

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.08.013

实验研究

参蛤散对心力衰竭大鼠线粒体功能的影响

朱灵妍, 魏易洪, 赵雯奇, 刘春燕, 曹敏, 周端*

(上海中医药大学附属龙华医院, 上海市徐汇区宛平南路 725 号, 200032)

摘要 目的 探讨参蛤散治疗心力衰竭的可能作用机制。方法 48 只 Wistar 大鼠随机分为假手术组、模型组、参蛤散组、比索洛尔组, 每组 12 只。除假手术组外其余各组大鼠采用腹主动脉缩窄法建立心力衰竭大鼠模型, 造模后 5 天, 参蛤散组予参蛤散混悬液 1.89 g/(kg·d) 灌胃, 比索洛尔组给予富马酸比索洛尔混悬液 1 mg/(kg·d) 灌胃, 假手术组与模型组给予生理盐水 2.5 ml/d 灌胃, 连续 12 周。比较各组大鼠血清乳酸、丙酮酸、游离脂肪酸含量以及心脏组织中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 α (PGC-1 α)、核呼吸因子 1 (NRF1)、线粒体转录因子 A (TFAM) 和线粒体复合体亚基 (包括 COX1、COX2、COX3、ATP6、ATP8) mRNA 表达。结果 模型组大鼠血清乳酸、丙酮酸、游离脂肪酸含量较假手术组显著上升, 心脏 COX1、COX2、COX3、ATP6、ATP8 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 参蛤散组血清丙酮酸、游离脂肪酸含量明显下降, COX2、ATP6、ATP8 mRNA 表达明显上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。模型组、参蛤散组、比索洛尔组大鼠心脏 PGC-1 α 、NRF1、TFAM mRNA 表达均较假手术组显著上升, 而 3 组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 参蛤散可能通过上调心脏 COX2、ATP6、ATP8 mRNA 表达水平, 减少血清代谢产物堆积, 从而保护心脏线粒体功能。

关键词 心力衰竭; 参蛤散; 线粒体; 血清代谢产物

心力衰竭的发展过程中伴随着心肌能量代谢的变化。心力衰竭早期细胞核及线粒体代偿性增大、增多, 失代偿之后, 心肌细胞能量代谢障碍, ATP 生成不足, 进一步加重心室重构和心力衰竭的发展。因缺血缺氧, 引起心肌细胞能量供应不足或糖脂代谢失衡, 线粒体结构功能损伤, 进而导致心脏结构和功能受损的过程称为代谢重构^[1]。代谢重构对线粒体的损伤源于两点: 一是导致线粒体氧化磷酸化效率明显减低, 二是中间代谢产物堆积导致线粒体结构与功能受损^[2]。前期研究发现, 参蛤散对心力衰竭大鼠左室射血分数、血压、左心功能均有不同程度的改善, 能减少心肌组织病变, 减轻基质水肿及心肌纤维化^[3-5]。本研究通过观察参蛤散对心力衰竭大鼠血清代谢产物乳酸、丙酮酸、游离脂肪酸, 心肌组织中过氧化物酶体增殖物激活受

体 γ 辅激活因子 1 α (PGC-1 α)、核呼吸因子 1 (NRF1)、线粒体转录因子 A (TFAM) 和线粒体复合体亚基 (包括 COX1、COX2、COX3、ATP6、ATP8) mRNA 表达的影响, 从线粒体功能方面探讨参蛤散治疗心力衰竭的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 Wistar 大鼠 48 只, 8 周龄, 雄性, 体重 (200 ± 20) g, 购自北京维通利华有限公司, 实验动物合格证号: SCXK (京) 2012-0001。

1.2 药物

参蛤散由生晒参 (批号: 140619)、蛤蚧 (批号: XD14101903) 组成, 购自上海雷允上连锁总店, 生药分别打粉过 100 目筛, 按 3 : 1 质量比例混合, 溶于双蒸水制成 200 mg/ml 混悬液, 低温保存备用。富马酸比索洛尔 (康忻, 5 mg, 批号: 184092), 德国默克公司, 溶于双蒸水制成 0.3 mg/ml 混悬液。戊巴比妥钠 (批号: 57330),

基金项目: 国家科技支撑计划 (2012BAI41B05); 国家自然科学基金 (81202660); 上海市“杏林新星”计划 (ZYSNXXD011-RC-XLXX-20130001)

