

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.12.012

实验研究

养心通脉方对心肌梗死血瘀证模型大鼠心肌能量代谢的影响

于子璇¹, 张书萌², 张梦雪³, 陈宇霞¹, 陈杏¹, 孔贝贝⁴, 陈伶俐⁵, 李杰^{1✉}

1. 湖南中医药大学中医诊断研究所, 湖南省长沙市岳麓区含浦科教园学士路300号, 410208; 2. 湖南中医药大学中医学院;
3. 上海中医药大学附属龙华医院; 4. 湖南中医药大学第一附属医院; 5. 湖南中医药大学医学院

[摘要] **目的** 探讨养心通脉方治疗心肌梗死血瘀证的可能作用机制。**方法** 50只大鼠随机选取38只在高脂饲料喂养下运用维生素D3灌胃+异丙肾上腺素腹部皮下注射的方法建立心肌梗死血瘀证模型。从造模成功的28只大鼠中选出24只随机分为模型组、养心通脉方组和阿托伐他汀钙组, 每组8只, 未进行造模的大鼠中8只作为空白组。养心通脉方组大鼠给予养心通脉方12 g/(kg·d)灌胃, 阿托伐他汀钙组大鼠给予阿托伐他汀钙片1.8 mg/(kg·d)灌胃, 空白组和模型组给予4 ml/(kg·d)蒸馏水灌胃, 各组均每天1次, 连续14天。HE染色法观察冠状动脉病理形态学改变, 透射电镜观察心肌组织线粒体超微结构及数量变化, ELISA法检测心肌组织腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)、血清一氧化氮(NO)与C1q肿瘤坏死因子相关蛋白3(CTRP3)水平, Western blot法测定心肌组织CTRP3蛋白表达水平。**结果** 与空白组相比, 模型组冠状动脉组织出现内膜增厚、内皮破损、炎性浸润等改变; 心肌线粒体数量减少, 膜结构变浅, 部分破溃; 心肌组织ATP、血清NO水平明显降低, 心肌组织CTRP3蛋白表达及血清CTRP3水平明显下降($P<0.05$)。与模型组比较, 养心通脉方组和阿托伐他汀钙组冠状动脉内皮损伤情况均明显改善, 心肌组织肌小节排列规律, 心肌线粒体数量增加、结构完整, 心肌组织ATP含量、血清NO含量显著升高, 心肌组织CTRP3蛋白表达及血清CTRP3水平明显升高($P<0.05$)。与养心通脉方组比较, 阿托伐他汀钙组冠状动脉内皮损伤以及线粒体膜结构破坏程度均较为明显, 心肌组织ATP及CTRP3蛋白表达水平、血清CTRP3水平均明显升高($P<0.05$)。**结论** 养心通脉方能够显著改善心肌梗死血瘀证大鼠的心肌线粒体能量代谢功能, 抵抗冠状动脉内皮损伤, 其机制可能与升高脂肪因子CTRP3含量相关。

[关键词] 心肌梗死; 血瘀证; 能量代谢; 线粒体; C1q肿瘤坏死因子相关蛋白3; 养心通脉方

心肌梗死(myocardial infarction, MI)是一种因冠状动脉血管阻塞而导致心肌组织缺氧坏死, 最终影响其正常收缩功能的缺血性心脏病, 该病急性发作时往往伴随着剧烈的心前区疼痛, 严重时可向左上肢放射^[1]。据统计, 2019年全球死于心血管疾病的人数约占总死亡人数的1/3, 其中以MI为代表的缺血性心脏病最多^[2]。心肌能量代谢异常是影响MI发生与发展的重要因素, 当心肌发生缺血性

损伤时, 线粒体的结构与功能均受到破坏, 并伴随出现呼吸链和腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)合成的异常以及氧化应激反应的增加, 进而导致更广泛的细胞损伤与凋亡, 加重MI的程度^[3]。研究显示, 脂肪并非单纯的能量储存组织, 它同时具有旺盛的分泌功能, 能够合成一系列参与维持炎症反应平衡、内环境稳态、糖脂代谢水平等重要生理作用的细胞因子, 即脂肪因子^[4]。C1q肿瘤坏死因子相关蛋白3(CTRP3)是一种广泛表达于心外膜脂肪组织的脂肪因子, 具有抑制内皮炎症、减少斑块形成、发挥抗炎和抗动脉粥样硬化的冠状动脉保护作用, 能够在多个阶段干预MI的病程进展^[5]。MI属于中医学

基金项目: 国家自然科学基金(81874375); 湖南省自然科学基金(2022JJ30430); 湖南省教育厅科学研究项目(21A0231); 湖南中医药大学研究生创新课题(2022CX06, 2022CX57)

