

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.07.013

参附益心颗粒对 Ang II 诱导的 H9c2 心肌细胞损伤及 PGC-1 α 信号通路相关因子的影响

刘倩茹¹, 王新陆²✉, 朱明军², 崔琳², 李彬², 王永霞², 于瑞²

1. 河南中医药大学药学院, 河南省郑州市金水区人民路 19 号, 450000; 2. 河南中医药大学第一附属医院

[摘要] **目的** 探讨参附益心颗粒治疗慢性心力衰竭可能的作用机制。**方法** 通过超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱检测参附益心颗粒的离子成分。将 H9c2 心肌细胞分为正常 1 组、模型 1 组、参附益心颗粒低剂量组、参附益心颗粒高剂量组、氯沙坦组、辅酶 Q10 组。除正常 1 组外, 其余各组采用血管紧张素 II (Ang II) 诱导 H9c2 心肌细胞损伤模型, 同时参附益心颗粒低、高剂量组分别用含参附益心颗粒 0.25、0.5 mg/ml 的培养基培养, 氯沙坦组用含氯沙坦片 1×10^{-4} mol/L 的培养基培养, 辅酶 Q10 组用含有辅酶 Q10 片 1×10^{-4} mol/L 的培养基培养, 各组均培养 24 h。再将 H9c2 细胞分为正常 2 组、模型 2 组、转染模型组、转染参附益心颗粒组、转染对照组。除正常 2 组、转染对照组外, 其余各组采用 Ang II 诱导 H9c2 心肌细胞损伤模型, 同时转染模型组、转染参附益心颗粒组、转染对照组给予 Lipofectmine 2000 转染试剂进行转染, 转染参附益心颗粒组给予转染前实验结果更好的参附益心颗粒剂量继续培养。采用 CCK-8 法检测各组细胞活性, Mito-Tracker 荧光探针观察 H9c2 细胞中线粒体含量, 检测 H9c2 细胞中乳酸脱氢酶 (LDH) 含量及心肌细胞相关基因 [过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α)、过氧化物酶体增殖物激活受体 β/δ (PPAR β/δ)、过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 辅助激活因子 1 α (PGC-1 α)、核呼吸因子 1 (NRF-1)、核呼吸因子 2 (NRF-2)、雌激素相关受体 (ERR)] mRNA 表达。**结果** 参附益心颗粒药物定性的正离子物质成分共有 387 个, 含量最多的为 Stachydrine (水苏碱)、5-Hydroxymethylfurfural (5-羟甲基糠醛)、Retronecine (倒千里光裂碱); 定性的负离子物质成分共有 308 个, 含量最多的为 Danshensu (丹参素)、Malic acid (苹果酸)、4-hydroxybenzoic acid (4-羟基苯甲酸)。转染参附益心颗粒组给药剂量为 0.5 mg/ml。基因沉默前, 与正常 1 组比较, 模型 1 组细胞活性及各相关基因 mRNA 表达降低、LDH 含量升高 ($P < 0.05$), 线粒体含量减少; 与模型 1 组比较, 氯沙坦组、辅酶 Q10 组及参附益心颗粒高、低剂量组细胞活性升高、LDH 含量降低, 氯沙坦组 PGC-1 α 、NRF-1、NRF-2、ERR, 辅酶 Q10 组 PPAR α 、PGC-1 α 、NRF-1, 参附益心颗粒低剂量组 NRF-1、NRF-2, 参附益心颗粒高剂量组 PPAR α 、PGC-1 α 、NRF-1、NRF-2、ERR mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$), 线粒体含量增加; 与参附益心颗粒低剂量组比较, 参附益心颗粒高剂量组、氯沙坦组、辅酶 Q10 组的细胞活性均升高、LDH 含量降低 ($P < 0.05$), 线粒体含量增多, 参附益心颗粒高剂量组 PGC-1 α 、NRF-2 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。基因沉默后, 与正常 2 组比较, 模型 2 组、转染模型组心肌细胞活性及各相关基因 mRNA 表达均降低、LDH 含量升高 ($P < 0.05$), 线粒体含量减少; 与转染模型组比较, 转染参附益心颗粒组心肌细胞活性、LDH 含量、各相关基因 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 线粒体含量改善不明显。与参附益心颗粒高剂量组比较, 转染参附益心颗粒组心肌细胞活性及 PPAR α 、PPAR β/δ 、PGC-1 α 、NRF-1、NRF-2、ERR mRNA 表达均降低, LDH 含量升高 ($P < 0.05$)。**结论** 参附益心颗粒可能通过调节 PGC-1 α 信号通路相关因子, 改善心肌细胞损伤, 从而发挥治疗慢性心力衰竭的作用, 其有效物质成分可能为丹参酮、水苏碱、5-羟甲基糠醛、苹果酸等。

[关键词] 慢性心力衰竭; 参附益心颗粒; 基因沉默; PGC-1 α ; 乳酸脱氢酶; 线粒体

基金项目: 国家自然科学基金 (82030120, 81703897, 82004178, 81503419); 河南省科技攻关计划 (202102310177); 河南省中医局课题 (2019JDZX2015); 河南省高校科技创新团队支持计划 (13IRTSTHN012); 河南省中原千人计划-中原名医项目

✉ 通讯作者: wangxinlu110@126.com, 15038352207

慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF) 是多种心血管疾病的终末阶段, 可简单理解为心脏无法满足身体的正常需要^[1]。该病具有发病率高、预后差、病死率高等特点, 给患者及社会带来沉重的经济负担^[2]。CHF 病情的进展与能量代谢密切相关^[3], 而大量存在于心脏、肝脏等组织中的过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 辅助激活因子 1 α (PGC-1 α) 可参与机体调控心脏线粒体功能的过程^[4], 增加线粒体生物合成^[5], 在能量代谢调节过程中发挥重要作用^[6], 可能成为治疗 CHF 的新靶点^[7]。参附益心颗粒 (原名心衰康冲剂) 有益气活血、温阳利水之功, 能改善 CHF 患者的症状、体征及心功能^[8]。另有研究显示, 该方可阻断肾素-血管紧张素系统^[9], 改善心肌细胞线粒体功能^[10] 和线粒体膜电位^[11]。线粒体对于能量代谢过程十分重要, 而能量代谢贯穿 CHF 病程的发生发展始终^[12]。基于此, 本研究使用血管紧张素 II (Ang II) 构建 H9c2 心肌细胞损伤模型, 探讨参附益心颗粒对能量代谢的影响及其治疗 CHF 的可能作用机制。

