

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.07.013

强心汤对慢性心力衰竭模型大鼠梗死心肌区组织活性氧及PINK1/parkin介导的线粒体自噬的影响

庞延¹, 卢健棋[✉], 唐梅玲¹, 黄溥玮¹, 蔡宗余², 石炜琦², 刘水花², 张诗雨², 黄敏²

1. 广西中医药大学第一附属医院, 广西壮族自治区南宁市东葛路89-9号, 530001; 2. 广西中医药大学

[摘要] **目的** 探讨强心汤治疗慢性心力衰竭的可能作用机制。**方法** 40只SPF级SD大鼠随机分为假手术组、模型组、强心汤组、卡托普利组、卡托普利+强心汤组, 每组8只。除假手术组外其余各组大鼠均采用结扎左冠状动脉前降支方法建立慢性心力衰竭模型。造模成功后第2天开始, 强心汤组大鼠给予12.25 g/(kg·d)强心汤混悬液灌胃; 卡托普利组大鼠给予10.38 mg/(kg·d)卡托普利片混悬液灌胃; 卡托普利+强心汤组给予强心汤和卡托普利片混悬液灌胃, 剂量同上; 假手术组和模型组大鼠给予2 ml生理盐水灌胃。各组大鼠均每天灌胃2次, 连续28天。采用心脏彩超检测各组大鼠心功能指标 [包括左室舒张末期内径(LVEDd)、左室收缩末期内径(LVEDs)、左室射血分数(LVEF)]; 荧光探针染色检测梗死心肌区组织活性氧(ROS)水平; HE染色观察梗死心肌区组织病理学变化; 分别采用RT-PCR和蛋白免疫印迹法检测大鼠梗死心肌区组织PTEN诱导激酶1(PINK1)、E3泛素连接酶(parkin)、微管相关蛋白1轻链3(LC3)mRNA表达及PINK1、parkin、微管相关蛋白1轻链3 I(LC3 I)、微管相关蛋白1轻链3 II(LC3 II)蛋白表达。**结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠LVEDd、LVEDs升高, LVEF下降, 梗死心肌区组织ROS、LC3 mRNA及LC3 I/LC3 II值升高, PINK1、parkin mRNA及蛋白表达下降($P<0.05$), 且心肌组织中大量弥漫性出血, 出血灶周围心肌细胞核形态发生变化, 部分细胞核发生核碎裂、核溶解, 大量炎性细胞浸润。与模型组比较, 各药物干预组大鼠上述指标均明显改善($P<0.05$); 与强心汤组、卡托普利组比较, 卡托普利+强心汤组上述指标改善程度更佳($P<0.05$); 强心汤组与卡托普利组各指标比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 强心汤可能通过上调PINK1、parkin表达促进线粒体自噬而减少ROS和心肌细胞凋亡从而发挥改善心功能的作用, 同时强心汤与卡托普利片联合使用可发挥协同作用。

[关键词] 慢性心力衰竭; 强心汤; 线粒体自噬; 活性氧; PTEN诱导激酶1; E3泛素连接酶; 卡托普利

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是心血管疾病的终末阶段, 是一种高发病率、高病死率的严重疾病。2021年统计数据显示, 我国心血管疾病患者约为3.3亿, 其中心力衰竭患者约为890万^[1]。虽然CHF的治疗目前已取得重大进展, 但五年死亡率仍高达50%^[2]。在正常生理情况下, 线粒体通过呼吸链氧化磷酸化合成三磷酸腺苷(ATP)用于支持心肌的收缩和舒张功能, 同时产生少量活性氧(ROS)以维持适当的氧化还原平衡。研

究^[3-4]发现, 心肌缺血缺氧时可导致线粒体受损产生大量ROS, 并促进心肌细胞氧化损伤和凋亡以及ATP供应障碍进而诱发CHF, 而线粒体自噬能够选择性清除受损线粒体, 减少ROS对细胞的毒性反应从而减缓CHF的发展。另有研究^[5]证实, PTEN诱导激酶1(PINK1)/E3泛素连接酶(parkin)、微管相关蛋白1轻链3(LC3)介导的线粒体自噬在CHF中具有重要作用。

目前中医药治疗CHF的疗效得到越来越多的肯定并成为治疗CHF的有力补充手段。《慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识》^[6]提出, CHF的基本病机为本虚标实, 以气虚为本, 以瘀、水、痰为标。根据其病因病机及长期临床经验, 本团队制定

基金项目: 国家自然科学基金(82160887, 81673891); 广西自然科学基金(2021GXNSFAA220111, 2021GXNSFBA196018); 国家中医临床研究基地业务建设第二批科研专项课题(JDZX2015146)