✉ 通讯作者: 317768870@qq.com, 13308472992

“胸痹”范畴，血瘀证是该病最常见的证型之一^[6]。养心通脉方是著名医家秦伯未先生治疗胸痹的经验方，由人参、桂枝、生地黄、丹参、泽泻组成，具有“扶养心气，和通血脉”的功效^[7]。湖南中医药大学袁肇凯教授依据多年临床经验，在原方基础上加以改进，去其生地黄再加枳实以增强其破气消积、消痰散瘀之功效，取得了良好的效果。前期研究^[8]表明，养心通脉方具有改善冠心病患者血液流变学指标、抗血小板聚集、抑制炎症反应、保护冠状动脉结构、改善肠道菌群、调控表观遗传修饰等作用。本研究从脂肪因子 CTRP3 出发，观察养心通脉方对心肌能量代谢的影响，从而探讨其防治 MI 血瘀证的可能机制，为养心通脉方治疗 MI 的临床应用提供依据。本实验经湖南中医药大学动物伦理委员会审批(审批号:XMBH-201907230005)。

1 材料及方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只，6~8 周龄，体质量(220±10) g，由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供，实验动物使用许可证号：SYXK(湘)2019-0017。饲养于湖南中医药大学动物实验中心 SPF 级动物室，自由进食进水，昼夜周期 12 h，相对湿度(50±10)%，室温(22±2)℃。

1.2 药物

养心通脉方组成：人参 10 g、丹参 10 g、桂枝 10 g、枳实 10 g、泽泻 10 g，由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供、质控并鉴定。以上饮片置于圆底烧瓶中煎制，一煎按生药量加 8 倍水熬制 45 min，二煎加 4 倍水熬制 30 min，两煎所得药液混匀后，武火浓缩至含生药量 2 g/ml 的溶液。阿托伐他汀钙片(北京嘉林药业股份有限公司,批号：H20093819)，捣粉溶于蒸馏水，配制成含药物 0.2 mg/ml 的溶液。

1.3 主要试剂与仪器

维生素 D3 (批号 J14O10R99577)、异丙肾上腺素(批号 Z21N10X103254)，上海源叶生物科技有限公司；水合氯醛(批号 O/12HB4218-2017)，天津市科密欧化学试剂有限公司；BCA 蛋白定量检测试剂盒(批号 G2026)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(批号 G2003)、GAPDH 兔多克隆抗体(批号 GB13002-m)、HRP 标记山羊抗兔 IgG (批号 GB23303)、蛋白酶抑制剂(批号 G2007)、4%多聚甲醛(批号 G1101)、2.5%戊二醛固定液(批号

G1102)，武汉赛维尔生物科技有限公司；CTRP3 兔多克隆抗体(批号 SIG-3565)，深圳海思安生物技术有限公司；丙酮(批号 20200118)，国药集团化学试剂有限公司；812 包埋剂(批号 90529-77-4)，美国 SPI 公司；醋酸双氧铀(批号 SPI-02624)，海德创业北京生物科技有限公司；枸橼酸铅溶液(批号 Rbr00328)，上海榕柏生物技术有限公司；大鼠 CTRP3 (批号 210311R09)、大鼠一氧化氮(NO, 批号 210311R05)、大鼠 ATP ELISA 试剂盒(批号 210311R15)，江苏菲亚生物科技有限公司；HE 染色试剂盒(批号 C0105S)，上海碧云天生物技术有限公司。

Rt2100c 型酶标检测仪(瑞士 Rayto 公司)；HS-3345 型全自动组织切片机(金华市华速科技有限公司)；TG16W 型高速离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司)；EMUC7 型超薄切片机(德国 Leica 公司)；HT7700 型透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司)；Moticam Pro 205A 型光学显微镜(麦克奥迪医疗诊断系统有限公司)；FluorChem E 型化学发光凝胶成像系统(ProteinSimple 公司)；ECG-6511 型心电图机(上海光电仪器有限公司)；7180 型全自动生化检测仪(日本 Hitachi 公司)；SA-5600 型全自动血液流变测试仪(北京赛科希德科技发展有限公司)；JY92-IIIn 型超声细胞粉碎机(宁波新芝生物有限公司)；DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.4 动物造模

大鼠经 7 天的适应性喂养后，运用 SPSS 28.0 软件产生的随机数字表选取 12 只作为空白组，继续普通饲料喂养。剩余 38 只作为造模组，在参考文献^[9-10]基础上结合课题组前期经验^[11-12]进行 MI 血瘀证造模。方法：高脂饲料(81.3%基础饲料，10%猪油，5%白糖，3%胆固醇，0.5%胆酸钠，0.2%丙基硫氧嘧啶，定制于湖南斯莱克景达实验动物有限公司)喂养，并于实验第 1、3 天灌胃维生素 D3(0.5 g/ml)30 万 IU/kg，第 5 天再次灌胃 20 万 IU/kg；第 91 天与 92 天予以异丙肾上腺素(30 mg/kg)腹部皮下注射，继续高脂饲料喂养 14 天，造模共 106 天。造模后所有大鼠提前禁食禁水 12 h，使用 10%水合氯醛(2.5 ml/kg)腹腔注射麻醉，进行心电图监测，造模组大鼠出现 J 点上移和(或)ST 段抬高或压低改变(≥0.1 mV)可认为 MI 造模成功^[13-14]。运用 SPSS 28.0 软件生成随机数字表抽取空白组 4 只、造模组 6 只大鼠，腹主动脉采血检测

