

参附益心方对缺氧原代心肌细胞活性氧和能量代谢的影响^Δ

李彬^{1,2*}, 王新陆², 谢世阳³, 高原³, 王幼平³, 崔琳³, 王永霞², 朱明军^{2#}(1.河南中医药大学第一附属医院研究生科, 郑州 450099; 2.河南中医药大学第一附属医院心脏中心, 郑州 450099; 3.河南中医药大学第一附属医院中心实验室, 郑州 450099)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)08-1018-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.08.03

摘要 目的:观察参附益心方对缺氧原代心肌细胞活性氧(ROS)和能量代谢的影响。方法:新生SD大鼠原代心肌细胞经分离、培养、鉴定后,随机分为正常组、模型组、阳性对照组(辅酶Q₁₀, 0.1 mmol/L)和参附益心方低、高剂量组(0.25、0.5 mg/mL)。除正常组外,其余各组细胞均于5%O₂、5%CO₂、90%N₂条件下培养6 h以复制缺氧损伤模型。缺氧6 h后,采用ROS探针和流式细胞术分别检测各组细胞及其线粒体中ROS的含量,采用荧光素酶发光法和Western blotting法分别检测各组细胞中腺苷三磷酸(ATP)的含量以及肌酸激酶(CK)蛋白的表达水平,并使用透射电子显微镜观察各组细胞的超微结构。结果:与正常组比较,模型组缺氧原代心肌细胞及其线粒体中ROS的表达均明显增加,其ROS含量均显著升高,ATP的含量以及CK蛋白的表达水平均显著降低($P < 0.05$);细胞内质网、线粒体肿胀,线粒体嵴溶解甚至消失,损伤明显。与模型组比较,各给药组缺氧原代心肌细胞及其线粒体中ROS的表达均有所减少,阳性对照组和参附益心方高剂量组缺氧原代心肌细胞中ROS的含量以及各给药组缺氧原代心肌细胞线粒体中ROS的含量均显著降低,阳性对照组和参附益心方高剂量组缺氧原代心肌细胞中ATP的含量以及各给药组缺氧原代心肌细胞中CK蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.05$);阳性对照组和参附益心方高剂量组缺氧原代心肌细胞损伤明显减轻。结论:参附益心方对缺氧原代心肌细胞具有一定的改善作用,可下调细胞及线粒体中ROS的表达,并可改善其能量代谢。
关键词 参附益心方;缺氧损伤;原代心肌细胞;活性氧;能量代谢

Effects of Shenfu Yixin Decoction on Reactive Oxygen Species and Energy Metabolism of Primary Hypoxic Cardiomyocytes

LI Bin^{1,2}, WANG Xinlu², XIE Shiyang³, GAO Yuan³, WANG Youping³, CUI Lin³, WANG Yongxia², ZHU Mingjun² (1. Graduate Division, the First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou 450099, China; 2. Center of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou 450099, China; 3. Central Laboratory, the First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou 450099, China)

company closures[J]. *P & T*, 2013, 38(5): 261-263.

[11] 国家卫生计生委, 国家发展改革委, 工业和信息化部, 等. 关于改革完善短缺药品供应保障机制的实施意见[EB/OL]. [2018-10-07]. <http://www.nhc.gov.cn/yaoszs/s3581/201706/ec2c5910ba4341559e0176e5e237d5e6.shtml>.

[12] 舒永全, 童荣生. 医院药品采购工作中常见问题及处理[J]. *中国药房*, 2011, 22(33): 3114-3115.

[13] 何梦婷, 冯国忠, 周振, 等. 国外药品短缺处理机制的比较及对我国的启示[J]. *中国药事*, 2017, 31(9): 980-983.

[14] U.S. Food and Drug Administration. *CDER conversation: FDA's drug shortages prevention strategies*[EB/OL]. [2018-10-07]. <https://www.fda.gov/Drugs/NewsEvents/ucm432474.html>.

[15] 高晨, 王孝蓉. 美国医院药剂师协会药品缺货管理指南[J]. *中国医院药学杂志*, 2006, 26(10): 1289-1290.

[16] 王晓君. 供应链下短缺药品的现状分析与应对措施[J]. *中医药管理杂志*, 2018, 26(15): 10-12.

[17] 徐帆, 孙琳, 杨中磊, 等. 医院药品采购计划管理信息系统的设计与应用[J]. *中国药房*, 2014, 25(29): 2728-2731.

[18] 李培芳, 方焱, 张善堂, 等. 医疗机构药品短缺原因分析与防范[J]. *药学实践杂志*, 2015, 33(2): 179-182.

[19] BOCQUET F, DEGRASSATTHÉAS A, PEIGNÉ J, et al. The new regulatory tools of the 2016 Health Law to fight drug shortages in France[J]. *Health Policy*, 2017, 121(5): 471-476.

[20] 四川省药械集中采购服务中心. 四川省药械集中采购服务中心关于开展短缺药品信息上报工作的通知[EB/OL]. [2018-10-07]. <https://www.scbid.gov.cn/HomePage/ShowDetail.aspx?InfoId=26449>.