1 材料

1.1 细胞

H9c2 细胞株来源于上海中国科学院细胞库。

1.2 药物

参附益心颗粒的组成: 人参、桂枝、砂仁、炮附片、丹参、赤芍、益母草、泽泻、猪苓、车前子、葶苈子、大腹皮、大枣 (药物比例为 1: 2: 1.67: 1.67: 5: 2.5: 5: 2.5: 2.5: 2.5: 2.5: 2.5: 2)。山东步长制药有限公司提供参附益心颗粒浸膏, 批号: 131101, 1 g 浸膏相当于 9.5 g 生药, 颗粒浸膏得率为 10.5%。辅酶 Q10 片, 卫材 (中国) 药业有限公司, 批号: H10930021, 10 mg/片; 氯沙坦钾片, 杭州默沙东制药有限公司, 批号: J20180006, 50 mg/片。

1.3 主要试剂及仪器

蛋白酶抑制剂 Cocktail (货号: P8340)、十二烷基硫酸钠 (SDS, 货号: Y0000620)、Ang II (货号: A9525), 美国 Sigma 公司, Ang II 冻干粉于 -70 °C 低温冰箱保存, 先用 pH 为 7.2~7.4 的无菌双蒸水配制成 1×10^{-3} mol/L 母液, 分装, -20 °C 存储备用, 使用时用 DMEM 高糖培养基稀释成所需要的终浓度; 扩增试剂盒 (货号: c11744-100)、逆转录试剂盒 (货号: c28025-032)、荧光探针 (Mito-Tracker, 货号: M22426), 美国 Invitrogen 公

司; 胎牛血清 (FBS, 货号: 1906287), 以色列 BI 公司; N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸 (HEPES, 货号: H8090)、DMEM 高糖培养基 (货号: 12100), 北京 Solarbio 科技有限公司; 线粒体提取试剂盒 (货号: K280-50), Biovision 公司; 乳酸脱氢酶 (LDH) 含量检测试剂盒 (货号: A020-2-2), 南京建成生物工程研究所; 胰蛋白酶 (Trypsin, 货号: 25200-056), 美国 Gibco 公司; CCK-8 试剂盒 (货号: CK04), 日本同仁公司; Trizol 试剂 (货号: 15596026)、Lipofectamine 2000 转染试剂 (货号: 11668030)、Opti-MEM 培养基 (货号: 51985091), Thermo Fisher Scientific 公司。

RCO-3000TVBB 型 CO₂ 培养箱 (美国 Revco 公司); CK40 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); Airtech 型生物超净工作台 (江苏苏净集团安泰公司); JA203 型电子分析天平 (上海海康电子仪器厂); MK3 型酶标仪 (德国 Thermo Fisher Scientific 公司); DMI3006 型倒置荧光显微镜 (德国 Leica 公司); ABI 7300 型荧光定量 PCR 仪 (美国 AB 公司); MK3 型荧光分光光度计 (Molecular Devices 公司); 1290 UPLC 型超高效液相 (Agilent 公司); Q Exactive Focus 型高分辨质谱仪 (Thermo Fisher Scientific 公司); YM-080S 型超声仪 (深圳市方奥微电子有限公司); ST16R 型台式高速离心机 (Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱 (UHPLC-QE-MS) 检测药物成分

在参附益心颗粒粉末中加入小钢珠和提取液, 涡旋研磨后冰水浴超声 1 h, -40 °C 静置 1 h 后, 4 °C、12 000 r/min 离心 (半径 15 cm) 15 min, 取上清于 0.22 μ m 滤膜中过滤, 上机检测。使用 Xcalibur 4.1 (Thermo Fisher Scientific 公司) 进行数据采集, 随后导入 XCMS 3.6.2 进行保留时间矫正、峰识别、峰提取等工作, 进行物质鉴定。

2.2 H9c2 大鼠心肌细胞培养

将 H9c2 心肌细胞置于 10% FBS+DMEM 高糖培养基 (含双抗) 中, 在 5% CO₂ 培养箱 (37 °C) 中培养 24 h。随后胰酶消化, 传代, 选取对数生长期细胞进行后续实验。

2.3 细胞分组及给药

将 H9c2 大鼠心肌细胞分正常 1 组、模型 1 组、氯沙坦组、辅酶 Q10 组及参附益心颗粒低、高剂量

组。其中,正常1组继续培养;模型1组用含 Ang II 1×10^{-5} mol/L 的培养基培养^[13];参附益心颗粒低剂量组用含参附益心颗粒(以浸膏干粉质量计) 0.25 mg/ml 及 Ang II 1×10^{-5} mol/L 的培养基培养^[10];参附益心颗粒高剂量组用含参附益心颗粒(以浸膏干粉质量计) 0.5 mg/ml 及 Ang II 1×10^{-5} mol/L 的培养基培养^[10];氯沙坦组用含氯沙坦片 1×10^{-4} mol/L 及 Ang II 1×10^{-5} mol/L 的培养基培养;辅酶Q10组用含有辅酶Q10片 1×10^{-4} mol/L 及 Ang II 1×10^{-5} mol/L 的培养基培养,各组均培养 24 h。每组设 3 个复孔(检测心肌细胞 LDH 含量时每组设 4 个复孔),实验重复 3 次。

另取 H9c2 大鼠心肌细胞,使用 Lipofectmine 2000 转染试剂对其进行 PGC-1 α 基因沉默。将细胞分为正常 2 组(同正常 1 组)、模型 2 组(同模型 1 组)、转染模型组[小分子干扰 RNA (SiRNA) + Ang II]、转染参附益心颗粒组(SiRNA+参附益心颗粒+Ang II)、转染对照组(转染空载体)。其中转染参附益心颗粒组参附益心颗粒给药剂量根据基因沉默前实验结果选择,即给予改善心肌细胞损伤效果更佳(升高线粒体含量、降低 LDH 含量效果更好)的剂量。转染模型组、转染参附益心颗粒组、转染对照组根据 Lipofectmine 2000 转染试剂说明书对 H9c2 大鼠心肌细胞进行转染,转染 24 h 后收集细胞检测转染率。PGC-1 α SiRNA 基因序列为: 5' (UCA CCG AGA CCG ACG UUA A) dTdT 3'; 对照模板(Scrambled PGC-1 α SiRNA) 基因序列为: 5' (ACG UGA CAC GUU CGG AGA A) dTdT 3'。转染率=荧光阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

