

**科技部補助**  
**大專學生研究計畫研究成果報告**

計 畫 名 稱	: 橙花叔醇減少心肌缺血再灌注損傷的評估
------------	----------------------

執行計畫學生：徐悅恬  
學生計畫編號：MOST 108-2813-C-040-045-B  
研究期間：108年07月01日至109年02月28日止，計8個月  
指導教授：黃相碩

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學系藥理學科

中華民國 109年03月31日

# 橙花叔醇減少心肌缺血再灌注損傷的評估

## Nerolidol alleviate myocardial ischemia reperfusion injury

### 一、研究計畫內容:

#### (一)摘要

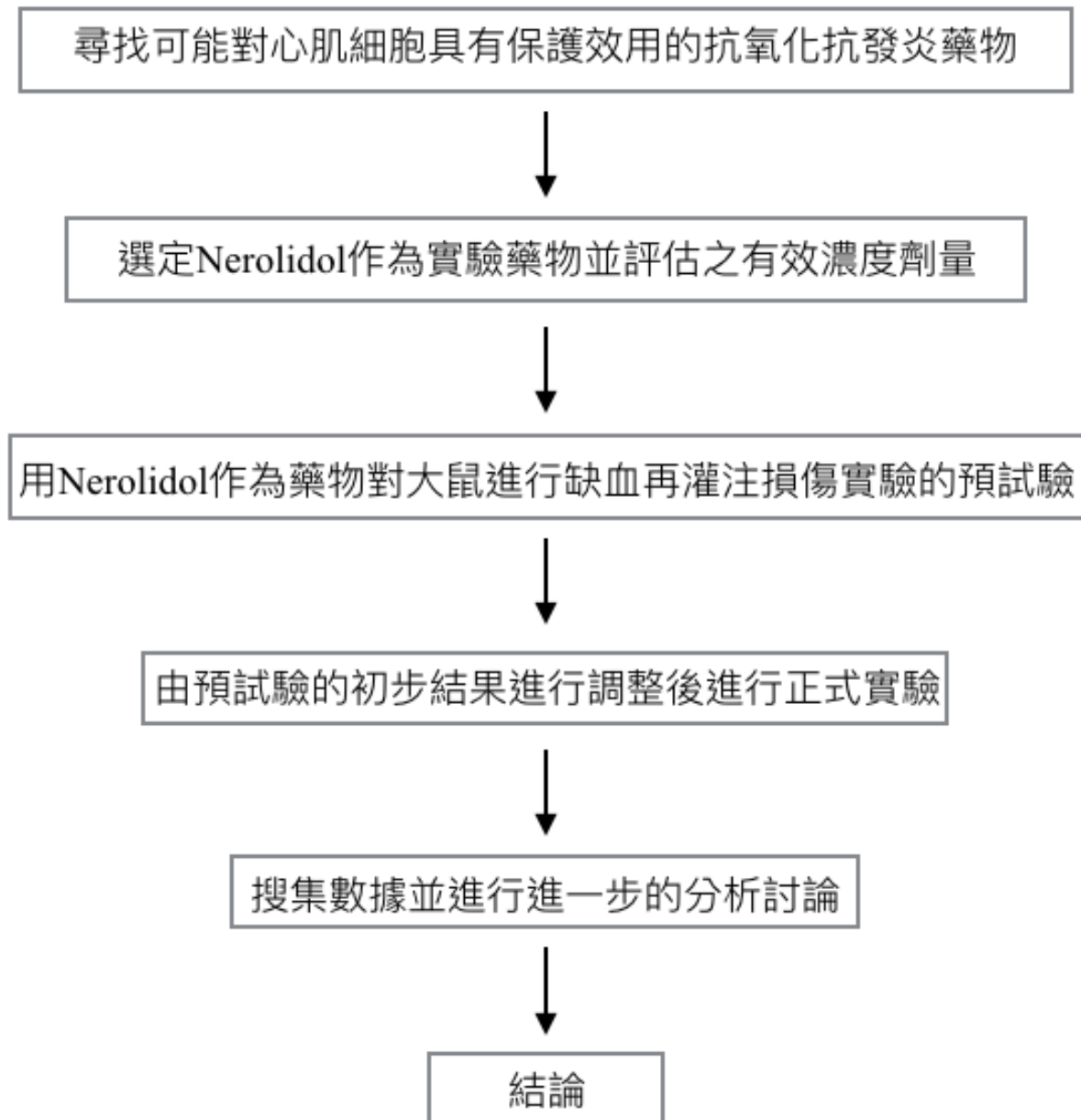
橙花叔醇 (Nerolidol) 是天然的倍半萜烯醇，存在於具花香氣味的各種植物中，先前研究顯示其具有抗氧化和抗發炎的活性，因此認為可能有保護心臟減少心肌缺血再灌注損傷之潛力。然而截至目前，尚未有研究證實 Nerolidol 是否對大鼠心肌缺血再灌注損傷具有保護作用，因此本研究的目的是要透過大鼠心肌缺血再灌注損傷的模式來驗證 Nerolidol 的作用。我們將雄性 Sprague-Dawley 大鼠結紮左前降支冠狀動脈造成其缺血 60 分鐘，而後放開結紮處造成血液再灌注 3 小時，造成缺血再灌注損傷，並在缺血前 15 分鐘經由靜脈注射投予 Nerolidol 或溶劑，透過檢測心肌缺血再灌注損傷誘導的心律不整發生率及時間長短、心肌梗塞區域和心肌細胞損傷程度來評估 Nerolidol 對於心臟的保護效果。在實驗結果中，我們發現投予 Nerolidol 0.1 mg/kg 的大鼠有效降低心肌缺血再灌注損傷誘發的心室性心律不整、心肌梗塞的體積及心肌細胞損傷程度，因此，我們認為 0.1 mg/kg Nerolidol 為有效對抗心肌缺血再灌注損傷的劑量。

