

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2021.18.012

暖心康对心肌缺血再灌注模型小鼠
心肌细胞凋亡的影响

董鑫, 温蕊嘉, 陈梓欣, 江佳林, 林祉均, 关卓骥, 李玄, 王陵军, 冼绍祥✉

广州中医药大学第一临床医学院, 广东省广州市白云区机场路12号, 510405

[摘要] 目的 探讨暖心康治疗心力衰竭的可能作用机制。方法 30只C57BL/6雄性小鼠随机分为假手术组、模型组、暖心康组, 每组10只。暖心康组和模型组采用可逆性结扎冠状动脉左前降支的方法建立心肌缺血再灌注模型。暖心康组给予暖心康1.65 g/kg灌胃, 模型组和假手术组给予生理盐水0.1 ml/10 g灌胃。各组每日灌胃1次, 连续6周。采用超声评定小鼠心功能; qPCR法检测心脏组织心房钠尿肽(ANP)、B型钠尿肽(BNP) mRNA表达; HE染色观察心脏组织病理形态, TUNEL染色观察心肌细胞凋亡程度, 计算心肌细胞凋亡率; Western blot法检测小鼠心脏组织凋亡相关蛋白B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、活化半胱氨酸蛋白酶3(Caspase-3)表达。结果 与假手术组比较, 模型组小鼠心功能左室射血分数(EF)、心输出量(CO)、左室舒张末期前壁厚度(LVAWd)及左室收缩末期前壁厚度(LVAWs)明显降低, 心脏组织ANP mRNA、BNP mRNA及Bax、活化Caspase-3蛋白表达水平明显上升, Bcl-2、Bcl-2/Bax值下降, 心肌细胞凋亡率明显增加($P<0.01$); 与模型组比较, 暖心康组EF、CO、LVAWd及LVAWs明显升高, 心脏组织ANP mRNA、BNP mRNA表达水平及Bax、活化Caspase-3蛋白表达明显降低, Bcl-2、Bcl-2/Bax值显著升高, 心肌细胞凋亡率明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。HE染色结果显示, 与模型组比较, 暖心康组小鼠心肌细胞轻微肿胀, 细胞边界相对清晰, 心肌纤维排列相对整齐, 炎性细胞浸润减少。结论 暖心康可能通过下调心脏组织Bax、活化Caspase-3蛋白表达, 上调Bcl-2蛋白表达, 抑制ANP、BNP基因表达, 而减少心肌细胞凋亡, 从而改善心力衰竭。

[关键词] 心力衰竭; 心肌缺血再灌注; 暖心康; 细胞凋亡; Bcl-2相关X蛋白; B淋巴细胞瘤2; 活化半胱氨酸蛋白酶3

心肌梗死发生后快速恢复阻塞冠状动脉血流是减少梗死面积并改善临床结果的关键, 能够降低死亡率, 同时缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)损伤又是冠状动脉血流恢复过程中不可避免的并发症, 其病理机制复杂^[1]。心肌缺血和冠状动脉复流均可导致心肌细胞凋亡^[2]。心肌细胞凋亡是IR过程中的主要的病理特征, 对心血管疾病的进程有重要影响^[3]。心肌细胞凋亡增加会导致心脏结构重塑, 最终导致心力衰竭(heart failure, HF)^[4]。研

究^[5]发现, 益气活血法能对抗心肌细胞凋亡, 保护心功能。暖心康以益气活血利水法为基本原则组方, 治疗HF临床效果确切, 能减轻心脏重构, 改善心肌能量代谢^[6-7]。本研究旨在观察暖心康对心肌IR损伤后心肌细胞凋亡的影响, 探讨暖心康治疗HF的可能作用机制。本研究通过广州中医药大学动物伦理委员会批准(批准号: 20190226029)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级雄性C57BL/6小鼠30只, 8周龄, 体重(24±2)g, 实验动物生产许可证号: SCXK粤2018-0002, 使用许可证号: SYXK粤2018-0001, 购自广东省医学实验动物中心。

