

益气活血方对慢性心力衰竭大鼠心室重构的 干预作用及其机制

方子寒¹, 谢盈彧¹, 王铭扬¹, 王亚楠¹, 李渊芳¹, 穆怀玉¹, 张军平^{2*}

(1. 天津中医药大学, 天津 301617; 2. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300381)

[摘要] **目的:** 观察益气活血方对慢性心力衰竭模型大鼠心脏结构变化的影响, 并从线粒体动力学和分泌型糖蛋白(Wnt)/ β -链蛋白(β -catenin)通路探讨其作用机制。**方法:** 40只雄性SD大鼠随机选取10只为假手术组, 其余行左冠状动脉前降支结扎术构建慢性心力衰竭(CHF)大鼠模型, 造模完成后随机分为模型组、卡托普利组和益气活血组, 每组10只。给药组分别予以卡托普利片 $13.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 益气活血颗粒 $20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃给药, 干预8周后取心脏组织, 称取体质量与心脏质量结合超声心动图检测心脏结构变化情况, 行马松(Masson)染色测定心肌间质胶原容积分数, 应用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测心肌线粒体融合蛋白视神经萎缩相关蛋白1(Opal), 分裂蛋白线粒体动力相关蛋白1(Drp1)的表达水平, 应用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测Wnt/ β -catenin通路相关因子低密度脂蛋白受体相关蛋白6(LRP6), 糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β), β -catenin mRNA的表达。**结果:** 与假手术组比较, 模型组左心室壁明显增厚($P < 0.05$), 心腔明显扩大、心肌间质胶原含量升高($P < 0.01$); Opal表达水平降低, Drp1表达水平升高($P < 0.01$), LRP6, GSK-3 β , β -catenin的mRNA表达量升高($P < 0.01$)。与模型组比较, 益气活血组可减轻室壁增厚和心腔扩大($P < 0.05$, $P < 0.01$), 降低心肌间质胶原含量($P < 0.05$); 上调Opal的低表达、下调Drp1的高表达、下调LRP6, GSK-3 β , β -catenin的高表达($P < 0.01$), 作用效果优于或不劣于卡托普利组。**结论:** 益气活血方可有效减轻慢性心力衰竭大鼠心室重构、改善线粒体能量代谢, 其机制可能与抑制Wnt/ β -catenin的相关因子的表达相关。

[关键词] 益气活血方; 慢性心力衰竭; 心室重构; 线粒体动力学; 分泌型糖蛋白/ β -链蛋白(Wnt/ β -catenin)信号通路

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)04-0082-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200104

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190911.1315.008.html>

[网络出版时间] 2019-09-12 08:51

Effect of Reinforcing Qi and Activating Blood Recipe on Ventricular Remodeling in Rats with Chronic Heart Failure and Mechanisms Involved

FANG Zi-han¹, XIE Ying-yu¹, WANG Ming-yang¹, WANG Ya-nan¹, LI Yuan-fang¹,
MU Huai-yu¹, ZHANG Jun-ping^{2*}

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin 301617, China;

2. The First Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300381, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the intervention effect of Yiqi Huoxue recipe (YQHX) on ventricular remodeling in rats with chronic heart failure, in order to explore its mechanism. **Method:** Among 40 male SD rats, 10 were randomly selected as the sham operation group. The left anterior descending coronary artery ligation was performed to construct the chronic heart failure (CHF) rat model. After modeling, they were randomly divided into

[收稿日期] 20190609(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774232)