(收稿日期: 2018-10-14 修回日期: 2019-03-03)
(编辑: 段思怡)

^Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81503419, 81373853, 81603466, 81603432); 国家重点基础研究发展计划(973计划)课题(No. 2015CB554401); 河南省创新型科技团队项目(No. 豫科人组[2013]2号)

* 主治医师, 硕士。研究方向: 中西医结合治疗心血管疾病的临床。电话: 0371-66264771。E-mail: libinnvhai@163.com

通信作者: 主任医师, 教授, 博士。研究方向: 中西医结合治疗心血管疾病的临床。电话: 0371-66289006。E-mail: zhumingjun317@163.com

ABSTRACT OBJECTIVE: To observe the effects of Shenfu yixin decoction on reactive oxygen species (ROS) and energy metabolism in primary hypoxic cardiomyocytes. METHODS: After isolation, culture and identification, primary cardiomyocytes of neonatal SD rats were randomly divided into normal group, model group, positive control group (coenzyme Q₁₀, 0.1 mmol/L) and Shenfu yixin decoction low-dose and high-dose groups (0.25, 0.5 mg/mL). Except for normal group, other groups were cultured with 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂ for 6 h to induce hypoxic injury model. After 6 hours of hypoxia, ROS contents in cardiomyocytes and mitochondria of each group were detected by ROS probe and flow cytometry. Luciferase luminescence and Western blotting were used to detect ATP content and CK protein expression of each group. Transmission electron microscope was used to observe ultrastructure of cardiomyocytes in each group. RESULTS: Compared with normal group, the expression of ROS in primary hypoxic cardiomyocytes and mitochondria as well as the content of ROS were increased significantly, while the content of ATP and expression levels of CK protein were decreased significantly ($P < 0.05$); there were swelling of endoplasmic reticulum and mitochondria, dissolution or even disappearance of mitochondrial ridge, obvious cardiomyocytes injury. Compared with model group, the expression of ROS in primary hypoxic cardiomyocytes and mitochondria of administration groups, the contents of ROS in primary hypoxic cardiomyocytes of positive control group and Shenfu yixin decoction high-dose group as well as the content of ROS in primary hypoxic cardiomyocytes mitochondria of administration groups were all decreased significantly, while ATP contents in primary hypoxic cardiomyocytes of positive control group and Shenfu yixin decoction high-dose group as well as expression levels of CK protein in primary hypoxic cardiomyocytes of administration groups were all increased significantly ($P < 0.05$). The primary hypoxic cardiomyocytes injury was relieved significantly in positive control group and Shenfu yixin decoction high-dose group. CONCLUSIONS: Shenfu yixin decoction can improve primary hypoxic cardiomyocytes, down-regulate the expression of ROS in cardiomyocytes and mitochondria and also improve its energy metabolism.

KEYWORDS Shenfu yixin decoction; Hypoxic injury; Primary cardiomyocytes; Reactive oxygen species; Energy metabolism

慢性心力衰竭(CHF)因其发病率和病死率均较高,已成为21世纪最重要的心血管疾病。2011—2014年流行病学调查显示,美国20岁以上心力衰竭患者增长到650万;预计到2030年,美国18岁以上心力衰竭患者将增加46%,达到800万^[1]。我国成年人心力衰竭患病率为0.9%,即有450万成年心力衰竭患者^[2]。有研究表明,心肌能量代谢失衡在心力衰竭的发生和发展中发挥着关键的作用^[3]。其中,线粒体是细胞内最重要的能量代谢场所,并直接参与细胞生长、增殖、胞内信号转导和细胞凋亡等过程^[4]。细胞中活性氧(ROS)等自由基主要由线粒体产生,高浓度的ROS会触发细胞内的氧化应激反应,造成氧化损伤,导致线粒体功能的丧失,最终诱发细胞凋亡^[5-6]。

参附益心方是我校孙建芝教授辨治CHF的经验方。前期基础研究证实,该方可改善CHF模型大鼠心功能,降低其血清心房钠尿肽(ANP)、B型脑钠肽(BNP)和心肌血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)水平,抑制心肌纤维化,具有延缓或改善心肌重塑的作用^[7-10],但该方对ROS和能量代谢的影响尚未明确。为此,本研究利用缺氧条件建立原代心肌细胞损伤模型,观察参附益心方对其ROS和能量代谢的影响,以期为参附益心方治疗CHF提供实验基础和理论依据。

1 材料

1.1 仪器

RCO-3000TVBB型CO₂培养箱(美国REVCO公司);CK40型倒置显微镜(日本Olympus公司);JEM-1400型透射电子显微镜(日本JEOL公司);DMI3006型倒置荧光显微镜、EM UC7型全自动超薄切片(德国

Leica公司);Airtech型生物超净工作台(江苏苏净集团);MK3型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);FACSCalibur型流式细胞仪(美国BD公司);Chemi-Doc XRS+型化学发光成像分析系统(美国Bio-Rad公司);TDL-50B型低速台式大容量离心机(北京医用离心机厂);JA203型电子分析天平(上海海康电子仪器厂)。

