

温心方对心肌缺血再灌注损伤大鼠线粒体能量代谢的作用机制

刘莹¹, 王兆博², 申力¹, 曹洪欣^{3*}

(1. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700;

2. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700; 3. 中华中医药学会, 北京 100029)

[摘要] 目的:揭示温心方对心肌缺血再灌注损伤大鼠线粒体能量代谢的改善作用及其对沉默信息调节因子1(SIRT1)/过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α)/雌激素受体相关受体 α (ERR α)能量信号通路的作用。方法:SPF级Wistar雄性大鼠90只,随机分为假手术组、模型组、温心方低、中、高剂量组;温心方低、中、高剂量组分别给予0.99、1.98、3.96 g·kg⁻¹的颗粒剂灌胃,假手术组和模型组均予以等体积生理盐水灌胃;预给药21 d后,模型组及温心方组采用冠状动脉左前降支结扎30 min,再灌注2 h复制大鼠心肌缺血再灌注损伤(MIRI)模型,假手术组只穿线,不结扎;TTC染色观察心肌梗死面积,苏木素-伊红(HE)染色观察心肌组织病理形态,试剂盒检测血清肌酸激酶同工酶(CK-MB)和乳酸脱氢酶(LDH)活性、心肌组织ATP含量及线粒体复合体IV(CCO)、琥珀酸脱氢酶(SDH)活性,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)、蛋白免疫印迹法(Western blot)检测心肌组织SIRT1、PGC-1 α 、ERR α 、TFAM mRNA及蛋白表达。结果:与假手术组比较,模型组心肌纤维断裂,排列紊乱,细胞胞质水肿,细胞核出现固缩、偏移;CK-MB、LDH活性明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),ATP含量及CCO、SDH活性明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),心肌组织SIRT1、PGC-1 α 、ERR α 、TFAM mRNA及蛋白表达均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,温心方预处理各组心肌梗死面积显著缩小,且以高剂量组最显著($P<0.01$),心肌组织病理形态有所改善,CK-MB、LDH活性明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),ATP含量及CCO、SDH活性均有提高,以高剂量组最显著($P<0.01$),心肌组织SIRT1、PGC-1 α 、ERR α 、TFAM mRNA及蛋白表达均有不同程度提高($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:温心方可通过调控SIRT1/PGC-1 α /ERR α 信号通路,改善心肌线粒体能量代谢,保护心肌缺血再灌注损伤。

[关键词] 温心方; 心肌缺血再灌注损伤; 线粒体能量代谢; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)17-0052-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221103

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220330.0907.001.html>

[网络出版日期] 2022-03-31 16:58

Protective Effect of Wenxin Prescription on Mitochondrial Energy Metabolism in Rats with Myocardial Ischemia-reperfusion Injury

LIU Ying¹, WANG Zhaobo², SHEN Li¹, CAO Hongxin^{3*}

(1. Institute of Basic Theory for Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 3. China Association of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To reveal the effect of Wenxin prescription on mitochondrial energy metabolism and silent information regulator 1 (SIRT1)/peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α)/recombinant estrogen-related receptor α (ERR α) signaling pathway in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury. **Method:** Totally 90 male Wistar rats of SPF grade were randomly assigned into a sham