2.4 观察指标及方法

2.4.1 CCK-8 法检测 H9c2 心肌细胞活性 按照试

剂盒说明书,使用 CCK-8 比色法检测 H9c2 大鼠心肌细胞活性(以 OD 值表示),检测波长为 450 nm。

2.4.2 H9c2 心肌细胞线粒体含量 采用 Mito-Tracker 荧光探针,依照试剂盒说明书,于荧光显微镜下取 3 个视野,通过观察 Mito-Tracker 荧光强度判定各组 H9c2 心肌细胞线粒体含量。

2.4.3 H9c2 心肌细胞 LDH 含量 依据试剂盒说明书进行操作,细胞 LDH 含量(%)=细胞培养基中测定的酶活力单位/(细胞裂解液中测定的酶活力单位+细胞培养基中测定的酶活力单位) $\times 100\%$ 。

2.4.4 H9c2 心肌细胞 PGC-1 α 通路相关因子表达 采用 RT-PCR 法检测 H9c2 心肌细胞 PGC-1 α 通路相关因子包括过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α)、过氧化物酶体增殖物激活受体 β/δ (PPAR β/δ)、PGC-1 α 、核呼吸因子 1 (NRF-1)、核呼吸因子 2 (NRF-2)、雌激素相关受体 (ERR) mRNA 的表达。使用 Trizol 试剂从细胞中提取总 RNA,对细胞总 RNA 纯度和浓度进行测定后,使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,随后进行扩增,随机引物和逆转录酶 PCR 试剂盒合成 cDNA, GAPDH 作为内参基因。引物由江苏金唯智生物科技有限公司合成,各分子引物序列见表 1。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件。计量资料均符合正态分布以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间数据使用单因素方差分析进行比较,两两比较若方差齐性选择 LSD 检验,方差不齐则使用 Tamhane's T^2 检验、Dunnetts T^3 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

转染参附益心颗粒组确定给药剂量为参附益心颗粒高剂量(0.5 mg/ml)。

表 1 RT-PCR 法检测 H9c2 心肌细胞各扩增基因分子引物序列情况

基因	上游引物	下游引物	扩增长度/bp
GAPDH	ACAGCAACAGGTTGGTGAC	TTTGAGGGTGCAGCGAAGCTT	252
PPAR α	CGGCGTTGAAAACAAGGAGG	CCTTGCGCAAATTCGGTGAGC	95
PPAR β/δ	AGCCATAACGCACCCCTTCAT	TGCACGCTGATCTCGTTGTA	116
PGC-1 α	CATGTGCAGCCAAGACTCTGT	AAAGCTGTCTGTGCCAGGTC	136
NRF-1	AGAGACAGCAGACACGGTTG	GCTGCGCCAAACACCTTAAA	136
NRF-2	GCACGGTGGAGTTCAATGAC	AGGGGCACTGTCTAGCTCTT	152
ERR	GGTGGCCGACAGAAGTACAA	GGCGTACAGCTTCTCAGGTT	165

注: GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; PPAR α , 过氧化物酶体增殖物激活受体 α ; PPAR β/δ , 过氧化物酶体增殖物激活受体 β/δ ; PGC-1 α , 过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 辅助激活因子 1 α ; NRF-1, 核呼吸因子 1; NRF-2, 核呼吸因子 2; ERR, 雌激素相关受体。

3.1 参附益心颗粒中物质成分鉴定结果

参附益心颗粒药物定性的正离子物质成分共有 387 个, 其中, 萜类 109 个, 生物碱 78 个, 苯丙素类 29 个, 含量最多的化合物前 10 位依次为 Stachydrine (水苏碱)、5-Hydroxymethylfurfural (5-羟甲基糠醛)、Retronecine (倒千里光裂碱)、7-Oxatricyclo [4.3.0.0~3, 9~] nonan-8-one, 9-[(benzoyloxy) methyl] -1-(beta-D-glucopyranosyloxy) -4-hydroxy-6-methyl-, (1R, 3R, 4R, 6S, 9S) [(氯二环己基甲基) 苯]、Pesticide3_Propoxur_C11H15NO3_Baygon、Pyroglutamic acid (not validated, isomer of 89) (焦谷氨酸)、4, 4, 8, 10, 14-pentamethyl-17-(4, 5, 6-trihydroxy-6-methylheptan-2-yl) -2, 5, 6, 7, 9, 15-hexahydro-1H-cyclopenta [a] phenanthrene-3, 16-dione、2-Chloro-DL-Phenylalanine (2-氯苯丙氨酸)、3-Pyridinemethanol、Salsolinol。

定性的负离子物质成分共有 308 个, 其中, 萜类 84 个, 黄酮类 32 个, 苯丙素类 31 个, 酚类 31 个, 含量最多的化合物前 10 位依次为 Danshensu (丹参素)、Malic acid (苹果酸)、4-hydroxybenzoic acid (4-羟基苯甲酸)、Albiflorin (芍药内酯苷)、beta-D-Glucopyranoside, (1aR, 2S, 5S, 5aR) -5b-[(benzoyloxy)methyl] tetrahydro-5-hydroxy-2-methyl-2, 5-methano-1H-3, 4-dioxacyclobuta [cd] pentalen-1a (2H) -yl、Alisol A (泽泻醇 A)、Gallocatechin (没食子儿茶素)、Magnolol (厚朴酚)、5-OXO-D-PROLINE (L-焦谷氨酸)、Salvianolic acid A (丹酚酸 A)。

3.2 各组 H9c2 心肌细胞活性比较

在荧光显微镜下观察, 经计算 PGC-1 α 基因沉默转染率约为 60%。表 2 示, PGC-1 α 基因沉默前, 与正常 1 组比较, 模型 1 组细胞活性降低 ($P<0.05$); 与模型 1 组比较, 氯沙坦组、辅酶 Q10 组及参附益心颗粒高、低剂量组细胞活性升高 ($P<0.05$); 参附益心颗粒高剂量组、氯沙坦组、辅酶 Q10 组的细胞活性均高于参附益心颗粒低剂量组 ($P<0.05$), 参附益心颗粒高剂量组、氯沙坦组、辅酶 Q10 组细胞活性比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

基因沉默后, 与正常 2 组比较, 模型 2 组、转染模型组心肌细胞活性均降低 ($P<0.05$), 转染对照组差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与模型 2 组比较, 转染模型组心肌细胞活性降低 ($P<0.05$); 转染参附益心颗粒组与转染模型组心肌细胞活性比

