

参附益心颗粒对急性心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌细胞线粒体自噬的影响^Δ

曹亚选^{1*}, 郑荣菲¹, 王贺^{2#}, 曹英杰², 董文杰², 崔琳², 李彬², 陈玉善², 朱明军²(1.河南中医药大学第一临床医学院, 郑州 450099; 2.河南中医药大学第一附属医院心脏中心, 郑州 450099)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)10-1183-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.10.06



摘要 目的 研究参附益心颗粒对急性心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌细胞线粒体自噬的影响。方法 采用结扎左冠状动脉前降支的方法建立急性心肌梗死后心力衰竭大鼠模型,将造模成功的大鼠分为模型组,参附益心颗粒低、高剂量组(1.76、8.8 g/kg),福辛普利钠片组(阳性对照,4 mg/kg),另设假手术组(相同位置只穿线不结扎),每组8只。干预4周后,使用生理记录仪检测各组大鼠的血流动力学指标,观察各组大鼠心肌组织的病理学变化,检测各组大鼠心肌细胞氧化应激水平和线粒体膜电位以及心肌组织中PTEN诱导激酶1(PINK1)、E3泛素连接酶Parkin、泛素结合蛋白P62的表达水平。结果 与假手术组比较,模型组大鼠心肌纤维形态紊乱,炎症细胞浸润等病理损伤严重,其左心室收缩末期压力(LVESP)、左心室内压最大上升速率(+dp/dt_{max})、左心室内压最大下降速率(-dp/dt_{max})、左心室缺血心肌细胞总抗氧化能力、线粒体膜电位以及心肌组织中PINK1、Parkin、P62蛋白的表达水平均显著降低($P<0.01$),左心室舒张末期压力(LVEDP)、左心室缺血心肌细胞活性氧水平和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶活性均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,各药物干预组大鼠心肌组织病理损伤有所减轻,上述指标均有不同程度改善($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论 参附益心颗粒具有降低氧化应激水平、缓解急性心肌梗死后心力衰竭的作用,可能与其激活Parkin依赖性通路而增强线粒体自噬、减少线粒体功能障碍有关。

关键词 参附益心颗粒;急性心肌梗死;心力衰竭;线粒体自噬;大鼠

Effects of Shenfu yixin granule on mitochondrial autophagy of cardiomyocytes in rats with heart failure after acute myocardial infarction

CAO Yaxuan¹, ZHENG Rongfei¹, WANG He², CAO Yingjie², DONG Wenjie², CUI Lin², LI Bin², CHEN Yushan², ZHU Mingjun²(1. The First Clinical Medical School, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450099, China; 2. Heart center, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450099, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the effects of Shenfu yixin granule on mitochondrial autophagy of cardiomyocytes in rats with heart failure after acute myocardial infarction. **METHODS** The model of heart failure after acute myocardial infarction was established by ligaturing the anterior descending branch of the left coronary artery in rats. The model rats were divided into model group, Shenfu yixin granule low-dose and high-dose groups (1.76, 8.8 g/kg), Fosinopril sodium tablets group (positive control, 4 mg/kg), sham operation group was set up (only threading without ligation at the same position), with 8 rats in each group. After 4 weeks of drug intervention, the hemodynamic indexes of rats in each group were measured by physiological recorder. The pathological changes of myocardial tissue were observed in each group. The level of oxidative stress in cardiomyocytes, mitochondrial membrane potential, protein expression of PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1), E3 ubiquitin ligase Parkin and ubiquitin binding protein P62 in myocardial tissue of rats in each group were detected. **RESULTS** Compared with sham operation group, the pathological injuries such as myocardial fiber morphology disorder and inflammatory cell infiltration were serious. The left ventricular end systolic pressure (LVESP), maximum rate of rise of left ventricular internal pressure (+dp/dt_{max}), maximum rate of decrease of left ventricular internal pressure (-dp/dt_{max}), total antioxidant capacity, mitochondrial membrane potential, PINK1, Parkin and P62 protein expression were significantly decreased in model group ($P<0.01$). The left ventricular end diastolic pressure (LVEDP), the level of reactive oxygen species and the activity of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in left ventricular ischemic cardiomyocytes were significantly increased ($P<0.01$). Compared with model group, the pathological injuries of myocardial tissue in intervention groups were alleviated, and above indexes were improved in varying degrees ($P<0.01$ or $P<0.05$). **CONCLUSIONS** Shenfu yixin granule can reduce the level of oxidative stress and alleviate heart

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81603432);河南省中医药科学研究专项课题(No.2019ZY2139)

* 硕士研究生。研究方向:冠心病与心力衰竭的基础和临床。E-mail:1175595675@qq.com

通信作者:副主任医师,博士。研究方向:冠心病、心力衰竭、离子通道病的基础和临床。E-mail:ewaller@163.com

failure after acute myocardial infarction, which may be related to the activation of Parkin-dependent pathway to strengthen mitochondrial autophagy and reduce mitochondrial dysfunction.

