

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.04.014

健心颗粒对慢性心力衰竭气虚血瘀证模型大鼠心肌能量代谢及PPAR α /PGC-1 α 通路的影响

陈隽[✉], 黄飞翔, 王永, 周一薇, 陈美华, 叶盈

福建中医药大学附属第二人民医院, 福建省福州市五四路282号, 350000

[摘要] 目的 从心肌能量代谢角度探讨健心颗粒治疗慢性心力衰竭气虚血瘀证的可能作用机制。方法 60只SD大鼠随机分为造模组50只和空白组10只。造模组大鼠采用冠脉结扎配合力竭式游泳、饥饿法建立慢性心力衰竭气虚血瘀证模型。造模成功46只大鼠随机分为模型组10只, 缬沙坦组及健心颗粒低、中、高剂量组各9只。缬沙坦组给予7.2 mg/(kg·d) 缬沙坦灌胃, 健心颗粒低、中、高剂量组分别给予1.6、3.2、6.4 g/(kg·d) 剂量的健心颗粒灌胃, 模型组和空白组每天仅给予1 ml/100 g 无菌生理盐水灌胃。各组均每天灌胃2次, 共4周。HE和Masson染色观察大鼠心肌组织病理改变。检测大鼠心肌组织能量代谢指标 [包括糖原质量分数、脂肪酸(FA)及乳酸浓度、三磷酸腺苷(ATP)浓度]、左室射血分数(EF)、心肌组织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 γ 辅助活化因子-1 α (PGC-1 α)、300 KDA腺病毒E1A结合蛋白(P300)、中链酰基辅酶A脱氢酶(MCAD)、腺苷酸转运体(ANT)蛋白及mRNA表达。结果 HE和Masson染色结果显示, 模型组大鼠心肌细胞重度肥大、排列松散, 心肌纤维断裂, 成纤维细胞严重增生并伴有炎细胞浸润, 心肌纤维化严重, 胶原组织增生明显, 缬沙坦组和健心颗粒各剂量组心肌组织损伤和胶原组织增生均有不同程度改善。与空白组比较, 其余各组大鼠心肌组织FA和乳酸浓度升高, EF、糖原质量分数、ATP浓度和PPAR α 、PGC-1 α 、P300、MCAD、ANT mRNA及蛋白表达降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 缬沙坦组和健心颗粒各剂量组心肌组织FA和乳酸浓度降低, EF、糖原质量分数、ATP浓度和PPAR α 、PGC-1 α 、P300、MCAD、ANT mRNA及蛋白表达升高 ($P<0.05$); 且健心颗粒高剂量组各指标改善优于缬沙坦组和健心颗粒低、中剂量组 ($P<0.05$), 健心颗粒中剂量组各指标改善与缬沙坦组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 健心颗粒可显著改善慢性心力衰竭气虚血瘀证大鼠心肌能量代谢, 且以高剂量最佳, 推测其可能是通过调控PPAR α /PGC-1 α 通路而实现。

[关键词] 慢性心力衰竭; 气虚血瘀证; 心肌能量代谢; 过氧化物酶体增殖物激活受体 α ; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助活化因子-1 α ; 健心颗粒

慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF) 是由心血管疾病导致的一种复杂临床综合征, 是心血管疾病的终末期阶段^[1]。随着我国人口老龄化的加剧, CHF的发病率呈逐年升高趋势, 发病率高达0.9%^[2]。心肌能量代谢异常是CHF发生发展的主要机制之一, 贯穿着CHF的全过程, CHF发生时心脏的负荷持续增加, 心肌细胞线粒体能量供需失

衡^[3]。过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α) 是调节心肌能量代谢重构中的重要转录因子, 通过辅助过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助活化因子1 α (PGC-1 α) 调控心肌能量代谢相关酶的靶基因的转录, 增加线粒体脂肪酸 (FA) 酶活性, 增强FA氧化代谢, 促进三磷酸腺苷 (ATP) 的生成, 实现抑制CHF的作用^[4]。PGC-1 α 是一种转录调节辅激活因子, 能够调节线粒体自身合成及线粒体代谢过程相关酶的表达, 促进腺苷酸转运体 (ANT) 和ATP的合成以调节CHF^[5]。PPAR α /PGC-1 α 通路

基金项目: 福建省卫健委科技计划 (2020GGA068); 福建省自然科学基金 (2022J01835)

✉ 通讯作者: cchenjun1979@163.com

在 CHF 的发生发展过程中发挥关键作用^[6]。目前临床上治疗 CHF 主要以利尿剂、血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI)、 β 受体阻滞剂以及抗 CHF 药物等为主,但疗效不甚理想,且长期服用有较大的副作用^[7]。健心颗粒是根据林求诚研究员的经验方制成,具有益气温阳、活血利水的功效,前期研究显示其对早期 CHF 效果显著^[8-9]。本研究通过构建 CHF 气虚血瘀证大鼠模型,观察健心颗粒对 CHF 气虚血瘀证大鼠心肌能量代谢的影响,并从 PPAR α /PGC-1 α 通路角度探究其可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

3 月龄 SPF 级 SD 雄性大鼠 60 只,体质量 (232.26 $\pm$ 20.17) g,购自上海史莱克实验动物中心,实验动物合格证号:SCXK (沪) 2018-0005。动物饲养于 SPF 级饲养间,自由饮食进水,12 h 明暗交替光照,温度为 20~22 $^{\circ}\text{C}$,湿度为 50%~60%。