[收稿日期] 2022-01-03

[基金项目] 中医基础理论研究所科研发展基金项目(KJX-202201);唐仲英中药基金项目

[第一作者] 刘莹,博士,从事脏象学说与脏腑证候,E-mail:LY122608@163.com

[通信作者] *曹洪欣,博士,教授,从事中医药治疗心血管疾病研究工作,Email:caohx898@163.com

operation group, a model group, and low-, medium-, and high-dose Wenxin prescription groups, with 18 rats in each group. The rats in low-, medium-, and high-dose Wenxin prescription groups were administrated with 0.99, 1.98, and 3.96 g·kg⁻¹ granules by gavage, respectively, and those in the sham operation group and model group with the same amount of normal saline. Twenty-one days after pre-administration, the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury was established by ligation of the left anterior descending coronary artery for 30 min and reperfusion for 2 h, and the rats in the sham operation group were only threaded without ligation. Myocardial infarction area was observed through 2, 3, 5-triphenyl-2h-tetrazolium chloride (TTC) staining, and the myocardial histopathology through hematoxylin-eosin (HE) staining. The levels of creatine kinase-MB (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH) in serum, cytochrome C oxidase (CCO) and succinate dehydrogenase (SDH) in mitochondrion, and ATP in myocardial tissue were detected according to kit instructions. The mRNA and protein levels of SIRT1, PGC-1 α , ERR α , and mitochondrial transcription factor A (TFAM) in myocardial tissue were determined by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot, respectively. **Result:** Compared with the sham operation group, the model group showed broken and disordered myocardial fibers, cytoplasmic edema, and pyknosis and deviation of nuclei. Moreover, the modeling increased the levels of CK-MB and LDH ($P<0.05$, $P<0.01$), lowered the levels of ATP, CCO, and SDH ($P<0.05$, $P<0.01$), and down-regulated the mRNA and protein levels of SIRT1, PGC-1 α , ERR α , and TFAM in myocardial tissue ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, Wenxin prescription reduced the myocardial infarction area (especially in the high-dose group, $P<0.01$), restored the pathological changes, lowered the levels of CK-MB and LDH ($P<0.05$, $P<0.01$), increased the levels of ATP, CCO, and SDH (especially in the high-dose group, $P<0.01$), and up-regulated the mRNA and protein levels of SIRT1, PGC-1 α , ERR α , and TFAM in myocardial tissue ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Wenxin prescription can protect rats from myocardial ischemia-reperfusion injury by regulating myocardial mitochondrial energy metabolism via the SIRT1/PGC-1 α /ERR α signaling pathway.

[Keywords] Wenxin prescription; myocardial ischemia-reperfusion injury; mitochondrial energy metabolism; peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α)

冠心病是常见的心血管疾病之一,根据《中国心血管健康与疾病报告2020》,我国心血管病患者人数约3.3亿人,其中冠心病1139万,其发病率和死亡率逐年上升,且趋于年轻化^[1]。心肌缺血是冠心病的主要病理改变,当心脏血液灌注量减少,心脏供氧不足,导致心肌能量代谢异常,不能支持心脏正常工作,严重者可诱发心肌梗死、猝死等^[2],以溶栓、经皮冠状动脉介入等及时再灌注治疗能够在短时间内恢复血供、尽可能挽救缺血心肌,但在恢复血流的同时又会带来严重的再灌注损伤,即为心肌缺血再灌注损伤(MIRI),可对心肌结构和功能带来不可逆伤害,导致病情恶化^[3]。MIRI的病理生理机制较为复杂,涉及多个方面,相关研究报道,线粒体功能受损和能量代谢障碍与MIRI关系密切^[4-5]。

温心方是曹洪欣教授通过多年临床实践和研究在对冠心病“阳虚痰瘀”基本病机认识的基础上创制的中药复方,课题组前期临床研究表明,温心方可缓解心绞痛、胸闷等症状,减少发作频率、缩短

发作时间,提高硝酸甘油减停率,促使心电图ST段回升,明显改善心肌缺血缺氧^[6-8];基础实验显示,温心方能够降低心肌酶活性,减少再灌注心律失常发生率,减轻再灌注损伤后心肌细胞凋亡程度及炎症损伤^[9-10]。同时可以提高和恢复缺血心肌Na⁺-K⁺-ATP酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶活性、加强和恢复氧化磷酸化过程,改善心肌能量代谢^[11]。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α)是线粒体的主调节因子,参与调控能量代谢,对MIRI具有保护作用^[12-13]。基于前期研究基础与有关报道,本研究以PGC-1 α 为切入点探讨温心方改善MIRI大鼠线粒体能量代谢作用机制,为温心方防治MIRI提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级Wistar雄性大鼠90只,体质量(240 \pm 20)g,8周龄,购自斯贝福(北京)实验动物科技有限公司[生产合格证号SCXK(京)2019-0010],饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所动物

房[许可证号SYXK(京)2021-0017]。分笼饲养,每笼5只,室温(21.0±2.0)℃,相对湿度(50.0±10.0)%,自由饮食进水。实验通过中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物伦理委员会批准(批准号IBTCMCACMS21-2105-03)。

1.2 药物及试剂 温心方药物组成为人参10 g、麦冬10 g、黄连10 g、瓜蒌15 g、薤白15 g、法半夏9 g、川芎15 g、赤芍15 g、桂枝10 g等,剂型为颗粒剂,由北京康仁堂药业有限公司生产,购自北京中医药大学东直门医院免煎颗粒药房(人参批号21006762,麦冬批号21032531,黄连批号21013571,瓜蒌批号20033431,薤白批号20020261,法半夏批号21032861,川芎批号21043611,赤芍批号21042911,桂枝批号21037791)。使用蒸馏水将药物溶解,分别制备含生药量0.1、0.2、0.4 g·mL⁻¹的溶液。

