

双参宁心胶囊通过调控线粒体ATP敏感性钾通道减轻大鼠 心肌缺血/再灌注损伤

赵雨薇^{1,2}, 付建华^{1,2*}, 李磊¹, 孟红旭¹, 辛高杰¹, 贾非凡¹, 郑秋生², 刘建勋^{1*}

(1. 中国中医科学院 西苑医院, 北京 100091;

2. 滨州医学院, 山东烟台 264033)

[摘要] 目的:观察双参宁心胶囊通过调控线粒体三磷酸腺苷(ATP)敏感性钾通道来减轻大鼠心肌缺血/再灌注损伤。方法:成年雄性SD大鼠56只,随机分为假手术组(sham),模型组(model),双参宁心组(SSNX)给予SSNX 90 mg·kg⁻¹,线粒体ATP敏感性钾通道(MitoK_{ATP})通道抑制剂组(SSNX+5-HD),给予SSNX 90 mg·kg⁻¹和5-HD 5 mg·kg⁻¹;每组各14只。除假手术组外其余3组均阻断冠状动脉左前降支(LAD)45 min,分别于再灌注后3 h后处死,氯化2,3,5-三苯基四氮唑(TTC)染色观察心肌缺血和梗死面积,苏木素-伊红(HE)染色观察心肌组织损伤程度。试剂盒检测血清乳酸盐脱氢酶(LDH),肌酸激酶(CK)及肌酸激酶同工酶(CK-MB)的活性。透射电镜下观察心肌细胞线粒体及线粒体自噬超微结构变化,荧光探针法检测心肌细胞中线粒体膜电位水平的变化。结果:与sham组比较,model组心肌梗死面积与心肌缺血面积百分率明显增大,心肌组织排列紊乱,疏松,个别心肌纤维断裂,心肌细胞坏死,血清中CK,CK-MB,LDH活性显著升高($P<0.01$),线粒体膜电位显著降低($P<0.01$),透射电镜观察线粒体结构破坏明显。与model组比较,SSNX组心肌组织排列有序,少数区域细胞水肿轻度变性,心肌梗死面积与心肌缺血面积百分率显著降低,血清中CK,CK-MB,LDH活性显著降低($P<0.01$),线粒体膜电位升高($P<0.01$),SSNX+5-HD组心肌组织排列轻度无序,部分区域细胞水肿轻度变性,心肌梗死面积与心肌缺血面积百分率显著降低,血清中CK,CK-MB,LDH活性显著降低($P<0.01$),线粒体膜电位升高($P<0.01$)。而SSNX+5-HD组较SSNX组,血清中CK,CK-MB,LDH活性显著升高($P<0.01$),心肌梗死面积与心肌缺血面积百分率显著增大,线粒体膜电位有所降低($P<0.05$)。结论:双参宁心胶囊通过开放线粒体ATP敏感性钾通道来保护大鼠心肌缺血再灌注损伤。

[关键词] 心肌缺血/再灌注损伤; 线粒体; 线粒体三磷酸腺苷(ATP)敏感性钾通道; 双参宁心胶囊

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)13-0104-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201305

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200403.0912.001.html>

[网络出版日期] 2020-4-3 10:30

Effect of Shuangshen Ningxin Capsule in Alleviating Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rats by Regulating Mitochondrial ATP-sensitive Potassium Channel

ZHAO Yu-wei^{1,2}, FU Jian-hua^{1,2*}, LI Lei¹, MENG Hong-xu¹, XIN Gao-jie¹, JIA Fei-fan¹,
ZHENG Qiu-sheng², LIU Jian-xun^{1*}

(1. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China;

2. Binzhou Medical University, Yantai 264033, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Shuangshen Ningxin capsule in alleviating myocardial ischemia/reperfusion injury in rats by regulating mitochondrial adenosine triphosphate(ATP)-sensitive potassium channels. **Method:** A total of 56 adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham-operated

[收稿日期] 20191101(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774145,81503292,81603335);国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2015CB554406)

[第一作者] 赵雨薇,在读硕士,从事心血管中药药理研究,Tel:010-62835608,E-mail:452098696@qq.com

[通信作者] *付建华,博士,研究员,从事心血管中药药理研究,Tel:010-62879814,E-mail:jianhuaaffcn@263.net;