基金项目: 国家自然科学基金(81973777, 82004293); 广东省基础与应用基础研究基金(2019A1515110374); 广东省普通高校青年创新人才项目(2019KQNCX020); 广东省中医药局科研项目(20211145); 广东省省级科技计划(2018B020207009)

✉ 通讯作者: zhonggyf@126.com

1.2 药物及试剂

暖心康干膏粉(批号 TA2017014, 包含人参、毛冬青, 比例为 23:77, 由广州中医药大学科技园提供)。RNAzol(批号 R4533, 美国 Molecular Research Center 公司); 苏丹黑(批号 4197-25-5, 北京索莱宝生物科技有限公司); SDS-PAGE 电泳液(批号 081120201208)、BCA 试剂盒(批号 010719190225)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(批号 120120201209)、1.5 Tris-Hcl(批号 091217171129), 碧云天生物科技有限公司; 柱式法蛋白质提取试剂盒(批号 SD201912001, 美国 Invent 公司); ECL 显影液(批号 20210115, 凯基生物); 异氟烷(批号 19082602, 深圳市瑞沃德生命科技有限公司); 切片包埋剂(批号 4583, 美国 SAKURA 公司); Fastking RT 反转录试剂盒[批号 KR211, 天根生化科技(北京)有限公司]; 链霉素阻断试剂盒(批号 H-1200-10, 美国 VECTOR 公司); SYBR™ Select Master 试剂盒(批号 1176202K, 美国 Life Technology 公司); 中性树胶(批号 21061101, 国药集团化学试剂有限公司); TUNEL 染色试剂盒(批号 G3250, 美国 Promega 公司); 戊巴比妥钠(批号 P3761, 美国 Sigma 公司); 青霉素(批号 42201113, 山东鲁抗医药股份有限公司); HE 染液(批号 G1005, 武汉赛维尔生物科技有限公司); B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2) 抗体(批号 15071)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax) 抗体(批号 14796)、活化半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3) 抗体(批号 9661), 美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.3 主要设备与耗材

0.45 μm PVDF 膜(货号: IPVH00010)、MILLI-Q INTEGRAL 3 纯水机, 美国 Millipore 公司; 27G 1/2 针头(批号: 6095683, 美国 BD 公司); 荧光定量 PCR 检测系统(型号: CFX96 Touch)、全自动凝胶成像系统(型号: Gel Doc EZ)、高压电泳仪(型号: Power Pac TMBasic)、96 孔全裙边 PCR 版(型号: hsp9601), 美国 Bio-Rad 公司; 8/0 双针缝合线(宁波医用缝针有限公司); 小动物呼吸机(型号: Harverd inspira ASVv, 美国自然基因有限公司); 小动物心电图机(型号: SP2006, 北京软隆生物技术有限公司); 小动物超声影像系统(型号: Vevo 2100 型, 加拿大 Visual Sonics 公司); 组织匀浆机(型号: MagNA Lyser, 瑞士 ROCHE 公司); 低温高速离心机(型号: Allegra X-30R, 美国 Beckman 公司); 荧光显微镜(型号: BX50, 日本

