

抗纤益心方干预线粒体通透性转换孔抑制心肌细胞 凋亡的机制

王振涛^{1*}, 任雪萍², 吴鸿¹, 高水波¹

(1. 河南省中医院, 郑州 450002; 2. 河南中医药大学, 郑州 450046)

[摘要] 目的:探讨抗纤益心方通过调控线粒体通透性转换孔(mPTP)对心肌细胞凋亡的影响及相关作用机制。方法:H9c2心肌细胞常规培养,饥饿8 h后分为正常组,模型组,抗纤益心方(0.25 g·L⁻¹)组,环孢素A(10 μmol·L⁻¹)组,药物作用24 h用于后续实验。利用去甲肾上腺素(NE)诱导H9c2心肌细胞肥大模型,通过实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测NE的最佳造模浓度,流式细胞仪检测mPTP的开放程度,同时检测mPTP开放后引起的凋亡相关因子Cyp-D, Cyt-C, Caspase-3 mRNA和蛋白的表达水平,和线粒体膜电位的水平。结果:NE浓度在200 μmol·L⁻¹时心房钠尿肽(ANP),脑钠肽(BNP) mRNA的表达水平最高,此浓度作为诱导H9c2心肌细胞肥大模型的最佳浓度,与正常组比较,模型组mPTP过度开放,线粒体内相对荧光强度减弱和线粒体膜电位降低($P<0.05$, $P<0.01$);凋亡相关因子Cyp-D, Cyt-C, Caspase-3 mRNA和蛋白表达升高($P<0.05$)。与模型组比较,抗纤益心方组和环孢素A组mPTP开放受到抑制,线粒体相对荧光强度和线粒体膜电位升高($P<0.05$, $P<0.01$);Cyp-D, Cy-tC, Caspase-3 mRNA和蛋白表达降低($P<0.05$)。结论:抗纤益心方能够抑制心肌细胞凋亡,其作用机制可能是通过调控mPTP的开放,抑制相关凋亡因子Cyp-D, Cyt-C, Caspase-3的表达有关。

[关键词] 扩张型心脏病; 抗纤益心方; 细胞凋亡; 线粒体通透性转换孔(mPTP)

[中图分类号] R2-0; R285.5; R542.2; R22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)18-0042-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211897

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210728.1104.001.html>

[网络出版日期] 2021-07-28 11:46

Kangxian Yixin Prescription Interferes with Mitochondrial Permeability Transition Pore to Inhibit Cardiomyocyte Apoptosis

WANG Zhen-tao^{1*}, REN Xue-ping², WU Hong¹, GAO Shui-bo¹

(1. Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China;
2. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of Kangxian Yixin prescription in regulating mitochondrial permeability transition pore (mPTP) and inhibiting cardiomyocyte apoptosis. **Method:** H9c2 cardiomyocytes were cultured routinely. After 8 h of starvation, the cells were divided into the normal group, model group, Kangxian Yixin prescription(0.25 g·L⁻¹) group, and cyclosporin A (CsA, 10 μmol·L⁻¹) group and treated with the corresponding drugs for 24 h for follow-up experiments. The H9c2 cardiomyocyte hypertrophy model was induced by norepinephrine (NE), whose optimal concentration was determined by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). The degree of mPTP opening was detected by flow cytometry, followed by the measurement of mRNA and protein expression levels of apoptosis-related factors cyclophilin D (Cyp-D), cytochrome C (Cyt-C), and cysteine aspartate-specific protease-3 (Caspase-3) after mPTP opening and the quantification of mitochondrial membrane potential. **Result:** When the concentration of NE was

[收稿日期] 20210215(001)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81573920);河南省中医药科学研究专项课题(20-21ZY2009)

