



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111481535 B

(45) 授权公告日 2023.01.10

(21) 申请号 202010273573.7

A61P 9/00 (2006.01)

(22) 申请日 2020.04.09

A61P 9/04 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

审查员 李圩田

申请公布号 CN 111481535 A

(43) 申请公布日 2020.08.04

(73) 专利权人 西北大学

地址 710069 陕西省西安市太白北路229号

(72) 发明人 郑晓晖 杨阳 齐亚婷 杨雯雯

姬婷 白亚军

(74) 专利代理机构 西安恒泰知识产权代理事务

所 61216

专利代理师 史玫

(51) Int. Cl.

A61K 31/216 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图11页

(54) 发明名称

IDHP用于制备抗败血症及其诱发的心肌损伤药物的应用

(57) 摘要

本发明公开了IDHP用于制备治疗和/或预防败血症及其诱发的心肌损伤药物的应用。本发明研究发现IDHP可抑制败血症引起的生存率下降、降低WBC、LYM、MON、GRA和LDH的水平；同时，IDHP也能抑制败血症诱发的心肌组织损伤后髓过氧化物酶、Ly6C的高表达和心肌细胞凋亡，发挥抗炎、抗凋亡的作用；并且，还发现IDHP具有改善心脏收缩功能的作用。

1. 丹参素异丙酯用于制备治疗和/或预防败血症药物的应用。
2. 如权利要求1所述的应用,其特征在於,所述药物为静脉注射给药制剂。
3. 如权利要求1所述的应用,其特征在於,所述药物的给药剂量为每千克体重15mg-60mg丹参素异丙酯。
4. 丹参素异丙酯用于制备治疗和/或预防败血症诱发的心肌损伤药物的应用。

## IDHP用于制备抗败血症及其诱发的心肌损伤药物的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及IDHP的新适应症,具体涉及IDHP用于抗败血症及其诱发的心肌损伤药物的应用。

### 背景技术

[0002] 丹参素异丙酯(IDHP)是从申请人团队从复方丹参方的众多代谢产物及其系列改性物中筛选出来的效应成分,进一步结合现代药物化学和药理学技术合成的一个化合物。研究表明,IDHP具有扩张血管等活性作用。

### 发明内容

[0003] 发明人通过构建败血症及其诱发的心肌损伤动物模型,观察其生存率、血常规、炎症及心肌损伤各项指标发现:

[0004] IDHP可抑制败血症引起的生存率下降、降低血浆白细胞(White Blood Cell, WBC)、淋巴细胞(Lymphocyte,LYM)、巨噬细胞(Macrophages,MON)、中性粒细胞(Granulocyte,GRA)、和乳酸脱氢酶(Lactate Dehydrogenase,LDH)的水平;

[0005] 同时,IDHP也能抑制败血症诱发的心肌组织损伤后髓过氧化物酶(MPO)、Ly6C的高表达和心肌细胞凋亡,发挥抗炎、抗凋亡的作用;

[0006] 并且,IDHP可提高由败血症引起的左心室收缩末期容积(Volume;s)、左心室舒张末期容积(Volume;d)、每搏输出量(Stroke Volume)、心输出量(Cardiac Output)的降低;改善左心室收缩末期后壁厚度(LVPW;s)、左心室舒张末期后壁厚度(LVPW;d)的增加。从而达到改善心脏收缩功能的作用。

[0007] 基于上述发现,本发明提供了IDHP用于制备治疗和/或预防败血症及其诱发的心肌损伤药物的应用。

[0008] 同时提供一种治疗和/或预防败血症药物,所述药物由IDHP和药物辅料制备而成。

[0009] 进一步,所述药物为静脉注射给药制剂。

[0010] 更进一步,所述药物的给药剂量为每千克体重15mg-60mg IDHP。

### 附图说明:

[0011] 图1为IDHP的化学结构式;

[0012] 图2为IDHP对CLP损伤后小鼠生存率的影响,观察CLP术后72h内各组小鼠的生存情况,结果以均数±标准差表示,n=12。\*vs.Sham组,P<0.05;#vs.CLP组,P<0.05;

[0013] 图3为IDHP对CLP损伤24h后小鼠血常规和LDH各项指标的影响,其中,A图为血常规结果;B图为LDH结果;结果以均数±标准差表示,n=6;\*vs.Sham组,P<0.05;#vs.CLP组,P<0.05,LDH,乳酸脱氢酶;

[0014] 图4为IDHP对CLP损伤10h后心脏功能各项指标的影响,A图为超声心动图短轴切面、M模典型图片以及各项心脏功能指标的统计分析图;B图为超声心动图长轴切面、M模典

型图片以及各项心脏功能指标的统计分析图;结果以均数±标准差表示,n=6,\*vs.Sham组,P<0.05;#vs.CLP组,P<0.05;左心室舒张收缩容积;左心室舒张末期容积;每搏输出量;心输出量;左心室收缩末期后壁厚度;左心室舒张末期后壁厚度;

[0015] 图5为IDHP对CLP损伤24h后心肌炎症相关指标的影响,炎症相关典型指标Ly6c、MPO的免疫组织化学染色结果及统计分析图;结果以均数±标准差表示,n=4,\*vs.Sham组,P<0.05;#vs.CLP组,P<0.05;

[0016] 图6为IDHP对CLP损伤24h后心肌组织氧化应激指标的影响,心肌组织DHE染色结果及统计分析图;结果以均数±标准差表示,n=4.\*vs.Sham组,P<0.05;#vs.CLP组,P<0.05,DHE,超氧化物阴离子荧光探针;

[0017] 图7为IDHP对CLP损伤24h后心肌组织形态的影响,心肌组织切片HE染色结果;

[0018] 图8为IDHP对CLP损伤24h后心肌线粒体功能指标的影响,免疫印迹实验结果及统计分析图;结果以均数±标准差表示,n=4,\*vs.Sham组,P<0.05;#vs.CLP组,P<0.05;

[0019] 图9为IDHP对CLP损伤24h后相关心肌保护信号通路的影响,免疫印迹实验结果及统计分析图;结果以均数±标准差表示,n=4,\*vs.Sham组,P<0.05;#vs.CLP组,P<0.05。

### 具体实施方式

[0020] “败血症”是指各种致病菌侵入血液循环,并在血中生长繁殖,产生毒素而发生的急性全身性感染。其症状多为急性起病、寒战、高热、呼吸急促、心动过速,以及皮疹、关节肿痛、肝脾肿大和精神、神志改变等。严重者可出现急性器官功能障碍,称之为重型败血症。病情进一步加重后可发展为感染性休克、弥散性血管内凝血(DIC)和多器官功能衰竭。

[0021] 盲肠结扎穿孔(Cecal Ligation and Puncture,CLP)动物模型是经典的败血症动物模型,本发明采用CLP动物模型为研究对象,根据现有技术研究,该类动物模型可造成急性心肌损伤,急性肺损伤,即败血症诱发的心肌损伤。

[0022] 败血症诱发的心肌损伤属于感染性心肌损伤的一种。感染性心肌损伤指病毒感染过程中或恢复期中出现的如心脏扩大、心力衰竭、心源性休克或心律异常等心肌损伤,典型的症状为疲乏无力、食欲不振、恶心、呕吐、呼吸困难、面色苍白,发热。

[0023] 本发明所述的感染性心肌损伤,特别是指细菌性心内膜炎、系统性或者其他脏器感染所致菌血症导致的心肌炎性病变和系统性或者其他脏器感染所致脓毒症导致的心肌炎性病变。临床上多用肾上腺皮质激素和广谱抗生素,防止菌群失调。在应用过程中严加观察,特别注意有无消化道、泌尿道和呼吸道的真菌感染。

[0024] 本发明所述药物辅料是药物制剂在制备或调配过程中所必需的、除主要以外的物质。一般要求这些物质无生理活性,不影响药物制剂中药物疗效、含量测定和稳定性。加入辅料的主要目的是方便制剂的制备和临床应用。

