

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.12.012

心阴片对慢性心力衰竭模型小鼠线粒体能量代谢的影响

刘惠^{1,2}, 王陵军^{1,2}, 王俊岩^{1,2}, 冼绍祥^{1,2}, 方红城³, 叶桃春¹✉



1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东省广州市白云区机场路 16 号, 510405; 2. 广州中医药大学岭南医学研究中心; 3. 深圳中西医结合医院

摘要 **目的** 探讨心阴片治疗慢性心力衰竭的可能作用机制。 **方法** 60 只 C57BL/6J 小鼠随机分为假手术组 8 只, 模型组、曲美他嗪组及心阴片低、高剂量组各 13 只。除假手术组外, 其余各组采用主动脉弓缩窄术制备慢性心力衰竭模型。造模后心阴片低剂量组给予心阴片 292.5 mg/kg 灌胃, 心阴片高剂量组给予心阴片 1170 mg/kg 灌胃, 曲美他嗪组给予盐酸曲美他嗪片 15 mg/kg 灌胃, 假手术组和模型组给予 0.1 ml/10 g 蒸馏水灌胃。各组均每天 1 次, 共 8 周。检测心功能各指标包括左室射血分数 (LVEF)、左室短轴缩短率 (LVFS)、左室舒张内径 (LVIDd)、左室收缩内径 (LVIDs), 观察心脏组织形态学、心肌组织胶原纤维沉积、心肌细胞线粒体超微结构变化, 检测心脏组织过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 协同活化因子 1 α (PGC-1 α)、核呼吸因子 1 (NRF1)、线粒体转录特异因子 B2 (TFB2M) 蛋白表达及心肌组织三磷酸腺苷 (ATP) 水平。 **结果** 与假手术组比较, 模型组 LVEF、LVFS 明显下降, LVIDd、LVIDs 明显升高, PGC-1 α 、NRF1 及 TFB2M 蛋白表达显著降低, 心脏组织 ATP 水平降低 ($P < 0.05$); 心肌细胞明显增大, 排列不规则, 胶原纤维沉积明显增多, 线粒体数量减少、体积肿胀, 线粒体膜结构不完整, 嵴模糊。与模型组比较, 曲美他嗪组及心阴片低、高剂量组 LVEF、LVFS、LVIDs 改善, ATP 水平显著提高 ($P < 0.05$); 心阴片低剂量组 PGC-1 α 、TFB2M 蛋白表达, 心阴片高剂量组 PGC-1 α 、NRF1、TFB2M 蛋白表达, 曲美他嗪组 NRF1、TFB2M 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.05$); 各组心脏组织形态学明显改善, 胶原纤维沉积明显减轻, 线粒体超微结构破坏较少。 **结论** 心阴片能改善慢性心力衰竭模型小鼠心功能, 其机制可能是调控 PGC-1 α /NRF1/TFB2M 信号通路进而改善线粒体能量代谢。

关键词 慢性心力衰竭; 线粒体; 能量代谢; 心阴片; 过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 协同活化因子 1 α ; 核呼吸因子 1; 线粒体转录特异因子 B2

慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF) 是各种心脏疾病的严重表现或者终末阶段。我国 CHF 患病率为 1.3% ~ 3.5%^[1], 每年新发 CHF 患者约 50 万例^[2], 病死率和再住院率居高不下, 已经成为严重的公共卫生问题。目前 CHF 的药物治疗主要是抑制神经内分泌的激活, 尽管改善了临床症状, 但病死率仍然很高, 有必要探索 CHF 发病的其他潜在机制和治疗的新途径。CHF 时心肌线

粒体能量代谢紊乱可导致心脏结构和功能异常^[3]。有学者认为, 改善心肌线粒体能量代谢是 CHF 治疗新的潜在靶点^[4]。研究表明, 过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 协同活化因子 1 α (PGC-1 α) 在心血管疾病包括心肌肥厚、CHF、动脉粥样硬化、心肌梗死、心肌病等中发挥重要作用^[5]; PGC-1 α 可通过激活下游核呼吸因子 1 (NRF1)、线粒体转录特异因子 B2 (TFB2M) 等调节线粒体生物合成, 从而调节能量代谢^[6-7]。心阴片 (原名养心康) 是广州中医药大学第一附属医院研制的采用益气养阴活血利水法治疗 CHF 的院内制剂。前期研究发现, 心阴片可以显著提高 CHF 患者心肺功能, 改

基金项目: 国家自然科学基金 (81973777); 广州中医药大学第一附属医院青年科研基金 (211010010116); 广东省省级科技计划 (2018B020207009); 第六批全国老中医药专家学术经验继承项目; 广州市科技计划 (202102080228)

✉ 通讯作者: yetaochun@163.com

善临床症状^[8-9]；可以调控 CHF 动物模型心肌细胞自噬，改善心肌细胞超微结构，减轻心肌纤维化，改善心功能，降低血管紧张素 II (Ang II)、醛固酮、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6) 水平等^[10-13]。本研究旨在从线粒体能量代谢角度探讨心阴片治疗 CHF 的可能作用机制。本实验经广州中医药大学伦理委员会批准 (批件号 20190721001)，并严格执行动物使用道德规范。

