

- [7] Guzik TJ, Marvar PJ, Gzesnikiewicz GM, et al. Perivascular adipose tissue as a messenger of the brain-vessel axis: role in vascular inflammation and dysfunction[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2007, 58(4): 591-610.
- [8] 朱梅, 兰希发. G-CSF 对血管性痴呆大鼠海马 Ach 含量及 CHAT 活性的影响[J]. *疑难病杂志*, 2012, 11(10): 772-774.
- [9] 刘春丽, 陈虹, 姜勇, 等. 松果菊苷对脑缺血大鼠海马、纹状体胆碱、乙酰胆碱水平的影响[J]. *药学报*, 2013, 48(5): 790-793.
- [10] Head E, Corrada MM, Kahle WK, et al. Synaptic proteins, neuropathology and cognitive status in the oldest-old[J]. *Neurobiol Aging*, 2009, 30(7): 1125-1134.
- [11] Jacobsen JS, Wu CC, Redwine JM, et al. Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(13): 5161-5166.
- [12] Masliah E, Mallory M, Alford M, et al. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease[J]. *Neurology*, 2001, 56: 127-129.
- [13] Meck WH, William CL, Cermak JM, et al. Developmental period of choline sensitivity provide an ontogenetic mechanism for regulating memory capacity and age-related dementia[J]. *Front Integr Neurosci*, 2007, 1(1): 7.
- [14] 吴俊芳. 现代神经科学研究方法[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2006: 705-707.

(编辑: 宋威)

益气温阳活血法对心力衰竭大鼠心肌细胞线粒体通透性转变的影响

王陵军, 冼绍祥, 高梦夕, 孙敬和, 陈洁 (广州中医药大学第一附属医院, 广州中医药大学国家重点学科中医内科学实验室, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 观察益气温阳活血法对心力衰竭大鼠心肌细胞线粒体通透性转变的作用。**方法** 将 SD 大鼠随机分为对照组、模型组, 心阳片低、中、高剂量组, 每组 6 只。除对照组开腹后不行腹主动脉缩窄术, 其余大鼠采用腹主动脉缩窄术复制心力衰竭模型, 心阳片低、中、高剂量组分别给予心阳片 140, 281, 562 mg·kg⁻¹, 连续 2 周。采用心脏彩超检测各组大鼠心功能, 观察各组心肌细胞线粒体在 CaCl₂ 作用 15 min 后, 540 nm 吸光值的变化值检测各组心肌细胞线粒体通透性(MPT)转变。通过荧光素-荧光素酶的方法检测心肌细胞三磷酸腺苷(ATP)的含量。**结果** 模型组左室射血分数(LVEF)和左室短轴缩短率(LVFS)较对照组显著降低($P<0.01$); 心阳片低、中、高剂量组 LVEF 和 LVFS 较模型组均显著增加($P<0.01$)。模型组心肌细胞 MPT 较对照组显著增加($P<0.01$), 而心阳片中、高剂量组 MPT 较模型组显著减少($P<0.01$)。模型组心肌细胞 ATP 含量较对照组显著减少($P<0.01$), 而心阳片低、中、高剂量组 ATP 含量较模型组均显著增加($P<0.01$)。**结论** 益气温阳活血法代表方心阳片具有抑制心衰大鼠心肌细胞线粒体通透性转变, 改善心功能的作用。

关键词: 益气; 温阳; 活血; 心力衰竭; 线粒体通透性转变

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)03-0276-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.009

Therapy of Benefiting Qi, Warming Yang and Activating Blood in Inhibiting Mitochondrial Permeability Transition in Cardiomyocytes of Heart Failure Rats

WANG Lingjun, XIAN Shaoxiang, GAO Mengxi, SUN Jinghe, CHEN Jie (The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, State Key Laboratory of Chinese Internal Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of therapy of benefiting qi, warming yang and activating blood on