[第一作者] 方子寒, 硕士, 从事中医药治疗心血管疾病的基础研究, E-mail: fzh851510509@163.com

[通信作者] *张军平, 博士生导师, 教授, 从事中西医结合治疗心血管疾病的临床与基础研究, E-mail: tjzhtcm@163.com

model group, captopril group ($13.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and YQHX group ($20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and orally given the corresponding drugs. After 8 weeks of intervention, cardiac tissues were collected, body mass and heart mass were weighed, and echocardiography were performed to detect the changes in cardiac structure. Masson staining was performed to determine the myocardial interstitial collagen volume fraction. Western blot was used to detect the expression levels of mitochondrial fusion protein optic atrophy 1 (Opa1) and cleavage protein dynamic-related protein 1 (Drp1). The quantitative real-time fluorescence polymerase chain reaction (Real-time PCR) was applied to detect the expressions of Wnt/ β -catenin pathway-related factors such as lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6), glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) and β -catenin. **Result:** Compared with the sham group, the left ventricular wall of the model group was significantly thickened ($P < 0.05$), the cardiac cavity was significantly enlarged, and the content of collagen in the myocardial interstitium was increased ($P < 0.01$). The expression level of Opa1 decreased, the expression level of Drp1 increased ($P < 0.05$), the mRNA expression level of LRP6, GSK-3, and β -catenin increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, YQHX group can reduce ventricular wall thickening, heart chamber enlargement, myocardial interstitial collagen content, up-regulate the low expression of Opa1, but down-regulate the high expressions of Drp1, LRP6, GSK-3 β , β -catenin ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** YQHX can effectively alleviate ventricular remodeling and improve mitochondrial energy metabolism in rats with CHF. The mechanism may be related to the inhibition of Wnt/ β -catenin related factors.

[**Key words**] reinforcing Qi and activating blood method; chronic heart failure; ventricular remodeling; mitochondrial dynamics; Wnt/ β -catenin signaling pathway

慢性心力衰竭(CHF)是各类心脏疾病的严重表现的终末阶段,也是造成患者死亡的主要原因^[1]。心室重构(VR)作为CHF的重要病理机制,其主要表现为心肌肥厚、心腔扩大、心肌纤维化等,可失代偿发展成为泵衰竭、心律失常直至死亡的不可逆性恶性事件。近年来,越来越多的研究者将关注放在了VR中的线粒体能量代谢障碍^[2-3]。心脏作为人体能量消耗最大的器官,而线粒体又是参与机体能量供应中最重要的细胞器,故改善心肌线粒体能量代谢为CHF的治疗带来了新的思路^[4]。

中医认为,CHF的病机在于心气不足、心阳亏虚,而瘀血阻滞、痰瘀互结是疾病发展变化的关键。对于心之本体而言,气虚则能量供应不足,血瘀、或痰瘀互结则有害产物堆积,长此以往则心肌能量代谢紊乱,病理产物积聚于心肌壁,使心室甚或全心结构发生代偿性改变,是为VR的发生^[5]。补益心气即调节能量代谢紊乱、提高供能效率;活血化痰即清除代谢过程病理产物堆积,故益气活血法指导下、以黄芪、丹参等为代表的中药组方在治疗CHF,肥厚型心肌病等方面取得了显著的疗效,临床上广为沿用^[6-8]。为进一步明确益气活血方的效应靶点和可能的作用途径,开展益气活血方对CHF大鼠VR干预作用的实验研究,以期为进一步临床推广应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 雄性SD大鼠,SPF级,体质量240~260g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号SCXK(京)2014-0004,饲养于中国医学科学院放射医学研究所实验中心。本实验经天津中医药大学实验动物伦理委员会批准(编号TCM-LAEC20170043),所有实验操作均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

1.2 药物 益气活血方所用药物为颗粒剂,购自天津中医药大学第一附属医院国药堂,按临床处方剂量比例:黄芪30g(批号1804002),丹参15g(批号18003095),降香10g(批号1810029),三七粉1.5g(批号1806026),使用时最终药物质量浓度为 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。卡托普利片(上海衡山药业有限公司,国药准字H31021353)。

1.3 试剂 马松(Masson)复合染色液(南京建成科技有限公司,批号D026);线粒体蛋白提取试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司,批号GMS10013);BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物工程有限公司,批号P0010);视神经萎缩相关蛋白1(Opa1),线粒体动力相关蛋白1(Drp1),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(美国CST生物科技有限公司,批号分别为#80471, #8570, #8476);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(碧云天生物工程有限公司,批号

A0208); trizol 裂解液 (Ambion 公司, 批号 15596026); PrimeScript™ PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司, 批号 RR420A)。