✉ 通讯作者: lujianqi666@163.com

了具有益气温阳、活血利水功效的强心汤。前期研究显示,强心汤可显著提高CHF患者的生活质量和运动耐量^[7-8],能够保护心肌细胞线粒体形态从而改善心功能^[9]。在前期研究的基础上,本研究从心肌组织ROS及PINK1/parkin介导的线粒体自噬角度探讨强心汤治疗CHF的可能作用机制,以为其临床应用提供科学依据。本研究经广西中医药大学动物伦理委员会批准通过,伦理批准号:DW 20220907-211。

1 材料及方法

1.1 动物

清洁级健康成年雄性SD大鼠40只,6~8周龄,体质量(220±25)g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,实验动物许可证号:SCXK(京)2019-0010。在SPF级动物实验室中饲养,温度20~26℃,湿度40%~70%,12h明暗交替,普通饲料饲养,自由饮水。

1.2 药物

强心汤组成:黄芪30g,党参15g,炮附片(先煎)、桂枝、川芎、丹参、葶苈子、茯苓、白术、玉竹各10g,柏子仁(打碎)12g,炙甘草6g。由广西中医药大学第一附属医院制剂中心煎煮制备,最终制成含生药0.665g/ml的煎煮液。卡托普利片(国药集团汕头金石制药有限公司,批号220317,规格:25mg/片),由生理盐水配制成1mg/ml混悬液。

1.3 主要试剂及仪器

戊巴比妥钠(北京化学试剂公司,批号:090502);OCT包埋剂(SAKURA公司,货号:4583);ROS测定试剂盒(南京建成生物科技有限公司,货号:E004-1-1);Trizol试剂盒(货号:R1100)、伊红染色液(货号:G1100),Solarbio公司;PrimeScript™ RT Master Mix (Takara公司,货号:RR036A);苏木素染液(货号:ZLI-9610)、Scott蓝化液(货号:G1865),中杉金桥生物技术有限公司;超净高级封片胶(BASO公司,货号:YZB);BCA蛋白定量试剂盒(Elabscience公司,货号:E-BC-K318-M);PVDF膜(Millipore公司,货号:IPVH00010);封闭专用脱脂奶粉(北京普利莱基因技术有限公司,货号:P1622);超敏发光液[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,货号:RJ239676];鼠抗GAPDH(TransGen Biotech公司,货号:HC301);二抗IgG(H+L)(货号:GB23301)、PINK1抗体(货号:20220625)、parkin抗体(货号:20220621)、LC3抗体(货号:20220625),

Servicebio公司。

心电图机(深圳市凯沃尔电子有限公司,型号:ECG-1103G Vet);小动物呼吸机(北京众实迪创科技发展有限公司,型号:DW-3000c);冻切片机(型号:CM1950)、石蜡包埋机(型号:HistoCore Arcadia),Leica公司;荧光显微镜(OLYMPUS公司,型号:CX41);小动物超声机(VisualSonics公司,型号:VEVO2100);7500实时荧光定量PCR系统(Applied Biosystems公司,型号:4351105);全自动酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司,型号:SuPerMax 3100);超高灵敏度化学发光成像系统(伯乐生命医学产品有限公司,型号:Chemi Doc™ XRS+)。

1.4 CHF大鼠造模方法

大鼠适应性饲养7天后,参考文献[10]方法,以1%戊巴比妥钠3.5ml/kg剂量进行腹腔注射麻醉,固定备皮,碘伏消毒,充分暴露前胸部后进行气管插管机械通气,连接心电图机,打开胸廓、撕开心包膜,6-0带线缝针穿过左冠状动脉前降支并结扎,观察结扎后心室壁变苍白,心电图监测提示ST段抬高后将心脏回纳胸腔,关胸后逐层缝合后碘伏消毒,置于保温垫上直至苏醒。术后2周行心脏彩超检测提示左室射血分数(LVEF)下降20%~30%可判定CHF模型成功^[10]。

1.5 实验分组及干预方法

40只大鼠采用随机数字表法分为假手术组、模型组、强心汤组、卡托普利组、卡托普利+强心汤组,每组8只。除假手术组外,其余各组大鼠按照1.4中方法建立CHF大鼠模型,假手术组大鼠只穿线,不结扎左前降支。全部大鼠造模成功。自模型建立成功后第2天开始,按照动物与人等效剂量换算公式^[11]得出强心汤组大鼠以12.25g/(kg·d)强心汤混悬液灌胃;卡托普利组大鼠以10.38mg/(kg·d)卡托普利片混悬液灌胃;卡托普利+强心汤组则以12.25g/(kg·d)强心汤+10.38mg/(kg·d)卡托普利片混悬液灌胃。各给药组大鼠每天灌胃总液体量平均分为2等份,每日分2次灌胃;假手术组、模型组每次给予1ml生理盐水,每日2次灌胃。各组均连续灌胃28天。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 心脏彩超检测 全部干预结束后次日,对各组大鼠进行二维超声心动图检测,分别检测大鼠左室舒张末期内径(LVEDd)、左室收缩末期内径