苏木素-伊红(HE)染液套装(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号G1003),2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色液(2%)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)活性检测试剂盒、ATP含量检测试剂盒、琥珀酸脱氢酶(SDH)检测试剂盒、线粒体呼吸链复合体IV活性检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为G3005、SEKR-0059、BC0685、BC0305、BC0955、BC0945);PGC-1 α 、线粒体转录因子A(TFAM)、沉默信息调节因子1(SIRT1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G H&L(英国Abcam公司,货号分别为ab191838、ab252432、ab189494、ab181602、ab6721);兔抗雌激素受体相关受体 α (ERR α)重组蛋白抗体(美国CST公司,货号13826S);BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号PC0020);mRNA逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒[普洛麦格(北京)生物技术有限公司,货号分别为A6001、A6002];TRIzol试剂(美国Ambion公司,货号15596026)。

1.3 仪器 ALC-V8型动物呼吸机(上海奥尔科特公司),RM-6240BD型生理记录仪(成都仪器厂),Nikon Eclipse E100型正置光学显微镜(日本尼康公司),Elx800型酶标仪(美国BioTek公司),Centrifuge 5804型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司),CFX96™ Optics Module型Real-time PCR仪、PowerPac型电泳仪、chemidoc型多功能成像系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 分组与给药 将90只Wistar大鼠适应性饲养3 d后按随机数字表分为假手术组、模型组、温心方低、中、高剂量组,每组18只。以成人1日正常服用量为准,按照大鼠和人体表面积比例换算得出各组给药剂量,温心方低、中、高剂量组分别给予0.99、1.98、3.96 g·kg⁻¹的药物灌胃,假手术组和模型组均予以等体积生理盐水灌胃。各组每日给药1次,连续21 d。

2.2 模型制备及取材 采用冠状动脉左前降支结扎术复制大鼠MIRI模型^[14-16]:以20%乌拉坦(5 mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,脱毛后将大鼠仰卧固定于手术台,四肢皮下连接心电图电极,记录标准II导联心电图;调整呼吸机参数:呼吸频率80次/分,吸呼比1~2,潮气量8,气管插管后,乙醇消毒手术部位,在胸骨左缘第三、四肋间皮肤处行一横行切口,用弯止血钳逐层钝性分离肌肉和组织,大鼠开胸器撑开肋间隙,撕开心包膜,暴露左心耳,在肺动脉圆锥和左心耳左下缘的中点处穿入6-0带针缝合线结扎左冠状动脉,打结前垫1 cm左右棉线,结扎成功后出现心尖部位发白,心电图ST段抬升(≥ 0.2 mV)。结扎30 min后剪断棉线松解结口,形成再灌注,持续2 h,期间ST段逐步回落。开胸后只穿线不结扎制备假手术组模型。

再灌注结束后,迅速取出心脏,置于预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)中清洗,切取心脏左心室缺血区的心肌组织,根据检测目的,或于4%多聚甲醛中固定,或冻存于-80℃冰箱。

2.3 TTC染色检测心肌梗死面积 将即刻剖取的左心室切成4片2 mm薄片,置于2% TTC染液中,37℃避光10 min,染色后用4%多聚甲醛固定并拍照,红色为正常心肌,灰白色为梗死区域。用Image J软件分析,计算梗死面积。心肌梗死面积=(每片心肌梗死面积之和/左心室面积)×100%。

2.4 HE染色观察心肌组织病理形态变化 将固定液中的心肌组织进行石蜡包埋、切片,经二甲苯、无水乙醇、75%乙醇脱蜡后,将切片依次行苏木素染色、伊红染色,再经无水乙醇、二甲苯梯度脱水后,中性树胶封片。置于显微镜下采集图像进行分析。

2.5 ELISA检测CK-MB、LDH活性 再灌注2 h后,腹主动脉取血5 mL,3 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径75 mm),取血清。按照试剂盒说明书ELISA检测血清CK-MB活性,微量法检测LDH活性。

2.6 试剂盒检测 ATP 含量、线粒体复合体 IV (CCO)、琥珀酸脱氢酶(SDH)活性 根据试剂盒说明书,微量法检测心肌组织 ATP 含量及心肌 CCO、SDH 活性。

