

益心泰对慢性心力衰竭大鼠线粒体分裂蛋白Fis1、Mff的影响

刘承鑫, 魏佳明, 王子焱, 施敏, 袁惠, 唐云, 李雅, 郭志华*

(湖南中医药大学第一中医临床学院, 中医学院, 药学院, 慢病中医智能诊断与治未病湖南省普通高等学校重点实验室, 互联网+慢病中医诊治与养生智能化应用研究生联合培养基地, 长沙 410208)

[摘要] 目的:研究益心泰对慢性心力衰竭大鼠线粒体分裂蛋白的干预作用及其机制。方法:60只SD大鼠随机抽取10只作为假手术组,剩余50只采用结扎左冠状动脉前降支法制备心肌梗死后心力衰竭大鼠模型。将造模成功的大鼠随机分为模型组、益心泰低、中、高剂量组(1.4、2.8、5.6 g·kg⁻¹)、曲美他嗪组(10 mg·kg⁻¹),各给药组予相应剂量药物灌胃,模型组和假手术组给予等体积的生理盐水灌胃,连续给药28 d。采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠血清氨基末端B型利钠肽(NT-pro BNP)、B型利钠肽(BNP)、腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)含量;彩色多普勒超声成像仪检测心功能指标;苏木素-伊红(HE)染色、马松(Masson)染色法观察心脏病理形态学改变,使用Image J软件计算胶原容积分数(CVF);透射电镜观察心肌细胞超微结构变化;原位末端标记法(TUNEL)染色检测心肌组织细胞凋亡率;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测心肌组织线粒体外膜线粒体分裂蛋白1(Fis1)、线粒体分裂因子(Mff)表达。结果:与假手术组比较,模型组血清NT-pro BNP、BNP含量显著升高($P<0.01$),ATP含量显著降低($P<0.01$),左心室射血分数(LVEF)及左心室短轴缩短率(LVFS)下降($P<0.01$),左室舒张末期内径(LVIDd)、左室收缩末期内径(LVIDs)升高($P<0.01$),心肌细胞排列紊乱、炎性细胞浸润、胶原纤维增多、CVF上升($P<0.01$),心肌及线粒体出现损伤,心肌细胞凋亡指数升高($P<0.01$),心肌组织线粒体分裂蛋白Fis1、Mff表达上调($P<0.01$);与模型组比较,益心泰低、中、高剂量组及曲美他嗪组血清NT-pro BNP、BNP含量降低($P<0.05$),ATP含量升高($P<0.05$),益心泰低、中、高剂量组及曲美他嗪组LVEF、LVFS升高($P<0.01$),LVIDd、LVIDs均降低($P<0.01$),各剂量益心泰治疗组及曲美他嗪组心肌炎症损伤减轻、纤维化得到改善,CVF降低($P<0.01$),各剂量益心泰治疗组及曲美他嗪组心肌线粒体结构得到改善,各剂量益心泰治疗组及曲美他嗪组心肌细胞凋亡指数下降($P<0.01$);益心泰中、高剂量组及曲美他嗪组心肌组织Fis1、Mff蛋白表达下调($P<0.05$)。结论:益心泰可改善线粒体结构、减轻心肌细胞凋亡、提升心功能,其作用机制可能与抑制心肌组织线粒体分裂蛋白Fis1、Mff表达有关。

[关键词] 益心泰; 心力衰竭; 线粒体动力学; 凋亡; 线粒体分裂

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R541.6+1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2024)04-0143-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20231937

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20231120.1143.001>

[网络出版日期] 2023-11-20 17:30:17

Effect of Yixintai on Mitochondrial Fission Proteins Fis1 and Mff in Rat Model of Chronic Heart Failure

LIU Chengxin, WEI Jiaming, WANG Ziyang, SHI Min, YUAN Hui, TANG Yun, LI Ya, GUO Zhihua*
(First Clinical College of Chinese Medicine, School of Traditional Chinese Medicine (TCM), School of Pharmacy, Hunan Key Laboratory of Colleges and Universities of Intelligent TCM Diagnosis and Preventive Treatment of Chronic Diseases, Internet + TCM Diagnosis and Treatment of Chronic Diseases and Intelligent Application of Health Care Joint Postgraduate Training Base, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[收稿日期] 2023-07-02

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82174343);湖南省自然科学基金项目(2021JJ30495);湖南省卫生健康委科研计划项目(D202303017861);湖南省研究生科研创新项目(CX20220808);湖南省中医药科研计划项目(2021064,A2023017);湖南中医药大学“一方”研究生创新项目(2023YF10)

