

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.03.014

附子-黄芪-葶苈子角药对心力衰竭模型大鼠心肌细胞线粒体膜电位及钙调节蛋白 NCX1、SERCA2 的影响

李焱¹, 姜泽丰², 乔冬卉², 刘雯雯², 薛一涛¹✉

1. 山东中医药大学附属医院, 山东省济南市经十路 16369 号, 250014; 2. 山东中医药大学

摘要 目的 探讨附子-黄芪-葶苈子角药治疗心力衰竭的可能作用机制。方法 将 75 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、角药组、黄芪甲苷组与曲美他嗪组, 每组 15 只。除空白组外, 其余各组大鼠以腹腔注射盐酸阿霉素 6 周的方式建立心力衰竭大鼠模型, 实验第 2 周起角药组给予附子、黄芪、葶苈子免煎颗粒 15 g/(kg·d) 灌胃, 曲美他嗪组给予盐酸曲美他嗪片 10 mg/(kg·d) 灌胃, 黄芪甲苷组给予黄芪甲苷水溶液 1 g/(kg·d) 灌胃, 空白组和模型组大鼠给予 2 ml 双蒸水灌胃。各组均每日灌胃 1 次, 共 6 周。末次给药 12 h 后, 检测大鼠心功能指标及血清脑钠肽 (BNP) 水平, 测定大鼠心肌组织线粒体膜电位的变化及心肌细胞钙调节蛋白钙钠交换体 (NCX1) 和心肌细胞肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶 (SERCA2) mRNA 和蛋白表达。结果 与空白组比较, 模型组大鼠血清 BNP 水平升高, 心功能及心肌细胞线粒体膜电位未降低细胞的百分比明显降低, 心肌细胞 NCX1 蛋白及 mRNA 表达升高, SERCA2 蛋白及 mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 黄芪甲苷组、曲美他嗪组和角药组上述各指标均有不同程度改善 ($P < 0.01$), 且角药组在改善心肌细胞线粒体膜电位未降低细胞的百分比及 NCX1、SERCA2 mRNA 表达方面优于黄芪甲苷组、曲美他嗪组 ($P < 0.01$)。结论 附子-黄芪-葶苈子角药可稳定心力衰竭大鼠心肌细胞线粒体膜电位, 改善心肌细胞的线粒体功能, 调节 NCX1 和 SERCA2 表达平衡, 从而改善心功能。

关键词 心力衰竭; 附子; 黄芪; 葶苈子; 线粒体膜电位; 钙调节蛋白; 钙钠交换体; 肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶

心力衰竭是由于各种原因所引起的心肌受损, 导致心脏的收缩与舒张功能发生障碍, 心排出量不足以维持机体代谢需要的一种病理状态, 是各种心血管事件的严重阶段和最终结果。研究^[1-2]显示, 细胞组织凋亡、能量代谢改变等都是心力衰竭的病理过程, 而在能量代谢改变过程中往往伴随着线粒体形态及功能的受损。线粒体膜电位耗损可严重影响线粒体功能, 造成细胞凋亡, 诱发心力衰竭^[3]。既往研究显示, 复心汤能提高心力衰竭患者运动耐力、改善生活质量^[4], 且能通过不同的途径发挥抗心力衰竭作用^[5-7]。作为复心汤方中主要组成药物, 附子、黄芪、葶苈子三味药物充分体现了复心汤益气温阳、活血利水的组方原则。研究^[8]证实, 附子、黄芪、葶苈子三药合用可改善心肌梗死后小鼠的左室重构, 显著提高小鼠的心功能。本研究选取复心汤方中角药附子-黄芪-葶苈子为研究对

象, 以线粒体膜电位及钙调节蛋白为切入点, 进一步探讨复心方治疗心力衰竭的可能作用靶点。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 75 只, 8 周龄, 体质量 (200 ± 20) g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (京) 20160006。饲养在屏障环境饲养间, 温度 (25 ± 1) °C, 湿度 (55 ± 5) %, 人工光照明暗各 12 h, 自由取食标准饲料及自来水。

1.2 药物

角药组成: 附子 30 g, 黄芪 30 g, 葶苈子 30 g。附子颗粒, 江阴天江药业有限公司生产, 货号: 18090711, 规格 3 g/袋, 含附子 3 g; 黄芪颗粒, 北京康仁堂药业有限公司生产, 货号: 18029191, 规格 5 g/袋, 含黄芪 10 g; 葶苈子颗粒, 江阴天江药业有限公司生产, 货号: 18051321, 规格 3 g/袋, 含葶苈子 10 g。黄芪甲苷粉剂, 批号:

基金项目: 国家自然科学基金 (81774247, 81804045)

✉ 通讯作者: yi-tao-xue@163.com

DASF180911H, 南京道斯夫生物公司; 盐酸曲美他嗪片, 货号: 246300028, 施维雅制药有限公司, 规格 20 mg/片; 盐酸阿霉素, 货号: MB1087, 大连美伦生物技术有限公司。

