

苓桂术甘汤通过调节 MCU-mtCa²⁺通路恢复线粒体自噬稳态改善大鼠心肌梗死后心力衰竭

王 荣¹, 王 芳^{1,2}, 黄圣意¹, 黄金玲^{1*}

1. 安徽中医药大学中西医结合学院, 安徽 合肥 230012

2. 拉萨市人民医院, 西藏 拉萨 850000

摘要: 目的 探讨苓桂术甘汤(Lingui Zhugan Decoction, LGZGD)通过调控线粒体钙单向转运体(mitochondrial calcium uniporter, MCU)-线粒体钙(mitochondrial calcium, mtCa²⁺)通路介导的线粒体自噬,改善心肌梗死(myocardial infarction, MI)后心力衰竭(heart failure, HF)的分子机制。方法 构建大鼠MI后HF模型及H₂O₂诱导的H9c2心肌细胞损伤模型,设置假手术组、模型组、LGZGD组和卡托普利组,并结合MCU敲低或过表达进行干预;采用超声心动图、Masson染色、透射电子显微镜分别检测大鼠心功能、心肌纤维化程度、线粒体超微结构,通过qRT-PCR、Western blotting检测线粒体自噬及线粒体功能相关基因和蛋白的表达水平,检测活性氧(reactive oxygen species, ROS)、mtCa²⁺水平并定量分析心肌损伤标志物,利用共聚焦显微镜观察细胞自噬流变化。结果 与假手术组比较,MI后HF大鼠心功能显著下降,心肌纤维化和线粒体损伤加重,线粒体自噬相关基因转录失调,MCU转录水平显著上调($P<0.001$);H₂O₂诱导的H9c2细胞ROS、mtCa²⁺水平显著升高,自噬流受阻,心肌损伤标志物水平显著上升($P<0.01$)。与模型组比较,LGZGD组可显著改善MI后HF大鼠心功能,减轻心肌纤维化和线粒体损伤,下调MCU表达($P<0.01$),调控自噬及线粒体自噬相关基因表达($P<0.05$ 、 0.01);细胞水平上LGZGD可降低H₂O₂诱导的H9c2细胞ROS、mtCa²⁺水平,恢复线粒体形态和自噬流,降低心肌损伤标志物水平($P<0.01$)。MCU敲低可增强LGZGD的心脏保护效果,MCU过表达则加剧细胞损伤,LGZGD可有效逆转MCU过表达造成的细胞损伤,并改善氧化应激相关酶紊乱($P<0.05$ 、 0.01)。结论 LGZGD通过恢复MCU-mtCa²⁺稳态、促进线粒体自噬流,减轻氧化应激损伤,改善MI后HF。

关键词: 苓桂术甘汤; 心力衰竭; 线粒体自噬; 线粒体钙单向转运体; 氧化应激; 茯苓酸B; 肉桂酸; 白术内酯III; 甘草次酸
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)12-4693-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.12.015

Lingui Zhugan Decoction improves heart failure after myocardial infarction in rats by restoring mitophagy homeostasis via regulating MCU-mtCa²⁺ pathway

WANG Rong¹, WANG Fang^{1,2}, HUANG Shengyi¹, HUANG Jinling¹

1. Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

2. Lhasa People's Hospital, Lhasa 850000, China

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanism by which Lingui Zhugan Decoction (Lingui Zhugan Decoction, LGZGD) ameliorates heart failure (HF) after myocardial infarction (MI) via regulating mitophagy mediated by mitochondrial calcium uniporter (MCU)-mitochondrial calcium (mtCa²⁺) signaling pathway. **Methods** Rat models of post-MI HF and hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced H9c2 cardiomyocyte injury models were established. For *in vivo* experiments, rats were assigned to sham group, model group, LGZGD group and captopril group. For *in vitro* experiments, H9c2 cells were divided into corresponding groups with additional interventions of MCU knockdown or overexpression. Echocardiography, Masson staining and transmission electron microscopy were performed to evaluate rat cardiac function, myocardial fibrosis and mitochondrial ultrastructure, respectively. The mRNA and protein

收稿日期: 2026-02-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81973844); 安徽省重点研究与开发计划项目(201904a07020109); 安徽中医药大学研究生科技创新基金资助项目(2021ZC09); 黄金玲安徽省名中医工作室(2025)

作者简介: 王 荣, 博士研究生, 从事中药复方效用机制与物质基础研究。E-mail: wr976016756@163.com

*通信作者: 黄金玲, 博士, 教授, 从事中药复方效用机制与物质基础研究。E-mail: jinling6181@126.com

expression levels of genes related to mitophagy and mitochondrial function were detected by qRT-PCR and Western blotting. The levels of reactive oxygen species (ROS) and mtCa^{2+} were measured, myocardial injury markers were quantitatively analyzed, and changes in cellular autophagic flux were observed using confocal laser scanning microscopy. **Results** Compared with sham group, rats with post-MI HF exhibited significantly impaired cardiac function, aggravated myocardial fibrosis and mitochondrial damage, dysregulated transcription of mitophagy-related genes, and markedly upregulated *MCU* transcription level ($P < 0.001$). In H_2O_2 -stimulated H9c2 cells, ROS and mtCa^{2+} levels were significantly increased, autophagic flux was blocked, and myocardial injury marker levels were notably elevated ($P < 0.01$). Compared with model group, LGZGD treatment significantly improved cardiac function, alleviated myocardial fibrosis and mitochondrial damage, downregulated *MCU* expression ($P < 0.01$), regulated the mRNA expressions of autophagy and mitophagy-related genes in post-MI HF rats ($P < 0.05, 0.01$). At the cellular level, LGZGD reduced ROS and mtCa^{2+} levels in H_2O_2 -injured H9c2 cells, restored mitochondrial morphology and autophagic flux, and decreased myocardial injury marker levels ($P < 0.01$). *MCU* knockdown enhanced the cardioprotective effect of LGZGD, whereas *MCU* overexpression exacerbated cellular injury. LGZGD effectively reversed *MCU* overexpression-induced cellular damage and ameliorated the dysregulation of oxidative stress-related enzymes ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** LGZGD alleviates oxidative stress injury and improves post-MI heart failure by restoring *MCU*- mtCa^{2+} homeostasis and promoting mitochondrial autophagic flux.

Key words: Lingui Zhugan Decoction; heart failure; mitophagy; mitochondrial calcium uniporter; oxidative stress; pachymic acid B; cinnamic acid; atractylenolide III; glycyrrhetic acid

心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 后心力衰竭 (heart failure, HF) 是 21 世纪公共卫生领域面临的重大挑战^[1]。全球有 5 500~6 400 万人受 HF 影响, 现有疗法仍无法有效治愈该疾病^[2-3]。MI 发生后, 冠状动脉急性闭塞导致心肌供血中断, 缺血区心肌细胞迅速发生能量代谢障碍、离子稳态紊乱和氧化应激爆发^[4]。随着缺血时间延长, 心肌细胞经历坏死、凋亡和自噬性死亡等多种形式的细胞死亡, 梗死区域逐渐扩大^[5]。存活的心肌细胞为维持心输出量而发生代偿性肥厚, 但长期负荷过重导致心肌重构失代偿, 心腔扩大、室壁变薄, 最终发展为 HF^[6]。在这一病理进程中, 线粒体功能障碍是驱动 MI 向 HF 进展的核心环节^[5]。心肌细胞是高能量需求细胞, 其收缩功能高度依赖线粒体氧化磷酸化供能^[7]。MI 后, 缺血缺氧导致线粒体结构破坏、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 合成急剧下降, 同时电子传递链功能障碍引发活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 大量生成, 形成恶性循环^[7-8]。ROS 进一步损伤线粒体 DNA、蛋白质和脂质, 加剧线粒体功能障碍, 最终导致心肌细胞死亡和心功能恶化^[9]。

线粒体钙 (mitochondrial calcium, mtCa^{2+}) 稳态失衡是 MI 后线粒体功能障碍的关键病理因素^[10-11]。线粒体钙单向转运体 (mitochondrial calcium uniporter, *MCU*) 作为介导 mtCa^{2+} 摄取的主要通道, 在能量代谢、氧化应激和细胞命运调控中占据核心地位^[12]。生理条件下, 受调控的 *MCU* 介导钙内流支持线粒体氧化还原代谢, 维持心肌细胞正常收缩

功能; 而 MI 后病理状态下, *MCU* 过度激活会导致 mtCa^{2+} 超载, 触发线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 开放、膜电位崩溃及 ATP 合成终止, 最终诱导心肌细胞坏死和凋亡^[12-13]。此外, MI 后 HF 进展中, 线粒体单胺氧化酶 A (mitochondrial monoamine oxidase A, MAOA) 作为 ROS 的重要来源, 可催化儿茶酚胺类神经递质氧化脱氨, 产生大量过氧化氢 (hydrogen peroxide, H_2O_2), 进而诱导脂质过氧化并形成高反应活性的 4-羟基壬烯醛 (4-hydroxynonenal, 4-HNE)^[14-15]。4-HNE 通过共价修饰线粒体钙摄取调节蛋白 1 (mitochondrial calcium uptake 1, *MICU1*) 解除其对 *MCU* 的抑制, 同时作用于电压依赖性阴离子通道 1 (voltage-dependent anion channel 1, *VDAC1*) 促进 mtCa^{2+} 内流, 双重途径协同加剧 *MCU* 介导的钙超载, 进一步诱发 mPTP 开放和线粒体功能障碍^[16-18]。线粒体自噬作为清除受损线粒体、维持线粒体稳态的关键保护机制, 生理状态下可通过 PTEN 诱导激酶 1 (PTEN-induced putative kinase 1, *PINK1*)-帕金森病相关蛋白 (Parkinson's disease-associated protein, *Parkin*) 通路和 FUN14 结构域包含蛋白 1 (FUN14 domain containing 1, *FUNDC1*) 通路, 将受损线粒体包裹形成自噬体, 随后与溶酶体融合完成降解, 从而防止 ROS 过度积累和钙超载^[19-20]。但 MI 后持续氧化应激会导致线粒体自噬流严重受损, 具体表现为 *PINK1/Parkin* 通路受抑、*FUNDC1* 表达下调、p62 蓄积及微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated

protein 1 light chain 3, LC3) 转化障碍。受损线粒体无法及时清除而持续积累, 会进一步增加 ROS 生成、加剧 MCU 介导的钙超载, 形成“线粒体损伤-自噬障碍-ROS/钙超载-线粒体进一步损伤”的恶性循环^[21-22]。该循环不断放大心肌细胞损伤, 加速心室重构进程, 也是 MI 后 HF 难以逆转的重要原因^[18]。因此, 恢复线粒体自噬功能、纠正 MCU-mtCa²⁺通路紊乱, 是改善 MI 后 HF 的潜在治疗策略。