(LVEDs) 和 LVEF, 取 5 个心动周期的平均数值。

1.6.2 大鼠梗死心肌区组织 ROS 荧光探针染色

大鼠心脏彩超检测完成后处死, 取大鼠左室前臂缝线处下方梗死心肌区组织, 根据 ROS 测定试剂盒说明对新鲜大鼠梗死心肌区组织固定、脱水, 在组织周围滴上 OCT 包埋剂进行速冻包埋切片, 滴加稀释好的 DCFH-DA 工作液 (1:1000) 在切片上, 37℃ 孵育, 于荧光显微镜在 400 倍数下观察并采集图像, 标尺为 100 μm。阳性表达在激发波长 465~495 nm、发射波长 515~555 nm 中发绿光, 通过 Image J 1.52 软件分析荧光图片。

1.6.3 大鼠梗死心肌区组织 PINK1、parkin、LC3 mRNA 表达 根据 Trizol 试剂盒说明书提取梗死心肌区组织 RNA, 根据 PrimeScript™ RT Master Mix 操作说明书进行逆转录后实时荧光定量 PCR。引物由广西医大睿谷医学检验有限公司合成, 引物序列: PINK1, 上游: TGTATGAAGCCACCATGCCC, 下游: TCTGCTCCCTTTGAGACGAC, 产物长度: 96 bp; parkin, 上游: CAGTATGGTGCCGAGGACTG, 下游: CTTTCCTCTGGCCCTGTTC, 产物长度: 98 bp; LC3, 上游: TGCCTCCCAAGAAACCTTCG, 下游: GGGGAGAACCTGACCAGAAC, 产物长度: 78 bp; GAPDH, 上游: CATGACCACAGATCCTGA, 下游: AGGTCTACCTCAGGAATGT, 产物长度: 100 bp。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行各基因表达的相对定量。

1.6.4 大鼠梗死心肌区组织 PINK1、parkin、微管相关蛋白 1 轻链 3 I (LC3 I)、微管相关蛋白 1 轻链 3 II (LC3 II) 蛋白表达 每只大鼠剪取梗死心肌区组织 50 mg 样品置于液氮环境中的离心管内, 裂解研磨, 离心取上清液, 根据 BCA 蛋白定量试剂盒说明测定蛋白浓度, 配置 SDS 胶置制胶板中, 压胶、浓缩凝固、电泳, 放好含有内参 (GAPDH) 及 PINK1、parkin、LC3 I、LC3 II 条带的胶和 PVDF 膜置于转膜液浸没后转膜, 封闭液封闭, 分

别进行一抗和二抗 (稀释比例均为 1:2000) 孵育后洗膜各 3 次, 用发光液浸湿 PVDF 膜后放置于超高灵敏度化学发光成像系统样品放置区显影成像。使用 Image J 1.52 对条带进行定量分析, 各指标灰度值通过 GAPDH 均一化后计算蛋白相对表达量。

1.6.5 大鼠梗死心肌区组织 HE 染色 将固定好的梗死心肌区组织进行石蜡包埋切片, 脱蜡至水, 苏木素染色, 返蓝液返蓝, 流水冲洗后入伊红染液中染色 3~5 min, 流水冲洗, 超净高级封片胶封片, 于荧光显微镜在 400 倍数下进行图像采集, 标尺为 50 μm。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行数据处理, 计量资料均符合正态分布, 以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 方差齐性选择单因素方差分析 Bonferroni 检验, 方差不齐则选择 Tamhane's T^2 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心脏彩超指标比较

表 1 示, 与假手术组比较, 各组大鼠 LVEDd、LVEDs 均升高, LVEF 均降低 (P<0.05)。与模型组比较, 各给药组大鼠 LVEDd、LVEDs 均降低, LVEF 均升高 (P<0.05)。卡托普利+强心汤组各指标改善程度均优于卡托普利组和强心汤组 (P<0.05), 强心汤组与卡托普利组各指标比较差异无统计学意义 (P>0.05)。

