

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2026.04.017

参芪健心方对慢性心力衰竭模型大鼠心脏组织线粒体自噬及 PINK1/Parkin 信号通路的影响

谢沛池¹, 刘攀², 丁子彤¹, 白敬一¹, 庞德棋¹, 戴小华³✉

1. 安徽中医药大学第一临床医学院, 安徽省合肥市梅山路117号, 230000; 2. 安徽中医药大学中医学院; 3. 安徽中医药大学第一附属医院

[摘要] 目的 从PTEN诱导激酶1(PINK1)/E3泛素连接酶(Parkin)通路调控线粒体自噬角度探讨参芪健心方治疗慢性心力衰竭(CHF)的可能作用机制。方法 SD雄性大鼠采用腹主动脉缩窄术建立大鼠CHF模型,将造模成功的24只大鼠随机分为模型组、沙库巴曲缬沙坦组及参芪健心低、高剂量组,每组6只;另取6只大鼠设为假手术组,仅分离腹主动脉后即复位关腹。参芪健心低、高剂量组大鼠分别给予参芪健心方混悬液4.41、17.64 g/(kg·d)灌胃,沙库巴曲缬沙坦组大鼠给予沙库巴曲缬沙坦钠片10 mg/(kg·d)混悬液灌胃,假手术组和模型组大鼠予10 ml/(kg·d)生理盐水灌胃,均连续干预4周。检测心功能指标左心室射血分数(LVEF)、左室短轴收缩率(LVFS),血清脑钠肽(BNP)含量,HE染色和Masson染色进行心肌组织病理观察,透射电子显微镜观察心脏组织超微结构,Rt-qPCR法检测大鼠心肌组织PINK1/Parkin通路和自噬相关蛋白[包括苣荬素1(Beclin-1)、p62、微管相关蛋白1轻链3(LC3)]及mRNA表达。结果 与假手术组比较,模型组大鼠LVEF、LVFS水平均显著降低,血清BNP含量升高,心脏组织中PINK1、Parkin、Beclin1 mRNA及其蛋白水平降低,p62 mRNA及其蛋白水平升高,微管相关蛋白1轻链3β(LC3B) mRNA、磷酸化PTEN诱导激酶1(p-PINK1)、磷酸化E3泛素连接酶(p-Parkin)蛋白及微管相关蛋白轻链3蛋白Ⅱ与微管相关蛋白轻链3蛋白Ⅰ的比值(LC3Ⅱ/LC3Ⅰ)均显著降低($P<0.05$);病理结果显示,模型组大鼠心肌细胞明显水肿、坏死及变性,心肌纤维排列紊乱增多,并伴有广泛炎性细胞浸润,线粒体中、重度肿胀,少数线粒体空泡变,视野内未见明显自噬。与模型组比较,参芪健心高剂量组和沙库巴曲缬沙坦组上述各指标均显著改善($P<0.05$),且参芪健心高剂量组各指标改善优于参芪健心低剂量组($P<0.05$),参芪健心高剂量组心肌肌原纤维排列规整、走向有序,横纹结构清晰,坏死细胞显著减少,偶见自噬溶酶体。结论 参芪健心方通过激活心肌组织PINK1/Parkin信号通路,增强线粒体自噬,清除功能失调的线粒体,从而改善心功能延缓CHF的进展。

[关键词] 慢性心力衰竭;线粒体;自噬;PTEN诱导激酶1;E3泛素连接酶;参芪健心方

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是多种心血管疾病发展的终末阶段,患病率随年龄增长显著上升,在≥65岁人群中可达5%~10%,其核心病理机制涉及心肌细胞损伤、能量代谢失衡和神经内分泌系统过度激活^[1]。线粒体作为心脏能量的主要来源,其功能异常会导致心肌收缩力下降、氧化应激加剧及细胞死亡,加剧心力衰竭的能量危

机^[2]。在CHF进程中,心肌中线粒体分裂/融合失衡、呼吸链复合体功能缺陷及活性氧(ROS)积累显著,这些异常与线粒体自噬调控密切相关^[3]。有研究^[4]显示,线粒体功能障碍是CHF进展的关键因素,线粒体自噬关键蛋白的表达下调或活性降低可导致异常线粒体清除效率下降。因此,线粒体自噬对于维持心肌细胞能量稳态至关重要^[5]。PTEN诱导激酶1(PINK1)/E3泛素连接酶(Parkin)通路是线粒体自噬的核心调控途径,当线粒体膜电位受损时,PINK1稳定在线粒体外膜,磷酸化泛素并

基金项目:安徽中医药大学校级探索性科研项目(AHUCM2024 TS085)

✉ 通讯作者:xin d3980@163.com

招募 Parkin, 后者泛素化线粒体蛋白, 促使自噬受体蛋白 (如自噬受体 p62 蛋白) 识别泛素化标记, 最终通过微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) 介导的自噬体清除受损线粒体^[6-7]。

在 CHF 的治疗过程中, 西医常用药物 (如利尿剂、血管紧张素转化酶抑制剂、 β 受体阻滞剂) 可能引起低血压、肾功能恶化、电解质紊乱、心动过缓等副作用, 部分患者无法耐受或需要频繁调整剂量^[8]。参芪健心方是本团队针对 CHF 气虚、血瘀、水饮病理特点而创立的中医组方, 以益气健脾为核心, 活血化瘀与温阳利水并重。前期研究^[9-11]证实, 参芪健心方联合西药可显著改善 CHF 患者心功能和临床症状, 降低 N 末端脑钠肽前体 (NT-proBNP) 水平。因此, 本研究从心肌线粒体自噬角度探讨参芪健心方干预 CHF 的可能作用机制, 为其临床应用提供依据。本研究经安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准 (伦理审查号: AZYFY2024-1005)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 32 只, 6~8 周龄, 体质量 250~270 g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (辽) 2020-0001。实验动物在安徽中医药大学实验动物中心标准化环境中饲养, 环境温度 21~25 °C, 相对湿度 40%~70%, 采用 12 h 明暗循环照明, 并保证饲料和饮水自由摄取。

1.2 药物

参芪健心方颗粒剂组成: 黄芪 18 g, 红参 6 g, 桂枝 9 g, 炙淫羊藿 9 g, 茯苓 12 g, 麸炒白术 9 g, 丹参 12 g, 炒葶苈子 9 g, 药物由安徽宏方药业有限公司提供。沙库巴曲缬沙坦钠片 (100 mg/片, 批准文号: 国药准字 J20171054), 北京诺华制药有限公司。