1.2 药物及试剂

健心颗粒组成:黄芪 333 g,丹参 167 g,红参 167 g,白术 167 g,葶苈子 167 g,猪苓 167 g,桂枝 100 g,蒲黄 100 g。以上药材加水浸泡 1 h 后煎煮 3 次,第 1 次煎煮 1.5 h,第 2、3 次各煎煮 1 h,3 次药液合并浓缩成浸膏,干燥,制成 1000 g 颗粒,分装为每袋 10 g^[10]。青霉素钠 (上海户实医药科技有限公司,批号 HS3026);缬沙坦 (湖南千金湘江药业股份有限公司,批号 190511);水合氯醛 (上海晶抗生物有限公司,批号 JKSJ840);糖原、FA、乳酸、ATP 试剂盒 (上海雅吉生物科技有限公司,批号 A043、A026、A040、A055);苏木素-伊红 (HE) 试剂盒 (美国 Biovision 公司,批号 P1527-50);Masson 试剂盒 (美国 GENMED 公司,批号 GMS80013.1);TRIzol 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司,批号 ML4410);放射免疫沉淀法 (RIPA) 裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司,批号 P0013B);兔抗人 PPAR α 、PGC-1 α 、300 KDA 腺病毒 E1A 结合蛋白 (P300)、中链酰基辅酶 A 脱氢酶 (MCAD)、ANT、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 单克隆抗体 (杭州宜百康生物科技股份有限公司,批号 190522、191104、190518、200122、200116、200414);山羊抗兔 PPAR α 、PGC-1 α 、P300、MCAD、ANT、GAPDH 多克隆抗体 (购自杭州宜百康生物科技股份有限公司,批号 200224、200113、201104、191230、191207、191203);化

学发光试剂 (美国 AMRESCO 公司,货号 N223-KIT)。

1.3 实验器材

VentElite 型小动物呼吸机 (美国 Harvard Apparatus 公司);MAC5500HD 型心电图机 (美国 GE 医疗公司);DW-T3 型心脏彩超机 [大为医疗 (江苏) 有限公司];Forma 88000 型超低温冰箱 (美国 Thermo Fisher 公司);Ntegra SNOM 型光学显微镜 (俄罗斯 NT-MDT 公司);CG-05 型聚合酶链反应 (PCR) 仪 (力康生物医疗科技控股有限公司);CMVC GT 型高速离心机 (德国 CMVC 公司);BFEP-300 型电泳仪 (杭州比格飞序生物科技有限公司);GelDoc Go 型凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 造模方法

采用随机数字表法从 60 只大鼠中选取 50 只组成造模组,剩余 10 只为空白组。造模组大鼠常规喂养 1 周后,参照文献^[11]方法腹腔注射 10% 水合氯醛 0.3 ml/100 g 麻醉,将麻醉后大鼠仰卧固定,连接小动物呼吸机。腹中部去毛,碘伏消毒,打开胸腔使心脏暴露,在左冠状动脉前降支起点下方 2~4 mm 处结扎直至周边心肌变白,将心脏重置于胸腔中并逐层缝合切口,大鼠呼吸平稳后断开小动物呼吸机。连接心电图机,心电图显示胸导联 ST-T 段升高即为结扎成功^[12]。术后注射青霉素钠 4 万单位/kg 防止感染,每天 1 次,共 3 天。术后常规喂养 1 周,从第 2 周起将饲料量减半至每天 5 g/100 g 体重使其饥饿,同时每天将大鼠放置于水温 (30 $\pm$ 3) $^{\circ}\text{C}$ 水箱中进行 1 次力竭式游泳,以大鼠头部连续下沉 3 次,且每次超过 5 s 后仍不能浮出水面为力竭标准^[13],持续 2 周。期间大鼠出现气虚血瘀证的症状:活动度降低,精神萎靡,毛色暗淡无光,呼吸急促,口唇及舌质发暗,经心脏彩超测定左室射血分数 (EF) $\leq$ 50% 则为 CHF 气虚血瘀证造模成功^[14]。

1.5 分组及给药

将造模成功的 46 只大鼠按照随机数字表分为模型组 10 只,缬沙坦组及健心颗粒低、中、高剂量组各 9 只。缬沙坦组给予 7.2 mg/(kg $\cdot$ d) 缬沙坦溶于 1 ml/100 g 大鼠体质量的无菌生理盐水中灌胃;健心颗粒低、中、高剂量组分别给予 1.6、3.2、6.4 g/(kg $\cdot$ d) 剂量的健心颗粒溶于 1 ml/100 g 大鼠体质量的无菌生理盐水中灌胃,健心颗粒低剂量为临床等效剂量^[15];模型组及空白组均每天仅给予 1 ml/100 g 无菌生理盐水灌胃。各组均每天 2 次,

共 4 周。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 心功能指标 EF 末次灌胃后禁食 12 h, 各组大鼠行心脏彩超检测其心功能指标 EF。

1.6.2 心肌组织病理形态 HE 染色: 大鼠断颈处死后, 解剖取出心脏, 左心室注射预冷过的生理盐水灌流洗涤, 剔除脂肪、血管等非心肌组织。用无菌纱布吸干多余水分, 取左心室部分置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存备用, 部分心肌组织以 4% 多聚甲醛固定 24 h, 石蜡包埋, 制成 2 mm 的组织切片。取组织切片加入二甲苯脱蜡, 苏木精染液染色 5 min, 流水冲洗至切片返蓝, 伊红染液染色 3 min, 流水洗去染液后梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封存, 光学显微镜下观察心肌组织病理改变。

Masson 染色: 取左心室心肌组织切片, 脱蜡至水, 依次经重铬酸钾、铁苏木素、丽春红、磷钼酸、苯胺蓝染色, 1% 乙酸溶液分化 3 min, 无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 光学显微镜观察心肌纤维化情况。

1.6.3 心肌组织能量代谢指标检测 各组大鼠取 100 mg 左心室心肌组织, 采用比色法分别测定大鼠心肌组织能量代谢指标, 包括糖原质量分数、FA 及乳酸浓度、ATP 浓度, 按照试剂盒操作步骤进行。

