

# 基于线粒体融合-裂解探讨化痰祛痰方对动脉粥样硬化家兔心肌纤维化的抑制作用

郑曲, 贾连群, 宋囤, 陈宁, 陈丝, 杨关林\*  
(辽宁中医药大学, 沈阳 110032)

**[摘要]** **目的:** 探讨化痰祛痰方通过影响线粒体融合-裂解对动脉粥样硬化家兔心肌纤维化的抑制作用。**方法:** 选取 SPF 级健康雄性家兔 36 只, 随机选取 6 只作为正常组, 给予普通颗粒饲料; 另 30 只采用高脂饲料建立动脉粥样硬化模型。模型复制成功后, 随机分为模型组、化痰祛痰方低、中、高剂量组(4.0, 8.0, 16.0 g·kg<sup>-1</sup>)及辛伐他汀组(1.4 mg·kg<sup>-1</sup>), 各 6 只。各给药组按剂量给予相应药物, 连续给药 4 周。全自动生物化学分析仪检测各组家兔血清血脂水平, 马松(Masson)染色法观察各组家兔心肌纤维化程度, 免疫组化法检测心肌组织线粒体融合蛋白 1(Mitofusin1), 线粒体融合蛋白 2(Mitofusin2), 视神经萎缩蛋白 1(Opa1), 发动蛋白相关蛋白 1(Drp1), 分裂蛋白 1(Fis1)表达水平。**结果:** 与正常组比较, 模型组家兔血清总胆固醇(TC), 甘油三酯(TG), 低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平明显升高, 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平明显降低, 心肌组织 Mitofusin1, Mitofusin2, Opa1 表达水平明显降低, Drp1, Fis1 表达水平明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 与模型组比较, 辛伐他汀组及化痰祛痰方低、中、高剂量组家兔血清 TC, TG, LDL-C 水平明显降低, HDL-C 水平明显升高, 心肌组织 Mitofusin1, Mitofusin2, Opa1 表达水平明显升高, Drp1, Fis1 表达水平明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 与化痰祛痰方高剂量组比较, 辛伐他汀组及化痰祛痰方低、中剂量组血清 TC, TG, LDL-C 水平明显升高, HDL-C 水平明显降低, 心肌组织 Mitofusin1, Mitofusin2, Opa1 表达水平明显降低, Drp1, Fis1 表达水平明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论:** 化痰祛痰方能有效调节血脂, 抑制粥样硬化家兔心肌纤维化, 且化痰祛痰方剂量越高效果越明显, 推测其作用可能与调节心肌细胞线粒体融合-裂解相关蛋白 Mitofusin1, Mitofusin2 及 Opa1, Drp1, Fis1 表达有关。

**[关键词]** 化痰祛痰方; 动脉粥样硬化; 心肌纤维化; 线粒体融合-裂解

**[中图分类号]** R22; R24; R289; R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)03-0071-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.20200340

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191018.1054.002.html>

**[网络出版时间]** 2019-10-18 11:18

## Study on Inhibitory Effect of Huayu Qutan Recipe on Myocardial Fibrosis in Atherosclerotic Rabbits Based on Mitochondrial Fusion-lysis

ZHENG Qu, JIA Lian-qun, SONG Nan, CHEN Ning, CHEN Si, YANG Guan-lin\*  
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analysis the effect of Huayu Qutan recipe on myocardial fibrosis in atherosclerotic rabbits based on mitochondrial fusion-lysis. **Method:** The 36 SPF healthy male rabbits were selected, and 6 rabbits were selected randomly as the normal group, and given normal pellet feed, another 30 rats were fed with high fat diet to establish atherosclerosis model. After successful replication of animal models, they were randomly divided into model group, Huayu Qutan recipe low-dose, medium-dose and high-dose group (4.0, 8.0, 16.0 g·kg<sup>-1</sup>) and simvastatin group (1.4 mg·kg<sup>-1</sup>), 6 rats each. Each group was given corresponding drugs according to the dosage, continuous administration for 4 weeks. The serum lipid levels in rabbits of each group were detected by automatic biochemical analyzer, the degree of myocardial fibrosis was measured by

**[收稿日期]** 20190518(005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81774022);国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2013CB531704)