* 通讯作者: zhouduan@126.com, (021) 64385700

Merck 公司; 青霉素 (批号: H13020657), 华北制药集团有限责任公司。

1.3 试剂与仪器

大鼠血清乳酸 (货号: A019-2)、丙酮酸试剂盒 (货号: A081) 购自南京建成生物工程研究所。大鼠血清游离脂肪酸的测定委托上海中医药大学附属龙华医院检验科完成。PrimerScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (货号: RR047A)、SYBR Premix Ex Taq II (货号: RR820A), 购自 TaKaRa 公司。手持式高速分散均质机 (南北仪器厂), BioSpectrometer basic 紫外可见分光光度计 (Eppendorf 公司), ProFlex PCR 仪 (ABI 公司), 7500 实时荧光定量基因扩增仪 (ABI 公司), Synergy H1MF 型酶标分析仪 (BioTek 公司)。

1.4 动物分组、造模与给药方法

Wistar 大鼠适应性喂养 5 天后采用随机数字表法分为假手术组、模型组、参蛤散组、比索洛尔组, 每组 12 只。3% 戊巴比妥钠 0.3 ml/100 g 腹腔注射麻醉, 参照文献 [2] 建立腹主动脉缩窄致心力衰竭大鼠模型, 术后腹腔注射青霉素 8 万单位/只抗感染。自造模术后 5 天, 参蛤散组予参蛤散混悬液 1.89 g/(kg · d) 灌胃, 比索洛尔组给予富马酸比索洛尔混悬液 1 mg/(kg · d) 灌胃, 假手术组与模型组每只给予生理盐水 2.5 ml/d 灌胃, 各组每日 1 次, 连续 12 周。

1.5 观察指标及方法

大鼠禁食 12 h, 不禁水, 麻醉后腹主动脉取血, -80℃ 保存, 待测血清中乳酸、丙酮酸、游离脂肪酸含量。分离出左心室, 生理盐水漂洗后吸干, 冻存于 -80℃ 中。心脏组织匀浆后 Trizol 法提取心肌组织总 RNA, 测浓度, A_{260/280}: 1.7 - 2.0, 琼脂糖凝胶电泳检测, 确保抽提 RNA 的纯度及完整性, 后逆转录合成 cDNA, 实时荧光定量 PCR 测定 PGC-1α、NRF1、TFAM、COX1、COX2、COX3、ATP6、ATP8 mRNA 表达, 以 β-actin 基因为内参基因。反应体系 20 μl, 反应参数: 95℃

1 min; 95℃ 5s; 58℃ 15s, 72℃ 30s, 40 个循环, 观察熔解曲线判断扩增产物是否特异。引物由上海生工生物工程有限公司合成, PGC-1α: 上游: 5-AACTTGCTAGCGGTCCTCA-3, 下游: 5-TTCTGTGGGTTTGGTGTGA-3; NRF1: 上游: 5-AAGACAGGGTTGGGTTTGG-3, 下游: 5-CGAAAGAGACAGCAGACACG-3; TFAM: 上游: 5-TGAAGCTTG-TAAATCAGGCTTGGA-3, 下游: 5-GAGATCACTTCGCCCCAACTTCAG-3; COX1: 上游: 5-GAGGCTTCGGAAACTGAC-3, 下游: 5-GCTTATGTTATT-TATTCGTGGG-3; COX2: 上游: 5-GAAGTTGATA-ATCGGGTAG-3, 下游: 5-TAGTGAAGGGATG-GCTC-3; COX3: 上游: 5-GCCCATCACAGCCTAA-TA-3, 下游: 5-GAAATCCCGTTGCTATGA-3; ATP6: 上游: 5-TTGCCTCTTTCATTACC-3, 下游: 5-TGAGTGTAGTCGGTTGCT-3; ATP8: 上游: 5-CTTCCCAAACCTTTCCTG-3, 下游: 5-GGTAATGAAAGAGGCAAATAGA-3; β-actin: 上游: 5-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3, 下游: 5-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 21.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清乳酸、丙酮酸、游离脂肪酸含量比较

给药过程中, 模型组、参蛤散组各死亡 1 只大鼠。表 1 示, 模型组大鼠血清中乳酸、丙酮酸、游离脂肪酸含量较假手术组显著上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 参蛤散组大鼠血清丙酮酸、游离脂肪酸含量明显下降, 比索洛尔组血清乳酸、游离脂肪酸含量明显下降 ($P < 0.05$)。参蛤散组和比索洛尔组各指标组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠血清代谢产物含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	乳酸 (mmol/L)	丙酮酸 (μmol/L)	游离脂肪酸 (mmol/L)
假手术组	12	1.425 ± 0.3408	81.89 ± 17.04	0.7300 ± 0.1656
模型组	11	2.031 ± 0.5103*	110.00 ± 27.78*	0.9570 ± 0.1668**
参蛤散组	11	1.646 ± 0.1626	79.04 ± 15.98 [△]	0.7680 ± 0.1103 [△]
比索洛尔组	12	1.500 ± 0.2270 [△]	87.91 ± 10.57	0.7814 ± 0.1454 [△]