1.6.4 心肌组织 PPAR α 、PGC-1 α 、P300、MCAD、ANT mRNA 表达检测 各组大鼠取 50 mg 左心室心肌组织制成匀浆, 采用差速离心法分离出线粒体和细胞核, TRIzol 法分别提取其总核糖核酸 (RNA), 逆转录合成互补脱氧核糖核酸 (cDNA), 进行 PCR 扩增。引物均由金斯瑞生物科技股份有限公司设计合成, 其中 PPAR α 上游引物 5'-CTGATGTCAGTACGTAC-3', 下游引物 5'-TTGCGTAGTACGTACG-3', 产物长度 248 bp; PGC-1 α 上游引物 5'-TCGTCTAGTAGTGTACGTA-3', 下游引物 5'-CGTGTGTGTACGAATGACCT-3', 产物长度 290 bp; P300 上游引物 5'-TCAAGTACGTAGTACGATAC-3', 下游引物 5'-CCTGATAGTAACGTAC-3', 产物长度 185 bp; MCAD 上游引物 5'-TTAGGACCGATAGC-3', 下游引物 5'-CTTGATCATCGAAGCA-3', 产物长度 206 bp; ANT 上游引物 5'-CTGTATGTATTAGCGCGC-3', 下游引物 5'-CCTGTGTGTAAAGTAAGT-3', 产物长度 262 bp; GAPDH 上游引物 5'-TAGTAGTCGTAAGCGCCT-3', 下游引物 5'-TTGTAGCACGCACGAGTG-3', 产物长度 255 bp。反应参数: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$

30 s, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 45 个循环。以 GAPDH 为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各基因的表达, 其中 $\Delta\text{Ct}=\text{Ct}$ 平均值 (目的基因) - Ct 平均值 (内参基因), $\Delta\Delta\text{Ct}=\Delta\text{Ct}$ (实验组) - ΔCt (空白组)。

1.6.5 心肌组织 PPAR α 、PGC-1 α 、P300、MCAD、ANT 蛋白表达检测 各组大鼠取 100 mg 左心室心肌组织制成匀浆, 采用差速离心法分离出线粒体和细胞核, 用 RIPA 裂解液分别对其冰浴裂解 40 min, 12 000 r/min (离心半径 6 cm) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 25 min, 收集上清液并加入与上清液等体积的含十二烷基硫酸 (SDS) 的 2 倍上样缓冲液, 煮沸 5 min。将样品以 20 μl /孔加样在 8% 的 SDS 聚丙烯凝胶中, 80~130 V 恒压电泳分离, 转移至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上。在 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h, 加入稀释比 1:1000 的一抗, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜。TBST 缓冲液冲洗 3 次, 加入稀释比为 1:1000 的二抗, 室温下孵育 1 h, TBST 缓冲液冲洗 3 次, 化学发光试剂显色, Image Lab 凝胶成像系统成像, Image J v1.8.0 图像分析软件进行分析处理, 计算各目标蛋白与 GAPDH 条带灰度值的比值即为其相对表达量。

1.7 统计学方法

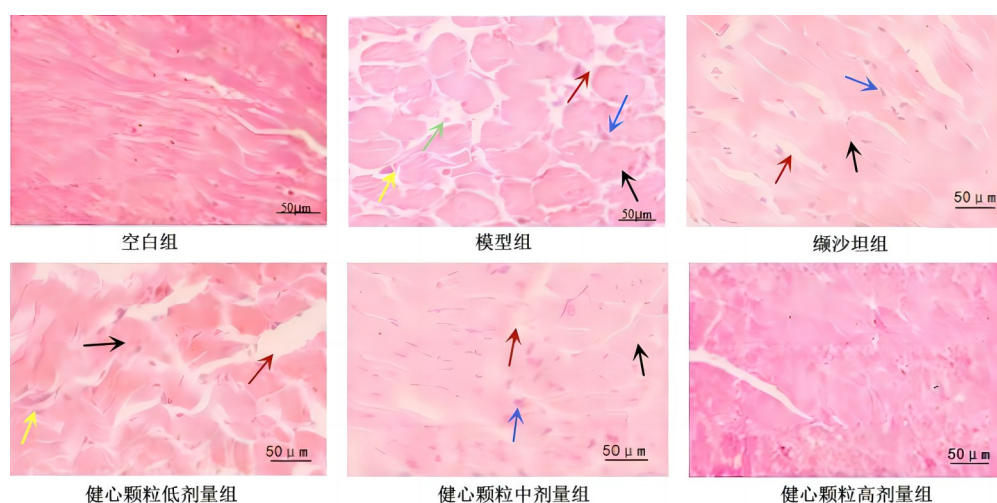
采用 SPSS 26.0 软件进行统计学检验, 计量资料均符合正态分布且方差齐, 采用 $(\bar{x}\pm s)$ 描述, 多样本比较采用单因素方差分析, 两两样本比较采用 SNK- q 检验, 两样本间比较采用独立样本 t 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

模型组大鼠在干预过程中因心力衰竭死亡 1 只, 故最终分组结果为模型组和健心颗粒低、中、高剂量组为 9 只, 空白组 10 只。

2.1 各组大鼠心肌组织病理结果

HE 染色: 空白组大鼠心肌纤维排列整齐, 细胞核在心肌纤维中部, 着色浅, 细胞形态正常; 模型组可见心肌细胞重度肥大、排列松散, 细胞核深染, 出现心肌纤维断裂现象, 间质内成纤维细胞增生严重并伴有炎细胞浸润; 健心颗粒低剂量组心肌纤维排列疏松, 细胞核边缘化, 心肌细胞明显肥大变形, 成纤维细胞重度增生伴随炎细胞浸润; 缬沙坦组和健心颗粒中剂量组心肌细胞肥大, 有少量炎性细胞, 心肌纤维排列较松散, 细胞核着色较深, 成纤维细胞轻度增生; 健心颗粒高剂量组新生血管增多, 细胞形态基本正常、几乎无炎细胞浸润和成纤维细胞增生等, 见图 1。