**[第一作者]** 郑曲, 博士, 主治医师, 从事化痰祛痰方在冠脉粥样硬化中的作用及机制研究, E-mail: 362523993@qq.com

**[通信作者]** \* 杨关林, 博士, 教授, 博士后导师, 从事中医脾脏象理论研究, E-mail: yang\_guanlin@163.com

Masson staining, and expression levels of mitochondrial fusion protein 1 (Mitofusin 1), mitochondrial fusion protein 2 (Mitofusin 2), optic atrophy protein 1 (Opa1), promoter protein 1 (Drp1), mitogen 1 (Fis1) in myocardial tissue were detected by immunohistochemistry. **Result:** Compared with normal group, the levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in model group were significantly increased, levels of density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were significantly decreased, the expression levels of Mitofusin 1, Mitofusin 2 and Opa1 in myocardial tissue were significantly decreased, the expression levels of Drp1 and Fis1 were significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), compared with model group, the levels of serum TC, TG, LDL-C in simvastatin group and Huayu Qutan recipe low-dose, medium and high-dose group were significantly decreased, levels of HDL-C were significantly increased, the expression levels of Mitofusin 1, Mitofusin 2 and Opa1 in myocardial tissue were significantly increased, the expression levels of Drp1 and Fis1 were significantly decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), compared with the Huayu Qutan recipe high-dose group, the levels of serum TC, TG, LDL-C in simvastatin group and Huayu Qutan recipe low, medium-dose group were significantly increased, the expression levels of Mitofusin 1, Mitofusin 2 and Opa1 in myocardial tissue were significantly decreased, the expression levels of Drp1 and Fis1 were significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Huayu Qutan recipe can effectively regulate blood lipid and inhibit myocardial fibrosis in atherosclerotic rabbits, and the higher the dose of Huayu Qutan recipe, the more obvious the effect is, it is speculated that its effect may be related to the regulation of the expression of mitochondrial fusion-lysis related proteins such as Mitofusin1, Mitofusin2 and Opa1, Drp1 and Fis1 in myocardial cells.

**[Key words]** Huayu Qutan recipe; atherosclerosis; myocardial fibrosis; mitochondrial fusion-lysis

动脉粥样硬化是多种心脑血管疾病的病理基础<sup>[1]</sup>,近来研究发现,其不仅能造成血管损伤,还能诱发心肌纤维化等心脏本身的改变<sup>[2]</sup>,导致心功能障碍。心肌纤维化以心肌组织 I/III 型胶原比例升高,胶原纤维数量过量增加等为主要表现,能够引发心力衰竭、心肌梗死、心源性猝死等多种严重心血管疾病,危及患者生命<sup>[3]</sup>。随着人口老龄化进程加速以及生活水平提高,心血管疾病患者也迅速增加,成为公共卫生问题,而抑制动脉粥样硬化、延缓和逆转心肌纤维化在心血管疾病的治疗中有重要意义<sup>[4]</sup>。临床上主要采用调脂、降压、抗炎、血管舒张剂等来进行治疗,治疗效果有限,中医药以其在抗动脉粥样硬化及心肌纤维化方面的独特优势受到广泛关注。有研究认为,中药复方、单味中药、中药提取物等能够通过多靶点、多机制、多途径来影响心肌纤维化过程,控制心血管疾病进展<sup>[5-6]</sup>。化痰祛瘀方是杨关林教授治疗动脉粥样硬化的自拟经验方,本组前期已经对化痰祛瘀方进行了大量的临床及实验研究<sup>[7-10]</sup>,经多种途径证实了其具有明显的抗动脉粥样硬化的作用,但其机制仍尚未完全清楚。本次研究主要以线粒体融合-裂解功能为切入点,探讨化痰祛瘀方对动脉粥样硬化家兔心肌纤维化的抑制作用及相关机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 36 只 SPF 级健康雄性家兔,体质量

2.0 ~ 2.5 kg,购自济南金丰实验动物有限公司,合格证号 SCXK(鲁)2014-0006,饲养于辽宁中医药大学实验动物中心。家兔单笼进行适应性饲养,时间为 1 周,饲养室内温度 17 ~ 25 °C,相对湿度 60% ~ 75%,定时通风换气,噪音 < 60 db,昼夜节律为 12 h,家兔自由摄食和饮水,定期更换垫料、消毒。实验通过辽宁中医药大学实验动物伦理委员会审查合格,编号为 20160704。