#### (二)研究動機與研究問題

2015 年全世界有 1590 萬人罹患心肌梗塞(myocardial infarction, MI)，其成因是部分心肌的血液循環突然中斷，心肌無法得到足夠氧氣而造成損傷[1]，可能會造成心臟衰竭、心律不整及心搏停止，其危險因子包括高血壓、抽菸、糖尿病、缺乏運動、肥胖症、高膽固醇血症、攝取過量酒精等多種因素[2]。然而，心肌缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I-R)損傷是造成冠狀動脈疾病死亡的主要原因，心肌缺血是由於血栓形成或冠狀動脈粥樣硬化斑塊引起的冠狀動脈血供給不足，早期利用恢復缺血心肌的血流是減少心肌梗塞體積和降低死亡率的常用治療策略，但是，血流的恢復可能會造成不可逆轉的傷害，導致更大範圍的心臟損傷和併發症。心肌缺血再灌注損傷的特徵在於細胞因子和趨化因子的快速增加以及白細胞流入與梗塞部位接壤的易損區域，造成發炎反應，其不僅可能導致心肌細胞凋亡，還可能損害心肌功能。因此，開發有效的藥物或是介入方法限制 I-R 誘導的心肌發炎反應，幫助減少心肌 I-R 誘導的心室性心律不整、心肌梗死及死亡率是目前臨床上非常重要的研究方向。

橙花叔醇(Nerolidol)是天然存在的倍半萜烯醇，存在於具有花香氣味的各種植物中。先前研究指出 Nerolidol 具有抗氧化和抗發炎作用等藥理活性，表示 Nerolidol 可能具有保護心臟減少心肌缺血再灌注(I-R)損傷的心臟保護作用。然而，到目前為止尚未有研究驗證橙花叔醇是否對心肌 I-R 損傷具有保護作用。因此，本研究計畫將利用實驗室先前建立的大鼠心肌缺血再灌注損傷模式，來評估缺血前投予 Nerolidol 對於減少心肌缺血再灌注損傷的效果及其作用機制。

#### 研究流程及大綱



### (三)文獻回顧與探討

缺血(ischemia)是描述可能因血管收縮、血栓形成，或栓塞，導致局部貧血所導致組織供血量不足，進而導致缺氧及養分的情形 [3]。缺血除了導致缺氧以外及缺乏營養素之外，也會導致代謝產物累積，進而傷害組織。像是敗血症(sepsis)、心肌梗塞、缺血性中風(ischemia stroke)及器官移植等皆有可能造成組織缺血，而過去主要主張縮短缺血時間以減輕對器官的傷害，但有研究發現對於組織恢復血液再灌注(reperfusion)會造成細胞損傷更嚴重，因會有大量的白血球凝集，釋放有害的氧自由基對已受傷的組織進行破壞，最後導致更大範圍的組織壞死，此種傷害稱為缺血再灌注 (ischemia-reperfusion, I-R)損傷 [4]。在其機制方面，局部缺血期間，當 ATP 逐漸耗盡時，離子幫浦不能發揮作用，導致鈣離子濃度上升，加速了<sup>2+</sup>

ATP 的消耗。然而，再灌注期間也會導致粒線體中的累積過多的 Ca<sup>2+</sup>，使得電子傳遞鏈損傷導致活性氧物質(reactive oxygen species, ROS)的生成增加，進而導致粒線體通透性轉換孔的開放，進一步導致細胞質膜破裂和細胞死亡 [5]。也有研究發現，當心肌缺血再灌注損傷

發生時，心臟內源性氧化劑的形成與心臟內源性抗氧化劑的可用性不平衡時，就會產生氧化壓力 [6]，此外，心肌缺血再灌注損傷產生有毒性的 ROS 還會活化肥大細胞 (mast cell)，促進釋放組織胺、血清素等影響血管通透性之媒介物，可能會趨化中性粒細胞聚集到缺血的心肌中並且過度產生促炎細胞因子 [7]，亦會促進釋放腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor alpha, TNF) 等發炎媒介物，引起發炎反應，進而造成心臟收縮功能障礙，心律不整以及不可逆的心肌細胞損傷 [8]。因此，抗氧化(anti-oxidation)及抗發炎(anti-inflammatory)機制在保護心臟減少心肌缺血再灌注損傷中都是相當重要的。