注：黑色箭头指示心肌细胞肥大；红色箭头指示心肌细胞排列松散；绿色箭头指示心肌纤维断裂；黄色箭头指示成纤维细胞增生；蓝色箭头指示细胞核着色深。

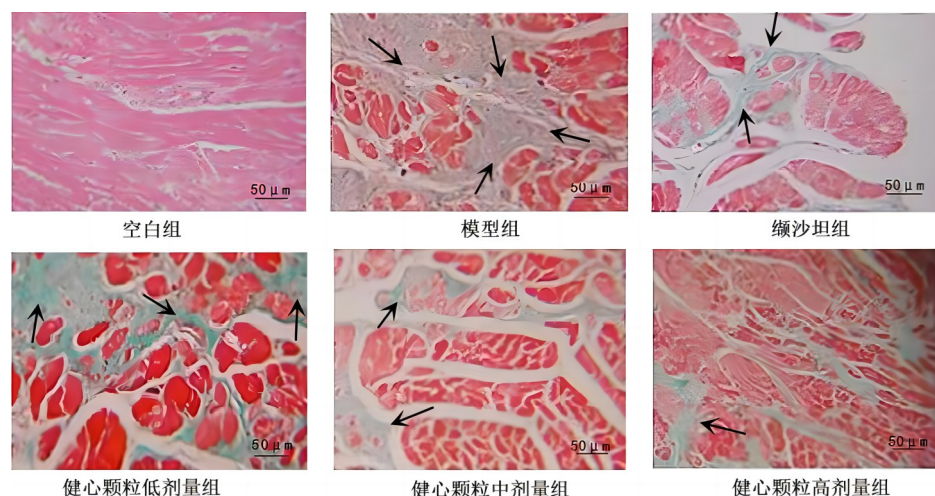
图1 各组大鼠心肌组织病理形态 (HE 染色, ×200)

Masson 染色：空白组心肌细胞着色均匀，无明显胶原组织增生；模型组有较严重的心肌纤维化，胶原纤维明显增粗、增多；健心颗粒低剂量组心肌纤维化明显，胶原组织增生明显；缬沙坦组和健心颗粒中剂量组心肌重度纤维化，有胶原组织增生；健心颗粒高剂量组有少量胶原纤维，心肌轻度纤维化，见图2。

2.2 各组大鼠心功能指标EF及心肌组织能量代谢指标比较

表1示，与空白组比较，模型组、缬沙坦组和健心颗粒各剂量组心肌组织FA和乳酸浓度升高，EF、糖原质量分数和ATP浓度降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较，缬沙坦组和健心颗粒各剂量组心肌

组织FA和乳酸浓度降低，EF、糖原质量分数和ATP浓度升高。与缬沙坦组比较，健心颗粒低剂量组心肌组织FA和乳酸浓度升高，EF、糖原质量分数和ATP浓度降低，健心颗粒高剂量组心肌组织FA和乳酸浓度降低，EF、糖原质量分数和ATP浓度升高 ($P < 0.05$)，健心颗粒中剂量组心肌组织EF、糖原质量分数、FA、乳酸及ATP浓度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与健心颗粒低剂量组比较，健心颗粒中、高剂量组心肌组织FA和乳酸浓度降低，EF、糖原质量分数和ATP浓度升高 ($P < 0.05$)。与健心颗粒中剂量组比较，健心颗粒高剂量组心肌组织FA和乳酸浓度降低，EF、糖原质量分数和ATP浓度升高 ($P < 0.05$)。



注：箭头指示心肌纤维化。

图2 各组大鼠心肌组织病理形态 (Masson 染色, ×200)

表 1 各组大鼠 EF 及心肌组织能量代谢指标表达比较 (x̄±s)

组别	鼠数	EF/%	糖原质量分数/mg·g ⁻¹	FA/mmol·L ⁻¹	乳酸/mmol·g ⁻¹	ATP/U·mg ⁻¹
空白组	10	73.68±6.24	4.15±0.70	0.58±0.11	118.03±21.67	4.16±0.77
模型组	9	41.54±4.80 ^{a)}	1.98±0.35 ^{a)}	1.34±0.26 ^{a)}	313.51±52.83 ^{a)}	1.03±0.18 ^{a)}
缬沙坦组	9	55.23±5.26 ^{a) b)}	2.84±0.51 ^{a) b)}	0.89±0.16 ^{a) b)}	202.24±30.35 ^{a) b)}	2.55±0.43 ^{a) b)}
健心颗粒低剂量组	9	48.49±4.77 ^{a) b) c)}	2.37±0.42 ^{a) b) c)}	1.07±0.18 ^{a) b) c)}	259.55±41.17 ^{a) b) c)}	1.88±0.31 ^{a) b) c)}
健心颗粒中剂量组	9	57.91±5.08 ^{a) b) d)}	2.88±0.53 ^{a) b) d)}	0.85±0.15 ^{a) b) d)}	208.27±32.44 ^{a) b) d)}	2.52±0.42 ^{a) b) d)}
健心颗粒高剂量组	9	65.44±5.17 ^{a) b) c) d) e)}	3.47±0.61 ^{a) b) c) d) e)}	0.71±0.13 ^{a) b) c) d) e)}	171.91±26.26 ^{a) b) c) d) e)}	3.17±0.54 ^{a) b) c) d) e)}