血脂水平〔包括总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、动脉粥样硬化指数(AI), $AI = (TC - HDL-C) / HDL-C$ 〕及血液流变学指标(包括血浆黏度和全血黏度)。当血脂指标中的TC、TG与LDL-C水平中至少两项显著升高,同时 $AI \geq 4$,且血液流变学指标中全血和(或)血浆黏度显著升高时,可认为血瘀证造模成功^[15]。造模期间造模组死亡4只大鼠,剩余28只大鼠。

1.5 分组及给药

对28只造模成功大鼠进行编号,运用Excel 2022软件的“RAND”函数功能^[16]随机选取其中的24只大鼠分为模型组、养心通脉方组和阿托伐他汀钙组,每组8只,剩余4只大鼠留作备用。空白组剩余8只。养心通脉方组大鼠给予养心通脉方 $12\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ ^[17]灌胃;阿托伐他汀钙组大鼠给予阿托伐他汀钙片 $1.8\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 灌胃;空白组和模型组给予 $4\text{ ml}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 蒸馏水灌胃,各组均每天1次,连续14天。

1.6 取材

大鼠禁食不禁水12 h,腹腔注射10%水合氯醛(2.5 ml/kg)麻醉,腹主动脉取血,室温静置凝固, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 3500 r/min 离心15 min(半径10 cm),取上层血清于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,以备血清NO与CTRP3的ELISA法检测。

取左心室内壁肌肉组织,剪取 $3\text{ mm}\times 3\text{ mm}\times 3\text{ mm}$ 体积的肌肉组织,迅速投入2.5%戊二醛固定液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中固定3 h,以备透射电镜观察。取0.5 g心肌组织固定于4%多聚甲醛48 h,以备HE染色。取0.2 g心尖肌肉组织,加入生理盐水充分捣碎, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 3000 r/min 离心15 min(半径10 cm),取上清液置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,以备心肌ATP的ELISA法检测。剩余心肌组织保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,以备心肌CTRP3的Western Blot法检测。

1.7 观察指标及方法

1.7.1 冠状动脉血管组织病理改变 取固定的0.5 g心肌组织,经石蜡包埋、切片(厚度 $4\text{ }\mu\text{m}$),HE染色、封片后,于高倍光学显微镜下观察冠状动脉血管组织形态学变化。

1.7.2 心肌组织线粒体超微结构 取固定的心肌组织, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液反复漂洗,依次加入50%、70%、80%、90%、95%乙醇进行上行脱水处理,每种浓度处理15 min,后在100%乙醇中处理20 min,最后转移至100%丙酮中处理20 min。

丙酮:812包埋剂=1:1渗透2 h,将样品插入加入纯812包埋剂的包埋板,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烤箱中过夜,并在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烤箱中聚合48 h后切片(厚度60 nm)。在2%醋酸双氧铀饱和酒精溶液、枸橼酸铅中各染色处理15 min,室温环境中干燥过夜,通过透射电镜观察心肌组织线粒体超微结构。

1.7.3 心肌组织ATP及血清NO、CTRP3含量 采用SPSS 28.0软件产生的随机数字表每组抽取6只大鼠的心肌组织上清液与血清样本,ELISA法检测,按照说明书步骤完成。在酶标仪450 nm处测量各孔吸光度,按照标准曲线方程确定样本浓度。

1.7.4 Western Blot法检测心肌组织CTRP3水平

采用SPSS 28.0软件产生的随机数字表抽取6只大鼠的心肌组织样本, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的PBS洗涤0.1 g心肌组织,置于匀浆器,加入含蛋白酶抑制剂的裂解液于冰上彻底匀浆。振荡后冰浴30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心10 min(半径10 cm),BCA法测上清液蛋白浓度。SDS-PAGE电泳分离,恒流200 mA 1 h转膜至活化好的PVDF膜。室温下加入5%脱脂牛奶封闭1 h,稀释CTRP3兔多克隆抗体(一抗)1000倍, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。脱色摇床上清洗5 min,反复3次,用TBST稀释HRP标记山羊抗兔IgG(二抗)6000倍,室温孵育1 h,后TBST再次清洗3次。将膜放入暗匣中曝光后显影。经成像系统采集图片后运用PhotoShop 2020、AlphaEaseFC 3.0软件整理去色并分析目标带的光密度值。

1.8 统计学方法

采用SPSS 28.0软件进行统计学分析。计量资料均符合正态分布,以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,方差齐者多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD法;方差不齐者多组间比较采用Welch检验,两两比较采用Games-Howell法。 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MI血瘀证模型构建指标结果

心电图示,与空白组比较,造模组大鼠心电图J点出现上抬,S-T段弓背向上抬高明显,幅度 $>0.1\text{ mV}$,T波高尖,其波峰程度超过R波波峰,见图1、图2。表1、表2示,与空白组比较,造模组全血黏度的各指标及TC、LDL-C与HDL-C水平,AI均显著升高($P<0.05$),提示造模成功。