[通信作者] *王振涛,博士,教授,博士生导师,从事中医药防治心血管疾病的研究, E-mail:13803817796@139.com

200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, the mRNA expression levels of atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) were the highest, implying that it was the optimal concentration to induce H9c2 cell hypertrophy. Compared with the normal group, the model group exhibited excessive opening of mPTP, weakened relative fluorescence intensity in mitochondria, decreased mitochondrial membrane potential ($P<0.05$, $P<0.01$), and elevated mRNA and protein expression of Cyp-D, Cyt-C, and Caspase-3 ($P<0.05$). Compared with the model group, both Kangxian Yixin prescription and CsA inhibited mPTP opening, enhanced the relative fluorescence intensity of mitochondria, increased mitochondrial membrane potential ($P<0.05$, $P<0.01$), and lowered the mRNA and protein expression of Cyp-D, Cyt-C, and Caspase-3 ($P<0.05$). **Conclusion:** Kangxian Yixin prescription inhibits cardiomyocyte apoptosis possibly by regulating mPTP opening and inhibiting the expression of apoptosis-related factors Cyp-D, Cyt-C, and Caspase-3.

[Keywords] dilated cardiomyopathy; Kangxian Yixin prescription; apoptosis; mitochondrial permeability transition pore(mPTP)

扩张型心肌病(DCM)主要以心腔扩大和心肌收缩功能障碍为特征,病情呈进行性加重,最终导致心力衰竭,目前缺乏有效的治疗手段,预后较差^[1-2]。DCM的主要病理表现是心室重构,其发生机制暂不明确,可能与内质网应激、线粒体功能障碍、钙信号转导异常引起的细胞凋亡及胶原蛋白代谢异常引起的心肌纤维化有关^[3]。

线粒体是维持生命活动的重要细胞器,在细胞代谢活动方面参与了 Ca^{2+} 稳态、细胞凋亡和坏死等过程。细胞凋亡有多条途径,其中由线粒体介导的内源性途径起中心调控作用^[4-5]。越来越多的证据证明线粒体通透性转换孔(mPTP)是细胞的凋亡的关键节点,是维持线粒体稳态的关键细胞器。过度的细胞凋亡会导致心肌细胞损伤和心功能下降,导致心室重构引发心血管疾病。线粒体功能障碍导致mPTP病理性开放是触发心肌细胞死亡和心室重构的关键因素。mPTP受外界因子刺激之后,可被激活而开放,引起线粒体内膜肿胀、破裂,导致线粒体外膜上细胞色素C(Cyt-C)释放,进入胞质中,活化半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-9(Caspase-9),进一步激活Caspase-3,最终导致细胞凋亡^[6-7]。有研究证实亲环蛋白D(Cyp-D)是唯一一种调节mPTP的可溶性肽基-脯氨酰顺反异构酶,且是环孢素A(CsA)的作用位点^[8-9]。LI等^[10]通过H9c2细胞和大鼠实验研究发现是mPTP一种心脏调控分子,抑制其开放可以减少心肌梗死面积和细胞死亡率。MOON等^[11]研究证明了充血性心力衰竭时,激活了钙非依赖性磷脂酶 $\text{A}_{2\gamma}$ (ipLA $_{2\gamma}$)生成羟基二十碳四烯酸(HETE)促进mPTP的病理性开放,使心肌细胞坏死或凋亡,进一步导致心力衰竭的发生发展。尽管对mPTP开放后病理结果已有了解,但该领域目前

仍缺乏对mPTP有效的治疗药物以改善心脏功能。

课题组前期研究采用抗纤益心方在临床中治疗DCM已取得良好疗效,能够明显改善患者症状,减少证候积分,抑制心室重构,改善心功能^[12-13]。前期基础研究证实抗纤益心方能够抑制心肌细胞凋亡,但其作用机制有待研究^[14-15]。本实验利用去甲肾上腺素(NE)诱导H9c2心肌细胞肥大模型,从抗纤益心方干预mPTP角度,探讨DCM中心肌细胞凋亡的作用机制,为临床治疗DCM提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 药物 抗纤益心方组成为红参12 g,黄芪30 g,茯苓15 g,白术15 g,丹参15 g,升麻9 g,麦冬12 g,泽兰15 g,益母草15 g,中药免煎颗粒由四川新绿药业科技发展有限公司生产,批号1706039,药物质量保证采用GMP(Good Manufacturing Practice)认证(证书编号SC20150037)。称取抗纤益心方颗粒混合物8.9 g,充分溶解于DMEM高糖培养基中,随后用0.2 μm 过滤器过滤及灭菌,分装,保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。根据多个取样药液烘干之后的称量结果计算得到原始药液质量浓度为 $250\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,使用时稀释至所需质量浓度 $0.25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。CsA(美国Med Chem Express公司,批号34526),原液浓度为 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,在使用药物诱导时稀释至所需浓度 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。NE(上海源叶生物科技有限公司,批号B24713,100 mg/瓶),精确称取NE粉末8.45 mg溶于25 mL无血清DMEM高糖培养基,配成 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液备用(本实验选用抗纤益心方药物浓度和方法参考本课题组前期研究^[16])。