1.2 药品与试剂

参附益心方浸膏(山东步长制药有限公司,批号:131101,规格:1g约相当于生药总量9.5g);辅酶Q₁₀片[阳性对照,卫材(中国)药业有限公司,批号:H10930021,规格:10mg];心肌细胞消化液、DMEM高糖培养基、磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)、ROS探针[2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)]试剂盒、水溶性封片剂、CCK-8试剂、十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(TBST)溶液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为T1320、12100、P1020、CA1410、S2150、CA1210、S8010、T1085);胎牛血清(FBS,以色列Biological Industries公司,批号:04-001-1A);胰蛋白酶(美国Gibco公司,批号:27250018);溴脱氧尿核苷(BrdU)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染料(美国Sigma公司,批号分别为B9285、D9542);兔心肌钙蛋白I(cTnI)多克隆抗体、SABC-FITC双标记山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为BM1765、SA1064);0.4%台盼蓝染料(华美生物工程有限公司,批号:C0040);腺苷三磷酸(ATP)检测试剂盒(瑞士Roche公司,批号:11699695001);兔肌酸激酶(CK)多克隆抗体、兔甘油醛-3-磷酸脱氢(GAPDH)单克隆抗体(内参)(美国Abcam公司,批号分别为ab108388、

ab181602);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔IgG抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:SA00001-1);MitoSOX试剂盒、YOYO-1染料(美国Invitrogen公司,批号分别为M36008、Y3601);RIPA细胞裂解液(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号:OC183166);ECL发光液(美国Millipore公司,批号:WBKLS0100);其余试剂均为分析纯,水为双蒸水。

1.3 动物

SPF级新生SD大鼠,出生1~3 d,雌雄不限,体质量约5~6 g,由河南省实验动物中心提供[动物生产许可证号:SCXK(豫)2015-0005]。

2 方法

2.1 药物贮备液的制备

2.1.1 参附益心方贮备液 称取参附益心方浸膏0.25 g,加至DMEM高糖培养基10 mL中,混匀,经0.2 μm滤器滤过后,得质量浓度为25 mg/mL(以浸膏质量计,下同)的参附益心方贮备液,现用现配。

2.1.2 辅酶Q₁₀贮备液 称取辅酶Q₁₀片50 mg,碾碎,加至DMEM高糖培养基5.8 mL中,混匀,经0.2 μm滤器滤过后,得浓度为10 mmol/L的辅酶Q₁₀贮备液,备用。

2.2 原代心肌细胞的提取

取新生大鼠,于无菌条件下开胸,取其心尖部,经4 ℃ PBS清洗3次后,将其剪成大小约1 mm³的组织块,加入心肌细胞消化液适量,轻轻吹打后,移至玻璃瓶中,于37 ℃水浴锅中消化6 min,重复消化7~8次:第1次消化自然沉淀后弃去上清液;后几次消化自然沉淀后均留取上清液,直至组织块变为白色透明。留取的上清液中加入等量含10% FBS的DMEM高糖培养基,轻轻吹打,以1 000 r/min离心10 min,弃去上清液,加入含10% FBS的DMEM高糖培养基1 mL,制成原代心肌细胞悬液,经200目筛滤过以除去未充分消化的组织块。

2.3 原代心肌细胞的分离和培养

取“2.2”项下原代心肌细胞悬液,置于37 ℃、5% CO₂培养箱中差速贴壁90 min后,吸取细胞悬液,以1 000 r/min离心5 min,弃去上清液,加入含10% FBS的DMEM高糖培养基适量,轻轻吹打。经0.4%台盼蓝染色后,于倒置显微镜下观察(死细胞染色后呈蓝色),计算活细胞比率,并以此为参考调整细胞浓度至4×10⁵个/mL,接种于培养板中,加入BrdU适量(终浓度为0.1 mmol/L)以抑制心肌成纤维细胞增殖。按上述条件培养48 h后,弃去上清液,细胞用不含FBS的DMEM高糖培养基同步化培养24 h。

2.4 原代心肌细胞的鉴定

取“2.3”项下原代心肌细胞适量,弃去培养基,于4%多聚甲醛溶液中固定10~20 min,加入cTn I抗体(1:50),于4 ℃孵育过夜,随后加入SABC-FITC双标记IgG抗体(1:100),于常温下避光孵育2 h;加入DAPI染料适量,避光染色5 min,以水溶性封片剂封孔,于倒置荧光显微镜下观察、拍照(DAPI染料可将所有细胞核染

成蓝色,cTn I则可将心肌细胞胞浆染成绿色)。取6个视野拍照,采用Image J 5.0软件统计心肌细胞数(n_1 ,即cTn I染色阳性的细胞数)及细胞总数(N_1),计算心肌细胞比例(心肌细胞比例= $n_1/N_1 \times 100\%$)。当心肌细胞比例超过85%,表明原代心肌细胞纯度达到试验要求,可进行后续研究。

2.5 分组、给药与造模

取“2.3”项下纯度达到试验要求的原代心肌细胞适量,随机分为5组,即正常组、模型组(即缺氧组)、阳性对照组(辅酶Q₁₀,0.1 mmol/L,剂量根据本课题组前期CCK-8试验结果确定)和参附益心方低、高剂量组(0.25、0.5 mg/mL,剂量根据本课题组前期CCK-8试验结果确定)。对照组和模型组加入含10% FBS的DMEM高糖培养基2 mL,各给药组加入含相应药物的含10% FBS的DMEM高糖培养基2 mL,每组设置3个复孔。除正常组外其余各组细胞均于5% O₂、5% CO₂、90% N₂条件下培养6 h(缺氧时间根据本课题组前期YOYO-1染色试验结果确定),造成缺氧损伤。正常组细胞不予任何处理,于37 ℃、5% CO₂条件下培养6 h。