2.2 各组大鼠冠状动脉血管组织病理学形态

图3示,空白组血管内壁无明显斑块附着,管



图1 空白组大鼠心电图

Figure 1 ECG of rats in the blank group



图2 造模组大鼠心电图

Figure 2 ECG of rats in the model group

表1 空白组与造模组大鼠血液流变学指标比较

Table 1 Comparison of hemorheology indexes between the blank group and the model group (mPa·s, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	血浆黏度	全血黏度		
			低切	中切	高切
空白组	4	1.47±0.07	8.70±0.44	5.13±0.22	4.03±0.17
造模组	6	1.36±0.08	11.63±1.02 ^{a)}	6.10±0.57 ^{a)}	4.80±0.43 ^{a)}

注: a) 与空白组比较, $P < 0.05$ 。

壁厚度均匀,无异常增厚,各层结构清晰完整,组织紧密连接,细胞排列有序。与空白组比较,模型组血管内膜明显增生,组织结构松散,内中外层分界模糊,部分内皮结构出现缺损,并伴有管壁明显的脂肪、炎性及泡沫细胞的浸润。与模型组比较,养心通脉方组与阿托伐他汀钙组冠脉内膜增厚程度减轻,炎性及脂肪浸润程度均有改善,各层结构可大致区分,细胞排列较为规律,但阿托伐他汀钙组仍存在内皮结构破损现象。

2.3 各组大鼠心肌组织线粒体超微结构比较

图4示,空白组心肌肌节横纹结构清楚,明带暗带交替分明,排列规律整齐,Z线与M线清晰平直。线粒体呈线性排列,数量丰富,大小均匀,外膜结构完整,线粒体嵴结构清晰且排列密集,内容物饱满,基质丰富。与空白组比较,模型组Z线与M线结构模糊,肌小节结构扭曲不规律。线粒体数

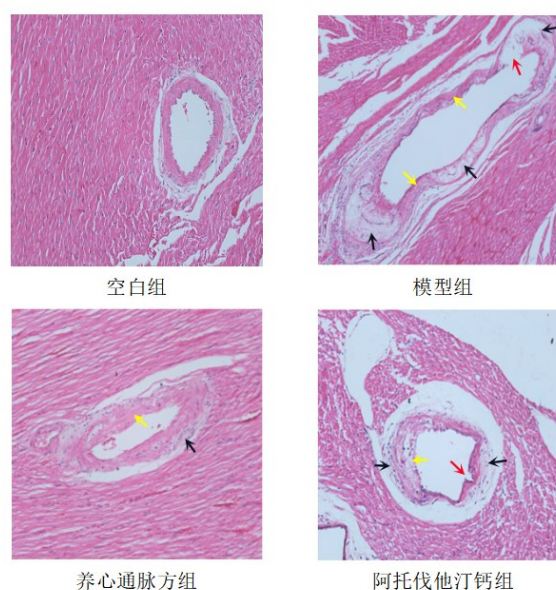
表2 空白组与造模组大鼠血脂指标比较

Table 2 Comparison of blood lipid indexes between blank group and model group

(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TC	TG	HDL-C	LDL-C	AI
空白组	4	2.63±0.17	0.60±0.24	1.01±0.38	1.45±0.14	1.80±0.73
造模组	6	14.38±7.88 ^{a)}	0.74±0.40	2.73±0.87 ^{a)}	11.85±7.64 ^{a)}	4.11±1.71 ^{a)}

注: TC, 总胆固醇; TG, 甘油三酯; HDL-C, 高密度脂蛋白胆固醇; LDL-C, 低密度脂蛋白胆固醇; AI, 动脉粥样硬化指数。

a) 与空白组比较, $P < 0.05$ 。

注: 红色箭头所指为破损的冠状动脉内皮组织; 黄色箭头所指为疏松增厚的冠状动脉内膜组织; 黑色箭头所指为浸润的脂质及泡沫细胞

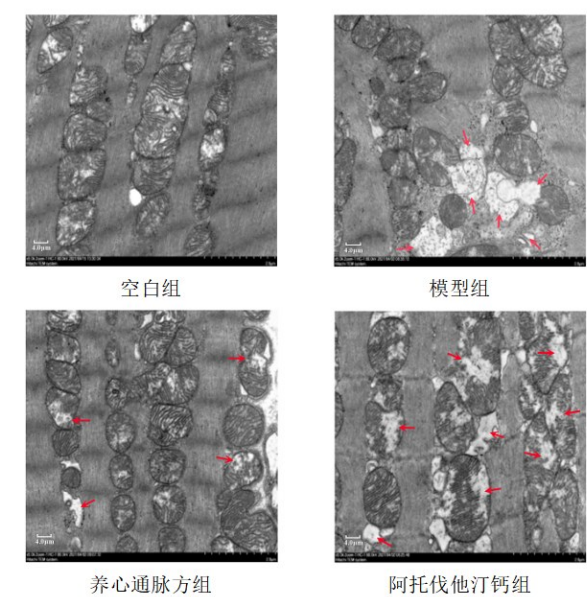
图3 各组大鼠冠状动脉病理学形态

Figure 3 Pathological morphology of coronary arteries in rats of each group (HE, $\times 200$)

