

参芪利心汤对心力衰竭大鼠心肌细胞的保护作用及机制研究

庄金龙¹, 刘 莉², 钟渊福¹, 隋艳波², 林庚海¹, 胡桂华¹, 许惠莲^{1*}

1. 厦门大学附属东南医院, 福建 漳州 363000

2. 黑龙江中医药大学附属第一医院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 研究参芪利心汤对阿霉素诱导心力衰竭大鼠心肌细胞的保护作用及机制。**方法** 雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、依那普利 (2.1 mg/kg) 组以及参芪利心汤低、中、高剂量 (9.975、19.950、39.900 g/kg) 组, 除对照组外, 其余大鼠 ip 阿霉素诱导心力衰竭模型; 各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续 4 周。给药结束后, 采用心脏彩色多普勒超声仪测定各组大鼠左室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室短轴缩短率 (left ventricular fractional shortening, LVFS) 以及每搏心输出量 (stroke volume, SV); 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; 采用透射电镜观察各组大鼠心肌细胞超微结构; 采用 ELISA 法检测各组大鼠血浆 N 端 B 型利钠肽 (N-terminal B-type natriuretic peptide, NT-proBNP) 及心肌组织三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 含量; 采用流式细胞仪检测各组大鼠心肌细胞凋亡情况; 采用 qRT-PCR 法检测各组大鼠心肌组织 B 淋巴细胞瘤 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α) mRNA 表达情况; 采用 Western blotting 法检测各组大鼠心肌组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 和 p53 蛋白表达情况。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠 LVEF、LVFS 和 SV 显著降低 ($P < 0.01$), 血浆 NT-proBNP 含量显著升高 ($P < 0.01$), 心肌组织 ATP 含量显著降低 ($P < 0.01$), 心肌细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$); 心肌组织 Bcl-2 和 PGC-1 α mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 心肌组织 Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), Bax、Caspase-3 和 p53 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 参芪利心汤中、高剂量组和依那普利组大鼠 LVEF、LVFS 和 SV 均显著升高 ($P < 0.01$); 血浆 NT-proBNP 含量显著降低 ($P < 0.01$), 心肌组织 ATP 含量显著升高 ($P < 0.01$), 心肌细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.01$); 心肌组织 Bcl-2 和 PGC-1 α mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.01$), Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.01$); 心肌组织 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), Bax、Caspase-3 和 p53 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。**结论** 参芪利心汤能够改善心力衰竭大鼠的心肌结构、能量代谢及心功能, 并减少心肌细胞凋亡, 其作用机制可能与调控 PGC-1 α 和线粒体凋亡通路相关蛋白表达有关。

关键词: 参芪利心汤; 心力衰竭; 心肌结构; 心功能; 心肌细胞凋亡; 线粒体凋亡通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)19-5922-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.19.015

Protective effects and mechanism of Shenqi Lixin Decoction on cardiomyocytes of rats with heart failure

ZHUANG Jin-long¹, LIU Li², ZHONG Yuan-fu¹, SUI Yan-bo², LIN Geng-hai¹, HU Gui-hua¹, XU Hui-lian¹

1. Affiliated Dongnan Hospital of Xiamen University, Zhangzhou 363000, China

2. First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To study the protective effect and mechanism of Shenqi Lixin Decoction (参芪利心汤) on cardiomyocytes of rats with heart failure induced by adriamycin. **Methods** Male Wistar rats were randomly divided into control group, model group, enalapril (2.1 mg/kg) group, low-, medium- and high-dose Shenqi Lixin Decoction (9.975, 19.950, 39.900 g/kg) groups. In addition to control group, the rest of rats were ip adriamycin to induce heart failure model, rats in each administration group were ig

收稿日期: 2021-02-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81904107); 福建中医药大学临床专项课题基金资助项目 (XB2018126)

作者简介: 庄金龙 (1985—), 男, 主治医师, 硕士研究生, 主要从事中西医结合防治心力衰竭临床及基础研究。E-mail: xiaozhuzhu505@163.com

*通信作者: 许惠莲, 女, 副主任医师, 主要从事中西医结合治疗心血管病研究。E-mail: xhl2873033@126.com

corresponding drugs, rats in control group and model group were ig equal volumes of distilled water, once a day for four consecutive weeks. After administration, cardiac color doppler ultrasound was used to measure left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular fractional shortening (LVFS) and stroke volume (SV) in rats of each group. Hematoxylin-eosin (HE) staining method was used to observe the pathological changes of myocardial tissue in rats; Transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructural changes of myocardial cells in rats; *N*-terminal B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) level in plasma and adenosine triphosphate (ATP) content in myocardial tissue were detected by ELISA; Flow cytometry was used to detect myocardial cell apoptosis in rats of each group; qRT-PCR method was used to detect B-cell lymphoma 2 (*Bcl-2*), Bcl-2 associated X protein (*Bax*), *Caspase-3* and peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α (*PGC-1 α*) mRNA expressions in myocardial tissue; Western blotting was used to detect Bcl-2, Bax, *Caspase-3* and p53 protein expressions in myocardial tissue of rats in each group.

Results Compared with the control group, LVEF, LVFS and SV of rats in model group were significantly reduced ($P < 0.01$), NT-proBNP level in plasma was increased ($P < 0.01$), and ATP content in myocardial tissue was reduced ($P < 0.01$); Cardiomyocyte apoptosis rate was increased ($P < 0.01$), *Bcl-2* and *PGC-1 α* mRNA levels in myocardial tissue were reduced ($P < 0.01$), *Bax* and *Caspase-3* mRNA levels were increased ($P < 0.01$); Bcl-2 protein expression in myocardial tissue was reduced ($P < 0.01$), Bax, *Caspase-3* and p53 protein expressions were increased ($P < 0.01$). Compared with model group, LVEF, LVFS and SV of rats in medium-, high-dose Shenqi Lixin Decoction group and enalapril groups were increased ($P < 0.01$); NT-proBNP level in plasma was decreased ($P < 0.01$), ATP content in myocardial tissue was increased ($P < 0.01$); Cardiomyocyte apoptosis rate was reduced ($P < 0.01$); *Bcl-2* and *PGC-1 α* mRNA levels in myocardial tissue were increased ($P < 0.01$), *Bax* and *Caspase-3* mRNA levels were reduced ($P < 0.01$); Bcl-2 protein expression in myocardial tissue was increased ($P < 0.01$), Bax, *Caspase-3* and p53 protein expressions were reduced ($P < 0.05, 0.01$).

Conclusion Shenqi Lixin Decoction can improve myocardial structure, energy metabolism and cardiac function in rats with heart failure, and reduce myocardial cell apoptosis. Its mechanism may be related to the regulation expression of *PGC-1 α* and mitochondrial apoptosis pathway-related proteins.