2.6 缺氧原代心肌细胞中ROS含量检测

按“2.3”“2.4”项下方法分离、培养、鉴定原代心肌细胞后,再按“2.5”项下方法分组、给药、造模。缺氧6 h后,吸弃各孔上清液,于室温下以不含FBS的DMEM高糖培养基清洗2~3次,每次1 min,加入经不含FBS的DMEM高糖培养基稀释的ROS探针适量(终浓度为10 μmol/L),于37 ℃、5% CO₂条件下避光孵育30 min,于室温下以不含FBS的DMEM高糖培养基清洗2~3次,每次1 min。使用倒置荧光显微镜观察细胞形态,使用酶标仪(激发波长:488 nm,发射波长:525 nm)检测各孔的荧光强度,以此表示细胞中ROS的含量。上述试验重复3次。

2.7 缺氧原代心肌细胞线粒体中ROS含量检测

按“2.3”“2.4”项下方法分离、培养、鉴定原代心肌细胞后,再按“2.5”项下方法分组、给药、造模。缺氧6 h后,吸弃各孔上清液,于室温下以PBS清洗2~3次,每次1 min,用不含EDTA的胰蛋白酶消化,收集细胞,加入MitoSOX试剂适量(终浓度为5 μmol/L),于37 ℃、5% CO₂条件下避光孵育30 min,于室温下以PBS清洗2次,每次1 min,以1 000 r/min离心5 min,细胞用DMEM高糖培养基调整密度至5×10⁶个/mL,采用流式细胞仪(激发波长:488 nm,发射波长:525 nm)检测各孔的荧光强度比率,以此表示细胞线粒体中ROS的含量。上述试验重复3次。

2.8 缺氧原代心肌细胞中ATP含量检测

按“2.3”“2.4”项下方法分离、培养、鉴定原代心肌细胞后,再按“2.5”项下方法分组、给药、造模。缺氧6 h后,吸弃各孔上清液,于室温下以PBS清洗2~3次,每次1 min,采用荧光素酶发光法以酶标仪检测缺氧原代心肌细胞中ATP的含量。上述试验重复3次。

2.9 缺氧原代心肌细胞中CK蛋白表达水平检测

按“2.3”“2.4”项下方法分离、培养、鉴定原代心肌细

胞后,再按“2.5”项下方法分组、给药、造模。缺氧6 h后,采用Western blotting法检测缺氧原代心肌细胞中CK蛋白的表达情况^[1]。细胞经RIPA细胞裂解液裂解后,于4℃下以12 000 r/min离心15 min,收集上清液(即细胞总蛋白),采用Brandford法测定蛋白浓度后,煮沸变性,随后加入适量5×SDS上样缓冲液,置于-20℃冰箱保存,备用。每组取蛋白50 μg进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,电泳结束后采用半干转移法转膜,以5%脱脂奶粉封闭1 h,分别加入相应一抗[CK(1:1 500)、内参(1:3 000)],于4℃孵育过夜;TBST溶液洗膜,加入HRP标记二抗(1:3 000),于37℃恒温摇床孵育1 h, TBST溶液洗膜。以ECL发光液显色后,置于化学发光成像分析系统上成像,采用Image J 5.0软件分析蛋白条带灰度值,以相应蛋白与内参的灰度值之比表示该蛋白的表达水平。上述试验重复3次。

2.10 缺氧原代心肌细胞超微结构观察

按“2.3”“2.4”项下方法分离、培养、鉴定原代心肌细胞后,鉴于“2.6”~“2.9”项下结果,将细胞按“2.5”项下方法随机分为正常组、模型组、阳性对照组、参附益心方高剂量组,然后给药、造模。缺氧6 h后,吸弃各孔上清液,于室温下以PBS清洗2~3次,用2.5%戊二醛溶液固定4 h;PBS清洗,用1%锇酸溶液处理2 h;PBS清洗,分别用50%、70%、80%、95%、100%的乙醇梯度脱水,再以丙酮、环氧树脂812处理,半薄切片定位、超薄切片(厚度约70 nm),经饱和醋酸双氧铀溶液染色、水洗、烘干后,于透射电子显微镜下观察缺氧心肌细胞超微结构并拍照。

2.11 统计学方法

采用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,组间比较采用单因素方差分析或非配对 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

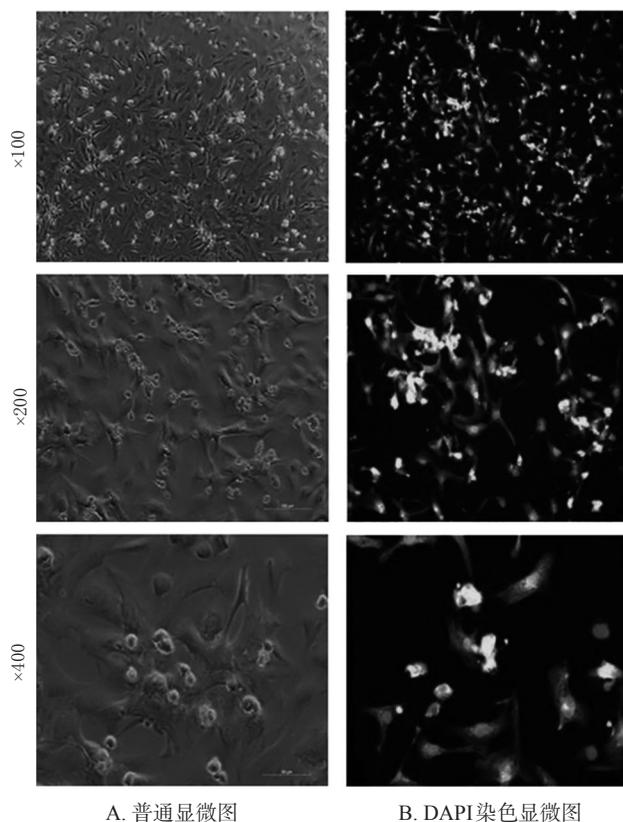
3 结果

3.1 原代心肌细胞的鉴定

原代心肌细胞呈星形或梭形,相互接触交织成网,有聚生长趋势,并逐渐形成细胞簇或单层细胞。同时,细胞呈现同步搏动,搏动频率、节律、强度稳定,频率约70~130次/min,详见图1。