中医药具有多成分、多靶点的治疗特点, 为应对 HF 复杂的病理生理过程 (包括氧化应激、钙失调、炎症和能量代谢障碍) 提供了整体调控框架^[23-25]。中医经典方剂苓桂术甘汤 (Lingui Zhugan Decoction, LGZGD) 记载于《金匱要略》, 是一种具有 1 600 多年历史的传统中药方剂, 由茯苓、桂枝、白术和甘草组成^[26-27]。该方具有温阳化饮、健脾利湿之功效, 现代药理学研究表明其具有显著的心脏保护作用, 能够调控能量代谢和氧化应激相关通路^[24,28-29]。已有研究发现, LGZGD 在慢性疾病模型中对氧化应激、蛋白水解活性和自噬信号通路具有多靶点调控作用, 可保护心肌细胞和神经元细胞免受损伤诱导的氧化损伤、炎症和凋亡^[14,17,24,30]。然而, LGZGD 是否通过调控 MCU-mtCa²⁺通路介导的线粒体自噬发挥心脏保护作用尚不明确。本研究通过建立大鼠 MI 后 HF 模型和 H₂O₂ 诱导的心肌细胞损伤模型, 旨在阐明 LGZGD 通过靶向 MCU-mtCa²⁺介导的线粒体自噬通路改善 MI 后 HF 的分子机制, 为临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 (180±20) g, 6~8 周龄, 购自辽宁长生生物技术有限公司, 动物合格证号 SCXK (辽) 2023-0001。大鼠饲养于安徽中医药大学动物实验中心, 温度 23~25 °C, 相对湿度 40%~60%, 光照周期设置为 12 h 明暗交替, 并确保通风系统正常运行。所有实验流程均经安徽中医药大学动物伦理审查委员会批准 (批准号 AHUCM-rats-2023076、2023114)。

H9c2 细胞源自胚胎 BD1X 大鼠心脏组织的心肌母细胞系, 由本实验室保存。

1.2 药材

苓桂术甘汤按茯苓、桂枝、白术、甘草质量比 4:3:3:2 配伍组成。各饮片 (批号分别为 2005181、2002202、2005181、1911041) 均购自安徽

普仁中药饮片有限公司, 经安徽中医药大学黄金玲教授分别鉴定为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核、樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝、菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。

1.3 药品与试剂

卡托普利片 (批号 23080111) 购自常州制药厂有限公司; H₂O₂ (批号 C0404510123) 购自南京化学试剂股份有限公司; 雷帕霉素 (批号 V900930)、兔抗 p62 多克隆抗体 (批号 P0067)、兔抗 LC3 单克隆抗体 (批号 L7543) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; Masson 染色试剂盒 (批号 G1340) 购自北京索莱宝科技有限公司; JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒 (批号 100-117) 购自信天翁生物科技 (广州) 有限公司; Rhod-2 AM (批号 HB190625) 购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; MitoTracker Green 试剂盒 (批号 C1996S)、Lyso-Tracker Green 试剂盒 (批号 C1047S)、Mito-Tracker Deep Red 试剂盒 (批号 S0033S)、DCFH-DA 试剂盒 (批号 S0033S)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒 (批号 C0016)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 A0208)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗 (批号 A0216) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 4-HNE ELISA 试剂盒 (批号 MM-92588801) 购自深圳易致生物技术有限公司; 谷胱甘肽 (glutathione, GSH) ELISA 试剂盒 (批号 E-EL-0026) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; RNA 提取试剂盒 (批号 KR118-02) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 一步法 qRT-PCR 试剂盒 (批号 Q221-01)、Lipofectamine 3000 (批号 TL301-01) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 肌酸激酶 (creatine kinase, CK) 检测试剂盒 (批号 SBJ-R0888) 购自南京森贝伽生物技术有限公司; 兔抗 β -tubulin 多克隆抗体 (批号 10068-1-AP)、兔抗 PINK1 多克隆抗体 (批号 23274-1-AP)、兔抗 Parkin 多克隆抗体 (批号 14060-1-AP)、兔抗 GAPDH 多克隆抗体 (批号 10494-1-AP)、兔抗 FUNDC1 多克隆抗体 (批号 28519-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; 兔抗 β -actin 单克隆抗体 (批号 AC038) 购自武汉爱博泰克生物技术有限公司; 兔抗 VDAC1 多克隆抗体 (批号 sc-98708) 购自美国 Santa Cruz 公司; 兔抗 MCU 多克隆抗体 (批号 bs-20189R)、兔抗 MAOA 多克隆抗体 (批号 bs-6679R) 购自北京博奥

森生物技术有限公司；兔抗自噬相关蛋白 5 (autophagy related protein 5, ATG5) 单克隆抗体 (批号 ab108327) 购自英国 Abcam 公司；MCU 敲低质粒 (sh-MCU) 购自汉恒生物科技 (上海) 有限公司；MCU 过表达质粒由本实验室构建；RFP-GFP-LC3 质粒由王林教授惠赠。

1.4 仪器

HT7700 型透射电子显微镜 (日本日立高新技术公司)；INNO6 VET 型便携式彩色多普勒超声成像系统 (飞依诺科技有限公司)；LightCycler96 型实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司)；N60 型微量紫外分光光度计 (德国 Implen 公司)；Nikon Eclipse E100 型正置光学显微镜 (日本尼康公司)；DMi8 型倒置荧光显微镜 (德国 Leica 公司)；k3 型全波长酶标仪 (美国赛默飞世尔科技公司)；ECG-2303B 型数字心电图机 (广州三锐电子科技有限公司)；IC1000 型细胞计数仪器 [艾力特生物科技 (上海) 有限公司]；CytoFLEX LX 型流式细胞分析仪 [贝克曼库尔特国际贸易 (上海) 有限公司]；LSM980 型激光共聚焦显微镜 (德国蔡司公司)。

2 方法

2.1 LGZGD 的制备

根据本课题组已建立的方法^[31]制备 LGZGD，所得水煎液密封、避光，于 4 °C 条件下保存。采用高效液相色谱-质谱联用 (HPLC-MS) 定量检测 LGZGD 中的 4 种主要成分，结果显示，LGZGD 含茯苓酸 B 0.125 mg/g、肉桂酸 2.63 mg/g、白术内酯 III 0.413 mg/g、甘草次酸 0.155 mg/g。

2.2 LGZGD 含药血清的制备

将 20 只大鼠随机分为空白组和 LGZGD (8.4 g/kg) 组，每组 10 只，给药组每日固定时间 ig LGZGD 水煎液，空白组 ig 等体积的生理盐水，连续给药 7 d。末次给药 1 h 后 (血药达峰时间)，采用异氟醚麻醉大鼠，腹主动脉无菌采血，血液室温静置 2 h 后，4 °C、3 000 r/min 离心 15 min，分离上层血清，同组血清合并混匀，56 °C 水浴 30 min 热灭活补体，经 0.22 μm 微孔滤膜无菌滤过后，分装冻存于 -80 °C 冰箱备用。以上流程和剂量按照课题组已建立的体系操作^[32]。本研究含药血清制备采用 8.4 g/kg 剂量，为体内实验剂量的 2 倍，该设置遵循中药血清药理学“等效剂量加倍法”原则，同时基于课题组前期实验结果确定。中药复方经大鼠胃肠道吸收、肝脏首过效应后，入血有效成分生物

利用度偏低，2 倍等效剂量可保证血清中复方有效成分达到稳定的药理活性浓度，其药效学效应与体内 4.2 g/kg 长期给药高度匹配，可真实反映复方的体内药理作用。

2.3 HF 大鼠模型建立及 LGZGD 干预

按照文献方法^[28,33]建立 HF 模型，采用 2% 异氟醚气体麻醉 SD 大鼠，永久性结扎左冠状动脉前降支诱导 MI；假手术组进行开胸手术，冠状动脉只穿线不结扎。术后为减轻疼痛，每 12 小时 sc 丁丙诺啡 (0.05 mg/kg)，持续 48 h。通过心电图观察 ST 段抬高及超声心动图检测左心室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF) 降低，确认 MI 模型成功建立。术后第 2 天，将大鼠随机分为假手术组、模型组、LGZGD (4.2 g/kg) 组和卡托普利 (2.57 mg/kg) 组，每组 10 只。前期研究已在大鼠 MI 后 HF 模型及代谢性心肌病模型中，对 LGZGD 的低、中、高剂量 (2.1、4.2、8.4 g/kg) 进行了系统对比分析。本研究选用的 4.2 g/kg 为中剂量，该剂量在预实验及前期量效关系实验中已被多次证实具有最稳定、可靠的药效，因此确定作为本实验的给药剂量^[30,32-33]。卡托普利为国内外心力衰竭指南 (如中国心力衰竭诊断和诊疗指南 2024、2023 ESC、2022 AHA/ACC/HFSA 指南) 推荐的 MI 后 HF 一线基础治疗药物，临床研究证实其可改善心室重构、降低死亡率，机制涉及抑制 RAAS、减轻负荷、抗氧化及抗纤维化。因此以卡托普利为阳性对照药物，验证 LGZGD 的心脏保护作用。各给药组 ig 相应药物，假手术组和模型组 ig 等体积的生理盐水，1 次/d，连续给药 4 周。

2.4 超声心动图检测

给药 4 周后，使用小动物专用超声仪检测大鼠心脏功能。末次给药后 40 min，采用 1% 戊巴比妥钠麻醉大鼠，仰卧固定，剃除左胸毛发以获得清晰超声图像。通过胸部侧面 M 型超声检测左心室舒张末期内径 (left ventricular internal dimension diastole, LVIDd)、左心室收缩末期内径 (left ventricular internal dimension systole, LVIDs)、LVEF 和左心室短轴缩短率 (left ventricular fractional shortening, LVFS)。为保证准确性，所有测量均取 3 个心动周期的平均值。