Key words: Shenqi Lixin Decoction; heart failure; myocardial structure; cardiac function; cardiomyocyte apoptosis; mitochondrial apoptosis pathway

心力衰竭是由于任何心脏结构或功能异常导致心室充盈或泵血功能受损的一种复杂临床综合征,是各种心脏疾病的严重表现或晚期阶段,已成为 21 世纪我国乃至全球重要的公共卫生问题^[1]。研究表明,神经内分泌介导的心肌重构是心力衰竭发生、发展的病理生理机制,而心肌细胞凋亡是其重要的病理基础^[2]。近 20 年来,尽管心力衰竭的治疗策略已从过去“强心、利尿、扩血管”以改善血流动力学状态逐渐转变为如今以“抑制神经内分泌异常激活”为主的长期、修复性治疗,但心力衰竭患者的再住院率和死亡率仍居高不下且预后差,因此现阶段心力衰竭的治疗迫切需要寻找新靶点及新思路。

中药治疗心力衰竭历史悠久,大部分都是在古籍名方基础上根据临证经验化裁为各家经验方,临床疗效良好,但有自身的局限性,缺乏现代循证医学证据和客观实验室评估指标。尽管如此,由于中药复方具有多成分、多靶点、多通路的特点,在治疗心力衰竭方面具有单种化学药无法比拟的优势,复方中成药现已被《中国心力衰竭诊断和治疗指南(2018)》推荐使用^[1],且国内心血管病权威专家们制定了《慢性心力衰竭中医诊疗专家共识》^[3]、《慢

性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识》^[4]。但目前中药复方治疗心力衰竭的作用机制尚未完全清楚,大部分机制研究是从改善临床症状、血流动力学及神经体液调节等方面入手,缺乏从心力衰竭的病理生理机制上的深入研究。参芪利心汤是在中医治疗心力衰竭古籍名方“苓桂术甘汤、养心汤”基础上加减,并加用活血、温阳等药物化裁而来,其前期的临床及基础研究表明,既可以改善心力衰竭患者的临床症状、提高活动耐量、改善心功能指标^[5-6],也可以改善阿霉素致心力衰竭大鼠的血流动力学并降低细胞炎性因子^[7-8],但其干预心力衰竭的作用机制尚不明确。本研究通过建立阿霉素诱导的心力衰竭大鼠模型,观察参芪利心汤对心力衰竭大鼠的心肌结构、心功能、心肌能量代谢、心肌细胞凋亡率、心肌细胞线粒体凋亡途径相关蛋白表达的影响,旨在探讨参芪利心汤干预心力衰竭的具体作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 105 只,6~7 周龄,体重(200±20)g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物合格证号 SCXK(沪)2017-0005。

动物分笼饲养于厦门大学附属东南医院动物实验中心, 自由进食饮水, 光照 12 h, 温度 (22 ± 3) °C、湿度 (50 ± 8) %。动物实验经厦门大学附属东南医院伦理委员会批准 (批准号 909DWLL201901)。

1.2 药材

参芪利心汤由人参 20 g、黄芪 20 g、桂枝 10 g、淫羊藿 20 g、葶苈子 15 g、丹参 15 g、茯苓 20 g、白术 15 g、仙鹤草 30 g、益母草 15 g 和甘草 10 g 组方而成, 以上饮片购自厦门大学附属东南医院门诊中药房, 经厦门大学医学院刘庆春教授鉴定分别为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎、豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Ege. var. *mongholicus* (Ege.) Hsiao 的干燥根、樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝、小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim. 的干燥叶、十字花科植物播娘蒿 *Descurainia sophia* (L.) Webb. ex Prantl. 的干燥成熟种子、唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎、多孔菌科真菌茯苓 *Faria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核、菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎、蔷薇科植物龙芽草 *Agrimonia pilosa* Ledeb. 的干燥地上部分、唇形科植物益母草 *Leonurus japonicus* Houtt. 的干燥地上部分、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。

1.3 药品与试剂

马来酸依那普利片 (10 mg/片, 批号 18010301) 购自扬子江药业集团江苏制药股份有限公司; 注射用盐酸多柔比星 (10 mg/支, 批号 18033311) 购自浙江海正药业股份有限公司; 苏木素染液 (批号 20170035)、伊红染液 (批号 20180017) 购自北京益利精细化学品有限公司; N 端 B 型利钠肽 (N-terminal B-type natriuretic peptide, NT-proBNP) ELISA 试剂盒 (批号 ER0309)、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) ELISA 试剂盒 (批号 ER1637) 购自武汉菲恩生物科技有限公司; Annexin V-碘化丙啶 (PI) 试剂盒、Trizol 试剂盒、qRT-PCR 试剂盒、裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、ECL 超敏发光液 (批号分别为 AV0120126、PR01259、LK-0103A、PWB-78503、PWB-563、PWB-020、PWB-03132) 购自上海诺伦生物医药技术有限公司; PCR 引物由上海艾博思生物科技有限公司合成;

PVDF 转移膜 (批号 IPVH00010) 购自美国 Millipore 公司; X 光片显影液及定影液购自美国 Kodak 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 A0208) 购自上海碧云天生物技术有限公司; B 淋巴细胞瘤 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 抗体、重组 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体、重组 β -actin 抗体、半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 抗体、p53 抗体购自英国 Abcam 公司。

1.4 仪器

IE33 型心脏彩色多普勒超声仪 (荷兰 Philips 公司); MDF-U53V 型医用超低温冰箱 (日本三洋公司); ST5020 型多功能染色封片一体机、RM2245 型切片机、DW4-B 型生物显微镜 (德国 Leica 公司); JEM-1220 型透射电镜 (TEM, 日本 Hitachi 公司); TDZ4-WS 型台式低速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); BD FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 BD Bioscience 公司); MX3000P 型 qRT-PCR 仪 (美国 Agilent 公司); PowerPac™ HC 电泳仪、170-3940 型半干转印槽、XR+凝胶成像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司); VE-180 型垂直电泳槽 (中国天能科技公司); XBT-1 型柯达医用 X 线胶片 (美国 Kodak 公司); Gel-Pro analyzer 型分析软件 (美国 Media Cybernetics 公司)。

2 方法

2.1 参芪利心汤的制备

取组方量人参、黄芪、淫羊藿、桂枝、葶苈子、丹参、茯苓、白术、仙鹤草、益母草和甘草饮片, 加入 10 倍量蒸馏水浸泡 1 h, 煎煮 1 h, 纱布滤过, 滤渣再加 8 倍量蒸馏水继续煎煮 1 h, 滤过, 合并 2 次滤液, 分别浓缩成含生药量 0.998、1.995、3.990 g/mL 的溶液, 经高效液相色谱仪测定主要含黄芪甲苷 278.21 μ g/g、丹参酮 II_A 1.58 mg/g、淫羊藿苷 326.32 μ g/g^[9], 分装灭菌后, 于 4 °C 保存备用。

