

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.07.012

心衰康胶囊对心力衰竭模型大鼠心肌组织 SERCA2a、miR-25 表达的影响

张雪峰^{1,2}, 赵姝欣¹, 杨宇¹, 张晶^{1,2}✉

1. 内蒙古自治区中医医院, 内蒙古自治区呼和浩特市新城区健康街 11 号, 010010; 2. 国家中医心血管病临床研究中心分中心

[摘要] **目的** 探讨心衰康胶囊治疗心力衰竭的可能作用机制。**方法** 将 60 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、地高辛组及心衰康低、中、高剂量组, 每组 10 只。除空白组外, 其余各组大鼠使用阿霉素腹腔注射 2 周建立心力衰竭模型。造模成功后空白组、模型组大鼠给予 1 ml/(100g·d) 纯净水灌胃; 地高辛组给予地高辛片 0.02 mg/(kg·d) 灌胃; 心衰康低、中、高剂量组分别给予心衰康胶囊 150、300、450 mg/(kg·d) 灌胃, 各组每日灌胃 1 次, 连续 4 周。采用超声诊断仪检测心功能指标 [包括左室射血分数 (LVEF)、左室舒张末期内径 (LVEDD)、左室短轴缩短率 (LVFS)、左室收缩末期内径 (LVESD)]; ELISA 法检测血浆 N 末端 B 型钠尿肽 (NT-proBNP) 水平; RT-PCR 法检测心肌组织肌质网钙离子 ATP 酶 2a (SERCA2a)、miR-25 基因表达; Western blot 法检测心肌组织 SERCA2a 蛋白表达; HE 染色观察心肌组织病理变化。**结果** 与空白组比较, 模型组大鼠 LVEF、LVFS、SERCA2a 蛋白及基因表达降低, LVEDD、LVESD、血浆 NT-proBNP 水平、miR-25 基因表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 且模型组大鼠心肌组织结构重度异常, 肌间质可见胶原纤维明显增生、少量炎症细胞弥散分布, 心肌纤维排列紊乱、可见断裂。与模型组比较, 心衰康低、中、高剂量组和地高辛组 LVEF、LVFS、SERCA2a 蛋白及基因表达升高, LVEDD、LVESD、血浆 NT-proBNP 水平、miR-25 基因表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 各药物干预组大鼠心肌组织病理损伤均有一定程度改善, 且以心衰康高剂量组改善程度最明显。地高辛组在降低血浆 NT-proBNP 水平方面优于心衰康各剂量组, 而心衰康各剂量组随剂量的增加 NT-proBNP 水平递减 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与心衰康中、高剂量组比较, 心衰康低剂量组 SERCA2a 蛋白及基因表达降低, miR-25 基因表达升高 ($P<0.05$); 与心衰康高剂量组比较, 心衰康中剂量组 SERCA2a 蛋白及基因表达降低 ($P<0.05$)。**结论** 心衰康胶囊能够改善心力衰竭大鼠的心肌结构及心功能, 且以高剂量效果最佳, 其作用机制可能与降低 miR-25 基因表达、升高 SERCA2a 表达有关。

[关键词] 心力衰竭; 心衰康胶囊; 肌质网钙离子 ATP 酶; miR-25; 心功能

心力衰竭 (heart failure, HF) 是由于心脏结构或功能异常导致心室充盈或泵血功能受损的复杂临床综合征, 是各种心脏疾病的严重表现或晚期阶段^[1]。研究显示, 心肌 Ca^{2+} 稳态异常是心力衰竭发生的普遍特征, 而肌质网钙离子 ATP 酶 (SERCA) 是影响 Ca^{2+} 循环的关键酶, 是心肌细胞 Ca^{2+} 浓度的主要决定因素, 其中在心脏中主要表达为 SERCA2a, 其对心肌兴奋-收缩耦联具有重要调控作用^[2]。SERCA2a 蛋白在钙的摄入、储存和释放过程中发

