孵育30min。低温离心机4℃ 12000 rpm 离心15 min,提取蛋白上清液后用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度并完成蛋白制样。配制浓缩胶和分离胶,进行 SDS-PAGE 蛋白电泳、电泳结束后蛋白转膜至 PVDF 膜上;5%脱脂奶粉室温封闭2 h 后进行漂洗;一抗4℃冰箱摇床孵育过夜,次日用 TBST 漂洗;加入二抗室温避光孵育2 h 后 TBST 漂洗;最后用成像分析系统对条带进行灰度值统计分析。

#### (八) 统计学处理方法

用 SPSS 20.0 对数据进行统计分析,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,两组之间比较用 t 检验,以  $P < 0.05$  认为差异具有显著性。

## 二、结果

### (一) SVS 对 MIRI 模型大鼠心电图的影响

通过将针形电极穿于大鼠四肢皮下,引出大鼠的标准 II 导联心电图,记录结扎大鼠左冠状动脉前降支之前正常心电图;结扎大鼠左冠状动脉前降支后的心电图显示,ST 段弓背抬高  $> 0.1$  mV 以上或伴随 T 波抬高;结扎大鼠左冠状动脉前降支 30 min 后再灌注心电图显示 ST 段骤降;给予 MIRI 模型大鼠 SVS 干预后,心电图趋于正常。

### (二) SVS 对心肌细胞形态的影响

假手术组大鼠心肌纤维形态结构正常,排列有序,未见肌纤维断裂、溶解;心室肌纤维着色均匀,无缺血、晕染及空泡现象;未见炎性细胞浸润。模型组大鼠心室肌纤维形态结构明显异常,排列无规律、心室肌细胞边界模糊欠清,部分肌纤维异常肿胀,并且局部区域可见局灶性肌纤维断裂、溶解、坏死;胞浆染色变浅,肌浆内亦出现空泡样现象;并且可以见到大量的炎性细胞浸润。SVS 组,其心室肌病理改变明显改善,心室肌纤维排列尚规律有序,肌纤维表现为轻度肿胀,胞浆内染色略淡,并可以观察到少数的炎性细胞浸润,明显优于模型组。

### (三) SVS 对 MIRI 模型大鼠血清氧化应激标志物的影响

实验结果可见:模型组实验动物与假手术组实验动物相比,其血清中 MDA 含量呈显著性上升 ( $P < 0.05$ ),而 GSH-Px、SOD 的活性均呈显著性降低 ( $P < 0.05$ );SVS 组实验动物与模型组实验动物相比血清中 GSH-Px、SOD 的活性均呈显著性上升 ( $P < 0.05$ ),而 MDA 的含量明显降低 ( $P < 0.05$ )。

### (四) SVS 对 MIRI 模型大鼠心肌组织结蛋白、Nrf2、Keap1 及 NQO1 表达量的影响

WB 结果显示:模型组实验动物心肌组织中结蛋白、Nrf2、Keap1 及 NQO1 蛋白表达量与假手术组相比均显著降低 ( $P < 0.05$ );而与模型组实验动物相比,SVS 组实验动物心肌组织结蛋白、Nrf2、Keap1 及 NQO1 蛋白表达量均显著升高 ( $P < 0.05$ )。

## 三、讨论

流行病学统计学数据表明,缺血性心脏病患者在经历再灌注治疗后依然有较高比例的心功能异常、心肌损伤甚至是死亡事件发生,严重影响患者预后<sup>[2]</sup>。如何防治 MIRI 带来的严重后果,改善心肌细胞正常形态与心肌机械功能,提高心肌的缺氧耐受性和细胞存活具有重要意义<sup>[3]</sup>。本实验中采用的大鼠 MIRI 造模方式,心电图 ST 段弓背抬高且伴随 T 波抬高,再灌注后 ST 段骤降,心室肌出现大面积梗死灶,心室肌细胞形态结构受到严重破坏,综合以上结果得出,该造模方式可成功诱导心肌缺血再灌注损伤,为后续药效作用的研究奠定基础。本研究对 MIRI 模型大鼠给予 SVS 处理,心电图、TTC 染色及心肌细胞形态均得以改善,表明 SVS 对 MIRI 具有显著的改善作用,但具体作用机制需要进一步阐明。

前期研究认为,结蛋白可作为心肌缺血早期的有效指标。有研究团队通过构建结蛋白基因敲除小鼠模型开展实验,结果显示,当结蛋白缺失时,心肌细胞会出现超微结构的病理性异常,同时伴随心肌细胞凋亡现象,最终导致心肌机械功能障碍。这一结果直接表明,结蛋白是维持心肌细胞超微结构完整性、保障心肌正常机械功能的关键必需蛋白。胡丙杰等<sup>[4]</sup>发现,大鼠急性心肌缺血 15 min 结蛋白即可在缺血区心肌呈小灶性缺失,随缺血时间延长缺失范围逐步扩大。本研究显示,模型组结蛋白表达量显著降低,SVS 可以显著阻断 MIRI 导致的结蛋白表达量降低,表明 SVS 一定程度上可以改善 MIRI 引起的心肌细胞结构异常以及心肌机械功能障碍,对维持心肌细胞正常形态与机械功能具有重要的作用。

既往研究显示,氧化应激与 MIRI 密切相关。心肌细胞的氧化应激和凋亡被认为是 MIRI 的标志。本研究结果显示, MIRI 模型大鼠血清 SOD、GSH-Px 的活性显著降低,而 MDA 含量显著增高,表明心肌缺血后复灌引起了机体氧化应激反应,而 SVS 可以一定程度上阻断 MIRI 诱导的氧化应激反应,这与既往文献报道 SVS 的抗氧化应激药效机制相一致。既往研究表明, Nrf2/HO-1/NQO1 信号通路具备抗氧化应激、改善能量代谢的功能,能够有效缓解心肌损伤。Nrf2 作为该信号通路的核心转录因子,在生理稳态下主要定位于细胞质;当心肌细胞遭遇氧化应激刺激时, Nrf2 会向细胞核内转移,进而诱导下游靶基因(如 HO-1、NQO1)的表达。其中, HO-1 作为关键的抗氧化酶,可通过降解毒性代谢产物以减轻机体氧化应激状态。NQO1 则通过参与氧化还

原反应，降低氧化应激对心肌细胞的损伤。本研究显示，模型组 Nrf2、HO-1、NQO1 表达量显著降低，SVS 干预可以显著阻断 MIR1 导致的 Nrf2、HO-1、NQO1 表达量降低，表明 SVS 可能通过 Nrf2/HO-1/NQO1 信号通路改善 MIR1 引起的氧化应激损伤，

发挥保护心肌细胞与维持心肌正常机械功能的作用。本实验结果仅能揭示 SVS 保护心肌细胞与维持心肌正常机械功能可能与调控 Nrf2/HO-1/NQO1 信号通路抑制氧化应激损伤相关，确切的药效作用机制有待进一步探索研究。

## 参考文献

- [1] 郑小宇, 王威. 沙库巴曲缬沙坦钠治疗心肌缺血再灌注损伤的机制研究进展 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2024, 32 (07): 135-140.
- [2] 王龙, 马磊, 黄燕, 等. 杨梅素对心肌缺血再灌注损伤大鼠血红素加氧酶 1 表达的影响 [J]. 西部中医药, 2021, 34(04): 5-10.
- [3] 胡丙杰, 陈玉川, 祝家镇, 等. 实验性早期心肌缺血结蛋白的免疫组织化学研究 [J]. 法律与医学杂志, 1998, 5(4): 148-150.