[第一作者] 刘承鑫,在读博士,从事心脑血管疾病的防治研究,E-mail:511170405@qq.com

[通信作者] *郭志华,博士,教授,主任医师,博士生导师,从事心脑血管疾病的防治研究,E-mail:guozhihua112@163.com

[Abstract] **Objective:** To study the effect and mechanism of Yixintai on mitochondrial fission proteins in the rat model of chronic heart failure. **Method:** Ten of 60 SD rats were randomly selected as the sham operation group, and the remaining 50 rats were subjected to ligation of the left anterior descending coronary artery for the modeling of heart failure post myocardial infarction. The successfully modeled rats were randomized into model, low-, medium-, and high-dose (1.4, 2.8, and 5.6 g·kg⁻¹, respectively) Yixintai, and trimetazidine (10 mg·kg⁻¹) groups. The rats were administrated with corresponding doses of drugs by gavage, and the rats in the model group and sham operation group were given an equal volume of normal saline by gavage for 28 consecutive days. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was then employed to measure the levels of amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-pro BNP), B-type natriuretic peptide (BNP), and adenosine triphosphate (ATP) in the serum. Color Doppler ultrasound imaging was conducted to examine the cardiac function indicators. Hematoxylin-eosin staining and Masson staining were conducted to observe the pathological changes in the heart, and Image J was used to calculate collagen volume fraction (CVF). Transmission electron microscopy was employed to observe the ultrastructural changes of myocardial cells. Terminal-deoxynucleotidyl transferase-mediated nick-end labeling (TUNEL) was employed to measure the apoptosis rate of myocardial cells. Western blot was employed to determine the protein levels of mitochondrial fission protein 1 (Fis1) and mitochondrial fission factor (Mff) in the outer mitochondrial membrane of the myocardial tissue. **Result:** Compared with the sham operation group, the model group showed elevated levels of NT-pro BNP and BNP in the serum, decreased ATP content, left ventricular ejection fraction (LVEF), and left ventricular fraction shortening (LVFS), increased left ventricular end-diastolic diameter (LVIDd) and left ventricular end-systolic diameter (LVIDs), disarrangement of myocardial cells, inflammatory cell infiltration, increased collagen fibers and CVF, damaged myocardium and mitochondria, and increased apoptosis rate of myocardial cells, and up-regulated expression of Fis1 and Mff in the cardiac tissue ($P<0.01$). Compared with the model group, different doses of Yixintai and trimetazidine lowered the serum levels of NT-pro BNP and BNP ($P<0.05$), increased the ATP content ($P<0.05$), increased LVEF and LVFS ($P<0.01$), decreased LVIDd and LVIDs ($P<0.01$). Moreover, the drugs alleviated the myocardial inflammatory damage and fibrosis, reduced CVF ($P<0.01$), repaired the myocardial mitochondrial structure, and decreased the apoptosis rate of myocardial cells ($P<0.01$). Medium- and high-dose Yixintai and trimetazidine down-regulated the expression of Fis1 and Mff in the myocardial tissue ($P<0.05$). **Conclusion:** Yixintai can improve mitochondrial structure, reduce myocardial cell apoptosis, and improve cardiac function by inhibiting the expression of Fis1 and Mff in the myocardial tissue.

[Keywords] Yixintai; heart failure; mitochondrial dynamics; apoptosis; mitochondrial fission

慢性心力衰竭(CHF)是各种因素导致的心室充盈和(或)血液排出困难所引发的一组复杂的临床综合征^[1],因其具有发病率高、病死率高的特点,已成为21世纪最重要的心血管病症之一^[2]。心肌梗死(MI)是导致CHF的主要原因之一^[3]。在MI后,细胞内活性氧(ROS)增加及Ca²⁺超载导致线粒体损伤,造成能量代谢障碍,同时也引发心肌重构及细胞凋亡,最终促使CHF的发生;而调节线粒体结构和功能,则会改善CHF^[4]。因而,调节线粒体功能与结构成为防治CHF的潜在作用靶点^[5]。线粒体是调节能量供应的重要细胞器^[6],主要通过其自身动力学(分裂与融合)机制调控其结构与功能,从而实现对能量代谢、线粒体生物合成、凋亡、ROS的调

节^[7]。研究发现,在CHF的发展过程中,线粒体动力学失衡,总体趋于分裂,线粒体出现碎片化,不能满足心肌细胞正常能量需求,导致心功能损伤^[8]。这与线粒体分裂蛋白1(Fis1)、线粒体分裂因子(Mff)出现高表达存在关联性^[9]。因此,抑制线粒体分裂蛋白的表达,调节线粒体动力学平衡,成为稳定线粒体结构与功能,改善心肌能量代谢,延缓CHF的潜在作用机制^[10]。

本课题组长期致力于中医药防治血管疾病的基础研究,根据多年来对于CHF的临床经验及实验研究,创制益心泰方。该方由温阳益气之经典药对黄芪、人参,活血化瘀之经典药对丹参、红花合《伤寒论》五苓散化裁而来,具有益气活血、利水消肿之

功。前期研究发现,益心泰能通过抑制心肌重构、减轻凋亡、提高心功能,从而延缓CHF进程^[11],且对心肌超微结构及能量代谢具有一定的改善作用^[12-13]。然而,益心泰调节线粒体结构功能的潜在调节机制尚未阐明。因此,本研究通过结扎左冠状动脉前降支法制备大鼠心肌梗后CHF模型,以观察益心泰对CHF大鼠心功能、线粒体结构及心肌线粒体分裂蛋白Fis1、Mff表达的影响,为该药的后续开发与应用提供依据。

1 材料

1.1 动物 60只雄性SD大鼠,SPF级,体质量200~240 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号SCXK(湘)2019-0009。本实验中操作通过湖南中医药大学伦理委员会审核(批号LL2022070709)。动物饲养于温度(23±2)℃,湿度(56±4)%的环境中,自由进水进食。

1.2 药物 益心泰颗粒:益心泰颗粒由黄芪30 g、丹参15 g、红花5 g、人参10 g、泽泻10 g、猪苓15 g、葶苈子15 g、茯苓15 g组成,方中所用药物均为中药配方颗粒,购自广东一方制药有限公司,批号分别为1051693、1080473、1081223、1042233、1081173、1051953、1042123、1071523;盐酸曲美他嗪片(瑞阳制药股份有限公司,货号H20066534,批号22010701,规格20 mg/片);注射用青霉素钠(华北制药股份有限公司,货号H13020657,批号F2052114,规格80万U/瓶)。

1.3 试剂 氨基末端B型利钠肽(NT-pro BNP)、B型利钠肽(BNP)、腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(湖南艾方生物科技有限公司,货号分别为AF40240-A、AF2943-A、AF8511-A);Fis1、Mff、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,货号分别为DF12005、DF12006、AF7021);羊抗兔二抗(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号KL07068L1929);原位末端标记法(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号C1089);苏木精、伊红[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,货号分别为H9627、E4009];马松(Masson)染液(武汉赛维尔生物科技股份有限公司,货号G1006);异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,规格100 mL/瓶,批号22090401)。