1.4 仪器 DM3000 型光学显微镜 (德国 Leica 公司), ALC-V8S 型小动物呼吸机 (上海奥尔科特生物科技有限公司), Vevo2100 型小动物超声实时影像系统 (加拿大 Visual Sonics 公司), MK3 型酶标仪 (美国 Thermo 生物科技有限公司), ChemiQ4600 型凝胶成像系统 (上海勤翔科学仪器有限公司), ES-2 型紫外分光光度计 (日本 Malcom 公司), LightCycler 2.0 型实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 仪 (罗氏设备有限公司), EPS-300 型心电图仪与转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模、给药 40 只雄性 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 按随机数字表法分为假手术组 (10 只) 和造模组 (30 只)。参照文献方法^[9-10], 假手术组仅接受胸腔切开, 前降支穿线但不结扎, 心肌组织无损伤。造模组大鼠在左冠状动脉前降支下穿线结扎, 以肉眼可见缝线下方心肌色泽灰白、甚至紫绀为结扎成功。造模完成 4 周后, 造模组随机分为模型组、卡托普利组、益气活血组, 每组 10 只。益气活血组予益气活血颗粒 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}$, 卡托普利组予卡托普利片 $13.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}$ 。药物剂量均根据成人临床剂量按照体表面积法计算; 假手术组、模型组灌胃 (ig) 相应体积的生理盐水, 每日 1 次, 连续给药 4 周。

2.2 观测指标及检测方法

2.2.1 超声检测心脏形态学变化 利用超高分辨率小动物超声实时影像系统进行检测, 以评价其心脏体积变化情况。大鼠备皮后固定, 异氟烷吸入麻醉, 探头置于左胸部定位心脏, 经胸骨左心长轴切面以 M 模式超声评价心脏功能。分别检测左心室短轴缩短率 (LVFS), 左室舒张末内径 (LVDD), 左室收缩末内径 (LVDS), 左室舒张末容积 (LVD VOL), 左室收缩末容积 (LVS VOL)。所有数据均选取连续 3 个心动周期测量值的平均值。

2.2.2 测定心脏质量指数 造模后 8 周再次进行超声检测其左室质量指数 (LVMI), 结果参照 Devereux 标准校对公式自动计算。取材前一晚禁水 12 h。称量大鼠体质量 (BM), 采用 5% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 迅速打开腹腔从腹主动脉取血, 剪开左心耳, 0.9% 生理盐水灌注, 摘取心脏, 滤纸吸干后剔除连带组织及血管部分、全心质量 (HM), 计算全心重指数 (HWI) = HM/BM。

2.2.3 Masson 染色观察心肌间质胶原组织 将心脏组织固定于 10% 的甲醛溶液中, 经过梯度乙醇脱水、透明、浸蜡和包埋等步骤, 制成石蜡切片。经二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水、苏木素染核、盐酸乙醇分化、自来水冲洗返蓝后 Masson 复合染色液染色, 再经磷酸铝处理、苯胺蓝复染、冰乙酸处理、梯度乙醇脱水后二甲苯透明, 中性树胶封片, 光学显微镜下观察结果并拍照。Masson 染色后心肌纤维呈红色, 胶原组织呈蓝色, 利用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件, 计算心肌间质胶原容积分数 (CVF), $\text{CVF} = \text{胶原面积} / \text{总面积}$ 。

2.2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 Opal, Drp1 蛋白表达 心肌组织洗净后剪碎至 1 cm^3 置入匀浆器中裂解、研磨至匀浆状态, 以线粒体蛋白提取试剂盒提取心肌线粒体蛋白, 以 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定其含量。稀释、变性后置于冰上进行 SDS-PAGE 电泳转膜, 膜浸入封闭液中室温下震荡 1 h, 加入一抗 (1:1 000), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次后加入二抗 (1:2 000) 室温孵育 1 h, 洗膜后进行 ECL 化学发光自显影, 利用 Image J 软件计算目的蛋白相对表达量。