1 材料与方法

1.1 动物

60 只 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠，6~8 周龄，体重 18~22 g，购于广州中医药大学实验动物中心，实验动物许可证号：SCXK (粤) 2018-0034，饲养在广州中医药大学 SPF 级实验动物中心，小鼠均自由摄食与饮水，适应性喂养 1 周。

1.2 主要药物、试剂及仪器

心阴片 (组成：人参、毛冬青、麦冬、黄芪、葶苈子等，组成比例 1.5 : 1.5 : 1 : 1 : 3 等)，购自广州中医药大学第一附属医院，批号：20190701。盐酸曲美他嗪片 (万爽力)，施维雅 (天津) 制药有限公司，批号：2016753。

戊巴比妥钠 (批号 P3761)、电镜染色试剂 (批号 10092103)，国药集团化学试剂有限公司；异氟烷 (瑞沃德生命科技有限公司，批号 19082602)；RIPA 裂解液 (批号 P0013B)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 P0010)、SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒 (批号 P0012A)、电泳液 (批号 P0014D)、转膜液 (批号 P0012B)、增强型三磷酸腺苷 (ATP) 检测试剂盒 (批号 S0027)，碧云天生物技术公司；蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物 (批号 2872S)、羊抗兔二抗 (批号 7074S)，CST 公司；PGC-1 α (批号 AF5395)、NRF1 (批号 AF5298) 抗体，Affinity 公司；TFB2M 抗体 (Proteintech 公司，批号 2411-4-AP)；GAPDH 抗体 (Abcam 公司，批号 2118S)；Masson 试剂盒 (批号 G1006)、HE 试剂盒 (批号 G1003)、电镜固定液 (批号 G1102)，武汉赛维尔生物科技有限公司。

小动物呼吸机 (美国 Harvard 公司，型号 Inspira)；小动物超声机 (加拿大 Visual Sonics 公司，型号 Vevo 2100)；全自动凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司，型号 Gel Doc XR)；超薄切片机 (Leica 公司，型号 leica UC7)；透射电子显微镜 (HITACHI 公司，型号 HT7700)；化学发光仪

(Promega 公司，型号 E5311)；正置光学显微镜 (日本尼康公司，型号 Eclipse E100)。

1.3 分组、造模及给药

60 只小鼠按照随机数字表法分为假手术组 8 只，模型组、曲美他嗪组及心阴片低、高剂量组各 13 只。除假手术组外，其余各组参照文献 [4] 用主动脉弓缩窄术复制心力衰竭模型。0.5% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉小鼠，气管插管连接呼吸机后行开胸手术，将生理盐水湿润过的 6~0 丝线穿过主动脉弓，依据主动脉弓粗细不同，在主动脉弓处平行放置 25~27 G (直径 0.4~0.5 mm) 钝性针头并结扎，然后轻轻取出垫针，关胸，逐层缝合，小鼠恢复自主呼吸后移除气管插管，术后置于保温垫保暖，待其苏醒后转移至笼内。假手术组开胸暴露主动脉弓并穿线，但不结扎。术后连续 3 天予青霉素 1 万 U 腹腔注射以防感染。术后 6~8 周超声检测小鼠左室射血分数 (LVEF) 低于 50% 为模型成功^[15-16]。模型组 10 只、心阴片低剂量组 9 只、心阴片高剂量组 8 只、曲美他嗪组 7 只小鼠造模成功。

小鼠苏醒且基本情况稳定后开始给药。小鼠用药剂量折算方法参考《药理实验方法学》^[17] 人与动物剂量换算公式。心阴片低剂量组给予心阴片 292.5 mg/kg 灌胃，心阴片高剂量组给予心阴片低剂量的 4 倍即 1170 mg/kg 灌胃，其中低剂量为等效剂量。曲美他嗪组给予盐酸曲美他嗪片 15 mg/kg 灌胃，假手术组和模型组给予 0.1 ml/10 g 蒸馏水灌胃。各组均每天 1 次，共 8 周。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 心功能 给药结束后小鼠吸入异氟烷麻醉，仰卧固定，胸部脱毛膏备皮后涂抹耦合剂，用相应超声探头观察，检测小鼠 LVEF、左室短轴缩短率 (LVFS)、左室舒张内径 (LVIDd)、左室收缩内径 (LVIDs)。

1.4.2 心脏组织形态学 分离小鼠心脏，一部分固定于 4% 多聚甲醛、电镜固定液，一部分放置于 -80℃ 冰箱待用。采用 HE 染色法，心脏组织石蜡包埋后切成 4 μ m 厚的薄片，贴于载玻片后烤片，然后苏木精-伊红染色，1% 盐酸乙醇分化，乙醇梯度脱水，透明，中性树胶封片，显微镜下观察小鼠心脏组织形态学。