1.4 仪器 VINNO 6LAB型小动物彩色多普勒超声成像系统(飞依诺科技股份有限公司);R407型小动物呼吸机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司);

VECG-2303B型心电图机(广州市三锐电子科技有限公司);DYY-7C型电泳仪(北京市六一仪器厂);Eclipse E100型正置光学显微镜、DS-U3型成像系统(日本Nikon公司);HT7700型透射电子显微镜(日本HITACHI公司);ChemiDoc XRS+型核酸蛋白表达成像系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 动物造模 健康雄性SD大鼠60只,体质量(200±20)g。随机抽取10只作为假手术组,其余50只为模型组。参考文献,采用结扎左冠状动脉前降支法制备MI后CHF模型^[14]。2%戊巴比妥钠麻醉SD大鼠,背部固定,经脱毛、消毒、机械通气后,于大鼠胸部左侧切开皮肤,钝性分离第3~4肋间肌及心包膜以充分暴露心脏,并用6-0缝合线于左冠状动脉根部约2.5~3.5 mm处结扎。术前、术后行心电图监测,根据心电图ST段抬高及术中所见心肌变白以综合判断心肌梗死模型是否成功。假手术组开胸后,只穿线不结扎,其余步骤同CHF模型组。术后对大鼠连续3 d肌注青霉素(8万U/只)以预防感染。其后,对所有手术大鼠进行力竭游泳,连续游泳14 d。

2.2 分组与给药 造模6周后,将成模大鼠随机分为5组:模型组、益心泰低、中、高剂量组、曲美他嗪组,每组8只,另设假手术组10只。于实验第7周开始灌胃,给药剂量根据《中医科研设计与统计学》中所载的等效剂量比值系数进行折算^[15],将益心泰低、中、高剂组分别按照1.4、2.8、5.6 g·kg⁻¹剂量标准(相当于成人剂量1、2、4倍)加生理盐水配制成悬浊液后灌服,每日1次,连续28 d;曲美他嗪组予曲美他嗪10 mg·kg⁻¹,溶于生理盐水后灌胃,每日1次,连续28 d,灌胃容积为10 mL·kg⁻¹;假手术组和模型组给予生理盐水3 mL灌胃,每日1次,连续28 d。

2.3 一般情况观察 观察大鼠精神状态、心率、呼吸频率、体质量等一般情况。

2.4 ELISA检测大鼠血清BNP、NT-pro BNP、ATP含量 大鼠腹主动脉采血,静置后3 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径10 cm),取血清置于-80℃冰箱保存。按照ELISA试剂盒说明书检测血清BNP、NT-pro BNP、ATP含量。

2.5 心功能检测 采用小动物彩色多普勒超声成像系统检测,异氟烷呼吸麻醉大鼠,后将大鼠平卧位固定,将彩超机探头频率设置为17~18 MHz,取心前区左室长轴最大直径处,计算大鼠左室射血分数(LVEF)、左室短轴收缩率(LVFS)、左室舒张末期

内径(LVIDd)、左室收缩末期内径(LVIDs)取3个心动周期计算平均值。

2.6 苏木素-伊红(HE)、Masson染色法观察心肌组织病理结构 采用多聚甲醛固定液固定心肌组织,经脱水、浸蜡、包埋、切片(厚4~5 μm)、烤片后,按试剂盒说明书操作步骤进行HE、Masson染色。每组随机选3张玻片,每张切片随机选择5个不同视野拍照。Masson染色切片保存图片后使用Image J软件进行纤维化定量,分析心肌胶原容积分数(CVF), $CVF = \text{胶原面积} / \text{整个视野面积} \times 100\%$ 。

2.7 透射电镜观察心肌超微结构 取大约1 mm³的心肌组织为样品,并对样本进行初步固定,其后经锇酸固定、脱水、渗透、包埋、切片、铀铅双染色、干燥后,于透射电子显微镜下观察,并采集图像分析。

2.8 TUNEL法检测心肌细胞凋亡情况 采用TUNEL法检测心肌细胞凋亡情况。取大鼠左室前壁中段心肌细胞,制备石蜡切片,按照试剂盒操作步骤进行TUNEL染色,予抗荧光淬灭封片液封片处理。在荧光显微镜下观察,正常心肌细胞核呈蓝色染色,凋亡阳性细胞呈红色,取5个高倍视野中凋亡阳性心肌细胞数量占总细胞数量分数为心肌细胞凋亡指数(AI)。

2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Fis1、Mff蛋白表达 将心肌组织100 mg置于冰上,加入RIPA裂解液,经充分研磨、裂解后离心取上清,其后进行蛋白定量,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)电泳分离蛋白,转膜,封闭,经一抗[Fis1(1:1 000),Mff(1:1 000),GAPDH(1:3 000)]、二抗[羊抗兔(1:6 000)]孵育,显影成像,通过Image J软件分析灰度值,以GAPDH作对照计算Fis1、Mff蛋白相对表达水平。

2.10 统计学方法 用SPSS 27.0统计学软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 处理。多组间比较满足正态性检验、方差齐性,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)分析,两两比较采用最小显著性差异法(LSD),否则采用非参数检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 手术前后心电图情况 手术前大鼠心电图ST段无明显抬高,心肌颜色正常;手术后大鼠心电图ST段抬高,结扎部位心肌颜色变白,综合以上结果提示心肌梗死。

3.2 对CHF大鼠模型一般情况的影响 假手术组

大鼠始终动作灵活,精神状态与饮食均正常,毛发柔顺、光泽;模型组大鼠体质量减轻、呼吸频率快、活动较少,毛发黄无光泽,蜷缩嗜睡,精神萎靡,反应迟缓,部分实验大鼠一般情况有所加重;用药后,益心泰低、中、高剂量组和曲美他嗪组大鼠精神状态、毛发情况、呼吸频率、反应等一般情况逐渐较前好转。整个用药过程中模型组、益心泰低剂量组大鼠各死亡2只,益心泰高剂量组死亡1只,益心泰中剂量组、曲美他嗪组、假手术组无大鼠死亡。