收稿日期: 2013-10-28

作者简介: 王陵军, 男, 副研究员, 研究方向: 心血管疾病的发病机制及中医药防治研究。Email: smu868@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81373570); 国家自然科学基金青年科学项目(81102585); 中国博士后科学基金(20110490871); 广东省自然科学基金项目(S2011040003510)。

mitochondrial permeability transition in cardiomyocytes of heart failure(HF) rats. **Methods** Thirty SD rats were evenly randomized into five groups, blank control group, heart failure group, and low-, middle- and high-dosage *Xinyang* tablet(XT) groups. Rats except for the blank control group were given abdominal aorta constriction to induce heart failure, and then were fed orally with normal saline or ST at the dosage of 140, 281, 562 mg·kg⁻¹ respectively for 2 continuous weeks according to the experimental design. The rats of the blank control group only had the belly cut open. We examined the heart function of rats in three groups by color ultrasonography, analyzed the mitochondrial permeability transition(MPT) by observing the optical absorption value at 540 nm after myocardial cell mitochondria were cocultured with CaCl₂ for 15 min, and detected the intracellular ATP content in the cardiomyocytes of HF rats by luciferin- luciferase method. **Results** Heart failure group had lower left ventricular ejection fraction(LVEF) and left ventricular fractional shortening(LVFS)than the blank control group($P<0.01$), while XT groups had higher LVEF and LVFS than the heart failure group($P<0.01$). MPT was increased in heart failure group($P<0.01$ compared with that in the blank control group), and then was decreased by middle- and high-dosage XT($P<0.01$ compared with that in the heart failure group). ATP content was decreased in heart failure group($P<0.01$ compared with that in the blank control group), and then was increased by low-, middle- and high-dosage XT($P<0.01$ compared with that in the heart failure group). **Conclusion** *Xinyang* tablet, a representative prescription of therapy of benefiting qi, warming yang and activating blood, can improve cardiac function through inhibiting the mitochondrial permeability transition in cardiomyocytes of heart failure rats.

Keywords: Benefiting qi; Warming yang; Activating blood; Heart failure; Mitochondrial permeability transition

近年来心力衰竭(简称心衰)的发病率逐步增加。在我国,成年人心衰的患病率为 0.9%,目前 35~74 岁成年人有 420 万心衰患者^[1],随着我国人口的快速老龄化,心衰的患病率还会显著上升。心衰正成为我国心血管病领域的重要公共卫生问题。线粒体含有内膜和外膜,外膜对低分子溶质具有非特异的通透性,但内膜除了对特殊的载体外是不具有通透性的。在某些病理因素作用下线粒体通透性转变孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)开放将导致线粒体通透性转变(mitochondrial permeability transition, MPT)。MPTP 开放会引起线粒体肿胀、线粒体膜电位降低、氧化磷酸化脱耦联,导致三磷酸腺苷(ATP)生成减少。MPT 与心肌细胞凋亡、坏死等密切相关。抑制心肌细胞线粒体通透性转变可有效改善心功能。心阳片在临床上治疗心衰已取得了良好的效果。本研究旨在探讨心阳片对心衰大鼠心肌细胞 MPT 的作用,以揭示益气温阳活血法防治心衰的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物 SD 大鼠 30 只,雄性,SPF 级,体质量 250~300 g,购于广东省医学实验动物中心,动物合格证号:0094274,0094682。

1.2 试剂及仪器 线粒体分离试剂盒,美国 Sigma 公司,批号:MITOISO1;ATP 检测试剂盒,碧云天生物技术有限公司,批号:S0026;心阳片,广州中医药大学第一附属医院,批号:130201;IE33 彩色多普勒超声诊断仪,美国飞利浦公司;多光谱微孔板阅读器,美国 Molecular Devices 公司;低温高速离心机,美国 Beckman 公司;分光光度计,中国上海分析仪器总厂。