OLYMPUS 公司); 切片机(型号: RM2125RTS, 德国 LEICA 公司)。

1.4 分组、造模及给药

30 只小鼠适应性喂养 1 周, 按随机数字表法分为假手术组、模型组、暖心康组, 每组 10 只。模型组和暖心康组参照文献[8]方法并进行改良: 小鼠称重后腹腔注射 0.5% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉, 固定于手术台。依次连接心电图机和呼吸机, 脱毛膏去除胸部毛发, 碘伏消毒。于左侧胸部依次剪开皮肤、分离胸部各层肌肉, 钝性分离第 3、4 肋间肌肉, 充分暴露心脏后撕开心包, 于左心耳下约 2 mm 使用 8/0 双针缝合线从冠状动脉左前降支(LAD) 下方穿出, 27G 1/2 针头垫在手术结下, 随后收紧手术结, 此时肉眼可见心脏缺血处发白, 同时心电图显示明显的 ST 段抬高, 表明心脏缺血造模成功。30min 后取出垫针恢复左前降支血流, 关闭胸腔(注意避免气胸), 然后依次缝合胸部肌肉、皮肤。假手术组同样行开胸操作, 但不进行缺血再灌注手术。连续 3 天每只注射青霉素 10 000 U 预防术后感染。造模后小鼠心输出量降低 30%, 射血分数少于 50%, 则认为造模成功^[9]。模型组和暖心康组各 6 只造模成功。造模后第一天小鼠能自主活动、摄食后开始灌胃。课题组前期实验^[7]证实, 暖心康给药剂量为 1.65 g/kg 疗效最好, 故暖心康组小鼠以此剂量灌胃。其余两组给予生理盐水 0.1 ml/10 g 灌胃。各组每日灌胃 1 次, 连续 6 周。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 超声检测心功能 于末次灌胃 2 h 后超声检测小鼠心功能。异氟烷气体吸入麻醉, 超声心动图采集小鼠心功能指标: 左室射血分数(EF)、心输出量(CO)、左室舒张末期前壁厚度(LVAWd)及左室收缩末期前壁厚度(LVAWs)。假手术组 3 只小鼠超声示右位心, 故予以剔除。

1.5.2 qPCR 法检测心脏组织心房钠尿肽(ANP)、B 型钠尿肽(BNP) mRNA 表达 末次灌胃 4 h 后, 0.5% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射深度麻醉后, 分离心脏。假手术组 1 只小鼠出现胸腔积液, 故予以剔除。每组 6 只小鼠分别取小鼠心尖区组织 30 mg 放入带研磨珠的 EP 管中, 按照 RNAzol 试剂盒说明书提取心脏总 RNA。按照 Fastking RT 反转录试剂盒说明书进行逆转录, 随后使用荧光定量 PCR 检测系统分别对 ANP mRNA、BNP mRNA 的转录水平进行测定, 结果以目的基因的相对表达量表示。反应条件: 95℃ 1 min; 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 72℃

30 s, 40 个循环; 95℃ 1 min; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s, 1 个循环。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列: ANP, 正向: 5'-GCTTCGGGGGTAGGATTGAC-3', 反向: 5'-CACAC-CACAAGGGCTTAGGA-3', 产物长度: 144 bp; BNP, 正向: 5'-CGGATCCGTCAGTCGTTTGG-3', 反向: 5'-AAAGAGACCCAGGCAGAGTCA-3', 产物长度: 100 bp; GAPDH: 正向: 5'-GGTTGTCTCCT-GCGACTTCA-3', 反向: 5'-TGGTCCAGGGTTTCT-TACTCC-3', 产物长度: 183 bp。

1.5.3 心脏组织病理形态 从提取总 RNA 剩余的小鼠心脏中, 每组按随机数字表法选取 2 个小鼠心脏, 以乳头肌为界限横切, 4% 多聚甲醛固定 24 h, 一部分心脏组织用于 HE 染色, 一部分用于 TUNEL 染色。心脏组织石蜡包埋后切成 4 μm 厚的薄片, 贴于载玻片烤片, 进行 HE 染色, 显微镜下观察心脏结构和形态变化。

1.5.4 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡 心脏组织用 30% 蔗糖脱水 24 h, 包埋剂冲洗心脏后包埋切片。随后按 TUNEL 试剂盒说明书操作。荧光显微镜下随机选择 5 个视野, 观察各组小鼠心肌细胞凋亡率(阳性细胞/1000 个检测的心肌细胞×100%)。

1.5.5 Western blot 法检测心脏组织中细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、活化 Caspase-3 表达 将选取切片及提取 RNA 后剩余小鼠心脏组织, 每组 4 只, 分别取 20 mg 心脏组织, 按柱式法蛋白质提取试剂盒说明提取心脏总蛋白; 按 BCA 试剂盒说明书操作测定蛋白浓度。用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白。半干转仪 1A/35 min 转蛋白至 PVDF 膜, 5% 的脱脂奶粉常温封闭 1 h, 轻轻洗净 PVDF 膜表面残留奶粉, 加入稀释后的一抗(1:1000), 4℃ 摇床过夜, TBST 洗膜 10 min, 重复 3 次, 加入二抗(1:5000) 常温摇床孵育 1 h, TBST 清洗二抗。加入 ECL 显影液, 于全自动凝胶成像系统曝光得到蛋白印迹条带, 用 Image J 1.8 软件分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析。数据均为计量资料且符合正态分布, 描述以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 方差齐时采用单因素方差分析, 组间比较采用 Bonferroni 事后分析; 方差不齐则采用 Dunnett T° 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠心功能指标比较