1.3 主要试剂与仪器

大鼠脑钠肽 (BNP) ELISA 试剂盒 (泉州市睿信生物科技有限公司, 批号: RX302462R); TRIzol RNA 提取试剂 (上海圣尔生物科技有限公司, 批号: SB-MR009); 抗体热启动染料法荧光定量 PCR 预混液 (批号: EG20117M)、三代逆转录去基因组 DNA 一管化预混液 (批号: EG15133S), 江苏百时美生物科技有限公司; 强效裂解液 (Biosharp 公司, 批号: BL504A); 磷酸化 PTEN 诱导激酶 1 (p-PINK1) 抗体 (Gene Universal 公司, 批号: UPA04762);

PINK1 抗体 (批号: DF7742)、磷酸化 E3 泛素连接酶 (p-Parkin) 抗体 (批号: AF3500)、Parkin 抗体 (批号: AF0235)、微管相关蛋白 1 轻链 3 β (LC3B) 抗体 (批号: AF4650)、苡氯素 1 (Beclin-1) 抗体 (批号: AF5128)、p62 抗体 (批号: AF5384), Affinity 公司; HE 染色试剂 (Servicebio 公司, 批号: G1005); 异氟烷 (深圳瑞沃德生命科技有限公司, 批号: R510-22-10); 青霉素 (石药控股集团有限公司, 批号: H13021634); Masson 三色染色试剂盒 (批号: G1006)、电镜固定液 (批号: G1102), 武汉赛维尔生物科技有限公司; 山羊抗小鼠 IgG (批号: ZB-2305)、山羊抗兔 IgG (批号: ZB-2301), 北京中杉金桥生物技术有限公司; ECL 超敏发光试剂盒 (GLPBIO 公司, 批号: GK10008)。

小动物超声影像系统 (Visualsonics 公司, 型号: Vevo2100); 透射电子显微镜 (Hitachi 公司, 型号: HT7800); 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司, 型号: StepOne Plus); 全自动酶标仪 (Bio Tek 公司, 型号: ELx800); 电泳仪及转膜系统 (Tanon 公司, 型号: EPS300/VE-186); 化学发光成像仪 (上海培清科技公司, 型号: JS-M6P); 冰冻切片机 (Leica 公司, 型号: RM2016); 光学显微镜 (OLYMPUS 公司, 型号: CX43); 高速冷冻离心机 (安徽嘉文仪器公司, 型号: JW-3021HR)。

1.4 分组及造模

32 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 采用随机数字表法分为假手术组 (6 只) 和模型制备组 (26 只)。模型制备组大鼠采用腹主动脉缩窄术制备 CHF 大鼠模型^[12]: 麻醉采用异氟烷 (浓度 3%~4%, 流量 7~8 L/min) 吸入麻醉, 浓度维持在 1.5%~3%。大鼠固定后, 腹部手术区域常规剃毛消毒, 剑突下 2~3 cm 处沿腹白线作长约 3 cm 纵向切口。轻柔移出腹腔内脏置于无菌生理盐水浸润纱布上, 钝性分离至腹主动脉鞘, 暴露腹主动脉、双侧肾上腺区域及伴行血管神经。在暴露的腹主动脉旁平行紧贴放置钝化 7 号针头 (直径约 0.7 mm), 使用 4-0 手术缝线将针头与血管一并结扎 (左肾即刻缺血变白作为成功标志), 迅速撤出针头形成约 60%~70% 管腔狭窄, 观察肾脏血流恢复后复位脏器、关闭腹腔。术后所有大鼠均每天腹腔注射青霉素 4000 U/只, 连续 3 天预防感染, 并恢复自由饮水和摄食。模型制备期持续 8 周, 期间死亡大鼠 2 只。造模结束后次日, 对存活大鼠进行超声心动图检查, 左心室射血分数 (LVEF) < 63%, 左心室短轴缩短率 (FS) < 30%,

即认为造模成功^[13]。最终将造模成功的 24 只大鼠采用随机数字表法分为模型组、沙库巴曲缬沙坦组和参芪健心低、高剂量组，每组 6 只。假手术组 6 只大鼠仅分离并穿线标记腹主动脉后即复位脏器、缝合腹腔。

1.5 干预方法

参考《实验动物学》^[14]中实验动物与人体表面积等效量换算比率，以成人每日剂量折算大鼠等效剂量为低剂量，参芪健心低、高剂量组大鼠分别给予参芪健心方混悬液 4.41、17.64 g/（kg·d）灌胃，沙库巴曲缬沙坦组大鼠给予沙库巴曲缬沙坦钠片 10 mg/（kg·d）混悬液灌胃。假手术组和模型组大鼠予 10 ml/（kg·d）生理盐水灌胃。每组连续干预 4 周。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 一般情况 实验期间观察各组大鼠精神状态、毛发、活动量、反应灵敏度、排便等情况。

1.6.2 心功能检测 全部干预结束后次日，对各组大鼠进行二维超声心动图检测。采用异氟烷（浓度 3%~4%，流量 7~8 L/min）吸入麻醉，浓度维持在 1.5%~3%，然后固定在大鼠板上。心前区脱毛，超声探头覆盖偶联剂。频率为 12 MHz，深度为 3.5 cm，速度为 200 mm/s。连续 3 个心动周期测量 LVEF、左室短轴收缩率（LVFS），结果取平均值。

1.6.3 ELISA 法检测大鼠血清 BNP 含量 各组大鼠在完成心脏超声检查 24 h 后，于禁食 12 h（自由饮水）状态下，采用异氟烷（浓度 3%~4%，流量 7~8 L/min）吸入麻醉，浓度维持在 1.5%~3%，麻醉生效后，行腹主动脉穿刺采血。4℃、3000 r/min（离心半径 10 cm）离心 12 min 分离血清。收集上清血清于 EP 管，-80℃冻存。按照试剂盒说明书，采用 ELISA 法测定血清中 BNP 的浓度。

1.6.4 心肌组织病理学形态 于采血后即刻摘取心脏，取约 50 mg 左心室组织分装冻存管，液氮速冻后-80℃保存。剩余心脏组织经 4% 多聚甲醛固定，脱水、透明、浸蜡、包埋、切片，并进行 HE 染色、Masson 染色，光学显微镜下观察大鼠心肌组织胶原纤维沉积情况。

1.6.5 透射电子显微镜观察心脏组织超微结构 电镜固定液固定大鼠心脏组织后，用丙酮分级串联脱水，最后包埋环氧树脂。制备超薄样品，通过透射电镜观察大鼠心脏组织的超微结构。