2.2 各组大鼠梗死心肌区组织 ROS 水平比较

表 2 示, 与假手术组比较, 各组大鼠梗死心肌区组织 ROS 水平均升高 (P<0.05)。与模型组比较, 各给药组大鼠 ROS 水平均降低 (P<0.05)。卡托普利+强心汤组大鼠 ROS 水平低于强心汤组和卡托普利组 (P<0.05), 强心汤组大鼠与卡托普利组 ROS 水平比较差异无统计学意义 (P>0.05)。各组大鼠梗死心肌区组织 ROS 荧光染色结果见图 1。

表 1 各组大鼠 LVEDd、LVEDs、LVEF 水平比较

Table 1 Comparison of LVEDd, LVEDs and LVEF levels of rats in each group

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

分组	鼠数	LVEDd/mm	LVEDs/mm	LVEF/%
假手术组	8	5.59±0.29	3.38±0.50	76.99±3.66
模型组	8	7.96±0.70 ^{a)}	6.78±0.79 ^{a)}	48.09±6.25 ^{a)}
强心汤组	8	7.02±0.42 ^{a) b) c)}	5.63±0.81 ^{a) b) c)}	56.18±2.92 ^{a) b) c)}
卡托普利组	8	7.20±0.40 ^{a) b) c)}	5.74±0.66 ^{a) b) c)}	54.97±3.49 ^{a) b) c)}
卡托普利+强心汤组	8	6.31±0.33 ^{a) b)}	4.59±0.65 ^{a) b)}	65.34±4.71 ^{a) b)}

注: LVEDd, 左室舒张末期内径; LVEDs, 左室收缩末期内径; LVEF, 左室射血分数。

a) 与假手术组比较, P<0.05; b) 与模型组比较, P<0.05; c) 与卡托普利+强心汤组比较, P<0.05。

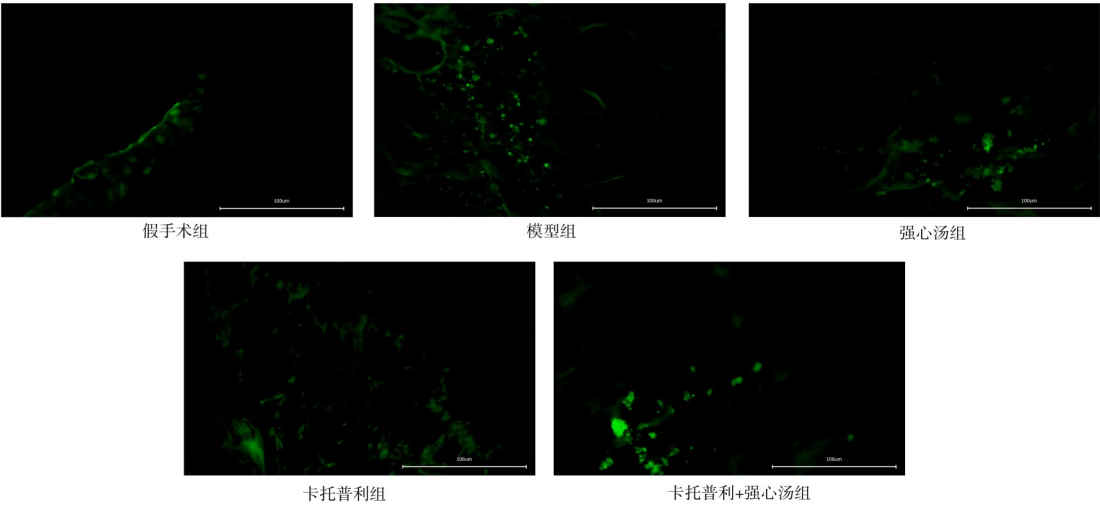
表 2 各组大鼠梗死心肌区组织 ROS 水平比较		
Table 2 Comparison of ROS levels in infarct area		
of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)		
组别	鼠数	ROS
假手术组	8	0.05±0.01
模型组	8	4.38±0.70 ^{a)}
强心汤组	8	0.67±0.21 ^{a) b) c)}
卡托普利组	8	0.92±0.23 ^{a) b) c)}
卡托普利+强心汤组	8	0.36±0.12 ^{a) b)}

注：ROS，活性氧。

a) 与假手术组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与卡托普利+强心汤组比较， $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠梗死心肌区组织 HE 染色结果