1.2 细胞株 H9c2心肌细胞株,中国科学院细胞库,编号ZQO104。

1.3 试剂 胎牛血清(FBS),DMEM高糖培养基

(以色列 BI 公司,批号分别为 2037145,2048219); mPTP 检测试剂盒(上海贝博生物技术有限公司,批号 BB-43052);JC-1 试剂盒(美国 Cayman 公司,批号 10009172);增强化学发光法(ECL)超敏发光液,BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝生物技术有限公司,批号分别为 20201123,090119191205);Cyp-D, Cyt-C, Caspase-3, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(武汉三鹰技术有限公司,批号分别为 00019135,00091621,00085677,10008047);辣根过氧化物酶(HRP)羊抗鼠二抗,HRP 羊抗兔二抗(武汉塞维尔生物科技有限公司,批号分别为 ATTSE0101,Z0610);Buffer Rlysis-AG, mRNA 提取试剂盒,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)反转录试剂盒(日本 Takara 公司,批号分别为 FB26KB3904,FB27KA3898,AK51598A)。

1.4 仪器 FACSJazz 型流式细胞仪(美国 BD 公司);3110 型 CO₂ 培养箱,FC 型酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司);OD 2000+型微量核酸蛋白测定仪(中国 One Drop 公司);CLS-4SS 型激光共聚焦显微镜(美国 Thorlabs 公司);7500 FAST 型 PCR 仪[赛默飞世尔(上海)仪器有限公司];185-2148 型基因扩增仪,Power Pac™ HV Power Suply 型转膜仪,170-4070 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.5 方法

1.5.1 Real-time PCR 检测 NE 诱导 H9c2 心肌细胞模型的最佳浓度 取对数生长期 H9c2 心肌细胞,以 1×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中,置于 37 °C,5%CO₂ 孵箱培养 24 h,待细胞融合密度 >80% 时,饥饿 8 h 换回 10%FBS 高糖培养基后给药处理,除正常组外,其余 5 组分别加入 100, 150, 200, 250, 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 NE,药物作用 24 h 后,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 遍。每孔加入 Buffer Rlysis-AG 500 μL ,按照试剂盒说明书提取总 RNA。波长 260 nm/280 nm 检测吸光度 A , A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.1。检测心房钠尿肽(ANP),脑钠肽(BNP) mRNA 的表达水平。

1.5.2 H9c2 心肌细胞培养和分组 将对数生长期的细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板,置于 37 °C,5%CO₂ 培养箱中孵育 24 h,饥饿 8 h 后分为正常组,模型组,抗纤益心方组,CsA 组,每组重复 3 个复孔,药物处理 24 h 用于后续实验。

1.5.3 JC-1 检测 H9c2 心肌细胞线粒体膜电位 取对数生长期的 H9c2 心肌细胞,以 2×10^4 个/孔的密度接种于 24 孔板,按照 1.5.2 项下方法将细胞培养完

毕,PBS 清洗 2 遍,每孔加入无血清 DMEM 460 μL 和 JC-1 Reagent 溶液 40 μL ,置于 37 °C,5%CO₂ 培养箱中孵育 15 min,置于激光共聚焦显微镜下观察,分析统计各组心肌细胞红/绿的值。

1.5.4 流式细胞仪检测 mPTP 开放度 按照 1.5.2 项下方法将细胞培养完毕,PBS 清洗 2 遍,胰酶消化收集于 2 mL EP 管中,4 °C,2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min(离心半径 6 cm),弃上清,每个样品加入 Hank's 平衡盐溶液(HBSS)500 μL 重悬细胞。向上述每个样品的细胞中分别加入 M61 染色工作液 5 μL 并充分混匀,37 °C 避光孵育 15 min。接着向样品管中加入淬灭剂 3 μL 混匀,37 °C 避光孵育 15 min。染色结束用流式细胞仪检测 mPTP 开放度。