2.2 心力衰竭大鼠模型的制备、分组与给药

参考文献方法^[10-11], 大鼠适应性饲养 7 d 后, 采用随机数字表法选取 15 只作为对照组, 其余大鼠按照前 3 周 3 mg/kg、后 3 周 2 mg/kg 的剂量 ip 阿霉素溶液 (0.8 mg/mL), 对照组 ip 等体积 0.9% 氯化钠溶液, 1 次/周, 连续 6 周; 6 周后采用心脏彩色多普勒超声仪检测大鼠心功能指标, 左室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF) < 45% 即表明心力衰竭大鼠模型制备成功。根据本课题组前期研究^[7-8], 将造模成功的心力衰竭大鼠随机分为

模型组、依那普利 (2.1 mg/kg, 相当于临床等效剂量) 组以及参芪利心汤低、中、高剂量 (9.975、19.950、39.900 g/kg, 分别相当于临床 1/2 倍剂量、等效剂量、2 倍剂量) 组, 每组 16 只; 各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续 4 周。每日观察并记录大鼠精神状态、饮水量、活动度、尿量、粪便、毛发等一般情况及死亡情况。

2.3 参芪利心汤对心力衰竭大鼠心功能的影响

给药结束后, 大鼠禁食不禁水 12 h, 脱毛、称定体质量, ip 20% 乌拉坦 (1.5 g/kg) 麻醉, 仰卧固定、胸前脱毛后, 采用心脏彩色多普勒超声仪检测大鼠 LVEF、左室短轴缩短率 (left ventricular fractional shortening, LVFS) 及每搏心输出量 (stroke volume, SV), 连续测定 3 个心动周期, 取平均值。

2.4 参芪利心汤对心力衰竭大鼠心肌组织病理变化的影响

大鼠腹主动脉采血 5 mL 于 EDTA 抗凝管中, 静置 1 h, 3000 r/min 离心 10 min, 取血浆, 于 -20 °C 保存。采血后立即处死大鼠, 剪开胸腔并快速取出心脏, 以预冷的 0.9% 氯化钠溶液冲洗血污, 于冰上剪除心包膜、血管及心房组织等, 留取左室心肌组织, 滤纸拭干, 快速剪取左室心尖部心肌组织, 于 4% 多聚甲醛中固定, 梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后切片 (厚 4 μm), 每个标本取 4 张切片, 常规苏木素-伊红 (HE) 染色、中性树胶封片, 于显微镜下观察各组大鼠心肌组织病理变化并拍照。

2.5 参芪利心汤对心力衰竭大鼠心肌细胞超微结构的影响

取各组大鼠的左室心尖部心肌组织, 于 2.5% 戊二醛溶液中固定, 以预冷的 PBS 溶液漂洗 3 次, 于 1% 锇酸中固定, 梯度乙醇脱水, 环氧树脂包埋, 超薄切片后, 每个标本取 5 张切片, 于 TEM 下观察各组大鼠心肌细胞超微结构并拍照。

2.6 参芪利心汤对心力衰竭大鼠血浆 NT-proBNP 和心肌组织 ATP 含量的影响

取“2.4”项下血浆, 按 ELISA 试剂盒说明书检测各组大鼠血浆 NT-proBNP 含量; 取左室心肌组织, 经预冷裂解、研磨匀浆、离心, 提取组织蛋白并制备组织匀浆, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测各组大鼠心肌组织 ATP 含量。

2.7 参芪利心汤对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响

取各组大鼠左室心尖部心肌组织, 以预冷的

PBS 溶液清洗残留血污, 用机械法制备单细胞悬液。将心肌组织放置于 200 目不锈钢网上, 下置平皿, 先用眼科剪将组织剪碎, 轻柔搓洗组织, 边搓边用预冷的 PBS 溶液冲洗, 逐渐将组织搓完, 然后将平皿中的混悬液过 300 目滤网去除细胞块, 收集细胞悬液; 2000 r/min, 离心 5 min, 弃上清, 收集细胞; 重悬于 4 °C 预冷的 PBS 溶液中, 2000 r/min 离心 5 min, 洗涤细胞 2 次, 并调整细胞密度为 1×10^5 /mL。吸弃 PBS 溶液后将细胞重悬于 300 μL Binding Buffer, 加入 5 μL Annexin V-FITC 轻轻混匀, 室温避光孵育 15 min; 上机前 5 min 再加入 5 μL PI 染色, 补加 200 μL Binding Buffer, 采用流式细胞仪检测各组大鼠心肌细胞凋亡率。

2.8 参芪利心汤对心力衰竭大鼠心肌组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1α (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1α, PGC-1α) mRNA 表达的影响

取各组大鼠左室心尖部心肌组织, 按照试剂盒说明书提取组织总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence

基因名称	引物序列 (5'-3')	长度/bp
Bcl-2	F: CGACTTTCAGAGATGTCCA	223
	R: ATGCCGGTTCAGGTACTCAG	
Bax	F: TGCAGAGGATGATTGCTGAC	207
	R: GGAGGAAGTCCAGTGTCAG	
Caspase-3	F: ACGGACCTGTGGACCTGA	151
	R: GGCGCAAAGTGACTGGAT	
PGC-1α	F: GGGCACATCTGTTCTTCC	197
	R: TCCCGTAGTTCACTGGTC	
β-actin	F: CGTAAAGACCTCTATGCCAACA	131
	R: GGAGGAGCAATGATCTTGATCT	

2.9 参芪利心汤对心力衰竭大鼠心肌组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 和 p53 蛋白表达的影响

取各组大鼠左室心尖部心肌组织, 加入 500 μL 预冷的裂解液, 研磨、匀浆、冰上裂解、离心, 提取组织蛋白, 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, 37 °C 封闭 1 h; 分别加入重组 Bcl-2 抗体、重组 Bax 抗体、Caspase-3 抗体、p53 抗体 (1:2000) 和重组 β-actin 抗体 (1:10 000), 4 °C 孵育过夜, 用 TBST 洗涤 4 次, 10 min/次; 加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (1:2000), 37 °C 孵育 2 h, 用 TBST 洗涤 4 次,