3.3 对CHF大鼠模型血清BNP、NT-pro BNP含量的影响 与假手术组比较,模型组血清BNP、NT-pro BNP含量显著上升($P < 0.01$);与模型组比较,益心泰低、中、高剂量组及曲美他嗪组血清BNP、NT-pro BNP含量明显下降($P < 0.05$)。见表1。

表1 益心泰对CHF大鼠模型血清BNP、NT-pro BNP含量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of Yixintai on serum BNP and NT-pro BNP in CHF rat model ($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | BNP/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | NT-pro BNP/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ |
|---------|-------------------------------------|--|---|
| 假手术组 | | 17.03±1.26 | 471.55±31.09 |
| 模型组 | | 38.89±1.24 ¹⁾ | 853.51±77.55 ¹⁾ |
| 益心泰低剂量组 | 1.4 | 31.54±4.89 ²⁾ | 730.30±51.17 ²⁾ |
| 益心泰中剂量组 | 2.8 | 26.00±3.26 ²⁾ | 608.33±46.94 ²⁾ |
| 益心泰高剂量组 | 5.6 | 23.93±3.53 ²⁾ | 488.39±72.16 ²⁾ |
| 曲美他嗪组 | 0.01 | 19.73±4.08 ²⁾ | 487.14±32.05 ²⁾ |

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表2-表6同)

3.4 对CHF大鼠模型血清ATP含量的影响 与假手术组比较,模型组血清ATP含量显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,益心泰低、中、高剂量组及曲美他嗪组血清ATP含量明显上升($P < 0.05$)。见表2。

表2 益心泰对CHF大鼠模型血清ATP含量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Yixintai on serum ATP content in CHF rat model ($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | ATP/ $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ |
|---------|-------------------------------------|--|
| 假手术组 | | 930.30±17.68 |
| 模型组 | | 694.87±26.42 ¹⁾ |
| 益心泰低剂量组 | 1.4 | 796.82±32.09 ²⁾ |
| 益心泰中剂量组 | 2.8 | 835.76±37.67 ²⁾ |
| 益心泰高剂量组 | 5.6 | 907.22±23.08 ²⁾ |
| 曲美他嗪组 | 0.01 | 909.49±17.10 ²⁾ |

3.5 对CHF大鼠模型心功能的影响 与假手术组比较,模型组LVEF、LVFS下降,LVIDd、LVIDs上升,差异具有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,

益心泰低、中、高剂量组及曲美他嗪组LVEF、LVFS上升,LVIDd、LVIDs下降,差异具有统计学意义($P<0.01$)。见表3。

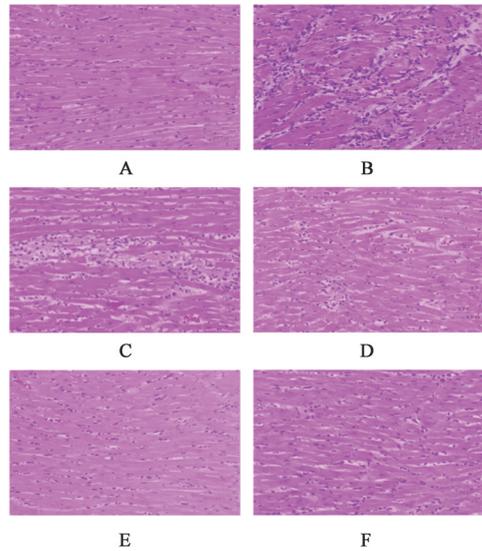
表3 益心泰对CHF大鼠模型心功能的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Yixintai on cardiac function in CHF rat model ($\bar{x}\pm s, n=6$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | LVEF/% | LVFS/% | LVIDd/mm | LVIDs/mm |
|---------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 假手术组 | | 82.44±2.09 | 43.69±2.76 | 6.11±0.37 | 4.23±0.37 |
| 模型组 | | 52.73±3.57 ¹⁾ | 23.78±1.98 ¹⁾ | 8.10±0.19 ¹⁾ | 6.46±0.28 ¹⁾ |
| 益心泰低剂量组 | 1.4 | 62.59±3.21 ³⁾ | 29.72±2.02 ³⁾ | 7.90±0.54 ³⁾ | 5.95±0.66 ³⁾ |
| 益心泰中剂量组 | 2.8 | 67.28±1.62 ³⁾ | 34.01±2.45 ³⁾ | 7.47±0.18 ³⁾ | 5.10±0.53 ³⁾ |
| 益心泰高剂量组 | 5.6 | 73.42±2.00 ³⁾ | 37.73±1.72 ³⁾ | 7.03±0.45 ³⁾ | 4.89±0.49 ³⁾ |
| 曲美他嗪组 | 0.01 | 73.08±4.25 ³⁾ | 37.48±3.58 ³⁾ | 6.95±0.44 ³⁾ | 4.48±0.52 ³⁾ |

3.6 对CHF大鼠模型心肌组织病理形态学的影响

HE染色结果显示,假手术组心肌组织形态基本正常完整,心肌纤维排列整齐紧密,心肌细胞形态正常,胞膜、胞核清晰,心肌间质无水肿及炎症细胞浸润。与假手术比较,模型组心肌纤维排列紊乱,且出现断裂,细胞核出现皱缩,心肌间质出现水肿,存在炎性细胞浸润。与模型组比较,经各剂量复方益心泰治疗组及曲美他嗪组治疗后,心肌损伤程度均有所改善,炎性细胞浸润、心肌细胞核皱缩、心肌间质水肿均较模型组有不同程度减少,心肌细胞排列较模型组整齐,心肌纤维断裂程度较模型组减轻,而曲美他嗪组和益心泰高剂量组心肌组织病理形态改善最为明显。见图1。