KEYWORDS Shenfu yixin granule; acute myocardial infarction; heart failure; mitochondrial autophagy; rat

急性心肌梗死所致心力衰竭为临床常见疾病^[1]。近年来,冠心病的发病率急剧上升,心力衰竭是ST段抬高心肌梗死患者接受直接经皮冠状动脉介入治疗后住院死亡的重要独立预测因子^[2]。虽然,随着药物洗脱支架的出现和经皮机械循环支持设备的改进,急性心肌梗死的病死率大幅下降,但急性心肌梗死后心力衰竭的发生率仍然很高^[3]。据美国心脏协会预测,到2030年,全球将有超过800万成年人受到心力衰竭的困扰^[4]。近年来,心力衰竭的一系列治疗方法虽取得了一定进展,但患者预后仍不理想。因此,有必要进一步阐明心力衰竭的发病机制,寻找新的治疗靶点。

线粒体是心肌细胞能量代谢的主要部位,因此保证其数量和质量尤为重要^[5]。有研究指出,线粒体自噬对线粒体的质量控制发挥着重要作用^[6]。在生理或病理应激反应中,线粒体自噬可通过清除心脏中破碎的线粒体来维持健康的线粒体网络;一旦线粒体自噬功能受损,破碎的线粒体过度堆积就会导致心脏损伤,从而可引发心肌细胞死亡和心力衰竭^[7]。参附益心颗粒是在临床治疗心力衰竭方面具有优势的中成药^[8]。前期研究显示,该药能改善急性心肌梗死后心力衰竭大鼠的心脏功能,减轻其心肌纤维化程度,对心室重构有抑制作用,具有抗心力衰竭的效果^[9-10]。但是,参附益心颗粒的抗心力衰竭作用是否与线粒体自噬有关尚不清楚。PTEN诱导激酶1(PTEN-induced putative kinase 1, PINK1)/E3泛素连接酶Parkin通路是线粒体自噬的经典通路^[11],本研究选择参附益心颗粒作为干预药物,以急性心肌梗死后心力衰竭大鼠为对象,通过检测其血流动力学指标、心肌组织病理学指标、心肌细胞氧化应激水平、心肌细胞线粒体膜电位和心肌组织中PINK1、Parkin、泛素结合蛋白P62的表达水平,探讨参附益心颗粒对急性心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌细胞线粒体自噬功能的影响,以期阐明急性心肌梗死后心力衰竭的发病机制提供依据和新的方向。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有TKR-200C型小动物简易呼吸机(美国Harvard Apparatus公司),SpectraMax M3型荧光酶标仪(美国Molecular Devices公司),PowerPac HC型蛋白电泳与转膜装置(美国Bio-Rad公司),Image Scanner III型灰度扫描仪(美国GE公司),PowerLab型生理记录仪(上海然哲仪器设备有限公司),Multifuge X1R型离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司),RCO-3000TVBB型二氧化碳(CO₂)培养箱(美国Revco公司),DMI 3006型激光共聚焦显微镜(德国Leica公司),KZ-II型研磨器(武汉赛维尔生物科技有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

参附益心颗粒(批号131101,1 g相当于生药总量

9.5 g)由山东步长制药集团提供;福辛普利钠片(阳性对照药,批号ABS6325,规格10 mg/片)购自中美上海施贵宝制药有限公司;苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色试剂盒(货号G1120)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号PC0020)均购自北京索莱宝科技有限公司;活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(货号S0033S)、细胞总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)检测试剂盒(货号S0121)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)检测试剂盒(货号S0179)、胰酶消化液(货号C0201)均购自上海碧云天生物技术有限公司;JC-1线粒体膜电位检测试剂盒(货号T4069)、兔抗大鼠 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(货号ABT264)均购自美国Sigma公司;戊巴比妥钠(批号57330)购自天津市恒兴化学试剂制造有限公司;兔抗大鼠PINK1单克隆抗体(货号ab216144)、兔抗大鼠Parkin单克隆抗体(货号ab77924)、兔抗大鼠P62单克隆抗体(货号ab240635)均购自英国Abcam公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(货号7074P2)购自美国Cell Signaling Technology公司;其余试剂均为实验室常用规格,水为蒸馏水。