**1.2 药物** 化痰祛瘀方组成:黄芪、党参、绞股蓝、茯苓、石菖蒲、法半夏、川芎、丹参、郁金,药物购自辽宁中医药大学第一附属医院药房,使用时加水浸泡 30 min,煎煮 2 次,之后浓缩为生药质量浓度为 0.8, 1.6, 3.2 g·mL<sup>-1</sup>的化痰祛瘀方药液,置于 -20 °C 冰箱保存备用;辛伐他汀片(杭州默沙东制药有限公司,国药准字 H19990366,批号 20180321),使用时研碎成粉,采用生理盐水配制成质量浓度为 0.28 g·L<sup>-1</sup>辛伐他汀混悬液,现用现配。

**1.3 试剂** 兔高脂饲料(1.5% 胆固醇,1% 胆盐,3% 猪油,3% 花生油,5% 蛋黄粉,加 86.5% 普通饲料,江苏美迪森生物医药有限公司,批号 12017)。家兔总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒(焦作路非凡生物科技有限公司,批号分别为 LFF11072058, LFF-LC-1072, LFF-LC-1076, LFF-LC-

274);马松(Masson)染色试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司,批号HR8326-HQP);兔抗线粒体融合蛋白1(Mitofusin1)抗体,线粒体融合蛋白2(Mitofusin2)抗体(深圳子科生物科技有限公司,批号分别为zkp0365,BIV-3882-100);兔抗视神经萎缩蛋白1(Opa1)抗体,发动蛋白相关蛋白1(Drp1)抗体,分裂蛋白1(Fis1)抗体(武汉菲恩生物科技有限公司,批号分别为FNab05995, FNab02541, FNab03132);磷酸盐缓冲液(PBS,南京赛泓瑞生物科技有限公司,批号P6503);过氧化物酶(SABC)免疫组化染色试剂盒(上海彩佑实业有限公司,批号1002-2)。

**1.4 仪器** HP Sonos-5500 型超声诊断仪(美国 Hewlett Packard 公司);TBA-120FR 型全自动生化分析仪(日本东芝公司);UNIVERSAL 320R 型通用型离心机(德国 Hettich 公司);DM500 型光学显微镜(德国 Leica 公司)。

## 2 方法

**2.1 造模与给药** 适应性饲养结束后,将所有家兔编号,采用随机数字表法分为空白组 6 只及造模组 30 只。造模组家兔给予高脂饲料  $120 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ ,空白组家兔给予普通颗粒兔饲料  $120 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ ;8 周后,将所有家兔采用 3% 戊巴比妥钠溶液  $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  耳缘静脉注射以进行麻醉,采用 HP Sonos-5500 型超声诊断仪观察主动脉,若有动脉粥样硬化斑块形成即为动脉粥样硬化模型建立成功<sup>[11]</sup>。

将造模成功家兔随机分为模型组、辛伐他汀组及化痰祛痰方低、中、高剂量组,各 6 只,模型组及空白组分别灌胃给予生理盐水  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,辛伐他汀组灌胃给予  $0.28 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  辛伐他汀混悬液  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,即  $1.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  化痰祛痰方低、中、高剂量组参照文献[9]分别灌胃给予化痰祛痰方 4.0, 8.0,  $16.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,各组家兔均连续治疗 8 周。

**2.2 标本采集与处理** 末次给药后,所有家兔禁食 12 h,采集耳中央静脉血液 3 mL,室温静置 60 min 使之凝固,以  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  速度离心 10 min,分离得到的血清保存于  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱内;采用 20% 乌拉坦  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  腹腔注射以处死家兔,完整摘取心脏,采用预冷的 PBS 冲洗干净,取左心室心肌组织,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下采用 4% 甲醛固定 24 h,在自动脱水机内用梯度浓度乙醇脱水,之后采用二甲苯透明,常规石蜡包埋,  $3 \mu\text{m}$  厚度连续切片,  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  烤片 1 h 后  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 2.3 指标检测

**2.3.1 酶法检测血脂水平** 取出 2.2 项中制备的

血清,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  缓慢融化,按照试剂盒说明书中的步骤,采用 TBA-120FR 型全自动生化分析仪,通过酶法测定血清 TC, TG, LDL-C, HDL-C 水平。

**2.3.2 Masson 染色检测家兔心肌纤维化程度** 将取 2.2 项中制备的心肌组织切片取出,恢复至室温,常规经二甲苯溶液脱蜡、梯度浓度乙醇脱水后,采用蒸馏水冲洗;之后严格根据 Masson 染色试剂盒说明书中的步骤进行操作,依次采用苏木素溶液、丽春红酸性品红液、苯胺蓝溶液进行染色,之后常规经梯度浓度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片后进行观察。在光学显微镜下观察 Masson 染色结果,400 倍镜下,每张切片随机选取 5 个不重复的视野,采用 Image-Pro Plus Version 6.0 图像分析软件测量胶原面积和总视野面积,并根据公式:胶原容积分数(CVF) = 胶原面积/总视野面积  $\times 100\%$ ,计算 CVF,取平均值。