注:A.假手术组;B.模型组;C.益心泰低剂量组;D.益心泰中剂量组;E.益心泰高剂量组;F.曲美他嗪组(图2-图5同)

图1 益心泰对CHF大鼠模型心肌组织HE染色结果的影响(HE,×400)

Fig. 1 Effect of Yixintai on HE staining results of myocardial tissue in CHF rat model (HE, ×400)

Masson染色结果显示,与假手术组比较,模型组心肌间隙明显增大,心肌纤维发生断裂且伴有大量空泡,心肌间质发现大量被染成蓝色的胶原纤维,且CVF值显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,各剂量复方益心泰治疗组及曲美他嗪组的心肌组织损伤程度均得到一定改善,心肌间隙减小,心肌排列较完整,断裂程度减低,心肌胶原纤维较模型组减少,CVF值显著降低($P<0.01$)。以上结果提示,复方益心泰对CHF大鼠心肌纤维化具有缓解作用。见图2、表4。

维排列较模型组整齐,肌丝溶解程度降低,肌节较清晰;线粒体结构清晰程度、嵴分布及胞质空泡化程度均不同程度得到改善,其中益心泰高剂量组、曲美他嗪组改善最明显。见图3。

3.7 对CHF大鼠模型心肌组织及线粒体形态结构的影响 假手术组心肌肌原纤维排列整齐,Z线、M线、肌节清晰;线粒体结构清晰,嵴分布规则,胞质无变化。与假手术组比较,模型组心肌纤维排列紊乱,部分出现断裂,肌丝出现溶解;线粒体结构模糊,嵴分布紊乱,胞质出现空泡化。与模型组比较,经各剂量复方益心泰组及曲美他嗪组干预后,心肌及线粒体损伤程度均有所改善。各组心肌肌原纤

3.8 对CHF大鼠模型心肌组织凋亡的影响 与假手术组比较,模型组大鼠AI值显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各剂量益心泰组及曲美他嗪组AI值显著降低($P<0.01$)。见图4、表5。

3.9 对CHF大鼠模型线粒体分裂蛋白Fis1、Mff表达的影响 与假手术组比较,模型组心肌蛋白Fis1、Mff表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,益心泰中、高剂量组及曲美他嗪组心肌蛋白Fis1、Mff表达

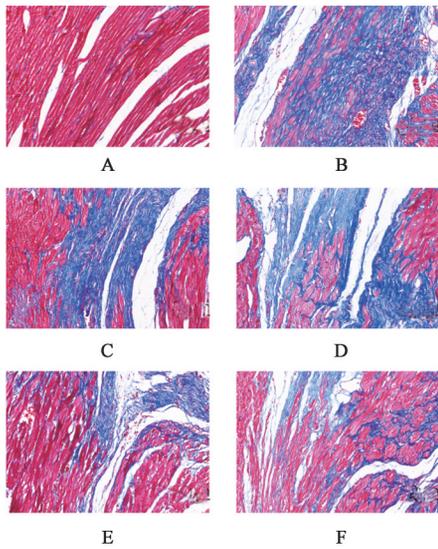


图2 益心泰对CHF大鼠模型心肌组织Masson染色结果的影响 (Masson, ×400)

Fig. 2 Effect of Yixintai on Masson staining results of myocardial tissue in CHF rat model (Masson, ×400)

表4 益心泰对CHF大鼠模型心肌组织胶原容积分数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 4 Effect of Yixintai on collagen volume fraction of myocardial tissue in CHF rat model ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | CVF/% |
|---------|-----------------------|--------------------------|
| 假手术组 | | 6.62±1.30 |
| 模型组 | | 54.70±3.00 ¹⁾ |
| 益心泰低剂量组 | 1.4 | 39.01±1.47 ³⁾ |
| 益心泰中剂量组 | 2.8 | 36.87±2.62 ³⁾ |
| 益心泰高剂量组 | 5.6 | 25.62±1.07 ³⁾ |
| 曲美他嗪组 | 0.01 | 24.25±1.96 ³⁾ |

明显下降($P<0.05$)。见图5、表6。

4 讨论

CHF可由许多因素引起,最常见的风险因素是高血压、冠状动脉疾病等,随着人口老龄化的不断加剧,CHF的患病率与死亡率呈上升趋势,现已成为全球防治心血管疾病的一大难题^[16]。心肌能量代谢改变是CHF的特征,而线粒体功能结构的损伤是导致能量代谢障碍并引起CHF的重要因素^[17-18]。目前通过调节线粒体结构、改善能量代谢治疗CHF的药物主要有曲美他嗪、磷酸肌酸钠、辅酶Q10等^[19],以上药物虽然对于CHF具有一定的缓解作用,但收效有限。因而,开发调节能量代谢的药物仍具有较大空间。研究发现,益气活血类中药对于线粒体结构功能具有调节作用^[20-21],故本次实验采用益心泰作为试验施加因素开展。

益心泰是基于CHF“虚、瘀、水”的病机特点而

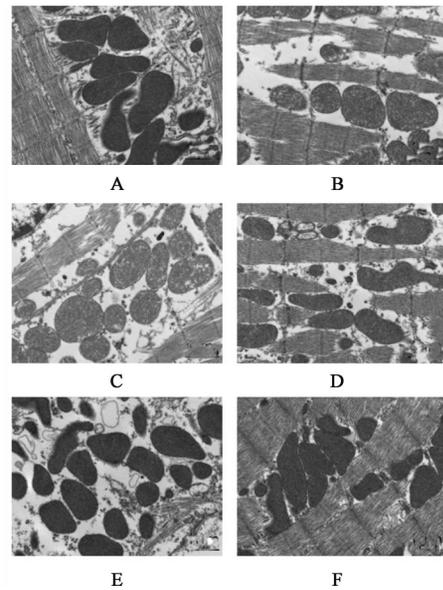


图3 益心泰对CHF大鼠模型心肌组织及线粒体形态结构的影响 (透射电镜, ×10 000)