1.3 实验动物

SPF级成年雄性SD大鼠(体质量180~220 g)购自郑州市惠济区华兴实验动物养殖场,动物生产许可证号为SCXK(豫)2019-0002。所有大鼠均饲养于SPF级环境中。动物实验方案经河南中医药大学第一附属医院实验动物福利伦理审查委员会批准,批件号为YFY-DW2020019。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

采用结扎左冠状动脉前降支的方法建立急性心肌梗死后心力衰竭大鼠模型。用2%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠后,备皮、消毒,行气管插管,外接小动物简易呼吸机,待其呼吸平稳后,在左侧胸部从右下至左上做一斜行切口,逐层分离胸肌后,在第4肋间以手术刀沿下位肋骨上缘切开肋间肌进入胸腔,扩大第4、5肋间隙并固定后用镊子撕开心包,将心脏挤出后,在左心耳与肺动脉圆锥之间平左心耳下缘1 mm处迅速结扎左冠状动脉前降支近端,同时观察心电图变化,术后立即关闭胸腔并用注射器抽出胸腔内气体,以恢复胸腔负压,将肌肉层和皮肤分别缝合。术后经心脏超声检查,若大鼠左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF) < 50%,则判定造模成功^[12]。将造模成功的大鼠分为模型组、参附益心颗粒低剂量组(1.76 g/kg)、参附益心颗粒高剂量组(8.8 g/kg)、福辛普利钠片组(4 mg/kg),另设假手术组(大鼠相同位置只穿线不结

扎),每组8只。给药前,取各药物适量,充分溶解于水中,配制成质量浓度分别为0.176 g/mL(参附益心颗粒低剂量组)、0.88 g/mL(参附益心颗粒高剂量组)、0.4 mg/mL(福辛普利钠片组)的混悬液。假手术组和模型组灌胃水(1 mL/100 g),各药物组灌胃相应混悬液(1 mL/100 g),每天1次,连续4周。其中,参附益心颗粒高剂量相当于人每1 kg体重临床用药剂量的5倍;参照《动物实验方法学》,大鼠的等效剂量相当于人的6.3倍。成人(体重60 kg)福辛普利钠片临床用药剂量为每天40 mg,换算成大鼠等效剂量约为4 mg/kg。

2.2 血流动力学指标的检测

药物干预4周后,称定各组大鼠体质量,腹腔注射2%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,并仰卧固定于试验台上。经大鼠右侧颈动脉插入导管,连接生理记录仪,记录大鼠的各项指标,包括左心室收缩末期压力(left ventricular end systolic pressure, LVESP)、左心室舒张末期压力(left ventricular end diastolic pressure, LVEDP)、左心室内压最大上升速率(+dp/dt_{max})、左心室内压最大下降速率(-dp/dt_{max})。

2.3 缺血心肌组织病理学观察

取“2.2”项下麻醉后的大鼠,于腹主动脉采血,采尽血液后,开胸取出大鼠心脏,用磷酸盐缓冲液(pH7.4,下同)冲洗干净并立即置于4%多聚甲醛组织固定液中固定48 h。随后,取出心肌组织标本,脱水,常规石蜡包埋,切片(厚度4 μm),经HE染色后,置于激光共聚焦显微镜下观察各组大鼠心肌组织病理损伤情况。

2.4 缺血心肌细胞氧化应激水平的检测

2.4.1 ROS水平 按ROS检测试剂盒说明书检测各组大鼠心肌细胞内ROS水平。药物干预4周后,取各组大鼠心肌缺血区域组织(假手术组取与模型组缺血区域相同部位组织)适量,剪碎,加入适量的胰酶消化液,于37℃下混合裂解并过滤后,以1 200 r/min离心10 min,弃去上清液,沉淀用无血清培养液制成 1×10^5 个/mL单细胞悬液。按照体积比1:1 000[2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA):无血清培养液]用无血清培养液稀释DCFH-DA探针,将单细胞悬液加至稀释好的DCFH-DA探针溶液(终浓度为10 μmol/L)中,于37℃培养箱内孵育20 min后,使用荧光酶标仪于525 nm波长处测定细胞内的荧光值(fluorescence units, FU)。将各组检测完的细胞于4℃下裂解后以13 000 r/min离心15 min,收集上清液。用BCA法检测总蛋白含量,以FU与蛋白含量的比值作为ROS水平的定量依据。

2.4.2 T-AOC水平 按T-AOC检测试剂盒说明书方法配制标准液及染色工作液。药物干预4周后,取各组大鼠心肌缺血区域组织(假手术组取与模型组缺血区域相同部位组织)适量,每20 mg组织加入100 μL磷酸盐缓

冲液,于4℃下匀浆后再以12 000 r/min离心5 min,取上清液作为样品,备用。按试剂盒说明书步骤在每个标准品孔内加入标准液20 μL,在每个样品测试孔内加入上述样品20 μL,室温孵育15 min后,使用荧光酶标仪于515 nm波长处测定各孔的光密度(optical density, OD)值,根据标准曲线计算各组样品的T-AOC水平。