**2.3.3 免疫组化检测家兔心肌组织 Mitofusin1, Mitofusin2, Opa1, Drp1 及 Fis1 蛋白表达水平** 将取 2.2 项中制备的心肌组织切片取出,常规脱蜡、至水;依次采用枸橼酸盐缓冲工作液,  $98 \text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温水浴修复抗原,3% 过氧化氢溶液灭活内源性过氧化物酶, Mitofusin1 (1:300), Mitofusin2 (1:300), Opa1 (1:500), Drp1 (1:500) 及 Fis1 (1:500) 一抗工作液孵育切片;然后,按照 SABC 免疫组化染色试剂盒说明书操作,室温条件下依次采用生物素化二抗 (1:1000),生物素化二抗、亲和素与生物素化辣根过氧化物酶混合液孵育切片,经显色液显色后,苏木素溶液染核,常规脱水、透明、中性树胶封片。在光学显微镜下观察染色结果,阳性细胞的细胞内存在不同程度的棕黄色颗粒。400 倍镜下,每张切片随机选取 5 个不重复的视野,采用 Image-Pro Plus Version 6.0 图像分析软件分别测量 Mitofusin1, Mitofusin2, Opa1, Drp1 及 Fis1 积分吸光度 IA。

**2.4 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 软件分析数据,符合正态性的计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析;组间多重比较采用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对动脉粥样硬化家兔血清中血脂水平的影响** 与空白组比较,模型组家兔血清 TC, TG, LDL-C 水平显著升高, HDL-C 水平显著降低 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,化痰祛痰方低、中、高剂量组及辛伐他汀组家兔血清 TC, TG, LDL-C 水平显著降低, HDL-C 水平显著升高 ( $P < 0.01$ );与化痰祛痰方高剂量组

比较,化痰祛痰方低、中剂量组家兔血清 TC, TG, LDL-C 水平较高, HDL-C 水平较低, 辛伐他汀组家

兔血清 TC, LDL-C 水平较高, TG, HDL-C 水平较低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 化痰祛痰方对家兔血清中血脂水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TC	TG	LDL-C	HDL-C
空白	-	6.34 ± 0.91	1.48 ± 0.43	6.11 ± 0.66	9.87 ± 1.85
模型	-	67.87 ± 3.50 <sup>2)</sup>	10.18 ± 1.07 <sup>2)</sup>	42.19 ± 3.39 <sup>2)</sup>	1.41 ± 0.62 <sup>2)</sup>
化痰祛痰方	16	22.22 ± 2.61 <sup>4)</sup>	2.60 ± 0.67 <sup>4)</sup>	20.13 ± 1.07 <sup>4)</sup>	8.69 ± 2.20 <sup>4)</sup>
	8	30.54 ± 2.96 <sup>4,6)</sup>	4.36 ± 0.98 <sup>4,5)</sup>	32.56 ± 5.64 <sup>4,6)</sup>	6.06 ± 0.87 <sup>4,5)</sup>
	4	32.32 ± 2.67 <sup>4,6)</sup>	5.48 ± 1.07 <sup>4,6)</sup>	26.84 ± 2.54 <sup>4,6)</sup>	4.70 ± 0.76 <sup>4,6)</sup>
辛伐他汀	0.001 4	34.13 ± 6.26 <sup>4,6)</sup>	1.51 ± 0.10 <sup>4,6)</sup>	37.24 ± 2.45 <sup>4,6)</sup>	4.86 ± 1.23 <sup>4,6)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ;与化痰祛痰方高剂量组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>6)</sup>  $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

### 3.2 对动脉粥样硬化家兔心肌纤维化程度的影响

Masson 染色结果显示,心肌细胞被染成红色,胶原纤维被染成蓝色。空白组胶原沉积极少;模型组心肌间质存在明显的胶原纤维沉积,且呈现条状或网状,排列紊乱;化痰祛痰方低、中、高剂量组及辛伐他汀组心肌细胞间胶原沉积情况较模型组有不同程度改善,其中化痰祛痰方高剂量组改善最为明显,见图 1。与空白组比较,模型组家兔心肌组织 CVF 显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,化痰祛痰方低、中、高剂量组及辛伐他汀组家兔心肌组织 CVF 显著降低 ( $P < 0.01$ )。与化痰祛痰方高剂量组比较,化痰祛痰方低、中剂量组及辛伐他汀组家兔心肌组织 CVF 显著升高 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