表 1 示, 与假手术组比较, 模型组小鼠 EF、CO、LVAWd 及 LVAWs 明显降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 暖心康组小鼠 EF、CO、LVAWd 及 LVAWs 明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠心功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	EF/%	CO/ml·min ⁻¹	LVAWd/mm	LVAWs/mm
假手术组	7	73.37±6.46	19.01±2.81	0.87±0.13	1.34±0.19
模型组	6	41.35±10.59 ^{a)}	11.27±1.44 ^{a)}	0.55±0.12 ^{a)}	0.79±0.25 ^{a)}
暖心康组	6	68.51±12.56 ^{c)}	17.10±1.57 ^{c)}	0.78±0.10 ^{b)}	1.27±0.31 ^{b)}

注: EF, 左室射血分数; CO, 心输出量; LVAWd, 左室舒张末期前壁厚度; LVAWs, 左室收缩末期前壁厚度。

a) 与假手术组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

2.2 各组小鼠心脏组织 ANP mRNA、BNP mRNA 表达比较

表 2 示, 与假手术组比较, 模型组小鼠心脏组织 ANP、BNP mRNA 表达水平明显上升($P < 0.01$); 与模型组比较, 暖心康组小鼠心脏组织 ANP、BNP mRNA 表达水平明显降低($P < 0.01$)。

表 2 各组小鼠心脏组织 ANP mRNA、BNP mRNA 相对表达量比较 (/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ANP mRNA	BNP mRNA
假手术组	6	1.01±0.15	1.01±0.12
模型组	6	17.47±3.46 ^{a)}	3.33±0.54 ^{a)}
暖心康组	6	1.41±0.30 ^{b)}	2.31±0.27 ^{b)}

注: ANP, 心房钠尿肽; BNP, B 型钠尿肽。

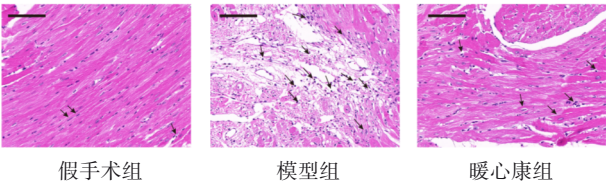
a) 与假手术组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

2.3 各组小鼠心脏组织形态 HE 染色结果

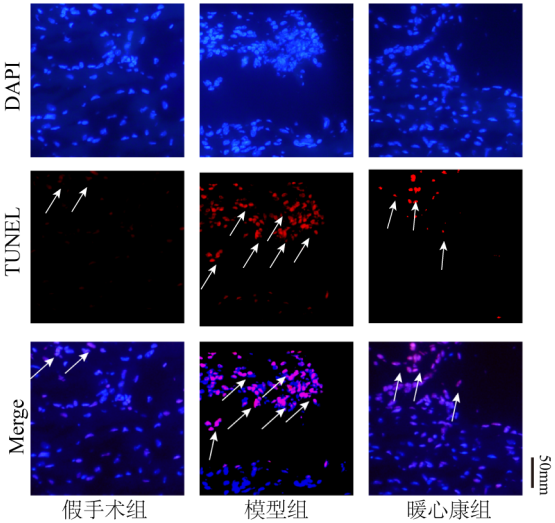
HE 染色显示(图 1, 扫描本文二维码获取彩色图), 假手术组小鼠心肌染色均匀, 心肌纤维排列整齐, 细胞边界清晰, 细胞形态基本一致。与假手术组比较, 模型组小鼠心肌纤维断裂、溶解、排列紊乱, 炎性细胞浸润。与模型组比较, 暖心康组小鼠心肌细胞轻微肿胀, 细胞边界相对清晰, 心肌纤维排列相对整齐, 炎性细胞浸润减少。