1.3 主要试剂及仪器

戊巴比妥钠 (批号: 020919), 北京化学试剂公司; 大鼠脑钠肽 (BNP) 试剂盒 (货号: CSB-E07972r), 武汉华美生物工程有限公司; 单细胞悬液分离试剂盒 (货号: CS-031), 英文特生物技术 (北京) 有限公司; 线粒体 JC-1 染色工作液 (货号: C2006), 碧云天生物技术有限公司; PBS 溶液 (货号: MA0015), 大连美伦生物技术有限公司; BCA 蛋白定量检测试剂盒 (货号: G2026)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (货号: G2003)、磷酸化蛋白酶抑制剂 (货号: G2007)、GAPDH (货号: GB12002)、TBS 缓冲液 (货号: G0001)、ECL (货号: G2014), Servicebio 公司; BSA (货号: A7030), Sigma 公司。

Stepone plus 型荧光定量 PCR 仪, ABI 公司; KZ-II 型匀浆仪, 赛维尔生物科技有限公司; D3024R 型台式高速冷冻型微量离心机, DragonLab 公司; NanoDrop2000 型超微量分光光度计, Thermo 公司; Rt2100c 型酶标检测仪, Rayto 公司; neofuge 13R 型冷冻离心机, 力康生物医疗科技控股有限公司; V300 型扫描仪, EPSON 公司; DYCZ-24DN 型双垂直电泳仪、DYCZ-40D 型转印电泳仪, 北京六一仪器厂; xMATRIX iU22 型彩色超声心动仪, Philips 公司; A50 micro plus 型流式细胞仪, 英国 PPOGEE 公司。

1.4 分组及干预方法

75 只 SD 大鼠按照随机数字法分成空白组、模型组、角药组、黄芪甲苷组与曲美他嗪组, 每组 15 只。除空白组外, 其余各组大鼠参考文献 [9] 以少量多次腹腔注射盐酸阿霉素的方法建立心力衰竭大鼠模型: 于实验第 1 天向大鼠腹腔内注射盐酸阿霉素 3 mg/kg, 每周 2 次, 共注射 6 周; 空白组注射等体积的生理盐水。4 周后各组随机选取 5 只大鼠进行超声心动图评估, 并取腹主动脉血液检测血清 BNP 水平, 左心室收缩功能较空白组减低、血清 BNP 水平较空白组升高且差异有统计学意义, 证明造模成功 [10-11]。实验第 2 周起角药组给予附子、黄芪、葶苈子免煎颗粒各 5 g, 共 15 g/(kg · d) 灌胃, 相当于临床成人剂量的 10 倍; 曲美他嗪组给予盐酸曲美他嗪片 10 mg/(kg · d) 灌胃; 黄芪甲

苷组给予黄芪甲苷水溶液 1 g/(kg · d) 灌胃; 空白组和模型组大鼠给予 2 ml 双蒸水灌胃。各组均每日灌胃 1 次, 共 6 周。

1.5 观察指标及方法

末次给药禁食 12 h 后, 用 3% 戊巴比妥钠溶液 30 mg/kg 麻醉大鼠, 检测心功能, 之后取血、分离心脏。

1.5.1 大鼠一般状态 实验期间观察大鼠进食饮水、活动、精神、呼吸、毛色光泽、大小便情况, 并检测体重。

1.5.2 心功能检测 采用超声心动仪检测大鼠心功能, 包括左室舒张末期内径 (LVEDD)、左室收缩末期内径 (LVEDS)、左室短轴缩短率 (LVFS) 和左心室射血分数 (LVEF)。

1.5.3 血清 BNP 水平 腹主动脉取血检测血清 BNP 水平, 按照试剂盒说明书步骤进行。

1.5.4 JC-1 染色法测定心肌细胞线粒体膜电位 待大鼠麻醉成功后剪开胸腔, 迅速分离出心脏并剪取左心室心肌, 置于 -80 ℃ 冰箱中妥善保存备用。参照单细胞悬液分离试剂盒说明书, 采用一步法提取心肌组织单细胞悬液。向单细胞悬液中加入 0.5 ml 的 JC-1 染色工作液, 经充分混匀后孵育 20 min。配制成 JC-1 染色缓冲液并冰浴。孵育完成后, 离心吸取上清液, 保留沉淀。JC-1 染色缓冲液洗涤细胞两次, 将两次洗涤后的沉淀细胞使用 JC-1 染色缓冲液重悬, 使用流式细胞仪对心肌细胞线粒体膜电位进行分析, 并统计线粒体膜电位未降低细胞的百分比。