*刘建勋,博士,研究员,从事心脑血管药理学和新药研究,Tel:010-62835601,E-mail:liujx0324@sina.com

control group (sham), model group (model), Shuangshen Ningxin group (SSNX, 90 mg·kg⁻¹). Shuangshen Ningxin and mitochondrial ATP-sensitive potassium channel (MitoK_{ATP}) channel inhibitor group 5-hydroxyacid group (SSNX+5-HD, 5 mg·kg⁻¹), with 14 rats in each group. Except the sham operation group, the other three groups received occlusion of left anterior descending coronary artery (LAD) for 45 min, and were sacrificed 3 h after reperfusion. Myocardial ischemia and infarct size were observed by TSC Evans blue staining, and myocardial tissue damage degree was observed by hematoxylin-eosin(HE) staining. The kit was used to measure serum lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK) and creatine kinase isoenzyme (CK-MB). The ultrastructural changes of mitochondria and mitochondrial autophagy were observed under transmission electron microscope. The changes of mitochondrial membrane potential in cardiomyocytes were detected by fluorescent probe. **Result:** Compared with the sham group, myocardial infarct size and myocardial ischemic area percentage in the model group were significantly increased, myocardial tissue arrangement was disordered and loose, individual myocardial fibers were broken, cardiomyocytes were necrotic, and serum CK, CK-MB, LDH activities were significantly increased ($P<0.01$). Mitochondrial membrane potential was significantly decreased ($P<0.01$), and mitochondrial structure was destroyed by transmission electron microscopy. Compared with the model group, the myocardial tissue of the SSNX group was arranged orderly, and a small amount of cell edema was mildly degenerated. The percentage of myocardial infarct size and myocardial ischemic area was significantly decreased, serum CK, CK-MB, and LDH activities were significantly decreased ($P<0.01$), while mitochondrial membrane potential increased ($P<0.01$). Compared with the model group, the SSNX+5-HD group had mild myocardial tissue disorder and mild degeneration of cell edema in some areas, the percentage of myocardial infarct size and myocardial ischemic area was significantly reduced, serum CK, CK-MB, and LDH activities were significantly decreased ($P<0.01$), and mitochondrial membrane potential increased ($P<0.01$). Compared with SSNX group, SSNX+5-HD group had significant increase in serum CK, CK-MB and LDH activities ($P<0.01$), significant increase in the percentage of myocardial infarct size and myocardial ischemic area, and mitochondrial membrane potential Reduced ($P<0.05$). **Conclusion:** SSNX protects rat myocardial ischemia-reperfusion injury by opening mitochondrial ATP-sensitive potassium channel.

[Key words] myocardial ischemia/reperfusion injury; mitochondria; mitochondrial adenosine triphosphate(ATP)-sensitive potassium channel; Shuangshen Ningxin capsule

随着生活水平的提高,人口老龄化日益明显,缺血性心脏病成为危害我国人民健康的首要疾病^[1]。缺血性心脏病是指因冠状动脉狭窄、堵塞、供血不足而引起的心肌机能障碍和器质性病变。冠状动脉长时间堵塞会引起心肌缺血、缺氧甚至坏死。恢复冠脉血流是目前治疗缺血性心脏病,挽救坏死心肌的最有效方法。临床上治疗缺血性心脏病常采用溶栓治疗或经皮冠状动脉介入,但经研究发现,心肌缺血再灌注后往往会加重心肌损伤,即为心肌缺血再灌注损伤(MIRI)^[2]。线粒体是心肌细胞的能量代谢和细胞内信号传导核心。MIRI会破坏心肌线粒体稳态平衡引起心肌线粒体功能紊乱,线粒体的结构和功能稳定直接影响着心肌功能。有研究表明,线粒体三磷酸腺苷(ATP)敏感性钾通道(MitoK_{ATP})通道开放是产生心肌保护效应的

重要启动分子^[3]。5-羟基羧酸盐(5-HD)是线粒体膜上ATP敏感性钾通道特异性抑制剂,可以有效抑制缺血损伤中的MitoK_{ATP}对心肌的保护作用^[4-5]。

双参宁心胶囊是治疗气虚血瘀症冠心病心绞痛的组方中药,由人参片、丹参和延胡索3味药的有效部位成分群组成,即人参总皂苷、丹参总酚酸和延胡索总生物碱成分按原方比例配伍而成(人参总皂苷、丹参总酚酸和延胡索总生物碱1:1:1.25组成)。其中,人参益气补虚,丹参活血化瘀,延胡索行气止痛,三药配伍,标本兼治,具有益气、活血、祛瘀、行气、止痛之功,临床主要治疗气虚血瘀所致的胸痹心痛。有实验研究表明,双参宁心胶囊可以有效改善心肌缺血程度,对抗心肌细胞Ca²⁺超载^[6]。本实验目的在于观察双参宁心胶囊对大鼠急性MIRI模型的保护作用,研究该药对MitoK_{ATP}