[0025] 以下通过实施例对本发明做进一步的阐述。实施例是对本发明进行详细说明,但本发明并不受这些的任何限定。

[0026] 需要说明的是,以下实验所用的丹参素异丙酯(IDHP)是申请人团队从复方丹参方的众多代谢产物中筛选出的活性成分,其结构式如图1所示。纯度为HPLC≥98%。所用动物购自第四军医大学实验动物中心,所用试剂为市场采购。如无特殊说明,以下实施例中所采用的实验方法或相关检测方法采用本领域已知方法。

[0027] 实施例1:发明人研究发现IDHP能够改善败血症引起的小鼠死亡。

[0028] 方案:

[0029] 采用CLP手术,于在体水平上构建败血症模型,给与IDHP预保护。

[0030] 步骤:

[0031] 使用野生型C57BL/6N小鼠作为研究对象,按照研究设计,用随机数字表法进行随机分组,小鼠感染性心肌损伤模型按照Rittirsch D等发表的CLP实验方法,复制重度感染性心肌损伤模型。具体实验步骤如下:

[0032] (1) 采用小动物吸入麻醉系统-VMC对小鼠进行麻醉:小鼠吸入含异氟烷2% (体积分数vol/vol)的氧气,流量为0.3L/min,麻醉程度监测标准为非缺血肢体的撤回反射消失,将小鼠固定并持续吸入含异氟烷2%的氧气维持麻醉;

[0033] (2) 小鼠腹正中区域备皮,75%乙醇消毒皮肤两次,延中下腹部正中行纵切口1cm,逐层切开分离皮肤、皮下组织,见腹白线,延腹白线切开腹直肌及腹膜,切口两侧用0.9%生理盐水湿润,用弯镊进腹,找到盲肠后轻柔牵出,将靠近回盲瓣处的粪便轻柔挤向盲肠末端(避免空气残留),在盲肠末端至回盲瓣连线上三分之一处用1号无菌手术缝线结扎盲肠,在结扎线与盲肠末端中点处用22G针头对穿已结扎肠(避开血管),穿孔后轻轻挤压盲肠,可见结扎段盲肠内容物顺穿孔流出,将盲肠连同周围所有肠管还纳入腹腔。用3号无菌手术缝线逐层间断缝合腹膜及皮肤;

[0034] (3) 术毕,所有实验小鼠均于术后立即背部皮下注射37℃生理盐水(10ml/kg体重)进行液体复苏,妥善标记后放回鼠笼,等待自由苏醒。假手术组(n=12)除不进行盲肠结扎穿孔外,其余步骤与实验组相同;

[0035] (4) 给药:60只C57BL/6N小鼠分为5组,每组12只,使用DMSO溶解IDHP制成剂量分别为15mg/kg、30mg/kg、60mg/kg的IDHP溶液,按照1ml/kg的浓度进行给药;手术前6天进行预保护处理(腹腔注射),对照组、CLP组给与DMSO,保护组给与不同剂量的IDHP,每隔一天给药一次,第7天进行CLP手术处理,术后立即皮下注射一次,确保每次给药的时间段和手术时间相同;

[0036] (5) 观察并统计72h内小鼠生存率:CLP手术处理后开始计时,每12h观察一次,记录72h内各个分组小鼠死亡数量及状态的变化,最后进行生存率分析;

[0037] (6) 根据各组生存率结果,确定IDHP最佳保护浓度,筛选确定出最佳保护浓度后,同上进行动物实验所取得的标本进行后续检测。

[0038] 结果:

[0039] 小鼠生存率曲线如图2所示,与对照组相比,CLP处理后,小鼠72h内生存率为0 ( $P < 0.05$ ),与CLP组相比,IDHP (15mg/kg) 处理后小鼠生存率约为15% ( $P < 0.05$ ),IDHP (30mg/kg) 处理后小鼠生存率约为70% ( $P < 0.05$ ),IDHP (60mg/kg) 处理后,小鼠生存率约为75% ( $P < 0.05$ ),提示IDHP可以提高小鼠CLP后的生存率,且IDHP最佳保护浓度为60mg/kg。

[0040] 实施例2:发明人研究发现IDHP能减轻败血症及其诱发的心肌损伤,减少细胞凋亡。

[0041] 方案:

[0042] 采用CLP手术,于在体水平上构建败血症及其诱发的心肌损伤模型,给与IDHP处理。

[0043] 步骤:

[0044] (1) 检测CLP手术24h后小鼠血常规的变化以及LDH的释放:损伤24h时,小鼠眼睑取血,每组的血浆分为2部分,一部分采用全自动生化分析仪进行血常规检测,另一部分用于检测LDH水平。LDH检测步骤为:收集每组血浆,3000r/min,离心10min,吸取上清,随后严格按照乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(微板法)进行操作(南京建成生物工程研究所有限公司),最后使用酶标仪进行检测。

[0045] (2) 免疫组织化学检测:

[0046] 石蜡包埋:心尖部缓慢注入含肝素生理盐水,右心耳流出的液体变为透明时,将灌注液体替换为4%多聚甲醛固定液;多聚甲醛组织固定成功后,沿心脏根部剪断各血管,完整取下心脏。将心脏放入4%多聚甲醛中,进行后固定至少24h;石蜡包埋、切片与脱蜡(按照顺序依次在30%、50%、70%、80%、95%、95%、100%乙醇中浸泡40min,再按照100%乙醇、100%乙醇/二甲苯1:1混合液、二甲苯浓度梯度浸泡30min进行组织脱水透明;按照二甲苯/软蜡1:1 30min、软蜡55min、硬蜡50min顺序进行组织透蜡包埋;

[0047] 切片:设置切片厚度为5 $\mu$ m,使用捞片法将切片贴于多聚赖氨酸覆膜载玻片上,70 $^{\circ}$ C烤片1h后,60 $^{\circ}$ C烤片5h;

[0048] 染色:切片常规脱蜡至水;分别取各组小鼠心脏组织石蜡切片依次经二甲苯2次,每次10min,100%乙醇2次、每次10min;95%、90%、80%、70%乙醇各1次,每次5min,最后浸入蒸馏水中,5min;抗原修复:柠檬酸钠缓冲液微波抗原修复20min;流水冲洗10min;阻断内源性过氧化物酶:5%双氧水-甲醇,室温15min。PBS洗3次,每次5min;封闭:滴加10%正常山羊血清封闭液,室温孵育60min;滴加一抗:擦去多余血清,加一抗,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。PBS洗3次,每次5min;滴加辣根过氧化物酶HRP标记的二抗(1:5000,PBS配制),37 $^{\circ}$ C温箱内孵育1h;PBS洗3次,每次5min;DAB显色:滴加DAB 0.5-3min,镜下控制显色程度;流水冲洗10min;苏木素复染,1%盐酸酒精分化,1%氨水脱色,脱水,经二甲苯透明后用中性树胶封片;显微镜下观察并拍照,光镜下组织切片呈棕黄色颗粒性沉积区域为阳性染色部位,每张切片随机找出20-30个不重叠视野,采用医学图象分析软件Image-Pro Plus 6.0软件半定量计算,以每个高倍视野下阳性表达的积分光密度表示阳性物质的相对含量。

[0049] (3) 心肌组织HE染色:

[0050] 将切片置于二甲苯中浸泡10min,更换二甲苯再次浸泡10min,按照100%、100%、95%、95%、80%、70%、50%、30%乙醇、去离子水的顺序依次浸泡2min脱蜡至水,以备染色。);心肌组织HE染色(将切片浸入苏木素染液染色3min,使用自来水轻柔冲洗5min;浸入1%盐酸乙醇30s,1%氨水10s脱色,使用自来水轻柔冲洗6min;浸入伊红染液染色1min,使用自来水轻柔冲洗6min;按照70%、80%浓度乙醇30s,95%、95%、95%、100%、100%浓度梯度乙醇、二甲苯、二甲苯分别浸泡2min进行脱水透明处理;中性树胶封片。)

[0051] 结果:

[0052] 小鼠血常规检测:首先检测了CLP处理24h后血常规相关指标的变化,如图3A,与对照组相比,WBC、MON、GRA显著上升( $P<0.05$ ),而IDHP处理后WBC、MON、GRA、LYM均显著下降( $P<0.05$ ),但是对RBC和PLT无显著影响( $P>0.05$ );

[0053] 小鼠血清心肌损伤指标LDH检测,如图3B:与对照组相比较,CLP损伤24h后,血清中LDH水平均显著上升,给与IDHP处理后,LDH水平出现明显下降( $P<0.05$ )。

[0054] 小鼠心肌组织IHC染色结果显示,如图5,对Ly6c和MPO进行染色,与对照组相比较,CLP损伤后Ly6c和MPO均显著上升,IDHP处理后其表达量下降( $P<0.05$ )

[0055] 小鼠心肌组织HE染色结果显示,如图7,与对照组相比,CLP损伤后心肌组织结构紊乱,视野内细胞核数量显著增加,肌细胞间微血管单核细胞浸润增加( $P<0.05$ );与CLP损伤组相比,给与IDHP后HE染色可见心肌组织结构相对清晰,视野内细胞核数量减少( $P<0.05$ ),肌细胞间微血管单核细胞浸润减少。

[0056] 实施例3:发明人研究发现IDHP通过减轻心肌组织氧化应激反应,改善感染性CLP引起的心肌损伤。

[0057] 方案:

[0058] 采用CLP手术,于在体水平上构建败血症及其诱发的心肌损伤模型,给与IDHP处理。

[0059] 步骤:

[0060] DHE染色:

[0061] 石蜡包埋:心尖部缓慢注入含肝素生理盐水,右心耳流出的液体变为透明时,将灌注液体替换为4%多聚甲醛固定液;多聚甲醛组织固定成功后,沿心脏根部剪断各血管,完整取下心脏。将心脏放入4%多聚甲醛中,进行后固定至少24h;石蜡包埋、切片与脱蜡(按照顺序依次在30%、50%、70%、80%、95%、95%、100%乙醇中浸泡40min,再按照100%乙醇、100%乙醇/二甲苯1:1混合液、二甲苯浓度梯度浸泡30min进行组织脱水透明;按照二甲苯/软蜡1:1 30min、软蜡55min、硬蜡50min顺序进行组织透蜡包埋;

[0062] 切片:设置切片厚度为5 $\mu$ m,使用捞片法将切片贴于多聚赖氨酸覆膜载玻片上,70 $^{\circ}$ C烤片1h后,60 $^{\circ}$ C烤片5h;

[0063] 染色:将切片置于二甲苯中浸泡10min,更换二甲苯再次浸泡10min,按照100%、100%、95%、95%、80%、70%、50%、30%乙醇、去离子水的顺序依次浸泡2min脱蜡至水,以备染色。脱蜡结束后,使用DHE染色液于37 $^{\circ}$ C下孵育30min,经过适当洗涤后,荧光显微镜下观察并拍照,荧光显微镜下组织切片呈红色荧光阳性染色部位,每张切片随机找出20-30个不重叠视野,采用医学图象分析软件Image-Pro Plus 6.0软件半定量计算,以每个高倍视野下阳性表达的积分光密度表示阳性物质的相对含量。

[0064] 结果:

[0065] 小鼠心肌组织DHE染色结果显示,如图6,与对照组相比较,CLP损伤后红色荧光部位显著增多,且红色荧光强度显著增强,IDHP处理后其荧光部位显著减少,荧光强度明显下降( $P<0.05$ )。

[0066] 实施例4:发明人研究发现IDHP可以改善心肌损伤引起的心肌功能损伤

[0067] 方案:

[0068] 采用CLP手术,于在体水平上构建败血症及其诱发的心肌损伤模型,给与IDHP处理。

[0069] 步骤:

[0070] 小动物超声检测CLP手术10h后小鼠心脏功能:CLP处理10h后,小鼠再次经过2%异氟烷麻醉,异氟烷吸入麻醉后固定于37 $^{\circ}$ C恒温加热板上,充分暴露左侧胸廓,采用30MHz探头,选取标准心尖四腔切面及标准左心室乳头肌短轴切面,记录M模心脏超声切面图像,包

括左室收缩末期容积、左室舒张末期容积、每搏输出量、心输出量、左室收缩末期后壁厚度、左室舒张末期后壁厚度等。

[0071] 在检测过程中应该注意以下几点可能影响检测结果的细节：第一，麻醉状态不可以过深，否则会影响小鼠的心率和收缩功能；第二，小鼠的体位要摆好，四肢不可固定地过伸过紧，否则会压迫小鼠心脏，最终影响心功能检测的准确性；第三，小鼠靠近心脏部分至少提前一天进行脱毛处理，脱毛太早会导致检测时生出新毛发，成像时生成伪影，影响超声结果，太晚则使小鼠处于应激状态干扰心功能结果。

[0072] 结果：

[0073] 小动物超声检测CLP手术24h后小鼠心脏功能，结果如图4A、4B，与对照组相比，小鼠心脏的左室收缩末期容积、左室舒张末期容积、每搏输出量、心输出量显著下降，给与IDHP保护后，心功能明显改善。以及与对照组相比，小鼠左室收缩末期后壁厚度、左室舒张末期后壁厚度明显变厚，给与IDHP保护后，心功能明显改善。

[0074] 实施例5：发明人研究发现IDHP通过维护线粒体功能，改善感染性心肌损伤损伤引起的心肌损伤。

[0075] 方案：

[0076] 采用CLP手术，于在体水平上构建败血症及其诱发的心肌损伤模型，给与IDHP处理。

[0077] 步骤：

[0078] (1) 总蛋白提取

[0079] 剪取各组小鼠的心脏组织并称重，按照10 $\mu$ l/mg加入RIPA裂解液，剪碎心肌组织，置于匀浆器内充分研磨，后经超声破膜处理。整个操作过程置于冰上进行；4 $^{\circ}$ C，20000r，离心20min。留取部分上清液用BCA蛋白定量试剂盒(Thermo)进行蛋白定量；蛋白上清与等量上样Buffer混合，煮沸5min，10000g离心10min，取上清，分装蛋白样品。

[0080] (2) BCA蛋白定量

[0081] 取各个稀释浓度的蛋白质标准品和待测蛋白质样品各25 $\mu$ l加入到96孔板中；在每一个孔中加入200 $\mu$ l工作液，并在震荡器上震荡30s，使其充分混合；将96孔板密封，37 $^{\circ}$ C孵育30min；将96孔板冷却到室温，使用微孔板读数仪，测量样品在562nm或该波长附近的吸光值，根据标准曲线计算蛋白浓度。

[0082] (3) Western Blot

[0083] 取等量蛋白样品进行SDS-PAGE电泳，待溴酚蓝到达分离胶底端后，结束电泳；电泳完成后，甲醇激活PVDF膜10s，放置于转膜缓冲液(转移缓冲液：3.03g Tris碱，14.41g甘氨酸，200ml甲醇，加去离子水定容至1L，pH 8.3-8.4)中。将SDS-PAGE移置于转移电泳槽内，制备转印蛋白夹层，冰浴条件下将蛋白样品转移至PVDF膜上；TBST(10mM Tris, 150mM NaCl, and 0.1% Tween-20)漂洗5-10min；5%脱脂奶粉室温封闭1h；去除封闭液，将PVDF膜分别与兔抗小鼠的UCP2(解偶联蛋白2)抗体(1:1000稀释)、NRF1(核呼吸因子1)抗体(1:1000稀释)和GAPDH抗体(1:1000稀释)4 $^{\circ}$ C孵育过夜；TBST洗涤3次，每次5-10min；使用合适浓度的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记山羊抗兔二抗(1:1000稀释)37 $^{\circ}$ C孵育1h，TBST漂洗5-10min；ECL发光液，凝胶成像系统进行化学发光成像，Quantity One System程序对条带进行定量分析。



[0084] 结果:

[0085] 检测CLP-24h时小鼠心脏组织蛋白变化。结果如图8所示,与对照组相比,CLP-24h后小鼠心脏组织中UCP2、NRF1蛋白水平显著下调( $P<0.05$ ),给与IDHP保护后蛋白水平显著上调( $P<0.05$ )。

[0086] 实施例6:发明人研究发现通过激活SIRT1/PGC-1 $\alpha$ 信号通路,可以改善感染性心肌损伤损伤引起的心肌损伤。

[0087] 方案:

[0088] 采用CLP手术,于在体水平上构建败血症及其诱发的心肌损伤模型,给与IDHP处理。

[0089] 步骤:

[0090] (1) 总蛋白提取

[0091] 剪取各组小鼠的心脏组织并称重,按照10 $\mu$ l/mg加入RIPA裂解液,剪碎心肌组织,置于匀浆器内充分研磨,后经超声破膜处理。整个操作过程置于冰上进行;4 $^{\circ}$ C,20000g,离心20min。留取部分上清液用BCA蛋白定量试剂盒(Thermo)进行蛋白定量;蛋白上清与等量上样Buffer混合,煮沸5min,10000g离心10min,取上清,分装蛋白样品。

[0092] (2) BCA蛋白定量

[0093] 取各个稀释浓度的蛋白质标准品和待测蛋白质样品各25 $\mu$ l加入到96孔板中;在每一个孔中加入200 $\mu$ l工作液,并在震荡器上震荡30s,使其充分混合;将96孔板密封,37 $^{\circ}$ C孵育30min;将96孔板冷却到室温,使用微孔板读数仪,测量样品在562nm或该波长附近的吸光值,根据标准曲线计算蛋白浓度。

[0094] (3) Western Blot

[0095] 取等量蛋白样品进行SDS-PAGE电泳,待溴酚蓝到达分离胶底端后,结束电泳;电泳完成后,甲醇激活PVDF膜10s,放置于转膜缓冲液(转移缓冲液:3.03g Tris碱,14.41g甘氨酸,200ml甲醇,加去离子水定容至1L,pH 8.3-8.4)中。将SDS-PAGE移置于转移电泳槽内,制备转印蛋白夹层,冰浴条件下将蛋白样品转移至PVDF膜上;TBST(10mM Tris,150mM NaCl, and 0.1% Tween-20)漂洗5-10min;5%脱脂奶粉室温封闭1h;去除封闭液,将PVDF膜分别与兔抗小鼠的SIRT1抗体(1:1000稀释)、PGC-1 $\alpha$ 抗体(1:1000稀释)和GAPDH抗体(1:1000稀释)4 $^{\circ}$ C孵育过夜;TBST洗涤3次,每次5-10min;使用合适浓度的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记山羊抗兔二抗(1:1000稀释)37 $^{\circ}$ C孵育1h,TBST漂洗5-10min;ECL发光液,凝胶成像系统进行化学发光成像,Quantity One System程序对条带进行定量分析。

[0096] 结果:

[0097] 检测CLP-24h时小鼠心脏组织蛋白变化。结果如图9所示,与对照组相比,CLP-24h后小鼠心脏组织中SIRT1、PGC-1 $\alpha$ 蛋白水平显著下调( $P<0.05$ ),给与IDHP保护后蛋白水平显著上调( $P<0.05$ )。