2.7 Real-time PCR 检测心肌组织 SIRT1、PGC-1 α 、ERR α 、TFAM mRNA 的表达 取适量各组心肌组织于微型离心管中,加入 TRIzol 剪碎并匀浆,提取心肌组织总 RNA,按逆转录试剂盒说明书合成 cDNA,配置 PCR 反应体系进行扩增,设置 PCR 反应条件(95 $^{\circ}$ C 预变性 100 s,95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 55 s,42 循环),采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算目的基因相对表达量。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列	长度/bp
β -actin	上游 5'-TGACAGGATGCAGAAGGAGATTAC-3' 下游 5'-GAGCCACCAATCCACACAGA-3'	128
SIRT1	上游 5'-ATACTCGRCCACCTAACC-3' 下游 5'-TTGACCTCCTCATTGTAT-3'	176
PGC-1 α	上游 5'-ACAACCGCAGTCGCAACA-3' 下游 5'-GGAGGAGTCGTGGGAGGAG-3'	162
ERR α	上游 5'-GGCCACTCTCTGTGATCTTT-3' 下游 5'-CTCTGCAGTACTGACATCTGG-3'	131
TFAM	上游 5'-ACTCATCCTTAGCCTCCTG-3' 下游 5'-GACTACCCTCGCTGTC-3'	134

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测心肌组织 SIRT1、PGC-1 α 、ERR α 、TFAM 蛋白表达情况 取适量各组心肌组织,加入 RIPA 裂解液混匀,冰上匀浆后静置至充分裂解,12 000 r \cdot min⁻¹离心 10 min(离心半径 75 mm)取上清,采用 BCA 法检测蛋白浓度,加入上样缓冲液后在金属浴中煮沸 10 min 使蛋白变性,将样本经电泳(80 V, 90 min)、湿法转膜(250 mA, 60 min)、5% BSA 封闭 2 h,分别加入一抗 SIRT1(1: 2 000)、PGC-1 α (1: 1 000),ERR α (1: 1 000),TFAM(1: 1 000),GAPDH(1: 10 000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;1% TBST 洗膜 3 次(每次 10 min)后加入二抗(1: 10 000)室温孵育 1 h,洗膜 3 次(每次 10 min)后,用 ECL 发光液显影。以 GAPDH 为内参,用 Image Lab 软件分析蛋白条带的灰度值,以目的蛋白/内参蛋白条带灰度值作为蛋白相对表达量。

2.9 统计学分析 采用 SPSS 23.0 软件统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差

分析(ANOVA)统计,各组数据不符合正态分布或未通过方差齐性检验时,采用非参数检验统计学分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

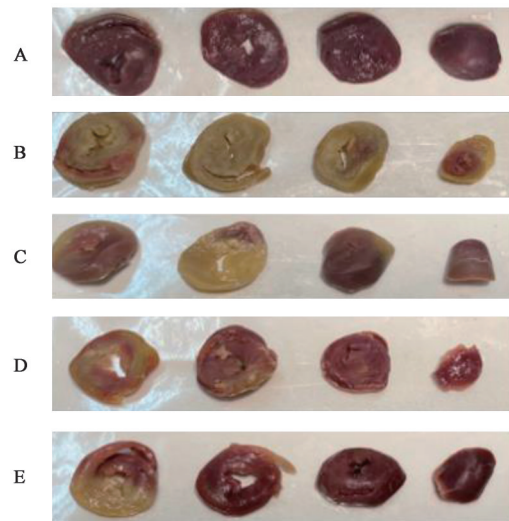
3.1 对 MIRI 大鼠心肌梗死面积的影响 TTC 染色结果显示,模型组心肌梗死面积为(54.26 \pm 7.30)%,温心方预给药组大鼠心肌梗死面积减少,且温心方中、高剂量组差异具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。见表 2、图 1。

表 2 温心方对 MIRI 大鼠心肌梗死面积影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of Wenxin prescription on myocardial infarction area in MIRI rats ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/g \cdot kg ⁻¹	心梗面积/%
假手术组		0.00 \pm 0.00
模型组		54.26 \pm 7.30
温心方低剂量组	0.99	31.05 \pm 9.78
温心方中剂量组	1.98	24.53 \pm 8.83 ¹⁾
温心方高剂量组	3.96	14.85 \pm 0.95 ²⁾

注:与模型组比较 ¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$



注:A.假手术组;B.模型组;C.温心方低剂量组;D.温心方中剂量组;E.温心方高剂量组(图2和图3同)

图 1 温心方对 MIRI 大鼠心肌梗死影响

Fig. 1 Effect of Wenxin prescription on myocardial infarction in MIRI rats

3.2 对 MIRI 大鼠心肌组织病理形态影响 假手术组心肌纤维呈束状排列,分布整齐,心肌细胞结构完整,形态正常;模型组心肌纤维断裂,排列紊乱,细胞胞质水肿,细胞核出现固缩、偏移,部分核溶解、消失;与模型组比较,温心方预给药组心肌纤维排列较整齐,胞浆水肿情况有所改善,胞核较为完整,其中高剂量改善最明显。见图 2。