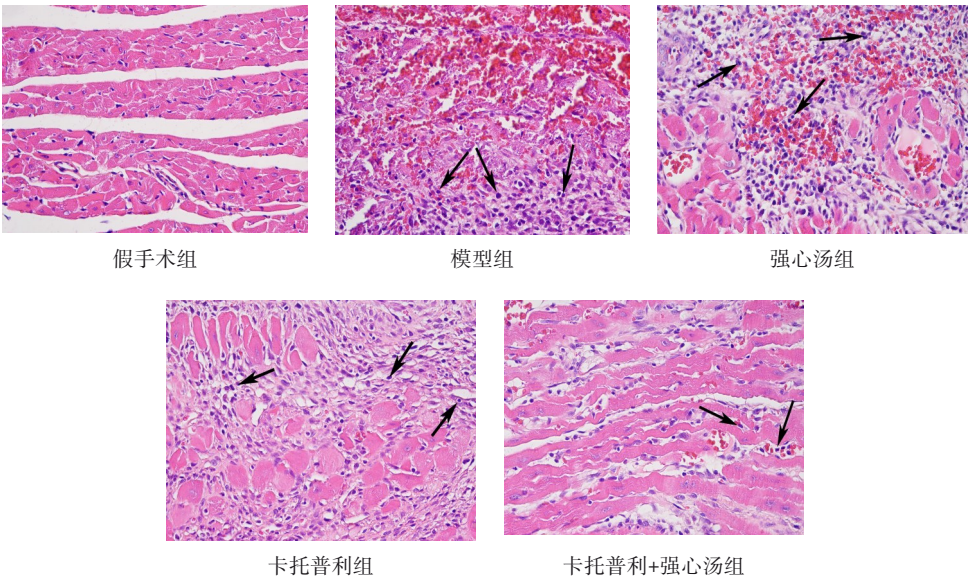
图 2 示，假手术组心肌排列整齐、细胞质丰富均匀、间质正常，未见明显微梗死灶，无炎性细胞浸润。模型组心肌组织中大量弥漫性出血，出血灶周围心肌细胞核形态发生变化，部分细胞核发生核碎裂、核溶解，大量炎性细胞浸润。与模型组相比，强心汤组心肌组织中弥漫性出血减少，部分细胞核发生核碎裂、核溶解，大量炎性细胞浸润；卡托普利组心肌组织中出血明显减少，部分细胞核发生核碎裂、核溶解，可见炎性细胞浸润；强心汤+卡托普利组心肌组织中少量弥漫性出血，出血灶周



注：图中绿色荧光代表活性氧（ROS）表达。

图 1 各组大鼠梗死心肌区组织 ROS 荧光染色结果（×400）

Figure 1 Fluorescence staining of ROS in the infarct area of rats in each group



注：图中黑色箭头指示为细胞核。

图 2 各组大鼠梗死心肌区组织 HE 染色结果（×400）

Figure 2 Fluorescence staining of HE in the infarct area of rats in each group

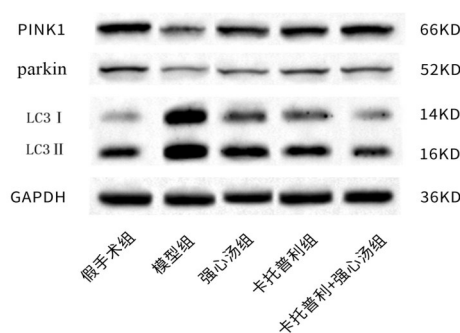
围少量炎性细胞浸润。

2.4 各组大鼠梗死心肌区组织 PINK1、parkin、LC3 mRNA 表达比较

表3示,与假手术组比较,各组大鼠梗死心肌区组织 PINK1、parkin mRNA 表达降低, LC3 mRNA 表达升高 ($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠 PINK1、parkin mRNA 表达升高, LC3 mRNA 表达降低 ($P<0.05$)。卡托普利+强心汤组各指标改善程度优于强心汤组和卡托普利组 ($P<0.05$),强心汤组与卡托普利组各指标比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.5 各组大鼠梗死心肌区组织 PINK1、parkin、LC3 I、LC3 II 蛋白表达比较

LC3 I/LC3 II 值可直接反映自噬水平的强弱,故 LC3 I、LC3 II 蛋白表达以 LC3 I/LC3 II 值表示。表4示,与假手术组比较,各组大鼠梗死心肌区组织 PINK1、parkin 蛋白表达降低, LC3 I/LC3 II 值升高 ($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组大鼠梗死心肌区组织 PINK1、parkin 蛋白表达升高, LC3 I/LC3 II 值降低 ($P<0.05$)。卡托普利+强心汤组各指标改善程度优于强心汤组和卡托普利组 ($P<0.05$),强心汤组与卡托普利组各指标比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。各组大鼠梗死心肌区组织 PINK1、parkin、C3 I、LC3 II 蛋白电泳图见图3。



注: PINK1, PTEN 诱导激酶 1; parkin, E3 泛素连接酶; LC3 I, 微管相关蛋白 1 轻链 3 I; LC3 II, 微管相关蛋白 1 轻链 3 II。