1.4.3 心肌组织胶原纤维沉积 采用 Masson 染色法，心脏组织石蜡切片脱蜡至水，Weigert 铁苏木素染色 5 min，1% 盐酸酒精分化，自来水冲洗

5 min 返蓝, 丽春红酸性品红染 10 min, 蒸馏水迅速冲洗, 磷钼酸溶液处理 5 min 后苯胺蓝复染 5 min, 1% 冰醋酸分化 1 min 后乙醇梯度脱水, 透明, 中性树胶封片, 显微镜下观察小鼠心肌组织胶原纤维沉积情况。

1.4.4 心肌线粒体超微结构 电镜固定液固定后取出心脏组织, 乙醇、丙酮梯度脱水, 包埋后切成 60~80 nm 超薄切片, 铀铅双染色, 透射电子显微镜下观察小鼠心肌线粒体超微结构。

1.4.5 Western blot 法检测心脏组织 PGC-1 α 、NRF1、TFB2M 蛋白表达 取小鼠心脏组织, 加入裂解液充分匀浆裂解, 4℃、15 000 r/min 离心 20 min (离心半径 10 cm), 取上清液, 用 BCA 法测定蛋白浓度, 按照上清液体积加入 5 $\times$ 上样缓冲液, 5 min、99℃ 金属浴变性。SDS-PAGE 电泳, 再转膜至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 一抗按照 PGC-1 α (1:1000), NRF1 (1:1000), TFB2M (1:1000), GAPDH (1:5000) 的比例稀释加入, 4℃ 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 加入二抗, 室温孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次, 凝胶成像系统中曝光显影, 结果以目的蛋白相对表达量表示。

1.4.6 心脏组织 ATP 水平 按照试剂盒说明书操作, 每 20 mg 心脏组织中加入 100~200 μ l 裂解液, 匀浆充分裂解, 4℃、15 000 r/min 离心 5 min (离心半径 10 cm), 取上清。将 ATP 标准溶液稀释成适度的梯度浓度, 用作标准曲线的制定。按照 1:4 的比例稀释 ATP 检测试剂配置成 ATP 工作液, 每个检测孔加入 100 μ l ATP 工作液, 室温放置 3~5 min, 加入 20 μ l 样品或标准品, 用化学发光仪测定相对光强度 (RLU) 值, 根据标准曲线计算 ATP 水平。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。实验数据均为计量资料且符合正态分布, 用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析,

若方差齐, 两两比较采用 LSD 法; 若方差不齐, 两两比较采用 Tamhane 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

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 LVEF、LVFS 明显下降, LVIDd、LVIDs 明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 心阴片低、高剂量组及曲美他嗪组 LVEF、LVFS 明显升高, LVIDs 明显降低, 心阴片高剂量组及曲美他嗪组 LVIDd 明显降低 ($P < 0.05$)。与心阴片低剂量组比较, 心阴片高剂量组 LVEF 明显升高, 曲美他嗪组 LVIDd 明显降低 ($P < 0.05$)。心阴片高剂量组与曲美他嗪组心功能各指标比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组小鼠心脏组织形态学及胶原纤维沉积情况

HE 染色与 Masson 染色结果显示, 假手术组心肌细胞排列整齐, 细胞形态大小基本一致, 未见细胞肥大、坏死等现象。与假手术组相比, 模型组小鼠心肌细胞明显增大, 排列不规则, 有较多炎症细胞和胶原纤维沉积; 与模型组相比, 心阴片低、高剂量组小鼠心脏组织形态学明显改善, 心肌细胞排列较规则, 胶原纤维沉积和炎性细胞浸润明显减轻, 其中心阴片高剂量组改善效果更优; 曲美他嗪组心肌细胞排列基本整齐, 间质中见少量胶原纤维沉积, 未见明显炎性细胞浸润。详见图 1、图 2 (彩图请扫描二维码获取)。

2.3 各组小鼠心肌线粒体超微结构

假手术组小鼠心肌纤维排列整齐, 线粒体排列规则, 数量较多, 呈椭圆形, 膜结构完整, 嵴清晰, 未见明显的肥大或增生现象; 模型组心肌纤维紊乱, 有明显肥大肿胀, 线粒体排列不整齐, 数量减少, 部分有明显肥大, 膜结构不清晰, 内部嵴形态模糊, 有空泡; 心阴片低、高剂量组心肌纤维有序排列, 线粒体数量较多, 排列较整齐, 膜结构较