注：EF，左室射血分数；FA，脂肪酸；ATP，三磷酸腺苷。
a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与缬沙坦组比较， $P<0.05$ ；d) 与健心颗粒低剂量组比较， $P<0.05$ ；e) 与健心颗粒中剂量组比较， $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠心肌组织 PPARα、PGC-1α、P300、MCAD、ANT mRNA 表达比较

表 2 示，与空白组比较，模型组、缬沙坦组和健心颗粒各剂量组心肌组织 PPARα、PGC-1α、P300、MCAD、ANT mRNA 表达降低 ($P<0.05$)。与模型组比较，缬沙坦组和健心颗粒各剂量组心肌组织 PPARα、PGC-1α、P300、MCAD、ANT mRNA 表达升高 ($P<0.05$)。与缬沙坦组比较，健心颗粒低剂量组心肌组织 PPARα、PGC-1α、P300、MCAD、ANT mRNA 表达降低，健心颗粒高剂量组心肌组织 PPARα、PGC-1α、P300、MCAD、ANT mRNA 表达升高 ($P<0.05$)，健心颗粒中剂量组心

肌组织 PPARα、PGC-1α、P300、MCAD、ANT mRNA 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与健心颗粒低剂量组比较，健心颗粒中、高剂量组心肌组织 PPARα、PGC-1α、P300、MCAD、ANT mRNA 表达升高 ($P<0.05$)。与健心颗粒中剂量组比较，健心颗粒高剂量组心肌组织 PPARα、PGC-1α、P300、MCAD、ANT mRNA 表达升高 ($P<0.05$)。

2.4 各组大鼠心肌组织 PPARα、PGC-1α、P300、MCAD、ANT 蛋白表达比较

表 3 示，与空白组比较，模型组、缬沙坦组和健心颗粒低、中、高剂量组心肌组织 PPARα、PGC-1α、P300、MCAD、ANT 蛋白表达降低 ($P<$

表 2 各组大鼠心肌组织 PPARα、PGC-1α、P300、MCAD、ANT mRNA 表达比较 (2^{-ΔΔCt}, x̄±s)

组别	鼠数	PPARα	PGC-1α	P300	MCAD	ANT
空白组	10	0.96±0.15	1.03±0.18	1.05±0.18	0.92±0.18	0.98±0.16
模型组	9	0.25±0.04 ^{a)}	0.41±0.07 ^{a)}	0.34±0.06 ^{a)}	0.31±0.06 ^{a)}	0.37±0.06 ^{a)}
缬沙坦组	9	0.64±0.11 ^{a) b)}	0.64±0.11 ^{a) b)}	0.61±0.11 ^{a) b)}	0.55±0.10 ^{a) b)}	0.57±0.10 ^{a) b)}
健心颗粒低剂量组	9	0.44±0.08 ^{a) b) c)}	0.52±0.10 ^{a) b) c)}	0.47±0.09 ^{a) b) c)}	0.40±0.07 ^{a) b) c)}	0.45±0.08 ^{a) b) c)}
健心颗粒中剂量组	9	0.66±0.12 ^{a) b) d)}	0.66±0.12 ^{a) b) d)}	0.64±0.12 ^{a) b) d)}	0.52±0.09 ^{a) b) d)}	0.60±0.11 ^{a) b) d)}
健心颗粒高剂量组	9	0.79±0.13 ^{a) b) c) d) e)}	0.80±0.15 ^{a) b) c) d) e)}	0.83±0.15 ^{a) b) c) d) e)}	0.71±0.14 ^{a) b) c) d) e)}	0.74±0.13 ^{a) b) c) d) e)}

注：PPARα，过氧化物酶体增殖物激活受体α；PGC-1α，过氧化物酶体增殖物激活受体γ辅助活化因子1α；P300，E1A 结合蛋白p300；MCAD，中链酰基辅酶A脱氢酶；ANT，腺苷酸转运体。

a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与缬沙坦组比较， $P<0.05$ ；d) 与健心颗粒低剂量组比较， $P<0.05$ ；e) 与健心颗粒中剂量组比较， $P<0.05$ 。

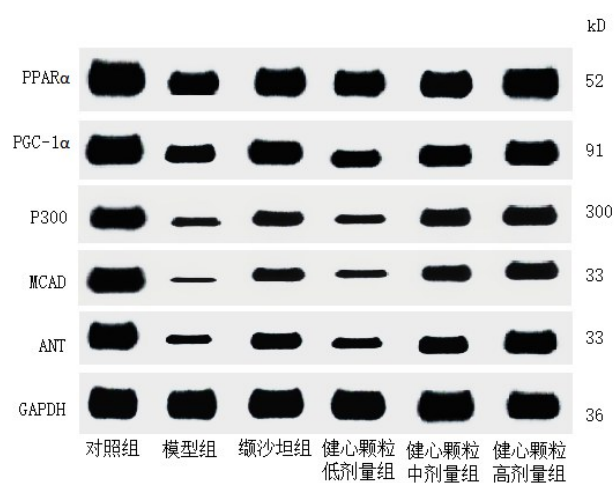
表 3 各组大鼠心肌组织 PPARα、PGC-1α、P300、MCAD、ANT 蛋白表达比较 (/GAPDH, x̄±s)