1.5.5 RT-PCR 法检测心肌组织钙调节蛋白钙钠交换体 (NCX1) 和肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶 (SERCA2) mRNA 相对表达量 采用 RT-PCR 法进行检测, 将心肌组织制成匀浆, 使用超微量分光光度计检测 RNA 浓度及纯度。引物由武汉赛维尔生物科技有限公司合成, NCX1: 上游 AAGCATACTGACCCT-GTCCCTG, 下游 CCACCACCACTCCCATAGCTT, 产物大小 109 bp; SERCA2: 上游 TGTCGCTCTTG-GAACCTCAG, 下游 TGGTAGATGCCAGCAATGGA, 产物大小 159 bp; GAPDH: 上游 CTGGAGAAAC-CTGCCAAGTATG, 下游 GGTGGAAGAATGGGAGT-TGCT, 产物大小 138 bp。反应结束后, 分析各检测样本的域值循环数 (CT) 值, 通过 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算 NCX1、SERCA2 mRNA 相对表达量。

1.5.6 Western-blot 法检测心肌组织钙调节蛋白 NCX1、SERCA2 表达 心肌组织用冷 PBS 洗涤 3 次, 剪成小块进行组织匀浆, 4 ℃、离心半径

8.5 cm、12 000 r/min 离心 10 min 后收集上清, 进行 SDS-PAGE 电泳, 然后进行转膜。将转好的膜于室温下脱色摇床上封闭 1 h, 稀释一抗 4℃ 孵育抗体 3 h, 后用 TBST 将二抗稀释 3000 倍, 将 PVDF 膜放在曝光匣, 加入 ECL 溶液充分反应, 曝光后的胶片进行显影和定影, 采用 Alpha EaseFC v3.0 软件 (Innotech 公司) 处理系统分析目标带的光密度值。

1.6 统计学方法

使用 SPSS 22.0 软件进行数据统计与分析, 计量数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 多组资料用单因素方差分析法进行比较, 两两比较采用 SNK 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

实验过程中模型组大鼠死亡 5 只, 黄芪甲苷组死亡 1 只, 角药组与曲美他嗪组各死亡 2 只。实验结束时, 空白组剩余大鼠 10 只, 模型组 5 只, 黄芪甲苷组 9 只, 曲美他嗪组 8 只, 角药组 8 只。为平衡各组大鼠数量, 避免误差增大, 空白组与各药物干预组均采用随机数字表法选取 5 只大鼠进行指标检测。

2.1 各组大鼠一般情况观察结果

空白组大鼠状态最佳, 取食进水正常, 活动自如, 精神佳, 呼吸平稳, 毛色光泽, 体重稳步增长, 大小便无异常表现。模型组大鼠随实验的进展逐步出现了呼吸喘促、痰鸣、腹部胀大等症状, 并逐渐加重, 且伴有不欲饮食, 精神低落, 蜷卧不动, 毛色粗糙无光, 口鼻及前后二阴处见少量渗血, 体重增长较慢, 小便少, 大便稀溏。黄芪甲苷组、角药组及曲美他嗪组大鼠均有上述表现, 但程度较模型组轻, 出现时间较晚。

2.2 各组大鼠心功能指标比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组大鼠 LVEDD、LVES 升高, LVFS、LVEF 降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 黄芪甲苷组和角药组大鼠 LVEDD 降

低, 黄芪甲苷组、曲美他嗪组和角药组大鼠 LVES 降低, 黄芪甲苷组、曲美他嗪组和角药组 LVFS、LVEF 升高 ($P < 0.01$); 曲美他嗪组大鼠 LVEDD 高于黄芪甲苷组和角药组 ($P < 0.01$); LVES、LVFS、LVEF 水平各药物干预组差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠血清 BNP 水平比较

表 2 示, 模型组大鼠血清 BNP 水平明显高于空白组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各药物干预组大鼠血清 BNP 水平均明显降低 ($P < 0.01$)。黄芪甲苷组、角药组及曲美他嗪组组间比较, 血清 BNP 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠血清 BNP 水平比较 ($\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	BNP
空白组	5	132.2 ± 43.76
模型组	5	500.6 ± 113.54 ^{a)}
黄芪甲苷组	5	339.0 ± 53.01 ^{a) b)}
曲美他嗪组	5	338.6 ± 50.22 ^{a) b)}
角药组	5	325.4 ± 47.83 ^{a) b)}

注: BNP, 脑钠肽。

a) 与空白组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

2.4 各组大鼠心肌细胞线粒体膜电位情况比较

JC-1 染色后会根据线粒体膜电位的高低发出不同荧光, 在线粒体膜电位较高的情况下, JC-1 会形成聚合物并在线粒体基质中发出红色荧光; 当线粒体膜电位偏低时, JC-1 就会形成单体, 发出绿色荧光。对流式细胞仪检验结果使用二维散点图表示, A、B 象限内是正常细胞, C、D 象限内是凋亡细胞, B 象限与 D 象限内的细胞数可间接反映线粒体膜电位的情况。各组大鼠心肌细胞线粒体 JC-1 染色流式细胞仪检测结果见图 1, 模型组 B 象限内心肌正常细胞数明显低于空白组, 而各药物干预组 B 象限内心肌正常细胞数明显高于模型组, D 象限内凋亡细胞数较模型组明显减少。