挥着极其重要的作用, 并参与 Ca^{2+} 的循环, 影响心肌功能^[3]。miR-25 是干扰 SERCA2a 合成的上游基因, 其增多或减少能够影响心肌 SERCA2a 水平^[4]。心衰康是根据宋一亭教授临床经验^[5] 总结而成的内蒙古自治区中医医院院内制剂, 由葶苈大枣泻肺汤和真武汤化裁而来, 具有益气温阳、行气利水功效。本研究通过建立阿霉素诱导的心力衰竭大鼠模型, 观察心衰康对模型大鼠心功能的影响, 并从 miR-25、SERCA2a 角度探讨其可能的作用机制。本研究已通过内蒙古自治区中医医院医学伦理委员会审查批准, 批准号: 20200110-1。

基金项目: 内蒙古自然科学基金 (2020MS08160)

✉ 通讯作者: 1531959230@qq.com, (0471)5322780

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量(200 ± 20) g, 8~10 周龄, 购于斯贝福(北京)生物技术有限公司, 饲养于 SPF 级环境, 实验动物使用许可证号: SCXK(京) 2019-0010。

1.2 药物

心衰康胶囊(0.5 g/粒, 1 粒 $\approx$ 12 g 生药, 处方组成: 黄芪 24 g, 炮附片 12 g, 葶苈子 12 g, 玄参 12 g, 川芎 12 g), 由内蒙古自治区中医院药物制剂中心生产, 批号: J150102000040023; 阿霉素粉针剂, 上海市阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号: A183027; 地高辛片(0.25 mg/片), 上海信谊药厂有限公司, 批号: 123200601。

1.3 主要试剂及仪器

RT-PCR 试剂盒(货号: AQ131-01)、Trizol(货号: H10318)、RNA 溶解液(货号: H10323), 北京全式金生物技术有限公司; 总 RNA 提取试剂盒(货号: 00266), 上海羽朵生物科技有限公司; cDNA 第一链合成试剂盒(货号: KR118-02), 天根生化科技(北京)有限公司; SDS(货号: BS088)、甘氨酸(货号: BS082), Biosharp 公司; 溴酚蓝(货号: BO449-5G), Amresco 公司; 蛋白标记物(货号: 180-6003)、ECL 底物液(货号: 180-501), Tanon 公司; PVDF 膜(0.45 μ m, 货号: IPVH00010), Millipore 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号: 23227)、ECL 试剂盒(货号: 34579), 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 裂解液(货号: abs9229), 爱必信(上海)生物科技有限公司; 人 N 末端 B 型脑钠肽前体(NT-proBNP) ELISA 试剂盒(批号: ml061452), 上海酶联生物科技有限公司; 4% 多聚甲醛(批号: G1101)、HE 染色液(批号: G1003), Servicebio 公司; 10% 水合氯醛(批号: 20210312), 福晨(天津)化学试剂有限公司。

ABI7500 型实时 PCR 仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; EPS300 型电泳仪, Tanon 公司; T8-1 型磁力搅拌器, 江苏省金坛市中大仪器厂; muLISKANMK3 型酶标仪, Thermo 公司; Centrifuge 5415R 型离心机, Eppendorf 公司; vivi E9 型彩色多普勒超声诊断仪, 美国 GE 公司; Y-3102 型代谢笼、Model1025 型小动物心电呼吸血压血氧监护仪, 上海玉研科学仪器有限公司; EclipseE100 型

正置光学显微镜, 日本尼康公司; BKJ4200 型全自动化学发光分析仪, 济南好来宝器材有限公司。

1.4 分组与造模方法

60 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 运用 SPSS 20.0 生成随机数字表进行分组, 分为空白组、模型组、地高辛组和心衰康低、中、高剂量组, 每组 10 只。除空白组外, 其余各组大鼠通过腹腔注射阿霉素粉针剂(总剂量 15 mg/kg, 每次 2.5 mg/kg), 配成 0.25 mg/ml 溶液, 每周二、四、六进行注射, 连续 2 周共 6 次, 建立大鼠心力衰竭模型^[6]。最后一次注射药物结束 3 周后应用超声诊断仪检测并计算左室射血分数(LVEF), 大鼠 LVEF 下降 20%~30% 则造模成功^[7]。