2.5 Masson 染色观察心肌纤维化程度

将心脏组织固定于 4% 多聚甲醛中，切成约 4 μm 厚的切片，采用商品化试剂盒进行 Masson 三色染色，于显微镜下观察并拍照。

2.6 透射电子显微镜观察线粒体超微结构

将大鼠心脏组织用预冷的 PBS 冲洗, 修剪成 1 mm×1 mm×2 mm 的组织块, 预冷的 2.5%戊二醛于 4 °C 固定 2~3 h; 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液洗涤 3 次, 1%四氧化钨后固定 3 h, 再次用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次; 梯度乙醇 (50%、70%、90%) 脱水, 每次 15 min, 随后经乙醇/丙酮混合液过渡, 100% 丙酮脱水 3 次, 每次 15 min; 通过梯度丙酮/环氧树脂

脂混合液渗透组织, 包埋于环氧树脂中, 依次经 37 °C、12 h, 45 °C、12 h, 60 °C、24 h 聚合; 制备 50~70 nm 的超薄切片, 经醋酸铀和柠檬酸铅双重染色 15~30 min 后, 采用透射电子显微镜观察。

2.7 qRT-PCR 检测心肌组织相关基因表达

采用 RNA 提取试剂盒提取大鼠心肌组织总 RNA, 使用一步法 qRT-PCR 试剂盒检测目标基因的转录水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (5'-3')
ATG5	CTTGATCAAGTTCAGCTCTTCC	AAGTGAGCCTCAACCGCATCC
FUNDC1	AGACACCACTGGTGGAAATCGAG	CCTTCTGGAATAAAAATCCTGCAC
LC3	GTCCTGGACAAGACCAAGTTCC	CCATTACCAGGAGGAAGAAGG
MAOA	AAACTGCTCGGGAATTTGCG	TCACATACCACAGGAACACAG
MCU	AGATGGTGTTCGAGTTGCTG	TCTGCGTTTTTCATGGCTCAG
p62	AAACATGGTGCACCCCAATG	ACTGCACTTATAGCGAGTTCCC
Parkin	ACCTGATCACCAACAACAGC	ATCGTTGAGCCTTGTGACAC
PINK1	CGACAACATCCTTGTGGAGTGG	CATTGCCACCACGCTCTACACT
VDAC1	GCTTTTCGGCCAAAGTGAAC	TTGACGTTCTTGCCATCCAG
β -actin	GGCGCTTTTGACTCAGGATT	GGGATGTTTGCTCCAACCAA

2.8 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞损伤模型建立及转染

2.8.1 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞损伤模型建立

正式实验前, 采用 CCK-8 试剂盒筛选 H₂O₂ 造模的最优作用浓度。将 H9c2 细胞接种于 96 孔板, 分别给予 0、25、50、100、200、400 μ mol/L 的 H₂O₂ 处理 6 h, 检测细胞存活率。结果显示, H₂O₂ 浓度低于 50 μ mol/L 时, 细胞活性无明显变化, 无法诱导稳定的氧化应激损伤表型; 浓度升至 100 μ mol/L 时, 细胞存活率为对照组的 60%, 可诱导稳定、可重复的亚致死性氧化应激损伤, 且细胞保留基础生理活性, 可满足后续药物保护效应的观察需求; 浓度超过 200 μ mol/L 时, 细胞存活率急剧下降, 400 μ mol/L 处理 6 h 细胞存活率低于 30%, 呈显著致死性毒性, 延长处理时间可导致细胞活力完全丧失, 无法用于药物干预实验。基于上述预实验结果, 本研究选择 100 μ mol/L H₂O₂ 处理 6 h 构建 H9c2 细胞氧化应激损伤模型^[34], 以模拟 MI 后心肌细胞的氧化应激损伤病理状态。

2.8.2 分组与给药

H9c2 细胞在含 10%胎牛血清和青霉素-链霉素的 DMEM 培养基中正常培养, 消化细胞并稀释成 5×10⁵ 个/mL, 均匀接种在 6 孔板中, 2 mL/孔。待细胞融合率达 70%~80%时, 设置对照组、模型组、空白血清组和 LGZGD 组。对照组不作任何处理; 模型组加入 100 μ mol/L H₂O₂ 处理; 空白血清组加入 100 μ mol/L H₂O₂ 和 20%正常

大鼠血清处理; LGZGD 组加入 100 μ mol/L H₂O₂ 和 20% LGZGD 含药血清^[34-35]处理。

为研究 MCU 的作用, 将 H9c2 细胞接种于 6 孔板, 建立 MCU 过表达和敲低模型。

(1) MCU 过表达分组: 设置对照组: 无转染, 无处理; 雷帕霉素组: 雷帕霉素处理后, 100 μ mol/L H₂O₂ 处理 6 h; 空载体组 (Vector): 转染空载体后, 100 μ mol/L H₂O₂ 处理 6 h; MCU 过表达组 (MCU): 转染 MCU 质粒后, 100 μ mol/L H₂O₂ 处理 6 h; MCU+空白血清组: 转染 MCU 质粒, 20%正常大鼠血清预处理 12 h 后, 100 μ mol/L H₂O₂ 处理 6 h; MCU+LGZGD 组: 转染 MCU 质粒, 20% LGZGD 含药血清预处理 12 h 后, 100 μ mol/L H₂O₂ 处理 6 h。

(2) MCU 敲低分组: 设置对照组: 无转染, 无处理; 雷帕霉素组: 雷帕霉素处理后, 100 μ mol/L H₂O₂ 处理 6 h; 空载体组 (Vector): 转染空载体后, 100 μ mol/L H₂O₂ 处理 6 h; MCU 敲低组 (sh-MCU): 转染 sh-MCU 后, 100 μ mol/L H₂O₂ 处理 6 h; sh-MCU+空白血清组: 转染 sh-MCU, 20%正常大鼠血清预处理 12 h 后, 100 μ mol/L H₂O₂ 处理 6 h; sh-MCU+LGZGD 组: 转染 sh-MCU, 20% LGZGD 含药血清预处理 12 h 后, 100 μ mol/L H₂O₂ 处理 6 h。

2.9 Western blotting 检测线粒体功能及自噬相关蛋白表达

按“2.8”项下方法处理后, 收集细胞, 加入裂

解液提取蛋白。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, 封闭后, 孵育一抗和二抗, 加入 ECL 化学发光试剂显影, 采用 Image J 软件分析条带灰度值^[36]。

2.10 自噬流分析

将 RFP-GFP-LC3、MCU 过表达质粒和 MCU 敲低质粒转染进 H9c2 细胞, 转染 12 h 后, 按照“2.8”项下方法处理。Hoechst 33342 孵育 15 min 标记细胞核, 4%多聚甲醛固定 10 min, 利用共聚焦显微镜观察自噬流。

2.11 细胞染色及成像分析

按“2.8”项下方法处理后, 收集细胞, 使用 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒测量线粒体膜电位, 用 Hoechst 33342 进行核标记后, 采用荧光显微镜获取细胞荧光图像, 绿色荧光强度增加表明线粒体膜去极化。使用 Rhod-2 AM (线粒体钙离子探针) 联合 Mito-Tracker Green (线粒体标记物) 评估 mtCa²⁺水平, Rhod-2 荧光强度增加表明 mtCa²⁺超载。使用 Mito-Tracker Deep Red (线粒体标记物) 标记线粒体, 并观察线粒体形态, 线粒体呈现丝状则表示线

粒体形态正常。

2.12 大鼠心脏组织 GSH, 血清 4-HNE、LDH、CK 和 H9c2 细胞中 4-HNE、GSH、LDH、CK 水平的检测

为评估 HF 模型大鼠和 H9c2 细胞的氧化损伤程度, 对大鼠心脏组织匀浆上清液、血清和 H9c2 细胞裂解液进行分析, 定量检测 4-HNE、GSH 以及损伤标志物 LDH 和 CK 水平。4-HNE 为脂质过氧化的指标, GSH 用于评估内源性抗氧化能力。

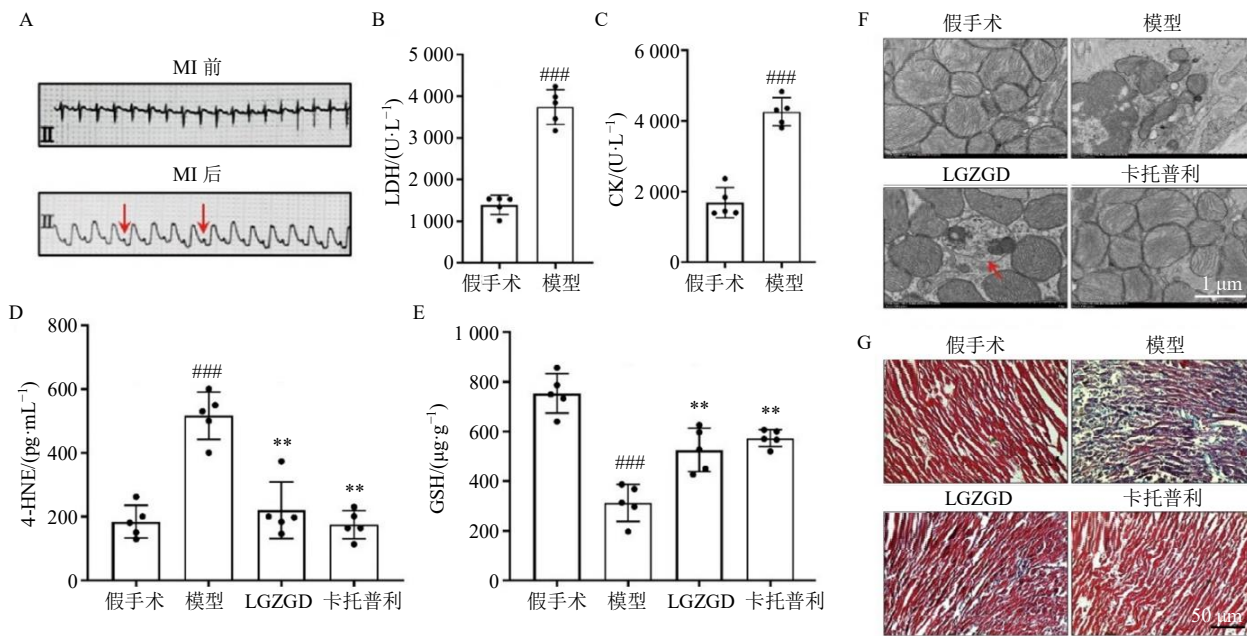
2.13 统计学分析

采用 GraphPad Prism 软件 (9.0 版本) 进行统计学分析。采用 Student's *t* 检验或单因素方差分析 (ANOVA) 比较组间差异, 定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3. 结果

3.1 LGZGD 改善大鼠 MI 后心功能

如图 1-A 所示, 冠状动脉结扎前大鼠心电图正常, 结扎后观察到 ST 段抬高, 符合 MI 特征。术后 48 h, MI 大鼠血清中 CK 和 LDH 活性显著高于假手术组 ($P < 0.001$, 图 1-B、C), 证实 MI 模型成功建立。通过检测心肌组织 GSH 和血清 4-HNE 水平



A-心电图, 箭头指示 ST 段抬高; B、C-MI 后第 2 天 CK 和 LDH 水平; D、E-MI 后第 28 天 4-HNE 和 GSH 水平; F-透射电子显微镜观察线粒体超微结构 ($\times 10\,000$), 箭头指示自噬溶酶体; G-大鼠心肌组织 Masson 染色 ($\times 200$); 与假手术 (对照) 组比较: $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#\#}P < 0.001$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$, 图 2、3 同。

A-electrocardiogram, with arrow indicating ST-segment elevation; B, C-levels of CK and LDH on day 2 post-MI; D, E-levels of 4-HNE and GSH on day 28 post-MI; F-mitochondrial ultrastructure observed under transmission electron microscopy ($\times 10\,000$), arrows indicate autophagic lysosomes; G-Masson staining of rat myocardial tissues on day 28 post-MI ($\times 200$); $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs sham (control) group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ vs model group, same as Figs. 2, 3.