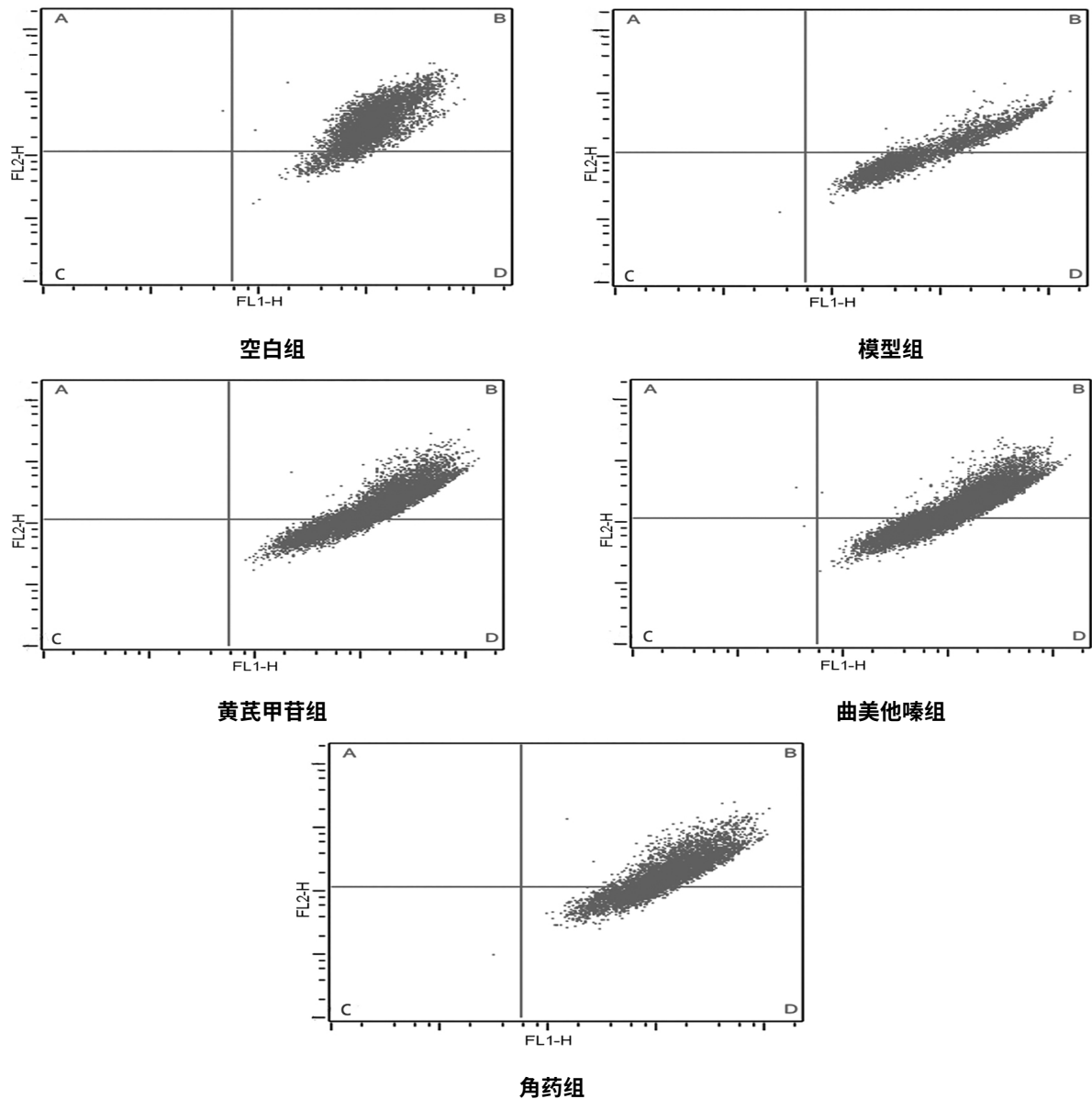
表 1 各组大鼠心功能指标比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	LVEDD/mm	LVES/mm	LVFS/%	LVEF/%
空白组	5	6.12 ± 0.77	4.39 ± 0.23	38.1 ± 2.3	70.8 ± 4.1
模型组	5	7.82 ± 0.28 ^{a)}	6.41 ± 0.37 ^{a)}	17.6 ± 4.9 ^{a)}	42.3 ± 5.9 ^{a)}
黄芪甲苷组	5	6.88 ± 0.43 ^{b) c)}	5.27 ± 0.41 ^{a) b)}	25.2 ± 2.4 ^{a) b)}	50.7 ± 4.7 ^{a) b)}
曲美他嗪组	5	7.59 ± 0.56 ^{a)}	5.44 ± 0.55 ^{a) b)}	24.9 ± 1.8 ^{a) b)}	52.2 ± 3.4 ^{a) b)}
角药组	5	6.57 ± 0.13 ^{b) c)}	5.23 ± 0.18 ^{a) b)}	26.6 ± 3.7 ^{a) b)}	53.4 ± 2.6 ^{a) b)}