1.5 给药方法

全部大鼠造模成功。造模成功后次日, 根据人与大鼠体表面积换算公式^[8], 空白组、模型组大鼠给予 1 ml/(100 g $\cdot$ d) 纯净水灌胃; 地高辛组大鼠给予地高辛片 0.02 mg/(kg $\cdot$ d) 灌胃; 心衰康低、中、高剂量组分别给予心衰康胶囊 150、300、450 mg/(kg $\cdot$ d) 灌胃, 其中心衰康低剂量组为临床等效剂量。各组大鼠每日灌胃 1 次, 连续 4 周。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 大鼠一般情况 实验期间观察各组大鼠精神状态、活动、进食、饮水、毛发、爪甲颜色、大小便情况, 每日测量体质量。

1.6.2 心功能指标 灌胃 4 周结束后采用 10% 水合氯醛 3 ml/100 g 腹腔注射麻醉大鼠, 用超声诊断仪检测大鼠心脏, 分别测量 LVEF、左室舒张末期内径(LVEDD)、左室短轴缩短率(LVFS)、左室收缩末期内径(LVESD), 取 3 次测量数值的平均值。

1.6.3 ELISA 法检测血浆 NT-proBNP 水平 超声检测结束后处死大鼠, 取 3~4 ml 腹主动脉血, 肝素抗凝, 静置 1 h, 于 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min(离心半径 15 cm)离心 10 min, 取上清于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。按试剂盒说明书, 采用 ELISA 法检测血浆 NT-proBNP 水平。

1.6.4 Western blot 法检测心肌组织 SERCA2a 蛋白表达 腹主动脉取血后摘取大鼠心肌组织, 剪取约 3 mm³ 心肌组织于 EP 管中并剪碎, 每管加 150~200 μ l 裂解液于冰上裂解 45 min, 来回摇动以使组织充分裂解。裂解完成后, 于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min(离心半径 15 cm)离心 15 min, 采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定 SERCA2a 蛋白表达。SDS-PAGE 电泳, 转至 PVDF 膜, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST(封闭液)

浸泡 PVDF 膜, 室温摇床封闭 2 h; 用封闭液稀释相应的一抗 (GAPDH 1 : 5000, SERCA2a 1 : 3000), 用封闭液稀释 (1 : 1000) HRP 标记二抗, 使 PVDF 膜浸泡于二抗孵育液中, 37℃ 摇床孵育 2 h; 将 ECL 试剂中增强液与稳定的过氧化物酶溶液按 1 : 1 比例混匀, 滴加工作液于 PVDF 膜上, 反应数分钟待荧光带明显后, 用滤纸吸去多余的底物液, 放入全自动化学发光分析仪中曝光, 拍照。使用 Image J 1. 53e 软件分析条带灰度值, 以目的条带与内参条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达量。

1. 6. 5 RT-PCR 法检测心肌组织 SERCA2a、miR-25 基因表达 取各组大鼠心尖部约 4 mm³ 心肌组织, 按照试剂盒说明书提取组织总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 引物序列: GAPDH, 上游 GATGACATCAAGAAGGTGGTGA, 下游 ACCCTGTTGCTGTAGCCATATTC, 产物长度 206 bp; SERCA2a, 上游 CTCTGAAGAAGTCGGAAATCG, 下游 GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA, 产物长度 280 bp; U6, 上游 CTCGCTTCGGCAGCACA, 下游 GAACGCTTACGAATTTGCGTGTTCAT, 产物长度 94 bp; miR-25-3p, 上游 AACTCCAGCTGGGCATTGCACTTGTCTCGG, 下游 CTCAACTGGTGTCTGAGTCGGCAATTTCAGTTGAGTCAGACC, 产物长度 60 bp。SERCA2a 基因表达以 GAPDH 为内参, miR-25-3p 表达以 U6 为内参。反应完成后计算机自动分析 Ct 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对比值。

1. 6. 6 HE 染色观察心肌病理学形态 将剩余心肌组织整体置于 4% 多聚甲醛中固定, 制备切片。行 HE 染色, 显微镜下观察左室心肌组织病理学形态。

1. 7 统计学方法

采用 SPSS 22. 0 软件进行统计分析, 计量资料均符合正态分布, 以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 方差齐者多组间比较用单因素方差分析, 两组间比较用 LSD-*t* 检验; 方差不齐者多组间比较使用 Kruskal-Wallis *H* 检验, 两组间比较使用 Mann-Whitney *U* 检验。以 $P < 0. 05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2. 1 各组大鼠一般情况比较