1.5.5 Real-time PCR 检测细胞凋亡相关基因 Cyp-D, Cyt-C, Caspase-3 mRNA 表达 按照 1.5.2 项下方法将细胞培养完毕,PBS 清洗 2 遍,每孔加入 Buffer Rlysis-AG 500 μL ,柱式法提取总 RNA,以 GAPDH 作为内参基因,用 Takara 反转录试剂盒,配制反转录体系总体积 20 μL 进行反转录反应,37 °C 15 min,85 °C 5 s,4 °C 冷却取出,进行扩增,根据目的基因将反转录 cDNA 进行稀释。采用 TB Green TM Premix Ex Taq™ II 试剂盒配制 Real-time PCR 反应液 20 μL ,加入反应管中进行反应,95 °C 预变性 90 s,95 °C 变性 10 s,60 °C 退火/延伸 30 s,65 °C 缓慢加热至 95 °C 60 s,循环数为 40。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 定量法得出各组 mRNA 表达水平。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列	长度 /bp
Cyp-D	上游 5'-TCTTTGACGTGGACATCGGC-3'	277
	下游 5'-CAGCAAACCCTCCCGATCAT-3'	
Cyt-C	上游 5'-TGGCCATGTCTGAAGATCGAG-3'	278
	下游 5'-ATGGCAGGGGCAATAGTAGC-3'	
Caspase-3	上游 5'-GAGCTTGGAACGGTACGCTA-3'	234
	下游 5'-CCGTACCAGAGCGAGATGAC-3'	
GAPDH	上游 5'-CTTCTCTGTGACAAAAGTGGACAT-3'	182
	下游 5'-TTGAAGTCCGCTGGGTAGAG-3'	

1.5.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Cyp-D, Cyt-C, Caspase-3 蛋白表达 按照 1.5.2 项下方法将细胞培养完毕,PBS 清洗 2 遍,加入裂解液(PSMF-RIPA 1:100),提取蛋白,4 °C,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心

5 min(离心半径6 cm),抽取上清液,采用BCA试剂盒测定蛋白含量,加入4×Loading buffer于金属浴中煮蛋白10 min,上样蛋白10 μg,配制十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳胶,加入样品后电泳,然后转膜至PVDF膜,转膜结束后在5%脱脂奶粉中封闭1.5 h,加入一抗Cyp-D, Cyt-C, Caspase-3(1:1 000)4 °C过夜,次日洗膜5次,每次5 min,加入HRP羊抗鼠二抗(1:4 000),HRP羊抗兔二抗(1:2 000),室温孵育1.5 h,洗膜5次,每次5 min,在Image lab软件上显影,测量各组织样品的蛋白灰度值。

1.5.7 统计学方法 数据分析利用SPSS 19.0统计软件进行,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用单因素方差分析(One-way ANOVA),以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NE诱导H9c2心肌细胞最佳浓度 给予不同浓度的NE诱导H9c2心肌细胞肥大模型,Real-time PCR检测ANP, BNP mRNA的表达水平,结果显示在200 μmol·L⁻¹时,ANP, BNP mRNA表达最高,选