Fig. 3 Effect of Yixintai on myocardial tissue and mitochondrial morphological structure in CHF rat model (TEM, ×10 000)

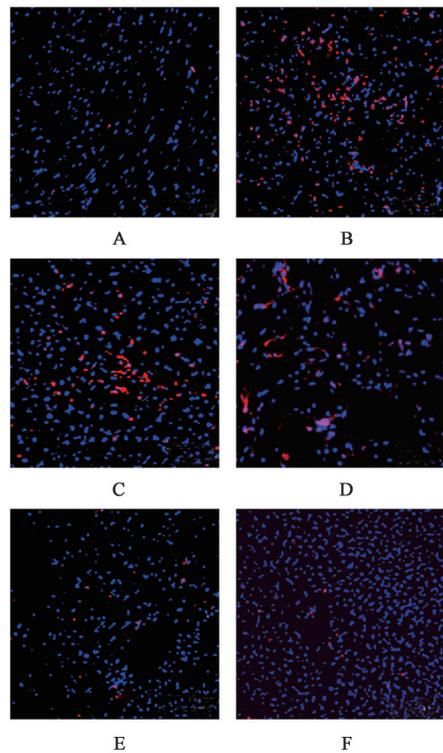


图4 益心泰对CHF大鼠模型心肌组织凋亡的影响 (TUNEL, ×400)

Fig. 4 Effect of Yixintai on myocardial tissue apoptosis in CHF rat model (TUNEL, ×400)

创制的临床科研方,该方主要通过培补元气,行瘀通络、化痰除饮,以达到“虚则补之,实则泻之”的治疗目的。方中重用甘温黄芪入脾、肺经,以其“益元气,温三焦,壮脾胃”(《本草备要·卷一·草部》)之

表5 益心泰对CHF大鼠模型心肌组织凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 5 Effect of Yixintai on myocardial tissue apoptosis in CHF rat model ($\bar{x} \pm s, n=5$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | AI/% |
|---------|-----------------------|--------------------------|
| 假手术组 | | 7.80±1.92 |
| 模型组 | | 54.60±4.62 ¹⁾ |
| 益心泰低剂量组 | 1.4 | 37.40±3.97 ³⁾ |
| 益心泰中剂量组 | 2.8 | 33.20±3.19 ³⁾ |
| 益心泰高剂量组 | 5.6 | 19.00±2.74 ³⁾ |
| 曲美他嗪组 | 0.01 | 14.80±3.35 ³⁾ |

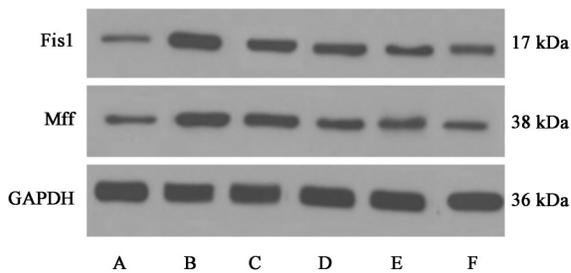


图5 CHF大鼠模型线粒体分裂蛋白Fis1、Mff蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of mitochondrial fission proteins Fis1 and Mff in CHF rat model

表6 益心泰对CHF大鼠模型线粒体分裂蛋白Fis1、Mff表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Yixintai on mitochondrial fission proteins Fis1 and Mff in CHF rat model ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | Fis1/GAPDH | Mff/GAPDH |
|---------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| 假手术组 | | 1.00±0.18 | 1.00±0.19 |
| 模型组 | | 2.94±0.02 ¹⁾ | 2.65±0.02 ¹⁾ |
| 益心泰低剂量组 | 1.4 | 2.48±0.37 | 2.40±0.10 |
| 益心泰中剂量组 | 2.8 | 2.26±0.37 ²⁾ | 1.97±0.42 ²⁾ |
| 益心泰高剂量组 | 5.6 | 1.91±0.44 ²⁾ | 1.96±0.48 ²⁾ |
| 曲美他嗪组 | 0.01 | 1.55±0.40 ²⁾ | 1.35±0.26 ²⁾ |

效,补益中焦脾胃之气,人参乃甘温大补元气之品,“功资脾肺,气纯味浓,补真元而益血生津,助卫充营”(《本草便读·卷一·草部》),两药须为用,可壮补一身之气,健脾益心肺,共为君药;丹参、红花相伍共入心经,导瘀滞、通血脉,又得参芪益气之功,则祛瘀有力而不留弊,共为臣药;葶苈子入上焦肺经,泻肺行水,茯苓入中焦脾经,健脾渗湿,猪苓、泽泻入下焦肾、膀胱经,利尿消肿,四药相伍,利全身之水湿,宣畅三焦,合参芪推动之力,可共奏“去宛陈莖”之功,共为佐药。综上,全方具有益气活血,利尿消肿之功,可用于治疗气虚血瘀水停之CHF。前期研究表明,该复方可通过调节钙调神经磷酸酶/活化T细胞核因子3(CaN/NFATC₃)信号通路改善心

肌重构,同时还能改善心肌凋亡以提升心功能,延缓CHF进程的作用^[22]。与此同时,在MI后CHF兔模型的研究过程中,益心泰能调节改善心肌超微结构^[12]。因而,为进一步探讨益心泰调节线粒体的作用机制提供潜在实验依据。