橙花叔醇(Nerolidol)是一種具有香氣的有機化合物，分子式為  $C_{15}H_{26}O$ ，化學名為 3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodecatrien-3-ol，在先前的研究中發現在小鼠神經細胞中，Nerolidol 能夠減少氧化壓力提供神經保護作用，證明了具抗氧化性[9];也有研究利用實驗性疼痛小鼠模型證實 Nerolidol 的抗傷害性和抗發炎活性，以及其分子作用機制 [10];利用評估小鼠抗焦慮活性的高架十字迷宮(EPM)和曠場試驗(OFT)，Nerolidol 在不改變運動協調性的情況下能夠發揮抗焦慮作用 [11]。此外，使用由乙醇誘導大鼠的急性胃損傷模型評估抗潰瘍作用，該研究的結果表明 Nerolidol 具有抗潰瘍活性，因為它顯著抑制不同動物模型中誘導的潰瘍形成 [12]。通過電子顯微鏡觀察暴露於萜烯的真菌的形態變化，菌絲在 0.4 mg/ml Nerolidol 的作用下會造成變形塌陷，表明 Nerolidol 對須癬毛癬菌的抗真菌作用 [13]。Nerolidol 證明了具抗氧化性，抗傷害性，抗發炎和抗焦慮等藥理活性，此將其歸類為治療藥物開發的有希望的植物化學物質，然而並沒有實驗直接證實 Nerolidol 是否對心肌缺血再灌注損傷的保護作用，因此在本研究計畫中，將對此進行更進一步之探討。

#### (四)研究方法及步驟

##### 一、實驗動物

實驗動物由樂斯科生技股份有限公司所購得，體重 250-300g 的雄性 Sprague-Dawley 大鼠飼養在中山醫科大學動物中心，環境溫度控制在室溫(25°C)，實驗動物允許自由的進食及飲水。

##### 二、心肌缺血再灌注模式

實驗利用腹腔注射的方式注射 urethane (1.25 g/kg) 將大鼠麻醉，將頸部及胸部毛髮剃除後，置於加熱的小動物手術台上進行手術。氣管切開術後，將插管動物用室內空氣通過呼吸器對小型齧齒動物(131 型，NEMI，美國)進行通氣，呼吸器使用的潮氣體積(tidal volume)為 15ml/kg，速率為 60 次/分鐘。接著接上頸靜脈作為投予藥物用，並將股動脈接上儀器偵測血壓(arterial blood pressure, BP)及心跳速率(heart rate,HR)。並通過連接到四肢的銀電極記錄標準的導聯 ECG。在第四和第五肋骨，接近胸骨左邊的位置，以左胸廓切開術(left thoracotomy)打開胸腔，並將心包膜剪開，以 6/0 絲線縫過 LAD，而後讓心臟恢復 15 分鐘，使血壓保持在 70mm/Hg。經過 15 分鐘後投予 Nerolidol 藥物或 DMSO 且讓動物休息 15 分鐘使之充分吸收，之後將小塑料圈套穿過結紮線並與心臟接觸。通過收緊結紮來封閉左冠狀動脈 1 小時，並通過放開小塑料圈套釋放施加於結紮線來實現再灌注 3 小時。成功結紮冠狀動脈是通過動脈壓的減少和心電圖改變(R 波和 ST 段提升)來驗證的，這是缺血的指標。而再灌注時，會觀察到動脈壓增加及心電圖的變化(R 波縮小和 ST 段恢復正常)，以及心律不整產生。

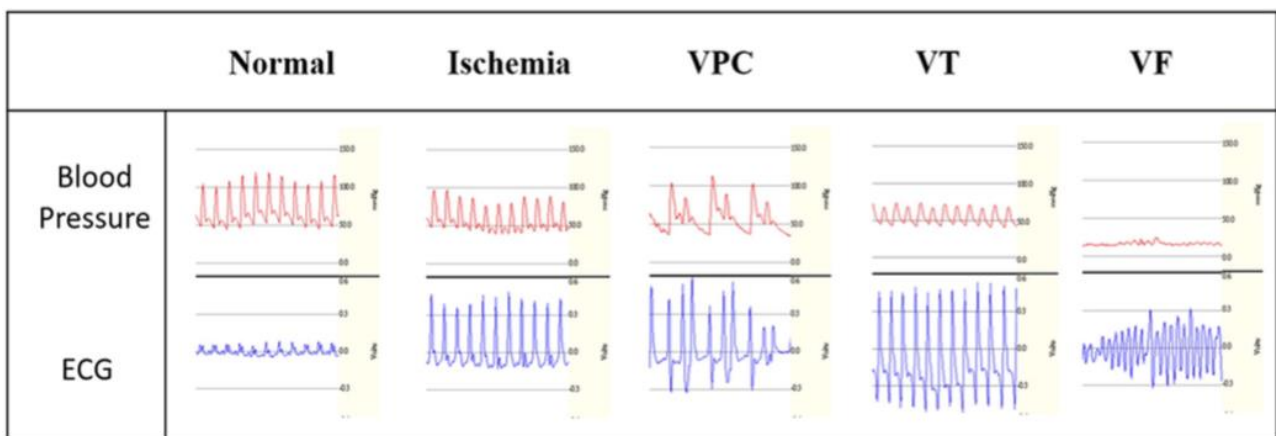
### 三、藥物投予

-3

將實驗動物隨機分成(1)Control 組:10 (v/v) DMSO (2)Nerolidol 組:0.01, 0.05, 0.1 mg/kg Nerolidol(3) Control 組與 Nerolidol 組進行 LAD 結紮手術前 15 分鐘以靜脈注射的方式投予 DMSO 或 Nerolidol 0.01, 0.5,0.1mg/kg。