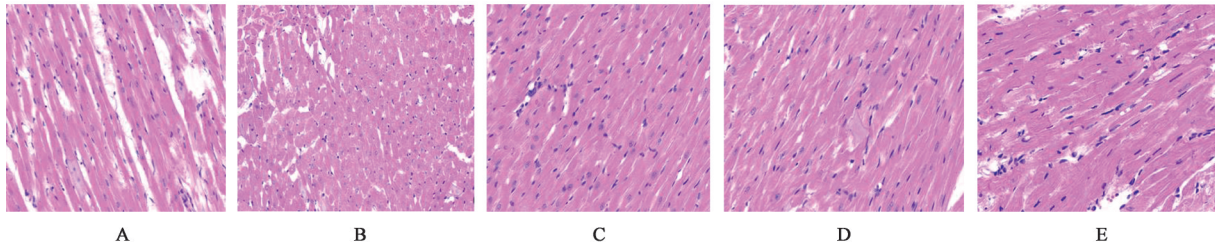


图2 温心方对大鼠心肌组织病理结构的影响(HE, ×400)

Fig. 2 Effect of Wenxin prescription on pathological structure of myocardial tissue in rats (HE, ×400)

3.3 对MIRI大鼠CK-MB、LDH活性的影响 与假手术组比较,模型组CK-MB活性明显升高($P < 0.05$),LDH活性显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,温心方高剂量组CK-MB活性明显降低($P < 0.05$),温心方中、高剂量组LDH活性显著降低($P < 0.01$)。见表3。

表3 温心方对MIRI大鼠CK-MB、LDH活性的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Wenxin prescription on CK-MB and LDH activities in MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CK-MB/μg·L ⁻¹	LDH/U·mL ⁻¹
假手术组		0.83±0.23	36.47±1.85
模型组		3.59±0.70 ¹⁾	54.65±1.72 ²⁾
温心方低剂量组	0.99	2.20±0.38	51.40±1.58
温心方中剂量组	1.98	1.98±0.47	48.22±1.20 ³⁾
温心方高剂量组	3.96	1.10±0.05 ³⁾	44.77±1.54 ⁴⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表5和表7同)

3.4 对MIRI大鼠心肌组织ATP含量的影响 与假手术组比较,模型组心肌组织中ATP含量显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,温心方高剂量组ATP含量显著增加($P < 0.01$)。见表4。

表4 温心方对MIRI大鼠心肌组织ATP含量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Wenxin prescription on ATP content in MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ATP/μmol·g ⁻¹
假手术组		181.03±2.23
模型组		89.08±9.36 ¹⁾
温心方低剂量组	0.99	116.38±5.78
温心方中剂量组	1.98	127.87±4.11
温心方高剂量组	3.96	168.10±6.20 ²⁾

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

3.5 对MIRI大鼠SDH、CCO活性的影响 与假手术组比较,模型组SDH活性显著降低($P < 0.01$),CCO活性明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,温心方中、高剂量组SDH、CCO活性明显增加($P < 0.05$,

$P < 0.01$)。见表5。

表5 温心方对MIRI大鼠SDH、CCO活性的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Wenxin prescription on SDH and CCO activities in MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SDH	CCO
假手术组		703.70±89.57	703.36±73.42
模型组		275.13±62.78 ²⁾	487.22±56.16 ¹⁾
温心方低剂量组	0.99	296.30±60.05	547.67±57.53
温心方中剂量组	1.98	544.97±88.06 ³⁾	677.72±43.63 ³⁾
温心方高剂量组	3.96	624.34±33.46 ⁴⁾	723.51±68.40 ³⁾

3.6 对MIRI大鼠心肌组织SIRT1、PGC-1α、ERRα、TFAM mRNA表达水平的影响 与假手术组比较,模型组SIRT1、PGC-1α、ERRα、TFAM mRNA表达水平均显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,温心方中、高剂量组SIRT1、PGC-1α、ERRα mRNA表达水平影响增加($P < 0.05, P < 0.01$),温心方低剂量组PGC-1α mRNA表达水平明显增加($P < 0.05$),温心方高剂量组TFAM mRNA表达水平显著增加($P < 0.01$)。见表6。

3.7 对MIRI大鼠心肌组织SIRT1、PGC-1α、ERRα、TFAM蛋白表达影响 与假手术组比较,模型组SIRT1、PGC-1α、ERRα、TFAM蛋白表达明显降低($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,温心方高剂量组SIRT1、PGC-1α、ERRα、TFAM蛋白表达均明显增加($P < 0.05$),温心方中剂量组PGC-1α、ERRα、TFAM蛋白表达明显增加($P < 0.05$),温心方低剂量组TFAM蛋白表达明显增加($P < 0.05$)。见表7、图3。