注: LVEDD, 左室舒张末期内径; LVES, 左室收缩末期内径; LVFS, 左室短轴缩短率; LVEF, 左室射血分数。

a) 与空白组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.01$; c) 与曲美他嗪组比较, $P < 0.01$ 。



注: FL1-H, 代表染料 A-V 所染到的细胞; FL2-H, 代表 PI 染料所染到的细胞; A 象限和 B 象限为正常细胞; C 象限和 D 象限为凋亡细胞。

图 1 各组大鼠心肌细胞线粒体 JC-1 染色流式细胞仪检测结果

表 3 示, 模型组心肌细胞线粒体膜电位未降低细胞的百分比明显低于空白组 ($P < 0.01$); 而各药物干预组心肌细胞线粒体膜电位未降低细胞的百

表 3 各组大鼠心肌细胞线粒体膜电位未降低细胞的百分比比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	线粒体膜电位未降低细胞的百分比
空白组	5	$84.78 \pm 3.24^a)$
模型组	5	44.69 ± 4.74
黄芪甲苷组	5	$60.80 \pm 3.39^{a)b)}$
曲美他嗪组	5	$59.59 \pm 4.67^{a)b)}$
角药组	5	$69.13 \pm 4.51^a)$

注: a) 与模型组比较, $P < 0.01$; b) 与角药组比较, $P < 0.01$ 。

分比较模型组明显升高 ($P < 0.01$); 角药组心肌细胞线粒体膜电位未降低细胞的百分比高于曲美他嗪组与黄芪甲苷组 ($P < 0.01$), 而曲美他嗪组与黄芪甲苷组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 各组大鼠心肌组织 NCX1、SERCA2 mRNA 相对表达量比较

表 4 示, 与空白组比较, 模型组大鼠心肌组织 NCX1 mRNA 相对表达量上升, 而 SERCA2 mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 黄芪甲苷组、曲美他嗪组、角药组大鼠心肌组织 NCX1 mRNA 相对表达量降低, 而 SERCA2 mRNA 相对表达量升高 ($P < 0.01$); 角药组 NCX1 mRNA 相对表

达量低于黄芪甲苷组和曲美他嗪组, SERCA2 mRNA 相对表达量高于黄芪甲苷组 GN 曲美他嗪组 ($P < 0.01$); 黄芪甲苷组与曲美他嗪组 NCX1 mRNA、SERCA2 mRNA 相对表达量比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 4 各组大鼠心肌组织 NCX1、SERCA2 mRNA

相对表达量比较		$(2^{-\Delta\Delta CT}, \bar{x} \pm s)$	
组别	鼠数	NCX1	SERCA2
空白组	5	$0.21 \pm 0.11^a)$	$0.78 \pm 0.19^a)$
模型组	5	0.53 ± 0.08	0.23 ± 0.04
黄芪甲苷组	5	$0.38 \pm 0.07^{a) b)}$	$0.34 \pm 0.03^{a) b)}$
曲美他嗪组	5	$0.37 \pm 0.03^{a) b)}$	$0.37 \pm 0.03^{a) b)}$
角药组	5	$0.24 \pm 0.03^a)$	$0.50 \pm 0.06^a)$

注: NCX1, 钙钠交换体; SERCA2, 肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶。

a) 与模型组比较, $P < 0.01$; b) 与角药组比较, $P < 0.01$ 。

2.6 各组大鼠心肌组织 NCX1、SERCA2 蛋白表达比较

表 5 示, 与空白组比较, 模型组大鼠心肌组织 NCX1 蛋白表达升高, 而 SERCA2 蛋白表达降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 黄芪甲苷组、曲美他嗪组、角药组大鼠心肌组织 NCX1 蛋白表达均降低, 而 SERCA2 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 黄芪甲苷组、曲美他嗪组、角药组大鼠心肌组织 NCX1、SERCA2 蛋白表达比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组大鼠心肌组织 NCX1、SERCA2 蛋白电泳图见图 2。