2.4.3 NADPH氧化酶活性 按NADPH检测试剂盒说明书方法配制标准溶液和反应混合物。药物干预4周后,取各组大鼠心肌缺血区域组织(假手术组取与模型组缺血区域相同部位组织)适量,每20 mg组织加入400 μL NADPH提取液,冰上匀浆后,于4℃下以12 000 r/min离心5 min,取上清液作为待测样品,备用。设置空白对照孔(NADPH提取液)、标准溶液孔(标准溶液)和待测样品孔(待测样品),各孔加入相应液体50 μL后,再加入NADPH反应混合物100 μL,室温避光反应20 min后,使用荧光酶标仪于460 nm波长处测定各孔的OD值,根据标准曲线计算各组样品的NADPH氧化酶活性。

2.5 线粒体膜电位的检测

按照JC-1线粒体膜电位检测试剂盒说明书提取样品,配制JC-1工作液。药物干预4周后,取各组大鼠心肌缺血区域组织(假手术组取与模型组缺血区域相同部位组织)50 mg,剪碎后分别置于线粒体提取专用研磨器中,并采用荧光酶标仪(单体:激发光490 nm,发射光530 nm;聚合物:激发光525 nm,发射光590 nm)检测大鼠线粒体膜电位(以OD值表示)。

2.6 缺血心肌组织中PINK1、Parkin、P62蛋白表达的检测

采用Western blot法检测各组大鼠心肌组织中PINK1、Parkin、P62蛋白的表达水平。药物干预4周后,取各组大鼠心肌缺血区域组织(假手术组取与模型组缺血区域相同部位组织)适量,剪碎后于4℃下匀浆,再以12 000 r/min离心10 min,取上清液,提取心肌组织总蛋白。采用BCA法测定蛋白浓度后加入上样缓冲液,于沸水中变性15 min后,置于-20℃冰箱中保存,备用。取各组大鼠蛋白经凝胶电泳分离后,转至硝酸纤维素膜上,以5%脱脂牛奶在室温下封闭1 h;倒掉5%脱脂牛奶,用TBST缓冲液洗膜5 min×3次,加入相应一抗(PINK1、Parkin、P62一抗的稀释比例为1:500,β-actin一抗的稀释比例为1:1 000),4℃孵育过夜;加入相应二抗(稀释比例为1:500),室温孵育1 h,同法洗膜后使用灰度扫描仪进行扫描显影,采用Image J软件计算条带灰度值,并以目标蛋白与内参蛋白(β-actin)的灰度值比值作为目标蛋白的表达水平。

2.7 统计学方法

使用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 参附益心颗粒对急性心肌梗死后心力衰竭大鼠血流动力学指标的影响

与假手术组比较,模型组大鼠的LVESP、+dp/dt_{max}、-dp/dt_{max}均显著降低,LVEDP显著升高($P<0.01$);与模型组比较,参附益心颗粒高剂量组和福辛普利钠片组大鼠的LVESP、+dp/dt_{max}、-dp/dt_{max}(福辛普利钠片组除外)均显著升高,LVEDP均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表1。

表1 参附益心颗粒对急性心肌梗死后心力衰竭大鼠血流动力学指标的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	LVESP/ mmHg	LVEDP/ mmHg	+dp/dt _{max} / (mmHg/s)	-dp/dt _{max} / (mmHg/s)
假手术组	118.95±3.27	2.93±1.10	5 152.03±100.79	4 375.77±352.35
模型组	84.14±4.54 ^a	12.29±2.20 ^a	3 910.53±181.36 ^a	3 167.85±160.90 ^a
参附益心颗粒低剂量组	84.91±5.72	12.64±1.96	3 938.48±227.81	3 177.09±186.47
参附益心颗粒高剂量组	97.79±5.74 ^a	7.13±1.24 ^a	4 243.80±276.53 ^a	3 506.24±130.12 ^a
福辛普利钠片组	94.07±4.54 ^a	7.10±1.31 ^b	4 249.75±240.63 ^a	3 461.58±150.15

1 mmHg=0.133 kPa;a:与假手术组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.01$;c:与模型组比较, $P<0.05$