空白组大鼠精神状态佳, 进食、饮水正常, 活动自如, 反应灵敏, 毛发光泽, 无脱毛现象, 爪甲颜色正常, 大小便色、质均未见异常, 体质量逐步增长。模型组大鼠逐步出现了精神低落, 饮食减少, 反应迟钝, 腹部胀大等症状, 出现毛色枯黄、脱毛现象, 爪甲颜色晦暗, 口鼻处见少量渗血, 体质量下降, 小便量少, 大便不成形。心衰康低、中、高剂量组及地高辛组大鼠上述表现较模型组均有不同程度好转, 其中心衰康中、高剂量组好转程度明显优于心衰康低剂量组和地高辛组。

2. 2 各组大鼠血浆 NT-proBNP 水平及心功能指标比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组大鼠血浆 NT-proBNP 水平及 LVEDD、LVESD 升高, LVEF、LVFS 降低 ($P < 0. 05$ 或 $P < 0. 01$)。与模型组比较, 各药物干预组血浆 NT-proBNP 水平及 LVEDD、LVESD 均降低, LVEF、LVFS 升高 ($P < 0. 05$ 或 $P < 0. 01$)。与地高辛组比较, 心衰康低、中、高剂量组 NT-proBNP 水平均升高, 心衰康低、中剂量组 LVESD 降低 ($P < 0. 05$ 或 $P < 0. 01$)。随剂量的增加, 心衰康各剂量组 NT-proBNP 水平递减, 呈剂量依赖性 ($P < 0. 05$ 或 $P < 0. 01$)。心衰康中剂量组 LVESD 低于心衰康低剂量组, 而心衰康高剂量组

表 1 各组大鼠血浆 NT-proBNP 水平和心功能指标比较

Table 1 Comparison of plasma NT-proBNP levels and cardiac function indicators among groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NT-proBNP/pg·ml ⁻¹	LVEF/%	LVFS/%	LVEDD/mm	LVESD/mm
空白组	10	167. 39±7. 21	79. 08±10. 47	49. 68±2. 93	5. 43±0. 39	2. 81±0. 28
模型组	10	493. 77±11. 36 ^{a)}	39. 37±8. 13 ^{b)}	31. 53±2. 24 ^{b)}	7. 31±0. 79 ^{b)}	4. 83±0. 32 ^{b)}
地高辛组	10	198. 47±8. 62 ^{c)}	49. 13±6. 19 ^{d)}	34. 18±1. 70 ^{d)}	6. 66±0. 42 ^{d)}	3. 96±0. 26 ^{d)}
心衰康低剂量组	10	322. 61±6. 04 ^{e) f)}	59. 37±10. 58 ^{d)}	39. 73±3. 66 ^{d)}	5. 90±0. 34 ^{d)}	3. 59±0. 22 ^{d) f)}
心衰康中剂量组	10	248. 01±7. 72 ^{e) f) g)}	59. 30±11. 45 ^{d)}	41. 54±4. 03 ^{d)}	5. 96±0. 44 ^{d)}	3. 16±0. 10 ^{d) f) g)}
心衰康高剂量组	10	218. 38±11. 84 ^{e) f) g) h)}	55. 09±9. 27 ^{d)}	38. 69±2. 06 ^{d)}	6. 01±0. 40 ^{d)}	3. 72±0. 19 ^{d) g)}

注: NT-proBNP, N 末端 B 型脑钠肽前体; LVEF, 左室射血分数; LVFS, 左室短轴缩短率; LVEDD, 左室舒张末期内径; LVESD, 左室收缩末期内径。

a) 与空白组比较, $P < 0. 01$; b) 与空白组比较, $P < 0. 05$; c) 与模型组比较, $P < 0. 01$; d) 与模型组比较, $P < 0. 05$; e) 与地高辛组比较, $P < 0. 01$; f) 与地高辛组比较, $P < 0. 05$; g) 与心衰康低剂量组比较, $P < 0. 01$; h) 与心衰康中剂量组比较, $P < 0. 05$ 。