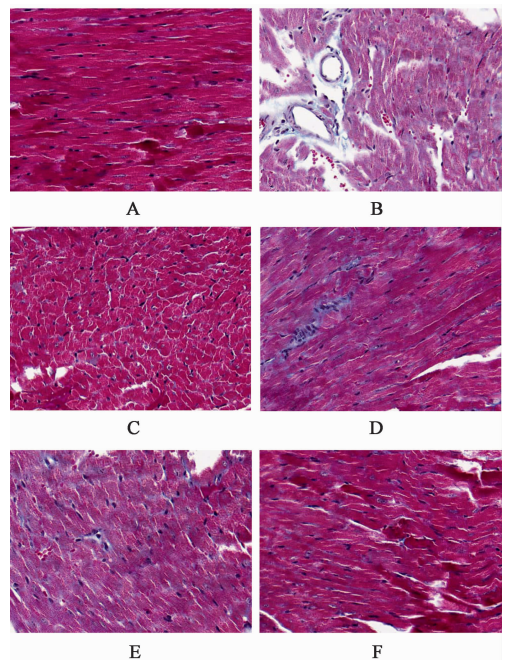
表 2 化痰祛痰方对家兔心肌纤维化程度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of Huayu Qutan recipe on myocardial fibrosis in rabbits ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	CVF/%
空白	-	3.92 ± 0.33
模型	-	8.74 ± 1.05 <sup>2)</sup>
化痰祛痰方	16	4.71 ± 0.46
	8	5.53 ± 0.52 <sup>4,6)</sup>
	4	6.42 ± 0.61 <sup>4,6)</sup>
辛伐他汀	0.001 4	7.17 ± 0.84 <sup>4,6)</sup>

### 3.3 对动脉粥样硬化家兔心肌组织 Mitofusin1, Mitofusin2 及 Opa1 蛋白表达水平的影响

与空白组比较,模型组家兔心肌组织 Mitofusin1, Mitofusin2 及 Opa1 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,化痰祛痰方低、中、高剂量组及辛伐他汀组家兔心肌组织 Mitofusin1, Mitofusin2 及 Opa1 蛋白表达水平较高 ( $P < 0.01$ );与化痰祛痰方高剂量组比较,化痰祛痰方低、中剂量组及辛伐他汀组家兔心肌组



A. 正常组; B. 模型组; C. 化痰祛痰方高剂量组; D. 化痰祛痰方中剂量组; E. 化痰祛痰方低剂量组; F. 辛伐他汀组 (图 2~6 同)

图 1 化痰祛痰方对家兔心肌纤维化程度的影响 (Masson,  $\times 400$ )

Fig. 1 Effect of Huayu Qutan recipe on myocardial fibrosis in rabbits (Masson,  $\times 400$ )

织心肌组织 Mitofusin1, Mitofusin2 及 Opa1 蛋白表达水平较低 ( $P < 0.01$ )。见图 2~4, 表 3。

### 3.4 对动脉粥样硬化家兔心肌组织 Drp1, Fis1 表达水平的影响

与空白组比较,模型组家兔心肌组织 Drp1, Fis1 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,化痰祛痰方低、中、高剂量组及辛伐他汀组家兔心肌组织 Drp1, Fis1 表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ );与化痰祛痰方高剂量组比较,化痰祛痰方低、中剂量组及辛伐他汀组家兔心肌组织 Drp1, Fis1 表达水平较高 ( $P < 0.01$ )。见图 5, 6, 表 4。

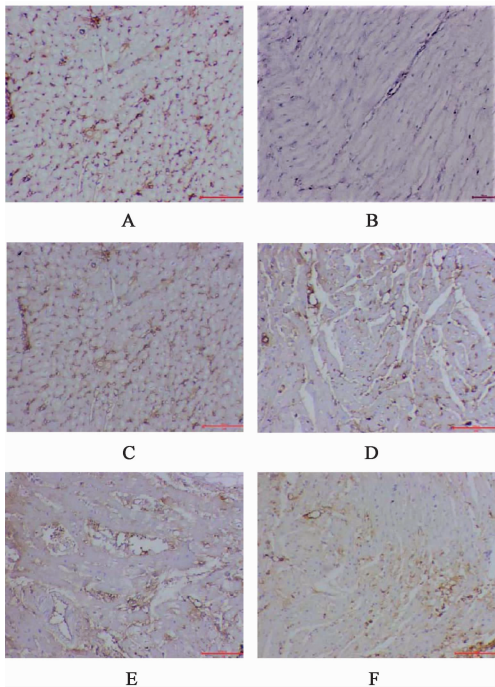


图 2 化痰祛痰方对家兔心肌组织 Mitofusin1 蛋白表达水平的影响 (免疫组化, ×400)