4 讨论

MIRI归属为中医“胸痹心痛”“真心痛”等疾病范畴。《金匱要略》中以“阳微阴弦”概括其主要病机,反映了该病本虚标实的病理属性,曹洪欣教授结合大量的临床实践和深入研究,认为心阳不足为主要病理基础,痰浊、瘀血为主要病理因素,依据阳虚痰瘀的病机特点,提出“温心阳、护心体、益心用”的温阳益心法,创制代表方剂温心方,由瓜蒌薤白

表 6 温心方对各组大鼠心肌组织 SIRT1、PGC-1 α 、ERR α 、TFAM mRNA 表达水平影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of Wenxin prescription on mRNA expressions of SIRT1, PGC-1 α , ERR α and TFAM in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SIRT1	PGC-1 α	ERR α	TFAM
假手术组		1.00±0.05	1.00±0.04	1.00±0.09	1.01±0.12
模型组		0.42±0.02 ¹⁾	0.49±0.05 ¹⁾	0.56±0.07 ¹⁾	0.48±0.05 ¹⁾
温心方低剂量组	0.99	0.43±0.04	0.59±0.07 ²⁾	0.63±0.08	0.46±0.03
温心方中剂量组	1.98	0.62±0.07 ²⁾	0.82±0.08 ³⁾	0.79±0.11 ³⁾	0.56±0.05
温心方高剂量组	3.96	0.82±0.08 ³⁾	0.93±0.06 ³⁾	0.92±0.04 ³⁾	0.85±0.08 ³⁾

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 7 温心方对各组大鼠心肌组织 SIRT1、PGC-1 α 、ERR α 、TFAM 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 7 Effect of Wenxin prescription on protein expressions of SIRT1, PGC-1 α , ERR α , TFAM in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SIRT1/GAPDH	PGC-1 α /GAPDH	ERR α /GAPDH	TFAM/GAPDH
假手术组		0.99±0.10	0.90±0.08	0.21±0.07	0.79±0.23
模型组		0.13±0.05 ²⁾	0.27±0.05 ¹⁾	0.06±0.03 ²⁾	0.19±0.06 ²⁾
温心方低剂量组	0.99	0.65±0.03	0.59±0.16	0.17±0.06	0.71±0.11 ³⁾
温心方中剂量组	1.98	0.90±0.18	0.84±0.21 ³⁾	0.22±0.05 ³⁾	0.97±0.10 ⁴⁾
温心方高剂量组	3.96	1.13±0.28 ³⁾	0.76±0.17 ³⁾	0.24±0.03 ³⁾	1.05±0.16 ⁴⁾

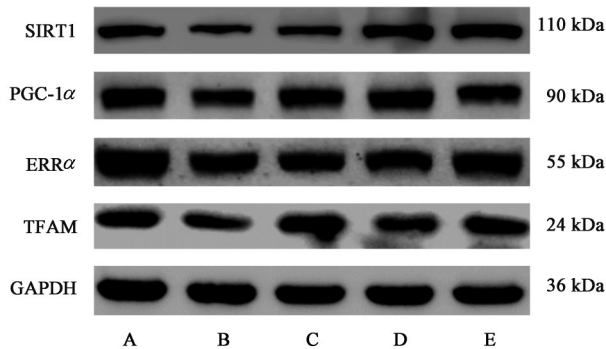


图 3 各组大鼠心肌组织 SIRT1、PGC-1 α 、ERR α 、TFAM 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of SIRT1, PGC-1 α , ERR α , TFAM protein expressions in myocardial tissue of rats in each group

半夏汤、小陷胸汤、生脉饮等经典名方化裁而成,融温阳补气益心,活血化瘀通脉为一体。方中人参、薤白、桂枝温通心阳,补益心气,瓜蒌薤白半夏汤、小陷胸汤宽胸理气,祛痰泻浊,川芎、赤芍活血化瘀通络,麦冬养阴清心,防止人参、桂枝等药温燥伤阴。本研究发现,温心方干预后,能缩减大鼠心肌梗面积,降低血清 CK-MB、LDH 活性,改善受损心肌病理组织形态,对 MIRI 起保护作用。

三磷酸腺苷(ATP)大量、持续供能是维持正常生命活动关键。ATP 的合成是心脏能量代谢的重要环节,主要由线粒体完成。脂肪酸、葡萄糖等能量底物经蛋白介导转运、代谢等途径进入线粒体,生