本实验采用结扎左冠状动脉前降支法制备MI后CHF大鼠模型,探讨益心泰对心肌线粒体的调节作用。研究表明,MI可引起血流动力学紊乱,导致心肌缺血缺氧,促使ROS生成增多、Ca²⁺超载,同时也会造成线粒体超微结构和形态发生改变,出现线粒体肿胀(空泡化)、嵴解体、基质密度丧失,病理产物增多,从而引发线粒体功能异常,能量代谢出现障碍,并最终导致心功能的衰竭^[23]。在这过程中,线粒体自身动力学(分裂-融合)机制的失衡是导致线粒体损伤并加重心功能损伤的重要病理机制^[24]。Fis1与Mff是参与线粒体分裂的主要蛋白,两者分布于线粒体外膜,是接受外来信号并启动线粒体分裂的主要受体^[25]。在外界因素作用下,Fis1、Mff蛋白被活化,引起线粒体构象发生改变,促使外膜和内膜的收缩,从而完成线粒体的分裂^[26]。研究发现,Fis1、Mff的过度表达是线粒体功能障碍及心血管疾病的重要特征^[27]。CHF的演变过程中,心肌出现损伤,正常线粒体数目减少,线粒体分裂-融合失衡,Fis1、Mff表达上调,致使线粒体分裂并出现碎片化,导致线粒体结构与功能出现失调,进而引起ATP生成减少,最终造成心功能损伤加剧^[28-29]。与此同时,由于分裂的损伤线粒体增多,使得内在凋亡途径激活,促使线粒体及心肌细胞的凋亡增加,使病情加重^[30-31]。因此,基于以上因素,通过降低线粒体分裂蛋白表达,维持线粒体功能结构稳定,成为调节能量代谢,改善心肌重构,提高心功能的潜在作用靶点^[32]。JIN等^[33]通过体外及体内实验发现,下调Mff的表达可抑制线粒体分裂,进而促进线粒体结构功能的稳定,改善心肌缺血再灌注损伤;YU等^[34]的研究发现参附注射液可通过抑制线粒体分裂调节线粒体动力学以减轻心肌损伤,该机制与Fis1表达下调有关;CHENG等^[35]在细胞实验过程中发现,天麻素可通过下调Drp1、Fis1的表达抑制线粒体分裂,促进线粒体融合,以维持线粒体平衡改善线粒体结构与功能,从而减轻心肌细胞的损伤。

本实验研究显示,与假手术组比较,模型组大鼠BNP、NT-pro BNP含量上升,ATP含量降低;LVEF、LVFS下降,LVIDd、LVIDs上升;心肌组织病

理形态学、电镜及 TUNEL 结果示,模型组大鼠心肌组织出现炎性浸润、心肌间质出现水肿、心肌纤维化明显,心肌组织线粒体出现损伤,心肌细胞凋亡指数升高;Western blot 结果示,模型组大鼠心肌线粒体分裂蛋白 Fis1、Mff 表达上升。与模型组比较,各剂量复方益心泰治疗组及曲美他嗪组大鼠血清 BNP、NT-pro BNP 含量降低,ATP 含量上升,LVEF、LVFS 升高,LVIDd、LVIDs 下降;心肌组织炎性浸润、心肌纤维化程度减轻,线粒体损伤得到改善、心肌细胞凋亡程度缓解;益心泰中、高剂量及曲美他嗪组大鼠心肌线粒体分裂蛋白 Fis1、Mff 蛋白表达均下调。以上研究结果提示益心泰可改善心功能和线粒体结构,促进 ATP 合成,同时下调心肌组织线粒体分裂蛋白 Fis1、Mff 的表达,减轻心肌细胞凋亡。本研究采用曲美他嗪作为阳性药进行实验研究,该药是一种脂质氧化的部分抑制剂,可通过调节脂质利用以发挥改善心功能,延缓心衰的作用^[19]。研究表明,曲美他嗪可通过抑制线粒体分裂以维持线粒体结构与功能的稳定^[36],且能减轻心肌细胞凋亡^[37-38]。本实验研究结果显示,曲美他嗪对心功能及线粒体结构、线粒体分裂蛋白等相关指标具有一定的改善作用,因而与过往研究结果具有一致性。

综上,益心泰可抑制 CHF 大鼠心肌组织线粒体 Fis1、Mff 蛋白表达,调节线粒体结构,抑制心肌细胞凋亡,促进 ATP 生成,改善心室重构,提高心功能,从而改善 CHF。这从调节线粒体分裂、能量代谢角度为改善 CHF 的药物开发提供了一定参考。但 CHF 发病机制复杂,本研究不能全面阐述其改善 CHF 的机制,故仍需进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] HEIDENREICH P A, BOZKURT B, AGUILAR D, et al. 2022 AHA/ACC/HFSA guideline for the management of heart failure: Executive summary: A report of the american college of cardiology/American heart association joint committee on clinical practice guidelines [J]. *Circulation*, 2022, 145 (18) : e876-e894.
- [2] 国家卫生计生委合理用药专家委员会,中国药师协会.心力衰竭合理用药指南(第2版)[J].*中国医学前沿杂志:电子版*,2019,11(7):1-78.
- [3] FRANTZ S, HUNDERTMARK M J, SCHULZ-MENGER J, et al. Left ventricular remodelling post-

myocardial infarction: Pathophysiology, imaging, and novel therapies[J]. *Eur Heart J*, 2022, 43 (27) : 2549-2561.