2.4 各组小鼠心肌细胞凋亡情况比较

TUNEL 阳性标记的细胞即为凋亡细胞。假手术组有少量的凋亡细胞, 模型组凋亡细胞增多, 暖心康组小鼠凋亡细胞则明显减少(见图 2, 扫描本文二维码获取彩色图)。表 3 示, 与假手术组比较, 模型组小鼠心肌细胞凋亡率明显增加($P < 0.01$)。与模型组比较, 暖心康组小鼠心肌细胞凋亡率明显减少($P < 0.01$)。



假手术组 模型组 暖心康组
注:黑色箭头所指为心肌细胞和炎性细胞聚集
图1 各组小鼠心脏组织形态结果(HE 染色, ×200)



注:白色箭头所指为TUNEL染色阳性细胞
图2 暖心康对缺血再灌注后心肌细胞凋亡的影响(TUNEL 染色, ×200)

表3 各组小鼠心肌细胞凋亡率比较 (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	随机视野	细胞凋亡率
假手术组	2	5	8.15±2.10
模型组	2	5	72.40±5.30 ^{a)}
暖心康组	2	5	23.67±3.77 ^{b)}

注: a) 与假手术组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$ 。
2.5 各组小鼠心脏组织中Bax、Bcl-2、活化Caspase-3蛋白表达比较

图3、表4示, 与假手术组比较, 模型组小鼠心脏组织Bax、活化Caspase-3表达上升, Bcl-2、Bcl-2/Bax值下降 ($P<0.01$)。与模型组比较, 暖心康组小鼠Bax、活化Caspase-3表达明显下调, Bcl-2、Bcl-2/Bax值显著升高 ($P<0.01$)。

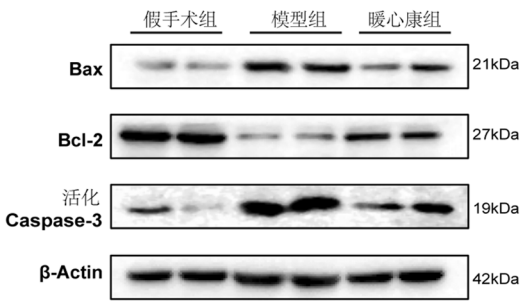
3 讨论

中医学认为, HF属于“水肿”“喘证”“痰饮”

表4 各组小鼠心脏组织中Bax、Bcl-2、活化Caspase-3蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	活化Caspase-3/ β -Actin	Bax/ β -Actin	Bcl-2/ β -Actin	Bcl-2/Bax
假手术组	4	0.35±0.08	0.44±0.05	1.22±0.11	2.82±0.14
模型组	4	0.91±0.06 ^{a)}	0.93±0.03 ^{a)}	0.25±0.02 ^{a)}	0.27±0.03 ^{a)}
暖心康组	4	0.55±0.06 ^{b)}	0.55±0.07 ^{b)}	0.64±0.09 ^{b)}	1.19±0.19 ^{b)}

注: Caspase-3, 半胱氨酸蛋白酶3; Bax, B淋巴细胞瘤2相关X蛋白; Bcl-2, B淋巴细胞瘤2。
a) 与假手术组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$ 。



注:Caspase-3, 半胱氨酸蛋白酶3; Bax, B淋巴细胞瘤2相关X蛋白; Bcl-2, B淋巴细胞瘤2。

图3 各组小鼠心肌细胞凋亡相关蛋白电泳图
等范畴, 是一种进展性的临床综合征, 虽然疾病的不同阶段的病理特点不尽相同, 但其基本病机在于气虚血瘀, 常兼有痰浊、水饮^[10]。HF的治疗应以益气活血利水为治疗原则。暖心康以红参、毛冬青组方, 药简力专。方中红参甘温, 能够补五脏之元气, 有安精神、定魂魄之功; 毛冬青苦寒, 有解毒活血、利水通络之效。两者一寒一热, 一阴一阳, 寒温并用, 阴阳互补, 共奏益气活血利水之功。