成乙酰辅酶 A(CoA),乙酰 CoA 在多种酶的促进作用下,经氧化磷酸化合成 ATP,因此,氧化磷酸化是线粒体能量代谢过程的关键环节,而线粒体呼吸链复合物 II(SDH)、复合物 IV(CCO)在氧化磷酸化过程中起重要作用,影响能量生成^[17-18]。

MIRI 与线粒体功能障碍、能量代谢异常的相关性已成为普遍认识^[19-20]。心肌缺血再灌注过程中,线粒体受损,氧化磷酸化功能障碍,使 ATP 合成减少,产生能量危机。本研究发现,温心方可以提高心肌组织中 ATP 含量及线粒体氧化磷酸化关键酶 CCO、SDH 的活性,改善线粒体能量代谢。

PGC-1 α 主要存在于心肌等高能量需求的组织中,是线粒体生物合成、能量代谢的核心因子,线粒体的生物合成是氧化磷酸化的先决条件,研究表明,当 PGC-1 α 表达上升时,线粒体生物合成、氧化磷酸化水平也相应提高^[21-22]。PGC-1 α 可通过沉默信息调节因子 1(SIRT1)去乙酰化途径激活,促进 ATP 合成,确保细胞能量供应^[23-24]。当 PGC-1 α 被活化后,又能够激活下游 ERR α ,与 PGC-1 α 相似,ERR α 在心脏中呈高表达,被证明是氧化磷酸化的关键调节因子,与线粒体能量代谢途径的基因调控密切相关^[25-28],基因组分析发现,ERR α 在线粒体基因的启动子区域直接或重叠结合位点大多数由 PGC-1 α 调控,这些基因包涵了三羧酸循环、氧化磷

酸化等线粒体能量代谢的多个方面^[29]。此外,有研究表明,ERRs作为PGC-1 α 功能的执行者,只有在与共激活分子PGC-1 α 结合才具有转录活性^[30],二者相互作用,激活线粒体转录因子A(TFAM),促进线粒体基因转录及生物合成^[31-32]。因此认为,SIRT1/PGC-1 α /ERR α 通路的激活对促进线粒体生物合成,改善其能量代谢具有重要意义。本研究结果显示温心方组心肌组织SIRT1、PGC-1 α 、ERR α 、TFAM mRNA水平及蛋白表达均有提高,说明该方可以激活SIRT1/PGC-1 α /ERR α 通路,促进心肌线粒体生物合成,改善线粒体能量代谢。

综上所述,温心方可通过调控SIRT1/PGC-1 α /ERR α 通路,提高氧化磷酸化水平,改善心肌线粒体能量代谢,进而对MIRI起保护作用。线粒体能量代谢涉及多个环节,受多种酶、多因子调节,温心方是否可以通过其他途径改善MIRI心肌线粒体能量代谢还需要进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 《中国心血管健康与疾病报告》2020[J]. 心肺血管病杂志, 2021, 40(10): 1005-1009.

[2] MC DOUGAL A D, DEWEY C F. Modeling oxygen requirements in ischemic cardiomyocytes [J]. J Biol Chem, 2017, 292(28): 11760-11776.

[3] HAUSENLOY D J, YELLON D M. Myocardial ischemia-reperfusion injury: A neglected therapeutic target [J]. J Clin Invest, 2013, 123(1): 92-100.

[4] KULEK A, ANZELL A, WIDER J, et al. Mitochondrial quality control: Role in cardiac models of lethal ischemia-reperfusion injury [J]. Cells, 2020, 9: 214.

[5] 刘洲, 柯希贤, 梁贵友. 线粒体功能障碍与心肌缺血再灌注损伤研究进展 [J]. 中华实验外科杂志, 2020, 37(12): 2379-2383.

[6] 李金霞, 张华敏, 曹洪欣. 温阳益心法治疗冠心病冠状动脉狭窄32例临床疗效的回顾性研究 [J]. 中医杂志, 2019, 60(9): 754-759.

[7] 李春杰, 谷素洁, 曹洪欣, 等. 温阳益心法治疗急性冠脉综合征的临床研究 [J]. 中医药学报, 2011, 39(4): 55-57.

[8] 徐慧. 温阳益心法治疗冠心病临床疗效评价研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2007.

[9] 唐丹丽, 张华敏, 曹洪欣. 温阳益心方对心肌缺血再灌注损伤大鼠NIK/IKK/I κ B/NF- κ B信号转导通路的影响 [J]. 国际中医中药杂志, 2011, 33(7): 590-593.

[10] 李春杰, 曹洪欣, 陈治水, 等. 中药预处理对家兔缺血再灌注损伤心肌细胞凋亡的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(1): 38-40.