Fig.2 Effect of Huayu Qutan recipe on Mitofusin1 expression in myocardium of rabbits (IHC, ×400)

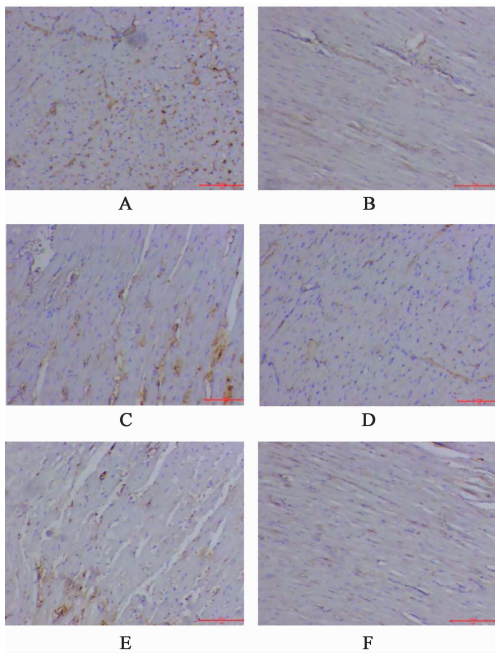


图 3 化痰祛痰方对家兔心肌组织 Mitofusin2 蛋白表达水平的影响 (免疫组化, ×400)

Fig.3 Effect of Huayu Qutan recipe on Mitofusin2 expression in myocardium of rabbits (IHC, ×400)

#### 4 讨论

动脉粥样硬化及其相关的心肌纤维化是心血管疾病防治的主要方向和潜在途径<sup>[12]</sup>。动脉粥样

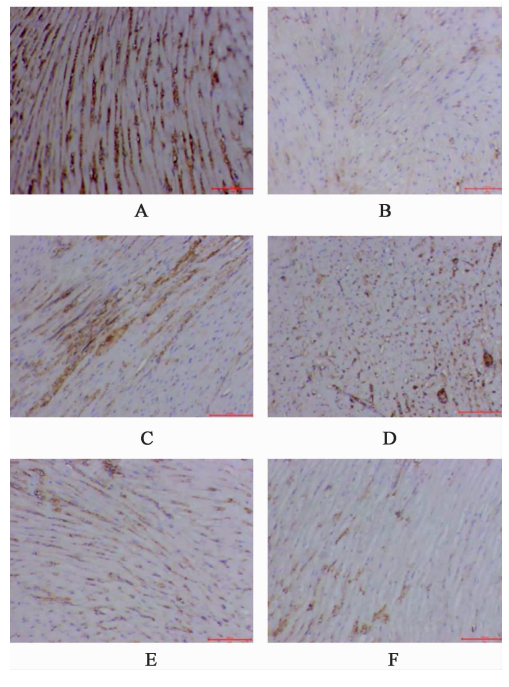


图 4 化痰祛痰方对家兔心肌组织 Opa1 蛋白表达水平的影响 (免疫组化, ×400)

Fig.4 Effect of Huayu Qutan recipe on Opa1 expressions in myocardium of rabbits (IHC, ×400)

表 3 化痰祛痰方对家兔心肌组织 Mitofusin1, Mitofusin2 及 Opa1 蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effect of Huayu Qutan recipe on Mitofusin 1, Mitofusin2 and Opa1 expression in myocardium of rabbits ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	Mitofusin1	Mitofusin2	Opa1
空白	-	0.64 ± 0.08	0.59 ± 0.07	0.73 ± 0.09
模型	-	0.12 ± 0.01 <sup>2)</sup>	0.14 ± 0.02 <sup>2)</sup>	0.11 ± 0.02 <sup>2)</sup>
化痰祛痰方 16		0.57 ± 0.07 <sup>4)</sup>	0.51 ± 0.06 <sup>4)</sup>	0.64 ± 0.08 <sup>4)</sup>
8		0.52 ± 0.05 <sup>4,6)</sup>	0.45 ± 0.06 <sup>4,6)</sup>	0.61 ± 0.07 <sup>4,6)</sup>
4		0.44 ± 0.06 <sup>4,6)</sup>	0.38 ± 0.05 <sup>4,6)</sup>	0.53 ± 0.05 <sup>4,6)</sup>
辛伐他汀	0.001 4	0.22 ± 0.03 <sup>4,6)</sup>	0.20 ± 0.02 <sup>4,6)</sup>	0.27 ± 0.04 <sup>4,6)</sup>