3.2 参附益心方对缺氧原代心肌细胞中ROS含量的影响

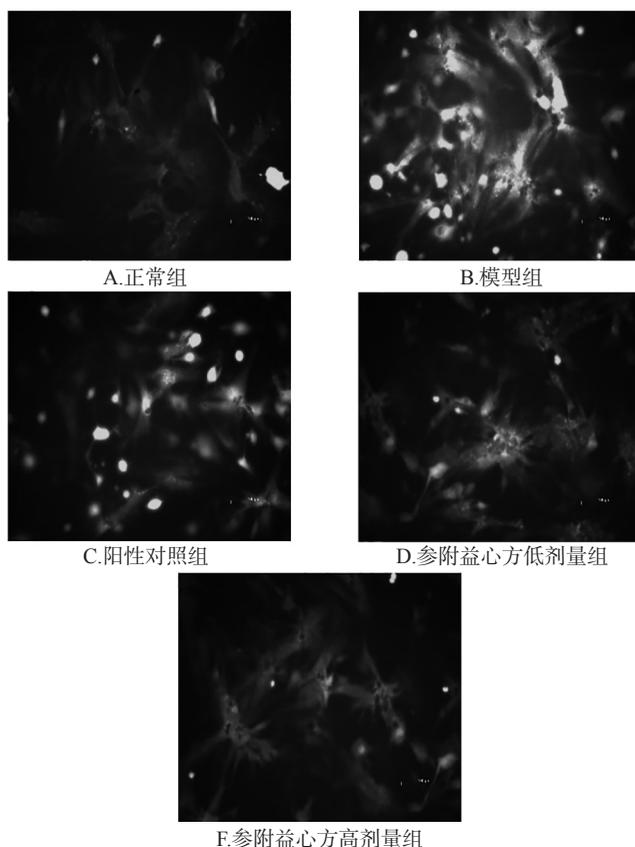
与正常组比较,模型组缺氧原代心肌细胞中ROS的表达明显增加,其ROS的含量显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组缺氧原代心肌细胞中ROS的表达均有不同程度的减少,其中阳性对照组和参附益心方高剂量组缺氧原代心肌细胞中ROS的含量均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),详见图2、表1。



A. 普通显微镜 B. DAPI染色显微镜

图1 原代心肌细胞的显微图

Fig 1 Micrographs of primary cardiomyocytes



F. 参附益心方高剂量组

图2 各组细胞中ROS表达的荧光显微图(×200)

Fig 2 Fluorescence micrographs of the expression of ROS in cardiomyocytes of each group(×200)

表1 参附益心方对缺氧原代心肌细胞及其线粒体中ROS含量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Effects of Shenfu yixin decoction on ROS content in primary hypoxic cardiomyocytes and mitochondria($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	原代心肌细胞中ROS含量	线粒体中ROS含量, %
正常组	60.39 ± 6.56	8.00 ± 0.36
模型组	180.10 ± 8.88*	22.37 ± 1.45*
阳性对照组	136.20 ± 4.81 [#]	5.62 ± 1.46 [#]
参附益心方低剂量组	166.60 ± 6.47	16.37 ± 0.93 [#]
参附益心方高剂量组	108.30 ± 4.70 [#]	6.53 ± 1.22 [#]

注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, [#] $P < 0.05$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$

3.3 参附益心方对缺氧原代心肌细胞线粒体中ROS含量的影响

与正常组比较,模型组缺氧原代心肌细胞线粒体中ROS的含量显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组缺氧原代心肌细胞线粒体中ROS的含量均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),详见图3、表1。