10 min/次; 加入 ECL 超敏发光液, 于暗室内曝光、显影、定影, 采用凝胶成像分析系统拍照并用 Gel-Pro Analyzer 软件进行分析。

2.10 统计学方法

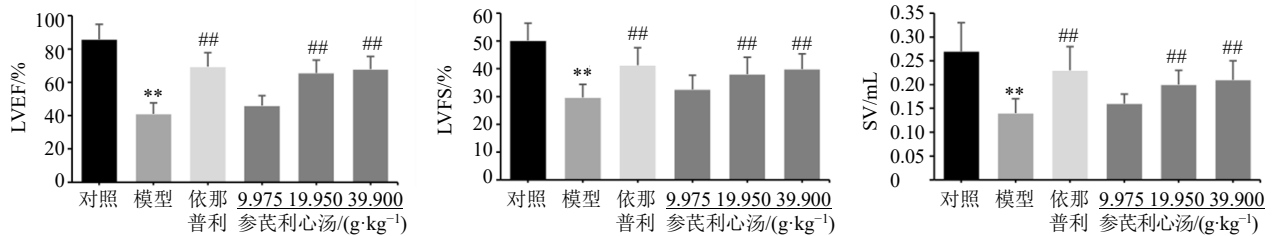
采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较满足正态分布及方差齐性的用 LSD-*t* 检验, 不满足正态分布及方差齐性的用

秩和检验, 多组间比较用单因素方差分析。

3 结果

3.1 参芪利心汤对心力衰竭大鼠心功能的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠 LVEF、LVFS 和 SV 均显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 参芪利心汤中、高剂量组和依那普利组大鼠 LVEF、LVFS 和 SV 均显著升高 ($P < 0.01$)。



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 图 4~7 同

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as fig. 4~7

图 1 参芪利心汤对心力衰竭大鼠心功能的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 13$)

Fig. 1 Effect of Shenqi Lixin Decoction on cardiac function in rats with heart failure ($\bar{x} \pm s$, $n = 13$)

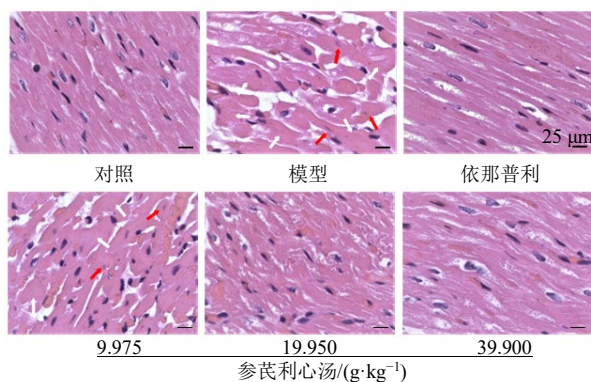
3.2 参芪利心汤对心力衰竭大鼠心肌组织病理变化的影响

如图 2 所示, 对照组大鼠心肌细胞结构清楚, 排列整齐、紧密, 无变性、坏死, 间质无水肿及充血, 无炎性细胞浸润。模型组大鼠心肌细胞排列紊乱, 严重肿胀, 变性、坏死, 肌纤维明显肿胀、断裂, 间质明显水肿, 伴炎性细胞浸润。参芪利心汤低剂量组大鼠心肌细胞排列紊乱、疏松, 部分肿胀、坏死, 肌纤维肿胀, 间质水肿, 少许炎性细胞浸润。参芪利心汤中剂量组大鼠心肌细胞排列稍紊乱、无

明显水肿, 肌纤维紊乱、结构不清, 间质轻度水肿。依那普利组和参芪利心汤高剂量组大鼠心肌细胞排列相对较齐, 细胞核增大、部分丢失, 肌纤维轻度肿胀、未见断裂, 间质稍水肿。

3.3 参芪利心汤对心力衰竭大鼠心肌细胞超微结构的影响

如图 3 所示, 对照组大鼠心肌细胞线粒体虽大小不一, 但结构完整、无肿胀, 内嵴清晰, 肌纤维排列整齐, 明暗带清楚; 模型组大鼠心肌细胞线粒

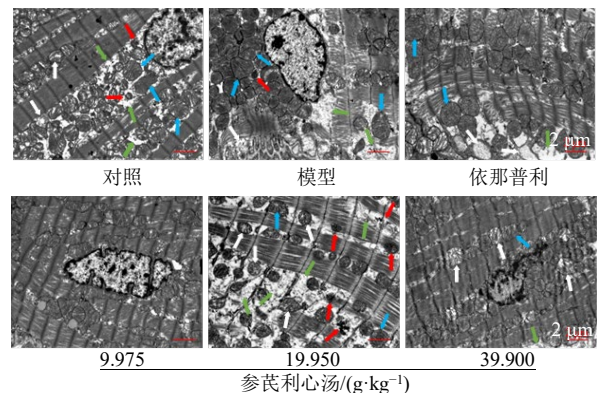


白色箭头表示细胞肿胀, 红色箭头表示细胞坏死

White arrow shows cell swelling, red arrow shows cell necrosis

图 2 参芪利心汤对心力衰竭大鼠心肌组织病理变化的影响 (HE, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of Shenqi Lixin Decoction on pathological changes of myocardial tissue in rats with heart failure (HE, $\times 400$)



蓝色箭头表示线粒体肿胀, 红色箭头表示线粒体溶解, 白色箭头表示内嵴溶解, 绿色箭头表示肌纤维溶解

Blue arrow shows swelling of mitochondria, red arrow shows lysis of mitochondria, white arrow shows internal ridge lysis, green arrow shows lysis of muscle fibers

图 3 参芪利心汤对心力衰竭大鼠心肌细胞超微结构的影响 ($\times 5000$)

Fig. 3 Effect of Shenqi Lixin Decoction on cardiomyocyte ultrastructure in rats with heart failure ($\times 5000$)

体结构不完整、肿胀、溶解、可见空泡样变，内嵴溶解、断裂，肌纤维水肿、严重溶解；参芪利心汤低剂量组大鼠心肌细胞线粒体部分肿胀、溶解、空泡样变，内嵴溶解，部分肌纤维溶解；参芪利心汤中剂量组大鼠心肌细胞线粒体排列紊乱，部分肿胀、极少溶解，未见空泡，小部分内嵴溶解，肌纤维部分溶解，较模型组减轻；参芪利心汤高剂量组和依那普利组大鼠心肌细胞线粒体部分肿胀，但结构尚完整、未见溶解，与模型组比较，大部分内嵴清晰、少溶解，肌纤维少溶解。

3.4 参芪利心汤对心力衰竭大鼠血浆 NT-proBNP 和心肌组织 ATP 含量的影响

如图 4 所示，与对照组比较，模型组大鼠血浆 NT-proBNP 含量显著升高，心肌组织 ATP 含量显著降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，参芪利心汤中、高剂量组和依那普利组大鼠血浆 NT-proBNP 含量