较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

与参附益心颗粒高剂量组比较, 转染参附益心颗粒组心肌细胞活性明显降低 ($P<0.05$)。

表 2 各组 H9c2 心肌细胞活性比较 (OD 值, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	细胞活性
正常 1 组	3	2.36 $\pm$ 0.09
模型 1 组	3	1.60 $\pm$ 0.03 ^{a)}
氯沙坦组	3	2.12 $\pm$ 0.04 ^{b)}
辅酶 Q10 组	3	1.94 $\pm$ 0.03 ^{b)}
参附益心颗粒低剂量组	3	1.79 $\pm$ 0.01 ^{b) c) d) e)}
参附益心颗粒高剂量组	3	2.02 $\pm$ 0.05 ^{b)}
正常 2 组	3	2.36 $\pm$ 0.11
模型 2 组	3	1.60 $\pm$ 0.08 ^{f)}
转染模型组	3	1.23 $\pm$ 0.04 ^{f) g)}
转染参附益心颗粒组	3	1.45 $\pm$ 0.06 ^{c)}
转染对照组	3	2.33 $\pm$ 0.06

注: a) 与正常 1 组比较, $P<0.05$; b) 与模型 1 组比较, $P<0.05$; c) 与参附益心颗粒高剂量组比较, $P<0.05$; d) 与氯沙坦组比较, $P<0.05$; e) 与辅酶 Q10 组比较, $P<0.05$; f) 与正常 2 组比较, $P<0.05$; g) 与模型 2 组比较, $P<0.05$ 。

3.3 各组 H9c2 心肌细胞线粒体含量比较

图 1(彩图请扫描本文二维码获取)示, PGC-1 α 基因沉默前, 模型 1 组大鼠心肌细胞 Mito-Tracker 荧光强度与正常 1 组相比明显降低, 线粒体含量减少; 与模型 1 组比较, 参附益心颗粒高、低剂量组及氯沙坦组、辅酶 Q10 组心肌细胞 Mito-Tracker 荧光强度均升高; 氯沙坦组荧光强度高于辅酶 Q10 组、参附益心颗粒高剂量组, 且此 3 组的荧光强度均高于参附益心颗粒低剂量组。

图 2(彩图请扫描本文二维码获取)示, PGC-1 α 基因沉默后, 转染模型组及模型 2 组大鼠心肌细胞 Mito-Tracker 荧光强度与正常 2 组相比明显降低, 线粒体含量减少; 转染对照组与正常 2 组比较, 荧光强度差异不明显, 证明转染试剂对本实验不产生影响; 与模型 2 组及转染模型组比较, 转染参附益心颗粒组心肌细胞 Mito-Tracker 荧光强度变化不明显, 线粒体含量改善不明显; 与参附益心颗粒高剂量组比较, 转染参附益心颗粒组 Mito-Tracker 荧光强度明显降低, 线粒体含量减少。

3.4 各组 H9c2 心肌细胞 LDH 含量比较

表 3 示, PGC-1 α 基因沉默前, 与正常 1 组比较, 模型 1 组中 LDH 含量显著升高 ($P<0.05$); 与模型 1 组比较, 参附益心颗粒各剂量组、氯沙坦组、辅酶 Q10 组心肌细胞 LDH 含量降低 ($P<0.05$); 与氯沙坦组比较, 参附益心颗粒低剂量组和辅酶 Q10 组心肌细胞 LDH 含量升高 ($P<0.05$);

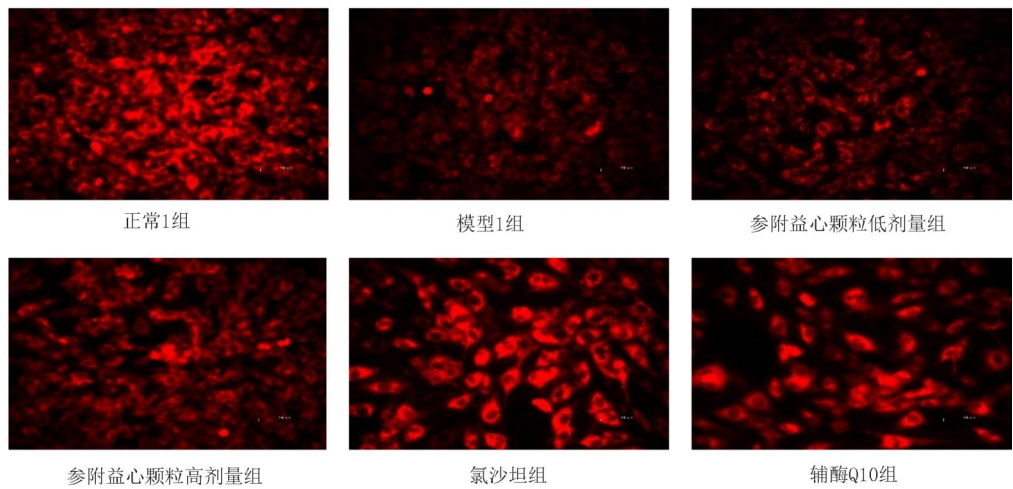


图1 过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 辅助激活因子1 α 基因沉默前各组H9c2心肌细胞线粒体含量 (Mito-Tracker 荧光, $\times 200$)

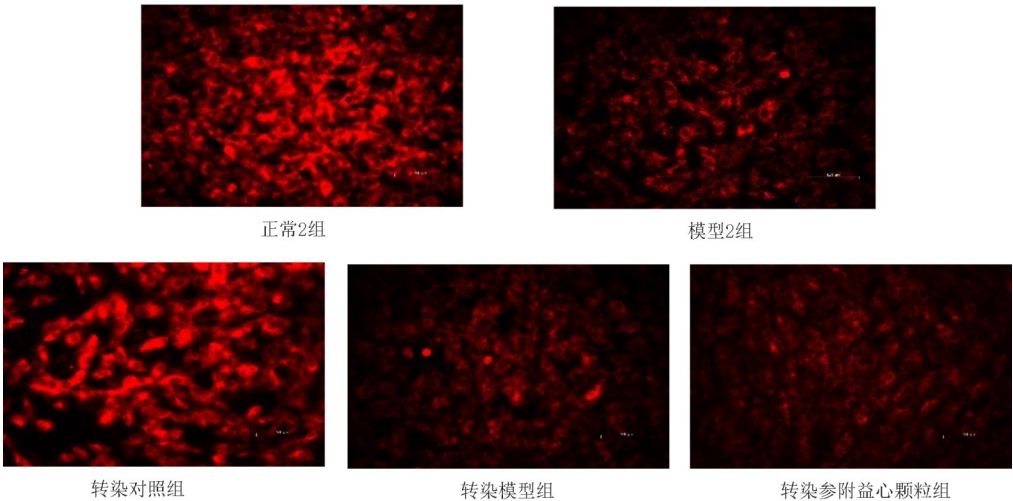


图2 过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 辅助激活因子1 α 基因沉默后各组H9c2心肌细胞线粒体含量 (Mito-Tracker 荧光, $\times 200$)