1.3 心衰模型复制^[2] 大鼠称定质量后,以水合氯醛腹腔注射麻醉,暴露腹主动脉,并于双侧肾动脉上方钝性分离腹主动脉,用缝合线将腹主动脉和与腹主动脉平行放置的外径约 0.6~0.9 mm 的不锈钢丝一并结扎,然后轻轻取出不锈钢丝,使腹主动脉截面积缩窄至原来的 25%~30%左右,造成腹主动脉狭窄,关腹。对照组钝性分离腹主动脉后,缝合线仅绕于腹主动脉上,并不缩窄。术后 3 d 内给予青霉素肌注(18000 U·kg⁻¹)预防感染。

1.4 分组 将大鼠随机分为对照组,模型组,心阳片低、中、高剂量组,每组 6 只。心阳片低、中、高组在心衰复制后分别给予心阳片 140, 281, 562 mg·kg⁻¹,用蒸馏水配成混悬液,分早晚 2 次灌胃给药,连续 2 周。对照组和模型组灌服等容积蒸馏

水, 1次/d, 连续2周。

1.5 大鼠心功能检测 各组大鼠麻醉后, 胸部备皮, 采用心脏彩超的方法检测各组大鼠左心室射血分数(LVEF)和左心室缩短分数(LVFS)值。

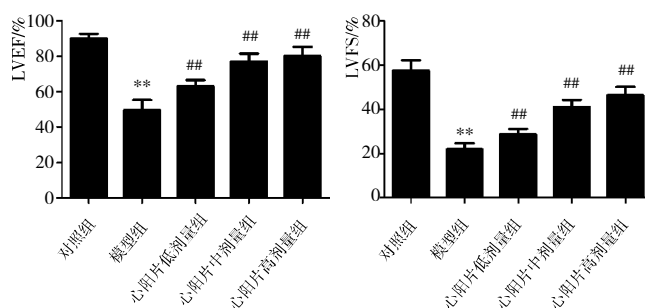
1.6 心肌细胞 MPT 检测 100 mg 心肌组织用剪刀剪碎, 用10倍心肌组织体积的含有 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胰酶的抽提缓冲液($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES, pH 7.5, $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇, $70 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGTA)重悬浮, 冰上孵育3 min, 离心后去上清, 加入8倍心肌组织体积的含 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胰酶的抽提缓冲液, 冰上孵育20 min, 加入终浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的白蛋白溶液中和。离心后去上清, 再用8倍体积抽提缓冲液清洗沉淀2次, 离心去上清。将沉淀放置在8倍体积的抽提缓冲液中冰上匀浆10~20 min。600 g, 4°C 离心5 min, 未破的细胞和胞核被沉淀。取上清, 再11000 g, 4°C 离心10 min。去上清, 按每100 mg组织40 μL 储存液($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES, pH 7.4, $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP, $0.08 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ADP, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丁二酸钠, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ K_2HPO_4 , $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT)重悬浮沉淀。采用Bradford法测定各样品线粒体蛋白浓度, 线粒体最终储存浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。通过运用分光光度计测量在540 nm吸光值的减少值(ΔA)来测量MPT: 将含有0.5 mg蛋白的线粒体孵育在1 mL的抽提缓冲液中, 1 min后加入 CaCl_2 (终浓度为 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 检测含有线粒体的抽提液缓冲液从0 min(A_0)到15 min(A_{15})在540 nm的吸光值的减少值, $\Delta A = A_0 - A_{15}$ 。

1.7 心肌细胞内 ATP 含量的检测 利用荧光素酶生物发光法检测细胞内 ATP 的相对含量。取左心室心肌, 剪碎后加入适当 ATP 检测裂解液, 4°C , 14000 g, 离心5 min, 取上清。加入100 μL ATP 检测工作液到96孔板的检测孔, 室温放置3~5 min。在检测孔加入待测样品, 迅速混匀, 使用多光谱微孔板阅读器测定RLU值。

1.8 统计学分析 数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用SPSS 13.0统计软件对数据进行处理。方差齐时应用单因素方差分析的LSD- t 检验, 方差不齐时应用Dummett' T3、Repeated Measures进行统计。