显著降低，心肌组织 ATP 含量显著升高 ($P<0.01$)。

3.5 参芪利心汤对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响

如图 5 所示，与对照组比较，模型组大鼠心肌细胞凋亡率显著升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，参芪利心汤中、高剂量组和依那普利组大鼠心肌细胞凋亡率均显著降低 ($P<0.01$)。

3.6 参芪利心汤对心力衰竭大鼠心肌组织 *Bcl-2*、*Bax*、*Caspase-3* 和 *PGC-1 α* mRNA 表达的影响

如图 6 所示，与对照组比较，模型组大鼠心肌组织 *Bcl-2* 和 *PGC-1 α* mRNA 表达水平均显著降低 ($P<0.01$)，*Bax* 和 *Caspase-3* mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，参芪利心汤中、高剂量组和依那普利组大鼠心肌组织 *Bcl-2* 和 *PGC-1 α* mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.01$)，*Bax* 和 *Caspase-3* mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.01$)。

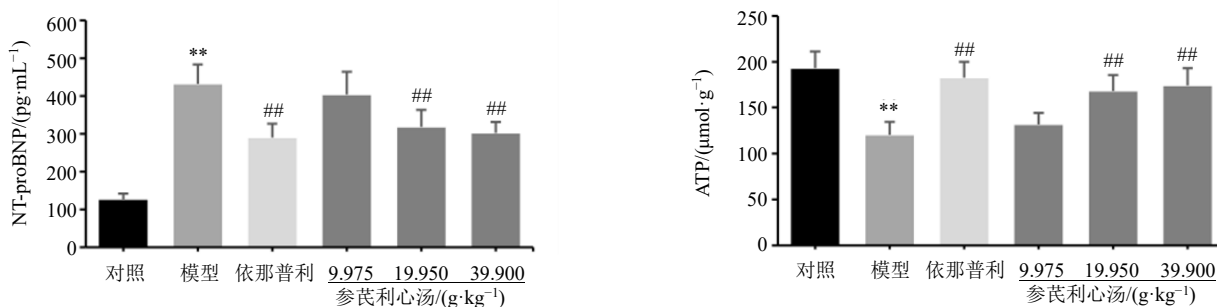


图4 参芪利心汤对心力衰竭大鼠血浆NT-proBNP和心肌组织ATP含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

Fig. 4 Effect of Shenqi Lixin Decoction on NT-proBNP content in plasma and ATP content in myocardial tissue in rats with heart failure ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

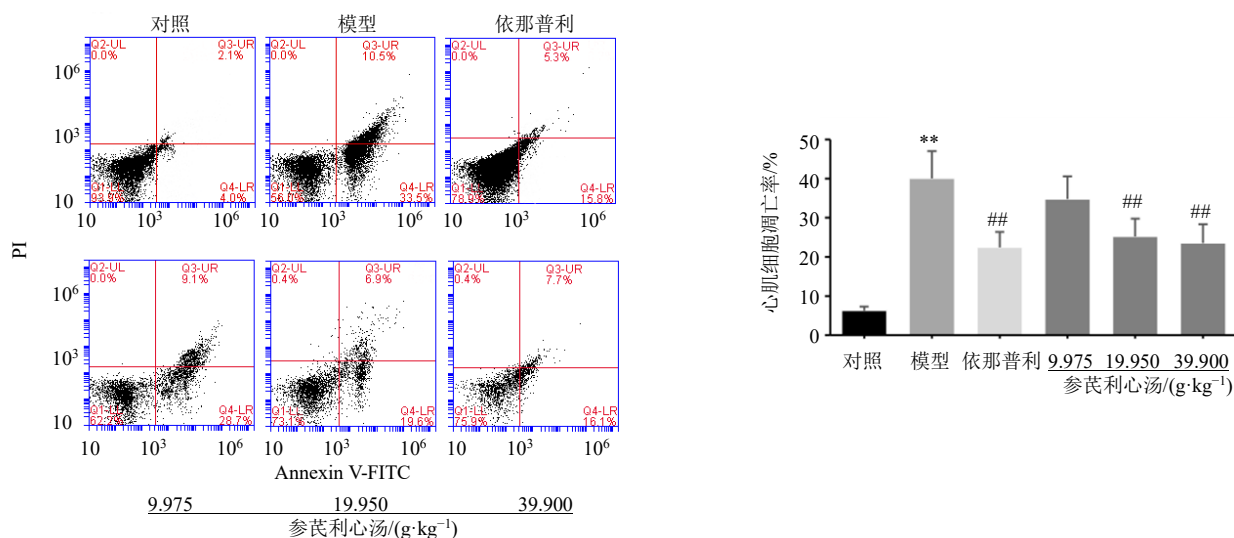


图5 参芪利心汤对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

Fig. 5 Effect of Shenqi Lixin Decoction on cardiomyocyte apoptosis in rats with heart failure ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

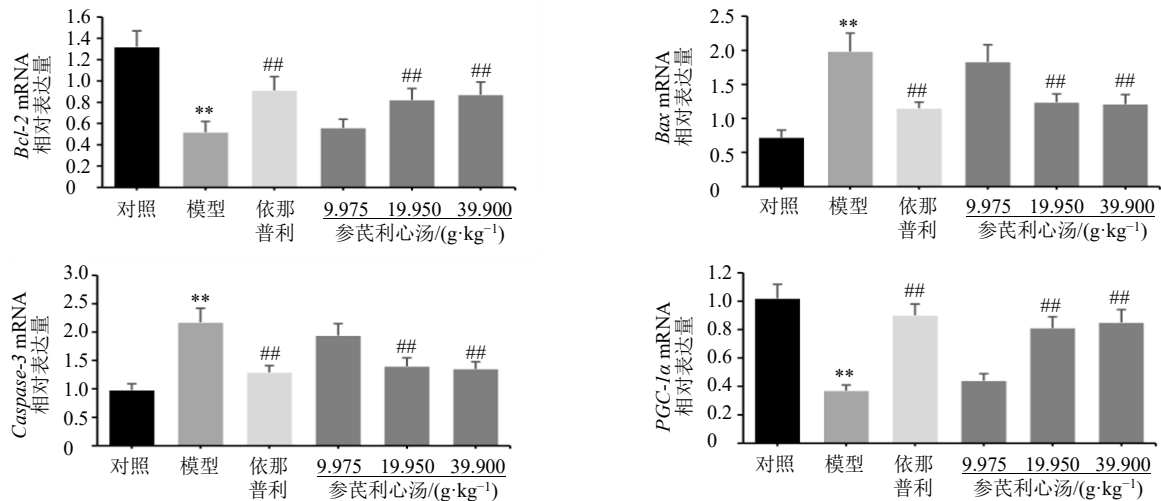


图 6 参芪利心汤对心力衰竭大鼠心肌组织 *Bcl-2*、*Bax*、*Caspase-3* 和 *PGC-1α* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effect of Shenqi Lixin Decoction on *Bcl-2*, *Bax*, *Caspase-3* and *PGC-1α* mRNA expressions in myocardial tissues of rats with heart failure ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.7 参芪利心汤对心力衰竭大鼠心肌组织 *Bcl-2*、*Bax*、*Caspase-3* 和 p53 蛋白表达的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠心肌组织 *Bcl-2* 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), *Bax*、*Caspase-3* 和 p53 蛋白表达水平均显著升高 ($P <$