与辅酶Q10组比较,参附益心颗粒低剂量组心肌细胞LDH含量升高,参附益心颗粒高剂量组降低 ($P<0.05$);与参附益心颗粒高剂量组比较,参附益心颗粒低剂量组心肌细胞LDH含量升高 ($P<0.05$)。

PGC-1 α 基因沉默后,与正常2组比较,模型2组和转染模型组大鼠心肌细胞LDH含量明显升高 ($P<0.05$),转染对照组差异无统计学意义 ($P>0.05$);与转染模型组比较,转染参附益心颗粒组心肌细胞LDH含量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

与参附益心颗粒高剂量组比较,转染参附益心颗粒组心肌细胞LDH含量明显升高 ($P<0.05$)。

3.5 各组H9c2心肌细胞中PPAR家族及NRF-1、NRF-2、ERR mRNA表达比较

表4示,PGC-1 α 基因沉默前,与正常1组比较,模型1组H9c2心肌细胞中PPAR α 、PPAR β/δ 、

PGC-1 α 、NRF-1、NRF-2、ERR mRNA表达水平均明显下降 ($P<0.05$);与模型1组比较,氯沙坦组PPAR α 、NRF-1、NRF-2、ERR,辅酶Q10组PPAR α 、PGC-1 α 、NRF-1,参附益心颗粒低剂量组NRF-1、NRF-2,参附益心颗粒高剂量组PPAR α 、PGC-1 α 、NRF-1、NRF-2、ERR mRNA表达水平明显升高 ($P<0.05$);与氯沙坦组比较,参附益心颗粒低剂量组NRF-1、NRF-2,参附益心颗粒高剂量组NRF-1 mRNA表达水平明显降低 ($P<0.05$);与参附益心颗粒高剂量组比较,参附益心颗粒低剂量组PGC-1 α 、NRF-2 mRNA表达水平明显降低 ($P<0.05$)。

PGC-1 α 基因沉默后,与正常2组比较,转染对照组各指标差异均无统计学意义 ($P>0.05$),而模型2组、转染模型组心肌细胞PPAR α 、

表 3 各组 H9c2 心肌细胞中 LDH 含量比较 (mU/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	LDH
正常 1 组	4	127.11 $\pm$ 4.42
模型 1 组	4	472.88 $\pm$ 52.02 ^{a)}
氯沙坦组	4	151.99 $\pm$ 13.67 ^{b)}
辅酶 Q10 组	4	211.96 $\pm$ 14.35 ^{b) c)}
参附益心颗粒低剂量组	4	259.77 $\pm$ 15.29 ^{b) c) d) e)}
参附益心颗粒高剂量组	4	160.60 $\pm$ 16.35 ^{b) d)}
正常 2 组	3	131.59 $\pm$ 7.52
模型 2 组	3	477.55 $\pm$ 26.46 ^{f)}
转染模型组	3	826.42 $\pm$ 82.75 ^{f)}
转染参附益心颗粒组	3	665.75 $\pm$ 38.05 ^{e)}
转染对照组	3	144.06 $\pm$ 4.97

注: LDH, 乳酸脱氢酶。

a) 与正常 1 组比较, $P < 0.05$; b) 与模型 1 组比较, $P < 0.05$; c) 与氯沙坦组比较, $P < 0.05$; d) 与辅酶 Q10 组比较, $P < 0.05$; e) 与参附益心颗粒高剂量组比较, $P < 0.05$; f) 与正常 2 组比较, $P < 0.05$ 。

PPAR β/δ 、PGC-1 α 、NRF-1、NRF-2、ERR mRNA 表达水平均明显降低 ($P < 0.05$); 转染参附益心颗粒组与转染模型组各指标比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

与参附益心颗粒高剂量组比较, 转染参附益心颗粒组 PPAR α 、PPAR β/δ 、PGC-1 α 、NRF-1、NRF-2、ERR mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.05$)。

4 讨论

中医学认为, CHF 为本虚标实之证, 气虚阳虚、血瘀水停为其主要中医病机^[14]。参附益心颗粒是河南名老中医孙建芝的临床经验方, 全方总括于阴阳, 有益气温阳、利水消肿等功效, 对于 CHF

患者疗效确切^[8]。本研究首先对参附益心颗粒所含离子成分进行检测, 结果显示, 方中定性的正离子物质成分共有 387 个, 含量较高的成分是水苏碱、5-羟甲基糠醛, 而定性的负离子物质成分共有 308 个, 含量较高的成分是丹参素、苹果酸。其中水苏碱可使活性氧 (ROS) 产生减少、抑制自噬的过度激活^[15], 丹参素对 CHF 大鼠的左室重构产生影响^[16], 5-羟甲基糠醛具有增强大鼠红细胞抗氧化的作用^[17], 苹果酸参与线粒体代谢, 且能减少机体内自由基的产生^[18]。以上结果说明, 参附益心颗粒中含有多种有效成分, 可能通过降低心肌细胞过度自噬、减缓心室重构的进程、保护心肌能量代谢等多种途径治疗 CHF。

Ang II 是肾素-血管紧张素系统的主要活性肽^[19], 具有收缩血管和增加心肌收缩力等作用^[20]。研究证实, CHF 患者体内 Ang II 水平升高^[21], 因此, 本实验使用 Ang II 诱导正常 H9c2 细胞株构建心肌细胞损伤模型。当心肌损伤时心肌细胞膜破裂, LDH 释放入血, 其浓度会随时间不同程度地增加^[22]; 而作为心肌细胞内能量的主要来源, 线粒体对心肌细胞的存活尤为重要^[23], 因此, 本实验中以二者判定心肌细胞损伤程度。本研究结果显示, 与正常心肌细胞比较, Ang II 诱导的 H9c2 心肌细胞的细胞活性及线粒体含量均明显降低, LDH 含量则明显增高, 证明 Ang II 可使心肌细胞受到损伤; 而各给药组细胞活性及线粒体含量较 Ang II 诱导的心肌细胞均显著升高, 接近正常心肌细胞的细胞活性及线粒体含量, 同时各给药组的 LDH 含量