组别	鼠数	PPARα	PGC-1α	P300	MCAD	ANT
空白组	10	1.37±0.21	1.02±0.18	0.65±0.12	0.75±0.14	0.95±0.17
模型组	9	0.61±0.11 ^{a)}	0.42±0.07 ^{a)}	0.23±0.04 ^{a)}	0.18±0.03 ^{a)}	0.26±0.04 ^{a)}
缬沙坦组	9	0.91±0.15 ^{a) b)}	0.70±0.13 ^{a) b)}	0.38±0.07 ^{a) b)}	0.34±0.06 ^{a) b)}	0.46±0.08 ^{a) b)}
健心颗粒低剂量组	9	0.76±0.14 ^{a) b) c)}	0.54±0.10 ^{a) b) c)}	0.29±0.05 ^{a) b) c)}	0.25±0.04 ^{a) b) c)}	0.33±0.06 ^{a) b) c)}
健心颗粒中剂量组	9	0.93±0.16 ^{a) b) d)}	0.68±0.12 ^{a) b) d)}	0.40±0.07 ^{a) b) d)}	0.36±0.07 ^{a) b) d)}	0.52±0.09 ^{a) b) d)}
健心颗粒高剂量组	9	1.14±0.19 ^{a) b) c) d) e)}	0.85±0.15 ^{a) b) c) d) e)}	0.51±0.09 ^{a) b) c) d) e)}	0.53±0.09 ^{a) b) c) d) e)}	0.77±0.14 ^{a) b) c) d) e)}

注：PPARα，过氧化物酶体增殖物激活受体α；PGC-1α，过氧化物酶体增殖物激活受体γ辅助活化因子1α；P300，E1A 结合蛋白p300；MCAD，中链酰基辅酶A脱氢酶；ANT，腺苷酸转运体。

a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与缬沙坦组比较， $P<0.05$ ；d) 与健心颗粒低剂量组比较， $P<0.05$ ；e) 与健心颗粒中剂量组比较， $P<0.05$ 。

0.05)。与模型组比较, 缬沙坦组和健心颗粒低、中、高剂量组心肌组织 PPAR α 、PGC-1 α 、P300、MCAD、ANT 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。与缬沙坦组比较, 健心颗粒低剂量组心肌组织 PPAR α 、PGC-1 α 、P300、MCAD、ANT 蛋白表达降低, 健心颗粒高剂量组心肌组织 PPAR α 、PGC-1 α 、P300、MCAD、ANT 蛋白表达升高 ($P<0.05$), 健心颗粒中剂量组心肌组织 PPAR α 、PGC-1 α 、P300、MCAD、ANT 蛋白表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与健心颗粒低剂量组比较, 健心颗粒中、高剂量组心肌组织 PPAR α 、PGC-1 α 、P300、MCAD、ANT 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。与健心颗粒中剂量组比较, 健心颗粒高剂量组心肌组织 PPAR α 、PGC-1 α 、P300、MCAD、ANT 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。各组大鼠心肌组织 PPAR α 、PGC-1 α 、P300、MCAD、ANT 蛋白电泳图见图 3。



注: PPAR α , 过氧化物酶体增殖物激活受体 α ; PGC-1 α , 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助活化因子1 α ; P300, E1A 结合蛋白 p300; MCAD, 中链酰基辅酶 A 脱氢酶; ANT, 腺苷酸转运体。

图3 各组大鼠心肌组织 PPAR α 、PGC-1 α 、P300、MCAD、ANT 蛋白电泳图

3 讨论

中医学认为, CHF 的病机为心气虚引发心阳虚, 进而血瘀痰阻, 水湿内停, 故对于 CHF 气虚血瘀证以益气活血、化痰利水为治疗法则^[16]。健心颗粒中黄芪益气补虚, 红参复脉固脱, 同为君药; 蒲黄、丹参为臣药, 以助君药祛瘀活血, 通利血脉; 桂枝温阳通经, 白术健脾补气、燥湿利水, 葶苈子泻肺利水, 同为佐药; 猪苓利水渗湿、调和诸药为使药, 诸药共奏活血益气、温阳利水之功效。前期研究显示, 健心颗粒可有效提升心力衰竭大鼠模型心肌代谢能力, 改善心肌重构^[17]。

心脏功能正常情况下, FA 是心肌能量代谢的主要供能物质, 可产生机体所需约 60%~70% 的 ATP, 其余约 30% 则是由糖代谢提供^[18]。当 CHF 发生后, 心肌能量代谢异常, 对 FA 的利用减少、糖酵解增加, 心肌组织糖原含量和 ATP 浓度降低, 导致 FA 和糖酵解产物乳酸的堆积, 进而加剧细胞损伤程度影响心肌功能^[19]。EF 是反映心脏功能的重要指标之一^[20]。本研究中, 与空白组比较, 模型组大鼠心肌组织 FA 和乳酸浓度升高, EF、糖原质量分数和 ATP 浓度降低, 心肌细胞重度肥大、排列松散, 心肌纤维断裂, 成纤维细胞增生严重并伴有炎细胞浸润, 心肌纤维化严重, 胶原组织增生明显, 表明 CHF 气虚血瘀证病程中存在明显的心肌细胞能量代谢异常, 进而引起心肌细胞严重损伤、心肌组织纤维化以及心功能衰退。经缬沙坦和不同浓度健心颗粒干预治疗后, 大鼠心肌组织 FA 和乳酸浓度降低, EF、糖原质量分数和 ATP 浓度升高, 心肌组织损伤得到了不同程度的改善, 其中健心颗粒的作用呈剂量依赖性, 以高剂量效果最佳, 且健心颗粒中剂量组作用效果与缬沙坦组无明显差别, 健心颗粒高剂量组作用效果优于缬沙坦组。以上结果说明健心颗粒通过降低 CHF 气虚血瘀证大鼠心肌组织 FA 和糖酵解产物乳酸的堆积, 提高心功能指标 EF、心肌组织糖原含量和 ATP 浓度, 改善心肌细胞能量代谢, 发挥保护心肌组织、改善心功能的作用。