0.01); 与模型组比较, 参芪利心汤中、高剂量组和依那普利组大鼠心肌组织 *Bcl-2* 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), *Bax*、*Caspase-3* 和 p53 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 表明参芪利心汤可通过调控凋亡相关蛋白, 抑制心肌细胞凋亡。

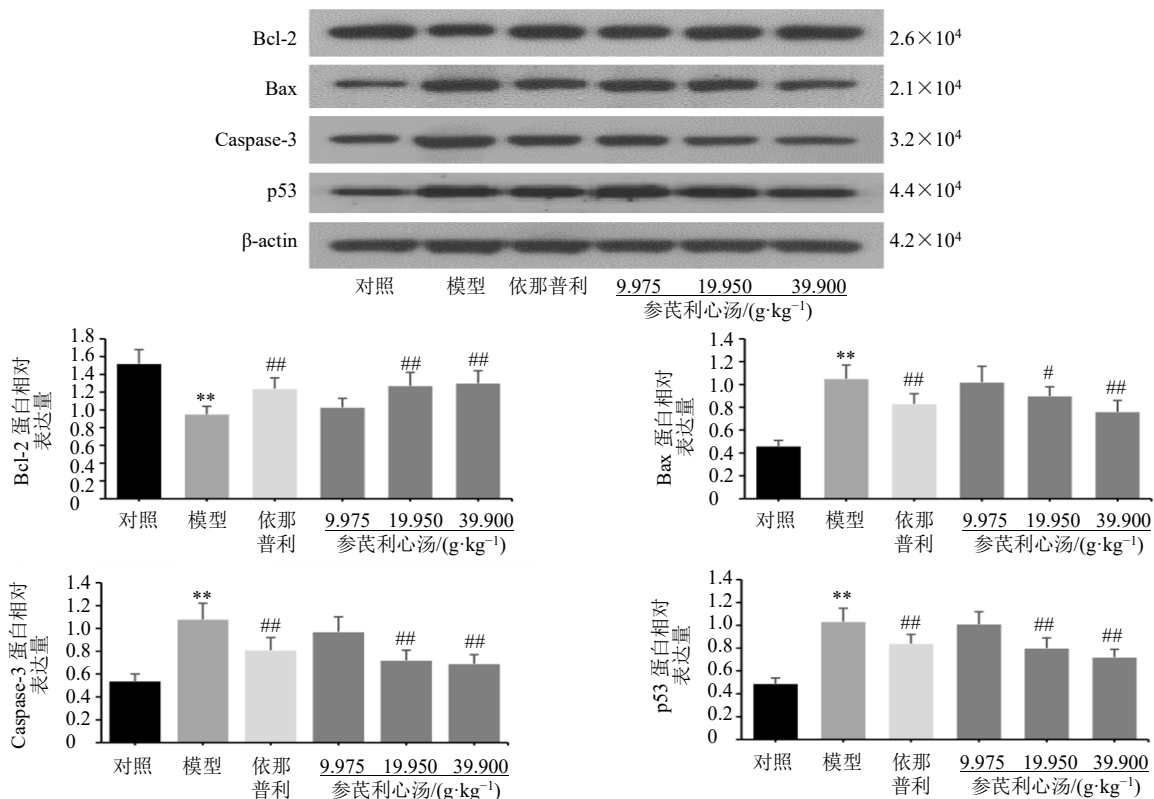


图 7 参芪利心汤对心力衰竭大鼠心肌组织 *Bcl-2*、*Bax*、*Caspase-3* 和 p53 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Effect of Shenqi Lixin Decoction on *Bcl-2*, *Bax*, *Caspase-3* and p53 protein expressions in myocardial tissues of rats with heart failure ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

心力衰竭的发生、发展机制一直是国内外心血管领域的研究热点。目前研究认为心力衰竭是一种慢性、自发进展性疾病,神经内分泌系统异常激活导致心肌重构是心力衰竭发生和发展的病理生理机制;而心肌细胞凋亡是其重要的病理基础,是心肌细胞丢失的主要原因,在心力衰竭的发病进程中起重要作用^[2]。因此有效地干预心肌细胞凋亡,可以减少心肌重构、延缓心力衰竭进展,从而改善心力衰竭的泵功能^[12]。本课题组前期的临床试验和动物实验表明参芪利心汤是改善心功能及血流动力学的有效方剂^[5-8],为了进一步考察参芪利心汤改善心功能与心肌细胞凋亡的相关性,本研究检测了各组大鼠的心功能超声指标、血浆 NT-proBNP 含量、心肌细胞凋亡率和相关凋亡基因及蛋白表达情况,发现与对照组相比,模型组大鼠心肌细胞凋亡率、血浆 NT-proBNP 含量显著升高,心功能指标显著降低,表明心力衰竭进程中存在严重的心肌细胞凋亡,引起心肌细胞大量丢失,导致心肌收缩功能障碍,进而引起心功能下降,这一结果符合心力衰竭的病理生理改变;经参芪利心汤干预后,大鼠心肌细胞凋亡率、血浆 NT-proBNP 含量降低,心功能指标升高,以中、高剂量组变化显著,表明参芪利心汤可以有效抑制心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡并改善心功能,且呈剂量相关性。本研究结果表明,参芪利心汤可以有效抑制心肌细胞凋亡、减少心肌细胞丢失、逆转心肌重构,从而改善心功能,与文献报道基本相符^[11]。同时本研究发现,依那普利为临床上最常用的血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI)类药物,可以显著减少心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡并改善心功能,与文献报道相符^[13],参芪利心汤中、高剂量组大鼠心肌细胞凋亡率、血浆 NT-proBNP 含量及心功能各指标与依那普利组相比无显著差异,表明中、高剂量参芪利心汤抑制心肌细胞凋亡、改善心功能的作用与依那普利相当。

心脏是一个高动力、高耗能、高代谢的人体重要器官,需要大量的能量来维持其正常的生理功能及代谢需求,而线粒体是人体能量代谢的主要细胞器,心脏中含有丰富的线粒体,约占心肌细胞体积的 40%~60%。ATP 是细胞各项生命活动所需的最直接能量来源,正常成人心中 60%~80%能量来源于心肌细胞线粒体脂肪酸 β 氧化产生的 ATP。研