量减少,散乱分布,多见聚集成簇,大小不一,结构不规则,部分线粒体水肿肿大,线粒体嵴变浅或消失,少部分线粒体外膜破碎,可见空泡结构。与模型组比较,养心通脉方组肌小节明暗分布清晰,Z线与M线结构平直,肌纤维排列紧密,线粒体数量有所增加,外膜完整,线粒体嵴结构清晰且连续;阿托伐他汀钙组肌节横纹大体恢复明暗交替的纵向排列规律,Z线与M线可基本辨识,线粒体数量较模型组有所增加,少见成团聚集情况,较多线粒体嵴结构已恢复,基质较为饱满,但与养心通脉方组相比仍有部分线粒体膜破裂而致内容物外漏的情况。

2.4 各组大鼠心肌组织ATP、CTRP3蛋白水平比较

表3示,与空白组比较,模型组心肌组织ATP、CTRP3蛋白水平明显降低($P < 0.05$)。与模型组比较,养心通脉方组和阿托伐他汀钙组ATP、CTRP3蛋白水平显著升高($P < 0.05$),其中阿托



注：红色箭头所指为膜结构被破坏的线粒体。

图4 各组大鼠心肌组织线粒体超微结构

Figure 4 Mitochondrial ultrastructure of rats myocardial tissue in each group (×5000)

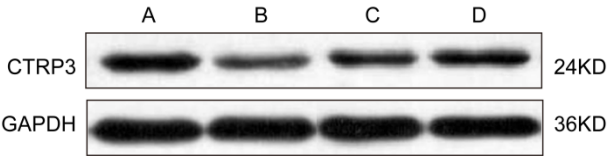
伐他汀钙组心肌组织 ATP 水平及 CTRP3 蛋白水平较养心通脉方组升高更显著 ($P<0.05$)。CTRP3 蛋白电泳图见图 5。

表3 各组大鼠心肌组织 ATP 含量、CTRP3 蛋白表达比较
Table 3 Comparison of ATP level and CTRP3 protein expression in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	ATP / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	CTRP3/GAPDH
空白组	6	2.85±0.25	0.42±0.07
模型组	6	2.07±0.56 ^{a)}	0.21±0.06 ^{a)}
养心通脉方组	6	3.16±0.27 ^{b) c)}	0.40±0.04 ^{b) c)}
阿托伐他汀钙组	6	3.53±0.54 ^{b)}	0.53±0.03 ^{b)}

注：ATP，腺嘌呤核苷三磷酸；CTRP3，C1q 肿瘤坏死因子相关蛋白 3。

a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与阿托伐他汀钙组比较， $P<0.05$ 。



注：A，空白组；B，模型组；C，养心通脉方组；D，阿托伐他汀钙组；CTRP3，C1q 肿瘤坏死因子相关蛋白 3。

图5 各组大鼠心肌组织 CTRP3 蛋白电泳结果

Figure 5 Electrophoresis of CTRP3 protein in myocardial tissue of rats in each group

2.5 各组大鼠血清 NO、CTRP3 水平比较

表4 示，与空白组比较，模型组血清 NO、CTRP3

水平降低 ($P<0.05$)。与模型组比较，养心通脉方组和阿托伐他汀钙组血清 NO、CTRP3 水平升高 ($P<0.05$)，其中阿托伐他汀钙组血清 CTRP3 水平较养心通脉方组升高更显著 ($P<0.05$)。

表4 各组大鼠血清 NO、CTRP3 水平比较
Table 4 Comparison of serum NO and CTRP3 levels of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	CTRP3 / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
空白组	6	35.42±1.45	145.26±6.01
模型组	6	19.72±2.40 ^{a)}	119.72±6.78 ^{a)}
养心通脉方组	6	27.41±4.82 ^{b)}	143.51±22.48 ^{b) c)}
阿托伐他汀钙组	6	27.55±5.70 ^{b)}	179.10±5.10 ^{b)}

注：NO，一氧化氮；CTRP3，C1q 肿瘤坏死因子相关蛋白 3。
a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与阿托伐他汀钙组比较， $P<0.05$ 。

3 讨论

MI 患者往往伴随血小板聚集程度增加，全血与血浆黏度增高，易于形成血栓阻塞冠状动脉^[18]。张仲景提出胸痹的主要病机为“阳微阴弦”，即上焦阳气不足，胸阳不振，以致阴寒及痰饮瘀血痹阻，不通则痛^[19]。研究表明，血瘀证是缺血性心脏病中最常见的中医证型，其发生率高达 77.89%^[20]。可见血行不畅、阻塞血脉是 MI（胸痹）发病的重要机制。本研究结果显示，MI 血瘀证大鼠造模后全血黏度、TC、LDL-C 明显升高，AI 指数大于 4，心电图出现 ST 段弓背向上抬高改变，提示大鼠血液处于高黏高脂状态并出现动脉硬化与心肌缺血，以上结果均符合 MI 血瘀证的典型病理表现^[21]，可为后续的药物干预提供可靠对象。