的影响,探究该药对心肌细胞线粒体的保护机制,为治疗缺血性心脏病提供新的思路。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康成年的SD大鼠56只,雄性,体质量220~250 g,7周龄,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0002。本实验经中国中医科学院西苑医院伦理委员会审批通过,编号2018XLC003-2。

1.2 药物与试剂 双参宁心胶囊(中国中医科学院西苑医院基础医学研究所药学室提供,批号20180714);MitoK_{ATP}通道抑制剂5-羟基葵酸盐(美国Sigma公司,批号104M4608V);水合氯醛(上海展云化工有限公司,批号170610);肌酸激酶(CK),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒[和光纯耀(上海)化学有限公司,批号分别为901587,809463];肌酸激酶同工酶(CK-MB)试剂盒(迈克生物股份有限公司,批号19G302);线粒体提取试剂盒,线粒体膜电位(JC-1)测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为20190416,20190326);伊红染色液,迈耶氏苏木素染色液(北京益利精细化学品有限公司,批号均为20150011);氯化2,3,5-三苯基四氮唑(TTC,美国Amresco公司,批号4319b320)。

1.3 仪器 ICE-CL31R型低温离心机(美国Thermo公司);DW-3000S型双通道小动物呼吸机(安徽正华生物仪器设备有限公司);IDA-2000型数字医学图像分析系统(北京正恒博诚科技发珍有限公司);SYNERGY4型多功能酶标仪(美国BioTek公司);H-7500型电子显微镜(日本日立电器有限公司);JEM-1400型透射电子显微镜(日本电子株式会社)。

2 方法

2.1 动物分组及给药方法 56只SD大鼠饲养于中国中医科学院西苑医院SPF级实验动物中心,适应性喂养3 d,根据体质量随机分成4组,每组14只,分别为假手术组、模型组、双参宁心组(90 mg·kg⁻¹),双参宁心胶囊与5-羟基葵酸盐组(90 mg·kg⁻¹+5 mg·kg⁻¹)。假手术组与模型组按10 mL·kg⁻¹灌胃蒸馏水;双参宁心胶囊组按10 mL·kg⁻¹灌胃给予双参宁心胶囊90 mg·kg⁻¹;双参宁心胶囊+5-羟基葵酸盐组按10 mL·kg⁻¹灌胃给予双参宁心胶囊90 mg·kg⁻¹和5-羟基葵酸盐5 mg·kg⁻¹,每天1次,连续7 d。将5-羟基葵酸盐生理盐水配制药物所需浓度,于冠状动脉左前降支(LAD)穿线后既可,尾静脉注射给药1次,假手术

组、模型组及双参宁心胶囊组给予生理盐水。在前期中,双参宁心胶囊的药效学实验结果较好,且90 mg·kg⁻¹效果最佳,且本实验聚焦于探索双参宁心胶囊对线粒体的保护机制,故只选择90 mg·kg⁻¹为单一用药剂量^[7]。

2.2 大鼠MIRI模型建立 建立模型方法参照文献基础上进行改善^[8]。大鼠用3.5%水合氯醛(10 mL·kg⁻¹)腹腔麻醉,仰位固定,进行气管插管,连接小动物呼吸机进行人工呼吸,并连接心电图机。开胸,段3~4肋,打开心包膜,暴露心脏,用0号手术线与LAD分叉以下约2 mm处穿线,经尾静脉注射给药/生理盐水,稳定10 min后结扎系为活扣,随后闭合胸腔,以心电图QRS波幅加大,ST段抬高,T波高耸或倒置作为缺血是否成功的判断标准。结扎45 min后解开结扎线,留下线头,实现再灌注过程,缝合胸壁,动物恢复自主呼吸,再灌注180 min后,用水合氯醛腹腔麻醉大鼠,采集血液及心肌组织样本进行检测。其中假手术组只穿线不结扎,其余操作同模型组。

2.3 试剂盒检测血清心肌酶CK,CK-MB及LDH活性 造模结束后,水合氯醛腹腔麻醉大鼠,腹主动脉取血,室温自然状态下静置1 h,3 000 r·min⁻¹离心15 min,分离血清,按照试剂盒说明书检测CK,CK-MB及LDH活性。