LVESD 高于心衰康低剂量组 ($P<0.01$)。

2.3 各组大鼠心肌组织 SERCA2a 蛋白、基因表达及 miR-25 基因表达比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组大鼠心肌组织 SERCA2a 蛋白及基因表达均降低, miR-25 基因表达升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 心衰康低、中、高剂量组和地高辛组 SERCA2a 蛋白及基因表达均升高, miR-25 基因表达降低 ($P<0.05$)。与地高辛组比较, 心衰康低、中剂量组 SERCA2a 蛋白及基因表达均降低, miR-25 基因表达升高 ($P<0.05$)。与心衰康中、高剂量组比较, 心衰康低剂量组 SERCA2a 蛋白及基因表达降低, miR-25 基因表达升高 ($P<0.05$)。与心衰康高剂量组比较, 心衰康中剂量组 SERCA2a 蛋白及基因表达降低 ($P<0.05$)。

2.4 各组大鼠心肌组织病理学比较

图 1 示, 空白组大鼠心肌组织结构基本正常,

视野中未见炎症细胞分布; 心肌纤维排列紧密规则; 心肌细胞形态未见异常, 胞核清晰, 未见明显坏死; 组织未见胶原纤维增生。模型组大鼠心肌组织结构重度异常, 视野中肌间质可见胶原纤维明显增生; 间质可见少量炎症细胞弥散分布; 心肌纤维排列紊乱, 可见断裂。地高辛组大鼠心肌组织结构中度异常, 视野中可见胶原纤维轻度增生; 肌间质可见大量炎症细胞弥散分布; 心肌纤维排列较整齐, 未见心肌纤维断裂; 心肌细胞形态较规则, 未见明显坏死。心衰康低剂量组大鼠心肌组织结构中度异常, 视野中可见轻度胶原纤维增生; 肌间质可见少量炎症细胞弥散分布; 部分心肌细胞可见轻度脂肪变性, 个别心肌细胞可见坏死。心衰康中剂量组大鼠心肌组织结构中度异常, 心肌纤维束排列疏松, 间隙增大; 肌间质可见大量炎症细胞弥散分布; 视野中可见少量胶原纤维增生; 心肌细胞形态规则, 胞核清晰, 未见明显坏死。心衰康高剂量组

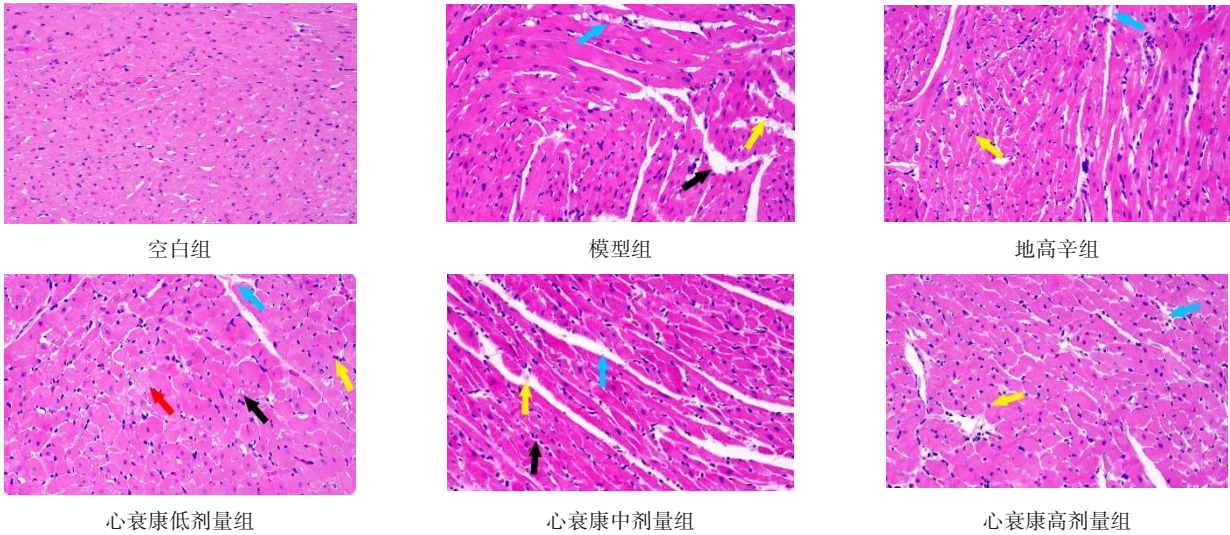
表 2 各组大鼠心肌组织 SERCA2a 蛋白、基因表达及 miR-25 基因表达比较