3.2 参附益心颗粒对急性心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌组织病理形态学的影响

假手术组大鼠心肌组织完整,心肌纤维排列规则;模型组大鼠心肌纤维形态紊乱,炎症细胞浸润等病理损伤严重。与模型组相比,各药物干预组大鼠心肌组织病理损伤有所减轻。结果见图1。

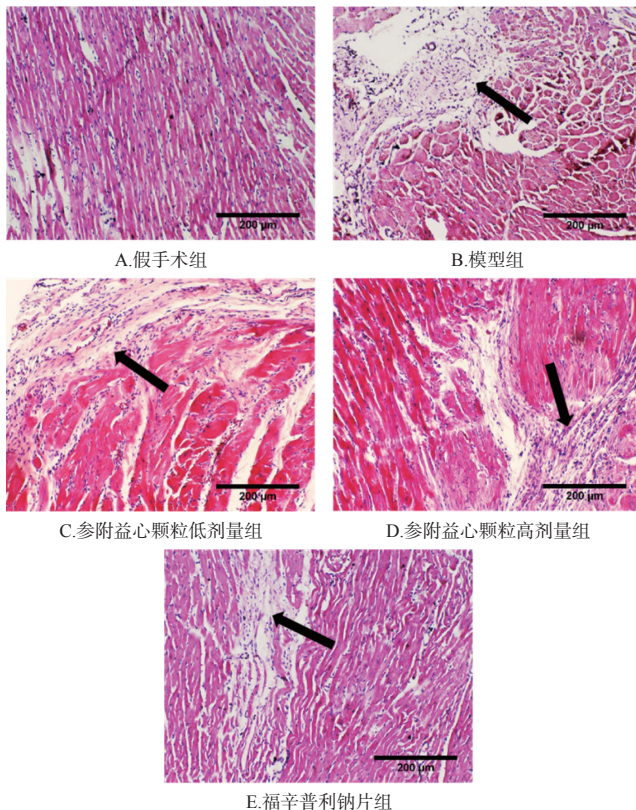


图1 参附益心颗粒对急性心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌组织病理形态学的影响(HE染色)

3.3 参附益心颗粒对急性心肌梗死后心力衰竭大鼠缺血心肌细胞氧化应激水平的影响

与假手术组比较,模型组大鼠缺血心肌细胞中ROS水平和NADPH氧化酶活性均显著升高,T-AOC水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,各药物干预组大鼠缺血心肌细胞中ROS水平(参附益心颗粒低剂量组除外)和NADPH氧化酶活性均显著降低,T-AOC水平均显著升高($P<0.01$)。结果见表2。

表2 参附益心颗粒对急性心肌梗死后心力衰竭大鼠缺血心肌组织氧化应激水平的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	ROS水平	T-AOC/(nmol/mg)	NADPH氧化酶/($\mu\text{mol/L}$)
假手术组	10.28±1.56	0.46±0.08	2 832.55±189.30
模型组	39.66±2.07 ^a	0.13±0.03 ^a	5 212.95±309.86 ^a
参附益心颗粒低剂量组	34.84±3.45	0.23±0.04 ^b	4 183.55±290.60 ^b
参附益心颗粒高剂量组	21.70±4.27 ^b	0.34±0.03 ^b	3 358.39±319.84 ^b
福辛普利钠片组	21.17±4.73 ^b	0.34±0.04 ^b	3 560.34±303.38 ^b

a:与假手术组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.01$

3.4 参附益心颗粒对急性心肌梗死后心力衰竭大鼠缺血心肌组织线粒体膜电位的影响

与假手术组比较,模型组大鼠的缺血组织心肌细胞线粒体膜电位显著降低($P<0.01$);与模型组比较,各药物干预组大鼠缺血心肌组织线粒体膜电位均显著升高($P<0.01$)。结果见表3。

表3 参附益心颗粒对急性心肌梗死后心力衰竭大鼠缺血组织心肌细胞线粒体膜电位的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	线粒体膜电位	组别	线粒体膜电位
假手术组	5.85±0.73	参附益心颗粒高剂量组	5.06±0.14 ^b
模型组	2.14±0.36 ^a	福辛普利钠片组	4.00±0.36 ^b
参附益心颗粒低剂量组	4.01±0.22 ^b		

a:与假手术组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.01$

3.5 参附益心颗粒对急性心肌梗死后心力衰竭大鼠缺血心肌组织中PINK1、Parkin、P62蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠缺血组织中PINK1、Parkin、P62蛋白的表达水平均显著降低($P<0.01$);与模型组比较,各药物干预组大鼠缺血组织中的PINK1、Parkin、P62蛋白(参附益心颗粒低剂量组除外)的表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图2、图3。