硬化的发病机制涉及到脂质浸润、血流动力学改变、炎症和免疫反应、氧化应激反应等多种方面,但尚无定论<sup>[13]</sup>。新近研究发现,线粒体损伤在动脉粥样硬化发生发展中起到重要作用,而同时线粒体融合、分裂相关的功能障碍与心肌损伤、纤维化等关系密切<sup>[14-16]</sup>。因此改善受损线粒体功能将成为动脉粥样硬化及心血管疾病治疗的新靶点。中医认为,动脉粥样硬化属于“胸痹”“痰证”等范畴,多由脾气亏虚,脏腑功能失调,气、血、津液运行障碍,痰瘀内生,痹阻血脉所致,治疗上应以活血化瘀、益气祛痰为主<sup>[17]</sup>。

化痰祛痰方在临床上主要用于痰浊血瘀型动脉粥样硬化患者的治疗,方中黄芪补气固表,党参补中

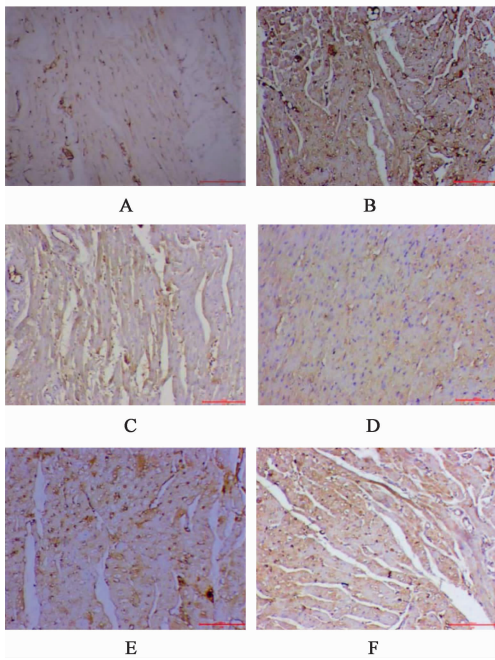


图 5 化痰祛痰方对家兔心肌组织 Drp1 蛋白表达水平的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 5 Effect of Huayu Qutan recipe on Drp1 expression in myocardium of rabbits (IHC, ×400)

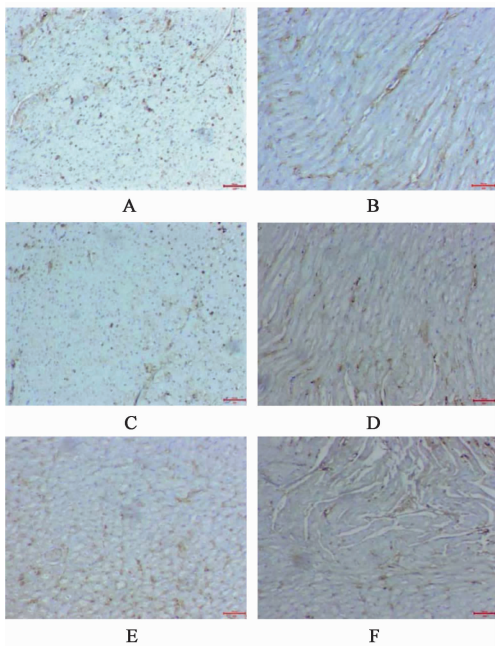


图 6 化痰祛痰方对家兔心肌组织 Fis1 蛋白表达水平的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 6 Effect of Huayu Qutan recipe on Fis1 expression in myocardium of rabbits (IHC, ×400)

益气、健脾益肺, 绞股蓝益气健脾、化痰, 三者共为君药, 功在益气健脾; 臣以茯苓健脾利水渗湿, 石菖蒲化湿豁痰, 法半夏燥湿化痰, 以助君药健旺脾气, 并祛除痰邪; 川芎、丹参、郁金活血祛瘀, 可助血行,