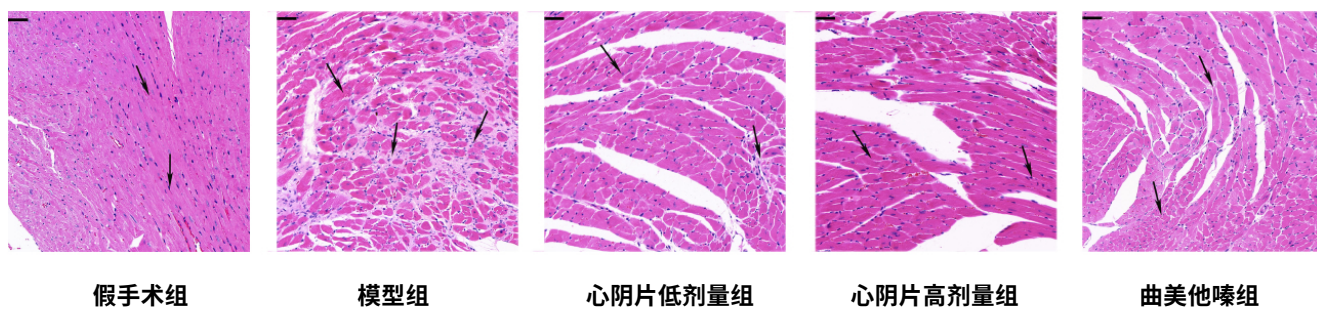
表 1 各组小鼠心功能指标比较

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

组别	鼠数	LVEF/%	LVFS/%	LVIDd/mm	LVIDs/mm
假手术组	8	74.43 $\pm$ 2.86	45.14 $\pm$ 3.61	3.23 $\pm$ 0.36	1.78 $\pm$ 0.29
模型组	10	34.84 $\pm$ 5.39 ^{a)}	17.10 $\pm$ 3.34 ^{a)}	3.99 $\pm$ 0.36 ^{a)}	3.31 $\pm$ 0.31 ^{a)}
心阴片低剂量组	9	53.64 $\pm$ 2.86 ^{b)}	26.93 $\pm$ 2.67 ^{b)}	3.74 $\pm$ 0.37	2.71 $\pm$ 0.31 ^{b)}
心阴片高剂量组	8	57.46 $\pm$ 3.46 ^{b) c)}	27.54 $\pm$ 3.22 ^{b)}	3.58 $\pm$ 0.35 ^{b)}	2.59 $\pm$ 0.25 ^{b)}
曲美他嗪组	7	57.18 $\pm$ 2.20 ^{b)}	27.92 $\pm$ 0.93 ^{b)}	3.31 $\pm$ 0.60 ^{b) c)}	2.39 $\pm$ 0.43 ^{b)}

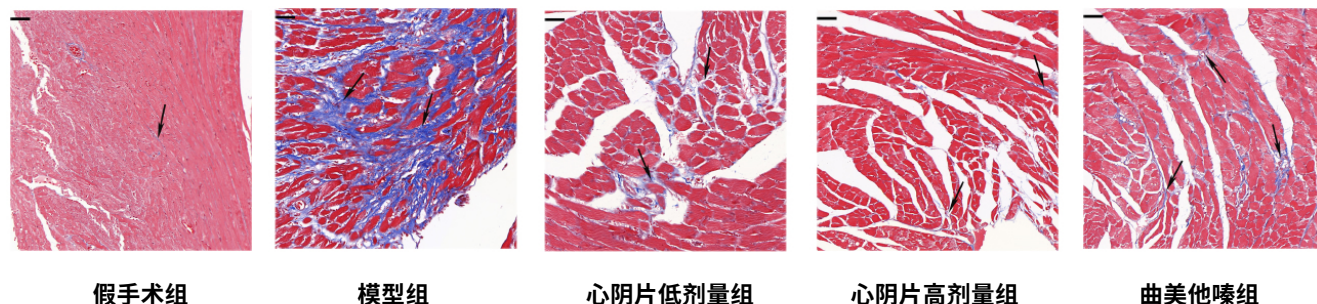
注: LVEF, 左室射血分数; LVFS, 左室短轴缩短率; LVIDd, 左室舒张内径; LVIDs, 左室收缩内径。

a) 与假手术组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与心阴片低剂量组比较, $P < 0.05$ 。



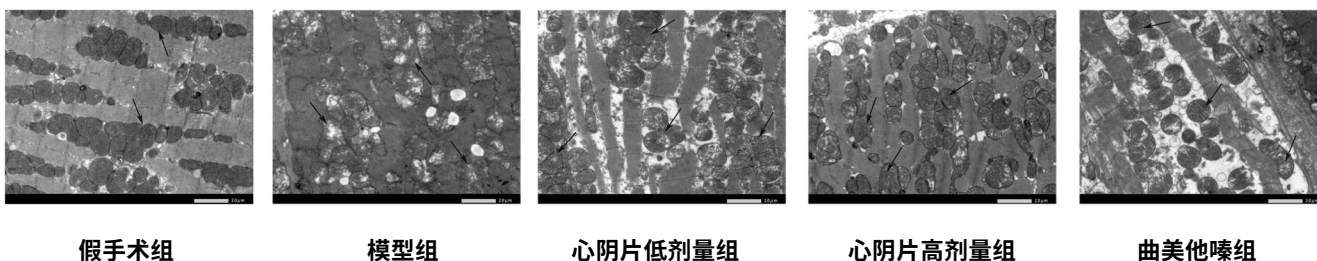
注：黑色箭头所指为心肌细胞和炎性细胞聚集。

图 1 各组小鼠心脏组织形态学 (HE 染色, ×200)