1.6.6 Rt-qPCR 法检测大鼠心肌组织 *PINK1*、*Parkin*、*p62*、*Beclin-1*、*LC3B* mRNA 表达 各组取

大鼠心肌组织样本 50~100 mg 经液氮研磨后，使用 TRIzol 试剂裂解细胞，经氯仿抽提实现有机相分离，收集含 RNA 的上清水相，继而采用异丙醇沉淀总 RNA，并使用 75% 乙醇洗涤纯化，所得 RNA 沉淀溶解于 DEPC 水中并于-80℃保存。随后，取 1 μg 总 RNA，加入含逆转录酶和三代逆转录去基因组 DNA 一管化预混液，经 37℃（2 min）、55℃（15 min）和 85℃（5 min）程序进行基因组 DNA 消化及 cDNA 合成，产物于-20℃保存。以合成的 cDNA 为模板，利用基因特异性引物和含 SYBR Green I 染料的 Taq SYBR Green qPCR Premix 配制反应体系，在实时荧光定量 PCR 仪上运行 40 个循环（95℃变性 15 s，60℃退火/延伸 30 s），通过实时监测荧光信号，并基于 2^{-ΔΔCt} 法计算目标基因相对于内参基因（β-actin）的相对表达量，引物序列见表 1，由合肥源恩生物技术有限公司合成。

表 1 大鼠心肌组织 *PINK1*、*Parkin*、*p62*、*Beclin-1*、*LC3B* 引物序列表

Table 1 Primer sequences of *PINK1*, *Parkin*, *p62*, *Beclin-1* and *LC3B* in myocardial tissues of rats

基因	引物序列	产物长度/bp
<i>PINK1</i>	上游: CCTCCAGCGAAAGCCATCTTA	148
	下游: GACGTCTGAGTCTGCCCCTA	
<i>Parkin</i>	上游: TTCCAAACCGGATGAGTGGA	88
	下游: GTTGGGTGTGCTCCACATTT	
<i>p62</i>	上游: CTGTCGCCTCCCTCTAATCC	108
	下游: ATTCTCCGGCTCCATCTTGG	
<i>Beclin-1</i>	上游: GAATGAGGGCGACAGTGAAC	134
	下游: CCTGGACCTTCTCCAGGTTT	
<i>LC3B</i>	上游: CAACAGGAAGAGAGCCATGC	130
	下游: TCAGACACGAGTGAGTGACC	
<i>β-actin</i>	上游: CCCATCTATGAGGGTTACGC	150
	下游: TTTAATGTCACGCACGATTTTC	

注: *PINK1*, PTEN 诱导激酶 1; *Parkin*, E3 泛素连接酶; *Beclin1*, 苊氯素 1; *LC3B*, 微管相关蛋白 1 轻链 3β。

1.6.7 Western Blot 法检测心肌组织 *PINK1*、p-*PINK1*、*Parkin*、p-*Parkin*、*p62*、*Beclin-1*、*LC3-I*、*LC3-II* 蛋白水平 采用随机数字表法每组选取 3 只大鼠组织样本 50~100 mg，经 RIPA 裂解液冰上裂解后，在 4℃、12 000 r/min 离心 15 min（离心半径 10 cm）获取上清总蛋白。蛋白样品经 5×SDS-PAGE 上样缓冲液变性处理，于预制 SDS-PAGE 凝胶中电泳分离。分离蛋白通过湿式电转印法（300 mA 恒流）转移至 PVDF 膜。随后，膜于 5% 脱脂奶粉溶液中

室温封闭 2 h。膜再依次与特异性一抗（4 ℃孵育过夜）及辣根过氧化物酶（HRP）标记的二抗（室温孵育 2 h）进行免疫反应，每次孵育后均以 PBST 充分洗涤。最后，在暗室中使用 ECL 化学发光底物反应，用 ImageJ 2. 1. 0 软件定量信号强度。

1. 7 统计学方法

应用 SPSS 26. 0 软件进行数据分析。计量资料均符合正态分布，以均值±标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，方差齐者采用单因素方差分析，以 LSD 法进行两两比较；方差不齐者多组间用 Dunnett's T_3 检验，两两比较用 Mann-Whitney U 检验。以 $P<0. 05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2. 1 各组大鼠的一般状态比较

假手术组大鼠精神饱满，反应敏捷，毛发光洁、有光泽，活动活跃，探索行为频繁，排便成形、规律，进食量正常；模型组大鼠精神萎靡，毛发枯槁，多蜷缩不动，逃避反射延迟，便秘与稀便交替，进食减少；参芪健心方高剂量组表现为精神

较振作，毛发稍显蓬松，偶见倦怠，反应轻度迟缓，排便基本正常，进食较模型组明显增加；参芪健心方低剂量组仍见精神不振，毛发粗糙，嗜睡少动，反应迟钝，大便时干时稀，进食量略有增加；沙库巴曲缬沙坦组在精神、毛发、进食量、主动探索增加及反应灵敏度方面改善显著，接近假手术组水平，仅偶见排便异常。

2. 2 各组大鼠心功能指标及血清 BNP 含量比较

表 2 示，与假手术组比较，模型组大鼠 LVEF、LVFS 水平均显著降低，血清 BNP 含量升高（ $P<0. 05$ ）。与模型组比较，参芪健心方高、低剂量组和沙库巴曲缬沙坦组 LVEF、LVFS 水平均升高，血清 BNP 含量降低（ $P<0. 05$ ）。与沙库巴曲缬沙坦组比较，参芪健心方高、低剂量组 LVEF、LVFS 水平降低，血清 BNP 含量升高（ $P<0. 05$ ）。与参芪健心方低剂量组比较，参芪健心方高剂量组 LVEF、LVFS 水平升高，血清 BNP 含量降低（ $P<0. 05$ ）。