### 四、心律不整評估

實驗紀錄 LAD 缺血再灌注期間血壓及心電圖的改變，計算的項目包括心室早期收縮 (Ventricular premature contraction, VPC)、心室心搏過速(ventricular tachycardia, VT)，及心室纖維顫動(ventricular fibrillation, VF)的發生率及其時間長短，下圖為經由血壓值、心電圖判定依據圖形 [10]。



### 五、心肌梗塞區域評估

大鼠經過 1 小時缺血及再灌注 3 小時後，將動物犧牲並取出其心臟，灌注 Evans blue 將其染色，再將其分為 8 段橫切片，並在避光的情況下利用 TTC 染色 30 分鐘，再將切片以 10% 福馬林浸泡固定 48 小時。完成後分別稱重整顆心臟、染色呈現藍色的組織(此為未缺血區域)、紅色加白色的組織(此為缺血區域, area at risk, AAR)及白色組織(此為梗塞區域, Myocardial infarction, MI)，並計算其所佔百分比來計算心肌梗塞大小。

### 六、細胞傷害程度評估

大鼠經過 LAD 缺血 1 小時及再灌注 3 小時實驗後，在取下其心臟前，由頸動脈抽取血液 6ml，並以 3000g 的轉速離心 10 分鐘後，取出上清液並置於-80°C 冰箱保存。並檢測檢體血液中的 Troponin I，lactate dehydrogenase (LDH)之活性，評估細胞傷害程度。

### 七、西方墨點法

大鼠犧牲後將其心臟染色，將心臟組織切成小碎塊，再用含有蛋白抑制劑 Cocktail(Sigma, USA)的組織蛋白提取試劑(Thermo Scientific, USA)將心臟組織勻質，再以 4°C，10000rpm 離心 10 分鐘，取出上清液進行蛋白質定量，置於-80 取冰箱保存。將萃取出蛋白質與 sample buffer 混合，並置於 95°C 的水與中加熱 10 分鐘。再以 SDS PAGE 進行電泳，電泳結束後，將膠片上的蛋白轉印到 PVDF 膜上。完成後將 PVDF 膜浸入 blocking buffer，在室溫

下搖晃 90 分鐘進行 blocking。完成後以含有 0.1%(v/v)Tween-20 PBS (PBST)清洗三次，每次 10 分鐘，完成後加入一級抗體在室溫下反應一小時後，再以 PBST 清洗三次，每次 10 分鐘。接著再加入對應之二級抗體於室溫下反應 40 分鐘，以 PBST 清洗三次，每次 10 分鐘，最後加入 ECL 冷光試劑進行反應，在暗房中將 PVDF 膜置於 X-ray 底片上進行曝光，進而偵測蛋白質的表現量。

## 八、數據統計及分析

數據以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示，平均血壓及心跳速率，心室早期收縮(VPC) 發生次數，心室心搏過速(VT) 及心室纖維顫動(VF) 發生時間長短以及梗塞區域的改善是以 Student's t-test 來分析組間的差異是否有意義。至於心室早期收縮(VPC)，心室性心搏過速(VT) 及心室性纖維顫動(VF) 發生率的百分比及死亡率的分析是以卡方檢定(chi-square test)分析其是否有意義。統計結果皆以  $p < 0.05$  視為有意義的差異。