表 5 各组大鼠心肌组织 NCX1、SERCA2

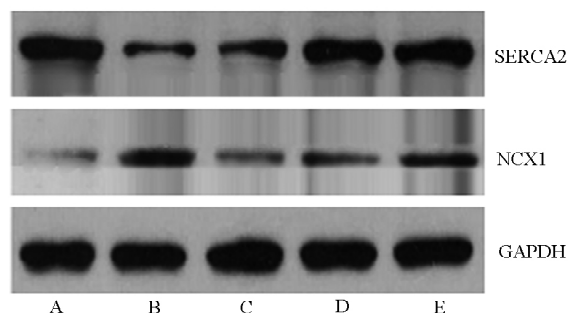
蛋白表达比较		$(\bar{x} \pm s)$	
组别	鼠数	NCX1	SERCA2
空白组	5	$0.20 \pm 0.05^a)$	$0.66 \pm 0.33^a)$
模型组	5	0.69 ± 0.15	0.31 ± 0.22
黄芪甲苷组	5	$0.31 \pm 0.18^a)$	$0.40 \pm 0.20^a)$
曲美他嗪组	5	$0.28 \pm 0.12^a)$	$0.33 \pm 0.20^a)$
角药组	5	$0.23 \pm 0.10^a)$	$0.59 \pm 0.28^a)$

注: NCX1, 钙钠交换体; SERCA2, 肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶。

a) 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

关于心力衰竭的中医病因病机各医家的见解有所差异, 但“本虚标实”却为统一认识。本虚首先在心, 随着心的气血阴阳亏损进而累及其他脏腑, 导致全身虚衰, 产生瘀血、痰饮和水饮等病理产物, 造成了气血的运行障碍, 进一步加重心力衰竭。国医大师雷忠义认为, 心的气血亏虚贯穿了心力衰竭整个疾病的发生发展过程, 以至于后期出现



注: A, 空白组; B, 模型组; C, 曲美他嗪组; D, 角药组; E, 黄芪甲苷组; NCX1, 钙钠交换体; SERCA2, 肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶。

图 2 各组大鼠心肌组织 NCX1、SERCA2 蛋白电泳图 阴阳俱损之虚象与水饮、血瘀、痰浊内停之标实, 并据此提出了温阳利水、行气活血和调整脏腑阴阳的治法^[12]。针对心力衰竭本虚标实的根本病机, 我们临床应用附子、黄芪、葶苈子角药配伍。附子乃辛热温阳之品, 尤温心阳, 可谓“益火之源以消阴翳”, 阳气充盛则瘀血得通、痰浊水饮得消, 标本兼治。现代药理研究^[13]指出, 附子中的皂苷与乌头碱类物质可保护心肌细胞线粒体, 维持线粒体膜电位稳定, 且强心作用显著。黄芪为甘温补益之品, 既可补气亦可行气兼利水, 气充气行则瘀血得通、气血得畅。现代药理学研究^[14]证明, 黄芪中的甲苷类有效成分可以通过调节心肌细胞中凋亡蛋白的表达而保护心肌细胞膜电位, 进而抑制心力衰竭。葶苈子具有泻肺消肿、平喘逐水之效, 利水逐痰而不伤及阴津, 为治疗心力衰竭痰浊水饮之标实的佳品。现代药理研究^[15]发现, 葶苈子同时具有一定的强心之效。附子、黄芪和葶苈子三味中药共同发挥温阳益气、行水逐瘀之效。

黄芪甲苷具有改善能量代谢、调节肌浆网 Ca^{2+} 泵、抑制心肌肥厚和纤维化、改善心肌缺血等作用, 对心力衰竭细胞有益^[16]。曲美他嗪可通过改善能量代谢、抗氧化损伤等调节心力衰竭大鼠心肌线粒体蛋白质组学变化, 改善大鼠心肌细胞线粒体形态, 抑制心肌细胞凋亡, 增加线粒体呼吸链复合物 I、III、IV 的活性, 保护心肌细胞线粒体功能, 从而改善心肌功能^[17-19]。故本研究选择两药为对照药物, 探讨附子-黄芪-葶苈子治疗心力衰竭的可能作用机制。本研究结果表明, 黄芪甲苷组、曲美他嗪组、角药组均能改善心力衰竭大鼠心功能, 且角药组改善效果更显著。

BNP 是由心肌细胞合成的具有生物学活性的天然激素, 血浆 BNP 水平越高, 表明患者的心力

衰竭程度越重, 心血管危险事件的发生率越高, 患者的死亡率和住院率就越高、预后越差^[24]。心肌细胞线粒体是为心脏提供所需能量的重要细胞器, 其能量的产生是以线粒体膜电位的正常功能为基础, 只有维持线粒体膜电位的正常功能, 才能保证线粒体进行氧化磷酸化反应, 产生三磷酸腺苷(ATP) 以供给心脏正常活动; 同时心肌细胞凋亡的重要途径之一就是线粒体介导的凋亡信号通路, 当心肌细胞受到内外产生的各种刺激时, 会破坏线粒体膜电位的稳定性, 使其通透性增加, 释放各种促凋亡因子进而激活心肌细胞凋亡^[25]。本研究结果表明, 模型组大鼠血清 BNP 水平升高, 心肌细胞线粒体膜电位下降最为明显, 而黄芪甲苷组、曲美他嗪组、角药组大鼠较模型组血清 BNP 水平降低、心肌细胞线粒体膜电位升高, 且以角药组升高最为明显, 说明黄芪甲苷、曲美他嗪、角药均对改善左心室功能有一定作用, 可通过维持线粒体膜电位的稳定来控制心力衰竭的发展, 且角药效果更好。