表 4 各组 H9c2 心肌细胞中 PPAR α 、PPAR β/δ 、PGC-1 α 、NRF-1、NRF-2、ERR mRNA 表达比较 (/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	PPAR α	PPAR β/δ	PGC-1 α	NRF-1	NRF-2	ERR
正常 1 组	3	1.02 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.02	1.01 $\pm$ 0.05	1.02 $\pm$ 0.04	1.01 $\pm$ 0.03	0.97 $\pm$ 0.11
模型 1 组	3	0.40 $\pm$ 0.07 ^{a)}	0.67 $\pm$ 0.06 ^{a)}	0.45 $\pm$ 0.06 ^{a)}	0.59 $\pm$ 0.02 ^{a)}	0.64 $\pm$ 0.01 ^{a)}	0.59 $\pm$ 0.03 ^{a)}
氯沙坦组	3	0.46 $\pm$ 0.05	0.71 $\pm$ 0.09	0.73 $\pm$ 0.07 ^{b)}	0.97 $\pm$ 0.01 ^{b)}	0.89 $\pm$ 0.01 ^{b)}	0.93 $\pm$ 0.05 ^{b)}
辅酶 Q10 组	3	0.56 $\pm$ 0.09 ^{b)}	0.76 $\pm$ 0.03	0.77 $\pm$ 0.06 ^{b)}	0.86 $\pm$ 0.04 ^{b)}	0.77 $\pm$ 0.06	0.78 $\pm$ 0.06
参附益心颗粒低剂量组	3	0.46 $\pm$ 0.04	0.62 $\pm$ 0.08	0.64 $\pm$ 0.04 ^{d)}	0.72 $\pm$ 0.01 ^{b) c)}	0.76 $\pm$ 0.01 ^{b) c) d)}	0.63 $\pm$ 0.10
参附益心颗粒高剂量组	3	0.56 $\pm$ 0.05 ^{b)}	0.95 $\pm$ 0.08	0.83 $\pm$ 0.04 ^{b)}	0.82 $\pm$ 0.02 ^{b) c)}	0.86 $\pm$ 0.02 ^{b)}	0.83 $\pm$ 0.05 ^{b)}
正常 2 组	3	1.02 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.02	1.01 $\pm$ 0.05	1.02 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.04	0.97 $\pm$ 0.11
模型 2 组	3	0.44 $\pm$ 0.04 ^{f)}	0.67 $\pm$ 0.06 ^{f)}	0.49 $\pm$ 0.06 ^{f)}	0.58 $\pm$ 0.02 ^{f)}	0.64 $\pm$ 0.01 ^{f)}	0.59 $\pm$ 0.03 ^{f)}
转染模型组	3	0.31 $\pm$ 0.03 ^{f)}	0.58 $\pm$ 0.04 ^{f)}	0.22 $\pm$ 0.03 ^{f)}	0.46 $\pm$ 0.02 ^{f)}	0.43 $\pm$ 0.01 ^{f)}	0.35 $\pm$ 0.02 ^{f)}
转染参附益心颗粒组	3	0.34 $\pm$ 0.01 ^{d)}	0.60 $\pm$ 0.04 ^{d)}	0.24 $\pm$ 0.04 ^{d)}	0.46 $\pm$ 0.03 ^{d)}	0.44 $\pm$ 0.02 ^{d)}	0.35 $\pm$ 0.02 ^{d)}
转染对照组	3	1.09 $\pm$ 0.10	1.03 $\pm$ 0.09	1.05 $\pm$ 0.05	1.01 $\pm$ 0.09	1.07 $\pm$ 0.06	0.96 $\pm$ 0.03

注: PPAR α , 过氧化物酶体增殖物激活受体 α ; PPAR β/δ , 过氧化物酶体增殖物激活受体 β/δ ; PGC-1 α , 过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 辅助激活因子-1 α ; NRF-1, 核呼吸因子 1; NRF-2, 核呼吸因子 2; ERR, 雌激素相关受体。

a) 与正常 1 组比较, $P < 0.05$; b) 与模型 1 组比较, $P < 0.05$; c) 与氯沙坦组比较, $P < 0.05$; d) 与参附益心颗粒高剂量组比较, $P < 0.05$; f) 与正常 2 组比较, $P < 0.05$ 。

较 Ang II 诱导的心肌细胞均显著降低, 接近正常心肌细胞的 LDH 含量, 且相较于参附益心颗粒低剂量组, 参附益心颗粒高剂量组及氯沙坦组、辅酶 Q10 组各指标均更接近正常心肌细胞水平, 证明参附益心颗粒高剂量及氯沙坦、辅酶 Q10 的改善效果较参附益心颗粒低剂量更好。

导致 CHF 的原因之一为心肌能量代谢障碍, 且心力衰竭时心脏重塑机制与能量稳态直接相关^[24], 故改善心肌能量代谢可延缓 CHF 患者的临床症状发展, 在一定程度上提高患者生活质量^[25]。PPARs 主要表达在心肌、脂肪等组织中, 目前共发现三种亚型即 PPAR α 、PPAR β/δ 和 PPAR γ , 具有促进脂肪酸摄取、转运和氧化的作用, 参与能量代谢平衡^[26], 可以调节合成代谢和氧化过程之间的平衡^[27], 是控制细胞内几乎所有脂肪酸代谢环节基因表达的一组核受体转录因子。PGC-1 α 作为一种诱导型转录共激活因子^[28], 是 PPARs 经典辅激活因子^[29], 能调节线粒体三磷酸腺苷 (ATP) 合成^[30], 并刺激线粒体生物的合成^[31], 参与能量代谢^[32]。相关研究证实, PGC-1 α 可通过增强 NRF-1 对线粒体转录因子 A (mtTFA) 的转录, 从而增加线粒体 DNA 的表达和复制^[33]; 当 PGC-1 α 与 ERR 家族成员 ERR- α 作用时, 可调控线粒体氧化代谢^[34]。此外, PGC-1 α 还能影响心肌缺血缺氧、心肌能量重构、改善心肌细胞肥大^[35], 可能具有心脏保护作用^[36]; 当其表达水平提升时, 会促进线粒体产生更多能量供给机体^[37], 是纠正衰竭心脏能量紊乱的新靶点^[38]。本研究结果显示, 相较于 Ang II 诱导的 H9c2 心肌细胞, 参附益心颗粒高剂量组中 PPAR α 、NRF-1、NRF-2、ERR、PGC-1 α 基因表达水平均明显上升, 由此推测, 参附益心颗粒可能通过上调脂肪酸代谢, 调节能量代谢, 增加心肌能量合成, 从而保护 Ang II 诱导的心肌细胞损伤。

同时本研究结果显示, PGC-1 α 基因沉默前, 相较于模型 1 组, 参附益心颗粒高剂量组中线粒体含量、心肌细胞活性以及相关基因表达水平均明显升高, LDH 含量显著降低, 提示参附益心颗粒能够抑制 H9c2 心肌细胞凋亡, 预防及保护心肌细胞损伤; PGC-1 α 基因沉默后, 与转染模型组比较, 转染参附益心颗粒组上述指标的变化均无统计学意义, 与参附益心颗粒高剂量组相比, 转染参附益心颗粒组中相关基因表达水平、心肌细胞活性均明显降低, LDH 含量则明显增高, 提示此时参附益心颗粒预防及保护心肌细胞损伤的作用被抑制。因