图 1 LGZGD 改善大鼠 MI 后心功能 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 LGZGD improves cardiac function of rats after MI ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

评估氧化应激状态,结果如图 1-D、E 所示,与假手术组比较,MI 大鼠 4-HNE 水平显著升高 ($P < 0.001$),GSH 水平明显降低 ($P < 0.001$);与模型组比较,LGZGD 和卡托普利均显著降低血清 4-HNE 水平 ($P < 0.01$),升高 GSH 水平 ($P < 0.01$)。线粒体结构观察结果(图 1-F)显示,模型组线粒体出现明显病理改变,包括线粒体嵴断裂、内部物质溶解性改变、空泡样变性及大量受损线粒体碎片;而 LGZGD 促进线粒体自噬,有效清除受损线粒体。组织病理学检查进一步验证了上述结果,Masson 三色染色结果(图 1-G)显示,模型组胶原纤维大量沉积,LGZGD 治疗后可有效减轻胶原沉积,抑制心肌纤维化。治疗 4 周后,超声心动图分析结果(表

2) 显示,模型组心脏收缩功能明显障碍,表现为 LVEF、LVFS 显著降低 ($P < 0.01$),LVIDd、LVIDs 显著增大 ($P < 0.01$);与模型组比较,LGZGD 显著升高 LVEF 和 LVFS ($P < 0.01$),显著降低 LVIDd 和 LVIDs ($P < 0.01$),卡托普利组也表现出类似的心脏保护作用。

3.2 LGZGD 调控 MI 大鼠线粒体功能及自噬相关基因表达

利用 qRT-PCR 分析各组大鼠心肌组织中相关基因表达情况,结果所示,与假手术组比较,模型组大鼠线粒体自噬相关基因表达显著失调(图 2-A、B),其中 *FUNDC1* 表达显著降低 ($P < 0.05$),而 *ATG5*、*p62*、*LC3*、*PINK1*、*Parkin* 表达明显升高

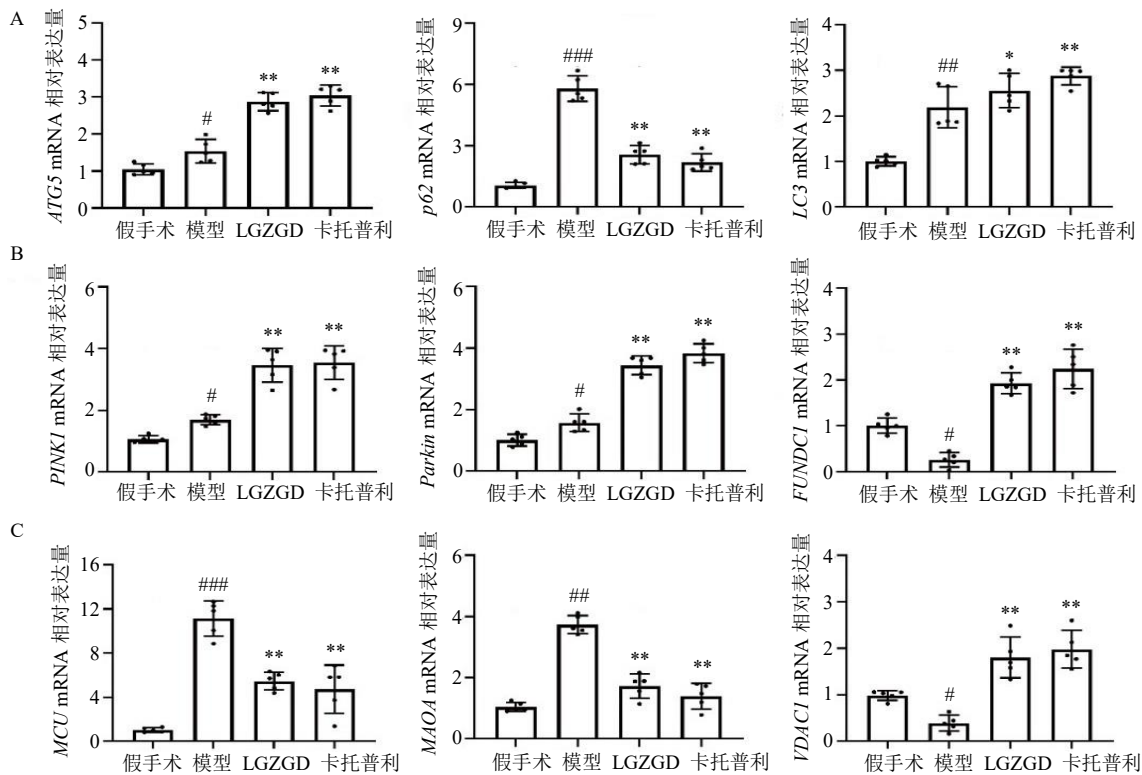
表 2 各组大鼠心脏功能指标 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Cardiac function indices of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	LVIDd/mm	LVIDs/mm	LVFS/%	LVEF/%
假手术	—	4.53±0.34	2.95±0.24	51.3±4.2	78.2±6.7
模型	—	6.38±0.40**	4.89±0.37**	20.9±2.8**	40.9±3.8**
LGZGD	4.2	5.58±0.55#	3.89±3.56#	32.6±2.8##	63.4±5.6##
卡托普利	2.57×10 ⁻³	5.46±0.43#	4.22±0.43	33.8±3.2##	62.3±5.7##

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.



A-自噬相关基因表达; B-线粒体自噬相关基因表达; C-线粒体功能相关基因表达。

A-expressions of autophagy-related genes; B-expressions of mitophagy-related genes; C-expressions of mitochondrial function-related genes.

图 2 LGZGD 改善线粒体功能并促进自噬和线粒体自噬 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

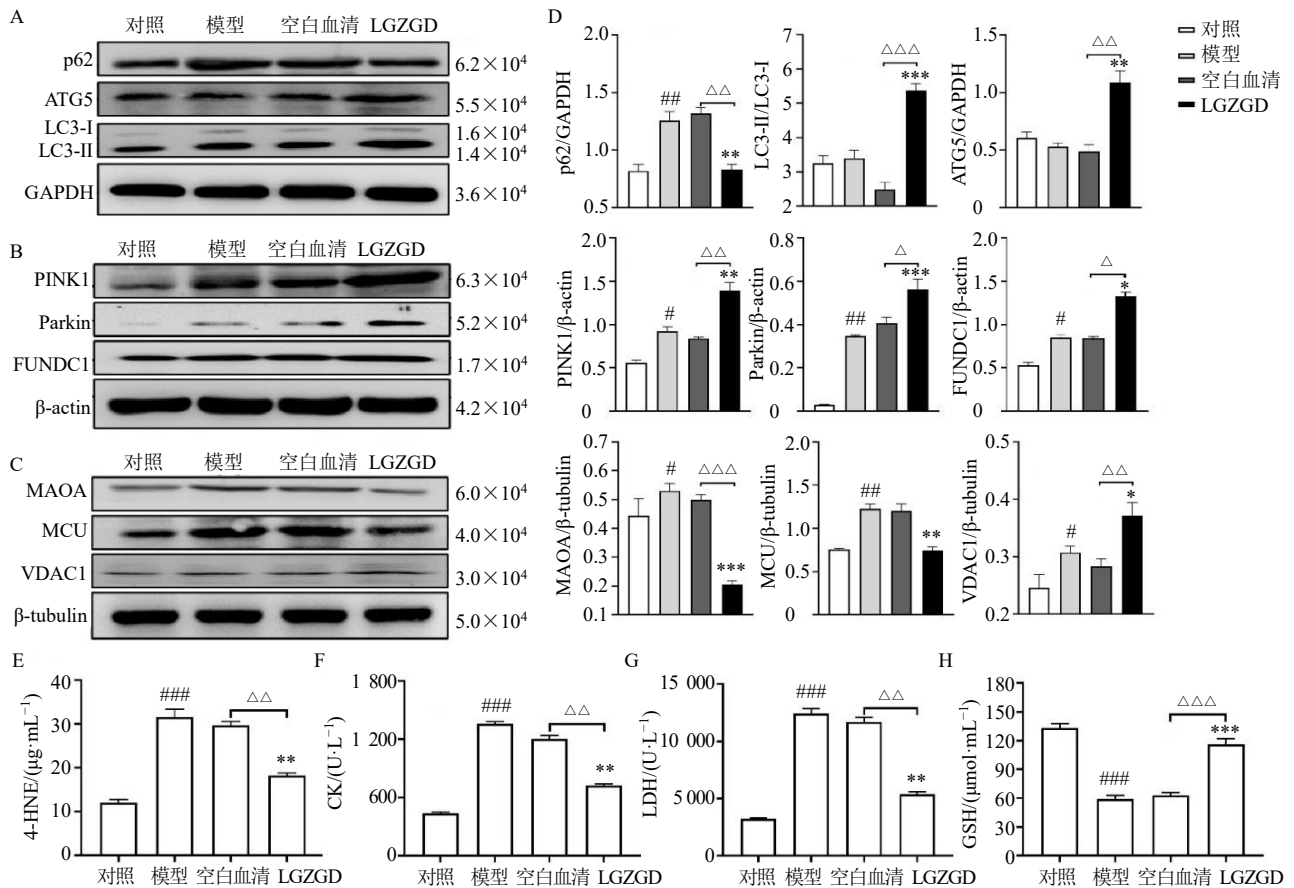
Fig. 2 LGZGD enhances mitochondrial function and facilitates both autophagy and mitophagy ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，表明自噬流严重受损；与模型组比较，LGZGD 和卡托普利处理后均显著升高 *ATG5*、*LC3*、*PINK1*、*Parkin* 和 *FUNDC1* 的表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)，同时降低 *p62* 表达 ($P < 0.01$)，提示线粒体自噬/自噬信号通路得到增强和恢复。此外，与假手术组比较，模型组 *MAOA* 和 *MCU* 表达显著上调 ($P < 0.01$ 、 0.001)，图 2-C)，*VDAC1* 表达明显下调 ($P < 0.05$)；与模型组比较，LGZGD 和卡托普利显著降低 *MAOA* 和 *MCU* 的表达 ($P < 0.01$)，升高 *VDAC1* 表达 ($P < 0.01$)。以上结果表明，LGZGD 通过恢复线粒体自噬/自噬信号通路，减轻 MI 大鼠的线粒体功能障碍，其保护效果与卡托普利相当。