此浓度用于后续实验。见表2。

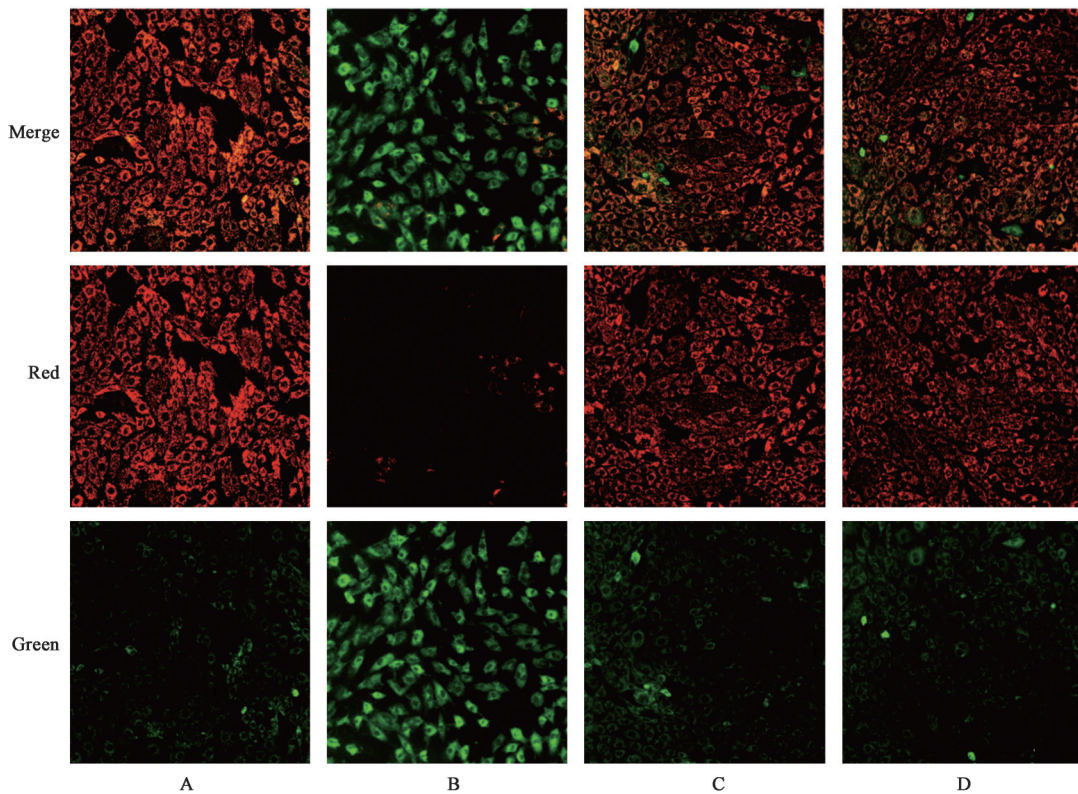
表2 不同浓度NE诱导H9c2心肌细胞中BNP, ANP mRNA的表达($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Different concentrations of NE induced the expression of BNP and ANP mRNA in H9c2 cardiomyocytes ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/μmol·L ⁻¹	ANP	BNP
正常		1.00±0.00	1.00±0.00
NE	100	1.13±0.23	3.03±0.72
	150	1.83±0.82	3.76±0.34
	200	2.37±0.15 ¹⁾	5.06±0.31 ¹⁾
	250	1.06±0.35	1.11±0.28
	300	0.98±0.07	1.02±0.23

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$ 。

2.2 抗纤益心方对NE诱导的心肌肥大细胞中线粒体膜电位的影响 正常组中,线粒体膜电位相对稳定,红色荧光较多。与正常组比较,模型组绿色荧光明显增加,线粒体膜电位明显降低($P<0.05$);与模型组比较,抗纤益心方组和CsA组,红色荧光明显增加,线粒体膜电位明显升高($P<0.05$),见图1,表3。



A. 正常组;B. 模型组;C. 抗纤益心方组;D. CsA组(图2同)

图1 抗纤益心方对各组心肌细胞线粒体膜电位表达的影响(激光共聚焦显微镜,×200)

Fig. 1 Effect of Kangxian Yixin prescription on expression of mitochondrial membrane potential of cardiomyocytes in each group (CLSM, ×200)

表3 抗纤益心方对各组心肌细胞线粒体膜电位变化的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of Kangxian Yixin prescription on changes of mitochondrial membrane potential of cardiomyocytes in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	线粒体膜电位变化/红/绿
正常		1.00±0.00
模型	200	0.22±0.00 ²⁾
抗纤益心方	200+0.25 ¹⁾	0.75±0.11 ³⁾
CsA	200+10	1.12±0.10 ³⁾

注: ¹⁾抗纤益心方使用剂量为0.25 g·L⁻¹;与正常组比较²⁾ $P<0.05$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$ (表5,6同)。

2.3 抗纤益心方对NE诱导的心肌肥大细胞中mPTP开放度的影响 与正常组比较,模型组mPTP开放度显著增加,线粒体相对荧光强度显著减弱($P<0.01$)。与模型组比较,抗纤益心方组和CsA组mPTP开放受到抑制,线粒体相对荧光强度明显增加($P<0.05$, $P<0.01$),见表4。