Table 2 Comparison of SERCA2a protein, gene expression and miR-25 gene expression in myocardial tissue among groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	SERCA2a 蛋白/GAPDH	SERCA2a 基因/GAPDH	miR-25 基因/U6
空白组	10	1.06±0.20	1.14±0.17	0.92±0.18
模型组	10	0.32±0.09 ^{a)}	0.44±0.08 ^{a)}	1.49±0.12 ^{a)}
地高辛组	10	0.92±0.21 ^{b)}	0.94±0.13 ^{b)}	1.11±0.13 ^{b)}
心衰康低剂量组	10	0.49±0.11 ^{b) c) d) e)}	0.58±0.08 ^{b) c) d) e)}	1.35±0.13 ^{b) c) d) e)}
心衰康中剂量组	10	0.67±0.17 ^{b) c) d)}	0.75±0.16 ^{b) c) d)}	1.18±0.12 ^{b) c)}
心衰康高剂量组	10	0.87±0.24 ^{b)}	0.91±0.14 ^{b)}	1.13±0.17 ^{b)}

注: SERCA2a, 肌质网钙离子 ATP 酶 2a。

a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与地高辛组比较, $P<0.05$; d) 与心衰康高剂量组比较, $P<0.05$; e) 与心衰康中剂量组比较, $P<0.05$ 。



注: 蓝色箭头所示为胶原纤维增生; 黄色箭头所示为炎症细胞浸润; 黑色箭头所示为心肌纤维排列紊乱; 红色箭头所示为心肌细胞坏死。

图 1 各组大鼠心肌组织 HE 染色病理图 ($\times 200$)

Figure 1 Pathological changes in HE staining in myocardial tissues of each group ($\times 200$)

大鼠心肌组织结构轻度异常,视野中可见胶原纤维轻度增生;肌间质可见大量炎症细胞弥散分布;心肌细胞形态规则,排列紧密,未见明显坏死。

3 讨论

中医学认为,心力衰竭病因有外感寒邪、饮食不节、情志异常、劳逸失调等,病机主要为心气、心阳亏虚,瘀血、痰饮内阻^[9]。内蒙古地区地处高原,气候寒冷、干燥,饮食习惯则有嗜食肥甘厚腻等高热量食物、喜饮酒等特点。气候寒冷,易伤阳气,喜食肥甘、饮酒,易致痰湿饮停,气虚、阳虚、饮停等又致血行不畅,瘀血内阻。我们在临床实践中亦发现,内蒙古地区心力衰竭患者主要病机要素为气虚、阳虚、饮停、血瘀,且各因素常常合并出现,故结合病因病机特点研制院内制剂心衰康胶囊。方中附子为君药,味辛甘、性热,可温阳散寒,助阳以化气行水;现代药理研究表明,附子提取物去甲乌药碱是附子强心的主要成分,能增强心肌收缩力,加快心率,增加心输出量^[10]。黄芪补益全身之气,以助附子化气行水。葶苈子入肺、心、肾、膀胱经,具有泻肺平喘、行气利水之效,其水提取液则具有增强心肌收缩的作用,可增加冠状动脉灌注量^[11]。川芎辛温行气、活血化瘀,有保护心肌缺血损伤、抑制动脉粥样硬化等作用^[12]。玄参味苦微寒,具有清热凉血、滋阴降火的功效,可改善冠状动脉血供、抑制心室重构及心肌肥厚^[13]。地高辛为临床治疗心力衰竭的常用药物,对心脏的作用表现为正性肌力作用^[14],故本研究将其作为对照药物。

本研究结果显示,模型组大鼠精神低落,饮食减少,反应迟钝,毛色枯黄脱落,爪甲颜色晦暗,口鼻处见少量渗血,体质量下降,血浆 NT-proBNP 水平及 LVEDD、LVESD 升高, LVEF、LVFS 降低,提示心力衰竭造模成功。心衰康低、中、高剂量组及地高辛组大鼠一般情况均有不同程度好转,其中心衰康中、高剂量组改善程度明显优于心衰康低剂量组和地高辛组,而地高辛组在降低血浆 NT-proBNP 水平方面优于心衰康各剂量组。心衰康各剂量组之间比较发现,心衰康高剂量组在降低血浆 NT-proBNP 水平方面效果最佳,心衰康中剂量组在降低 LVESD 方面效果最佳。心肌病理学观察显示,模型组大鼠心肌组织结构重度异常,胶原纤维明显增生,间质可见少量炎症细胞,心肌纤维排列紊乱,可见断裂;而各药物干预组大鼠心肌细胞损伤较模