2.2.5 Real-time PCR 检测 Wnt/ β -catenin 通路相关 mRNA 表达 trizol 法提取 RNA, 经沉降、洗涤、重悬后反转录 cDNA, 利用紫外分光光度计测定样品 RNA 含量。扩增体系为 $20 \mu\text{L}$, 扩增程序为 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 30 s, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 34 s, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 15 s, 40 个循环。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, LRP6 引物序列为上游 5'-CGTCTACTGGACGGACGATG-3', 下游 5'-GGTCCCATTGAGCCTTGTC-3', 引物长度为 187 bp; GSK-3 β 引物序列为上游 5'-GGGACAGTGGTGTGGATCAG-3', 下游 5'-GCCGAAAGACCTTCGTCCAA-3', 引物长度为 144 bp; β -catenin 引物序列为上游 5'-ATCATTCTGGCCAGTGGTGG-3', 下游 5'-GACAGCACCCTTCAGCACTCT-3', 引物长度为 104 bp; β -肌动蛋白 (β -actin) 为内参, 引物序列上游 5'-GACA TCAAGAAGGTGGTGAAG-3', 下游 5'-TGGAAATG TCCATTGG-3', 引物长度为 136 bp。每个样本设 3 个复孔, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量。

2.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件, 所得数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较采用单因素方差分析及 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 CHF 大鼠心脏形态学的影响 与假手术组

比较,模型组 LVDD, LVDS, LVD VOL, LVS VOL 心室内径、容积指标均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较,卡托普利组与益气活血组心室内径、容积指标均显著降低 ($P < 0.01$), 益气活血组与卡托普利组之间无显著差异。见表 1。

表 1 益气活血方对 CHF 大鼠心脏超声心动图的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Yiqi Huoxue recipe (YHR) on echocardiography in CHF rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	LVDD/mm	LVDS/mm	LVD VOL/ mm^3	LVS VOL/ mm^3
假手术	-	6.54 ± 0.60	4.11 ± 0.34	221.10 ± 45.80	74.58 ± 14.14
模型	-	8.70 ± 1.35 ¹⁾	7.19 ± 1.36 ¹⁾	449.69 ± 151.30 ¹⁾	303.76 ± 123.07 ¹⁾
卡托普利	0.013 5	7.97 ± 0.38 ²⁾	5.50 ± 0.34 ²⁾	351.60 ± 34.06 ²⁾	147.63 ± 19.94 ²⁾
益气活血	20	7.53 ± 0.79 ²⁾	5.27 ± 0.85 ²⁾	304.62 ± 66.06 ²⁾	130.56 ± 39.76 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 4,5 同)。

表 2 益气活血方对 CHF 大鼠心脏质量指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

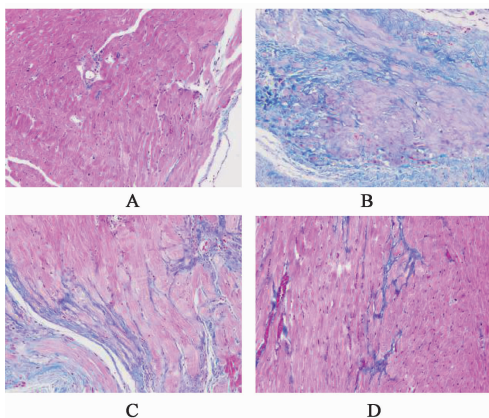
Table 2 Effect of YHR on heart mass index in CHF rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	HWI/ $g \cdot kg^{-1}$	LVMI/ $g \cdot m^{-2}$
假手术	-	3.17 ± 0.07	723.94 ± 113.35
模型	-	3.73 ± 0.08 ¹⁾	1019.07 ± 189.41 ¹⁾
卡托普利	0.013 5	3.34 ± 0.09 ²⁾	847.50 ± 169.41 ²⁾
益气活血	20	2.99 ± 0.13 ²⁾	818.97 ± 186.61 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 对 CHF 大鼠心肌间质胶原蛋白含量的影响

Masson 染色结果显示,镜下可见假手术组心肌间质少量细丝样胶原,模型组心肌间质大量粗大胶原,与模型组比较,卡托普利组与益气活血组胶原含量有所减少。与假手术组比较,模型组 CVF 显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,卡托普利组与益气活血组 CVF 均明显降低 ($P < 0.05$),益气活血组 CVF 明显低于卡托普利组 ($P < 0.05$)。见图 1,表 3。