究发现,衰竭心脏的线粒体脂肪酸 β 氧化能力显著下降,心力衰竭患者的心脏 ATP 含量与正常人相比下降 30%~40%^[14]。本研究结果显示,与对照组相比,模型组大鼠心肌组织 ATP 含量显著降低,经参芪利心汤干预后大鼠心肌组织 ATP 含量升高,以中、高剂量组变化显著。PGC-1 α 是促进线粒体生物合成、增强呼吸功能和能量代谢的关键调节因子,在机体的各种能量代谢过程中发挥重要作用^[15]。PGC-1 α 主要通过调节心肌线粒体的耦联呼吸、促进心肌 ATP 产生,进而调节心脏的收缩功能^[16]。心肌组织中 PGC-1 α 表达相对丰富,新生儿的心肌组织中 PGC-1 α 过表达,伴有线粒体的激活、糖酵解到脂肪酸 β 氧化的代谢转换^[17];心肌组织中 PGC-1 α 的缺失则会使线粒体生物合成及能量代谢障碍,导致心功能下降、心力衰竭和猝死^[17]。本研究发现,与对照组相比,模型组大鼠心肌组织 PGC-1 α mRNA 表达水平显著降低,经参芪利心汤干预后大鼠心肌组织 PGC-1 α mRNA 表达水平显著升高。本研究结果表明,心力衰竭时心肌组织中 PGC-1 α 表达下降,引起 ATP 含量降低,进而导致线粒体能量代谢障碍,难以维持正常心肌活动的能量需求,与文献报道一致^[14,18];参芪利心汤可以显著上调心力衰竭大鼠心肌组织中 PGC-1 α mRNA 表达,升高 ATP 含量,从而改善心肌线粒体能量代谢、减少细胞凋亡、改善心功能。参芪利心汤的上述作用与其方中君药人参、黄芪密不可分,现代药理学研究表明,人参富含人参皂苷 Rg1,可以上调心肌细胞 PGC-1 α 表达,提高心肌组织 ATP 含量,改善心肌能量代谢^[19];黄芪富含黄芪多糖,可以调控心肌组织 PGC-1 α 表达,提高 ATP 与二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)、ATP 与一磷酸腺苷(adenosine monophosphate, AMP)比值,增加能量供应,减少心肌凋亡^[20]。

心肌细胞凋亡是心力衰竭进程中的重要病理环节,是心力衰竭从代偿走向失代偿的关键转折点,受多种凋亡相关基因的调控。心肌线粒体不仅是生物合成及能量代谢的工厂,更是心肌细胞凋亡的调控中心,主要受 Bcl-2 蛋白家族的调控,包括抗凋亡蛋白如 Bcl-2、Bcl-xl 和促凋亡蛋白如 Bax、Bad,其中 Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 蛋白家族中的最重要成员,Bcl-2 与 Bax 比值决定细胞的生存或死亡^[21-22]。抗凋亡蛋白 Bcl-2 主要驻留在线粒体外膜,可保持线粒体的完整性,控制线粒体通透性转换孔

(mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 的开放, 抑制细胞色素 C 的释放; 促凋亡蛋白 Bax 则主要驻留在细胞质中, 可降低线粒体膜电位, 引起外膜通透性增加, 导致大量细胞色素 C 及部分凋亡前体如凋亡诱导因子 (apoptosis-inducing factor, AIF) 释放到细胞质中, 而细胞色素 C 激活 Apaf-1, 并与 Caspase-9 形成凋亡体, 进一步激活 Caspase-3 和 Caspase-7, 从而诱导细胞凋亡^[23]。本研究发现, 与对照组相比, 模型组大鼠心肌组织 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达水平显著降低, Bax、Caspase-3 mRNA 及蛋白表达水平显著升高, 心肌细胞凋亡率显著升高; 经中、高剂量参芪利心汤干预后, 大鼠心肌组织 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达水平显著升高, Bax、Caspase-3 mRNA 及蛋白表达水平显著降低, 心肌细胞凋亡率显著降低。p53 是促细胞凋亡的转录因子, 其表达产物为 p53 蛋白, 参与心肌细胞凋亡, 诱导并加速心力衰竭的进展^[24]。心肌细胞 DNA 受损后, 激活的 p53 蛋白诱导 Bax 转录、上调 Bax 蛋白表达, 同时诱导 Noxa 和 Puma 转录, Noxa、Puma 竞争性地与 Bcl-2 结合, 下调 Bcl-2 表达^[25], 导致 Bcl-2 与 Bax 比值降低, 从而启动线粒体凋亡途径诱导心肌细胞凋亡, 加速心力衰竭发展^[26]。p53 抑制剂能够减轻过氧化氢诱导的心肌细胞凋亡, 从而改善心功能^[27]。此外, p53 蛋白可破坏心肌受损线粒体自噬降解的能力, 导致心肌线粒体功能障碍, 促进心力衰竭发展^[28]。本研究发现, 与对照组相比, 模型组大鼠心肌组织 p53 蛋白表达水平显著升高, Bax、Caspase-3 蛋白表达水平显著升高, Bcl-2 蛋白表达显著降低, 同时心肌细胞凋亡率显著升高, 表明 p53 介导线粒体凋亡途径, 促进心肌细胞凋亡, 与文献报道相符^[25-26]; 与模型组相比, 经中、高剂量参芪利心汤干预后, 大鼠心肌组织 p53 蛋白表达水平显著降低, Bax、Caspase-3 蛋白表达水平显著降低, Bcl-2 蛋白表达水平显著升高, 同时心肌细胞凋亡率显著降低, 表明心力衰竭进程中存在线粒体凋亡途径介导的心肌细胞凋亡, 参芪利心汤可以双向调节心肌细胞凋亡相关基因的表达, 既能上调抗凋亡基因 Bcl-2 表达, 又能下调促凋亡基因 Bax、Caspase-3、p53 表达, 从线粒体凋亡途径上干预心肌细胞凋亡、减少心肌细胞丢失, 从而逆转心肌重构、改善心功能, 这可能是其改善心力衰竭的作用机制之一。参芪利心汤的上述作用可能与其方中含有人参、黄芪、丹参、淫羊藿等药材有关, 现代药

理学研究表明, 参芪利心汤主要含人参皂苷、黄芪甲苷、丹参酮酸及淫羊藿苷等成分, 其中人参皂苷可以通过抑制心力衰竭大鼠心肌细胞 Caspase-3 蛋白表达, 减少细胞凋亡, 降低血清脑钠素水平, 从而改善心功能^[29]; 黄芪甲苷能够保护线粒体功能, 降低细胞色素 C 释放, 阻断线粒体凋亡途径, 抑制心肌细胞凋亡^[30-31]; 丹参酮 II_A 可以抑制心肌细胞 Bax、p53 蛋白表达, 从而减少心肌细胞凋亡^[32]; 淫羊藿苷可以通过下调心肌组织 p53 和 Caspase-3 蛋白表达, 从而抑制心肌细胞凋亡^[33]。