型组均有不同程度减轻,且心衰康高剂量组效果优于地高辛组,这可能与中药复方存在多靶点作用机制有关,但确切结论仍需继续探索。

SERCA2a 是心脏重要的功能蛋白,当细胞内 Ca^{2+} 浓度 $>10^{-7}\text{mol/L}$ 时激活,使 SERCA2a 38 位上的丝氨酸磷酸化,ATP 依赖性逆浓度梯度将 Ca^{2+} 由胞浆排入肌浆网内,促进心肌舒张^[15]。SERCA2a 的活性调节控制着心脏的收缩和松弛,影响心脏功能^[16]。miR-25 选择性作用于 SERCA2a 基因 3' 非翻译区的结合位点,干扰 SERCA2a 的合成,从而降低心肌 SERCA2a 水平^[17]。本研究结果显示,心力衰竭大鼠造模成功后,其心肌组织 SERCA2a 蛋白及基因表达明显降低,miR-25 基因表达升高,而地高辛和心衰康各剂量干预后大鼠心肌组织 SERCA2a 蛋白及基因表达均升高,miR-25 基因表达降低,其中心衰康高剂量效果优于心衰康中、低剂量,且心衰康高剂量与地高辛疗效相当。以上结果证明,心衰康胶囊可能通过降低 miR-25 来改善 SERCA2a 蛋白及基因表达,从而调节心脏收缩-舒张功能,进而发挥改善心力衰竭的作用。

综上所述,心衰康胶囊具有抗心力衰竭作用,其机制可能为降低心肌组织 miR-25 基因表达,升高 SERCA2a 表达,抑制心肌病理损伤,从而改善心功能,且以高剂量效果最佳。但该药的最佳有效剂量及毒理反应需进一步观察,并且对其他可能的作用靶点及作用通路需进行深入探索,以为其临床应用提供基础。

参考文献

- [1] 中华医学会心血管病学分会心力衰竭组,中国医师协会心力衰竭专业委员会,中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018[J]. 中华心血管病杂志,2018,46(10):760-789.
- [2] 李红艳,赵思涵,王世华,等. SERCA2a 在心力衰竭中的研究进展[J]. 中国药理学通报,2020,36(2):171-174.
- [3] 周鑫,于睿,林萍. 参附汤通过 Ca^{2+} /SERCA2a 调控心力衰竭大鼠内质网应激改善心肌损伤研究[J]. 中华中医药学刊,2021,39(9):36-40.
- [4] LIU Z, NI J, LI L, et al. SERCA2a: a key protein in the Ca^{2+} cycle of the heart failure[J]. Heart Fail Rev, 2020, 25(3):523-535.
- [5] 马曙东,张晶,贾磊,等. 宋一亭通补结合辨治风寒痹阻型胸痹经验[J]. 中医杂志,2020,62(3):205-208.
- [6] 张译心,纪凤兰,王鑫,等. 阿霉素致大鼠慢性心力衰竭模型建立[J]. 中国老年学杂志,2021,41(12):2576-2581.