3.3 LGZGD 抑制 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞氧化应激并调控线粒体功能及自噬相关蛋白表达

如图 3-A~D 所示，H₂O₂ 处理导致 H9c2 细胞

中 *p62* 明显积累 ($P < 0.01$)，*ATG5* 表达降低，*LC3-II/LC3-I* 值升高，*PINK1*、*Parkin*、*FUNDC1*、*MAOA*、*MCU* 和 *VDAC1* 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)；与模型组比较，LGZGD 含药血清显著减轻 *p62* 积累 ($P < 0.01$)，提高 *LC3-II/LC3-I* 值 ($P < 0.001$)，下调 *MAOA*、*MCU* 表达 ($P < 0.01$ 、 0.001)，并上调 *ATG5*、*FUNDC1*、*PINK1*、*Parkin* 和 *VDAC1* 的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。如图 3-E~H 所示，H₂O₂ 显著降低细胞内 GSH 水平 ($P < 0.001$)，升高 4-HNE 及细胞损伤标志物 LDH、CK 水平 ($P < 0.001$)；与模型组比较，LGZGD 含药血清显著升高细胞内 GSH 水平 ($P < 0.001$)，降低 4-HNE、LDH 和 CK 水平 ($P < 0.01$)。以上结果表明，LGZGD 含药血清有效抑制 H₂O₂ 诱导的氧化应激，改善 H9c2 细胞线粒体功能障碍和自噬相关信号通路失调。



A-自噬相关蛋白表达；B-线粒体自噬相关蛋白表达；C-线粒体功能相关蛋白表达；D-蛋白条带灰度值分析；E~H-4-HNE、CK、LDH 和 GSH 水平； $\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ 。

A-expressions of autophagy-related proteins; B-expressions of mitophagy-related proteins; C-expressions of mitochondrial function-related proteins; D-grayscale analysis of protein bands; E-H-levels of 4-HNE, CK, LDH and GSH; $\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ 。

图 3 LGZGD 抑制氧化应激并调控线粒体功能和自噬相关蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 LGZGD inhibits oxidative stress and regulates mitochondrial function and autophagy related protein expressions ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

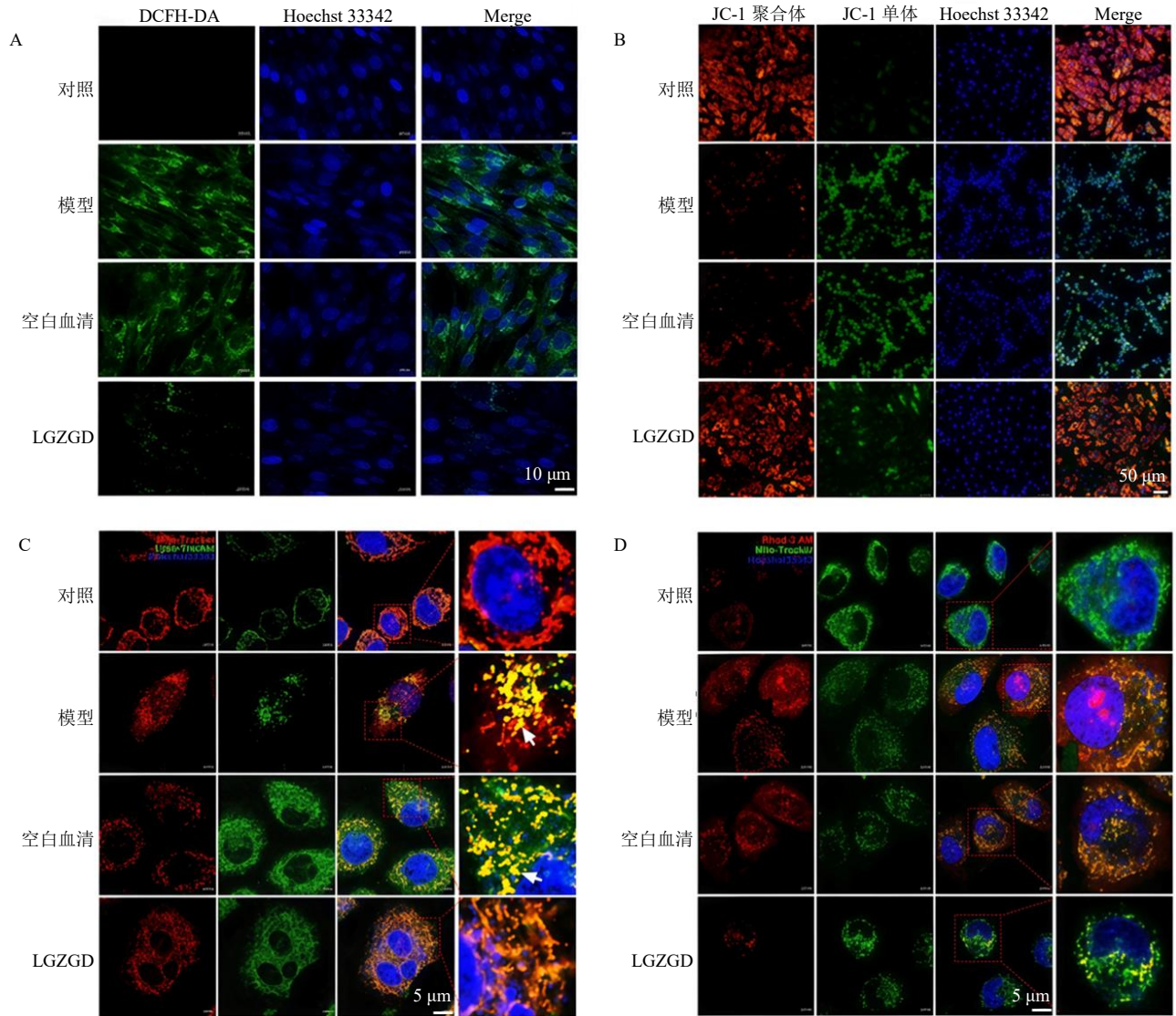
3.4 LGZGD 有效清除 ROS 并维持 mtCa²⁺稳态

H₂O₂ 处理可诱导 H9c2 细胞内 ROS 大量积累, 而 LGZGD 含药血清干预能逆转该效应 (图 4-A)。JC-1 染色实验结果 (图 4-B) 显示, H₂O₂ 处理会造成 H9c2 细胞线粒体膜电位去极化, 表现为绿色荧光信号增强; LGZGD 含药血清可明显缓解该线粒体膜电位异常。如图 4-C 所示, 与对照组相比, H₂O₂ 处理的模型组中线粒体与溶酶体的共定位水平升高, 红色与绿色荧光的重叠区域 (黄色) 扩大, 提示氧化应激状态下, 大量受损线粒体被溶酶体识别

并吞噬, 线粒体自噬过程被激活 (完整线粒体呈丝状, 破碎线粒体形态模糊); 而 LGZGD 可显著降低二者的共定位程度, 表明其既可缓解氧化应激诱导的线粒体损伤, 又能抑制过度自噬介导的线粒体异常清除。同时, LGZGD 含药血清还能有效逆转 H₂O₂ 诱导的 mtCa²⁺水平升高, 进而维持线粒体的结构与功能完整性 (图 4-D)。