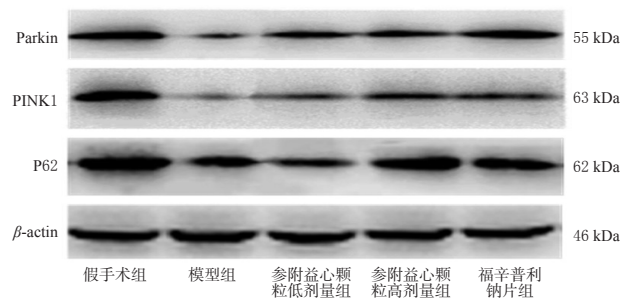
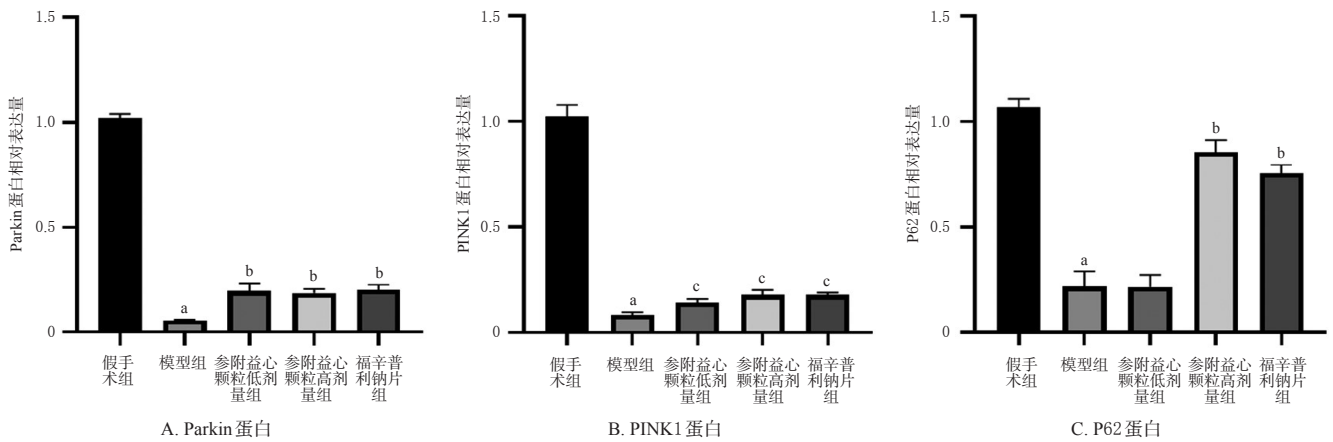


图2 参附益心颗粒对急性心肌梗死后心力衰竭大鼠缺血心肌组织PINK1、Parkin、P62蛋白表达影响的电泳图



a: 与假手术组比较, $P < 0.01$; b: 与模型组比较, $P < 0.01$; c: 与模型组比较, $P < 0.05$

图3 参附益心颗粒对急性心肌梗死后心力衰竭大鼠缺血心肌组织中线粒体自噬相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

4 讨论

心力衰竭是临床心血管疾病发展的最终结果,因高发率、高病死率和高再住院率而成为全世界迫切需要关注的公共卫生问题^[13]。近年来,心力衰竭的一系列治疗方法虽取得了一定进展,但患者预后仍不理想^[3-4]。越来越多的证据表明,线粒体功能障碍与心力衰竭的进展密切相关^[14]。自噬能够促进功能障碍线粒体的消除,溶酶体降解后形成的小分子可被细胞重新利用,从而产生新的线粒体,以维持线粒体稳态,减少氧化应激^[15]。因此,作为线粒体质量控制的重要组成部分,线粒体自噬成为了目前心力衰竭相关研究的重点^[16]。

有学者认为,气虚阳虚、血瘀水停是急性心肌梗死后心力衰竭的主要中医证候,可通过益气温阳、活血利水来有效改善患者的临床症状^[17]。参附益心颗粒(原心衰康冲剂)是在我院名老中医孙建芝教授经验方的基础上开发而成,方中人参、南黄芪益气,白附片温肾阳、通心脉,赤芍活血化瘀,葶苈子、玉米须化湿利水、泻肺逐饮,全方针对气虚血瘀、阳虚水泛型心力衰竭患者的临床效果显著^[18]。本课题组前期研究表明,参附益心颗粒在稳定线粒体膜电位、调节心肌细胞线粒体蛋白表达、提高心肌三磷酸腺苷含量、改善缺氧心肌细胞能量代谢等方面发挥了重要作用^[19]。