2 结果

2.1 对心衰大鼠心功能的影响 见图1。与对照组比较, 模型组LVEF和LVFS显著降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 心阳片各剂量组LVEF、LVFS值较心



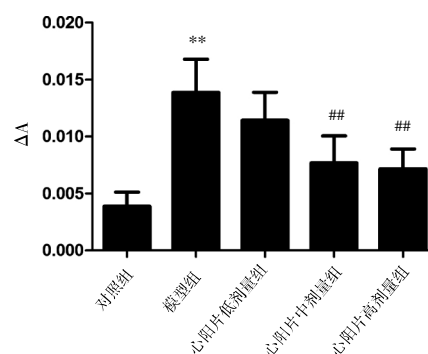
注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

图1 各组对心衰大鼠心功能指标LVEF、LVFS的影响

Figure 1 Effect of the Xinyang Tablet on cardiac function indexes of LVEF and LVFS

衰组显著增加($P < 0.01$)。

2.2 对心衰大鼠心肌细胞线 MPT 的影响 MPTP 开放可引起线粒体肿胀, 从而导致线粒体在540 nm的吸光值下降。 Ca^{2+} 是一种常用的MPTP开放诱导剂, Ca^{2+} 诱导后MPTP的变化反映了MPTP的初始状态。各组心肌细胞线粒体在 CaCl_2 诱导处理后从0 min(A_0)到15 min(A_{15})在540 nm处吸光值的减少值(ΔA)越大提示各组心肌细胞MPTP更开放, MPT更明显。结果发现, 与对照组比较, 模型组 ΔA 显著增加($P < 0.05$); 与模型组比较, 心阳片中、高剂量组 ΔA 值显著减少($P < 0.05$), 见图2。

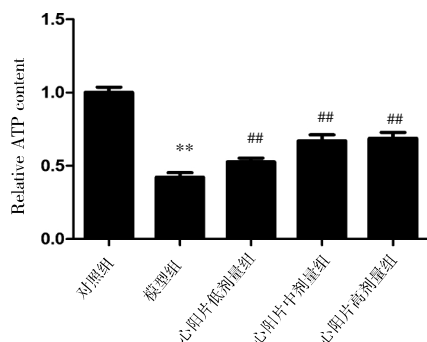


注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

图2 各组对心衰大鼠心肌细胞 MPT 的影响

Figure 2 Effect of Xinyang tablet on MPT in the cardiomyocytes of HF rats

2.3 对心衰大鼠心肌细胞 ATP 含量的影响 见图3。模型组ATP相对含量为对照组的(42.21 ± 3.10)%, 较对照组显著减少($P < 0.01$); 心阳片低、中、高剂量组ATP相对含量分别为对照组的(52.70 ± 2.58)%、(67.06 ± 4.09)%和(69.67 ± 5.48)%, 均较模型组显著增加($P < 0.01$)。



注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。

图 3 各组对心衰大鼠心肌细胞 ATP 含量的影响

Figure 3 Effect of Xinyang tablet on the intracellular ATP content in the cardiomyocytes of HF rats

3 讨论

心力衰竭是多种病因引起心肌损害的最终结果。急性冠脉综合征、冠状动脉粥样硬化和高血压是导致心力衰竭的主要原因。在中医经典文献中并无心力衰竭的病名，但有心衰之名。在大多中医经典文献中，众多医家均认为与心力衰竭相关性较强病名有心痹、心胀、心咳、心水、心脏衰弱和心脏麻痹等。近年来，中医对心衰病因病机的认识已基本趋于一致，即为本虚标实之证，本虚为气虚、阳虚、阴虚，标实为血瘀、水停、痰饮。标本俱病，虚实夹杂，是心衰的病理特点。中医药治疗心力衰竭有着悠久的历史，积累了丰富的临床经验，尤其是近 30 年，经过广泛的临床和科学研究，中医界对心衰的主要治疗大法已经达成共识，即益气、温阳、活血、利水四大治法。这些治法在临床上已经取得了良好的效果^[3-4]。心阳片是我院心衰课题组以益气温阳活血为治法组成的中药复方，由吉林参、淫羊藿等组成，具有益气温阳、活血化瘀利水之功。临床和实验研究都已证明其能有效治疗心力衰竭^[2,5]。