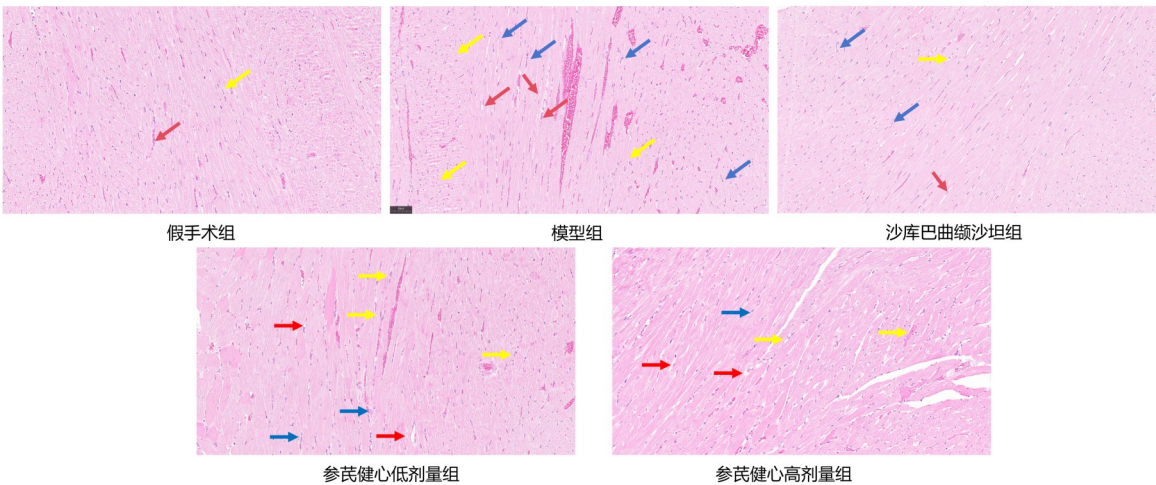
2. 3 各组大鼠心肌组织 HE 染色结果比较

图 1 示，假手术组大鼠心肌组织形态结构正

表 2 各组大鼠心功能指标及血清 BNP 水平比较
Table 2 Comparison of cardiac function indices and serum BNP levels in rats of each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	LVEF/%	LVFS/%	BNP/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
假手术组	6	66. 35±4. 54	37. 86±3. 24	155. 71±30. 32
模型组	6	24. 78±3. 80 ^{a)}	12. 30±1. 93 ^{a)}	781. 38±72. 07 ^{a)}
沙库巴曲缬沙坦组	6	61. 76±2. 47 ^{b)}	34. 20±1. 93 ^{b)}	341. 01±53. 21 ^{b)}
参芪健心低剂量组	6	37. 69±2. 22 ^{b) c)}	18. 30±1. 09 ^{b) c)}	633. 04±53. 31 ^{b) c)}
参芪健心高剂量组	6	55. 72±2. 38 ^{b) c) d)}	28. 65±2. 60 ^{b) c) d)}	434. 24±43. 74 ^{b) c) d)}

注：LVEF，左心室射血分数；LVFS，左室短轴收缩率；BNP，脑钠肽。
a) 与假手术组比较， $P<0. 05$ ；b) 与模型组比较， $P<0. 05$ ；c) 与沙库巴曲缬沙坦组比较， $P<0. 05$ ；d) 与参芪健心低剂量组比较， $P<0. 05$ 。



注：蓝色箭头示炎性细胞浸润；黄色箭头示心肌细胞排列紊乱；红色箭头示心肌细胞坏死，空泡样改变。

图 1 各组大鼠心肌组织形态 HE 染色结果比较（×200）

Figure 1 Comparison of HE staining results of morphology of myocardial tissues in rats of each group（×200）

常，心肌纤维排列规整、走向规则，横纹结构清晰。模型组可见心肌细胞明显水肿、坏死及变性，心肌纤维排列紊乱，并伴有广泛炎性细胞浸润。沙库巴曲缬沙坦组心肌组织的病理状态得到显著改善，仅见少量炎性细胞浸润。参芪健心方低剂量组心肌病理变化较模型组有所减轻，仍存在细胞排列紊乱及明显的炎性细胞浸润现象。参芪健心高剂量组心肌细胞排列较为有序，仅见散在的少量炎性细胞浸润。

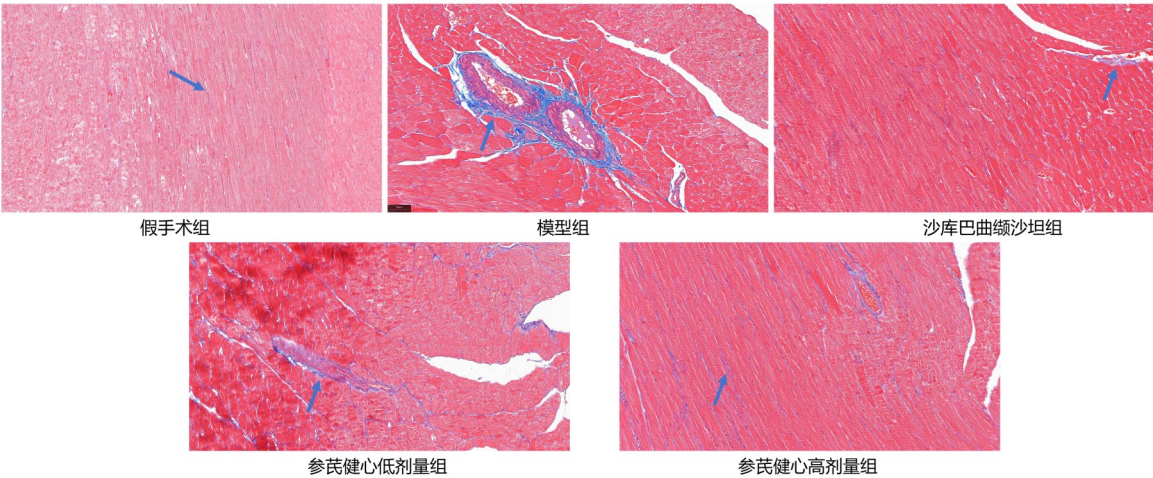
2.4 各组大鼠心肌组织 Masson 染色结果比较

图 2 示，假手术组心肌纤维排列有序，细胞间质均匀，无明显纤维化及炎性反应表现。模型组大

鼠心肌纤维结构紊乱，胶原纤维沉积明显，纤维化程度增加。沙库巴曲缬沙坦组心肌仅有少量纤维化。参芪健心方低剂量组纤维化程度有一定程度减轻。参芪健心方高剂量组细胞间质增量轻微，纤维化程度降低。