能量代谢障碍、氧化应激、内质网应激等一系列病理现象均可以导致心肌细胞凋亡, 造成IR损伤^[11]。大量心肌细胞凋亡发生后, 导致持续的无菌性炎症, 瘢痕组织替代正常心肌细胞, 从而使心脏发生病理性重构。心室重构是心力衰竭的关键病理基础, EF和CO用于评价心脏泵血功能, LVAWd和LVAWs用于评价心室结构^[12]。研究显示, 抑制心肌细胞凋亡能够减轻心脏损伤, 改善心室不良重构, 保护心功能^[13]。本实验中TUNEL染色结果显示, 与模型组比较, 暖心康组小鼠心脏组织染色率明显降低, 表明暖心康能减轻心肌细胞凋亡; 同时相对于模型组, 暖心康组LVAWd、LVAWs值明显上升, 说明暖心康一定程度阻止了心脏室壁损害, 部分恢复了心脏的正常结构; 与此一致, 暖心康组小鼠EF、CO较模型组明显增加, 提示其保护了心脏的泵血功能。

BNP、ANP为心室和心房分泌的神经激素, 与HF的患者的心功能和远期预后密切相关^[14]。ANP与血容量、血压、心率等密切相关, 常见于HF、

慢性阻塞性肺疾病等,其浓度对远期预后具有重要影响;心肌细胞损伤时,相应的BNP受体减少,导致BNP合成和释放代偿性增多,所以心室的病理变化一般由BNP反映,临床中BNP也是诊断左室收缩舒张功能不全的重要依据^[15]。本研究结果显示,相对假手术组,模型组小鼠心脏组织中ANP mRNA、BNP mRNA表达水平明显升高,说明模型组小鼠心功能恶化,心肌损害严重,远期预后不良;与模型组相比,暖心康组小鼠ANP mRNA、BNP mRNA表达水平得到不同程度的抑制,表明暖心康组小鼠心功能障碍减轻,心肌细胞损伤改善。

心肌细胞凋亡是心脏IR损伤后的最终病理结果^[16]。Bcl-2家族是细胞凋亡的主要参与者,贯穿细胞凋亡的全过程^[17]。Bax、Bcl-2是该家族中调节细胞凋亡的重要成员^[18]。Bcl-2家族蛋白Bax是细胞凋亡模式的主要控制因素,半胱氨酸蛋白酶(Caspases)的激活是凋亡过程的中心环节^[19]。Bcl-2是Bax的同源体,广泛存在线粒体内膜、核膜和内质网膜,能够抑制细胞凋亡^[20]。Caspases又以Caspase-3的活性最为重要,Caspase-3作为细胞凋亡程序的执行者,主要以活化的形式存在^[21],可使细胞内的蛋白和底物降解而引起细胞凋亡^[16, 22]。Bcl-2可阻断Caspase-3上游信号通路,从而抑制Caspase-3激活而保护细胞凋亡^[23]。所以,Bcl-2、Bax和活化Caspase-3在心肌细胞含量变化决定心肌细胞的凋亡。研究表明,上调Bcl-2/Bax值,以及抑制Caspase-3的过度活化能够减轻心肌细胞凋亡,从而改善心脏损伤后的愈合,保护心功能^[24-25]。本研究结果显示,与假手术组相比,模型组小鼠心脏中Bax、活化Caspase-3表达上升,Bcl-2表达下降,Bcl-2/Bax值减少。与模型组相比,暖心康能减少IR损伤后促进心肌细胞凋亡的因子Bax、活化Caspase-3表达水平,上调保护作用Bcl-2的水平,在暖心康给药后Bcl-2/Bax值较模型组也有一定程度的提高,提示暖心康可能通过调节这3种蛋白的表达进而抑制心肌细胞凋亡而发挥心脏保护作用。

综上所述,暖心康能够减轻心肌IR损伤后心肌细胞的凋亡而保护心功能,其可能通过调节心脏组织中Bcl-2、Bax、活化Caspase-3蛋白表达而实现。但本次实验样本量偏少,且仅从心肌细胞凋亡的角度探讨了暖心康的作用机制,暖心康治疗心力衰竭的相应机制仍需要进一步深入研究。

参考文献

[1] FAN Q, TAO R, ZHANG H, et al. Dectin-1 Contributes to Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Regulating

Macrophage Polarization and Neutrophil Infiltration [J]. Circulation, 2019, 139(5): 663-678.