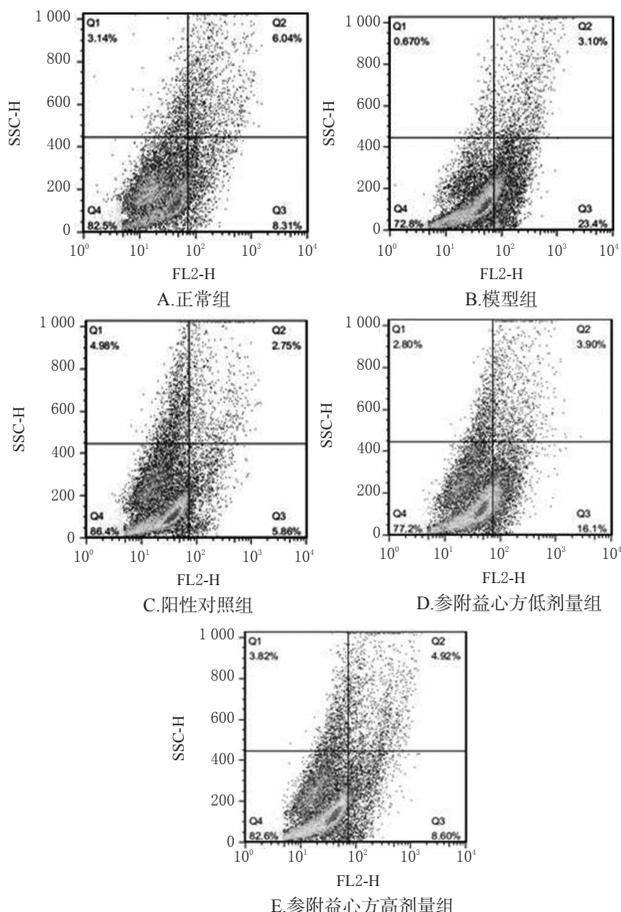


图3 各组细胞线粒体中ROS表达的流式细胞图

Fig 3 Flow cytometry of the expression of ROS in cardiomyocytes mitochondria of each group

3.4 参附益心方对缺氧原代心肌细胞中ATP含量的影响

与正常组比较,模型组缺氧原代心肌细胞中ATP的

含量显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组和参附益心方高剂量组缺氧原代心肌细胞中ATP的含量均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),详见表2。

表2 参附益心方对缺氧原代心肌细胞中ATP含量及CK蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Effects of Shenfu yixin decoction on ATP content and CK protein expression in primary hypoxic cardiomyocytes($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	ATP, $\mu\text{g/mL}$	CK
正常组	1.59 ± 0.05	0.61 ± 0.07
模型组	0.89 ± 0.02*	0.22 ± 0.02*
阳性对照组	1.32 ± 0.08 [#]	0.47 ± 0.08 [#]
参附益心方低剂量组	1.05 ± 0.10	0.48 ± 0.03 [#]
参附益心方高剂量组	1.34 ± 0.01 [#]	0.56 ± 0.06 [#]

注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, [#] $P < 0.05$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$

3.5 参附益心方对缺氧原代心肌细胞中CK蛋白表达水平的影响

与正常组比较,模型组缺氧原代心肌细胞中CK蛋白的表达水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组缺氧原代心肌细胞中CK蛋白的表达水平均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),详见图4、表2。

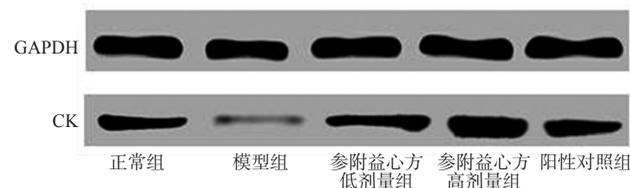


图4 各组细胞中CK蛋白表达的电泳图

Fig 4 Electrophoregrams of protein expression of CK in cardiomyocytes of each group

3.6 参附益心方对缺氧原代心肌细胞超微结构的影响

正常组原代心肌细胞的超微结构清晰,细胞膜、线粒体膜完整,线粒体嵴丰富,嵴膜完整、清晰;模型组缺氧原代心肌细胞内质网、线粒体肿胀,边界模糊不清,线粒体嵴溶解甚至消失;阳性对照组和参附益心方高剂量组缺氧原代心肌细胞可见细胞膜表面微绒毛样突起减少,细胞膜完整,线粒体嵴丰富,嵴膜完整,部分细胞内质网、线粒体肿胀,细胞膜完整,线粒体结构清晰,损伤较模型组明显减轻,详见图5。

4 讨论

心力衰竭是由多种病因导致的一种复杂的临床综合征,是各种心脏疾病的终末阶段^[12]。目前西医常规治疗CHF的靶点较为单一,药物不良反应较多;非药物治疗方法因多种因素(如适应证、治疗成本)的限制,效果也有限。而中医治疗CHF具有整体调节的特点,多途径、多靶点等优势,可用于CHF的规范化治疗^[13]。