2.5 各组大鼠心肌组织超微结构比较

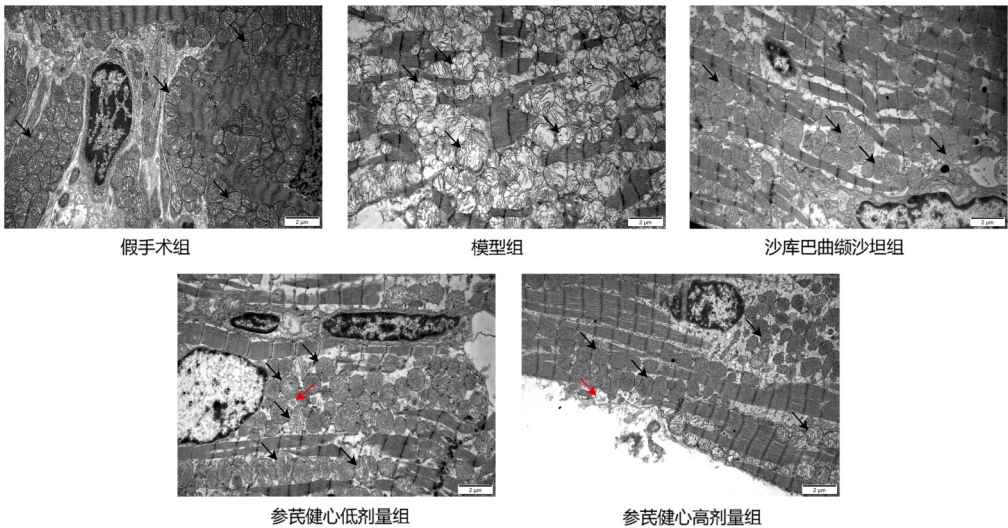
图 3 示，假手术组心肌细胞形态规则，肌原纤维排列基本规则，肌节结构清晰，肌原纤维间线粒体丰富，部分线粒体结构完整、内嵴清晰，视野内未见明显自噬。模型组肌细胞肿胀，肌原纤维排列不规则，部分肌节结构破坏，肌原纤维间线粒体中、重度肿胀，少数线粒体空泡变，视野内未见明



注：蓝色箭头示胶原纤维沉积。

图 2 各组大鼠心肌组织形态 Masson 染色结果比较 (×200)

Figure 2 Comparison of Masson's trichrome staining results of morphology of myocardial tissues in rats of each group (×200)



注：黑色箭头所示为线粒体，红色箭头所示为自噬溶酶体。

图 3 各组大鼠心肌组织透射电子显微镜下的心肌组织超微结构 (×2500)

Figure 3 Ultrastructural features of myocardial tissues in rats of each group observed by transmission electron microscopy (×2500)

显自噬。参芪健心低剂量组心肌组织显示一定程度的改善迹象,但仍存在损伤特征,肌细胞形态不规则,肌原纤维排列稍不规则,少数肌节结构破坏,肌原纤维间线粒体轻度肿胀,线粒体基质电子密度降低,少数线粒体内嵴断裂,视野内可见少量自噬溶酶体。参芪健心高剂量组肌细胞形态规则,肌原纤维排列基本规则,肌节结构清晰,肌原纤维间线粒体丰富,大部分线粒体结构完整、内嵴清晰,少数线粒体轻度肿胀,视野内偶见自噬溶酶体。沙库巴曲缬沙坦组肌细胞形态规则,肌原纤维排列稍不规则,肌节结构清晰,肌原纤维间线粒体丰富,大部分线粒体结构完整、内嵴清晰,视野内未见明显自噬。

2.6 各组大鼠心肌组织 PINK1/Parkin 通路相关蛋白 mRNA 表达比较

表 3 示,与假手术组比较,模型组大鼠心脏组织中 *PINK1*、*Parkin*、*Beclin1*、*LC3B* mRNA 相对表达量降低, *p62* mRNA 相对表达量升高 ($P<0.05$)。与模型组比较,各药物干预组心肌组织 *PINK1*、

Parkin、*Beclin1*、*LC3B* mRNA 相对表达量升高, *p62* mRNA 相对表达量降低 ($P<0.05$)。与沙库巴曲缬沙坦组比较,参芪健心方高、低剂量组心肌组织 *PINK1*、*Beclin1* mRNA 相对表达量降低, *p62* mRNA 表达升高 ($P<0.05$)。参芪健心方低剂量组 *Parkin*、*LC3B* mRNA 相对表达量亦降低 ($P<0.05$)。与参芪健心方低剂量组比较,参芪健心方高剂量组 *PINK1*、*Parkin*、*Beclin1*、*LC3B* mRNA 相对表达量升高, *p62* mRNA 相对表达量降低 ($P<0.05$)。

2.7 各组大鼠心肌组织 PINK1/Parkin 通路相关蛋白水平比较

表 4 示,与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织 *PINK1*、p-*PINK1*、*Parkin*、p-*Parkin*、*Beclin1* 蛋白水平及 *LC3 II*/*LC3 I* 值均显著降低, *p62* 蛋白水平升高 ($P<0.05$)。与模型组比较,除参芪健心方低剂量组 *LC3 II*/*LC3 I* 值差异无统计学意义外,其余各给药组心肌组织 *PINK1*、p-*PINK1*、*Parkin*、p-*Parkin*、*Beclin1* 蛋白水平及 *LC3 II*/*LC3 I* 值均显著升高, *p62* 蛋白水平降低 ($P<0.05$)。与沙库巴

表 3 各组大鼠心肌组织 PINK1/Parkin 通路相关蛋白 mRNA 相对表达量比较

Table 3 Comparison of mRNA expression for related proteins to the PINK1/Parkin pathway in myocardial tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	PINK1	Parkin	Beclin1	p62	LC3B
假手术组	6	1.08±0.09	0.95±0.08	1.09±0.07	1.07±0.21	0.97±0.09
模型组	6	0.24±0.06 ^{a)}	0.17±0.04 ^{a)}	0.13±0.03 ^{a)}	3.93±0.40 ^{a)}	0.29±0.07 ^{a)}
沙库巴曲缬沙坦组	6	0.86±0.08 ^{b)}	0.60±0.05 ^{b)}	0.72±0.07 ^{b)}	1.80±0.29 ^{b)}	0.88±0.09 ^{b)}
参芪健心低剂量组	6	0.37±0.02 ^{b) c)}	0.26±0.03 ^{b) c)}	0.28±0.04 ^{b) c)}	3.15±0.23 ^{b) c)}	0.61±0.05 ^{b) c)}
参芪健心高剂量组	6	0.68±0.12 ^{b) c) d)}	0.56±0.06 ^{b) d)}	0.59±0.07 ^{b) c) d)}	2.32±0.13 ^{b) c) d)}	0.82±0.12 ^{b) d)}

注: PINK1, PTEN 诱导激酶 1; Parkin, E3 泛素连接酶; Beclin1, 苊氯素 1; LC3B, 微管相关蛋白 1 轻链 3β。

a) 与假手术组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与沙库巴曲缬沙坦组比较, $P<0.05$; d) 与参芪健心低剂量组比较, $P<0.05$ 。