2.4 TTC检测心肌梗死范围 实验结束后,打开大鼠胸腔,原位重新扎紧LAD,由腹主动脉缓慢打进2%依文思蓝染液1 mL。稳定10 s后立即取下心脏,生理盐水冲洗,于心脏结扎线下平行于冠状沟均匀地将心室部分切成5片,放入TTC染液中,37 °C染色15 min。IDA-2000数字医学图像分析系统测量每片心肌蓝染及梗死区域面积,并测量计算每片心肌总面积、缺血区域面积与梗死总面积。

心肌梗死面积百分率=梗死区面积/缺血区面积×100%

2.5 苏木素-伊红(HE)染色观察心肌组织病理变化 大鼠心肌组织放于4%多聚甲醛固定液中固定24 h,石蜡包埋,切片(5 μm),HE染色,光学显微镜下观察心肌结构。

2.6 透射电镜观察线粒体结构 取大小约1 mm×1 mm×1 mm左心室缺血区组织,2%戊二醛固定,经磷酸盐缓冲液漂洗后用1%锇酸将组织继续固定,丙酮逐级脱水、包埋、超薄切片机切片,枸橼酸铅染色后,JEM-1400型透射电子显微镜观察心肌细胞及线粒体超微结构。

2.7 荧光探针法检测线粒体膜电位 取下大鼠

心脏后,于心尖部位取心肌组织100 mg,生理盐水冲洗,洗净血水,滤纸吸干,加入冰预冷的Lysis Buffer液1.0 mL重悬细胞,剪碎匀浆,按照线粒体提取试剂盒说明书进行线粒体提取。根据线粒体膜电位检测试剂盒说明书配制好JC-1染色工作液,将配制好的JC-1染色工作液加入0.1 mL总蛋白量为纯化的线粒10~100 μg。用荧光分光光度计检测。激发光设置为490 nm,激发光设置为530 nm检测JC-1单体,激发光设置为525 nm,发射光设置为590 nm检测JC-1聚合物。

2.8 统计学处理 采用SPSS 18.0统计软件进行统计,实验获得的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素

方差分析(One-way ANOVA)方法,方差齐用Tukey检验,方差不齐用Tamhane's T2检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对MIRI大鼠心肌酶CK,CK-MB,LDH水平的影响 心肌缺血再灌注后,与假手术组比较,模型组动物血清CK,CK-MB及LDH活性显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,双参宁心胶囊组与双参宁心胶囊+5-羟基萘酸盐组大鼠血清CK,CK-MB及LDH活性显著降低($P < 0.01$);与双参宁心胶囊组比较,双参宁心胶囊+5-羟基萘酸盐组大鼠血清CK,CK-MB及LDH活性升高显著($P < 0.01$)。见表1。

表1 双参宁心胶囊对MIRI大鼠心肌酶CK,CK-MB,LDH水平的影响($\bar{x} \pm s, n=14$)

Table 1 Effect of Shuangshen Ningxin capsule(SSNX) on levels of myocardial enzymes CK, CK-MB and LDH in MIRI rats($\bar{x} \pm s, n=14$)

U·L⁻¹

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	CK	LDH	CK-MB
假手术	-	434.58±102.44	548.16±214.24	685.25±133.92
模型	-	9 100.33±804.93 ¹⁾	2 491.66±684.14 ¹⁾	1 976.50±283.35 ¹⁾
双参宁心胶囊	90	2 341.91±701.83 ²⁾	789.50±226.58 ²⁾	1 070.66±242.71 ²⁾
双参宁心胶囊+5-羟基萘酸盐	90+5	4 165.33±706.39 ^{2,3)}	1 881.25±667.21 ^{2,3)}	1 765.58±638.80 ³⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与双参宁心胶囊组比较³⁾ $P < 0.01$ (表2同)。

3.2 对MIRI大鼠心肌梗死面积百分率的影响

与假手术组比较,模型组大鼠心肌梗死面积百分率显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,双参宁心胶囊组与双参宁心胶囊+5-羟基萘酸盐组均可显著降低大鼠心肌梗死面积百分率($P < 0.01$);与双参宁心胶囊组比较,双参宁心胶囊+5-羟基萘酸盐组降低心肌梗死面积百分率显著($P < 0.01$)。见表2,图1。

表2 双参宁心胶囊对MIRI大鼠心肌梗死面积百分率的影响($\bar{x} \pm s, n=14$)