NCX1 作为存在于细胞膜上的一种双向转运体, 是心肌细胞膜上 Ca^{2+} 最主要的转运通道之一, 如心脏压力负荷过大时, NCX1 则会发生反作用, 将 Ca^{2+} 由心肌细胞外转运至胞内, 导致心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度异常升高, 促进心肌细胞凋亡, 最终发展为心力衰竭^[22]。SERCA2 在心肌细胞 Ca^{2+} 循环及心脏搏动中起关键作用, 在衰竭心脏中, 心肌细胞 SERCA2 出现功能异常, 对 Ca^{2+} 的重新摄取能力下降, 影响心肌细胞内 Ca^{2+} 的浓度和稳态, 且其蛋白表达水平明显降低^[23]。NCX1 和 SERCA2 之间的失衡是细胞内 Ca^{2+} 稳态紊乱和心力衰竭病理过程的重要原因^[24]。本研究结果表明, 模型组大鼠心肌组织 NCX1 蛋白表达和 mRNA 相对表达量升高, SERCA2 蛋白表达和 mRNA 相对表达量降低, 而黄芪甲苷、曲美他嗪、角药均可不同程度改善 NCX1 和 SERCA2 蛋白及 mRNA 表达, 且附子-黄芪-葶苈子角药改善 NCX1、SERCA2 mRNA 相对表达量方面优于黄芪甲苷和曲美他嗪。

综上所述, 附子-黄芪-葶苈子角药可稳定心肌细胞线粒体膜电位, 改善心肌细胞的线粒体功能, 调节 NCX1 和 SERCA2 表达平衡, 从而改善心力衰竭大鼠心功能, 可为黄芪、附子、葶苈子配伍应用于慢性心力衰竭患者的临床治疗提供依据。

参考文献

[1] TONDI L, FRAGASSO G, SPOLADORE R, et al. Real-life indications to ivabradine treatment for heart rate optimi-

- zation in patients with chronic systolic heart failure [J]. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2018, 19(7): 351-356.
- [2] GRANDE D, IACOVIELLO M, ASPROMONTE N. The effects of heartrate control in chronic heart failure with reduced ejection fraction [J]. Heart Fail Rev, 2018, 23(4): 527-535.
- [3] YANG YY, YU YB, WANG JH, et al. Silica nanoparticles induced intrinsic apoptosis in neuroblastoma SH-SY5Y cells via CytC /Apaf1 pathway [J]. Environ Toxicol Phar, 2017, 52: 161-169. doi: 10.1016/j.etap.2017.01.010.
- [4] 薛一涛, 刘秀娟, 李焱, 等. 复心合剂对慢性充血性心力衰竭患者淋巴细胞 $\beta 1$ -AR mRNA 表达的影响及临床观察 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(3): 533-536.
- [5] 薛一涛, 焦华琛, 刘江, 等. 复心汤对乳鼠心肌细胞 GATA4、PKA、ERK 表达的影响 [J]. 中国中医急症, 2016, 25(10): 19.
- [6] 薛一涛, 陈炜, 刘鹏, 等. 复心汤对心力衰竭大鼠 PI3K-Akt-GSK3 β 通路的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2015, 49(8): 74-78.
- [7] 薛一涛, 焦华琛, 林鑫, 等. 复心汤对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡信号转导分子 Bcl-2 表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(12): 2717-2720, 2876.
- [8] 宝璐尔, 张林, 周晓慧, 等. 强心方组分对心肌梗死后心力衰竭小鼠心功能的影响 [J]. 同济大学学报(医学版), 2017, 38(6): 6-11.
- [9] SIVESKI-ILISKOVIC N, KAUL N, SINGAL PK. Probucol promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats [J]. Circulation, 1994, 89(6): 2829-2835.
- [10] PALAZZUOLI A, GALLOTTA M, QUATRINI I, et al. Natriuretic peptides (BNP and NT-proBNP): measurement and relevance in heart failure [J]. Vasc Health Risk Manag, 2010, 6: 411-418. doi: 10.2147/vhrm.s5789.
- [11] 肖渊茗. 超声心动图评价心衰大鼠模型心功能改变及大鼠心功能与脑钠素的关系 [D]. 长沙: 中南大学, 2008.
- [12] 陈书存. 雷忠义国医大师治疗心衰病经验 [J]. 陕西中医药大学学报, 2020, 43(1): 23-25.
- [13] 王宁宁. 乌头碱激活 Sirt3 改善心肌细胞线粒体功能 [J]. 广州: 广东药科大学, 2019.
- [14] 杨晶晶. 黄芪甲苷对大鼠心肌细胞缺血再灌注损伤的作用及机制研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2019.
- [15] 孙凯. 南葶苈子的化学成分及其生物活性研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2005.
- [16] ZANG Y, WAN J, ZHANG Z, et al. An updated role of astragaloside IV in heart failure [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 126: 110012. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110012.