表 4 各组大鼠心肌组织 PINK1/Parkin 通路相关蛋白水平比较

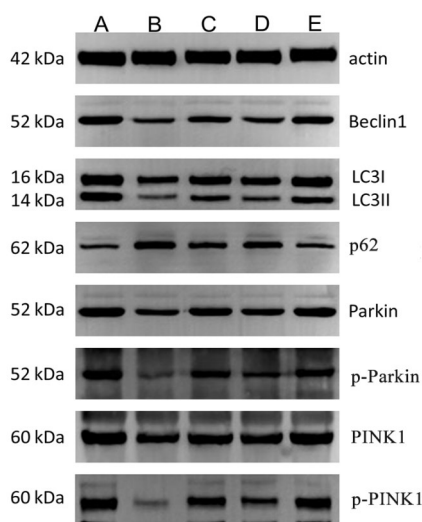
Table 4 Comparison of PINK1/Parkin pathway-related proteins levels in myocardial tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	PINK1	p-PINK1	Parkin	p-Parkin	p62	Beclin-1	LC3 II /LC3 I
假手术组	3	0.98±0.03	0.69±0.03	0.73±0.30	0.94±0.06	0.18±0.00	0.55±0.03	0.77±0.01
模型组	3	0.50±0.03 ^{a)}	0.18±0.54 ^{a)}	0.38±0.02 ^{a)}	0.26±0.04 ^{a)}	0.46±0.02 ^{a)}	0.21±0.02 ^{a)}	0.31±0.06 ^{a)}
沙库巴曲缬沙坦组	3	0.90±0.05 ^{b)}	0.63±0.05 ^{b)}	0.66±0.05 ^{b)}	0.75±0.07 ^{b)}	0.21±0.01 ^{b)}	0.49±0.03 ^{b)}	0.75±0.02 ^{b)}
参芪健心方低剂量组	3	0.64±0.02 ^{b) c)}	0.34±0.03 ^{b) c)}	0.46±0.01 ^{b) c)}	0.46±0.04 ^{b) c)}	0.36±0.01 ^{b) c)}	0.29±0.04 ^{b) c)}	0.40±0.04 ^{c)}
参芪健心方高剂量组	3	0.75±0.04 ^{b) c) d)}	0.49±0.03 ^{b) c) d)}	0.58±0.03 ^{b) c) d)}	0.63±0.07 ^{b) c) d)}	0.30±0.01 ^{b) c) d)}	0.40±0.02 ^{b) c) d)}	0.54±0.01 ^{b) c) d)}

注: PINK1, PTEN 诱导激酶 1; p-PINK1, 磷酸化 PTEN 诱导激酶 1; Parkin, E3 泛素连接酶; p-Parkin: 磷酸化 E3 泛素连接酶; Beclin1, 苊氯素 1; LC3 II, 微管相关蛋白轻链 3 蛋白 II; LC3 I, 微管相关蛋白轻链 3 蛋白 I。

a) 与假手术组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与沙库巴曲缬沙坦组比较, $P<0.05$; d) 与参芪健心低剂量组比较, $P<0.05$ 。

曲缙沙坦组比较, 参芪健心方低、高剂量组 PINK1、p-PINK1、Parkin、p-Parkin、Beclin1 蛋白水平及 LC3 II/LC3 I 值均显著降低, p62 蛋白水平升高 ($P < 0.05$)。与参芪健心方低剂量组比较, 参芪健心方高剂量组 PINK1、p-PINK1、Parkin、p-Parkin、Beclin1 蛋白水平及 LC3 II/LC3 I 值均显著升高, p62 蛋白水平降低 ($P < 0.05$)。各组大鼠心肌组织 PINK1/Parkin 通路相关蛋白电泳图见图 4。



注: A 假手术组; B 模型组; C, 参芪健心方高剂量组; D, 参芪健心方低剂量组; E, 沙库巴曲缙沙坦组; PINK1, PTEN 诱导激酶 1; p-PINK1, 磷酸化 PTEN 诱导激酶 1; Parkin, E3 泛素连接酶; p-Parkin: 磷酸化 E3 泛素连接酶; Beclin1, 苺氯素 1; LC3 II, 微管相关蛋白轻链 3 蛋白 II; LC3 I, 微管相关蛋白轻链 3 蛋白 I。

图 4 各组大鼠心肌组织 PINK1/Parkin 通路相关蛋白电泳图

Figure 4 Electrophoresis of PINK1/Parkin pathway-related proteins in myocardial tissues of rats in each group

3 讨论

CHF 表征为多种心脏疾病进展至终末期的共同临床综合征, 其根源在于心肌结构、节律、传导或功能的异常, 其发病率与病死率居高不下, 严重影响患者生活质量^[15]。参芪健心方针对 CHF 气虚阳微、血瘀水停之核心病机, 具有益气复脉、温阳利水、活血通络的功效。其中黄芪、红参共为君药, 大补元气, 固摄心气, 使气旺则血行津布; 白术、茯苓健运中焦, 渗利水湿, 助气化以消内停之水饮; 丹参活血祛瘀, 通利血脉, 改善心络瘀阻; 淫羊藿温补肾阳, 桂枝温通心阳, 二者振奋一身之阳气; 葶苈子泻肺利水, 宣通上焦, 导壅滞之水邪下行。

本研究通过腹主动脉缩窄术构建了 CHF 大鼠模型, 模型组大鼠精神萎靡, 毛发枯槁, 多蜷缩不动, 逃避反射延迟, 便秘与稀便交替, 进食减少;

表现出典型的心功能不全, 即 LVEF、LVFS 显著降低, 血清 BNP 水平升高; 心肌组织 HE 染色和 Masson 染色均显示心肌纤维化以及广泛的炎性细胞浸润, 这些表型与临床 CHF 特征高度吻合。参芪健心方高、低剂量组和沙库巴曲缙沙坦组均能不同程度改善大鼠一般状态和心功能指标, 降低血清 BNP 水平, 减轻心肌纤维化程度, 并且参芪健心方疗效表现出明显的剂量依赖性, 高剂量效果优于低剂量, 且更接近西药沙库巴曲缙沙坦, 再次证明参芪健心方治疗 CHF 疗效确切。