- [4] ZHOU B, TIAN R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure [J]. *J Clin Invest*, 2018,128(9):3716-3726.
- [5] HERNANDEZ-RESENDIZ S, PRUNIER F, GIRAO H, et al. Targeting mitochondrial fusion and fission proteins for cardioprotection [J]. *J Cell Mol Med*, 2020,24(12):6571-6585.
- [6] WU S, ZOU M H. AMPK, mitochondrial function, and cardiovascular disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (14):4987.
- [7] BUGGER H, PFEIL K. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(7) : 165768.
- [8] HAILESELASSIE B, MUKHERJEE R, JOSHI A U, et al. Drp1/Fis1 interaction mediates mitochondrial dysfunction in septic cardiomyopathy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 130: 160-169.
- [9] 邱志凌.心复康口服液干预心力衰竭大鼠心肌线粒体质量控制的机制研究[D].北京:中国中医科学院,2018.
- [10] TONG M, ZABLOCKI D, SADOSHIMA J. The role of Drp1 in mitophagy and cell death in the heart[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 142: 138-145.
- [11] 魏佳明,刘承鑫,李卉,等.益心泰有效组分对慢性心力衰竭兔左室肥厚和心肌细胞凋亡的干预作用及机制研究[J].*中药药理与临床*,2022,38(6):53-58.
- [12] 张彤瑜,孙涛,刘承鑫,等.益心泰有效组分对心肌梗死后心力衰竭兔心功能及心肌超微结构的影响[J].*中南药学*,2020,18(3):379-383.
- [13] 李姿锐,李雅,邹苏兰,等.益心泰总黄酮对H9c2心肌细胞代谢的影响[J].*中国临床药理学杂志*,2022,38(24):2964-2968.
- [14] 刘珂珂,吕梦,纪晓迪,等.稳心颗粒调控内质网应激途径抑制心梗大鼠心肌凋亡的机制[J].*中国实验方剂学杂志*,2021,27(3):56-62.
- [15] 贺石林,王键,王净净.中医科研设计与统计学[M].长沙:湖南科学技术出版社,2005:48-49.
- [16] BAMAN J R, AHMAD F S. Heart failure [J]. *JAMA*, 2020,324(10):1015.
- [17] LOPASCHUK G D, KARWI Q G, TIAN R, et al. Cardiac energy metabolism in heart failure [J]. *Circ Res*, 2021, 128(10):1487-1513.
- [18] 宋康,白振忠,格日力. AMPK 调控能量代谢及线粒体稳态[J]. *生理科学进展*, 2019, 50(6): 447-451.

- [19] 中国老年医学学会心电及心功能分会,中国医师协会心血管内科分会,中国心衰中心联盟专家委员会. 改善心肌代谢药物临床应用中国专家共识(2021)[J]. 中华老年医学杂志, 2021, 40(9): 1081-1092.
- [20] 于江, 唐家杨, 李帅, 等. 心力衰竭气虚证动物模型的建立与评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(15): 60-67.
- [21] 袁慧伦, 程凯, 陈前, 等. 基于ERK信号通路抑制星形胶质细胞活化探讨益气活血通络方对糖尿病大鼠神经病理性疼痛的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(23): 36-46.
- [22] 郭志华, 吴刚强, 李雅, 等. 益心泰颗粒对慢性心力衰竭兔Ca²⁺-CaN-NFAT3信号通路的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(3): 9-11, 15, 72.
- [23] JIN J Y, WEI X X, ZHI X L, et al. Drp1-dependent mitochondrial fission in cardiovascular disease [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(5): 655-664.
- [24] VASQUEZ-TRINCADO C, GARCIA-CARVAJAL I, PENNANEN C, et al. Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease [J]. *J Physiol*, 2016, 594(3): 509-525.
- [25] WOLF C, LOPEZ DEL AMO V, ARNDT S, et al. Redox modifications of proteins of the mitochondrial fusion and fission machinery [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 815.
- [26] SCHEFFER D, GARCIA A A, LEE L, et al. Mitochondrial fusion, fission, and mitophagy in cardiac diseases: Challenges and therapeutic opportunities [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2022, 36(13/15): 844-863.
- [27] WANG J, TOAN S, ZHOU H. New insights into the role of mitochondria in cardiac microvascular ischemia/reperfusion injury [J]. *Angiogenesis*, 2020, 23(3): 299-314.
- [28] CHANG X, LOCHNER A, WANG H H, et al. Coronary microvascular injury in myocardial infarction: Perception and knowledge for mitochondrial quality control [J]. *Theranostics*, 2021, 11(14): 6766-6785.
- [29] ZERIHUN M, SUKUMARAN S, QVIT N. The Drp1-mediated mitochondrial fission protein interactome as an emerging core player in mitochondrial dynamics and cardiovascular disease therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5785.
- [30] LI Y, LIU X. Novel insights into the role of mitochondrial fusion and fission in cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia/reperfusion [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(8): 5589-5597.
- [31] RAMACHANDRA C, HERNANDEZ-RESENDIZ S, CRESPO-AVILAN G E, et al. Mitochondria in acute myocardial infarction and cardioprotection [J]. *EBioMedicine*, 2020, 57: 102884.
- [32] COOPER H A, EGUCHI S. Inhibition of mitochondrial fission as a novel therapeutic strategy to reduce mortality upon myocardial infarction [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2018, 132(20): 2163-2167.
- [33] JIN Q, LI R, HU N, et al. DUSP1 alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury by suppressing the Mff-required mitochondrial fission and Bnip3-related mitophagy via the JNK pathways [J]. *Redox Biol*, 2018, 14: 576-587.
- [34] YU J, LI Y, LIU X, et al. Mitochondrial dynamics modulation as a critical contribution for Shenmai injection in attenuating hypoxia/reoxygenation injury [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 237: 9-19.
- [35] CHENG Q Q, WAN Y W, YANG W M, et al. Gastrodin protects H9c2 cardiomyocytes against oxidative injury by ameliorating imbalanced mitochondrial dynamics and mitochondrial dysfunction [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(10): 1314-1327.
- [36] KUZMICIC J, PARRA V, VERDEJO H E, et al. Trimetazidine prevents palmitate-induced mitochondrial fission and dysfunction in cultured cardiomyocytes [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 91(3): 323-336.
- [37] CHEN X, LIN S, DAI S, et al. Trimetazidine affects pyroptosis by targeting GSDMD in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Inflamm Res*, 2022, 71(2): 227-241.
- [38] WU S, CHANG G, GAO L, et al. Trimetazidine protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting excessive autophagy [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2018, 96(8): 791-806.

[责任编辑 孙丛丛]