LVESP、LVEDP、 $\pm dp/dt_{max}$ 等血流动力学指标是评价心力衰竭患者治疗效果以及预后的重要指标^[20]。本研究通过检测各组大鼠血流动力学指标发现,模型组大鼠LVESP、 $+dp/dt_{max}$ 和 $-dp/dt_{max}$ 均显著降低,LVEDP显著升高,说明模型组大鼠左心室的收缩功能明显减弱;经过高剂量的参附益心颗粒或福辛普利钠片干预后,大鼠LVESP、 $+dp/dt_{max}$ 和 $-dp/dt_{max}$ (福辛普利钠片组除外)均显著提高,LVEDP均显著降低,说明参附益心颗粒和福辛普利钠片能够改善心力衰竭大鼠左心室的收缩功能,其中高剂量参附益心颗粒的效果较优。

进一步通过HE染色观察发现,与假手术组比较,模型组大鼠心肌纤维形态紊乱,炎症细胞浸润严重;经过不同剂量参附益心颗粒或福辛普利钠片干预后,大鼠心

肌组织坏死、水肿和炎症细胞浸润程度明显减轻,说明参附益心颗粒和福辛普利钠片能明显改善大鼠心肌组织的病理损伤。氧化应激是心力衰竭发生发展的重要机制之一,降低心肌细胞氧化应激水平能够在一定程度上缓解心力衰竭的症状^[21]。本研究发现,参附益心颗粒和福辛普利钠片能显著降低急性心肌梗死后心力衰竭大鼠缺血心肌细胞中ROS水平(参附益心颗粒低剂量组除外)和NADPH氧化酶活性,并可显著提高T-AOC水平,说明参附益心颗粒能提高模型大鼠心肌组织的总抗氧化能力,缓解心肌细胞的过氧化损伤。心肌细胞线粒体损伤是心力衰竭病理生理机制之一^[22]。本实验通过检测缺血心肌细胞线粒体膜电位发现,与假手术组比较,模型组大鼠缺血心肌细胞线粒体膜电位显著降低;经过不同剂量参附益心颗粒或福辛普利钠片干预后,线粒体膜电位明显提高,其中高剂量参附益心颗粒的效果较优。说明参附益心颗粒和福辛普利钠片能明显提高缺血心肌细胞的线粒体膜电位,减轻心肌细胞线粒体损伤。

有学者认为,线粒体自噬主要分为Parkin依赖性通路和Parkin非依赖性通路,其中PINK1/Parkin通路是最为常见的线粒体自噬途径^[23]。在正常线粒体中,PINK1从线粒体外膜转运到内膜上,被线粒体泛素-蛋白酶体系统降解;在功能受损的线粒体中,PINK1转运受阻,PINK1不能有效地转运至线粒体内膜进行降解,导致PINK1在线粒体外膜累积,在线粒体外膜累积的PINK1能够招募Parkin转运至线粒体表面并激活,通过P62与微管相关蛋白轻链3结合,介导功能失调线粒体进入自噬体^[16]。P62在线粒体自噬过程中起到连接作用,研究表明,敲除P62编码基因将使受损线粒体的清除完全受阻^[24]。可见,在Parkin依赖性信号通路介导的线粒体自噬中,P62必不可少。本研究为探索参附益心颗粒的抗心力衰竭作用是否与PINK1/Parkin通路有关,分别检测了各组大鼠心肌组织中PINK1、Parkin、P62蛋白的表达水平。结果发现,与假手术组比较,模型组大鼠缺血心肌组织中PINK1、Parkin、P62蛋白的表达水平均显著降

低;经参附益心颗粒或福辛普利钠片干预后,大鼠缺血心肌组织中上述大部分指标水平均显著逆转,这说明参附益心颗粒和福辛普利钠片的抗心力衰竭作用可能与激活PINK1/Parkin通路有关。此外有文献报道,晚期心力衰竭患者体内PINK1蛋白的表达水平显著降低,且其线粒体自噬效率低下,而PINK1和Parkin的正常表达可以减轻心肌细胞的损伤、延缓心力衰竭的发展、延长患者的生命^[25],本研究结果与之有相似之处,提示PINK1、Parkin蛋白表达水平的下调有可能是导致线粒体自噬障碍和加重心力衰竭的重要原因。

综上所述,参附益心颗粒具有降低氧化应激水平、缓解急性心肌梗死后心力衰竭的作用,可能与该药激活Parkin依赖性通路而增强线粒体自噬、减轻线粒体功能障碍有关。另外,本研究也存在一定局限性:(1)未使用线粒体自噬抑制剂来进一步验证;(2)未进行离体细胞实验。今后需要多层次进一步研究参附益心颗粒对心力衰竭后心肌细胞线粒体自噬的影响。

参考文献

[1] EZEKOWITZ J A, KAUL P, BAKAL J A, et al. Declining in-hospital mortality and increasing heart failure incidence in elderly patients with first myocardial infarction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 53(1): 13-20.