现代研究^[16]表明, 线粒体功能障碍已成为 CHF 乃至其他心血管疾病发生发展的关键病理机制。因此, 针对线粒体功能的干预措施, 被视作延缓 CHF 疾病进程的重要治疗策略。当线粒体损伤时, 膜电位丧失导致 PINK1 稳定积累于线粒体外膜, 形成二聚体并自磷酸化激活^[17]。PINK1 磷酸化 Parkin 的 Ser65 残基及泛素分子, 激活 Parkin 活性, 催化线粒体外膜蛋白的 K48/K63 泛素链修饰, 泛素化蛋白被适配蛋白识别, 通过 LC3 相互作用域招募 LC3 II 包裹的吞噬膜, 形成自噬溶酶体降解受损线粒体^[18-19]。在这一过程中, p62 桥接泛素化线粒体蛋白与 LC3 II, 促进自噬体靶向; 同时受核因子红系 2 相关因子 2 (NRF2) 转录调控, 参与氧化应激应答^[20-21]。Beclin1 可启动自噬前体形成, 与 B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2) 相互作用调控自噬与凋亡平衡^[22]。LC3 I 脂化为 LC3 II 并定位于自噬膜, LC3 II/LC3 I 比值升高标志自噬流激活^[23]。CHF 的病理过程中, 心肌中 PINK1 蛋白或 mRNA 显著降低可导致线粒体自噬启动失败^[24]。Parkin 活性受损导致泛素化效率下降, 自噬靶向信号减弱, 并且溶酶体酸化和水解酶功能下降导致 LC3 II 包裹的线粒体无法降解^[25]。因此, 本研究聚焦于 PINK1/Parkin 通路介导的线粒体自噬这一关键的质量控制机制, 探讨参芪健心方治疗 CHF 的潜在作用靶点。

本研究结果显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌组织超微结构少数线粒体空泡变, 视野内未见明显自噬; PINK1、Parkin、Beclin1 蛋白及其 mRNA 表达降低, p62 蛋白及其 mRNA 表达升高, p-PINK1、p-Parkin、LC3B mRNA 及 LC3 II/LC3 I 值显著下调, 提示在 CHF 的进展期 PINK1/Parkin 通路介导的线粒体自噬功能受损, 导致受损线粒体清除障碍, 这可能是加剧心肌细胞能量危机和结构损伤的重要原因之一。而各药物组均能不同程度纠正上述指标变化, 且以参芪健心方高剂量优于低剂量。值得注意

的是,参芪健心方低剂量组 LC3 II/LC3 I 与模型组差异无统计学意义,说明其虽能部分激活自噬起始,但未能有效推动自噬流完成,这可能是其功能改善有限的关键机制之一。透射电镜结果进一步证实,参芪健心方高剂量组心肌线粒体肿胀空泡化减轻,嵴结构得到改善,并可见自噬小体形成,提示参芪健心方可通过激活 PINK1/Parkin 信号通路,增强线粒体自噬流,从而促进受损线粒体的清除,这可能是其改善心功能、延缓心肌重构的核心机制所在。另外,心脏组织中的自噬活动具有双重效应,适度的自噬对心肌细胞具有保护作用,然而由长期或高强度应激诱导的持续性线粒体自噬则被证明会加剧 CHF 的病情进展^[26]。参芪健心方高剂量组的干预并未导致自噬相关指标的持续升高,而是使其恢复至接近正常的水平,并伴随着心功能和结构的改善。这表明在自噬不足时予以增强,而非盲目地过度激活,其适度调控的特性可能与中药多成分、多靶点的整体调节优势有关,但其精确的“调控窗口”仍需进一步研究。

综上所述,参芪健心方能够通过激活 PINK1/Parkin 信号通路,增强线粒体自噬,清除功能失调的线粒体,改善 CHF 大鼠的心功能,延缓 CHF 的进展,这为参芪健心方的临床推广应用提供了重要的实验依据。本研究仅初步检测了相关蛋白及其 mRNA 表达情况,未来可以通过细胞实验或进一步利用基因敲除等技术明确 PINK1/Parkin 通路在参芪健心方治疗 CHF 疗效中的作用机制;同时,动态观察 CHF 不同时期自噬水平的变化及干预效应,有助于更精确地揭示参芪健心方调控线粒体自噬的机制。

参考文献

- [1] CELIK A, URAL D, SAHIN A, et al. Trends in heart failure between 2016 and 2022 in Türkiye (Trends-HF): a nationwide retrospective cohort study of 85 million individuals across entire population of all ages [J]. *Lancet Reg Health Eur*, 2023, 33: 100723. doi: 10.1016/j.lanepe.2023.100723.
- [2] ROSCA MG, HOPPEL CL. New aspects of impaired mitochondrial function in heart failure [J]. *Bioenerg Biomembr*, 2009, 41(2): 107-112.
- [3] XUE Y. Study on the mechanism of exercise tolerance in chronic heart failure from the perspective of mitochondrial dynamics [J]. *Biomed J Sci Techn Res*, 2021, 33(4): 25921-25922.
- [4] SHIRAKABE A, ZHAI P, IKEDA Y, et al. Drp1-dependent mitochondrial autophagy plays a protective role against pressure overload-induced mitochondrial dysfunction and heart failure [J]. *Circulation*, 2016, 133(13): 1249-1263.
- [5] TITUS AS, SUNG EA, ZABLOCKI D, et al. Mitophagy for cardioprotection [J]. *Basic Res Cardiol*, 2023, 109(1): 42.
- [6] 王香香, 凌江红, 王煜姣, 等. Pink1/Parkin 信号通路调控线粒体自噬的研究进展 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2022, 41(4): 919-926.
- [7] 梁丹阳, 戴汉川. PINK1/Parkin 通路在线粒体自噬氧化损伤中的作用 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2018, 40(1): 116-123.
- [8] HUNT SA, BAKER DW, CHIN MH, et al. ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2002, 21(2): 189-203.
- [9] 鄢德华. 参芪健心方治疗气虚血瘀证慢性心力衰竭患者的疗效观察 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2023.
- [10] 施俊峰. 参芪健心方治疗气虚血瘀证慢性心力衰竭患者的临床观察 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2020.
- [11] 左强, 杨帆, 桂青, 等. 参芪健心方治疗射血分数中间值心力衰竭患者临床观察 [J]. *安徽中医药大学学报*, 2023, 42(2): 13-17.
- [12] 朱林强, 周永焯, 谢晓明, 等. 大鼠腹主动脉缩窄术致大鼠慢性心衰的建模与体会 [J]. *现代医院*, 2015, 15(10): 21-24.
- [13] 李雪健, 张晓, 车运输, 等. 大鼠心力衰竭模型的建立与评估 [J]. *心脏杂志*, 2016, 28(6): 671-675.
- [14] 邹移海, 黄韧. 实验动物学 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2020: 134.
- [15] TOMASONI D, ADAMO M, LOMBARDI CM, et al. Highlights in heart failure [J]. *ESC Heart Fail*, 2019, 6(6): 1105-1127.
- [16] TIAN R, COLUCCI WS, ARANY Z, et al. Unlocking the secrets of mitochondria in the cardiovascular system: path to a cure in heart failure: a report from the 2018 national heart, lung, and blood institute workshop [J]. *Circulation*, 2019, 140(14): 1205-1216.
- [17] BUZHDYGAN TP, DEORE BJ, BALDWIN-LECLAIR A, et al. The SARS-CoV-2 spike protein alters barrier function in 2D static and 3D microfluidic in-vitro models of the human blood-brain barrier [J]. *Neurobiol Dis*, 2020, 146: 105131. doi: 10.1016/j.nbd.2020.105131.
- [18] Expert Panel on Gastrointestinal Imaging. ACR appropriateness criteria[®] right upper quadrant pain [J]. *J Am Coll Radiol*, 2019, 16(5S): S235-S243.
- [19] HE C, BASSIK MC, MORESI V, et al. Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis [J]. *Nature*, 2012, 481(7382): 511-515.
- [20] FRANKS SE, CAMPBELL CI, BARNETT EF, et al. Transgenic IGF-IR overexpression induces mammary tumors with basal-like characteristics, whereas IGF-IR-