养心通脉方中人参重于益气扶正，丹参擅长活血祛瘀，二者共为君药，以奏益气活血之功效；臣药桂枝可温通经脉，助阳化气，辅助君药行气活血，通利血脉，加强振奋心阳、祛瘀通脉的效果；佐以泽泻、枳实，利水渗湿、理气化痰，在祛瘀化痰的同时可发挥行血止痛的功效，标本兼顾。因此，养心通脉方具有扶养心气、化痰祛瘀功效。而针对模型大鼠血脂、血液流变学指标的显著升高，本研究选用阿托伐他汀钙片作为阳性对照药物，该药作为防治缺血性心脏病的临床一线用药具有良好的降脂稳斑效果^[22]。本研究结果显示，与空白组比较，模型组冠状动脉内皮明显受损并伴随管壁增生狭窄，内皮舒张因子 NO 水平也明显下降，经养心通脉方与阿托伐他汀钙干预后，两组冠状动脉受损情况均得到有效改善，血清 NO 水平显著提高，

提示养心通脉方能够通过改善冠状动脉内皮损伤,舒张血管,对 MI 血瘀证发挥治疗作用。

线粒体形态结构与心脏生理病理状态高度相关,当缺血缺氧性损伤发生时,线粒体作为细胞“发动机”首先受到影响,往往出现线粒体嵴消失、线粒体膜碎裂以及线粒体排列方式改变等^[23],故而观察其形态结构与数量多少可以客观反映心肌组织受累情况。在能量代谢方面,线粒体依靠呼吸链为心肌组织的收缩功能提供了超过 90% 的 ATP,并参与调节葡萄糖和脂肪酸氧化磷酸化平衡的代谢途径^[24]。在本研究中,相较于空白组,模型组心肌纤维结构紊乱,线粒体数量减少,膜结构被大量破坏,心肌组织中 ATP 水平也显著下降,提示 MI 血瘀证的病变过程中出现了线粒体能量代谢功能的紊乱。经养心通脉方与阿托伐他汀钙片干预后,两组大鼠线粒体数量与结构均得到改善,心肌 ATP 水平增加,提示药物干预在逆转心肌缺血性损伤的同时,显著提升了心肌组织的能量代谢能力。以上结果均说明养心通脉方能够修复线粒体损伤,从形态与功能两个方面改善心肌线粒体的能量代谢作用,进而抵抗 MI 血瘀证导致的心功能异常。心肌能量代谢功能与中医“心阳”理论有共通之处^[25],同时胸痹的病机也与“心阳”之衰微关系密切,故而养心通脉方能够改善心肌能量代谢功能的药理作用也为其防治胸痹赋予了现代科学内涵。

CTRP3 是一种具有抗炎作用的脂肪因子,能够通过抑制 Toll 样受体 (TLR) 和核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路减轻全身炎症反应^[26],还可促进 3-磷酸肌醇激酶 (PI3K) /蛋白激酶 B (AKT) /内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 通路的激活,降低白细胞介素 6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的表达来抑制氧化低密度脂蛋白 (Ox-LDL) 诱导的内皮炎症,延缓动脉粥样硬化的进展^[27]。同时,CTRP3 具有抑制心肌纤维化,减轻急性心肌梗死后的病理性心肌重构、促进血管内皮生成、增强缺血心肌细胞的存活和再生的作用^[28-29]。在能量代谢方面,CTRP3 能够改善线粒体合成过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 α (PGC-1 α)、核呼吸因子 1 (NRF-1)、线粒体转录因子 A (TFAM) 等生物分子的表达,增加心肌细胞 ATP 含量和有氧呼吸速率^[30]。本研究结果显示,模型组血清 CTRP3 水平与心肌 CTRP3 蛋白表达均较空白组显著下降,而经养心通脉方与阿托伐他汀钙干预后,两组大鼠血清 CTRP3 水平与心肌 CTRP3 蛋白表达量均较模型

组得到了明显提升。提示养心通脉方与阿托伐他汀钙均能改善模型大鼠心肌能量代谢,抵抗冠状动脉内皮损伤,对 MI 血瘀证起到积极的防治作用,其机制可能与上调血清 CTRP3 水平与心肌 CTRP3 蛋白表达量有关。

本研究结果亦显示,养心通脉方在改善冠状动脉病理学结果和心肌组织线粒体超微形态结果方面表现优于阿托伐他汀钙片,同时在提升血清 NO 水平方面与阿托伐他汀钙片效果无明显差异,在一定程度上说明了养心通脉方在防治心肌及冠状动脉的器质性病变以及增加血管内皮保护因子方面已经达到或优于 MI 临床一线用药的效果,为养心通脉方在临床治疗 MI 的应用提供依据。但对于心肌组织 ATP 和 CTRP3 蛋白水平及血清 CTRP3 水平的提升程度,养心通脉方不如阿托伐他汀钙片的效果显著,这可能与该方的给药剂量与干预周期不足有关,未来可尝试比较不同给药剂量以及给药周期对疗效指标的影响,进而探索出效果最佳的给药方案;也提示他汀类降脂药物对于脂肪因子水平的调控或许具有独特优势,其具体效果及相关机制值得后续深入探究。此外本研究每组大鼠的样本量相对偏少,同时未能通过量化指标对心肌组织、线粒体以及冠脉组织的病理改变情况进行比较,对本研究结果的证据等级造成一定影响。在下阶段的研究中将运用基因敲除或过表达等方法深入开展 CTRP3 与 MI 血瘀证病理机制的相关性研究,以期对心血管疾病新靶点的探索及其中医药防治提供更多依据与思路。