A. 假手术组;B. 模型组;C. 卡托普利组;D. 益气活血组(图 2 同)

图 1 益气活血方对 CHF 大鼠心肌纤维的影响 (Masson, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of YHR on muscle fiber tissue of CHF rats (Masson, $\times 200$)

3.2 对 CHF 大鼠心脏质量指数的影响 与假手术组比较,模型组 HWI 与 LVMI 明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较,卡托普利组与益气活血组 HWI 与 LVMI 均明显降低 ($P < 0.05$),益气活血组与卡托普利组之间无显著差异。见表 2。

表 3 益气活血方对 CHF 大鼠 CVF 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of YHR on CVF in CHF rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	CVF/%
假手术	-	2.09 ± 0.73
模型	-	30.14 ± 15.37 ¹⁾
卡托普利	0.013 5	15.95 ± 9.64 ²⁾
益气活血	20	4.00 ± 5.77 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.4 对 CHF 大鼠心肌线粒体 Opa1, Drp1 蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组 Opa1 表达显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,卡托普利组与益气活血组 Opa1 表达均显著提高 ($P < 0.01$),益气活血组 Opa1 表达显著高于卡托普利组 ($P < 0.01$)。与假手术组比较,模型组 Drp1 表达显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,卡托普利组 Drp1 表达无显著差异,益气活血组 Drp1 表达显著降低 ($P < 0.01$),益气活血组 Drp1 表达显著低于卡托普利组 ($P < 0.01$)。见图 2,表 4。

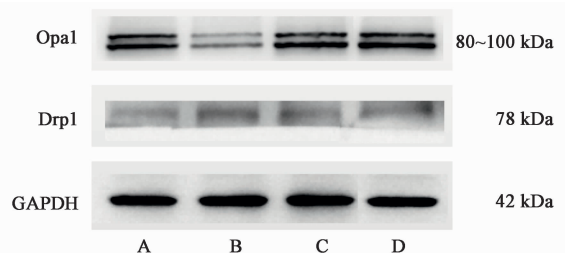


图 2 各组大鼠 Opa1 和 Drp1 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Opa1 and Drp1 proteins expression in rats

3.5 对 CHF 大鼠心肌 LRP6, GSK-3 β , β -catenin mRNA 表达的影响

与假手术组比较,模型组 LRP6 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,卡

表 4 益气活血方对 CHF 大鼠 Opa1 和 Drp1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of YHR on protein expression of Opa1 and Drp1 in CHF rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Opa1/GAPDH	Drp1/GAPDH
假手术	-	1.25 ± 0.02	0.24 ± 0.01
模型	-	0.45 ± 0.01 ¹⁾	0.29 ± 0.03 ¹⁾
卡托普利	0.013 5	0.79 ± 0.01 ²⁾	0.28 ± 0.02 ²⁾
益气活血	20	1.35 ± 0.01 ²⁾	0.20 ± 0.01 ²⁾

托普利组与益气活血组 LRP6 mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), 两组之间无显著差异。与假手术组比较, 模型组 GSK-3 β mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 卡托普利组与益气活血组 GSK-3 β mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), 两组之间无显著差异。与假手术组比较, 模型组 β -catenin mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 卡托普利组与益气活血组 β -catenin mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), 两组之间无显著差异。见表 5。

表 5 益气活血方对 CHF 大鼠 LRP6, GSK-3 β 和 β -catenin mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of YHR on mRNA expression of LRP6, GSK-3 β and β -catenin in CHF rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	LRP6	GSK-3 β	β -catenin
假手术	-	1.05 ± 0.09	1.05 ± 0.40	1.45 ± 0.04
模型	-	9.09 ± 0.32 ¹⁾	3.46 ± 0.29 ¹⁾	13.26 ± 0.86 ¹⁾
卡托普利	0.0135	5.17 ± 0.13 ²⁾	1.95 ± 0.02 ²⁾	4.98 ± 0.69 ²⁾
益气活血	20	4.71 ± 0.67 ²⁾	2.17 ± 0.37 ²⁾	4.88 ± 0.25 ²⁾