Table 2 Effect of SSNX on percentage of myocardial infarct size in MIRI rats($\bar{x} \pm s, n=14$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	心肌梗死面积百分率/%
假手术	-	2.49±0.61
模型	-	66.95±4.90 ¹⁾
双参宁心胶囊	90	48.19±6.48 ²⁾
双参宁心胶囊+5-羟基萘酸盐	90+5	58.42±6.35 ^{2,3)}

3.3 对MIRI大鼠心肌组织病理学的影响 假手术组心肌组织排列整齐、均匀、紧密,心肌细胞未见明显变性、坏死,间质未见异常。模型组心肌组织排列紊乱,疏松,部分区域细胞水肿变性,个别心肌纤维断裂,心肌细胞坏死,间质水肿,炎细胞浸润。



A. 假手术组;B. 模型组;C. 双参宁心胶囊组;D. 双参宁心胶囊+5-羟基萘酸盐组(图2,3同)

图1 双参宁心胶囊对MIRI大鼠心肌梗死面积的影响(TTC)

Fig. 1 Effect of SSNX on myocardial infarct size in MIRI rats (TTC)

双参宁心胶囊组心肌组织排列有序,疏松,少数区域细胞水肿轻度变性,未见心肌纤维断裂及坏死,间质轻度水肿,未见炎细胞浸润,病理损伤改善较显著。双参宁心胶囊+5-羟基萘酸盐组心肌组织排列轻度无序,疏松,部分区域细胞水肿轻度变性,未见心肌纤维断裂及坏死,间质轻度水肿,未见炎细胞浸润。见图2。

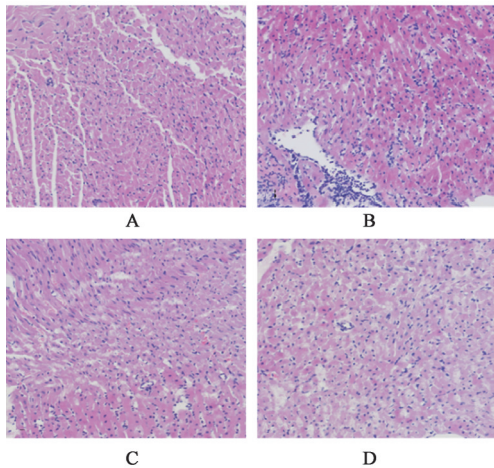


图2 双参宁心胶囊对MIRI大鼠心肌组织病理变化的影响(HE, ×200)

Fig. 2 Effect of SSNX on myocardial tissue pathological changes in MIRI rats(HE, ×200)

3.4 对MIRI大鼠心肌细胞线粒超微结构的影响

透射电镜下可观察到,正常组中心肌组织排列整齐,线粒体双层膜结构和嵴结构清晰明显。模型组中心肌组织断裂破碎,线粒体内部嵴结构破坏明显,大量线粒体成空泡样结构。双参宁心胶囊组心肌组织排列较为整齐,少数线粒体结构破坏,线粒体空泡化明显减少。双参宁心胶囊+5-羟基萘酸盐组中部分线粒体中有明显的嵴结构,大量线粒体双侧膜结构破坏,空泡化明显。见图3。

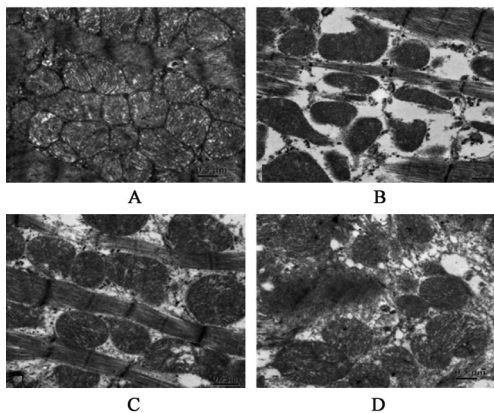


图3 双参宁心胶囊对心肌细胞线粒超微结构的影响(电镜扫描, ×200 000)

Fig. 3 Effect of SSNX on ultrastructure of myocardial cell mitochondria in MIRI rats(SEM, ×200 000)

3.5 对MIRI大鼠心肌细胞线粒体膜电位的影响

与假手术组比较,模型组心肌细胞线粒体膜电位显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,双参宁心胶囊组与双参宁心胶囊+5-羟基萘酸盐组心肌细胞线粒体膜电位显著增高($P < 0.01$);与双参宁心胶囊组比