[2] WU MY, YIANG GT, LIAO WT, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(4): 1650-1667.

[3] YU DM, XIONG JX, GAO YZ, et al. Resveratrol activates PI3K/AKT to reduce myocardial cell apoptosis and mitochondrial oxidative damage caused by myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Acta Histochemica, 2021, 123(5): 354-368.

[4] 赵英利, 邓兵. 心肌梗死后心室重构的机制及中医药防治进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(2): 211-215.

[5] 毕晗, 于远望. 益气活血法通过自噬-线粒体-细胞凋亡途径对心力衰竭的调控作用 [J]. 中医学报, 2019, 34(11): 2308-2314.

[6] 陈梓欣. 益气活血利水法对慢性心力衰竭能量代谢重构的作用及机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.

[7] CHEN Z, LUO T, ZHANG L, et al. A simplified herbal formula for the treatment of heart failure: Efficacy, bioactive ingredients, and mechanisms [J]. Pharmacol Res, 2019, 147: 104251.

[8] 范谦, 王跃民, 马新亮, 等. 小鼠心肌缺血/再灌注模型制备方法的改良 [J]. 心脏杂志, 2004, 16(6): 584.

[9] UCHINAKA A, KAWAGUCHI N, HAMADA Y, et al. Transplantation of myoblast sheets that secrete the novel peptide SVVYGLR improves cardiac function in failing hearts [J]. Cardiovasc Res, 2013, 99(1): 102-110.

[10] 曲扬, 戎靖枫, 杭宇, 等. 心衰病的中医辨证论治 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15(19): 2497-2498, 512.

[11] 刘丹勇, 夏正远, 韩荣辉, 等. 心肌缺血再灌注损伤机制研究的回顾与展望 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(12): 1013-1019.

[12] 陈红梅, 李绍生. 法舒地尔对心衰患者心功能及BNP、hs-CRP、ET-1、ANP的影响 [J]. 河北医学, 2020, 26(4): 576-580.

[13] 宋爱新, 王璐, 张媛媛. 黄芩甲苷通过TGF- β 1/Smad3信号通路对慢性心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响及机制研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(10): 1645-1651.

[14] LI X, LAN Y, WANG Y, et al. Telmisartan suppresses cardiac hypertrophy by inhibiting cardiomyocyte apoptosis via the NFAT/ANP/BNP signaling pathway [J]. Mol Med Report, 2017, 15(5): 2574-2582.

[15] 高家荣, 庄星星, 魏良兵, 等. 丹蛭降糖胶囊对2型糖尿病大鼠ANP、BNP和CNP的影响 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(5): 1079-1082.

- [16]李锦绣, 焦宪法, 王红宇, 等. 夏枯草提取物对缺氧/复氧诱导心肌细胞氧化应激损伤保护作用及抗凋亡的机制[J]. 临床与病理杂志, 2021, 41(4): 735-741.
- [17]黄建成, 郭世超, 刘璞娟, 等. 西红花苷对大鼠缺血缺氧心肌损伤的保护作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2021, 47(1): 102-109.
- [18]MOLDOVEANU T, CZABOTAR P. BAX, BAK, and BOK: a coming of age for the BCL-2 family effector proteins [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2020, 12(4): 124-134.
- [19]HUANG K, O'NEILL K, LI J, et al. BH3-only proteins target BCL-xL/MCL-1, not BAX/BAK, to initiate apoptosis [J]. Cell Res, 2019, 29(22): 942-952.
- [20]POLČIĆ P, MENDEL M, GAVURNÍKOVÁ G, et al. To keep the host alive: the role of viral Bcl-2 proteins [J]. Acta Virol, 2017, 61(3): 240-251.
- [21]梁桂洪, 黄和涛, 潘建科, 等. 龙螯胶囊含药血清对 YAP 抑制剂诱导人软骨细胞凋亡的保护作用及机制研究[J]. 中国药房, 2021, 32(12): 1442-1448.
- [22]BEROSKE L, WYNGAERT TVAN DEN, STROOBANTS S, et al. Molecular imaging of apoptosis: the case of Caspase-3 radiotracers [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(8): 12-22.
- [23]李兵. 丹参多酚酸盐对大鼠心肌缺血再灌注后心肌细胞凋亡的抑制作用及机制研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(2): 192-195.
- [24]刘珂珂, 王帅, 吴爱明, 等. 芪丹利心丸减轻心肌梗死大鼠心肌凋亡的机制研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(3): 423-427.
- [25]李浩然, 迟晓琦, 吴雪, 等. 7,8-DHF 对大鼠心肌缺血-再灌注损伤影响及机制[J]. 青岛大学学报(医学版), 2021, 57(2): 210-213.