图3 各组大鼠梗死心肌区组织 PINK1、parkin、LC3 I、LC3 II 蛋白电泳图

Figure 3 Electrophoresis of PINK1, parkin, LC3 I, LC3 II proteins in the infarct area of rats in each group

3 讨论

近年来,随着 CHF 的治疗药物血管紧张素受体脑啡肽酶抑制剂 (ARNI)、钠-葡萄糖共转运蛋白 2 抑制剂 (SGLT2i) 获得大量有益的临床证据,“新四联”疗法 [ARNI/血管紧张素转化酶抑制剂 (ACEI)/血管紧张素 II 受体拮抗剂 (ARB)+SGLT2i+β 受体阻滞剂 (BB)+醛固酮受体拮抗剂 (MRA)] 成为 CHF 新的基本治疗准则^[12-13]。而在我国 CHF 临床治疗实践中,中医药因其具有增加运动耐量、提高生活质量、改善心功能的疗效特点而被广泛地加

表3 各组大鼠梗死心肌区组织 PINK1、parkin、LC3 mRNA 表达比较

Table 3 Comparison of PINK1, parkin, LC3 mRNA expression in infarct area of rats in each group ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	PINK1	parkin	LC3
假手术组	8	1.00±0.09	1.01±0.06	1.03±0.05
模型组	8	0.32±0.06 ^{a)}	0.39±0.05 ^{a)}	1.57±0.06 ^{a)}
强心汤组	8	0.59±0.06 ^{a) b) c)}	0.62±0.08 ^{a) b) c)}	1.41±0.08 ^{a) b) c)}
卡托普利组	8	0.64±0.09 ^{a) b) c)}	0.65±0.07 ^{a) b) c)}	1.43±0.09 ^{a) b) c)}
卡托普利+强心汤组	8	0.87±0.06 ^{a) b)}	0.85±0.06 ^{a) b)}	1.23±0.08 ^{a) b)}

注: PINK1, PTEN 诱导激酶 1; parkin, E3 泛素连接酶; LC3, 微管相关蛋白 1 轻链 3。

a) 与假手术组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与卡托普利+强心汤组比较, $P<0.05$ 。

表4 各组大鼠梗死心肌区组织 PINK1、parkin 蛋白及 LC3 I/LC3 II 值比较

Table 4 Comparison of PINK1, parkin protein and LC3 I/LC3 II values in the infarct area of rats in each group (灰度值, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	PINK1	Parkin	LC3 I/LC3 II 值
假手术组	8	1.07±0.12	1.04±0.10	1.05±0.08
模型组	8	0.41±0.07 ^{a)}	0.28±0.08 ^{a)}	1.75±0.08 ^{a)}
强心汤组	8	0.57±0.08 ^{a) b) c)}	0.41±0.05 ^{a) b) c)}	1.54±0.07 ^{a) b) c)}
卡托普利组	8	0.61±0.09 ^{a) b) c)}	0.46±0.06 ^{a) b) c)}	1.48±0.11 ^{a) b) c)}
卡托普利+强心汤组	8	0.76±0.08 ^{a) b)}	0.65±0.08 ^{a) b)}	1.27±0.06 ^{a) b)}

注: PINK1, PTEN 诱导激酶 1; parkin, E3 泛素连接酶; LC3 I, 微管相关蛋白 1 轻链 3I; LC3 II, 微管相关蛋白 1 轻链 3 II。

a) 与假手术组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与卡托普利+强心汤组比较, $P<0.05$ 。

以应用, 中西医结合已成为 CHF 治疗中客观存在且普遍被患者接受的医疗模式^[14]。中医学认为, CHF 属于本虚标实之证, 心阳亏虚是 CHF 发病的内在基础, 血瘀是其关键病理环节, 痰浊、水饮是重要的病理产物, 故临床上以温阳利水、益气活血、泻肺利水等为主要治法^[15]。强心汤方中以黄芪补气、附子温阳为君药, 党参益气、桂枝助阳为臣药, 四药君臣相须相配乃取《医宗金鉴》中“补后天之气无如人参, 补先天之气无如附子”之意。佐以玉竹养阴, 茯苓健脾养心利水, 合黄芪、党参增强补气养阴之力, 桂枝配茯苓可温化渗利, 玉竹配茯苓又可养阴防伤阴; 白术健脾燥湿, 丹参、川芎行气活血祛瘀, 柏子仁养心安神, 葶苈子通调水道、泻肺利水。炙甘草补中益气、调和诸药以为使, 桂枝配炙甘草还可辛甘化阳。既往研究^[16]发现, 血管紧张素 II (Ang II) 能够减少 PINK1/parkin 转移至线粒体参与自噬, 导致线粒体 ROS 和氧化应激反应增加从而诱导心肌细胞损伤和凋亡, 而卡托普利能够抑制 Ang II 的活性同时参与线粒体自噬过程, 因此本研究选择卡托普利片为对照药物。