较,双参宁心胶囊+5-羟基萘酸盐组心肌细胞线粒体膜电位降低明显($P < 0.05$)。见表3。

表3 双参宁心胶囊对MIRI大鼠线粒体膜电位的影响($\bar{x} \pm s, n=14$)

Table 3 Effect of SSNX on mitochondrial membrane potential in MIRI rats($\bar{x} \pm s, n=14$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	红荧光/绿荧光
假手术	-	0.597±0.121
模型	-	0.279±0.634 ¹⁾
双参宁心胶囊	90	0.480±0.412 ²⁾
双参宁心胶囊+5-羟基萘酸盐	90+5	0.409±0.468 ^{2,3)}

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与双参宁心胶囊组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

目前,早期成功的再灌注心肌被认为是治疗急性心肌梗死最有效的办法,然而再灌注过程会对心肌细胞造成额外的损伤^[9]。如何减轻心肌再灌注损伤成为治疗缺血性心脏病的难点。ATP敏感钾通道(K_{ATP})是由4个通道亚基Kir6. x(Kir6. 1, Kir6. 2)与4个磺酰脲受体调节亚基(SUR)组成的异源8聚体^[10]。线粒体膜上K_{ATP}是由Kir6. 1和SUR1组成。Kir6. 1和Kir6. 2是MitoK_{ATP}具有代表性的2个亚基,但目前关于MitoK_{ATP}的聚体分子结构尚不十分清楚^[11]。MitoK_{ATP}是位于线粒体内膜上的内向整流钾通道,其开放与关闭主要受细胞内ATP与ADP浓度变化所调解。MitoK_{ATP}与改善能量代谢、维持线粒体膜电位、抑制凋亡减轻Ca²⁺密切相关,从而保持内环境的稳态^[12-13]。有实验表明,当应用特异性MitoK_{ATP}开放剂如二氮嗪时,缺血心肌受到保护^[14]。且很多药物被证实其对心肌的保护机制与促进MitoK_{ATP}开放相关,如葛根素、硫化氢等,但当其应用特异性MitoK_{ATP}阻滞剂5-HD后,药物的保护作用则被减弱^[15-16]。越来越多的研究发现,MitoK_{ATP}与心律失常、心力衰竭等心血管疾病密切相关,有望成为相关心血管疾病早期干预和治疗的靶点^[17-18]。本研究室前期研究表明,双参宁心胶囊可有效改善大鼠MIRI,保存大鼠缺血心肌ATP且有效抑制心肌细胞Ca²⁺超载^[7,19]。故本次实验聚焦于探索双参宁心胶囊对心肌线粒体的保护机制,开放MitoK_{ATP},从而保护缺血心肌细胞。

心肌细胞在缺血缺氧状态下,心肌细胞膜结构会遭到破坏,通透性升高,从而使细胞内各种酶(如CK-MB, LDH)进入到血液中。CK广泛存在于胞浆中,尤以心肌细胞最多,心肌细胞受损时,心肌细胞

中的心肌酶渗出到血液中。当血清中心肌酶活性越高,心肌损伤则越严重。本实验以血清CK,CK-MB,LDH活性来判断心肌损害程度。一般认为心肌酶水平与MIRI的程度呈正比。本实验检测各组大鼠血清中心肌酶水平,结果显示双参宁心胶囊能有效降低大鼠血清中心肌酶水平。

在实验研究中,心肌梗死面积是评价心肌损伤程度和药物治疗效果的一个重要指标^[20-22]。LAD主要供应左室前壁和室间隔,本实验在结扎原位再次结扎LAD,并由腹主动脉打入依文思蓝染色,染液随血液流动对大鼠心脏进行染色。非蓝染区域则被结扎LAD营养区域即为缺血区域。再经TTC染色,心肌梗死区域则呈现为灰白色或白色。本实验以心肌梗死面积与心肌缺血面积的比值作为判断心肌损伤程度的指标,结果显示4组心肌缺血面积稳定,而双参宁心胶囊组心肌梗死面积率值明显低于模型组。

HE染色是病理学和组织学中最常用的一种染色方法,可以在光镜下观察药物对MIRI大鼠心肌组织病理变化的影响,由结果可以看出,双参宁心胶囊可以有效改善大鼠心肌纤维排列情况,减轻心肌细胞水肿。提示双参宁心胶囊可以减轻MIRI。