4 讨论

CHF 作为各种心血管疾病的终末阶段, 是一种心输出量下降、无法满足身体的新陈代谢和静脉回流需求的临床综合征, 具有慢性、进行性等特征^[11]。其发病过程中的心肌结构变化是最重要的病因, 也是病情恶化最关键的病理机制^[12]。因此, 延缓、抑制甚至逆转 VR 在治疗 CHF 中具有重要意义。以 CHF 的发病机制、病理表现及临床症状为依据, 运用中医理论分析, 认为在 VR 的认识上应当着眼于“心体”本身变化, 其发病根本在于心气亏虚, 气虚则不能运血, 血行迟滞则为血瘀, 痰瘀互结为有形病理产物, 堆积于心腔, 而成心腔扩张; 附着于肌壁, 而成心体肥大。故当以益气活血法为主要治法, 本研究所用的益

气活血方以黄芪为君, 丹参为臣, 功以益气活血为主; 降香、三七粉为佐使, 以助行气化瘀之效。

线粒体具有高度动态的特征, 及通过不断运动和形态变化形成细胞内动态连续的线粒体网络以发挥其动力学效用。线粒体动力学参与多种基本生物过程, 包括线粒体质量控制、能量供应、细胞代谢和细胞凋亡等^[13], 在心血管疾病中, 大量证据显示线粒体动力学在支持心脏生物能量需求和代谢调节方面起着至关重要的作用。具体而言, 线粒体融合是线粒体的必要补充过程, 受损线粒体可通过将蛋白质、脂质以及 DNA 等与健康的线粒体进行交换来恢复正常功能; 线粒体分裂则在线粒体质量控制上更为重要, 通过分离受损的线粒体并随后通过线粒体自噬清除^[14]。有研究表明, 心衰大鼠的融合蛋白 Opa1 表达明显低于正常大鼠^[15], 在心力衰竭与扩张型心肌病患者中发现分裂蛋白 Drp1 表达明显降低^[16], 提示线粒体动力学可能与心力衰竭心室重构有一定联系。另有研究发现心肌肥厚动物模型的线粒体动力学以分裂为主, 导致线粒体数量增多、质量下降, 进而线粒体片段化增加、病理产物堆积^[17]; 氧化磷酸化不足、能量供应障碍, 加剧了心肌的肥厚程度。本实验证明, 益气活血方可显著减低 CHF 大鼠的心肌厚度及心腔容积, 并降低心肌间质胶原含量, 其作用效果不劣于卡托普利; 并进一步证明益气活血方可通过上调 Opa1 表达水平促进线粒体融合、下调 Drp1 抑制线粒体分裂, 从而抑制线粒体过度分裂、促进其受损健康部分融合以保证线粒体质量, 进而调控了线粒体动态平衡, 不增加底物的基础上提高了线粒体为心肌供能的效率, 潜在地减少了因线粒体数量过多和氧化磷酸化不足而增加的氧化应激过程产物, 降低对心肌细胞的损害, 从而抑制了 VR 的进展和恶化。

Wnt 糖蛋白家族是一组进化上高度保守的生物体发育调节因子, 早已明确其在维持机体自我更新的关键作用, Wnt 也是组织形态和结构发生变化的关键驱动因素。有研究显示 β -catenin 敲除可通过抑制心肌祖细胞分化进而防止 VR, 有利于 CHF 的预后, 验证了 Wnt/ β -catenin 信号通路与 VR 的密切关系。在机制研究方面, 有大量证据显示 Wnt/ β -catenin 信号通路对线粒体动力学之间的互相作用, 如 Wnt5a 可通过促进 Drp1 活性、增加线粒体内 Ca²⁺ 浓度介导海马神经中的神经元突触异常分化^[18]。其中, LRP6 作为连接 Wnt/ β -catenin 信号通路与线粒体动力学的纽带, 可发动 Drp1 的激活造成