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

表 2 各组大鼠心脏线粒体复合体亚基 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	COX1	COX2	COX3	ATP6	ATP8
假手术组	12	1.0100 ± 0.0743	1.2010 ± 0.3350	1.3110 ± 0.3231	1.0740 ± 0.1766	0.8626 ± 0.2735
模型组	11	0.6804 ± 0.1491**	0.2015 ± 0.0368**	0.1606 ± 0.0391**	0.4470 ± 0.0627**	0.5539 ± 0.0645*
参蛤散组	11	0.8447 ± 0.1453	0.5739 ± 0.1567 [△]	0.4209 ± 0.1468	1.0300 ± 0.3098 ^{△△}	0.9592 ± 0.2505 [△]
比索洛尔组	12	0.6977 ± 0.0456	0.5663 ± 0.0983 [△]	0.3966 ± 0.1327	0.9382 ± 0.1348 ^{△△}	1.1410 ± 0.1589 ^{△△}

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 3 各组大鼠心脏 PGC-1 α 、NRF1、TFAM mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PGC-1 α	NRF1	TFAM
假手术组	12	0.907 ± 0.0481	0.629 ± 0.0592	0.430 ± 0.0712
模型组	11	1.379 ± 0.2209**	1.941 ± 0.3174**	2.121 ± 0.2458**
参蛤散组	11	1.632 ± 0.2671**	1.770 ± 0.4677**	2.342 ± 0.3928**
比索洛尔组	12	1.349 ± 0.1813*	1.718 ± 0.3632**	2.329 ± 0.3781**

注: PGC-1 α , 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子-1 α ; NRF1, 核呼吸因子 1; TFAM, 线粒体转录因子 A; 与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 各组大鼠心脏线粒体复合体亚基 mRNA 表达比较

表 2 示, 模型组大鼠心脏 COX1、COX2、COX3、ATP6、ATP8 mRNA 表达较假手术组均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 参蛤散组及比索洛尔组 COX2、ATP6、ATP8 mRNA 表达明显上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而 COX1、COX3 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。参蛤散组和比索洛尔组各指标组间比较差异亦无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠心脏 PGC-1 α 、NRF1、TFAM mRNA 表达比较

表 3 示, 与假手术组比较, 其余各组大鼠心脏 PGC-1 α 、NRF1、TFAM mRNA 表达水平均显著性上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。而模型组、参蛤散组、比索洛尔组各指标组间比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

参蛤散出自《圣济总录》, 方中人参大补元气, 蛤蚧补肺、纳气平喘, 用于治疗心肾阳衰、水饮凌心, 心病累肺作喘故兼见喘证的心力衰竭患者。我们根据“异病同治”的中医理论, 临床运用参蛤散治疗慢性心力衰竭短气胸闷的患者, 具有一定疗效。心力衰竭的发展过程是线粒体功能逐步紊乱的过程, PGC-1 α 作为参与线粒体生物合成及功能状态有关的重要因子, 参与脂肪酸氧化、葡萄糖利用及氧化磷酸化产能的过程, 有研究发现, PGC-1 α 有心血管保护作用^[6]。心力衰竭过程中 PGC-1 α 、NRFs、TFAM 下调, 线粒体功能受损,

PGC-1 α 很可能成为能量枯竭心脏的潜在治疗靶点^[7]。细胞色素 C 氧化酶及 ATP 合酶是线粒体氧化磷酸化供能过程中的关键酶, 细胞色素 C 氧化酶中的三个亚基 (COX1、COX2、COX3) 和 ATP 合成酶中的两个要素 (ATP6、ATP8) 均由线粒体 DNA 编码^[8-9]。同时, 心力衰竭大鼠血清乳酸、丙酮酸作为代谢产物增加, 乳酸、游离脂肪酸、丙酮酸增多, 游离脂肪酸的利用率下降, 使血清乳酸、游离脂肪酸、丙酮酸浓度升高, 代谢产物堆积, 导致线粒体结构功能受损^[10], 加重能量代谢障碍。

本研究结果表明, 模型组心脏 COX1、COX2、COX3、ATP6、ATP8 mRNA 表达均较假手术组显著下降, 说明心力衰竭过程中线粒体复合体亚基的功能异常。而参蛤散可上调 COX2、ATP6、ATP8 mRNA 表达水平, 说明参蛤散对线粒体功能有改善作用。进一步检测 PGC-1 α 、NRF1 和 TFAM mRNA 表达, 结果发现, 其余各组大鼠 PGC-1 α 、NRF1、TFAM 的 mRNA 水平较假手术组均明显上升, 治疗组与模型组无明显差异, 这与 Karamanlidis G 等^[11]报道结果相符。参蛤散组大鼠血清乳酸、丙酮酸、游离脂肪酸含量较模型组均有不同程度下降, 说明参蛤散可缓解心肌毒性。本实验结果可初步得出心力衰竭大鼠心脏氧化磷酸化复合体亚基合成减少, 影响线粒体的电子链传递, 进而影响线粒体氧化磷酸化功能, 从而造成线粒体产能的异常, 而参蛤散可能通过上调心力衰竭大鼠心脏 COX2、ATP6、ATP8 mRNA 表达, 同时减少血清代谢产物的堆积, 进而保护心力衰竭大鼠心脏线粒体功能, 改善代谢重构。