此, 参附益心颗粒可预防及保护心肌细胞损伤, 其作用机制可能与上调 PGC-1 α 信号通路相关因子的基因表达水平、调控线粒体生成有关。

综上所述, 参附益心颗粒治疗 CHF 发挥作用的物质成分可能为丹参酮、水苏碱、5-羟甲基糠醛、苹果酸等, 该方可能通过调节 PGC-1 α 信号通路相关因子, 影响细胞能量代谢, 从而保护 Ang II 诱导的心肌细胞损伤, 进而治疗心力衰竭。但由于中药复方中药材的多样性及化学成分的复杂性, 使其干预疾病的途径及靶点并不单一, 因此本研究结论仍需进一步实验验证。

参考文献

- [1] SELIM A, ZOLTY R, CHATZIZISIS YS. The evolution of heart failure with reduced ejection fraction pharmacotherapy: What do we have and where are we going? [J]. Pharmacol Ther, 2017, 178 : 67-82. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.03.011.
- [2] 王宙, 周琳, 刘洋, 等. 慢性心力衰竭的流行病学研究现状及其防治研究进展 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2019, 11(8): 1022-1024.
- [3] 张健维, 徐坦, 徐明. PPARs 在不同类型心力衰竭中作用的研究进展 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(8): 1509-1514.
- [4] 王慧婷, 张岩晨, 徐梦怡, 等. 能量代谢关键调控因子 PGC-1 α 的研究进展 [J]. 生理学报, 2020, 72(6): 804-816.
- [5] 王江, 高峰, 聂凌, 等. 心力衰竭大鼠心肌组织 PGC-1 α 表达变化及与能量代谢的关系 [J]. 心脏杂志, 2011, 23(6): 834.
- [6] 刘景峰, 张艳, 王懿, 等. 益气活血中药对心衰大鼠心肌 PGC-1 α 能量代谢影响的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(7): 30-33.
- [7] 朱灵妍, 魏易洪, 赵雯奇, 等. 参蛤散对心力衰竭大鼠线粒体功能的影响 [J]. 中医杂志, 2017, 58(8): 678-681.
- [8] 朱明军, 王永霞, 李彬, 等. 参附益心颗粒辨证联合西药治疗慢性心力衰竭的多中心、随机、双盲、安慰剂对照研究 [J]. 中医杂志, 2019, 60(21): 1843-1848.
- [9] 王永霞, 任红杰, 李彬, 等. 参附益心颗粒对慢性心力衰竭大鼠心肌血管紧张素 II 1 型受体和 2 型受体表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(9): 2710-2712.
- [10] 王新陆, 崔琳, 王幼平, 等. 参附益心方对血管紧张素 II 诱导 H9c2 心肌细胞凋亡及线粒体含量、膜电位的影响 [J]. 中医杂志, 2019, 60(21): 1854-1860.
- [11] 崔琳, 王幼平, 王新陆, 等. 参附益心颗粒对缺氧诱导的大鼠 H9c2 心肌细胞能量代谢的影响 [J]. 中医杂志, 2019, 60(10): 862-868.

- [12] 吴繁, 刘莉, 韩宇博, 等. 参芪益心方对慢性心力衰竭患者心肌能量代谢的影响[J]. 海南医学院学报, 2021, 27(6): 416-420.
- [13] SUN B, HUO R, SHENG Y, et al. Bone morphogenetic protein-4 mediates cardiac hypertrophy, apoptosis, and fibrosis in experimentally pathological cardiac hypertrophy[J]. Hypertension, 2013, 61(2): 352-360.
- [14] 李彬, 王新陆, 谢世阳, 等. 参附益心方对缺氧原代心肌细胞活性氧和能量代谢的影响[J]. 中国药房, 2019, 30(8): 1018-1024.
- [15] 曹童童, 陈会花, 章忱, 等. 益母草水苏碱经 Nox2/ROS/mTOR 途径降低心肌过度自噬[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(10): 1790.
- [16] 孙大伟, 高青, 齐新. 基于 MPTP 探讨丹参素对心衰大鼠左室重构影响的研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(5): 1103-1107.
- [17] 顾海. 山茱萸活性成分 5-羟甲基糠醛对 H₂O₂ 诱导损伤的大鼠海马神经元保护作用的研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [18] 吴军林, 吴清平, 张菊梅. L-苹果酸的生理功能研究进展[J]. 食品科学, 2008, 29(11): 692-695.
- [19] 于甜乐, 马晗, 吴新华, 等. miR-30a 抑制 Ang2 诱导的大鼠心肌细胞系 H9c2 自噬[J]. 基础医学与临床, 2021, 41(4): 490-494.
- [20] 姚欢杰, 王凯璇, 崔振田, 等. 血管紧张素 II 对慢性深部胸骨感染患者清创术中低血压的预警作用[J]. 河北医药, 2021, 43(20): 3096-3099.
- [21] 徐建虎, 张琦, 杨子庆, 等. 苓桂术甘汤合方对心衰大鼠脑钠肽、血管紧张素 II 的影响[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(6): 1284-1285.
- [22] 吴胜男, 张露, 樊红莲, 等. PI3K/Akt 通路在内啡肽-1 后处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用[J]. 南方医科大学学报, 2021, 41(6): 870-875.
- [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, 45(9): 2082-2090.
- [24] NEUBAUER S. The failing heart: an engine out of fuel [J]. N Engl J Med, 2007, 356(11): 1140-1151.
- [25] 何远利, 安祯祥, 杨蕊琳, 等. 心衰宁合剂对慢性心力衰竭大鼠心肌 AMPK 和 PPAR α 的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(3): 287-293.
- [26] ISSEMAN I, GREEN S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators[J]. Nature, 1990, 347(6294): 645-650.
- [27] 叶尔柏, 萧晓玲, 何子煜, 等. PPARs 信号通路参与肠道菌群和棕色脂肪组织的代谢调控肥胖[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(32): 5222-5226.
- [28] 韩燕红, 张瑞霞. PGC-1 α 的生理特性及其影响因素[J]. 医学信息, 2021, 34(2): 42-45.
- [29] 张健维, 徐坦, 徐明. PPARs 在不同类型心力衰竭中作用的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(8): 1509-1514.
- [30] 韦斌, 莫雪梅, 王强, 等. 中药冠通方对心梗后心功能不全大鼠心肌细胞 PGC-1 α 和 AMPK 蛋白的影响[J]. 广西中医药, 2020, 43(3): 69-72.
- [31] LEUCKER TM, BIENENGRAEBER M, MURAVYEVA M, et al. Endothelial-cardiomyocyte crosstalk enhances pharmacological cardioprotection [J]. Mol Cell Cardiol, 2011, 51(5): 803-811.
- [32] BROWN EL, FOLETTA VC, WRIGHT CR, et al. PGC-1 α and PGC-1 β increase protein synthesis via ERR α in C2C12 myotubes [J]. Front Physiol, 2018, 9: 1336. doi: 10.3389/fphys.2018.01336.
- [33] 刘诗瑶, 张艳, 孔繁达. 基于“心脑肾轴”理论探究补肾活血方对慢性心衰大鼠心肌线粒体能量代谢及 PGC-1 α 、NRF-1、mtTFA mRNA 表达影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(5): 22-26.
- [34] 李迎君, 庄晓曦, 彭丽洁, 等. 2, 7-二苯基-4H-吡啶并[1, 2-a]嘧啶-4-酮类雌激素相关受体 α (ERR α)转录功能抑制剂的合成及活性研究[J]. 中国科学: 化学, 2015, 45(9): 968-978.
- [35] 王懿, 张艳, 礼海. 益气活血方干预 PGC-1 α 调控心衰心肌细胞能量代谢重构的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(6): 169-173.
- [36] 祝善俊. 代谢重构与慢性心力衰竭[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2007, 9(6): 361-363.
- [37] 平会坤, 刘丽, 于彩敏, 等. 血清 PGC-1 α 、Irisin 水平对急性缺血性脑卒中患者出血转化的预测价值[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(13): 1575-1579.
- [38] 游嘉, 岳中宝, 陈少锐, 等. PGC-1 α 通过上调 SIRT3 表达发挥心肌保护作用[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2016, 37(3): 343-350.