注：黑色箭头所指为胶原纤维。

图 2 各组小鼠心肌组织胶原纤维沉积情况 (Masson 染色, ×200)



注：黑色箭头所指为线粒体。

图 3 各组小鼠心肌线粒体超微结构 (铀铅双染色, ×2500)

完整, 内部嵴形态清晰, 嵴密度较高; 曲美他嗪组心肌纤维排列整齐, 线粒体排列较有序, 无明显肥大增生现象, 膜完整, 嵴密度高, 部分存在线粒体分裂融合现象。详见图 3。

2.4 各组小鼠心脏组织 PGC-1 α 、NRF1、TFB2M 蛋白表达比较

图 4、图 5 示, 与假手术组比较, 模型组 PGC-1 α 、NRF1、TFB2M 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 心阴片低剂量组 PGC-1 α 、TFB2M 蛋白表达, 心阴片高剂量组 PGC-1 α 、NRF1、TFB2M 蛋白表达及曲美他嗪组 NRF1、TFB2M 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.05$); 与心阴片低剂量组比较, 心阴片高剂量组和曲美他嗪组 PGC-1 α 蛋白表达降低, NRF1 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。心阴片高剂量组、曲美他嗪组两组间 PGC-1 α 、NRF1 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 心阴片低、高剂量组及曲美他嗪组各组间 TFB2M 蛋白表达差异

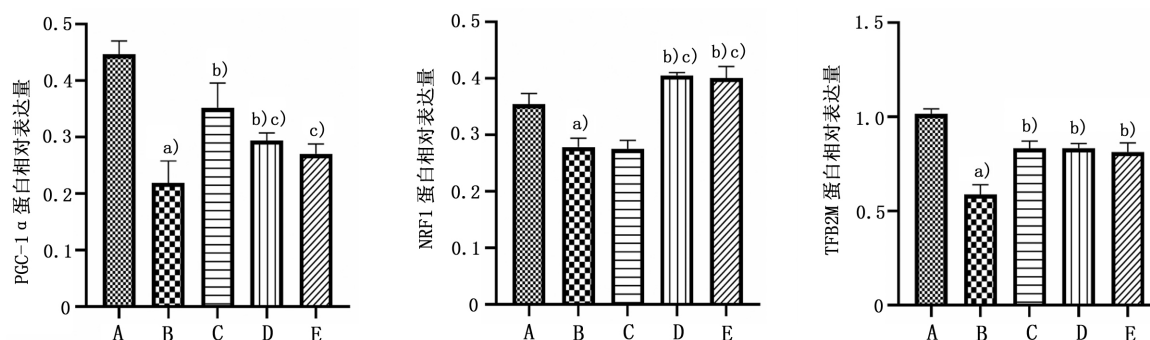
无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 各组小鼠心脏组织 ATP 水平比较

图 6 示, 与假手术组比较, 模型组心脏组织 ATP 水平明显下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 心阴片低、高剂量组及曲美他嗪组 ATP 水平明显提高 ($P < 0.05$), 且曲美他嗪组 ATP 水平高于心阴片低剂量组 ($P < 0.05$); 与心阴片高剂量组比较, 心阴片低剂量组及曲美他嗪组 ATP 水平均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

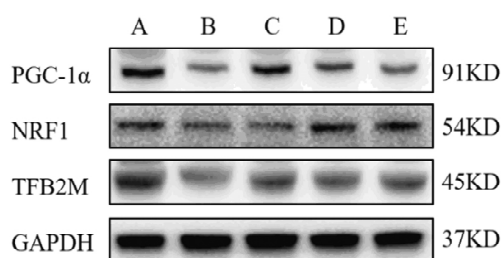
CHF 属于中医学“水肿”“喘证”“怔忡”“痰饮”等范畴, 其病机为气血阴阳虚衰、脏腑功能失调, 心失所养, 心血不运, 血脉瘀阻, 乃本虚标实之证, 本虚以气虚为主, 常兼有阴虚、阳虚, 标实以血瘀为主, 常兼有痰浊、水饮^[8]。CHF 中医基本证型有气虚血瘀、气阴两虚血瘀、阳虚血瘀 3 种, 均可兼有痰饮^[9], 故采用益气养阴活血利



注: A, 假手术组 (n=8); B, 模型组 (n=10); C, 心阴片低剂量组 (n=9); D, 心阴片高剂量组 (n=8); E, 曲美他嗪组 (n=7); PGC-1α, 过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 协同活化因子 1α; NRF1, 核呼吸因子 1; TFB2M, 线粒体转录特异因子 B2。