综上所述, 参芪利心汤能够改善心力衰竭大鼠的心肌结构、心肌组织能量代谢及心功能, 并减少心肌细胞凋亡, 其作用机制可能与调控 PGC-1 α 和线粒体凋亡途径相关基因及蛋白的表达有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华医学会心血管病学分会心力衰竭学组, 中国医师协会心力衰竭专业委员会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018 [J]. 中华心血管病杂志, 2018, 46(10): 760-789.
- [2] 国家卫生计生委合理用药专家委员会, 中国药师协会. 心力衰竭合理用药指南 [J]. 中国医学前沿杂志: 电子版, 2016, 8(9): 19-66.
- [3] 毛静远, 朱明军. 慢性心力衰竭中医诊疗专家共识 [J]. 中医杂志, 2014, 55(14): 1258-1260.
- [4] 陈可冀, 吴宗贵, 朱明军, 等. 慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(2): 133-141.
- [5] 孙雪平, 刘莉, 邹国良, 等. 参芪益心汤加减治疗慢性心力衰竭 60 例临床观察 [J]. 中医药信息, 2013, 30(3): 87-89.
- [6] 刘莉, 高晶, 金娟. 刘莉运用参芪益心汤加减治疗慢性心力衰竭临床经验 [J]. 中医药临床杂志, 2015, 27(9): 1243-1245.
- [7] 金娟, 崔璐, 邹国良, 等. 参芪益心方对阿霉素诱导的慢性心力衰竭大鼠心肌结构和细胞因子的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(8): 128-132.
- [8] 吴伦, 苏阳, 田振坤, 等. 参芪利心方对心衰大鼠血流动力学及 ANP、ALD、AngII 的影响 [J]. 中医药学报, 2016, 44(6): 44-47.
- [9] 吴伦, 苏阳, 陈晓宇, 等. 参芪利心胶囊的提取工艺研究 [J]. 中国药师, 2017, 20(4): 624-628.
- [10] Wu S J, Zhu L Q, Yang J, et al. Hydrogen-containing saline attenuates doxorubicin-induced heart failure in rats [J]. Pharmazie, 2014, 69(8): 633-636.
- [11] 王庆涛, 王玉璟. 不同给药方式建立阿霉素心肌病模

- 型的评价 [J]. 长江大学学报: 自然科学版, 2017, 14(12): 80-83.
- [12] Kang P M, Izumo S. Apoptosis in heart: Basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases [J]. *Trends Mol Med*, 2003, 9(4): 177-182.
- [13] 蔡智荣, 孙婷, 王仁萍, 等. 依那普利对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡及凋亡基因 bcl-2、Bax 的影响 [J]. 临床心血管病杂志, 2005, 21(3): 158-161.
- [14] Osorio J C, Stanley W C, Linke A, *et al.* Impaired myocardial fatty acid oxidation and reduced protein expression of retinoid X receptor- α in pacing-induced heart failure [J]. *Circulation*, 2002, 106(5): 606-612.
- [15] Liu C, Lin J D. PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2011, 43(4): 248-257.
- [16] Ruiz-Velasco A, Liu W, Wang X. T4 ERK5 degradation: A turning point from compensated metabolic cardiomyopathy to heart failure [J]. *Heart*, 2018, 104: A2.
- [17] Hauck L, Stanley-Hasnain S, Fung A, *et al.* Cardiac-specific ablation of the E3 ubiquitin ligase Mdm2 leads to oxidative stress, broad mitochondrial deficiency and early death [J]. *PLoS One*, 2017, 12(12): e0189861.
- [18] Ashok D, Sidor A, O'Rourke B. Enhancing mitochondrial biogenesis with a CRISPR/ndCas9 adenoviral vector system in cardiomyocytes [J]. *Biophys J*, 2018, 114(3): 662a.
- [19] 于胜男, 曹琼丹, 鲁美丽, 等. 黄芪多糖对糖尿病大鼠心肌细胞凋亡的影响 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(4): 102-105.
- [20] 孙娜, 王洪新, 鲁美丽. 人参皂苷 Rg₁ 通过 SIRT1/PGC-1 α 信号通路抑制 AngII 诱导乳鼠心肌细胞肥大的研究 [J]. 中药药理与临床, 2019, 35(5): 69-73.
- [21] 孙彬翔, 李小江, 蔡启亮, 等. 新加生脉饮对阿霉素所致心肌细胞凋亡及 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达的影响 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 433-438.
- [22] Chen C, Cui J, Lu H Z, *et al.* Modeling of the role of a Bax-activation switch in the mitochondrial apoptosis decision [J]. *Biophys J*, 2007, 92(12): 4304-4315.
- [23] Youle R J, Strasser A. The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(1): 47-59.
- [24] 刘茜, 魏玲. p53 基因及其相关蛋白与心血管疾病关系的研究进展 [J]. 医学综述, 2013, 19(20): 3692-3694.
- [25] Helton E S, Chen X B. p53 modulation of the DNA damage response [J]. *J Cell Biochem*, 2007, 100(4): 883-896.
- [26] Xia P, Liu Y N, Cheng Z K. Signaling pathways in cardiac myocyte apoptosis [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 1-22.
- [27] Zhang Y, Köhler K, Xu J, *et al.* Inhibition of p53 after acute myocardial infarction: Reduction of apoptosis is counteracted by disturbed scar formation and cardiac rupture [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(3): 471-478.
- [28] Hoshino A, Mita Y, Okawa Y, *et al.* Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial dysfunction in the mouse heart [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2308.
- [29] 陈徐彬. 人参总皂苷对慢性心衰大鼠血清 BNP 和心肌细胞 Caspase-3 蛋白表达的影响 [J]. 中国中医药科技, 2016, 23(6): 674-676.
- [30] 关凤英, 李红, 杨世杰. 黄芪甲苷预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤后细胞凋亡的保护作用及机制研究 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1146-1150.
- [31] 胡鸣旭, 刘莉. 黄芪甲苷对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(1): 40-42.
- [32] 王建刚, 江凤林, 冯俊, 等. 丹参酮 II_A 对血管紧张素 II 诱导的心肌细胞肥大与凋亡干预的研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(18): 2202-2204.
- [33] 钱志强, 王颖婉, 李叶丽, 等. 淫羊藿苷通过抑制 Caspase3 激活减轻自发性高血压大鼠心肌细胞凋亡 [J]. 遵义医学院学报, 2015, 38(5): 450-453.

[责任编辑 李亚楠]