表4 抗纤益心方对各组心肌细胞线粒体相对荧光强度的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 4 Effect of Kangxian Yixin prescription on relative fluorescence intensity of cardiomyocyte mitochondria in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	线粒体相对荧光强度/%
正常		20.58±1.41
模型	200	3.55±0.09 ²⁾
抗纤益心方	200+0.25 ¹⁾	21.67±1.83 ³⁾
CsA	200+10	27.29±0.26 ⁴⁾

注: ¹⁾抗纤益心方使用剂量为0.25 g·L⁻¹;与正常组比较²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ 。

2.4 抗纤益心方对NE诱导的心肌肥大细胞中Cyp-D, Cyt-C, Caspase-3 mRNA表达的影响 与正常比较,模型组Cyp-D, Cyt-C, Caspase-3 mRNA表达明显升高($P<0.05$);与模型组比较,抗纤益心方组和CsA组Cyp-D, Cyt-C, Caspase-3 mRNA表达明显降低($P<0.05$),见表5。

2.5 抗纤益心方对NE诱导的心肌肥大细胞中Cyp-D, Cyt-C, Caspase-3蛋白表达的影响 与正常比较,模型组Cyp-D, Cyt-C, Caspase-3蛋白表达明显升高($P<0.05$);与模型组比较,抗纤益心方组和CsA组Cyp-D, Cyt-C, Caspase-3蛋白表达明显降低($P<0.05$),见表6,图2。

3 讨论

mPTP是位于线粒体内外膜及基质中的多种蛋

表5 抗纤益心方对各组心肌细胞Cyp-D, Cyt-C, Caspase-3 mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 5 Effect of Kangxian Yixin prescription on expression of Cyp-D, Cyt-C and Caspase-3 mRNA in cardiomyocytes of each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Cyp-D	Cyt-C	Caspase-3
模型	200	1.50±0.03 ²⁾	2.57±0.38 ²⁾	2.92±0.399 ²⁾
抗纤益心方	200+0.25 ¹⁾	1.03±0.04 ³⁾	0.88±0.17 ³⁾	1.44±0.13 ³⁾
CsA	200+10	0.97±0.07 ³⁾	0.93±0.18 ³⁾	1.30±0.18 ³⁾

注: 正常组各指标mRNA相对表达量为1。

表6 抗纤益心方对各组心肌细胞Cyp-D, Cyt-C, Caspase-3蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 6 Effect of Kangxian Yixin prescription on Cyp-D, Cyt-C, and Caspase-3 protein expression of cardiomyocytes in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Cyp-D /GAPDH	Cyt-C /GAPDH	Caspase-3 /GAPDH
模型	200	2.26±0.21 ²⁾	2.24±0.25 ²⁾	2.71±0.37 ²⁾
抗纤益心方	200+0.25 ¹⁾	0.77±0.23 ³⁾	0.89±0.09 ³⁾	0.73±0.22 ³⁾
CsA	200+10	0.99±0.02 ³⁾	0.85±0.24 ³⁾	0.82±0.05 ³⁾

注: 正常组各指标蛋白相对表达量为1。

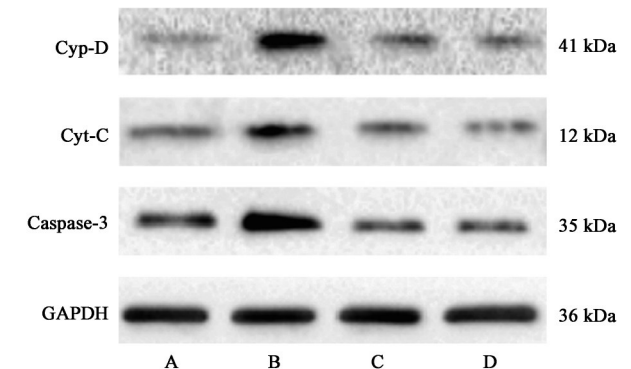


图2 各组心肌细胞Cyp-D, Cyt-C, Caspase-3蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Cyp-D, Cyt-C, and Caspase-3 protein in cardiomyocytes of each group