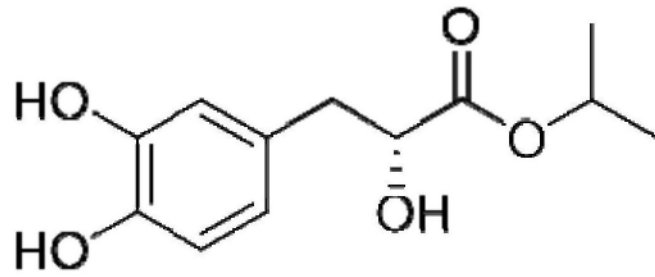


图1

### 72 h survival analysis of mice induced by CLP

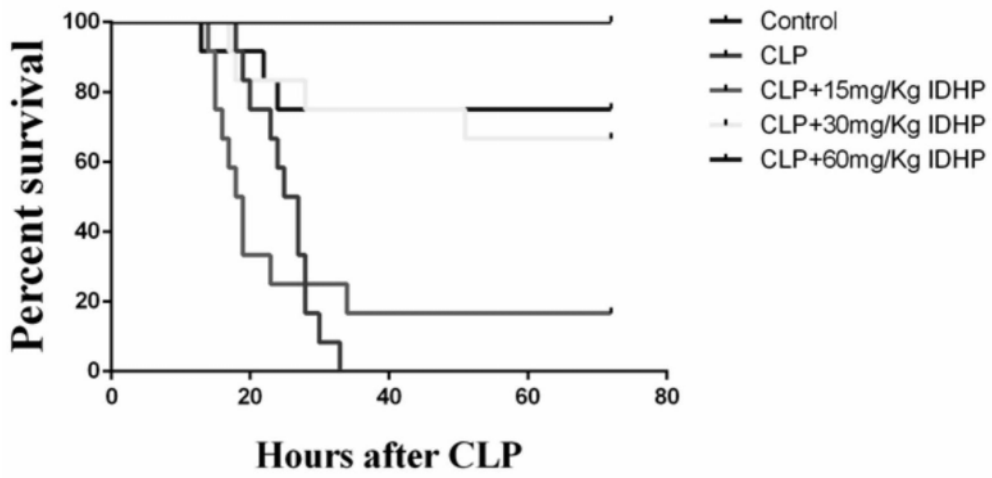


图2

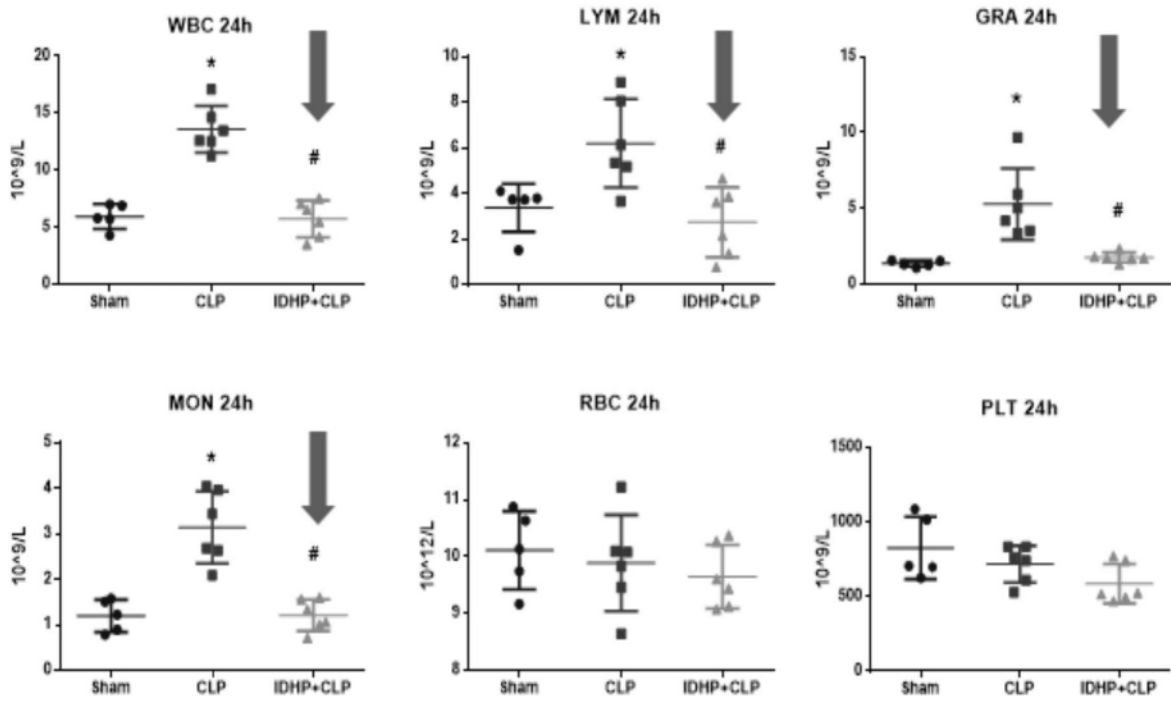


图3A