线粒体自噬障碍是导致 CHF 的重要原因^[17]。线粒体自噬障碍能够显著增加 ROS 水平, 加重线粒体 DNA 损伤, 导致心肌细胞钙超载、坏死和凋亡, 促进心肌纤维化进而诱导 CHF 的发生^[18-20]。PINK1、parkin 是哺乳动物细胞中最常见的线粒体自噬因子, PINK1 下调与心室肥厚、左心室功能障碍有关^[21]。当线粒体受损时, 其膜外的 PINK1 通过累积和募集 parkin 至线粒体表面磷酸化后, 将线粒体膜上的底物蛋白多聚泛素化, 进一步介导与自噬标志物 LC3 结合进入自噬体大量转化成 LC3 I, 随后 LC3 I 会酶解掉一小段多肽转变成自噬体膜型 LC3 II 并与溶酶体结合, 最终将受损线粒体降解从而减少 ROS 和细胞凋亡, 因此, PINK1、parkin、LC3I 表达越多其线粒体自噬水平越高, ROS 和细胞凋亡越少^[22-23]。

本研究结果提示, 与模型组比较, 各给药组均能明显促进梗死心肌区组织 PINK1、parkin mRNA 和蛋白表达以及 LC3 向 LC3I 转化, 减少 ROS, 改善心肌组织弥漫性出血以及心肌细胞核碎裂、核溶解及炎症浸润水平, 且各给药组 LVEF 水平更高, LVEDd、LVEDs 水平更低, 提示卡托普利和强心汤均可能通过上调 PINK1、parkin 表达促进线粒体自噬而减少 ROS 和心肌细胞凋亡从而改善 CHF 大鼠心功能。此外, 卡托普利联合强心汤使用其减少心肌细胞凋亡和改善心功能的作用均优于卡托普

利和强心汤单独使用, 故推测两药物联合使用可能会有协同作用。本研究仅设定一个药物浓度, 故未来拟增加样本量并设置不同浓度的药物进行干预, 同时设立远期观察, 从多蛋白、多通路等不同角度进一步探讨强心汤的作用机制。

参考文献

- [1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2021 概要[J]. 中国循环杂志, 2022, 37(6): 553-578.
- [2] MOZAFFARIAN D, BENJAMIN EJ, GO AS, et al. Heart disease and stroke statistics-2015 update: a report from the American Heart Association [J]. Circulation, 2015, 131(4): e29-322.
- [3] ZHOU B, TIAN R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure [J]. J Clin Invest, 2018, 128(9): 3716-3726.
- [4] DELBRIDGE LMD, MELLOR KM, TAYLOR DJ, et al. Myocardial stress and autophagy: mechanisms and potential therapies [J]. Nat Rev Cardiol, 2017, 14(7): 412-425.
- [5] BAKULA D, SCHEIBYE-KNUDSEN M. Mitophagy: mitophagy in aging and disease [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 239. doi: 10.3389/fcell.2020.00239.
- [6] 陈可冀, 吴宗贵, 朱明军, 等. 慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(2): 133-141.
- [7] 温志浩, 卢健棋, 潘朝铎, 等. 强心汤对慢性心衰患者生存质量影响的研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2015, 10(2): 204-206.
- [8] 温志浩, 卢健棋, 潘朝铎, 等. 强心汤对慢性心衰患者运动耐量影响的研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014, 12(11): 1291-1293.
- [9] 朱智德, 庞延, 卢健棋, 等. 强心汤对慢性心力衰竭模型大鼠心肌组织 OMA1、OPA1 表达及线粒体形态的影响 [J]. 中医杂志, 2021, 62(3): 266-270, 276.
- [10] WANG FY, LI XW, TONG L. An analysis on the factors influencing survival rate of myocardial infarction model in rats [J]. Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovasc Dis, 2008, 6(7): 862-863.
- [11] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [12] 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.
- [13] HEIDENREICH PA, BOZKURT B, AGUILAR D, et al. 2022 AHA/ACC/HFSA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardio-