利益冲突声明

本文不存在任何利益冲突。

参考文献

- [1]ARNETT DK, BLUMENTHAL RS, ALBERT MA, et al. 2019 ACC/AHA guideline on the primary prevention of cardiovascular disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on clinical practice guidelines [J]. Circulation, 2019, 140 (11):e596-e646.
- [2]ROTH GA, MENSAH GA, FUSTER V. The global burden of cardiovascular diseases and risks: a compass for global action[J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 76(25):2980-2981.
- [3]CHISTIYAKOV DA, SHKURAT TP, MELNICHENKO AA, et al. The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: a brief review [J]. Ann Med, 2018, 50

- (2):121-127.
- [4] KOLIAKI C, LIATIS S, KOKKINOS A. Obesity and cardiovascular disease: revisiting an old relationship [J]. *Metabolism*, 2019, 92: 98-107. doi: 10.1016/j.metabol.2018.10.011.
- [5] 于子璇, 张书萌, 刘佳, 等. 中药调控脂肪因子防治心血管病及其风险因素的研究进展[J]. *医学综述*, 2021, 27(22): 4531-4537.
- [6] 赵姣姣, 董建业, 柴丽丽, 等. 冠心病心绞痛中医证型分布与中药用药规律系统综述[J]. *实用中医内科杂志*, 2017, 31(2): 1-5.
- [7] 秦伯未. 谦斋医学讲稿[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1964: 12.
- [8] 江雨洁, 张书萌, 张湘卓, 等. 养心通脉方干预冠心病血瘀证的研究进展[J]. *中国中医急症*, 2021, 30(11): 2056-2059.
- [9] REUTER H. Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs [J]. *Nature*, 1983, 301(5901): 569-574.
- [10] BUJÁN J, BELLÓN JM, SABATER C, et al. Modifications induced by atherogenic diet in the capacity of the arterial wall in rats to respond to surgical insult [J]. *Atherosclerosis*, 1996, 122(2): 141-152.
- [11] 简维雄, 左和宁, 袁肇凯, 等. 心血瘀阻证动态演变过程大鼠模型的建立及方证验证评价[J]. *中医杂志*, 2015, 56(16): 1420-1424.
- [12] 周曼丽, 钱舒乐, 胡伊蕾, 等. 冠心病心血瘀阻证大鼠心肌代谢组学研究[J]. *中医杂志*, 2022, 63(10): 968-975.
- [13] 周慧明, 尼哈, 白珍, 等. 正常SD大鼠心电图Ⅱ导联参考值范围[J]. *当代医学*, 2018, 24(27): 116-119.
- [14] 孙晴, 杨蟠储, 黄培培, 等. 大鼠心肌梗死心电图演变特征及益气活血中药干预研究[J]. *中国中医药信息杂志*, 2014, 21(6): 41-44.
- [15] 梁耀月, 李佳佳, 董世芬, 等. 3种不同血瘀证动物模型的建立与评价[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(10): 1468-1473.
- [16] 周一平. 用Excel软件进行药物毒理实验的随机分组[J]. *药学进展*, 2005, 29(9): 425-427.
- [17] 曾雪芹. 从“心-肠-菌”出发探讨养心通脉方对冠心病血瘀证大鼠模型肠道微生态平衡的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2020.
- [18] AGRAWAL H, CHOY HK, LIU J, et al. Coronary artery disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(7): e185-e192.
- [19] 徐立思, 何新慧. 基于心阳功能探讨仲景“阳微阴弦”理论对冠心病治疗的启示[J]. *上海中医药杂志*, 2021, 55(11): 46-49.
- [20] 毕颖斐, 王贤良, 赵志强, 等. 冠心病现代中医证候特征的临床流行病学调查[J]. *中医杂志*, 2017, 58(23): 2013-2019.
- [21] 王阶, 熊兴江, 邢雁伟, 等. 冠心病血瘀证标准规范、生物学基础及循证评价: 基于病证结合的“证候”研究思路与方法[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(8): 1-6.
- [22] BORGHI C, LEVY BI. Synergistic actions between angiotensin-converting enzyme inhibitors and statins in atherosclerosis [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2022, 32(4): 815-826.
- [23] XIN Y, ZHANG X, LI J, et al. New insights into the role of mitochondria quality control in ischemic heart disease [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 774619. doi: 10.3389/fcvm.2021.774619.
- [24] CARRARO M, CARRER A, URBANI A, et al. Molecular nature and regulation of the mitochondrial permeability transition pore (s), drug target (s) in cardioprotection [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 144: 76-86. doi: 10.1016/j.yjmcc.2020.05.014.
- [25] 万星, 张子文, 黄雲菲, 等. 心肌线粒体能量代谢与心阳的关联性[J]. *中医研究*, 2021, 34(2): 1-4.
- [26] PEDRO-BOTET J, CLIMENT E, BENAIGES D. Atherosclerosis and inflammation. New therapeutic approaches [J]. *Med Clin (Barc)*, 2020, 155(6): 256-262.
- [27] CHEN L, QIN L, LIU X, et al. CTRP3 alleviates Ox-LDL-induced inflammatory response and endothelial dysfunction in mouse aortic endothelial cells by activating the PI3K/Akt/eNOS pathway [J]. *Inflammation*, 2019, 42(4): 1350-1359.
- [28] WU D, LEI H, WANG JY, et al. CTRP3 attenuates post-infarct cardiac fibrosis by targeting Smad3 activation and inhibiting myofibroblast differentiation [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2015, 93(12): 1311-1325.
- [29] YI W, SUN Y, YUAN Y, et al. C1q/tumor necrosis factor-related protein-3, a newly identified adipokine, is a novel antiapoptotic, proangiogenic, and cardioprotective molecule in the ischemic mouse heart [J]. *Circulation*, 2012, 125(25): 3159-3169.
- [30] ZHANG CL, FENG H, LI L, et al. Globular CTRP3 promotes mitochondrial biogenesis in cardiomyocytes through AMPK/PGC-1 α pathway [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2017, 1861(1 Pt A): 3085-3094.