Effects of Shenfu Yixin Granules (参附益心颗粒) on H9c2 Cardiomyocyte Injury and PGC-1 α Signaling Pathway Related Factors Induced by Ang II

LIU Qianru¹, WANG Xinlu², ZHU Mingjun², CUI Lin, LI Bin², WANG Yongxia², YU Rui²

1. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, 450000; 2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of Shenfu Yixin Granules (参附益心颗粒) in the treatment of

chronic heart failure (CHF). **Methods** The ionic components of *Shenfu Yixin Granules* were detected by ultra high performance liquid chromatography-quadruped-time-of-flight tandem mass spectrometry. H9c2 cardiomyocytes were divided into normal 1 group, model 1 group, *Shenfu Yixin Granules* low-dose group (SYL), *Shenfu Yixin Granules* high-dose group (SYH), losartan group, and coenzyme Q10 group. Angiotensin II (Ang II) was used to induce H9c2 cardiomyocytes injury model in all the groups except for the normal 1 group. Simultaneously, the cells in the SYL and SYH groups were cultured with the medium containing 0.25 mg/ml and 0.5 mg/ml of *Shenfu Yixin Granules*, respectively. The culture medium in the losartan group contained 1×10^{-4} mol/L of losartan tablets, and that in the coenzyme Q10 group used 1×10^{-4} mol/L of coenzyme Q10 tablets. Each group was cultured for 24 hours. The H9c2 cells were then divided into normal 2 group, model 2 group, transfection model group, transfection *Shenfu Yixin Granules* group (t-SY), and transfection control group. Except for the normal 2 group and the transfection control group, the other groups used Ang II to induce H9c2 myocardial cell injury model. Simultaneously, the transfection model group, the t-SY group, and the transfection control group were given lipofectmine 2000 transfection reagent for transfection. The cells in the t-SY group was continuously cultured with *Shenfu Yixin Granules* using the dose that had better results before transfection. After that, the cell activity was detected by CCK-8. Mito-tracker fluorescent probe was used to detect mitochondrial content in H9c2 cells. The lactate dehydrogenase (LDH) content, and mRNA expression of cardiomyocyte-related genes including peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α), peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (PPAR β/δ), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α (PGC-1 α), nuclear respiratory factor 1 (NRF-1), nuclear respiratory factor 2 (NRF-2) and estrogen-related receptor (ERR) were detected. **Results** There were a total of 387 positive ion substances in *Shenfu Yixin Granules*, and the most abundant ones were Stachydrine, 5-hydroxymethylfurfural and retronecine; 308 qualitative negative ion substances were obtained, and the abundant ones were Danshensu, malic acid, and 4-hydroxybenzoic acid. The dose used in t-SY group was 0.5 mg/ml. Before gene silencing, compared to the normal 1 group, the cell activity and the mRNA expression of each related gene decreased, while the LDH content increased ($P < 0.05$), and the mitochondrial content decreased in the model group 1. Compared to model 1 group, the cell activity increased and the LDH content decreased in the losartan group, the coenzyme Q10 group, SYH and SYL groups; the mRNA expression of PGC-1 α , NRF-1, NRF-2, ERR in the losartan group, that of PPAR α , PGC-1 α , NRF-1 in the coenzyme Q10 group, that of NRF-1, NRF-2 in the SYL group, and that of PPAR α , PGC-1 α , NRF-1, NRF-2 and ERR in the SYH group significantly increased ($P < 0.05$), and the mitochondrial content increased. Compared to SYL group, the cell activity increased while the LDH content decreased in the SYH group, the losartan group and the coenzyme Q10 group ($P < 0.05$), and the mitochondrial content increased; the mRNA expression of PGC-1 α and NRF-2 in the SYH group increased ($P < 0.05$). After gene silencing, compared to normal 2 group, the cardiomyocyte activity and the mRNA expression of each related gene decreased, while the LDH content increased ($P < 0.05$) in the model 2 group and the transfection model group, and the mitochondrial content decreased. Compared to the transfection model group, there were no significant differences in cardiomyocyte activity, LDH content, and mRNA expression of related genes in the t-SY group ($P > 0.05$), and the mitochondrial content was not significantly improved. Compared to the SYH group, the cardiomyocyte activity and the mRNA expressions of PPAR α , PPAR β/δ , PGC-1 α , NRF-1, NRF-2 and ERR were reduced, and the LDH content increased in the t-SY group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Shenfu Yixin Granules* may improve cardiomyocyte damage in treatment of CHF by regulating PGC-1 α signaling pathway related factors. And the active substances mainly include tanshinone, stachydrine, 5-hydroxymethylfurfural, and malic acid.

Keywords chronic heart failure; *Shenfu Yixin Granules* (参附益心颗粒); gene silencing; PGC-1 α ; lactate dehydrogenase; mitochondria

(收稿日期: 2021-07-30; 修回日期: 2021-12-30)

[编辑: 王利芬]