中医认为,CHF的病机为本虚标实之证,本虚为气虚、阳虚(或阴虚),标实为血瘀、痰饮、水停,标本俱病,

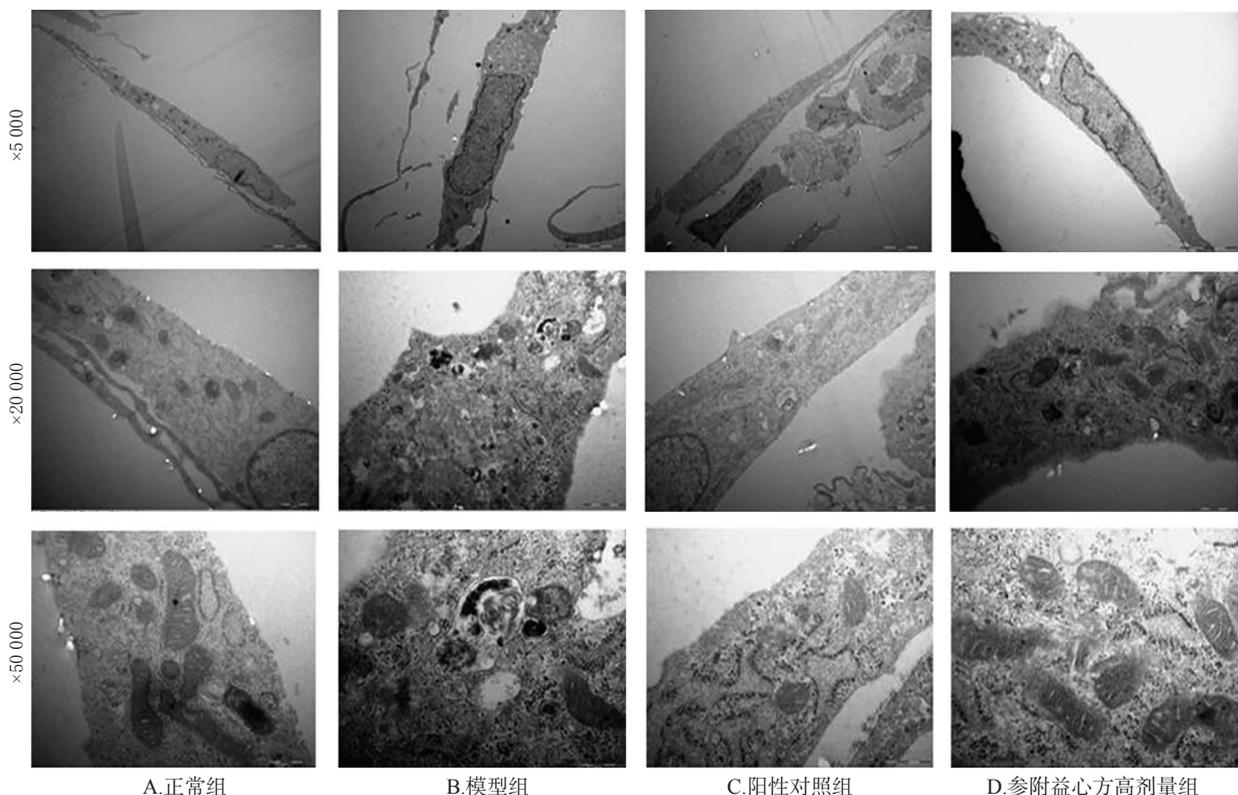


图5 各组细胞超微结构的电子显微镜图

Fig 5 Electron micrographs of the ultrastructure of cardiomyocytes in each group

虚实夹杂,其中医证候主要为气虚阳虚、血瘀水停。参附益心方是河南中医药大学名老中医辨治CHF的经验方,具有益气温阳、活血利水之功效。该方由人参、附子、桂枝、丹参、赤芍、益母草等药材组成,其中人参益气为君药;附子、桂枝温肾阳、通心脉为臣药;丹参、赤芍、益母草活血化瘀利水,泽泻、车前子、猪苓、大腹皮化湿利水,葶苈子泻肺逐饮,砂仁、大枣健脾利湿、温补中焦,共为佐使之药;诸药共奏益气温阳、活血利水之功^[14]。本课题组前期研究证实,参附益心方可改善CHF模型大鼠心功能^[7-10],但其在心肌ROS和能量代谢方面的作用尚不明确。辅酶Q₁₀可显著改善线粒体功能,具有较强的抗氧化作用^[15],且亦有大量研究证实其疗效^[16-18],现已被广泛用于CHF的治疗中。因此,本研究选用辅酶Q₁₀作为阳性对照药物,初步考察了参附益心方对缺氧原代心肌细胞ROS和能量代谢的影响。

已有证据表明,心脏能量代谢障碍是心肌细胞损伤的始动环节,是引起和促进心功能障碍发生、发展的重要因素^[19]。线粒体是细胞内重要的细胞器,生物体内90%以上的ATP都是由线粒体产生。该细胞器是自由基产生的重要场所,可通过氧化磷酸化反应为细胞生命活动提供能量,在凋亡过程中发挥着非常重要的调控作用^[20]。ROS属于自由基,含有氧原子并具有极强的氧化能力,是细胞内重要的氧化还原信号分子^[21]。ROS生成的主要部位及其作用的主要靶点均位于线粒体内,其可通过改变线粒体通透性转换孔(MPTP)的开放与关闭而影响线粒体膜电位和细胞色素C的释放,从而激活天冬

氨酸特异性胱天蛋白酶等凋亡调控蛋白和细胞凋亡诱导因子,最终引发内源性细胞凋亡;此外,ROS还可通过激活各种死亡受体,介导外源性细胞凋亡^[22]。ATP是细胞内主要的高能磷酸载体,可直接为细胞供应能量,若细胞内ATP缺失将可能导致细胞死亡^[23]。CK作为细胞主要的能量储备载体,当ATP需求增加时,可快速催化磷酸肌酸与腺苷二磷酸(ADP)反应,进而生成ATP和肌酸,以满足细胞的能量需求;而衰竭心脏经CK途径形成的能量储备(即ATP生成量)则有所降低^[24]。本研究结果显示,与正常组比较,模型组缺氧原代心肌细胞及其线粒体中ROS的表达均明显增加,其含量均显著升高,而细胞ATP含量及CK蛋白的表达量均显著降低,超显微结构亦提示心肌细胞损伤明显。经药物处理后,各给药组缺氧原代心肌细胞及其线粒体中ROS的表达均有不同程度的减少,阳性对照组和参附益心方高剂量组缺氧原代心肌细胞中ROS的含量以及各给药组线粒体中ROS的含量均较模型组显著降低,阳性对照组和参附益心方高剂量组缺氧原代心肌细胞中ATP的含量以及各给药组缺氧原代心肌细胞中CK蛋白的表达水平均较模型组显著升高,超显微结构亦提示阳性对照组和参附益心方高剂量组细胞损伤有所减轻。这提示参附益心方可一定程度地下调缺氧原代心肌细胞及其线粒体中ROS的表达,上调缺氧原代心肌细胞中ATP含量和CK蛋白表达,减轻细胞损伤,与益气、温阳类中药相关研究^[25-26]的结论相符。