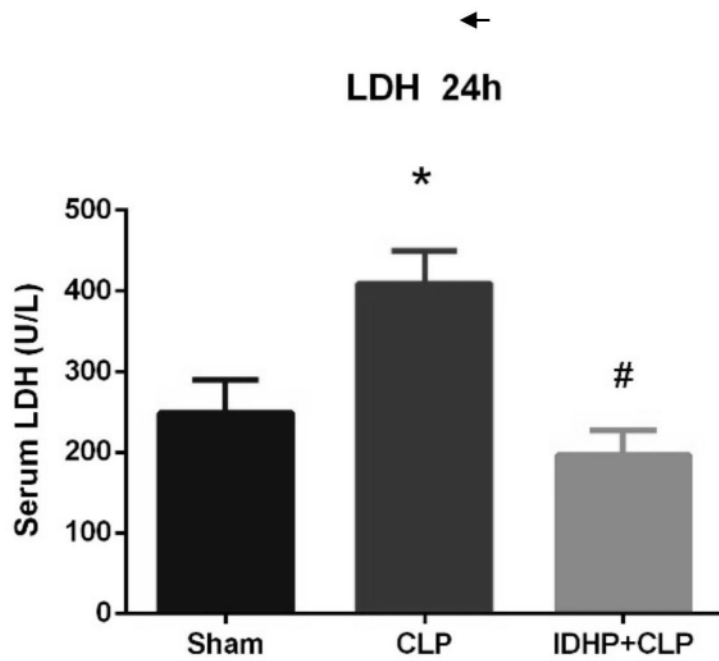


图3B

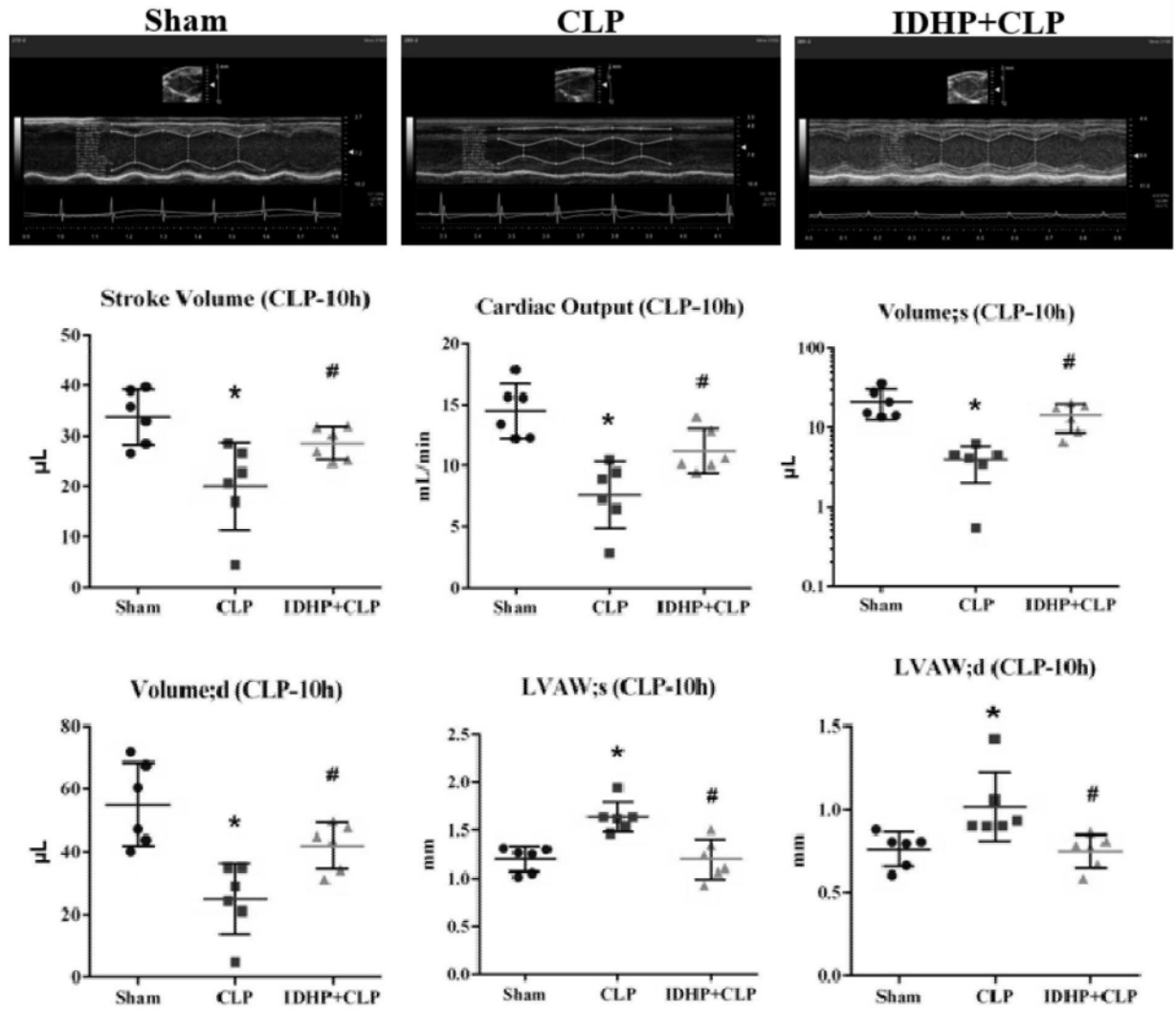


图4A

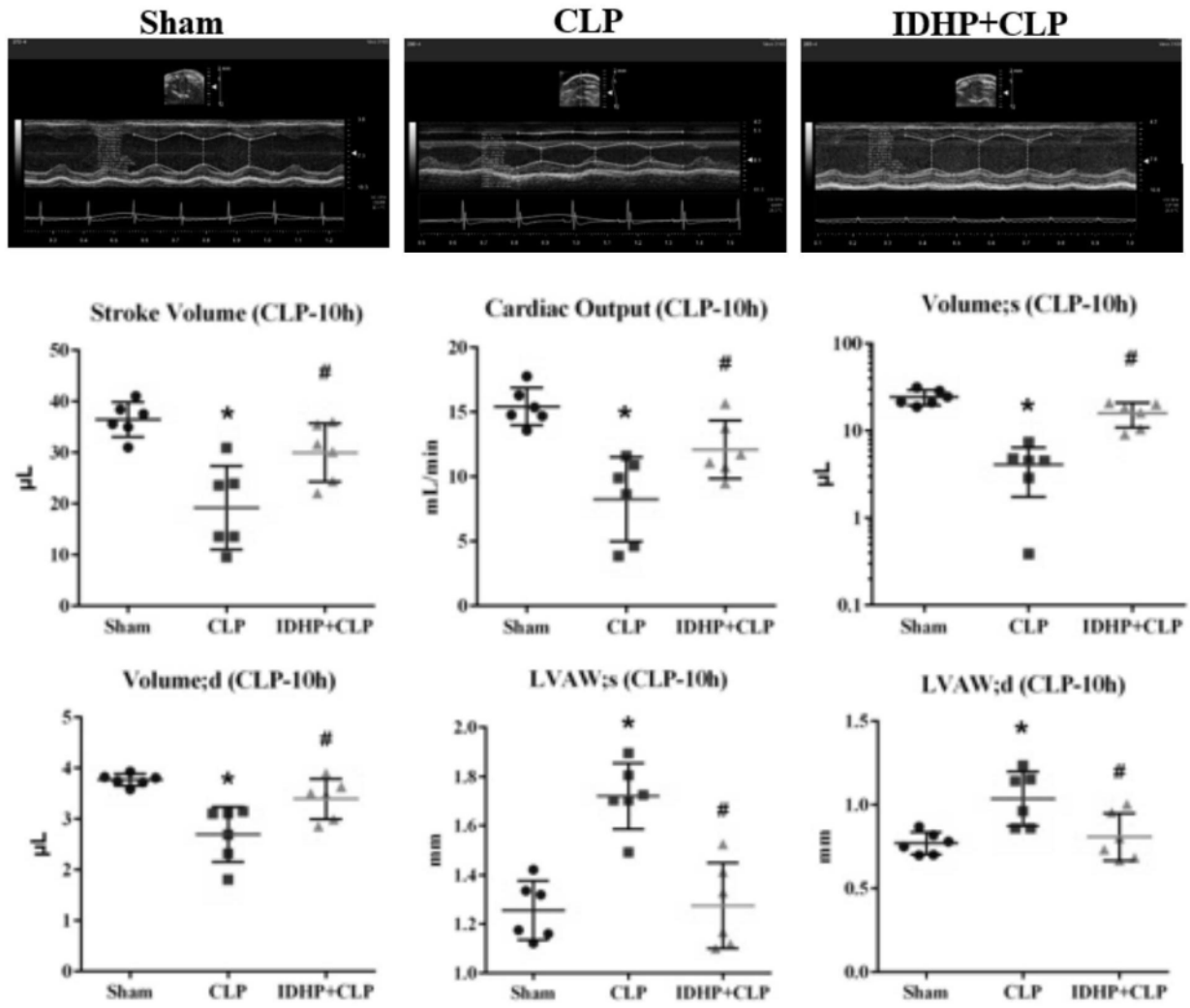
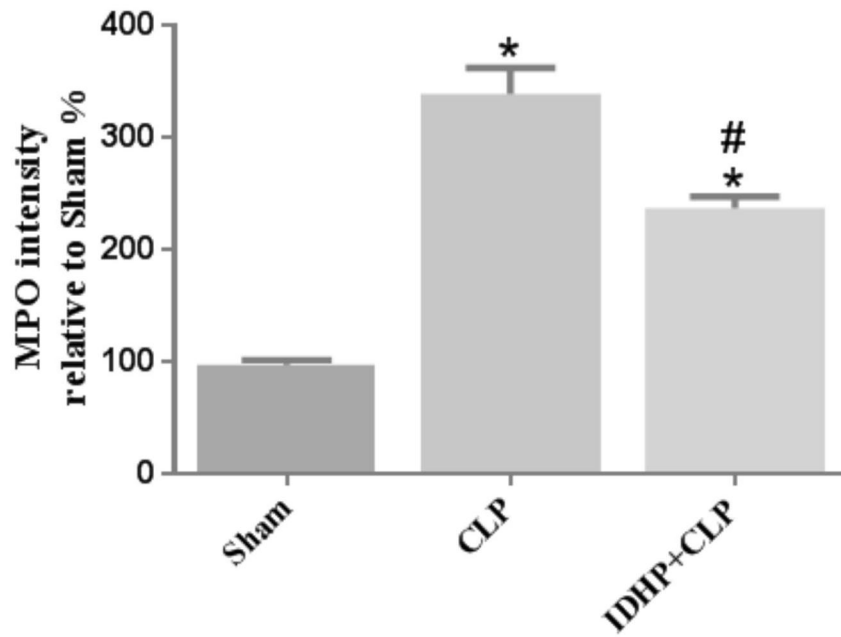
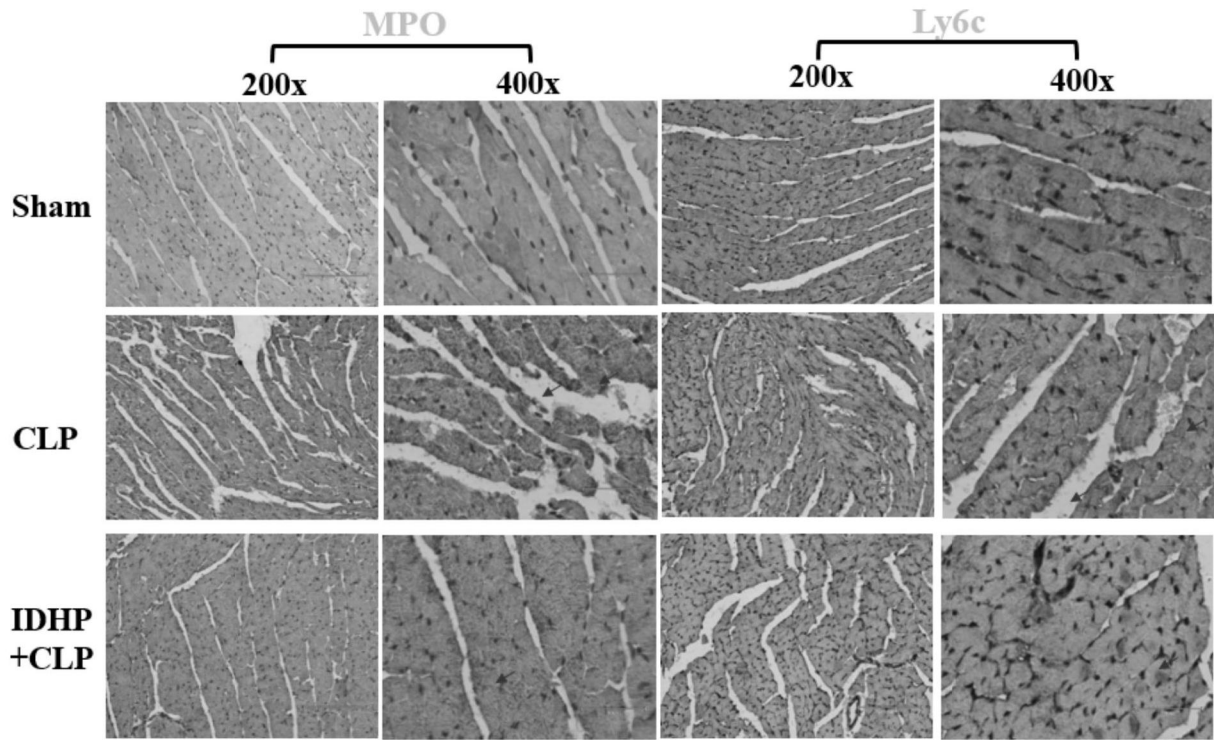