白质组成的复合体,这些蛋白通过构象改变调节通道开关的作用^[17]。mPTP的结构尚不明确,其分子组成也存在争议,最初mPTP被认为是线粒体内膜和外膜的相邻位点形成的,目前有研究认为mPTP是由位于线粒体外膜上的电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel),线粒体内膜的腺嘌呤核苷酸转位酶(adenine nucleotide translocase)和位于基质的Cyp-D组成^[18]。多项研究证实Cyp-D被称为mPTP调控剂,且大多数Cyp-D能够直接结合免疫抑制药物CsA^[19]。mPTP有两种开放状态,生理性开放(短期开放)和病理性开放(长期开放),导致mPTP长期开放的因素较多,其中活性氧

(ROS)增多和钙离子超载是其开放的主要因素^[20],病理性开放会导致膜电位降低、呼吸链解偶联、线粒体损伤ATP合成停止,最终导致线粒体肿胀、破裂,Cyt-C 释放到细胞质内,激活 Caspase,释放凋亡因子,诱发和加重细胞凋亡,损伤心肌^[21-23]。

抗纤益心方是在前人的基础上和多年的临床经验总结出来的经验方,方中黄芪补气升阳,红参补元气、益肺补脾。升麻引脾胃之气上升,与黄芪同用益气升陷之力更佳。茯苓、白术健脾利湿。泽兰、益母草活血化瘀利水。麦冬清心除烦、养阴润肺。丹参养血补心、活血祛瘀。DCM为本虚标实之证,以气虚血瘀为主要病机,多因先天禀赋不足,后天劳累失养或感受外邪,导致气虚;气虚无力推动血液运行而至血瘀,治疗上以益气活血贯穿本病始终。前期实验研究证实抗纤益心方能够降低B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax),Caspase-3表达,同时可以促进Bcl-2的表达水平,缓解内质网应激引发的细胞凋亡,改善DCM大鼠心功能^[16,24]。

本研究结果表明,与正常组比较,模型组mPTP开放,线粒体内荧光强度和线粒体膜电位降低,抗纤益心方和CsA干预后,mPTP开放受到抑制,线粒体内荧光强度和线粒体膜电位增加,心肌细胞凋亡相关因子均减少。进一步从蛋白和基因层面研究结果显示,与正常组比较,模型组心肌细胞内的线粒体内的荧光较弱,且Cyp-D, Cyt-C, Caspase-3蛋白和mRNA表达明显上升,表明mPTP开放促进凋亡因子蛋白和基因的表达。给予抗纤益心方和CsA干预后,Cyp-D, Cyt-C, Caspase-3蛋白和mRNA表达均明显降低。结果表明抗纤益心方能够抑制H9c2心肌细胞凋亡,其作用机制可能与抑制mPTP开放,从而下调凋亡相关因子Cyp-D, Cyt-C, Caspase-3蛋白和mRNA表达有关。在后续实验中需进一步分析抗纤益心方各药物有效成分与治疗靶点的对应关系,以深入探讨其作用机制。

本实验所用颗粒剂(提取物)是直接进行体外细胞实验,不能完全排除非胃肠吸收成分及其杂质的作用对此的影响,动物实验前期已有部分验证,见文献^[25-27]。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 廖玉华. 中国扩张型心肌病诊断和治疗指南:创新与转化[J]. 临床心血管病杂志, 2018, 34(5): 435-436.
[2] KNOWLTON K U. Dilated cardiomyopathy [J].

Circulation, 2019, 139(20): 2339-2341.