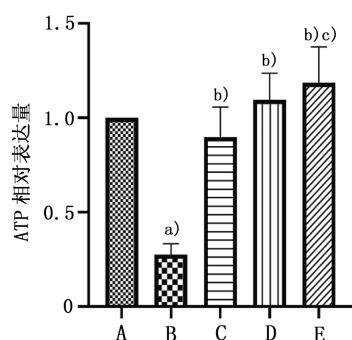
a) 与假手术组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与心阴片低剂量组比较, $P < 0.05$ 。

图 4 各组小鼠心脏组织 PGC-1α、NRF1、TFB2M 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)



注: A, 假手术组 (n=8); B, 模型组 (n=10); C, 心阴片低剂量组 (n=9); D, 心阴片高剂量组 (n=8); E, 曲美他嗪组 (n=7); PGC-1α, 过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 协同活化因子 1α; NRF1, 核呼吸因子 1; TFB2M, 线粒体转录特异因子 B2。

图 5 各组小鼠心脏组织 PGC-1α、NRF1、TFB2M 蛋白表达条带情况



注: A, 假手术组 (n=8); B, 模型组 (n=10); C, 心阴片低剂量组 (n=9); D, 心阴片高剂量组 (n=8); E, 曲美他嗪组 (n=7); ATP, 三磷酸腺苷。

a) 与假手术组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与心阴片低剂量组比较, $P < 0.05$ 。

图 6 各组小鼠心脏组织 ATP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

水法治疗。心阴片由人参、黄芪、麦冬、毛冬青、葶苈子等组成,是益气养阴活血利水的代表方,且前期研究已证实心阴片能够有效治疗 CHF^[8-13,20-21]。

心脏的主要功能是不停地泵血,这决定了心脏是一个高耗能的器官,但心肌细胞中直接供能物质 ATP 含量极低,心肌细胞必须不停地合成 ATP 以维持心脏的正常泵血功能。因此,能量缺乏及能量代谢障碍贯穿于 CHF 整个病程,也是促进和加重 CHF 的重要因素^[6,22]。线粒体作为能量代谢的主要场所,若发生结构或功能的异常,会导致细胞能量代谢障碍,进而影响心肌细胞生存^[23]。PGC-1α 主要分布于骨骼肌、肝脏、心脏、脑等能量需求较大的组织中,是线粒体生物发生及能量代谢的重要调控因子,可以通过激活下游核呼吸因子 (NRFs)、雌激素相关受体 (ERRs)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARγ)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPARα)、线粒体转录因子 A (TFAM)、线粒体转录特异因子 (TFBM),促进线粒体生物发生,调节氧化磷酸、脂肪酸氧化和糖酵解等过程^[6]。研究发现,在人和动物心肌肥厚、CHF 模型中 PGC-1α 表达降低^[24-25],心脏特异性 PGC-1α 敲除小鼠诱导心脏代谢、结构和功能异常,导致扩张性心肌病和 CHF^[26]。另有研究发现,卡维地洛诱导人脐静脉内皮细胞 PGC-1α 表达增加,促进了线粒体生物发生,提高了线粒体功能^[27]。这些研究提示 PGC-1α 是心肌肥厚和心力衰竭的重要保护因素。TFB2M 是 PGC-1α 在调控线粒体生物发生过程中下游 NRF1 的识别位点^[28]。当机体能量需求增加时,可启动 PGC-1α/NRF1/TFB2M 通路代偿,促进线粒体生物发生,提高线粒体的质与量,改善心肌能量供应^[29-31]。既往研究表明,CHF 时心脏中与线粒体生物发生相关的 PGC-1α、NRF1 及下游整条通路下调^[32],而通过刺激 PGC-1α、NRF1 及其下游通路,可以提高心肌线粒体生物发生,改

善能量代谢^[3]。

本研究结果显示,模型组小鼠心功能下降,心肌细胞肥大,胶原纤维沉积明显,PGC-1 α 、NRF1 及 TFB2M 蛋白表达下降,线粒体超微结构破坏明显,表明心力衰竭时心脏中调控线粒体能量代谢的 PGC-1 α /NRF1/TFB2M 通路下调,线粒体结构和功能受损,心脏 ATP 供应减少。心阴片和曲美他嗪可以显著改善 CHF 模型小鼠心功能,改善心脏组织形态,减轻心肌线粒体超微结构损伤,明显提高 CHF 小鼠心脏 ATP 水平,其中心阴片高剂量组上调 PGC-1 α 及 NRF1、TFB2M 蛋白的表达,心阴片低剂量组上调 PGC-1 α 、TFB2M 蛋白的表达,曲美他嗪上调 NRF1、TFB2M 蛋白表达,提示心阴片可能通过 PGC-1 α 及其下游 NRF1、TFB2M 联级信号通路刺激心肌线粒体生物发生,修复线粒体结构和功能损伤,改善心脏能量代谢,从而改善 CHF 小鼠心功能。本次实验结果发现心阴片高剂量组与心阴片低剂量组相比,干预效果未见显著差异,故尚不能明确药物调控该通路的量效关系,需进一步深入研究。