[11] 张腾, 曹洪欣, 殷惠军. 温心胶囊对异丙肾上腺素所致大鼠心肌缺血损伤保护作用的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2001, 8(1): 36-37.

[12] WANG D, CAO H, WANG X, et al. SIRT1 is required for exercise-induced beneficial effects on myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. J Inflamm Res, 2021, 14(4): 1283-1296.

[13] 聂俊刚, 塔娜, 刘莉娟, 等. PGC1 α 对心肌缺血再灌注损伤的作用及其机制 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2020, 45(10): 1155-1163.

[14] LI Y, ZHANG H, LI Z, et al. microRNA-130a-5p suppresses myocardial ischemia reperfusion injury by downregulating the HMGB2/NF- κ B axis [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2021, 21(1): 121.

[15] 李想, 张华敏, 崔海峰, 等. 栝楼薤白半夏汤对心肌缺血再灌注损伤大鼠自噬及PINK1/Parkin通路作用研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(11): 1626-1630.

[16] 罗斌, 田芳芳, 田俊斌, 等. 白杨素对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌Bax和Bcl-2表达的影响 [J]. 世界中医药, 2021, 16(1): 86-90.

[17] ZIEMANN M, LIM S C, KANG Y, et al. MicroRNA-101-3p modulates mitochondrial metabolism via the regulation of complex II assembly [J]. J Mol Biol, 2022, 434(2): 167361.

[18] 向飞, 薛冬冬, 罗佳, 等. 线粒体转录因子A和细胞色素c氧化酶途径对肿瘤坏死因子受体相关蛋白1调节大鼠缺氧心肌细胞能量生成的作用及机制 [J]. 中华烧伤杂志, 2020, 36(8): 651-657.

[19] DÍAZ-VESGA M C, ZÚÑIGA-CUEVAS Ú, RAMÍREZ-REYES A, et al. Potential therapies to protect the aging heart against ischemia/reperfusion injury [J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 770421.

[20] RAVINDRAN S, KURIAN G A. Effect of sodium thiosulfate postconditioning on ischemia-reperfusion injury induced mitochondrial dysfunction in rat heart [J]. J Cardiovasc Transl Res, 2018, 11(3): 246-258.

[21] LOPASCHUK G D, USSHER J R, FOLMES C D L, et al. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease [J]. Physiol Rev, 2010, 90(1): 207-258.

[22] FERNANDEZ-MARCOS PJ, AUWERX J. Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis [J]. Am J Clin Nutr, 2011, 93(4): 884-890.

[23] ZHAO Y, ZHANG J, ZHENG Y, et al. NAD⁺ improves cognitive function and reduces

- neuroinflammation by ameliorating mitochondrial damage and decreasing ROS production in chronic cerebral hypoperfusion models through Sirt1/PGC-1 α pathway[J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(9):207.
- [24] WANG C P, SUN X, QIU Z, et al. MiR-138-5p exacerbates hypoxia/ reperfusion-induced heart injury through the inactivation of SIRT1-PGC-1 α [J]. *Inflamm Res*, 2019, 68(10):867-876.
- [25] ZHOU Q, XU H, YAN L, et al. PGC-1 α promotes mitochondrial respiration and biogenesis during the differentiation of hiPSCs into cardiomyocytes [J]. *Genes Dis*, 2021, 8(6):891-906.
- [26] 黄凯,高佳明,贺爽,等. 线粒体作为中药治疗心力衰竭靶点的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(9): 2082-2090.
- [27] VERNIER M, GIGUÈRE V. Aging, senescence and mitochondria: The PGC-1/ERR axis [J]. *J Mol Endocrinol*, 2021, 66(1):R1-R14.
- [28] 徐佳琪,周忠焱,唐靖一. 中药治疗心血管疾病中线粒体氧化应激损伤的研究[J]. *世界中医药*, 2021, 16(5):831-834,839.
- [29] FAN W, EVANS R. PPARs and ERRs: Molecular mediators of mitochondrial metabolism[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 33:49-54.
- [30] RANHOTRA H S. The orphan estrogen-related receptor alpha and metabolic regulation: New frontiers [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 565-568.
- [31] YANG X, LIU Q, LI Y, et al. The diabetes medication canagliflozin promotes mitochondrial remodelling of adipocyte via the AMPK-Sirt1-Pgc-1 α signalling pathway[J]. *Adipocyte*, 2020, 9(1):484-494.
- [32] MA S, FENG J, ZHANG R, et al. SIRT1 activation by resveratrol alleviates cardiac dysfunction via mitochondrial regulation in diabetic cardiomyopathy mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 9(8): 4602715.

[责任编辑 周冰冰]