- independent mammary tumors express a claudin-low gene signature[J]. *Oncogene*, 2012, 31(27):3298-3309.
- [21] CARVALHO AF, PINTO MP, GROU CP, et al. Ubiquitination of mammalian Pex5p, the peroxisomal import receptor[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(43):31267-31272.
- [22] RISAL S, ADHIKARI D, LIU K. Animal models for studying the in vivo functions of cell cycle CDKs[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1336: 155-166. doi: 10.1007/978-1-4939-2926-9_13.
- [23] XIA X, LIANG C, SHENG J, et al. Association between serum arsenic levels and gestational diabetes mellitus: a population-based birth cohort study[J]. *Environ Pollut*, 2018, 235:850-856. doi:10.1016/j.envpol.2018.01.016.
- [24] LIU Y, WANG Y, BI Y, et al. Emerging role of mitophagy in heart failure: from molecular mechanism to targeted therapy[J]. *Cell Cycle*, 2023, 22(8):906-918.
- [25] LIN J, DUAN J, WANG Q, et al. Mitochondrial dynamics and mitophagy in cardiometabolic disease [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 917135. doi: 10.3389/fcvm.2022.917135.
- [26] GASSEN NC, NIEMEYER D, MUTH D, et al. SKP2 attenuates autophagy through Beclin1-ubiquitination and its inhibition reduces MERS-Coronavirus infection [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):5770.

Effect of *Shenqi Jianxin Formula* (参芪健心方) on Mitochondrial Autophagy and the PINK1/Parkin Signaling Pathway in Cardiac Tissues in Chronic Heart Failure

XIE Peichi¹, LIU Pan², DING Zitong¹, BAI Jingyi¹, PANG Deqi¹, DAI Xiaohua³

1. First Clinical Medical College, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, 230000; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Anhui University of Chinese Medicine; 3. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanism of *Shenqi Jianxin Formula* (参芪健心方) in the treatment of chronic heart failure (CHF) from the perspective of regulating mitochondrial autophagy via the PTEN-induced kinase 1 (PINK1)/E3 ubiquitin ligase (Parkin) pathway. **Methods** Male SD rats were subjected to abdominal aortic constriction to establish the CHF model. Twenty-four successfully modeled rats were randomly divided into the model group, sacubitril/valsartan group, and low- and high-dose *Shenqi Jianxin Formula* groups, with 6 rats in each group. Six other rats were set as the sham surgery group, which were only separated the abdominal aorta and then closed the abdomen. Rats in the low-dose and high-dose *Shenqi Jianxin Formula* groups were given intragastric administration of *Shenqi Jianxin Formula* suspension at doses of 4.41 g/(kg·d) and 17.64 g/(kg·d), respectively; the sacubitril/valsartan group received intragastric administration of sacubitril/valsartan sodium tablet suspension at 10 mg/(kg·d); the sham surgery group and the model group were given normal saline at 10 ml/(kg·d) via intragastric gavage. The intervention lasted for 4 consecutive weeks. Cardiac function indices including left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular fractional shortening (LVFS) were detected, and serum brain natriuretic peptide (BNP) content was measured. HE staining and Masson staining were used to observe myocardial histopathological changes. Transmission electron microscopy was employed to examine the ultrastructure of cardiac tissues. Quantitative real-time polymerase chain reaction (Rt-qPCR) was performed to determine the mRNA expressions of PINK1/Parkin pathway-related factors and autophagy-associated proteins including Beclin-1, p62, and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) in myocardial tissues. **Results** Compared with the sham surgery group, the model group showed significant decreases in LVEF and LVFS levels, an increase in serum BNP content, down-regulated mRNA and protein expressions of *PINK1*, *Parkin* and *Beclin-1* in cardiac tissues, up-regulated mRNA and protein expressions of *p62*, as well as significant reductions in *LC3B* mRNA expression, phosphorylated PTEN-induced kinase 1 (p-PINK1) and phosphorylated E3 ubiquitin ligase (p-Parkin) protein levels, and the ratio of microtubule-associated protein 1 light chain 3- II to microtubule-associated protein 1 light chain 3- I (LC3 II/LC3 I) ($P < 0.05$). Pathological results revealed obvious myocardial cell edema, necrosis and degeneration, increased disorder of myocardial fiber arrangement, extensive inflammatory cell infiltration, moderate to severe mitochondrial swelling, a few mitochondrial vacuolar changes, and no obvious autophagy in the field of vision in the model group. Compared with the model group, all the above indicators were significantly improved in the high-dose *Shenqi Jianxin Formula* group and the sacubitril/valsartan group ($P < 0.05$). Moreover, the improvement of each index in the high-dose *Shenqi Jianxin Formula* group was superior to that in the low-dose group ($P < 0.05$). In the high-dose *Shenqi Jianxin Formula* group, myocardial myofibrils were arranged regularly with orderly orientation, the striated structure was clear, and necrotic cells significantly reduced. **Conclusion** *Shenqi Jianxin Formula* can activate the PINK1/Parkin signaling pathway in myocardial tissues, enhance mitochondrial autophagy, and clear dysfunctional mitochondria, thereby improving cardiac function and delaying the progression of CHF.

Keywords chronic heart failure; mitochondria; autophagy; PTEN-induced kinase 1; E3 ubiquitin ligase; *Shenqi Jianxin Formula* (参芪健心方)

(收稿日期: 2025-08-27; 修回日期: 2025-12-15)

[编辑: 邓媛]