- [7] 吴运香, 张野, 谢春林, 等. SD 大鼠阿霉素慢性心力衰竭模型的建立与评价[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(8):1170-1173.
- [8] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993:33-34.
- [9] 张伯礼, 薛博瑜. 中医内科学[M]. 北京: 北京人民出版社, 2002:88-94.
- [10] 李庆. 附子汤对慢性心力衰竭大鼠心室重构及肾素血管紧张素醛固酮系统的影响[J]. 新中医, 2015, 47(1):222-224.
- [11] 林雪竹, 李蔚群, 关永霞, 等. 葶苈子化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国现代中药, 2022, 24(3):550-558.
- [12] 张露苗, 马平凡. 川芎在心血管疾病中的药理及临床应用探究[J]. 中医临床研究, 2021, 13(1):18-20.
- [13] 李静, 陈长勋, 高阳, 等. 玄参提取物抗炎与抗动脉硬化化作用的探索[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(3):532-534.
- [14] 赵国炎, 孙跃民. 强心药在心力衰竭应用中的再评价[J]. 临床荟萃, 2017, 32(3):189-192, 207.
- [15] 李小鹰. 肌浆网钙 ATP 酶 2a 基因转导治疗心力衰竭的研究[J]. 中华心血管病杂志, 2005, 33(6):576-578.
- [16] 于开锋, 宋囡, 张哲, 等. 当归补血汤通过调控 Ca^{2+} -SERCA2a 抑制肥厚型心肌病大鼠内质网应激反应改善心肌损伤[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(9):47-51.
- [17] 吴锦波, 叶小汉, 冼绍祥, 等. 中药心康方对心力衰竭大鼠心肌 miR-25-3p 表达水平和 SERCA2a 活性的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 30(10):1770-1774.

Effect of *Xinshuaikang Capsule* (心衰康胶囊) on the Expression of SERCA2a and miR-25 in Myocardial Tissue of Heart Failure Model Rats

ZHANG Xuefeng^{1,2}, ZHAO Shuxin¹, YANG Yu¹, ZHANG Jing^{1,2}

1. Inner Mongolia Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hohhot, 010010; 2. Sub-center of National Clinical Research Center for Chinese Medicine Cardiology

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of *Xinshuaikang Capsule* (心衰康胶囊) in the treatment of heart failure (HF). **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into blank group, model group, digoxin group and low-, medium- and high-dose groups of *Xinshuaikang Capsule*, with 10 rats in each group. Except for the blank group, rats were intraperitoneally injected with adriamycin for two weeks to establish the HF models. After successful modeling, the blank group and model group were given 1 ml/(100 g·d) of purified water by gavage, while the digoxin group was given 0.02 mg/(kg·d) of digoxin tablet, and the low-, medium- and high-dose groups were respectively given 150, 300, and 450 mg/(kg·d) of *Xinshuaikang Capsule* by gavage, once a day, for 4 consecutive weeks. The changes of cardiac function indicators including left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD), left ventricular short-axis shortening (LVFS) and left ventricular end-systolic diameter (LVESD) were evaluated by ultrasound diagnostic device. The content of plasma N-terminal B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) was detected by ELISA. The expression of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 2a (SERCA2a) and miR-25 genes in myocardial tissue was detected by RT-PCR. The expression of SERCA2a protein in myocardial tissue was detected by Western blotting. The pathological changes of myocardial tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. **Results** Compared to those in the blank group, LVEF, LVFS, and SERCA2a protein and genes expression in the model group decreased, while LVEDD, LVESD, plasma NT-proBNP, and miR-25 gene expression increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); and the structure of the myocardial tissue was severely abnormal in the model group, with obvious hyperplasia of collagen fibers in the interstitial muscle, diffuse distribution of a small amount of inflammatory cells, disorderly arranged and broken myocardial fibers. Compared to those in the model group, LVEF, LVFS, and SERCA2a protein and gene expressions in all three *Xinshuaikang Capsule* groups and digoxin group increased, while LVEDD, LVESD, plasma NT-proBNP content, and miR-25 expression decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the pathological damage of myocardial tissue in all intervention groups was improved to a certain extent, and most obvious improvement was seen in the high-dose *Xinshuaikang Capsule* group. Digoxin group was superior to all three *Xinshuaikang Capsule* groups in reducing plasma NT-proBNP levels, and with the increase of the dose of *Xinshuaikang Capsule*, NT-proBNP level decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the medium- and high-dose groups of *Xinshuaikang Capsule*, the expression of SERCA2a protein and gene in the low-dose group decreased, while the expression of miR-25 gene increased ($P < 0.05$); the expression of SERCA2a protein and gene was lower in the low-dose group than in the high-dose group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Xinshuaikang Capsule* can improve the myocardial structure and cardiac function of HF rats, and high dose shows best effect. Its mechanism may be related to reducing miR-25 expression and regulating the expression of SERCA2a.

Keywords heart failure; *Xinshuaikang Capsule* (心衰康胶囊); sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase; miR-25; cardiac function

(收稿日期: 2023-01-18; 修回日期: 2023-02-15)

[编辑: 邓媛]