中医学认为,心血瘀阻致使心脉失养,不痛则痛。气虚血瘀是胸痹心痛的主要病机之一,其中气虚为本,血瘀为标。双参宁心胶囊中人参大补元气,丹参活血祛瘀,延胡索理气止痛。通过益气活血,理气止痛来达到标本兼治的效果^[23]。中医理论上,气具有气化、温煦、推动、固涩、防御等作用,是维持生命基本活动的微小物质。线粒体是细胞能量产生的重要细胞器,且参与能量代谢、细胞分化等重要过程。笔者推测中医“气”的物质属性是现代医学“线粒体”,西医“线粒体”的功能体现中医“气”的作用,所以线粒体成为中医药治疗的重要靶点^[24]。当MIRI时会导致线粒体膜电位下降、钙稳态失衡、物质代谢异常,损伤线粒体功能。线粒体膜两侧离子的度浓度差构成了膜电位,生理条件下线粒体的能量产生依赖于线粒体膜存储电势能与能量转换的功能,用线粒体膜电位来衡量线粒体的功能已被广泛应用^[25]。近年来国内外研究表明,通过缺血预适应或缺血后适应激活MitoK_{ATP}是保护心肌的重要环节,MitoK_{ATP}的激活可以维持线粒体膜电位,抑制线粒体通透性转换孔(mPTP)的开放,从而减少心肌细胞的坏死和凋亡^[26]。本实验以心肌细胞线粒体膜电位作为衡量心肌细胞线粒

体功能的标准,结果显示双参宁心胶囊可有效保持线粒体膜电位,不使受损线粒体膜电位降低,从而起到保护缺血心肌的作用。MitoK_{ATP}的特异性阻断剂5-羟基癸酸盐,阻断MitoK_{ATP}的开放,使线粒体膜电位降低,抑制缺血损伤中MitoK_{ATP}对心肌的保护作用^[27-28]。双参宁心胶囊+5-羟基癸酸盐组线粒体膜电位低于双参宁心胶囊组提示双参宁心胶囊可能通过开放MitoK_{ATP},提高线粒体膜电位,保持线粒体功能结构完整,从而对缺血心肌起到保护作用。

综上所述,益气活血中药双参宁心胶囊可以明显降低大鼠MIRI血清心肌酶活性、减少心肌梗死面积、改善心肌细胞水肿和炎性浸润、保持心肌细胞线粒膜结构和嵴结构完整,增高心肌细胞线粒体膜电位。MitoK_{ATP}特异性抑制剂5-羟基癸酸盐拮抗了部分双参宁心胶囊的心肌保护作用,提示双参宁心胶囊可能通过开放MitoK_{ATP}提高心肌线粒体膜电位稳定线粒体,减少线粒体损伤导致的心肌细胞损伤。

[参考文献]

- [1] CHEN W W, GAO R L, LIU L S, et al. Outline of the report on cardiovascular diseases in China, 2014 [J]. Eur Heart J Suppl, 2016, 18(Suppl F): F2-F11.
- [2] ANZELL A R, MAIZY R, PRZYKLENK K, et al. Mitochondrial quality control and disease: insights into ischemia-reperfusion injury [J]. Mol Neurobiol 2018, 55(3): 2547-2564.
- [3] MOHUN R, BARRETT K, KYLE J W, et al. Transgenic overexpression of the SUR2A-55 splice variant in mouse heart reduces infarct size and promotes protective mitochondrial function [J]. Heliyon, 2018, 4(7): e00677-e00697.
- [4] FOSTER M N, COETZEE W A. KATP channels in the cardiovascular system [J]. Physiological Rev, 2016, 96(1): 177-252.
- [5] MATEJIKOVA J, KUCHARSKA J, PINTEROVA M, et al. Protection against ischemia-induced ventricular arrhythmias and myocardial dysfunction conferred by preconditioning in the rat heart: involvement of mitochondrial K-ATP channels and reactive oxygen species [J]. Physiol Res, 2009, 58(1): 9-19.
- [6] 韩笑, 刘建勋. 双参通冠方药物血清对缺氧/复氧心肌细胞Ca²⁺-CaM-CaMPKII信号系统的影响 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(7): 876-879.
- [7] 李丹, 韩笑, 刘建勋. 双参宁心方对大鼠心肌缺血损伤模型EPO含量的影响 [J]. 中药药理与临床, 2011,