### (五)結果

#### 1. 評估 Nerolidol 在大鼠心肌缺血再灌注損傷模式中對於平均血壓及心跳速率的影響

經由實驗結果 (圖一) 比較分析後，Control 組及 Nerolidol 組 0.01, 0.05, 0.1 mg/kg 在平均血壓和心跳速率皆無統計差異。

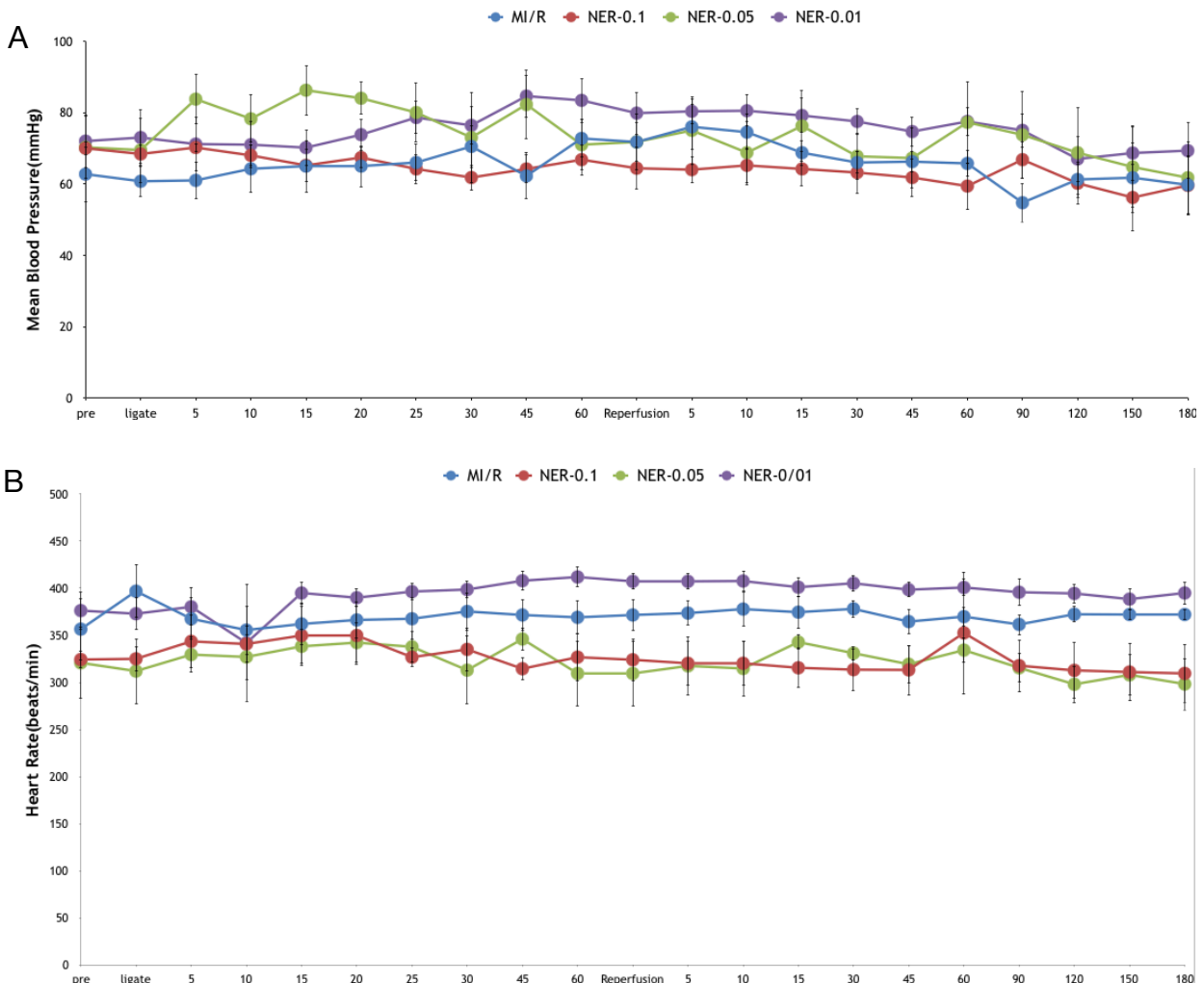


圖 (一) . (A) 平均血壓 Mean Blood Pressure(mmHg) ; (B) 心跳速率 Heart Rate(beats/min)

## 2. 評估Nerolidol在大鼠心肌缺血再灌注損傷模式中對於心律不整的影響

利用生理紀錄器紀錄缺血再灌注期間血壓及心電圖的改變，計算心室早期收縮(Ventricular premature contraction, VPC)、心室心搏過速(ventricular tachycardia, VT)，及心室纖維顫動(ventricular fibrillation, VF)的發生率及其發生時間長短，統整 Nerolidol 與 control 組在 心肌缺血再灌注期間並進行統計分析。實驗結果如圖 (二)，研究發現各組間VPC的發生率無明顯差異，不過在投予Nerolidol 0.01, 0.05, 0.1 mg/kg 後均有減少VPC發生次數的趨勢；而相較於Control組，投予Nerolidol 0.01, 0.05, 0.1 mg/kg 後各組均有減少VT及VF發生頻率的趨勢；投予Nerolidol 0.01, 0.05, 0.1 mg/kg 後各組均有減少VT及VF發生時間的趨勢，且Nerolidol 0.01 mg/kg 及0.1 mg/kg能夠明顯的減少VF之發生時間。