3.5 MCU 过表达和敲低影响 H9c2 细胞氧化应激反应

如图 5-A、B 所示, 相较于对照组, 氧化应激

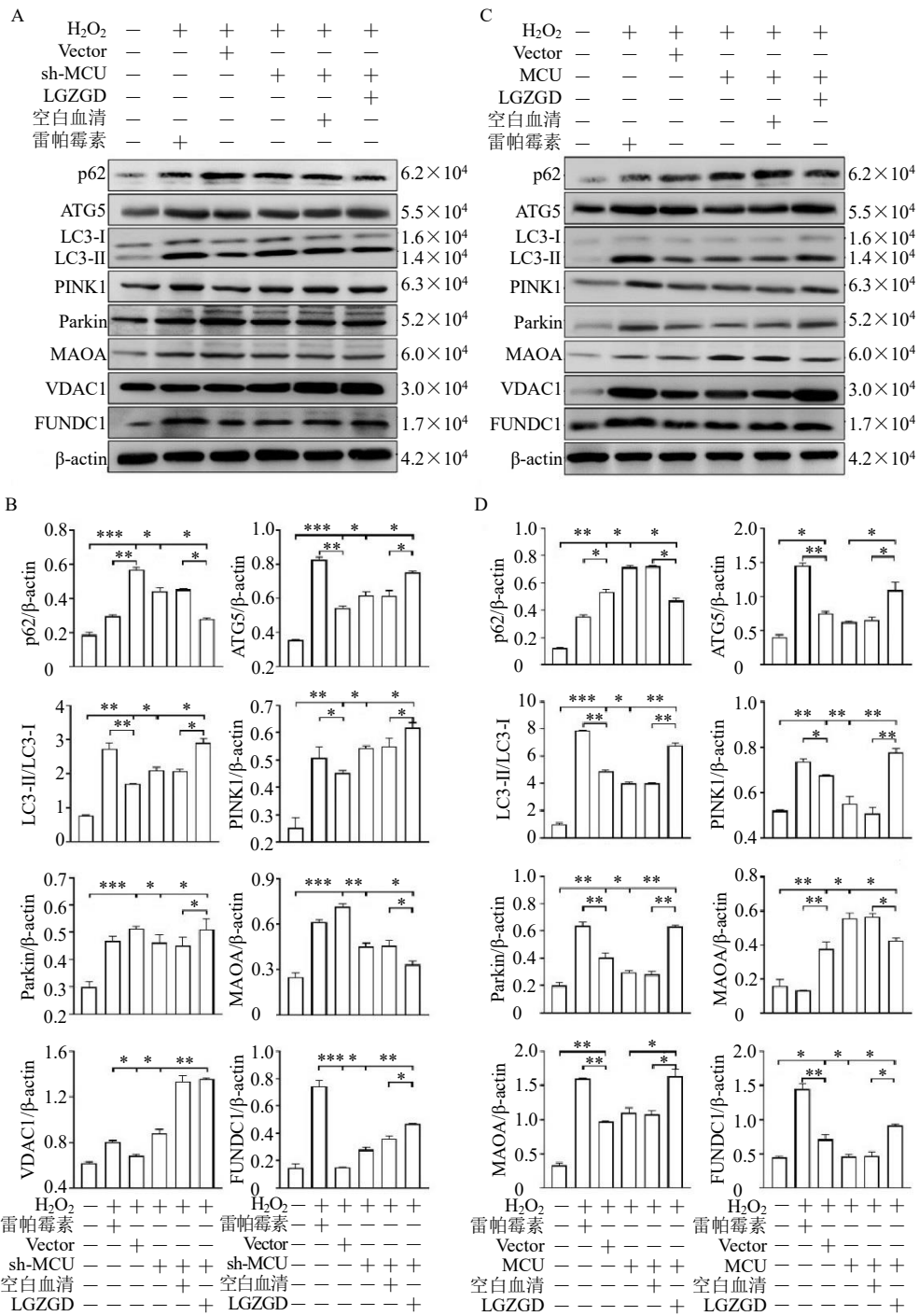


A-ROS 水平检测, 绿色荧光表示 ROS (×1 000); B-线粒体膜电位检测 (×200); C-线粒体-溶酶体共定位成像 (×2 000), 绿色荧光表示溶酶体, 红色荧光表示线粒体; D-mtCa²⁺水平及线粒体形态成像 (×2 000), 红色荧光表示细胞内游离 Ca²⁺, 绿色荧光标记线粒体。

A-ROS level assay, green fluorescence indicates ROS (× 1 000); B-mitochondrial membrane potential assay (× 200); C-mitochondria-lysosome colocalization imaging (× 2 000), green fluorescence indicates lysosomes, while red fluorescence represents mitochondria; D-mtCa²⁺ level and mitochondrial morphology imaging (× 2 000), red fluorescence indicates intracellular free Ca²⁺, green fluorescence labels mitochondria.

图 4 LGZGD 降低细胞内 ROS 水平并维持 mtCa²⁺稳态

Fig. 4 LGZGD reduces intracellular ROS level and maintains mtCa²⁺ homeostasis



A、B-MCU 敲低后自噬相关蛋白及线粒体功能和线粒体自噬相关蛋白表达；C、D-MCU 过表达后自噬相关蛋白及线粒体功能和线粒体自噬相关蛋白表达；**P*<0.05 ***P*<0.01 ****P*<0.001，图 6 同。

A, B-expressions of autophagy related proteins, mitochondrial function and mitochondrial autophagy related protein after knockdown of MCU; C, D-expressions of autophagy related proteins, mitochondrial function and mitochondrial autophagy related proteins after overexpression of MCU; **P* < 0.05 ***P* < 0.01 ****P* < 0.001, same as Fig. 6.

图 5 MCU 过表达和敲低对 H9c2 细胞氧化应激反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of MCU overexpression and knockdown on oxidative stress response in H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

条件下，MCU 敲低 (sh-MCU) 可显著降低 p62 蛋白积累、升高 LC3-II/LC3-I 值 (*P*<0.05)，该效应与经典自噬诱导剂雷帕霉素的作用趋势一致；而

MCU 敲低与 LGZGD 含药血清联用，能进一步增强自噬效应 (*P*<0.05)。此外，MCU 敲低可部分恢复 MAOA 与 VDAC1 的蛋白表达水平，修复 FUNDC1、

PINK1 及 Parkin 介导的线粒体自噬信号通路功能, 其中 sh-MCU 联合 LGZGD 组的调控作用最为显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。反之, MCU 过表达会显著加剧 H_2O_2 诱导的自噬流受损及线粒体功能障碍, 而 LGZGD 含药血清干预可部分逆转 MCU 过表达细胞的上述不良效应 (图 5-C、D)。以上结果表明, MCU 敲低可提升自噬流水平, 保护 H9c2 细胞抵御氧化应激诱导的线粒体功能障碍, LGZGD 含药血清能进一步强化该保护作用; 而 MCU 过表达会加剧氧化应激介导的细胞损伤, LGZGD 含药血清则可部分缓解此效应。

3.6 LGZGD 调控 MCU 介导的酶水平紊乱并抑制 H9c2 细胞氧化应激损伤

如图 6 所示, MCU 失调 (过表达/敲低) 条件下, LGZGD 含药血清可显著改善以 GSH、4-HNE 为指标的细胞氧化还原平衡 ($P < 0.05$ 、 0.01)。GSH 为细胞主要非酶类抗氧化剂, 核心参与 ROS 清除与氧化还原稳态维持; 4-HNE 是脂质过氧化特异性产物, 为膜脂质氧化损伤的可靠标志物。CK、LDH 作为心肌损伤经典标志物, 其水平升高可反映心肌细胞完整性破坏及心肌功能障碍程度, LGZGD 含药血清可通过调控上述指标减轻心肌损伤 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

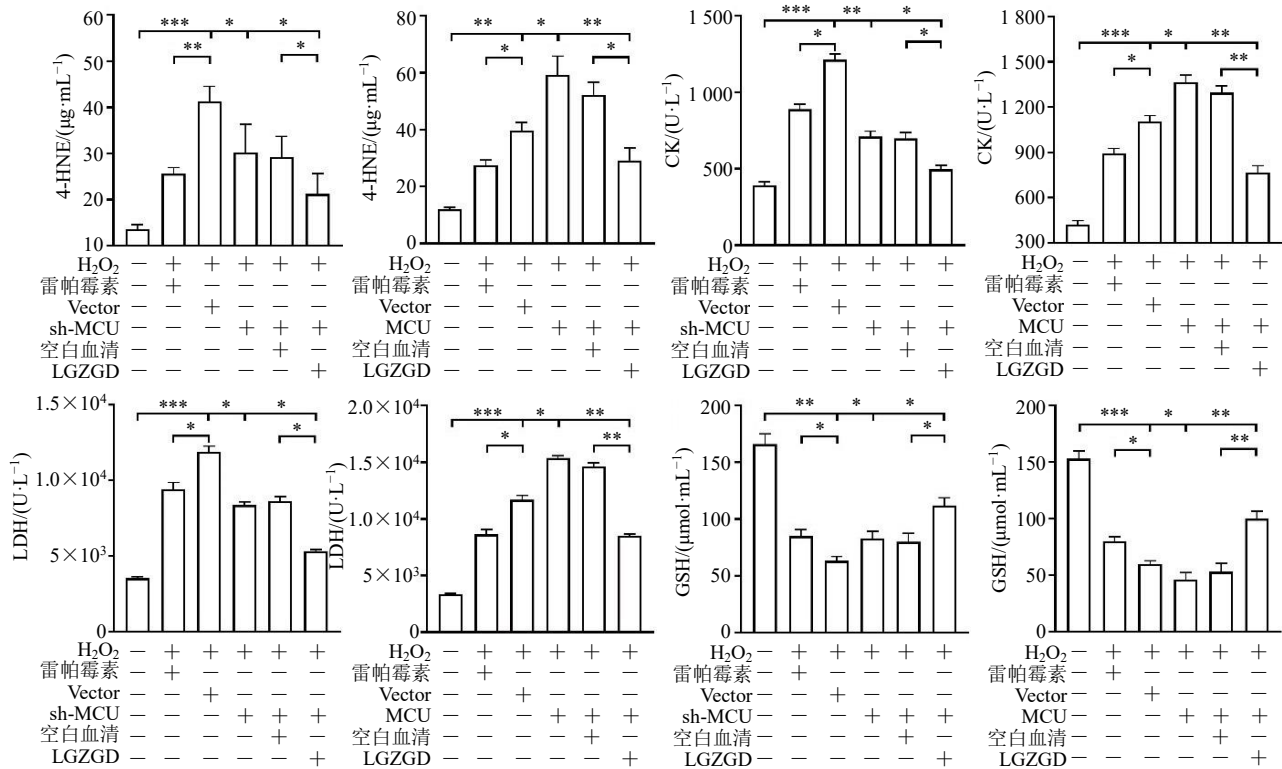


图 6 LGZGD 调控 MCU 异常诱导的酶稳态紊乱并减轻细胞氧化应激损伤 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 LGZGD regulates enzyme homeostasis perturbation induced by MCU abnormalities and mitigates oxidative stress-induced damage ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