PPAR α 在心肌能量代谢的调节中起重要作用, 激活后可诱导 FA 转运蛋白的合成, 从而促进 FA 进入细胞, 增加其氧化代谢, 并减少糖酵解^[21]。MCAD 是调节机体 FA 合成和氧化代谢的关键酶^[22]。PGC-1 α 可以通过与 PPAR α 结合, 增加转录产物 P300 和下游效应因子 MCAD 的表达进一步增加 FA 氧化代谢, 促进线粒体自身的生物合成及线粒体能量代谢^[23]。ANT 是位于线粒体内膜上特异性的腺苷酸转载体, 是 ATP/二磷酸腺苷 (ADP) 转运的关键酶, 在细胞能量代谢中起关键作用^[24]。研究显示, 下调 PPAR α /PGC-1 α 的表达能够抑制其下游基因的 ANT 的表达, 明显降低 ANT 的转运活性, 从而导致心肌细胞出现能量代谢障碍, 最终引发 CHF^[25]。本研究中, 与空白组比较, 模型组大鼠心肌组织 PPAR α 、PGC-1 α 、P300、MCAD、ANT mRNA 和蛋白表达降低, 表明 CHF 可诱导心肌组织中心肌能量代谢相关基因的表达异常。经缬沙坦和不同剂量健心颗粒干预治疗后, 大鼠心肌组

织 PPAR α 、PGC-1 α 、P300、MCAD、ANT mRNA 和蛋白表达升高,其中健心颗粒的作用效果呈剂量依赖性,以高剂量效果最佳,且健心颗粒中剂量组作用效果与缬沙坦组无明显差别,健心颗粒高剂量组作用效果优于缬沙坦组,提示健心颗粒可能是通过提高 CHF 气虚血瘀证大鼠心肌组织中心肌能量代谢相关基因 PPAR α 、PGC-1 α 表达,激活 PPAR α /PGC-1 α 通路,促进 P300 和下游调节机体 FA 合成的关键酶 MCAD 的表达,诱导 FA 转运蛋白合成和 FA 氧化代谢,增加 CHF 气虚血瘀证大鼠 ANT 转运活性,提高线粒体能量代谢,进而发挥保护心肌组织、改善心功能的作用。

综上所述,健心颗粒对慢性心力衰竭气虚血瘀证大鼠心肌组织有显著保护作用,推测可能是通过调控 PPAR α /PGC-1 α 通路抑制 PPAR α 、PGC-1 α 、P300、MCAD、ANT 的表达,改善心肌能量代谢实现的。本研究初步探讨了健心颗粒对慢性心力衰竭气虚血瘀证大鼠心肌能量代谢的作用及机制,为临床治疗提供了实验依据,但受实验条件限制,本研究未能添加信号通路抑制剂进行通路验证,以对健心颗粒的具体作用机制进行深入探讨,后期将进行深入阐述。

参考文献

- [1] MCDONAGH TA, METRA M, ADAMO M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure [J]. Eur Heart J, 2021, 42 (36):3599-3726.
- [2] 徐佳慧, 胡世莲. 慢性心力衰竭的流行病学与预防措施[J]. 中国临床保健杂志, 2021, 24(6):721-725.
- [3] KIMBALL TH, VONDRISKA TM. Metabolism, epigenetics, and causal inference in heart failure [J]. Trends Endocrinol Metab, 2020, 31(3):181-191.
- [4] 王理亚, 单艳华, 刘永萍, 等. PPAR- α 的激活对心力衰竭早期心肌功能的机制研究[J]. 安徽医药, 2022, 26(4):754-759, 850.
- [5] TIAN L, CAO W, YUE R, et al. Pretreatment with Tiliarin improves mitochondrial energy metabolism and oxidative stress in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury via AMPK/SIRT1/PGC-1 α signaling pathway [J]. J Pharmacol Sci, 2019, 139(4):352-360.
- [6] 王巍, 罗玉寅, 廖骏. 活血通脉方对慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化和心肌细胞能量代谢的影响研究[J]. 新中医, 2020, 52(22):1-5.
- [7] ANCION A, NGUYEN TRUNG ML, TRIDETTI J, et al. Therapeutic revolution in heart failure [J]. Rev Med Liege, 2020, 75(5/6):304-309.
- [8] 黄飞翔, 许杨, 叶盈, 等. 健心颗粒干预左室射血分数正常的心衰临床研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(10):1155-1157.
- [9] 柏义泊, 陈成, 张旺生, 等. 健心颗粒治疗老年气虚血瘀型慢性心力衰竭临床观察[J]. 山西中医, 2021, 37 (10):14-16.
- [10] 林清, 郭佳和, 徐航晨, 等. 健心颗粒对慢性心力衰竭病人血浆可溶性 ST2 水平的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(12):1835-1837.
- [11] 张艳, 方素清, 姜凯, 等. 慢性心衰气虚血瘀证大鼠模型的研究初探[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13 (8):14-15.
- [12] 温剑艺, 谭宁, 杨大浩. 大鼠心肌缺血-再灌注模型的心电图变化[J]. 岭南心血管病杂志, 2011, 17(6): 503-506.
- [13] XU P, WANG Y, SUN W, et al. Salidroside protects the cardiac function of exhausted rats by inducing Nrf2 expression [J]. Cardiovasc J Afr, 2020, 31(1):25-32.
- [14] 赵倩倩. 改良冠脉结扎术制备大鼠慢性心衰模型[J]. 生物化工, 2019, 5(4):51-53.
- [15] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002: 911.
- [16] 来晓磊, 尚菊菊, 刘红旭, 等. 泻肺利水合剂联合西医常规方法治疗慢性缺血性心力衰竭气虚血瘀证疗效的真实世界、多中心、队列研究[J]. 中医杂志, 2022, 63(6):544-550.
- [17] 苏天生, 肖章武, 卢静, 等. 健心颗粒对心力衰竭大鼠模型心肌代谢重构的作用[J]. 中国医药科学, 2022, 12(13):36-39, 81.
- [18] LOPASCHUK GD, KARWI QG, TIAN R, et al. Cardiac energy metabolism in heart failure [J]. Circ Res, 2021, 128(10):1487-1513.
- [19] BADOLIA R, RAMADURAI DKA, ABEL ED, et al. The role of nonglycolytic glucose metabolism in myocardial recovery upon mechanical unloading and circulatory support in chronic heart failure [J]. Circulation, 2020, 142(3):259-274.
- [20] GENTILE F, SCIARRONE P, ZAMORA E, et al. Body mass index and outcomes in ischaemic versus non-ischaemic heart failure across the spectrum of ejection fraction [J]. Eur J Prev Cardiol, 2021, 28(9):948-955.
- [21] JAO TM, NANGAKU M, WU CH, et al. ATF6 α down-regulation of PPAR α promotes lipotoxicity-induced tubulointerstitial fibrosis [J]. Kidney Int, 2019, 95 (3) : 577-589.
- [22] PUCA F, YU F, BARTOLACCI C, et al. Medium-chain