- 27(4):78-80.
- [8] HYLDE Z, MARIANE A, NOSIRUDEEN Q, et al. Acute administration of n-3 rich triglyceride emulsions provides cardioprotection in murine models after ischemia-reperfusion [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (1) : e0116274.
- [9] BERNINK F J P, TIMMERS L, BEEK A M, et al. Progression in attenuating myocardial reperfusion injury: an overview [J]. *Int J Cardiol*, 2014, 170(3) : 261-269.
- [10] SLOCINSKA M, LUBAWY J, JARMUSZKIEWICZ W, et al. Evidences for an ATP-sensitive potassium channel (KATP) in muscle and fat body mitochondria of insect [J]. *J Insect Physiol*, 2013, 59 (11) : 1125-1132.
- [11] HIBINO H, INANOBE A, FURUTANI K, et al. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles [J]. *Physiol Rev*, 2010, 90(1):291-366.
- [12] HUANG Y M, ZHANG Y, XIN Y, et al. Myocardial mitochondrial metabolism regulated by mitoK₁ (ATP) channel through FOXO1-PGC1 α signal pathway in systolic overload mice [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2010, 26(7):1306-1310.
- [13] LIU X, DUAN P, HU X, et al. Altered KATP channel subunits expression and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats with age [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2016, 68(2) : 143-149.
- [14] HAUSENLOY D. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? [J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 55(3):534-543.
- [15] 李双凤,冉珂,王亚平,等. 硫化氢延迟预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤后细胞的保护作用[J]. *郑州大学学报:医学版*, 2011, 46(4):526-528.
- [16] 高翔,高全,李涛,等. 葛根素预处理保护心肌缺血再灌注损伤的机制[J]. *贵阳医学院学报*, 2007, 32(1) : 37-41.
- [17] MURAVYEVA M, SEDLIC F, DOLAN N, et al. Preconditioning by isoflurane elicits mitochondrial protective mechanisms independent of sarcolemmal KATP channel in mouse cardiomyocytes [J]. *J Cardiovas Pharmacol*, 2013, 61(5) : 369-377.
- [18] ZHOU H Y, ZHANG L N, ZHENG M Z, et al. Improved myocardial function with supplement of levosimendan to celsior solution [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2014, 64(3) : 256-265.
- [19] 于震,刘建勋,李欣志,等. 双参宁心胶囊对血栓性心肌缺血小型猪心室重构和室壁运动的影响[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(2) : 43-47.
- [20] 李雪丽,刘建勋,郭宇洁. 双参宁心方对大鼠心肌缺血/再灌注损伤能量代谢的影响[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(17) : 2874-2877.
- [21] 李玲美,付建华,郭浩,等. 注射用红花黄色素经TLR-NF- κ B炎症通路抗大鼠MIRI的保护作用研究[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(12) : 2566-2571.
- [22] 聂阳,丁立,黄海潮,等. PI3K/Akt-eNOS信号通路在甘木通总黄酮后处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤作用[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(23) : 4692-4697.
- [23] 胡婷,包怡敏. 益气活血法抗心肌缺血再灌注损伤的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(22) : 228-234.
- [24] BAYRAMI G, KARIMI P, AGHA-HOSSEINI F, et al. Effect of ischemic postconditioning on myocardial function and infarct size following reperfusion injury in diabetic rats pretreated with vildagliptin [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2018, 23(2) : 174-183.
- [25] ZHAO Z, CUI W, ZHANG H, et al. Pre-treatment of a single high-dose of atorvastatin provided cardioprotection in different ischaemia/reperfusion models via activating mitochondrial KATP channel [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 751 : 89-98.
- [26] RAVINDRAN S, MURALI J, AMIRTHALINGAM S K, et al. Vascular calcification abrogates the nicorandil mediated cardio-protection in ischemia reperfusion injury of rat heart [J]. *Vascul Pharmacol*, 2017, 89 : 31-38.
- [27] CAO S, LIU Y, SUN W, et al. Genome-wide expression profiling of anoxia/reoxygenation in rat cardiomyocytes uncovers the role of MitoKATP in energy homeostasis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, doi:10.1155/2015/756576.
- [28] SELÇUK YAŞAR , ÖMER BOZDOĞAN , SALIH TUNÇ KAYA, et al. The effects of ATP-dependent potassium channel opener; pinacidil, and blocker; glibenclamide, on the ischemia induced arrhythmia in partial and complete ligation of coronary artery in rats [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2015, 18(2) : 188-193.

[责任编辑 周冰冰]