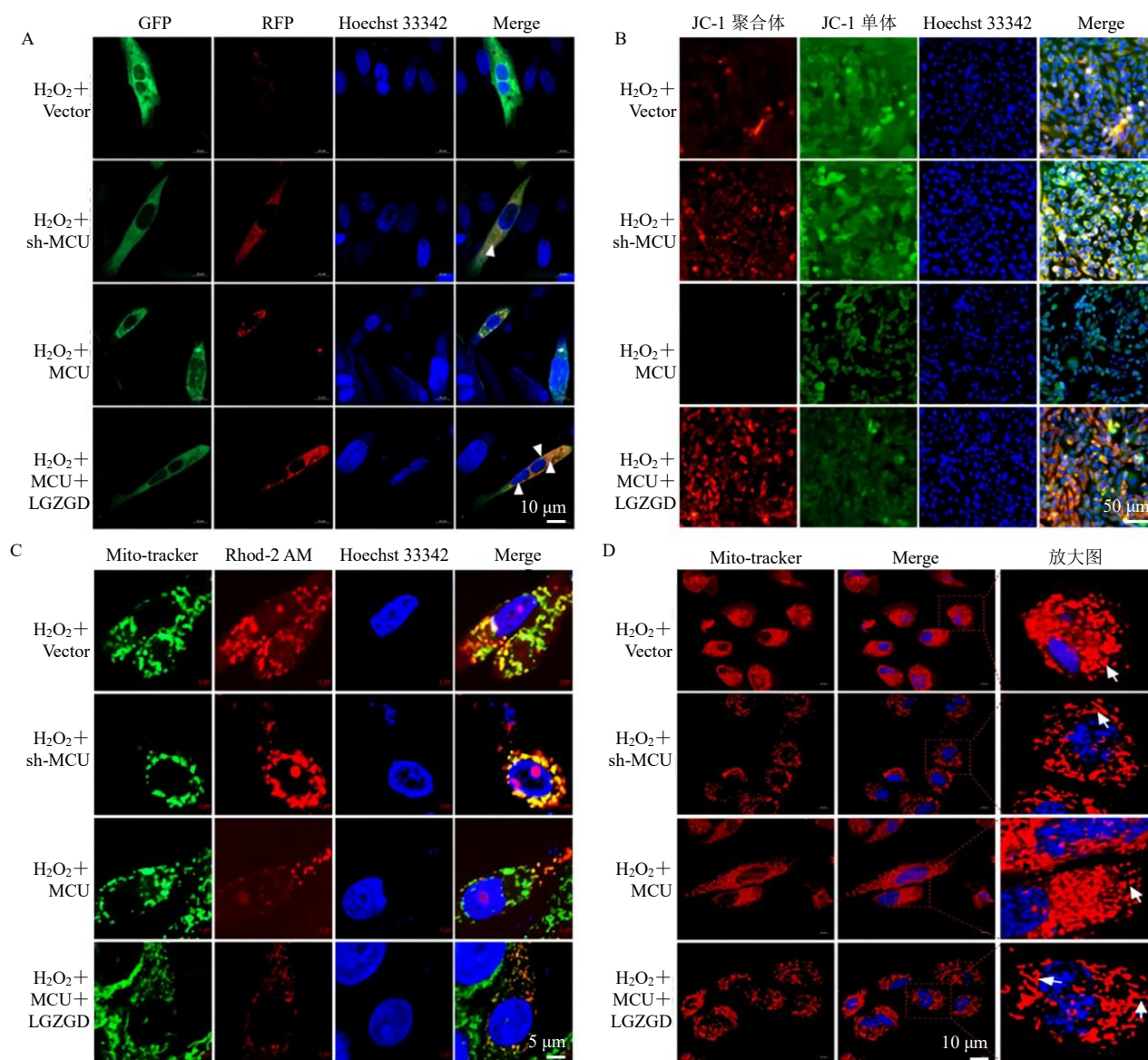
3.7 LGZGD 改善 MCU 失衡介导的线粒体功能与自噬异常

与上述蛋白水平变化趋势一致, 共聚焦成像显示, MCU 敲低可显著增强细胞自噬流 (图 7-A) 并维持线粒体膜电位稳定 (图 7-B); 反之, MCU 过表达会显著抑制自噬流, 并诱导线粒体膜发生明显去极化。LGZGD 含药血清干预可显著恢复 MCU 过表达细胞的自噬及线粒体相关指标 (图 7-A、B)。此外, MCU 敲低能显著减少 $mtCa^{2+}$ 的异常积累, 而 MCU 过表达则导致细胞 $mtCa^{2+}$ 水平显著升高

(图 7-C)。形态学观察显示, MCU 敲低可恢复线粒体完整的丝状结构, MCU 过表达则造成线粒体碎裂、形态模糊; LGZGD 含药血清干预可有效恢复线粒体的形态完整性 (图 7-D)。

4 讨论

MI 后进行性心室重构是 HF 发生发展的核心病理基础。线粒体功能障碍是驱动 MI 后心室重构向 HF 进展的关键环节^[37], 其中线粒体钙超载、氧化应激爆发与线粒体自噬功能紊乱, 共同构成了心肌损伤持续进展的核心恶性循环^[10,18,21]。课题组既



A-自噬流分析 ($\times 1\ 000$), 黄色斑点为自噬体, 红色斑点为自噬溶酶体; B-线粒体膜电位分析 ($\times 200$), 绿色荧光表示去极化线粒体, 红色荧光表示非去极化线粒体; C- $mtCa^{2+}$ -线粒体共定位分析 ($\times 2\ 000$), 红色荧光表示 $mtCa^{2+}$, 绿色荧光表示线粒体, 黄色斑点为二者共定位的钙超载区域; D-线粒体形态分析 ($\times 1\ 000$), 箭头表示线粒体形态, 其中丝状为完整线粒体, 破碎状为形态模糊线粒体。

A-autophagic flux analysis ($\times 1\ 000$), yellow dots represent autophagosomes, red dots represent autolysosomes; B-mitochondrial membrane potential analysis ($\times 200$), green fluorescence indicates depolarized mitochondria, red fluorescence indicates non-depolarized mitochondria; C- $mtCa^{2+}$ -mitochondria colocalization analysis ($\times 2\ 000$), red fluorescence indicates $mtCa^{2+}$, green fluorescence indicates mitochondria, and yellow dots represent the calcium overload area of their colocalization; D-mitochondrial morphology analysis ($\times 1\ 000$), arrows indicate mitochondrial morphology, where filamentous mitochondria are intact and fragmented mitochondria are obscure.

图7 LGZGD 改善 MCU 失衡介导的线粒体功能与自噬异常

Fig. 7 LGZGD improves mitochondrial function and autophagy abnormalities mediated by MCU imbalance

往研究及国内外相关报道均已证实, 经典温阳化饮方 LGZGD 具有明确的心脏保护作用^[24,30,32], 但其具体作用靶点与核心调控机制尚未完全阐明。本研究通过构建大鼠 MI 后 HF 模型与 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞损伤模型, 结合体外 MCU 基因敲低和过表达实验, 系统探讨了 LGZGD 改善 MI 后 HF 的作用机

制, 重点明确了其线粒体钙调控相关的关键靶点。

MCU 是介导 $mtCa^{2+}$ 摄取的核心门控通道, 生理状态下精准调控心肌细胞的能量代谢与兴奋-收缩耦联; 而在 MI 后病理状态下, 其过度激活是 $mtCa^{2+}$ 超载、线粒体结构与功能破坏的重要始动因素^[38-39]。本研究发现, MI 后 HF 大鼠心肌组织与

H₂O₂ 损伤的心肌细胞中, MCU 表达均显著上调, 伴随 mtCa²⁺ 超载、线粒体超微结构破坏与自噬流受阻, 而 LGZGD 干预可显著下调 MCU 表达, 恢复 mtCa²⁺ 稳态, 且该效应与大鼠心功能改善、心肌纤维化减轻的程度一致。此外, MCU 敲低可模拟 LGZGD 的心肌保护效应, 增强线粒体自噬通量、减轻氧化应激损伤, 与 LGZGD 联用还能进一步放大保护效果; 而 MCU 过表达则可显著削弱 LGZGD 的药理作用, 即便给药干预, 仍存在一定程度的 mtCa²⁺ 超载与自噬流障碍。值得注意的是, 本研究发现 LGZGD 可同时调控 MAOA 与 VDAC1 的表达, 而二者的调控效应与 MCU 的表达状态密切相关。MCU 敲低后可部分恢复 MAOA 与 VDAC1 的蛋白表达水平, MCU 过表达会显著加剧 H₂O₂ 诱导的自噬流受损及线粒体功能障碍, 而 LGZGD 含药血清干预可部分逆转 MCU 过表达细胞的上述不良效应。这一结果提示, MCU 是 LGZGD 多靶点调控网络中, 介导线粒体自噬稳态恢复的核心枢纽环节, 而非孤立的下游效应分子^[14,18]。

在此基础上, 本研究进一步探讨了 LGZGD 对 MAOA/4-HNE 通路的调控作用, 明确了该通路与 MCU-mtCa²⁺ 通路之间的双向正反馈调控关系, 补充了 LGZGD 多靶点协同作用的科学依据。既往研究仅单独报道了 MAOA 激活在心肌缺血损伤中的作用, 或 4-HNE 对 MCU 通道的修饰效应, 并未阐明二者在 MI 后慢性心衰进程中的恶性循环, 也未明确中药复方对该循环的干预机制^[14,17,40]。本研究结果显示, MI 后 HF 病理状态下, MAOA 表达上调伴随 4-HNE 大量蓄积, 而 LGZGD 干预可显著抑制 MAOA 的过度激活, 减少 4-HNE 生成, 同时恢复内源性抗氧化物质 GSH 的含量。据此, 初步表明该通路的双向调控逻辑: 一方面, MAOA 来源的 H₂O₂ 诱发脂质过氧化生成的 4-HNE, 可通过共价修饰 MCU 的负向调控亚基 MICU1 解除其对 MCU 的抑制, 同时修饰 VDAC1 增强线粒体外膜 Ca²⁺ 通透性, 双重途径协同加剧 MCU 介导的 mtCa²⁺ 超载, 是 MCU 病理性激活的重要上游驱动因素; 另一方面, MCU 介导的 mtCa²⁺ 超载可诱导线粒体 ROS 爆发, 进一步上调 MAOA 表达, 加剧 4-HNE 蓄积, 形成闭环式的恶性循环^[14,40]。而 LGZGD 可通过多靶点协同作用, 同时干预该循环的上下游环节: 包括直接抑制 MCU 的过度激活, 又通过抑制 MAOA 减少 4-HNE 生成, 从上游阻断 MCU 的病

理性激活, 最终打破氧化应激与钙超载的级联放大效应^[20,41], 这是中药复方相较于单靶点抑制剂的独特优势。此外, 本研究还发现 4-HNE 可直接抑制线粒体自噬流, 加剧受损线粒体的蓄积, 而 LGZGD 可通过恢复自噬通量清除受损线粒体, 进一步减少 MAOA 的异常激活, 补充了 MAOA/4-HNE 通路与线粒体自噬的内在联系, 为 MI 后 HF 的治疗提供了新的联合干预思路。