Effects of *Yangxin Tongmai Formula* (养心通脉方) on Myocardial Energy Metabolism in Myocardial Infarction Model Rats with Blood Stasis Syndrome

YU Zixuan¹, ZHANG Shumeng², ZHANG Mengxue³, CHEN Yuxia¹, CHEN Xing¹, KONG Beibei⁴, CHEN Lingli⁵, LI Jie¹

1. Institute of Traditional Chinese Medicine Diagnostics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine; 3. Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; 4. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine; 5. Medical School, Hunan University of Chinese Medicine

ABSTRACT **Objective** To explore the potential mechanism of *Yangxin Tongmai Formula* (养心通脉方, YXTM) in the treatment of myocardial infarction (MI) with blood stasis syndrome (BSS). **Methods** A total of 50 rats were selected, and 38 of them were randomly selected and fed with high fat diet, using intragastric administration of vitamin D3 plus intraperitoneal injection of isoproterenol to establish the MI rat model with BSS. Twenty-four out of the 28 successfully modeled rats were randomly divided into model group, YXTM group and atorvastatin calcium group, with eight rats in each group. Eight healthy rats were selected as blank group. The YXTM group and atorvastatin calcium group were given 12 g/(kg·d) of YXTM and 1.8 mg/(kg·d) of atorvastatin calcium tablets by gavage, respectively, while the blank group and the model group were administered with 4 ml/(kg·d) of distilled water by gavage. Each group was treated once a day for 14 consecutive days. The pathological changes of coronary arteries were observed by hematoxylin and eosin (HE) staining. The number and morphology of mitochondria in myocardial tissues were observed by transmission electron microscopy. The levels of adenosine triphosphate (ATP) in myocardial tissue, serum nitric oxide (NO) and C1q tumor necrosis factor-related protein 3 (CTRP3) were detected by ELISA kit. The expression of CTRP3 protein in myocardial tissue was determined by Western blot. **Results** Compared to the blank group, the model group showed intimal thickening, endothelial damage, inflammatory infiltration and other changes; the number of myocardial mitochondria in the model group decreased, and the membrane structure became shallower, and even ruptured, with decreased ATP in myocardial tissue, serum NO level, CTRP3 protein expression in myocardial tissue, and serum CTRP3 level ($P < 0.05$). Compared to those in the model group, the coronary endothelial injury was significantly improved in the YXTM group and atorvastatin calcium group, and the arrangement of sarcomeres in myocardial tissue was regular, with increased number of myocardial mitochondria, complete structure of myocardial mitochondria, and increased content of ATP in myocardial tissue, serum NO level, CTRP3 protein expression in myocardial tissue, and serum CTRP3 level ($P < 0.05$). Compared to those in the YXTM group, the coronary artery endothelial injury and mitochondrial membrane structure damage were more severe in the atorvastatin calcium group, and the ATP level and CTRP3 protein expression level in myocardial tissue and serum level of CTRP3 significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** YXTM can significantly improve myocardial mitochondrial energy metabolism and resist endothelial injury in rats with MI and BSS, and its mechanism may be related to the increase of adipokines CTRP3 content.

Keywords myocardial infarction; blood stasis syndrome; energy metabolism; mitochondria; C1q tumor necrosis factor-related protein 3; *Yangxin Tongmai Formula* (养心通脉方)

(收稿日期: 2022-08-26; 修回日期: 2023-04-04)

[编辑: 王利芬]

更正

本刊 2023 年第 11 期《中医药干预 TLR4/NLRP3 信号通路治疗抑郁症的研究概况》英文作者署名“LIU Meijun”(第 1184 页)的单位标注有误,“1”应为“2”,即应为 Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine。

特此更正,并诚挚地向作者及读者致歉。

本刊编辑部