[2] AUFFRET V, LEURENT G, GILARD M, et al. Incidence, timing, predictors and impact of acute heart failure complicating ST-segment elevation myocardial infarction in patients treated by primary percutaneous coronary intervention[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 221: 433-442.

[3] STONE G W, SELKER H P, THIELE H, et al. Relationship between infarct size and outcomes following primary PCI: patient-level analysis from 10 randomized trials[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 67(14): 1674-1683.

[4] ABUDUREYIMU M, YU W J, CAO R Y, et al. Berberine promotes cardiac function by upregulating PINK1/parkin-mediated mitophagy in heart failure[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 565751.

[5] LI A, GAO M, JIANG W T, et al. Mitochondrial dynamics in adult cardiomyocytes and heart diseases[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 584800.

[6] ZHU H, TOAN S, MUI D, et al. Mitochondrial quality surveillance as a therapeutic target in myocardial infarction[J]. *Acta Physiol(Oxf)*, 2021, 231(3): e13590.

[7] SAITO T, SADOSHIMA J. Molecular mechanisms of mitochondrial autophagy/mitophagy in the heart[J]. *Circ Res*, 2015, 116(8): 1477-1490.

[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] 王新陆,李彬,谢世阳,等.参附益心方对心肌梗死后心力衰竭大鼠心功能及能量代谢相关因子的影响[J]. *中国中医药杂志*, 2021, 36(5): 2521-2525.

[10] 程彦玲,谢世阳,王小晓,等.参附益心颗粒对心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响[J]. *中医杂志*, 2020, 61

(1): 68-73.

[11] KULEK A R, ANZELL A, WIDER J M, et al. Mitochondrial quality control: role in cardiac models of lethal ischemia-reperfusion injury[J]. *Cells*, 2020, 9(1): 214.

[12] 闫奎坡,朱翠玲,孙彦琴,等.两种冠状动脉结扎法制作大鼠急性心肌梗死模型的比较[J]. *国际心血管病杂志*, 2016, 43(2): 107-109.

[13] DEVORE A D, GRANGER B, HERNANDEZ A F. A hospital and postdischarge quality improvement intervention and outcomes and care for patients with heart failure with reduced ejection fraction-reply[J]. *JAMA*, 2021, 326(19): 1977.

[14] FAN H L, HE Z J, HUANG H F, et al. Mitochondrial quality control in cardiomyocytes: a critical role in the progression of cardiovascular diseases[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 252.

[15] MORALES P E, ARIAS-DURÁN C, ÁVALOS-GUAJARDO Y, et al. Emerging role of mitophagy in cardiovascular physiology and pathology[J]. *Mol Aspects Med*, 2020, 71: 100822.

[16] WU H, YE M, LIU D, et al. UCP2 protect the heart from myocardial ischemia/reperfusion injury via induction of mitochondrial autophagy[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 15455-15466.

[17] 郑荣菲,曹亚选,王贺,等.参附益心颗粒对心梗后心衰大鼠KATP通道的作用[J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(4): 819-821.

[18] 晋献春,孙建芝,朱明军,等.心衰康治疗充血性心力衰竭的临床研究[J]. *中国中医药科技*, 1997, 4(5): 266-268, 5.

[19] 谢世阳,王幼平,崔琳,等.参附益心颗粒对心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌线粒体呼吸功能的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2020, 40(1): 59-64.

[20] 祁莉萍,刘宏伟,洪昌明,等.早期有创脉搏指示连续心输出量监测对老年冠心病重症心力衰竭患者预后的影响[J]. *中华保健医学杂志*, 2020, 22(1): 19-22.

[21] AMIR O, PAZ H, ROGOWSKI O, et al. Serum oxidative stress level correlates with clinical parameters in chronic systolic heart failure patients[J]. *Clin Cardiol*, 2009, 32(4): 199-203.

[22] 李琪琳,胡元会,王欢,等.中医药防治心力衰竭心肌线粒体损伤的研究进展[J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41(11): 1813-1816.

[23] 周爽,蒋智渊,钟国强.线粒体自噬与心力衰竭[J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(5): 924-929, 935.

[24] 孙秀玉,徐俊,吴有熹,等.基于线粒体质量控制的茛菪苷抗心肌缺血/再灌注损伤的机制研究[J]. *中草药*, 2018, 49(18): 4337-4343.

[25] WANG B, NIE J L, WU L J, 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.

(收稿日期:2021-12-31 修回日期:2022-04-06)
(编辑:曾海蓉)