LGZGD 是《金匱要略》中治疗“中阳不足、水饮内停”的经典方剂, 君臣佐使配伍严谨, 临床常用于 HF 属水饮凌心证的患者, 其本身就具有多环节、多靶点的整体调控特点^[42]。中医理论认为, 水饮内停阻遏心阳是 HF 发生发展的核心病机, 可引发心悸、水肿、短气等症, 这与现代医学中 HF 的体液潴留、心肌细胞水肿、钙稳态失衡高度相关^[42-44]。本研究发现, “水饮内停”的病理本质, 与钙超载介导的线粒体功能障碍存在直接的因果联系: 钙超载可直接引发心肌细胞水肿、线粒体肿胀, 对应中医“水饮停聚”的病理表现; 而水饮内停、心阳受阻, 又会进一步加重离子稳态失衡, 加剧钙超载, 二者形成的恶性循环, 与本研究发现的氧化应激导致钙超载恶性循环高度契合。LGZGD 以温阳化饮为核心治则, 其现代生物学本质, 正是通过多成分、多靶点的协同作用, 以 MCU 为核心枢纽, 恢复心肌细胞钙稳态与线粒体功能, 阻断“水饮内停-钙超载-线粒体损伤”的恶性循环, 既纠正了中医核心病机, 又改善了现代医学的病理进程。

本研究采用整体动物实验与离体细胞实验相结合的研究策略, 2 套体系的核心结果高度一致。在大鼠 MI 后 HF 模型中观察到的 MCU、MAOA 及线粒体自噬相关分子表达上调、p62 蓄积等病理改变, 在 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞损伤模型中得到了一致的验证。当然, 本研究仍存在一定的局限性。首先, 本研究主要通过体外细胞层面基因干预实验验证了 MCU 的关键靶点作用, 尚未构建 MCU 敲除/敲入小鼠模型, 在体进一步验证 MCU 在 LGZGD 心脏保护作用中的必要性, 后续可通过模式动物实验完善因果关系的证据链。其次, 本研究明确了 MCU-mtCa²⁺ 通路是 LGZGD 改善 MI 后 HF 的关键机制之一, 但作为中药复方, LGZGD 必然存在其他潜在的作用靶点与调控通路, 本研究尚未进行系统的筛选与验证, 后续可结合转录组学、代谢组学等多组学技术, 全面解析其多靶点调控网络, 更完

整地阐释复方的作用机制。

综上,本研究明确了MCU是LGZGD改善MI后HF的关键核心靶点之一,揭示了LGZGD通过抑制MCU病理性上调,恢复 mtCa^{2+} 稳态和线粒体自噬通量,最终改善MI后心功能与心室重构的分子机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Udell J A, Bahit M C, Campbell P, *et al.* Prevention of heart failure after acute myocardial infarction [J]. *Lancet*, 2025, 406(10508): 1154-1170.
- [2] Khan S S, Berwanger O, Fiuzat M, *et al.* Prioritising the primary prevention of heart failure [J]. *Lancet*, 2025, 406(10508): 1138-1153.
- [3] Foroutan F, Rayner D G, Ross H J, *et al.* Global comparison of readmission rates for patients with heart failure [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2023, 82(5): 430-444.
- [4] Ritterhoff J, Tian R. Metabolic mechanisms in physiological and pathological cardiac hypertrophy: New paradigms and challenges [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20(12): 812-829.
- [5] Bonora M, Giorgi C, Pinton P. Molecular mechanisms and consequences of mitochondrial permeability transition [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(4): 266-285.
- [6] Chen Y, Guo X Y, Zeng Y C, *et al.* Ferroptosis contributes to catecholamine-induced cardiotoxicity and pathological remodeling [J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 207: 227-238.
- [7] Morciano G, Pedriali G, Bonora M, *et al.* A naturally occurring mutation in ATP synthase subunit c is associated with increased damage following hypoxia/reoxygenation in STEMI patients [J]. *Cell Rep*, 2021, 35(2): 108983.
- [8] Peoples J N, Saraf A, Ghazal N, *et al.* Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease [J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(12): 162.
- [9] Bock F J, Tait S W G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(2): 85-100.
- [10] Zong Y, Li H, Liao P, *et al.* Mitochondrial dysfunction: Mechanisms and advances in therapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 124.
- [11] Bennett C F, Latorre-Muro P, & Puigserver P. Mechanisms of mitochondrial respiratory adaptation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(12): 817-835.
- [12] Kamer K J, Mootha V K. The molecular era of the mitochondrial calcium uniporter [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(12): 817-835.
- [13] Tsai C W, Rodriguez M X, Van Keuren A M, *et al.* Mechanisms and significance of tissue-specific MICU regulation of the mitochondrial calcium uniporter complex [J]. *Mol Cell*, 2022, 82(19): 3661-3676.
- [14] Santin Y, Fazal L, Sainte-Marie Y, *et al.* Mitochondrial 4-HNE derived from MAO-a promotes mitoCa^{2+} overload in chronic postischemic cardiac remodeling [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(6): 1907-1923.
- [15] Ioannidis M, Tjepkema J, Uitbeijerse M R P, *et al.* Immunomodulatory effects of 4-hydroxynonenal [J]. *Redox Biol*, 2025, 85: 103719.
- [16] Giorgi C, Marchi S, Pinton P. The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(11): 713-730.
- [17] Wang P, Zheng X, Du R H, *et al.* Astaxanthin protects against alcoholic liver injury via regulating mitochondrial redox balance and calcium homeostasis [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(49): 19531-19550.
- [18] Garbincius J F, Elrod J W. Mitochondrial calcium exchange in physiology and disease [J]. *Physiol Rev*, 2022, 102(2): 893-992.
- [19] Ahmed Selim N, Wojtovich A P. Mitochondrial membrane potential and compartmentalized signaling: Calcium, ROS, and beyond [J]. *Redox Biol*, 2025, 86: 103859.
- [20] Onishi M, Yamano K, Sato M, *et al.* Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy [J]. *EMBO J*, 2021, 40(3): e104705.
- [21] Wu C N, Zhang Z, Zhang W D, *et al.* Mitochondrial dysfunction and mitochondrial therapies in heart failure [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 175: 106038.
- [22] Santin Y, Sicard P, Vigneron F, *et al.* Oxidative stress by monoamine oxidase-a impairs transcription factor EB activation and autophagosome clearance, leading to cardiomyocyte necrosis and heart failure [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 25(1): 10-27.
- [23] He H, Huang W W, Pan Z G, *et al.* Intercellular Mitochondrial transfer: Therapeutic implications for energy metabolism in heart failure [J]. *Pharmacol Res*, 2025, 211: 107555.
- [24] 曹航, 唐亚静. 基于 Lats1/Yap 信号通路探讨苓桂术甘汤对急性心肌梗死心肌纤维化及预后的影响 [J]. *药品评价*, 2025, 22(8): 953-957.
- [25] 许诺, 刘岩, 李晓凤. 苓桂术甘汤治疗心衰作用机制研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2026, 28(2): 96-100.
- [26] Sun S, Xun G, Zhang J, *et al.* An integrated approach for investigating pharmacodynamic material basis of Lingguizhugan Decoction in the treatment of heart failure [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 295: 115366.
- [27] 任涵. 苓桂术甘汤通过 HIF-1 α /HO-1 信号通路调控心肌梗死后心肌细胞自噬和凋亡的作用机制 [D]. 合肥:

- 安徽中医药大学, 2025.
- [28] Yu S Y, Qian H, Tian D W, *et al.* Linggui Zhugan Decoction activates the SIRT1-AMPK-PGC1 α signaling pathway to improve mitochondrial and oxidative damage in rats with chronic heart failure caused by myocardial infarction [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1074837.
- [29] 南岳龙, 孙东辉, 张晓亮, 等. 苓桂术甘汤加减治疗阳虚水泛型慢性心力衰竭的效果及对 copeptin、TIM-3 及 TSG-6 水平的影响 [J]. *中医药学报*, 2025, 53(12): 91-95.
- [30] Zhao C Z, Ding H M, Hu Z Q, *et al.* Exploring the mechanism of Ling-Gui-Zhu-Gan Decoction in metabolic cardiomyopathy via inhibiting ferroptosis [J]. *Phytomedicine*, 2024, 135: 156234.
- [31] 黄金玲, 王慧慧, 陈慧芳, 等. 正交试验法优选苓桂术甘汤的提取工艺 [J]. *安徽中医学院学报*, 2011(6): 65-68.
- [32] 王翔, 莫佳佳, 汤同娟, 等. 基于 Nrf2/BNIP3 通路探讨苓桂术甘汤改善心肌梗死诱导大鼠心力衰竭的作用及机制 [J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(12): 2390-2397.
- [33] Yang Y L, Zhao C Z, Zhao C C, *et al.* Ling-Gui-Zhu-Gan Decoction protects against doxorubicin-induced myocardial injury by downregulating ferroptosis [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2024, 76(4): 405-415.
- [34] 汤同娟, 王翔, 周鹏, 等. 基于 Nrf2/BNIP3 信号通路探讨苓桂术甘汤含药血清对心肌细胞线粒体氧化应激的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(12): 3303-3311.
- [35] 汤同娟, 王翔, 左梦雨, 等. 苓桂术甘汤含药血清通过 PI3K/Akt 信号通路保护 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞损伤 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(13): 1-9.
- [36] Liu A L, Liu Y F, Wang G, *et al.* The role of ipRGCs in ocular growth and myopia development [J]. *Sci Adv*, 2022, 8(23): eabm9027.
- [37] Hinton A Jr, Claypool S M, Neikirk K, *et al.* Mitochondrial structure and function in human heart failure [J]. *Circ Res*, 2024, 135(2): 372-396.
- [38] D'Angelo D, Rizzuto R. The mitochondrial calcium uniporter (MCU): Molecular identity and role in human diseases [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(9): 1304.
- [39] De Mario A, D'Angelo D, Zanotti G, *et al.* The mitochondrial calcium uniporter complex-a play in five acts [J]. *Cell Calcium*, 2023, 112: 102720.
- [40] Dalleau S, Baradat M, Guéraud F, *et al.* Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance [J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(12): 1615-1630.
- [41] Yu Z Q, Chen R Z, Li M H, *et al.* Mitochondrial calcium uniporter inhibition provides cardioprotection in pressure overload-induced heart failure through autophagy enhancement [J]. *Int J Cardiol*, 2018, 271: 161-168.
- [42] 王荣, 黄金玲. 苓桂术甘汤治疗心血管疾病的作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2024, 55(9): 3146-3156.
- [43] 师帅, 宋庆桥, 吴华芹, 等. 苓桂术甘汤治疗冠心病心律失常的体会 [J]. *现代中医临床*, 2022, 29(2): 60-63.
- [44] Li A L, Wang X X, Yang R Y, *et al.* Therapeutic potential and mechanisms of traditional Chinese medicine in regulating energy metabolism imbalance in heart failure [J]. *Chin Herb Med*, 2025, 17(4): 685-702.

[责任编辑 李亚楠]