参考文献

- [1] 张军芳. 芪苈强心胶囊对心力衰竭微血管损伤、心室重构及代谢重构的影响 [J]. 石家庄: 河北医科大学, 2013: 84-87.
- [2] 刘丽. 腹主动脉缩窄大鼠左室肥厚及替米沙坦、苯磺酸氨氯地平预防肥厚的差异蛋白质组学研究 [J]. 北京: 中国协和医科大学, 2008: 14-15.
- [3] 梁逸强, 周莉, 周端, 等. 参蛤散对压力超负荷性大鼠心室重构的影响 [J]. 中药材, 2014, 37(7): 1237-1240.
- [4] 梁逸强, 周莉, 周端, 等. 参蛤散对心室重构大鼠 TGF- β 1/Smads 信号传导的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(10): 2232-2236.
- [5] 魏易洪, 吴申, 曹敏, 等. 参蛤散对压力负荷性心衰大鼠血流动力学及 RhoA、ROCK1 的作用 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014, 12(1): 65-67.
- [6] ARANY Z, NOVIKOV M, CHIN S, et al. Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR- γ coactivator 1 α [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(26): 10086-10091.
- [7] GARNIER A, FORTIN D, DELOMÉNIE C, et al. Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles [J]. J Physiol, 2003, 551(Pt2): 491-501.
- [8] SARASTE M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle [J]. Science, 1999, 283(5407): 1488-1493.
- [9] SCARPULLA RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function [J]. Physiol Rev, 2008, 88(2): 611-638.
- [10] ARDEHALI H, SABBAB HN, BURKE MA, et al. Targeting myocardial substrate metabolism in heart failure: potential for new therapies [J]. Eur J Heart Fail, 2012, 14(2): 120-129.
- [11] KARAMANLIDIS G, NASCIMBEN L, COUPER GS, et al. Defective DNA replication impairs mitochondrial biogenesis in human failing hearts [J]. Circ Res, 2010, 106(9): 1541-1548.

Impact of *Shenge Powder* (参蛤散) on Mitochondrial Function of Heart Failure Model Rats

ZHU Lingyan, WEI Yihong, ZHAO Wenqi, LIU Chunyan, CAO Min, ZHOU Duan

(Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200032)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Shenge Powder* (参蛤散) in treating heart failure.

Methods Forty-eight Wistar rats were randomized into the sham operation group, the model group, the *Shenge Powder* group, and the bisoprolol group ($n=12$). Rats in other groups were built heart failure rat models by abdominal aorta constriction except the sham operation group. Five days after modeling, the *Shenge Powder* group was given 1.89 g/(kg·d) of *Shenge Powder* suspension by gavage. The bisoprolol group was given 1 mg/(kg·d) of bisoprolol fumarate suspension by gavage. The sham operation group and the model group were given 2.5 ml/d of normal saline by gavage. Treatment for each of groups lasted for 12 weeks. The serum levels of lactic acid, pyruvic acid and free fatty acid, as well as the mRNA expressions of peroxisome proliferator activated receptor coactivator 1 α (PGC-1 α), nuclear respiratory factor 1 (NRF1), mitochondrial transcription factor A (TFAM) and mitochondrial complex subunit (including COX1, COX2, COX3, ATP6 and ATP8) in heart tissue in all groups were compared. **Results** The serum levels of lactic acid, pyruvic acid and free fatty acid in the model group were higher, and mRNA expressions of heart COX1, COX2, COX3, ATP6 and ATP8 lower than those in the sham operation group; ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the model group, the serum level of pyruvic acid and free fatty acid decreased, but mRNA expressions of COX2, ATP6 and ATP8 increased in the *Shenge Powder* group ($P<0.05$ or $P<0.01$). mRNA expressions of PGC-1 α , NRF1 and TFAM in rats' heart increased in the model group, the *Shenge Powder* group and the bisoprolol group compared with that in the sham operation group, while there was no significant difference among the three groups ($P>0.05$). **Conclusion** *Shenge Powder* might reduce serum metabolites accumulation by up-regulating heart mRNA expressions of COX2, ATP6 and ATP8 to protect heart mitochondrion function.

Keywords heart failure, *Shenge Powder*, mitochondrion, serum metabolites

(收稿日期: 2016-10-13; 修回日期: 2017-01-02)

编辑: 邓媛