综上所述,参附益心方对缺氧心肌细胞具有一定的

改善作用,可下调细胞及线粒体中ROS的含量,并改善其能量代谢。但本研究仅初步探讨了该方对缺氧原代心肌细胞ROS和能量代谢的影响,其具体抗CHF的作用机制尚有待后续研究深入挖掘。

参考文献

- [1] BENJAMIN EJ, BLAHA MJ, CHIUVE SE, et al. Heart disease and stroke statistics: 2017 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2017, 135(10):e146-e603.
- [2] 国家心血管病中心. 中国心血管病报告 2014[M]. 北京: 中国大百科全书出版社, 2015: 1-6.
- [3] CHANDLER MP, KERNER J, HUANG H, et al. Moderate severity heart failure does not involve a downregulation of myocardial fatty acid oxidation[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(4):H1538-H1543.
- [4] 郭茜, 郭家彬, 李梨, 等. PGC-1 α 与线粒体生成调控在心血管疾病中的作用[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(1): 1-4.
- [5] LIN MT, BEAL MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases[J]. *Nature*, 2006, 443(7113):787-795.
- [6] STOWE DF, CAMARA AK. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(6):1373-1414.
- [7] 王永霞, 任红杰, 朱明军, 等. 参附益心颗粒对慢性心力衰竭大鼠血清心钠素、脑钠素的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(4):118-120.
- [8] 王永霞, 张群生, 任红杰, 等. 参附益心颗粒对慢性心力衰竭大鼠循环与心血管紧张素的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(21):226-229.
- [9] 王小晓, 王幼平, 谢世阳. 参附益心颗粒对大鼠急性心梗后心功能及心肌组织的影响[J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(3):142-146.
- [10] 王永霞, 李彬, 朱明军, 等. 参附益心颗粒对慢性心力衰竭大鼠心肌重塑的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26(10):2370-2372.
- [11] 王新陆, 崔琳, 王幼平, 等. 加参方对Ang II诱导的H9c2大鼠心肌细胞凋亡的干预作用研究[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(5):2210-2215.
- [12] 中国中西医结合学会心血管病专业委员会, 中国医师协会中西医结合医师分会心血管病学专家委员会. 慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2016, 14(3):225-228.
- [13] 邓悦. 中医药在诊治心力衰竭中的地位[J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(10):1162-1163.
- [14] 谢世阳, 王幼平, 王小晓, 等. 参附益心颗粒对心力衰竭大鼠心肌ATP含量及解偶联蛋白-2的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(10):4412-4415.
- [15] 王文娜, 陈明. 辅酶Q₁₀心血管病防治应用进展[J]. *心血管病学进展*, 2017, 38(2):184-189.
- [16] BAGGIO E, GANDINI R, PLANCHER AC, et al. Italian multicenter study on the safety and efficacy of coenzyme Q₁₀ as adjunctive therapy in heart failure: CoQ₁₀ drug surveillance investigators[J]. *Mol Aspects Med*, 1994. DOI: 10.1007/BF00226857.
- [17] MORTENSEN SA, ROSENFELDT F, KUMAR A, et al. The effect of coenzyme Q₁₀ on morbidity and mortality in chronic heart failure: results from Q-SYMBIO: a randomized double-blind trial[J]. *JACC Heart Fail*, 2014, 2(6): 641-649.
- [18] GARRIDO-MARAVER J, CORDERO MD, OROPESA-AVILA M, et al. Clinical applications of coenzyme Q₁₀[J]. *Front Biosci: Landmark Ed*, 2014. DOI: 10.2741/4231.
- [19] TUCKA J, BENNETT M, LITTLEWOOD T. Cell death and survival signaling in the cardiovascular system[J]. *Front Biosci: Landmark Ed*, 2012. DOI: 10.2741/3925.
- [20] 朱文赫, 沈楠, 徐俊杰, 等. 微波辐射对大鼠能量代谢及心肌细胞凋亡的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(4): 647-651.
- [21] 马淇, 刘垒, 陈佳. 活性氧、线粒体通透性转换与细胞凋亡[J]. *生物物理学报*, 2012, 28(7):523-536.
- [22] 易健, 舒徐. 活性氧对细胞凋亡和增殖的调控作用[J]. *基础医学与临床*, 2013, 33(10):1127-1130.
- [23] 王明霞, 牛玉凤, 高海祥. 细胞内三磷酸腺苷和腺苷在细胞凋亡中的作用研究进展[J]. *中国药房*, 2007, 18(1): 63-65.
- [24] 陈游洲, 袁建松. 心力衰竭中能量代谢重构研究进展[J]. *中国循环杂志*, 2014, 29(4):306-308.
- [25] 李岩. 益气药对慢性心力衰竭心气虚证模型大鼠心肌能量代谢重构的干预作用[D]. 北京: 北京中医药大学, 2012.
- [26] 于华芸, 季旭明, 吴智春, 等. 附子对大鼠能量代谢及相关基因表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(18):2535-2538.

(收稿日期:2018-06-10 修回日期:2019-01-11)

(编辑:张元媛)