- [7] 李琪琳, 胡元会, 霍艳明, 等. 曲美他嗪干预气虚血瘀证心衰大鼠心肌线粒体蛋白质组学研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 20(11): 2001-2007.
- [8] 张奕. 曲美他嗪对心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌和骨骼肌能量代谢的影响 [J]. 福州: 福建医科大学, 2018.
- [9] 冯翔宇, 赵亮, 冯佩明, 等. 曲美他嗪干预对心力衰竭大鼠心肌细胞线粒体超微结构、心肌细胞凋亡及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 蛋白、细胞色素 C 蛋白表达的影响 [J]. 中国循环杂志, 2015, 30(3): 276-279.
- [10] 王运红, 张健. N 末端 B 型利钠肽原在心力衰竭中的临床应用 [J]. 中华心血管病杂志, 2015, 43(12): 1022-1024.
- [11] 石静, 卿晨. 线粒体膜电位改变与细胞凋亡 [J]. 中国民族民间医药, 2011, 20(7): 20-21.
- [12] LU Z, CUI Y, WEI X, et al. Deficiency of PKD2L1 (TRPP3) exacerbates pathological cardiac hypertrophy by augmenting NCX1-mediated mitochondrial calcium overload [J]. Cell Rep, 2018, 24(6): 1639-1652.
- [13] KHAYRULLINA G, MORITZ KE, SCHOOLEY JF, et al. SMN-deficiency disrupts SERCA2 expression and intracellular Ca^{2+} signaling in cardiomyocytes from SMA mice and patient-derived iPSCs [J]. Skelet Muscle, 2020, 10(1): 16.
- [14] LU Y, HUANG J, SHIODA N, et al. CaMKII δ B mediates aberrant NCX1 expression and the imbalance of NCX1/SERCA in transverse aortic constriction-induced failing heart [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e24724. doi: 10.1371/journal.pone.0024724.

The Effect of Fuzi (附子) Huangqi (黄芪) Tinglizi (葶苈子) Herb Combination on Myocardial Mitochondrial Membrane Potential and Calmodulin NCX1 and SERCA2 in Heart Failure Model Rats

LI Yan¹, JIANG Zefeng², QIAO Donghui², LIU Wenwen², XUE Yitao¹

1. The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, 250014; 2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of herb combination of Fuzi (*Radix Aconiti Lateralis Praeparata*, 附子); Huangqi (*Radix Astragali*, 黄芪); Tinglizi (*Semen Lepidii*, 葶苈子) in the treatment of heart failure. **Methods** Seventy-five SD rats were randomly divided into blank group, model group, herb combination group, astragaloside IV group and trimetazidine group, with 15 rats in each group. The model of heart failure was established through intraperitoneally injection with adriamycin hydrochloride for six weeks in all rats except for the blank group. Since the second week after modelling, herb combination aqueous solution 15 g/(kg·d) were administered by gavage in herb combination group; trimetazidine hydrochloride aqueous solution 10 mg/(kg·d) and astragaloside IV aqueous solution 1 g/(kg·d) were given by gavage to trimetazidine group and astragaloside IV group, respectively; for blank group and model group, 2mL double distilled water by gavage was administered; all intragastric gavage was performed once daily, for 6 weeks. The serum brain natriuretic peptide (BNP) level, cardiac function indicators, changes of mitochondrial membrane potential in myocardial tissues, and the expression of proteins and mRNA of cardiomyocytes calmodulin sodium-calcium exchanger (NCX1) and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2 (SERCA2) were assessed. **Results** Compared to the blank group, the serum BNP level of the model group significantly increased; the cardiac function and the percentage of unreduced myocardial mitochondrial membrane potential significantly decreased; the expression levels of NCX1 protein and mRNA increased; and the expression levels of SERCA2 protein and mRNA decreased ($P < 0.01$). All above mentioned outcomes were obviously improved in astragaloside IV group, trimetazidine group, and herb combination group when compared to the model group ($P < 0.01$), and the most improvement in the percentage of unreduced myocardial mitochondrial membrane potential, and mRNA expression of NCX1 and SERCA2 were found of herb combination group than astragaloside IV group and trimetazidine group ($P < 0.01$). **Conclusion** herb combination can stabilize the myocardial mitochondrial membrane potential, improve the mitochondrial function of cardiomyocytes, and regulate the balance of NCX1 and SERCA2 expression, thereby improving cardiac function of rats with heart failure.

Keywords heart failure; Fuzi (*Radix Aconiti Lateralis Praeparata*); Huangqi (*Radix Astragali*); Tinglizi (*Semen Lepidii*); mitochondrial membrane potential; calmodulin; sodium-calcium exchanger; sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase

(收稿日期: 2020-07-25; 修回日期: 2020-10-20)

编辑: 邓 媛