Effect of *Nuanxinkang* (暖心康) on Cardiomyocyte Apoptosis in Myocardial Ischemia Reperfusion Model Mice

DONG Xin, WEN Ruijia, CHEN Zixin, JIANG Jialin, LIN Zhijun, GUAN Zhuoji, LI Xuan, WANG Lingjun, XIAN Shaoxiang

The First Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Nuanxinkang* (暖心康) in treating heart failure (HF). **Methods** Thirty C57BL/6 male mice were randomly divided into three groups, sham operation group, model group and *Nuanxinkang* group, with 10 mice in each group. The reversible ligation of left anterior descending coronary artery was used in *Nuanxinkang* group and model group to establish myocardial ischemia reperfusion (IR) model. *Nuanxinkang* 1.65 g/kg was given to the *Nuanxinkang* group by gavage, while the model group and sham operation group were given 0.1 ml/10 g normal saline by gavage; the interventions were administered once daily for six weeks. Ultrasound was used to evaluate the cardiac function of mice; qPCR method was used to detect the expression of atrial natriuretic peptide (ANP) mRNA and B-type natriuretic peptide (BNP) mRNA in myocardial tissue; HE and TUNEL staining were used to evaluate the structural changes of cardiac tissue and the degree of cardiomyocyte apoptosis, respectively. The cardiomyocyte apoptosis rate was calculated; Western blotting was used to detect the expression of apoptosis-related proteins B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2 related X protein (Bax) and activated cysteine protease 3 (Caspase-3) in the myocardium of the three groups. **Results** Compared to sham operation group, the model group had significantly decreased left ventricular ejection fraction (EF), cardiac output (CO), left ventricular anterior wall thickness in end-diastole (LVAWd) and left ventricular anterior wall thickness in end-systole (LVAWs), increased expression of ANP, BNP mRNA, Bax and activated Caspase-3 in the cardiac tissue, reduced Bcl-2 and Bcl2/Bax, and uprising cardiomyocyte apoptosis rate ($P < 0.01$). Compared to the model group, the *Nuanxinkang* group had significantly higher EF, CO, LVAWd and LVAWs, lower expression of ANP mRNA, BNP mRNA, Bax and activated Caspase-3 in the cardiac tissue, increased Bcl-2 and Bcl2/Bax, and decreased cardiomyocyte apoptosis rate ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The HE staining showed that the cardiomyocytes of the *Nuanxinkang* group were slightly swollen compared to those of the model group; the cell boundaries were relatively clear; the myocardial fibers were arranged relatively neatly, and the inflammatory cell infiltration was reduced. **Conclusion** *Nuanxinkang* may improve heart failure through reducing expression of Bax and activated Bcl-2, up-regulating Bcl-2 protein expression, inhibiting ANP and BNP gene expression, and decreasing cardiomyocyte apoptosis.

Keywords heart failure; myocardial ischemia reperfusion; *Nuanxinkang* (暖心康); apoptosis; Bcl-2 related X protein; B lymphocyte tumor 2; activated cysteine protease

(收稿日期: 2021-02-13; 修回日期: 2021-07-01)

[编辑: 王利芬]