参考文献

- [1] GROENEWEGER A, RUTTEN FH, MOSTERD A, et al. Epidemiology of heart failure [J]. Eur J Heart Fail, 2020, 22(8): 1342 - 1356.
- [2] 黄峻. 中国心力衰竭流行病学特点和防治策略 [J]. 中华心脏与心律电子杂志, 2015, 3(2): 2 - 3.
- [3] VANBILSEN M, SMEETS P, GILDE A, et al. Metabolic remodelling of the failing heart: the cardiac burn-out syndrome? [J]. Cardiovasc Res, 2004, 61(2): 218 - 226.
- [4] 陈游洲, 袁建松, 乔树宾. 心力衰竭中能量代谢重构研究进展 [J]. 中国循环杂志, 2014, 29(4): 306 - 308.
- [5] 唐楠, 刘方圆, 杨振, 等. PGC-1 α 在心血管疾病中的重要作用及机制 [J]. 医学研究杂志, 2019, 48(1): 18 - 22.
- [6] OKA SI, SABRY AD, CAWLEY KM, et al. Multiple levels of PGC-1 α dysregulation in heart failure [J]. Front Cardiovasc Med, 2020, 7: 2. doi: 10. 3389/fcvm. 2020. 00002.
- [7] FALKENBERG M, GASPARI M, RANTANEN A, et al. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA [J]. Nat Genet, 2002, 31(3): 289 - 294.
- [8] 叶桃春, 王陵军, 杨忠奇, 等. 心阴片对气阴虚血瘀水停型心衰患者心肺功能的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(9): 1129 - 1132.
- [9] 叶桃春, 吴伟, 周小雄, 等. 心阴片治疗气阴虚血瘀水停型慢性心力衰竭患者的疗效观察 [J]. 广州中医药大学学报, 2018, 35(6): 971 - 976.
- [10] 闫翠, 周政, 梁碧荣, 等. 养心康片调节自噬对慢性心力衰竭小鼠心肌纤维化的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 53 - 58.
- [11] 任培华, 王鹏, 廖东江, 等. 养心康片通过 Akt/AMPK-mTOR 通路抑制心梗后心力衰竭模型兔心肌细胞凋亡的机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(16): 124 - 130.
- [12] 任培华, 冼绍祥, 杨忠奇, 等. 养心康片对慢性心功能不全模型兔心功能, TNF- α , IL-6 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 237 - 240.
- [13] 任培华, 冼绍祥, 孙敬和, 等. 养心康对慢性心功能不全兔室重构的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(1): 58 - 60.
- [14] DEALMEIDA AC, VAN OORT RJ, WEHRENS XH. Transverse aortic constriction in mice [J]. J Vis Exp, 2010(38): 1729. doi: 10. 3791/1729.
- [15] 赵菁, 王迎超, 张玲. 超声心动图评价不同心肌梗死模型小鼠心功能的改变 [J]. 中华急诊医学杂志, 2015, 24(11): 1242 - 1244.
- [16] 谭伟江, 李想, 郑双, 等. 压力超负荷心衰小鼠模型的心脏结构和功能病理进程特征 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 583 - 592.
- [17] 魏伟, 吴希美, 李元健. 药理实验方法学 [M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1698.
- [18] 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.
- [19] 冠心病中医临床研究联盟, 中国中西医结合学会心血管病专业委员会, 中华中医药学会, 等. 慢性心力衰竭中医诊疗专家共识 [J]. 中医杂志, 2014, 55(14): 1258 - 1260.
- [20] 任培华, 王鹏, 廖东江, 等. 养心康片通过 Akt/AMPK-mTOR 通路对心肌梗死后心力衰竭模型兔心肌细胞自噬的影响 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(1): 16 - 19.
- [21] 黄衍寿, 冼绍祥, 吴辉. 养心康治疗充血性心力衰竭临床研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2000, 7(2): 71 - 74.
- [22] 邱英茹. 心肌代谢重构在慢性心力衰竭进展中的作用 [J]. 心血管病学进展, 2018, 39(2): 205 - 209.
- [23] 黄凯, 高佳明, 贺爽, 等. 线粒体作为中药治疗心力衰竭靶点的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2020, 42(9): 2082 - 2090.
- [24] BROWN DA, PERRY JB, ALLEN ME, et al. Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure [J]. Nat Rev Cardiol, 2017, 14(4): 238 - 250.
- [25] 刘传斌, 白婧, 李泱. PGC-1 α 在心血管疾病中的作用及可能机制研究进展 [J]. 解放军医学杂志, 2020, 45(10): 1077 - 1080.
- [26] KARKKAINEN O, TUOMAINEN T, MUTIKAINEN M, et al. Heart specific PGC-1 deletion identifies metabolome