- logy/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines [J]. J Am Coll Cardiol, 2022, 79(17):1757-1780.
- [14]毛静远, 赵志强, 王贤良. 心力衰竭的中西医治疗研究现状[J]. 中国实用内科杂志, 2020, 40(12):1001-1004.
- [15]唐震, 张明雪. 中医药治疗慢性心力衰竭临床研究进展[J]. 实用中医内科杂志, 2022, 36(6):4.
- [16]XIONG W, MA Z, AN D, et al. Mitofusin 2 participates in mitophagy and mitochondrial fusion against Angiotensin II induced cardiomyocyte injury [J]. Front Physiol, 2019, 10:411. doi: 10.3389/fphys.2019.00411.
- [17]WANG B, NIE J, WU L, et al. AMPK α 2 protects against the development of heart failure by enhancing mitophagy via PINK1 phosphorylation [J]. Circ Res, 2018, 122(5):712-729.
- [18]VAN DER POL A, VAN GILST WH, VOORS AA, et al. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future[J]. Eur J Heart Fail, 2019, 21(4):425-435.
- [19]OKA T, HIKOSO S, YAMAGUCHI O, et al. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure[J]. Nature, 2012, 485(7397):251-255.
- [20]QIU Z, WEI Y, SONG Q, et al. The role of myocardial mitochondrial quality control in heart failure [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1404. doi: 10.3389/fphar.2019.01404.
- [21]DADSON K, HAUCK L, HAO Z, et al. The E3 ligase Mule protects the heart against oxidative stress and mitochondrial dysfunction through Myc-dependent inactivation of Pgc-1 α and Pink1 [J]. Sci Rep, 2017, 7:41490. doi: 10.1038/srep41490.
- [22]YOO SM, JUNG YK. A molecular approach to mitophagy and mitochondrial dynamics [J]. Mol Cells, 2018, 41(1): 18-26.
- [23]VILLA E, PROČS E, RUBIO-PATÍÑO C, et al. Parkin-independent mitophagy controls chemotherapeutic response in cancer cells [J]. Cell Rep, 2017, 20(12): 2846-2859.

Effect of *Qiangxin Decoction* (强心汤) on Reactive Oxygen Species and PINK1/parkin Mediated Mitochondrial Autophagy in Myocardium of Chronic Heart Failure Model Rats

PANG Yan¹, LU Jianqi¹, TANG Meiling¹, HUANG Puwei¹, CAI Zongyu², SHI Weiqi², LIU Shuihua², ZHANG Shiyu², HUANG Min²

1. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi Zhuang Autonomous Region, 530001; 2. Guangxi University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Qiangxin Decoction* (QXD) in treating chronic heart failure. **Methods** A total of 40 SD rats of SPF level were randomly divided into sham operation group, model group, QXD group, captopril group, and captopril + QXD group, with eight rats in each group. Except for the sham operation group, the rats were ligated with the anterior descending branch of the left coronary artery to establish the rat model of chronic heart failure. From the second day after successful modeling, each rat in the QXD group was given 12.25 g/kg QXD suspension. Rat in the captopril group was given 10.38 mg/kg captopril suspension by gavage. captopril + QXD group was intervened with QXD and captopril. The rest groups were given 2 ml normal saline by gavage, and each group was cupped twice a day. After 28 consecutive days of gavage, color Doppler echocardiography was performed to test left ventricular end-diastolic diameter (LVEDd), left ventricular end-systolic diameter (LVEDs), and left ventricular ejection fraction (LVEF). The expression of PINK1, parkin, LC3 mRNA and protein in the infarcted myocardium of rats in each group were detected by RT-PCR and Western blot, and HE stain, ROS fluorescent probe staining was used. **Results** Compared with the sham operation group, LVEDd and LVEDs in the model group increased, LVEF decreased, ROS, LC3II/I protein expression ratio in myocardial tissue increased significantly, PINK1, parkin mRNA and protein expression decreased significantly ($P < 0.05$). And there was a large amount of diffuse hemorrhage in myocardial tissue, with morphological changes in cardiomyocyte nuclei around the hemorrhage, nuclear fragmentation and nucleolysis in certain nuclei, and infiltration of a large quantity of inflammatory cells. Compared with the model group, the above indexes of rats in each intervention group were significantly improved ($P < 0.05$). Compared with QXD group and captopril group, the improvement of above indicators in captopril + QXD group was more remarkable ($P < 0.05$). There was no significant difference in all indicators between QXD group and captopril group ($P > 0.05$). **Conclusion** QXD may improve cardiac function by upregulating PINK1 and parkin expression, promoting mitochondrial autophagy, reducing ROS and myocardial cell death, and may play a synergistic role with captopril.

Keywords chronic heart failure; *Qiangxin Decoction* (强心汤); mitochondrial autophagy; reactive oxygen; PTEN induced kinase 1; E3 ubiquitin ligase; captopril

(收稿日期: 2022-09-29; 修回日期: 2022-12-26)

[编辑: 邓媛]