线粒体受损是导致心肌细胞功能受损和存活率下降的重要性因素。线粒体损伤后一个重要的变化是线粒体通透性的转变，其中，MPTP 开放是重要原因。MPTP 开放，使本来不能通过线粒体内膜的离子（如 H^+ 等）、代谢产物、大分子物质可以从基质经过内膜漏出，引起线粒体肿胀、线粒体膜电位减低、膜间隙与基质间的 H^+ 梯度减小、氧化磷酸化脱耦联，导致 ATP 生成减少。MPTP 的开放，使线粒体能量产生不足，而心肌细胞能量不足将直接影响到心肌细胞的收缩和舒张能力。目前，在动物模型、线

粒体遗传疾病的患者以及心血管疾病患者中找到了足够的证据证明线粒体能量转化的下降与心脏机械功能异常有着密切联系^[6-8]。线粒体通透性转变孔开放导致的 MPT 与心肌细胞的凋亡、坏死等都有着密切关系。MPTP 被认为是心衰治疗的潜在靶点^[9-10]，抑制心衰时 MPT 具有改善心功能和线粒体 ATP 合成的作用。本研究中益气温阳活血法代表方心阳片能改善心衰大鼠心功能，并具有抑制 MPT，促进心肌细胞 ATP 合成的作用。这为益气温阳活血法以及代表方心阳片在临床心力衰竭治疗的应用提供了实验依据。但目前心阳片抑制 MPT 保护心肌细胞的上游机制还需进一步研究，而且其抑制 MPT 保护心肌细胞的作用是通过抑制心肌细胞凋亡、坏死，还是调节心肌细胞自噬还需要进一步的实验研究来阐明。

参考文献：

- [1] 卫生部心血管病防治研究中心. 中国心血管病报告[M]. 北京：中国大百科全书出版社，2012：1-6.
- [2] 洗绍祥，杨忠奇，汪朝辉，等. 心力衰竭中西医结合研究基础与临床[M]. 上海：上海科技出版社，2011：110-116.
- [3] 陈林榕，李创鹏，孙静，等. 益气温阳活血法治疗慢性心力功能不全患者 40 例疗效观察[J]. 新中医，2011，43(9)：9-11.
- [4] 杨蕊琳，翟海英，郭蕾，等. 参附舒心汤对老年心衰患者血清中脑利钠肽的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18(6)：249-252.
- [5] 吴伟，吴辉，李荣，等. 心阳片对急性失代偿性心力衰竭患者脑钠肽、超敏 C 反应蛋白及心功能的影响[J]. 中药新药与临床药理，2011，22(2)：220-223.
- [6] Willemsen S, Hartog JW, Hummel YM, et al. Tissue advanced glycation end products are associated with diastolic function and aerobic exercise capacity in diabetic heart failure patients[J]. Eur J Heart Fail, 2011, 13(1)：76-82.
- [7] Hartog JW, Voors AA, Schalkwijk CG, et al. Clinical and prognostic value of advanced glycation end-products in chronic heart failure[J]. Eur Heart J, 2007, 28(23)：2879-2885.
- [8] Koyama Y, Takeishi Y, Arimoto T, et al. High serum level of pentosidine, an advanced glycation end product(AGE), is a risk factor of patients with heart failure[J]. J Card Fail, 2007, 13(3)：199-206.
- [9] Halestrap AP, Pasdois P. The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1787(11)：1402-1415.
- [10] Sharov VG, Todor AV, Imai M, et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition pores by cyclosporine A improves cytochrome C oxidase function and increases rate of ATP synthesis in failing cardiomyocytes[J]. Heart Fail Rev, 2005, 10(4)：305-310.

(编辑：宋威)