acyl-CoA dehydrogenase protects mitochondria from lipid peroxidation in glioblastoma [J]. *cancer discov*, 2021, 11(11):2904-2923.

- [23] BHAT S, CHIN A, SHIRAKABE A, et al. Recruitment of RNA polymerase ii to metabolic gene promoters is inhibited in the failing heart possibly through pgc-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α) dysregulation [J]. *Circ Heart Fail*, 2019, 12 (3) : e005529.

- [24] KREITER J, RUPPRECHT A, ŠKULJ S, et al. ANT1 activation and inhibition patterns support the fatty acid cycling mechanism for proton transport [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5):2490.

- [25] YANG Y, ZHANG H, LI X, et al. Effects of PPAR α /PGC-1 α on the myocardial energy metabolism during heart failure in the doxorubicin induced dilated cardiomyopathy in mice [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(9) : 2435-2442.

Effect of *Jianxin Granules* (健心颗粒) on Myocardial Energy Metabolism and PPAR α /PGC-1 α Pathway in Model Rats of Chronic Heart Failure with *Qi* Deficiency and Blood Stasis Syndrome

CHEN Juan, HUANG Feixiang, WANG Yong, ZHOU Yiwei, CHEN Meihua, YE Ying

The Second People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350000

ABSTRACT Objective To investigate the potential mechanism of *Jianxin Granules* (健心颗粒) in the treatment of chronic heart failure (CHF) with *qi* deficiency and blood stasis syndrome from the perspective of myocardial energy metabolism. **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into modeling group (n=50) and blank group (n=10). The former established the rat model of CHF with *qi* deficiency and blood stasis syndrome by coronary artery ligation combined with exhaustive swimming and starvation. Forty-six rats were successfully modeled and were divided into model group (n=10), valsartan group (n=9) and *Jianxin Granules* low-, medium- and high-dose groups (n=9 each) according to the random number table. Valsartan group was given 7.2 mg/(kg·d) of valsartan by gavage, while the low-, medium- and high-dose groups of *Jianxin Granules* were given 1.6, 3.2 and 6.4g/(kg·d) of *Jianxin Granules* by gavage, respectively. The model group and the blank group were given 1 ml/100 g of sterile normal saline by gavage. The above interventions were administered twice a day for 4 weeks. Hematoxylin eosin (HE) and Masson staining were used to observe the pathological changes of rat myocardial tissue. The indexes of energy metabolism in rat myocardial tissues including glycogen mass fraction, concentration of fatty acid (FA) and lactic acid, and adenosine triphosphate (ATP) concentration were measured. Left ventricular ejection fraction (EF), peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α), peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α), 300kda adenovirus E1A binding protein (P300), medium chain acyl CoA dehydrogenase (MCAD) and adenylate transporter (ANT) proteins and mRNA expressions were detected. **Results** HE and Masson staining showed that in the model group, cardiomyocytes were severely hypertrophic and loosely arranged, with broken myocardial fibers, seriously proliferated fibroblasts accompanied by inflammatory cell infiltration, as well as serious myocardial fibrosis and obvious collagen tissue hyperplasia. The myocardial tissues injury and collagen tissue hyperplasia in valsartan group and all three *Jianxin Granules* groups were improved in varying degrees. Compared to those in the blank group, the concentration of FA and lactic acid in myocardial tissues increased, and EF, glycogen mass fraction, ATP concentration, and the mRNA and protein expressions of PPAR α , PGC-1 α , P300, MCAD and ANT decreased in the model group, valsartan group and three *Jianxin Granules* groups ($P < 0.05$). Compared to those in the model group, the concentration of FA and lactic acid in myocardial tissues decreased, and EF, mass fraction of glycogen, ATP concentration and the mRNA and protein expressions of PPAR α , PGC-1 α , P300, MCAD and ANT in the valsartan group and *Jianxin Granules* groups increased ($P < 0.05$). More changes were found in the high-dose *Jianxin Granules* group than the low- and medium-dose groups ($P < 0.05$). The differences were not statistically significant in the mentioned indexes between the medium-dose *Jianxin Granules* group and the valsartan group ($P > 0.05$). **Conclusion** *Jianxin Granules* can improve myocardial energy metabolism in CHF rats with *qi* deficiency and blood stasis syndrome, presumably by regulating PPAR α /PGC-1 α pathway. And the high-dose *Jianxin Granules* shows best effect.

Keywords chronic heart failure; *qi* deficiency and blood stasis syndrome; myocardial energy metabolism; peroxisome proliferator-activated receptor α ; peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α ; *Jianxin Granules* (健心颗粒)

(收稿日期: 2022-04-18; 修回日期: 2022-11-10)

[编辑: 王利芬]