- of cardiac restricted metabolic heart failure [J]. Cardiovasc Res, 2019, 115(1): 107–118.
- [7] YAO K, ZHANG WW, YAO L, et al. Carvedilol promotes mitochondrial biogenesis by regulating the PGC-1/TFAM pathway in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 470(4): 961–966.
- [8] GLEYZER N, VERCAUTEREN K, SCARPULLA RC. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(4): 1354–1366.
- [9] 张强, 胡晓虹, 张艳, 等. 益气活血复方对慢性心力衰竭大鼠 NRF-1、mtTFA 表达的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(6): 1541–1544.
- [10] LU X, ZHANG L, LI P, et al. The protective effects of compatibility of Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Zingiberis Rhizoma on rats with heart failure by enhancing mitochondrial biogenesis via Sirt1/PGC-1 alpha pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 92: 651–660. doi: 10.1016/j.biopha.2017.05.117.
- [11] 平政, 曹雪滨. 心肌线粒体生物发生及 PGC-1 α 的中心作用 [J]. 国际心血管病杂志, 2011, 38(3): 149–151.
- [12] 张艳, 刘秀娜, 王懿, 等. 冠心舒通胶囊对慢性心力衰竭大鼠心肌能量代谢的影响 [J]. 中医杂志, 2015, 56(23): 2054–2057.
- [13] PING Z, ZHANG L, CUI Y, et al. The protective effects of salidroside from exhaustive exercise-induced heart injury by enhancing the PGC-1 alpha-NRF1/NRF2 pathway and mitochondrial respiratory function in rats [J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015: 876825. doi: 10.1155/2015/876825.

Effects of *Xinyin Tablets* (心阴片) on Mitochondrial Energy Metabolism in Chronic Heart Failure Model Mice LIU Hui^{1,2}, WANG Lingjun^{1,2}, WANG Junyan^{1,2}, XIAN Shaoxiang^{1,2}, FANG Hongcheng³, YE Taochun¹

1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, 510405; 2. Lingnan Medical Research Center of Guangzhou University of Chinese Medicine; 3. Shenzhen Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Xinyin Tablets* (心阴片) in treating chronic heart failure (CHF). **Methods** Sixty C57BL/6J mice were randomized into sham operation group (n = 8), model group (n = 13), trimetazidine group (n = 13) and *Xinyin Tablets* low dose (n = 13) and high dose (n = 13) groups. Aortic arch constriction was carried out to prepare the model of CHF in all groups except for the sham operation group. After modeling, mice in the *Xinyin Tablets* low dose group and high dose group were given 292.5 mg/kg and 1170 mg/kg *Xinyin Tablets* by gavage, respectively; 15 mg/kg trimetazidine and 0.1 ml/10 g distilled water were administered by gavage in trimetazidine group and sham operation group, respectively; the interventions in all the groups were given to the mice once daily for eight weeks. Cardiac function indicators including left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular short axis shortening rate (LVFS), left ventricular internal dimension diastole (LVIDd) and left ventricular internal dimension systole (LVIDs) were measured; the cardiac tissue morphology, the cardiac tissue collagen fiber deposition and the changes of myocardial cell mitochondrial ultrastructure were assessed; the protein expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α (PGC-1 α), nuclear respiration factor 1 (NRF1), and mitochondrial transcription factor B2 (TFB2M) in the cardiac tissues, as well as the myocardial tissue adenosine triphosphate (ATP) level were detected. **Results** Compared to the sham operation group, the model group had significantly lower levels of LVEF and LVFS, higher levels of LVIDd and LVIDs, decreased expression of PGC-1 α , NRF1 and TFB2M proteins, and decreased level of ATP in cardiac tissue ($P < 0.05$); the myocardial cells were significantly increased with irregular arrangement; the deposition of collagen fibers obviously increased; the number of mitochondria significantly decreased with swollen volume; the mitochondrial membrane structure was incomplete, and the cristae was blurred. Compared to those of the model group, the levels of LVEF, LVFS and LVIDs in the trimetazidine group and *Xinyin Tablets* low dose and high dose groups were improved, and the ATP level was significantly increased ($P < 0.05$); the PGC-1 α and TFB2M protein expression in *Xinyin Tablets* low dose group, the PGC-1 α , NRF1 and TFB2M protein expression in the *Xinyin Tablets* high dose group, and the NRF1 and TFB2M protein expression in the trimetazidine group were significantly increased ($P < 0.05$); the cardiac tissue morphology in each group was significantly improved; the deposition of collagen fibers was reduced; and the ultrastructure of mitochondria was less damaged. **Conclusion** *Xinyin Tablets* may improve the cardiac function in the mice of CHF through regulating the PGC-1 α /NRF1/TFB2M signaling pathway and further promoting mitochondrial energy metabolism.

Keywords chronic heart failure; mitochondria; energy metabolism; *Xinyin Tablets* (心阴片); peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α ; nuclear respiration factor 1; mitochondrial transcription factor B2

(收稿日期: 2021-01-12; 修回日期: 2021-03-12)

编辑: 王利芬