- [3] ALIMADADI A, MUNROE P B, JOE B, et al. Meta-analysis of dilated cardiomyopathy using cardiac RNA-seq transcriptomic datasets [J]. Genes (Basel), 2020, 11(1): 60.
[4] BOCK F J, TAIT S. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(2): 85-100.
[5] ABDELWAHID E, STULPINAS A, KALVELYTE A. Effective agents targeting the mitochondria and apoptosis to protect the heart [J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(8): 1153-1166.
[6] GOLDENTHAL M J. Mitochondrial involvement in myocyte death and heart failure [J]. Heart Fail Rev, 2016, 21(2): 137-155.
[7] CUI Y, PAN M, MA J, et al. Recent progress in the use of mitochondrial membrane permeability transition pore in mitochondrial dysfunction-related disease therapies [J]. Mol Cell Biochem, 2021, 476(1): 493-506.
[8] RAMACHANDRAN A, LEBOFISKY M, BAINES C P, et al. Cyclophilin D deficiency protects against acetaminophen-induced oxidant stress and liver injury [J]. Free Radic Res, 2011, 45(2): 156-164.
[9] AMANAKIS G, MURPHY E. Cyclophilin D: an integrator of mitochondrial function [J]. Front Physiol, 2020, 11: 595.
[10] LI X, JIA P, HUANG Z, et al. Lycopene protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening [J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13: 2331-2342
[11] MOON S H, LIU X, CEDARS A M, et al. Heart failure-induced activation of phospholipase iPLA_{2γ} generates hydroxyeicosatetraenoic acids opening the mitochondrial permeability transition pore [J]. J Biol Chem, 2018, 293(1): 115-129.
[12] 柴松波,王振涛,刘舜禹. 抗纤益心方治疗扩张型心肌病气虚血瘀证队列研究[J]. 陕西中医, 2019, 40(1): 49-51.
[13] 曾垂义,王振涛,陈磊. 抗纤益心方治疗扩张型心肌病患者疗效观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(23): 321-323.
[14] 王振涛,常红波,郭宗耀,等. 基于扩张型心肌病大鼠模型研究内质网应激介导细胞凋亡和相关信号转导通路的时相性变化[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(4): 1705-1708.
[15] 王振涛,董丽莎,边汝涛,等. 抗纤益心方通过调控

- SERCA2a蛋白抑制扩张型心肌病大鼠心肌细胞凋亡的机制研究[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(1): 173-177.
- [16] 王振涛, 闫京京, 吴鸿, 等. 抗纤益心方对去甲肾上腺素诱导H9c2心肌细胞凋亡及凋亡相关因子表达的影响[J]. 中医杂志, 2019, 60(21): 1866-1869
- [17] PETROSILLO G, COLANTUONO G, MORO N, et al. Melatonin protects against heart ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 297(4): H1487-H1493.
- [18] BAINES C P, KAISER R A, PURCELL N H, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. [J]. Nature, 2005, 434(7033): 658-662.
- [19] MISHRA J, DAVANI A J, NATARAJAN G K, et al. Cyclosporin a increases mitochondrial buffering of calcium: an additional mechanism in delaying mitochondrial permeability transition pore opening [J]. Cells, 2019, 8(9): 1052.
- [20] PARKS R J, MURPHY E, LIU J C. Mitochondrial permeability transition pore and calcium handling[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1782: 187-196.
- [21] LU X, KWONG J Q, MOLKENTIN J D, et al. Individual cardiac mitochondria undergo rare transient permeability transition pore openings [J]. Circ Res, 2016, 118(5): 834-841.
- [22] BERNARDI P, DI LISA F. The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection[J]. J Mol Cell Cardiol, 2015, 78: 100-106.
- [23] KWONG J Q, MOLKENTIN J D. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart[J]. Cell metabolism, 2015, 21(2): 206-214.
- [24] 柴松波, 王振涛, 张淑娟, 等. 抗纤益心方对扩张型心肌病大鼠内质网应激CHOP通路的影响[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(2): 128-134.
- [25] 王振涛, 边汝涛, 杨凤鸣, 等. 抗纤益心方对扩张型心肌病大鼠心肌纤维化相关蛋白表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(3): 407-410, 497.
- [26] 常红波, 王振涛, 刘舜禹, 等. 抗纤益心方通过AMPK/mTOR通路改善扩张型心肌病大鼠心功能的作用机制[J]. 北京中医药大学学报, 2021, 44(1): 54-59.
- [27] 刘舜禹, 李巧稚, 芮浩淼, 等. 抗纤益心方对扩张型心肌病模型大鼠心肌纤维化相关因子及心肌组织 β -catenin/PPAR γ 信号通路的影响[J]. 中医杂志, 2021, 62(3): 259-265.

[责任编辑 王鑫]