线粒体功能障碍,造成致死性扩张型心肌病和心功能不全^[19]。本实验结果显示益气活血方在改善 VR 的过程中促进线粒体融合、抑制线粒体过度分裂,并伴随着 LRP6, GSK-3 β , β -catenin 等关键基因表达量下调,验证了益气活血方通过调控 Wnt/ β -catenin 促进线粒体动力学的平衡机制,阐释了益气活血方改善 VR 的内在机制,并在一定程度上丰富了中医药治疗 CHF,改善 VR 的理论内涵。

[参考文献]

[1] 中华医学会心血管病学分会心力衰竭学组, 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] Vanbilsen M, Smeets P, Gilde A, et al. Metabolic remodelling of the failing heart: the cardiac burn-out syndrome? [J]. Cardiovasc Res, 2004, 61(2): 218-226.

[3] LIU G Z, HOU T T, YUAN Y, et al. Fenofibrate inhibits atrial metabolic remodelling in atrial fibrillation through PPAR-alpha/sirtuin 1/PGC-1alpha pathway [J]. Br J Pharmacol, 2016, 173(6): 1095-1109.

[4] Doenst T, Nguyen T D, Abel D. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production[J]. Circ Res, 2013, 113(6): 709-724.

[5] 周亚男, 张军平. 慢性心力衰竭大气下陷说及从气、血、水论治[J]. 新中医, 2009, 41(4): 7-8.

[6] 施琦, 张军平, 谢盈彧, 等. 张军平应用益气活血、软坚散结法治疗肥厚型心肌病经验介绍[J]. 新中医, 2019, 51(2): 297-299.

[7] 刘晶, 徐浩. 益气活血法治疗射血分数保留心力衰竭气虚血瘀证临床疗效和安全性的 Meta 分析[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(11): 1477-1480.

[8] 赵爱梅, 任均国, 刘建勋. 益气活血方治疗冠心病气虚血瘀证作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(7): 215-220.

[9] 赵桂峰, 吴丽玉, 许传嘉. 芪参益气滴丸对梗后大鼠心功能及心肌纤维化相关蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(4): 131-136.

[10] 李庆敏, 瞿武林, 陈伯钧. 铁皮石斛对缺血再灌注后心衰心气虚型大鼠心肌纤维化的抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15): 83-88.

[11] Shantsila E, Wrigley B J, Shantsila A, et al. Monocyte-derived and CD34⁺/KDR⁺ endothelial progenitor cells in heart failure[J]. J Thromb Haemost, 2012, 10(7): 1252-1261.

[12] LI C, WANG Y, QIU Q, et al. Qishenyiqi protects ligation-induced left ventricular remodeling by attenuating inflammation and fibrosis via STAT3 and NF- κ B signaling pathway [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104255.

[13] Burman J L, Pickles S, WANG C, et al. Youle mitochondrial fission facilitates the selective mitophagy of protein aggregates[J]. J Cell Biol, 2017, 216(10): 3231-3247.

[14] MAO K, Klionsky D J. Mitochondrial fission facilitates mitophagy in saccharomyces cerevisiae[J]. Autophagy, 2013, 9(11): 1900-1901.

[15] Givvimani S, Pushpakumar S, Veeranki S, et al. Dysregulation of Mfn2 and Drp-1 proteins in heart failure [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2014, 92(7): 583-591.

[16] CHEN L, GONG Q, Stice J P, et al. Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure [J]. Cardiovasc Res, 2009, 84(1): 91-99.

[17] CHANG C R, Blackstone C. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology [J]. J Biol Chem, 2007, 282(30): 21583-21587.

[18] QI X, Disatnik M. H, SHEN N, et al. Aberrant mitochondrial fission in neurons induced by protein kinase C δ under oxidative stress conditions *in vivo* [J]. Mol Biol Cell, 2011, 22(2): 256-265.

[19] CHEN Z D, LI Y, WANG Y, et al. Cardiomyocyte-restricted low density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6) deletion leads to lethal dilated cardiomyopathy partly through drp1 signaling [J]. Theranostics, 2018, 8(3): 627-643.

[责任编辑 周冰冰]