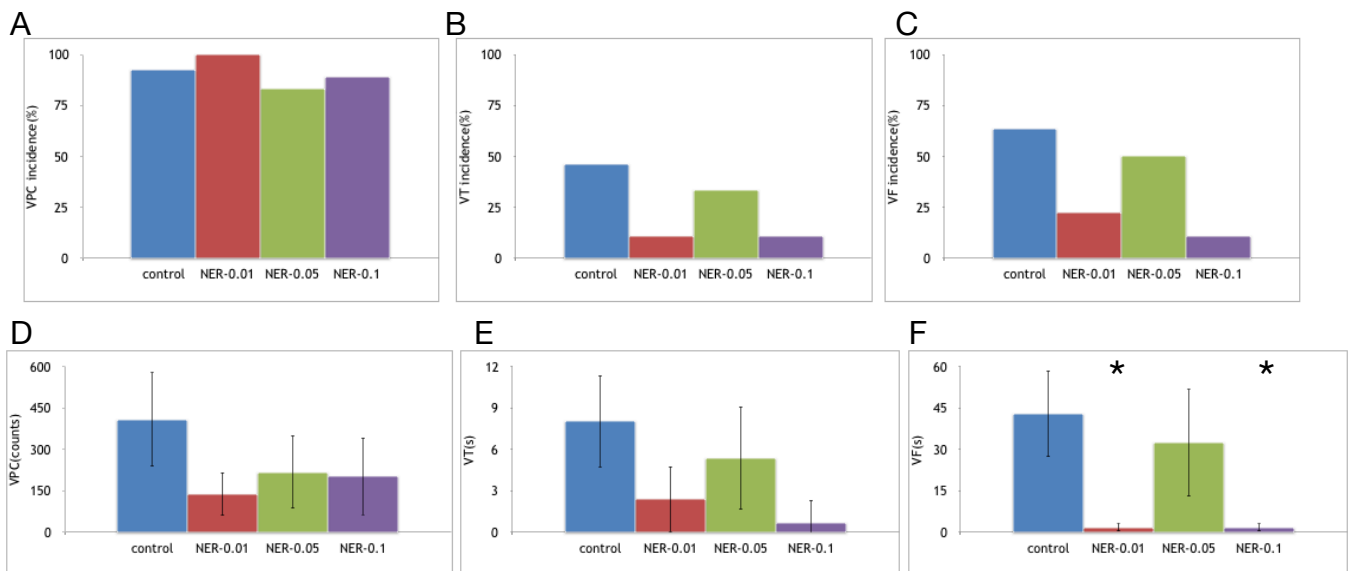


圖 (二)、心室早期收縮(Ventricular premature contraction, VPC)、心室心搏過速(ventricular tachycardia, VT)，及心室纖維顫動(ventricular fibrillation, VF)的發生率和發生次數及其時間長短。(A) VPC發生率；(B) VT發生率；(C) VF發生率；(D) VPC發生次數；(E) VT發生時間；(F) VF發生時間。\* $p < 0.05$ 視為與Control組相比是有意義的差異。

## 3. 評估Nerolidol在大鼠心肌缺血再灌注損傷模式中對於細胞損傷程度的影響

實驗結束後，從頸動脈採集大鼠的血液檢體，檢測血漿中 Troponin I的含量及LDH之活性評估細胞受損程度，並分析 Nerolidol 與 control 組間差異，實驗結果如圖 (三)。我們發現在大鼠心肌缺血再灌注損傷中，Nerolidol能夠減少LDH的活性，且具有劑量依賴性的現象；而Nerolidol也能夠降低血漿中Troponin I 的含量，且在投予Nerolidol 0.1 mg/kg 組間達統計差異。