图4B



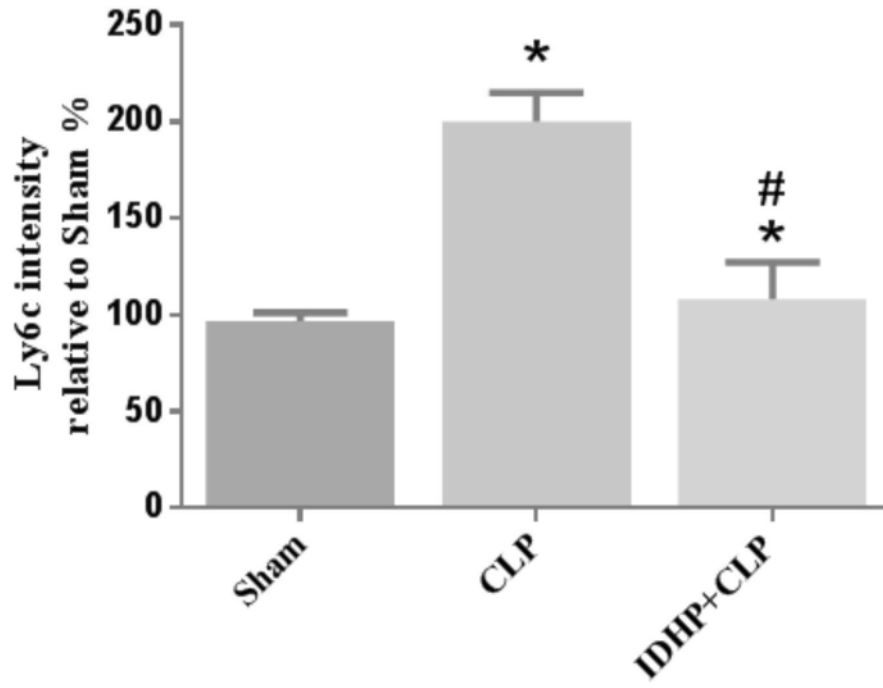


图5

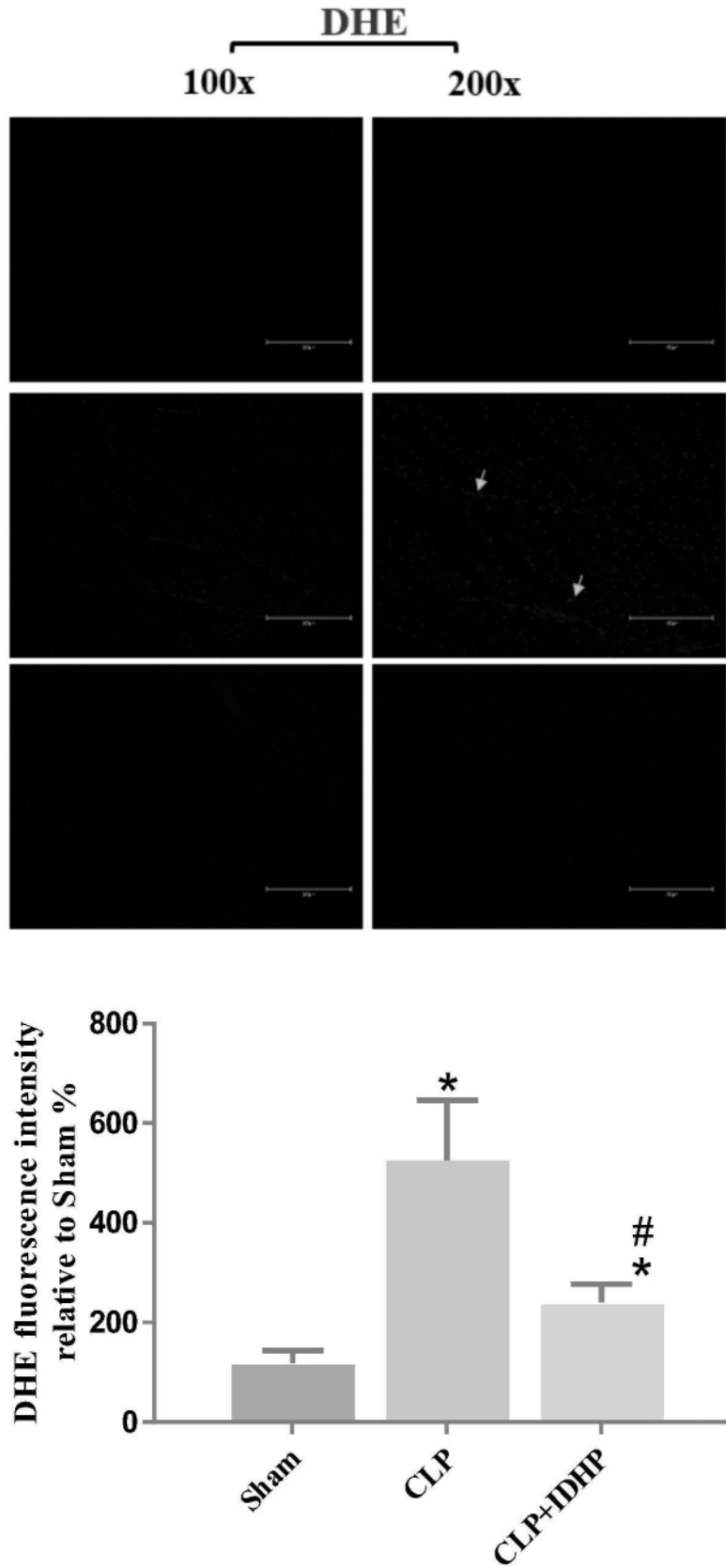


图6



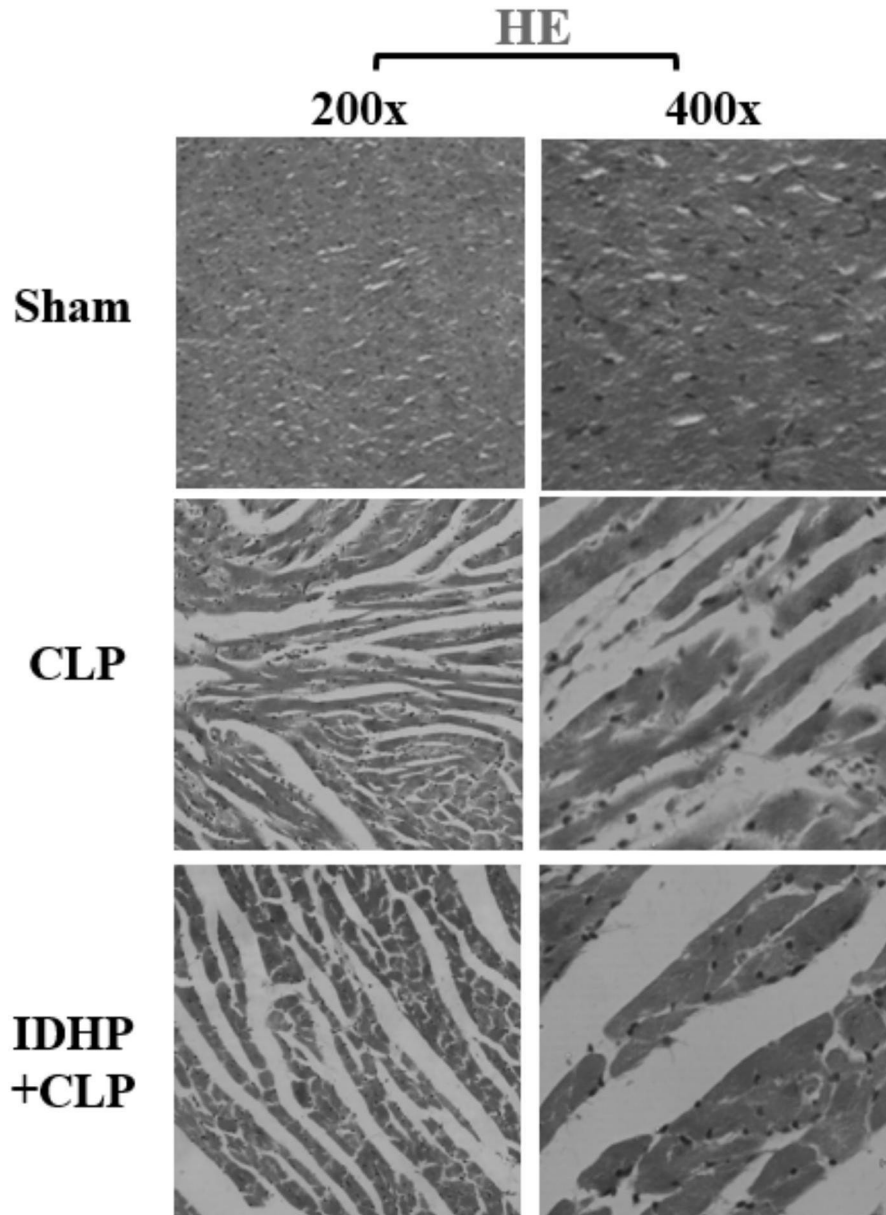
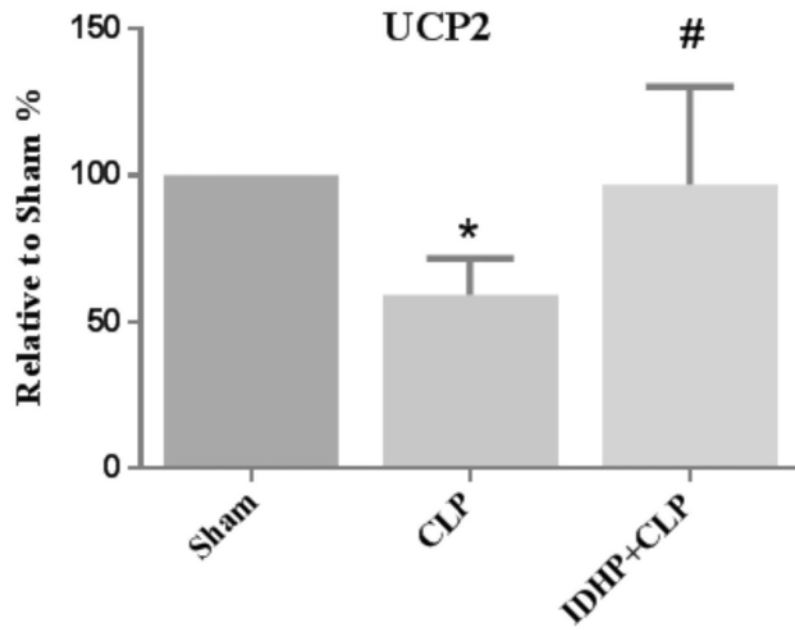
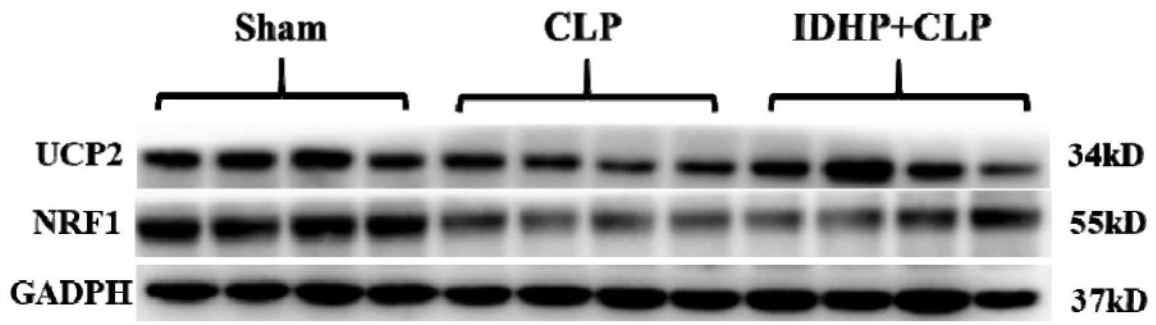


图7



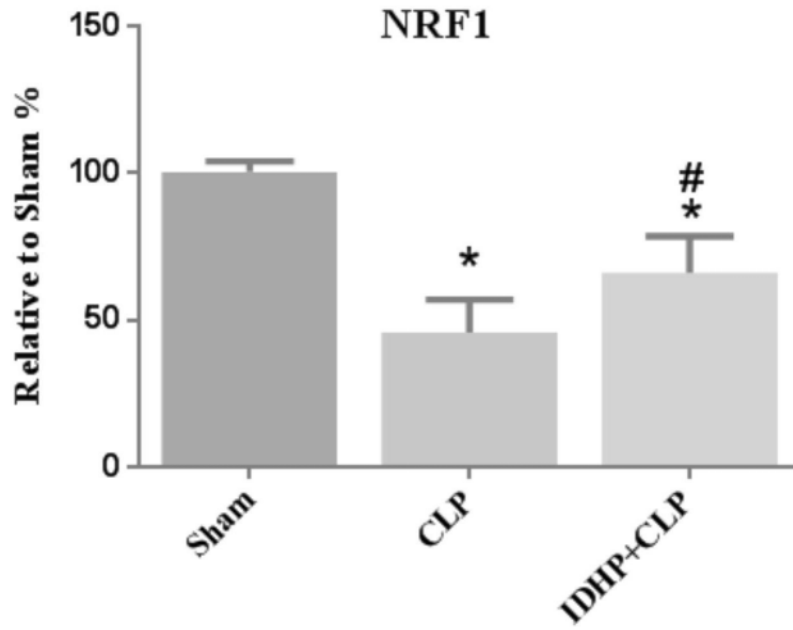
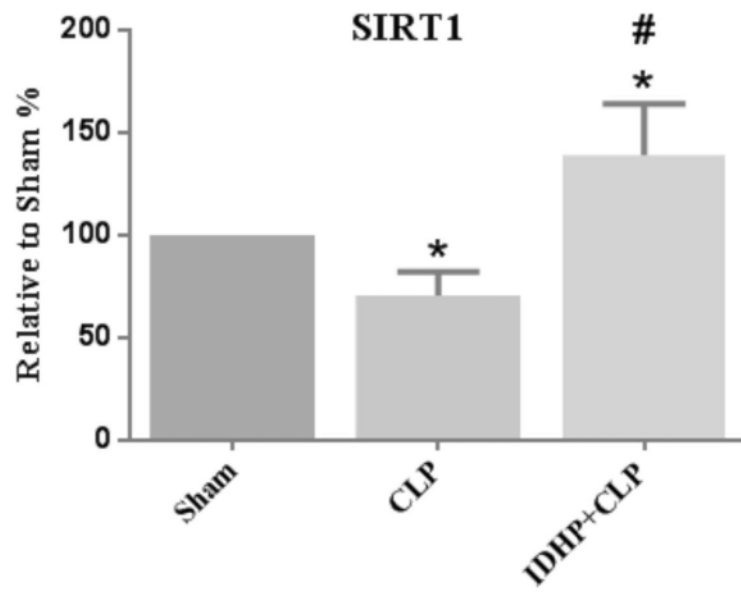
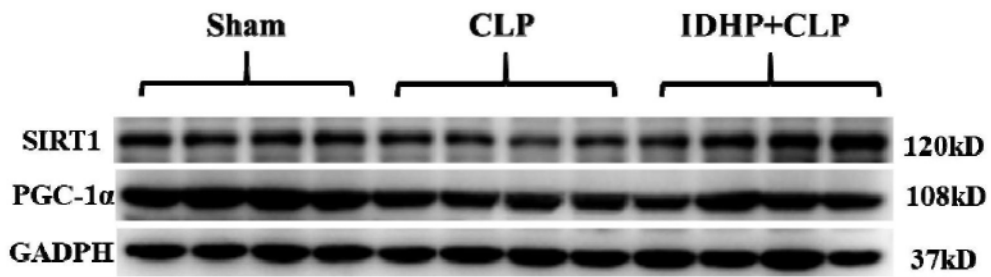


图8



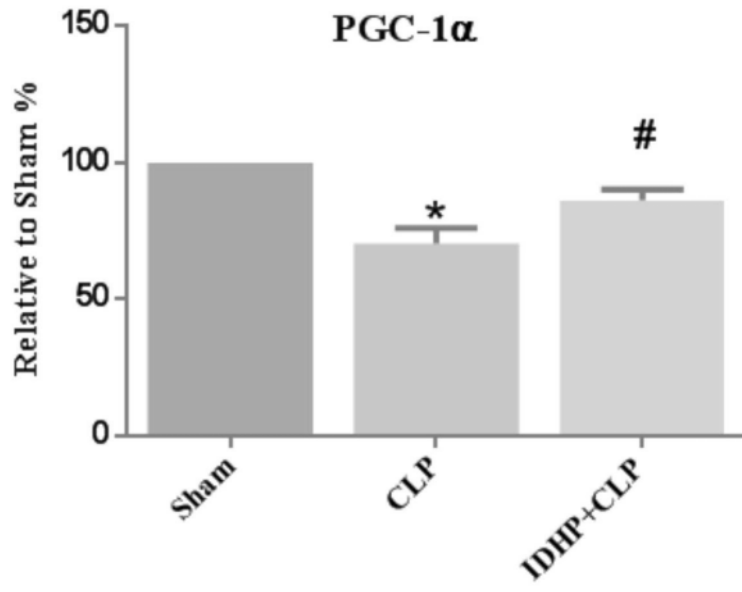


图9