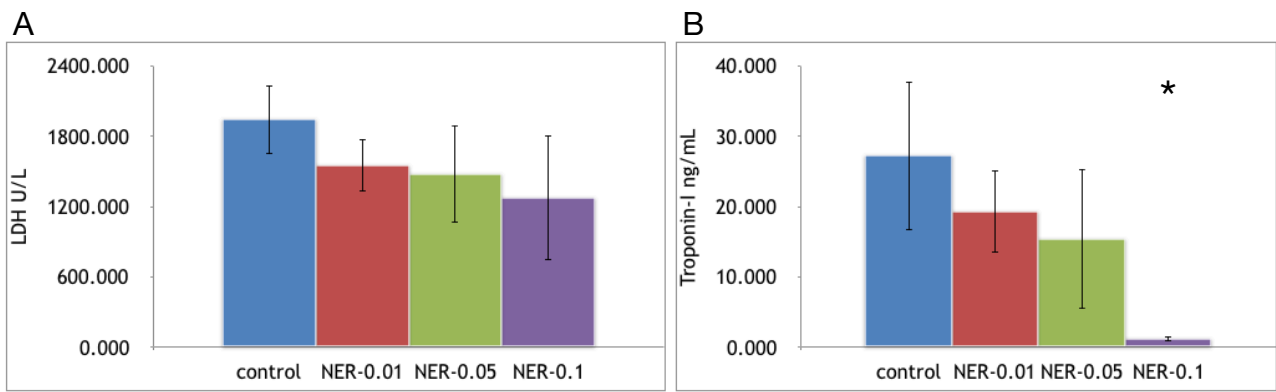


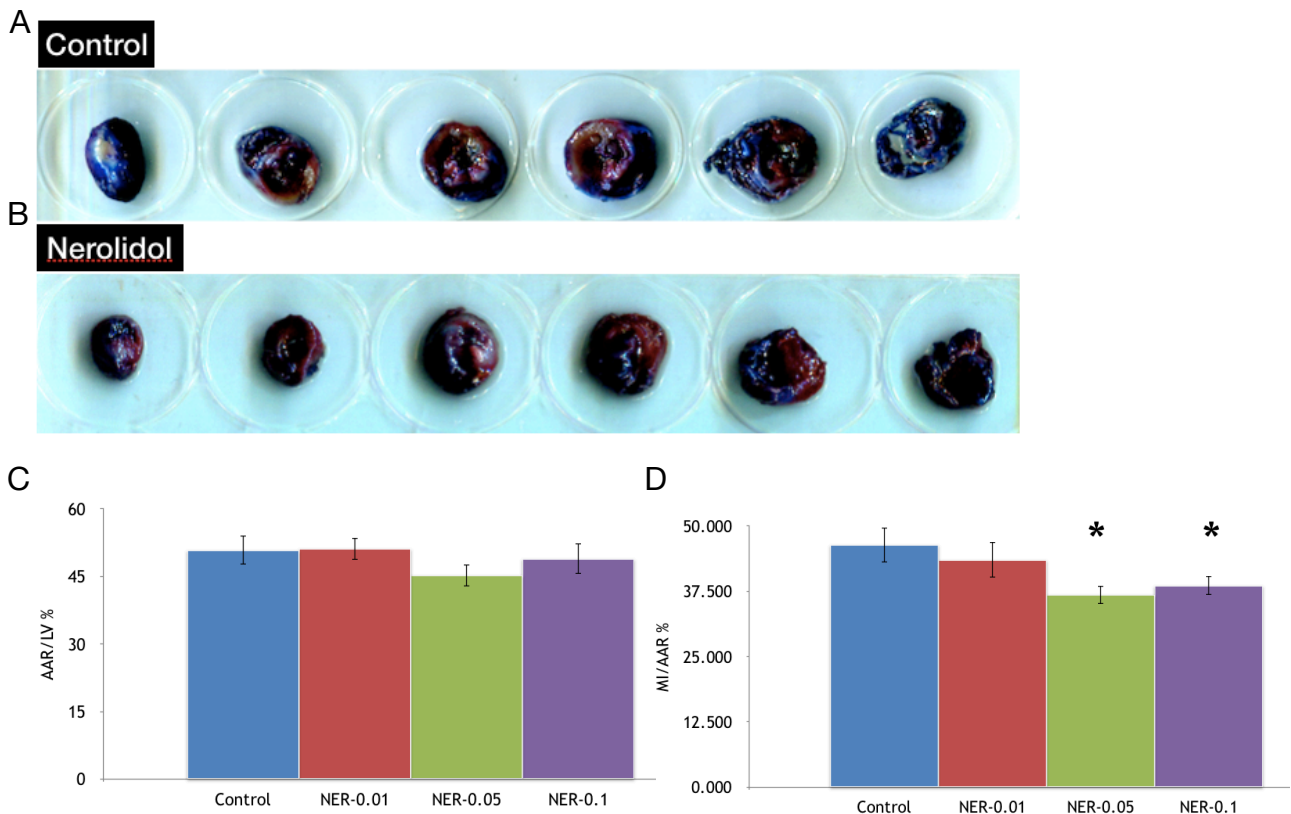
圖 (三) .血液檢體檢測 ( A ) Troponin I ng/mL ; ( B ) lactate dehydrogenase (LDH) U/L 。 \* $p < 0.05$ 視為與Control組相比是有意義的差異。

#### 4. 評估Nerolidol在大鼠心肌缺血再灌注損傷模式中對於心肌梗塞體積的影響

大鼠心肌缺血再灌注損傷模型完成後取出心臟，進行Evans blue-TTC雙重染色來評估心肌梗塞的體積，染色後呈現藍色的組織為未缺血區域、呈現紅色及白色的組織為缺血區域 (area at risk, AAR)，而呈現白色組織為梗塞區域 (Myocardial infarction, MI)，如圖 (四)。經由實驗的結果發現，Control 組及 Nerolidol 0.01, 0.05, 0.1 mg/kg組的大白鼠經過冠狀動脈結紮所造成之缺血區域無統計差異，表示每一組動物結紮左冠狀動脈前降支所造成之缺血區域皆相

-3

當。圖 (四) 表示，與 Control 組(DMSO 10 v/v)相比，投予0.01 mg/kg Nerolidol無法有效地減少心肌梗塞的體積，而投予 0.05及0.1 mg/kg Nerolidol 皆能夠有意義的減少心肌缺血再灌注損傷造成的心肌梗塞體積。





圖(四). (A) Control組之心臟染色切片；(B) 投予 Nerolidol之心臟染色切片；(C) 缺血區域, area at risk, AAR 所佔心臟 (LV) 比例；(D) 梗塞區域, Myocardial infarction, MI 佔缺血區域 (AAR) 比例。\* $p < 0.05$ 視為與Control組相比是有意義的差異。

## (六)討論

Nerolidol被譽為“公認的安全分子 (Generally Recognized as Safe, GRAS)”(Lapczynski et al. 2008)，在美國食品藥品監督管理局、歐盟與日本等國家也已批准Nerolidol為安全可添加的食品調味劑。過去研究發現Nerolidol具有相當多的藥理與生物活性，包括有具有強大的抗氧化活性能保護細胞免受脂質、蛋白質、DNA的氧化損傷；具有抗發炎的藥理活性來對抗發炎反應；還能夠有效地抑制癌細胞的增殖分化，並促進癌細胞死亡 (Biazi et al. 2017; Ferreira et al. 2012)。此外，2019年有兩篇文獻證實橙花叔醇具有心臟保護作用，第一篇是Loordhurani Asaikumar等人指出連續21天以口服的方式預處理200 mg/kg的橙花叔醇能夠有效地減少脂質過氧化的產物thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)、conjugated dienes (CD) 和lipid hydroperoxides (LHPs)，增加抗氧化酵素 (SOD、CAT、GPx、GST) 的活性，並減少單核球浸潤及心肌纖維破裂，進而對抗isoproterenol誘發的心肌梗塞傷害來達到心臟保護作用(Asaikumar et al. 2019)；第二篇則是由Ashif Iqbal等人證實連續14天以口服的方式預處理400 mg/kg的橙花叔醇能夠明顯減少抗癌藥物-cyclophosphamide誘發的氧化壓力、發炎反應、細胞凋亡和心臟纖維化，表示橙花叔醇具有心臟保護作用來對抗抗癌藥物-cyclophosphamide造成的心臟毒性(Iqbal et al. 2019a)。然而，到目前為止，並沒有任何文獻研究Nerolidol是否能夠保護心臟對抗心肌缺血再灌注損傷，所以本研究計畫是第一個利用結紮左冠狀動脈下降支造成心肌缺血再灌注損傷的動物模式來探討橙花叔醇是否能夠保護心臟對抗心肌缺血再灌注損傷。

在大鼠心肌缺血再灌注損傷的模型中，Control組及Nerolidol各組間的平均血壓及心跳速率並無明顯差異，表示Nerolidol在0.01-0.1 mg/kg的濃度對大鼠的生理狀態並無不良影響，我們也評估了Nerolidol對於心肌缺血再灌注損傷引起的心律不整、梗塞區域及細胞損傷的影響，發現0.1 mg/kg Nerolidol 能夠明顯降低心肌缺血再灌注損傷引起的VF之發生時間，且有效地降低血漿中troponin I的含量，更能夠有意義的減少心肌梗塞的體積，表示0.1 mg/kg Nerolidol是能夠對抗心肌缺血再灌注損傷的有效劑量，因此，我們認為Nerolidol是能夠開發成心臟保護劑的保健食品。

在未來實驗規劃中，將學習並利用西方點墨法更進一步探討Nerolidol對心肌缺血再灌注損傷模型之保護作用機制。檢測GPX-4、COX-2、NLRP-3、SDH 等等蛋白質表現量，嘗試以更多不同面向找出並證明Nerolidol對於減少心肌缺血再灌注損傷的作用機制。以期未來在此藥物的開發上有更多更好的依據甚至作為臨床用藥的可行性。

## (七)參考文獻

1. Thygesen, K., et al. (2007). "Universal definition of myocardial infarction." 50(22): 2173-2195.
2. Yusuf, S., et al. (2004). "Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study." 364(9438): 937-952.
3. Merck & Co. Occlusive Peripheral Arterial Disease, The Merck Manual Home Health Hand- book website, revised and updated March 2010. Retrieved March 4, 2012.
4. Hausenloy, D. J. and D. M. J. T. J. o. c. i. Yellon (2013). "Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target." 123(1): 92-100.
5. Murphy, E. and C. Steenbergen (2008). "Mechanisms Underlying Acute Protection From Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury." Physiological Reviews 88(2): 581-609.
6. Dhalla, N. S., et al. (2000). "Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury." 47(3): 446-456.
7. Xiong, J., et al. (2010). "Cholinergic anti-inflammatory pathway: a possible approach to protect against myocardial ischemia reperfusion injury." 123(19): 2720-2726.
8. Frangogiannis, N. G., et al. (2002). "The inflammatory response in myocardial infarction." 53(1): 31-47.
9. Neto, J. D. N., et al. (2013). "Antioxidant effects of nerolidol in mice hippocampus after open field test." 38(9): 1861-1870.
10. Fonsêca, D. V., et al. (2016). "Nerolidol exhibits antinociceptive and anti-inflammatory activity: involvement of the GABAergic system and proinflammatory cytokines." 30(1): 14-22.
11. Goel, R. K., et al. (2016). "Assessment of anxiolytic effect of nerolidol in mice." 48(4): 450.
12. Klopell FC, Lemos M, Sousa JP, Comunello E, Maistro EL, Bastos JK, et al. Nerolidol, an anti-ulcer constituent from the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) Z Naturforsch C. 2007;62:537-42.

13. Park MJ, Gwak KS, Yang I, Kim KW, Jeung EB, Chang JW, et al. Effect of citral, eugenol, nerolidol and alpha-terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. *Fitoterapia*. 2009;80:290–6.
14. Wang, Y.-H., et al. (2016). "Lumbrokinase attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting TLR4 signaling." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **99**: 113-122.
15. Wang, Y.-H., et al. (2018). "Sirt1 Activation by Post-ischemic Treatment With Lumbrokinase Protects Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury." *Frontiers in Pharmacology* **9**.