表 4 化痰祛痰方对家兔心肌组织 Drp1, Fis1 蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Effect of Huayu Qutan recipe on Drp1, Fis1 expression in myocardium of rabbits ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Drp1	Fis1
空白	-	0.15 ± 0.02	0.17 ± 0.03
模型	-	0.79 ± 0.08 <sup>2)</sup>	0.73 ± 0.07 <sup>2)</sup>
化痰祛痰方	16	0.34 ± 0.04 <sup>4)</sup>	0.25 ± 0.03 <sup>4)</sup>
	8	0.57 ± 0.06 <sup>4,6)</sup>	0.54 ± 0.07 <sup>4,6)</sup>
	4	0.71 ± 0.07 <sup>4,6)</sup>	0.64 ± 0.08 <sup>4,6)</sup>
辛伐他汀	0.001 4	0.62 ± 0.08 <sup>4,6)</sup>	0.33 ± 0.04 <sup>4,6)</sup>

全方配伍精当, 标本兼治, 切中了该病脾气亏虚、痰瘀阻脉的病机<sup>[18-19]</sup>。

关于化痰祛痰方抑制动脉粥样硬化心肌纤维化的作用机制, 笔者从对线粒体融合-裂解的影响方面进行了探讨。线粒体属于细胞的“能量工厂”, 生理情况下通过融合与裂解的动态平衡来维持线粒体正常的形态和功能, 线粒体融合能够增强线粒体与内质网的关联性, 有助于维持线粒体结果稳定, 而线粒体裂解能加速细胞增殖、活性氧簇产生和自噬<sup>[20]</sup>。有研究发现, 线粒体融合-裂解失衡一般以线粒体融合减少而裂解增多为主要表现, 与血管内皮细胞损伤有关, 并可进一步参与动脉粥样硬化发展<sup>[21]</sup>。Mitofusin1, Mitofusin2 为线粒体外膜蛋白, Opa1 为线粒体内膜蛋白, 他们分别促进线粒体外膜、内膜的融合; Drp1, Fis1 则具有调控线粒体分裂的作用<sup>[22]</sup>。血管内皮细胞损伤是动脉粥样硬化发生的关键, 抑制 Drp1, Fis1 等表达有助于抑制线粒体分裂至结构破碎、减少 ROS 产生, 保护血管内皮细胞, 这提示调节线粒体融合-裂解失衡是治疗血管内皮功能障碍相关动脉粥样硬化的新思路。而上调 Mitofusin1, Mitofusin2 及 Opa1 有助于促进线粒体融合, 改善线粒体功能, 起到保护作用<sup>[23-25]</sup>。

本次研究中, 笔者采用高脂饲料喂养家兔造模, 使得家兔血脂水平升高, 心肌间质存在明显的胶原纤维沉积, 且呈现条状或网状, 排列紊乱, 心肌组织 CVF 明显升高, 成功建立了动脉粥样硬化伴心肌纤维化模型; 采用相应药物治疗后, 与模型组比较, 各给药组血脂水平均得到明显改善, Masson 染色结果也显示心肌纤维化得到不同程度的缓解, 其中化痰祛痰方高剂量组效果最为明显, 表明高剂量的化痰祛痰方能有效调节血脂, 消除 LDL-C 等独立危险因素对于动脉粥样硬化的影响, 并且可以明显延缓心肌纤维化, 防治心血管疾病进展。研究结果还显示, 与模型组比较, 各给药组家兔心肌组织 Mitofusin1,

Mitofusin2, Opa1 表达水平较高, Drp1, Fis1 表达水平较低, 且化痰祛痰方高剂量组变化最为明显, 表明化痰祛痰方能明显上调心肌组织 Mitofusin1, Mitofusin2, Opa1 表达, 促进线粒体融合, 下调 Drp1, Fis1 表达, 抑制线粒体裂解, 改善线粒体融合-裂解失衡, 这可能是化痰祛痰方抑制减轻动脉粥样硬化、延缓心肌纤维化的作用机制之一。

综上所述, 化痰祛痰方能有效调节血脂, 抑制粥样硬化家兔心肌纤维化, 且化痰祛痰方剂量越高效果越明显, 其作用可能与调节心肌细胞线粒体融合-裂解相关蛋白 Mitofusin1, Mitofusin2 及 Opa1, Drp1, Fis1 表达有关, 但具体的作用机制还需进一步研究明确。

#### [参考文献]

[1] Jonsson A L, Bäckhed F. Role of gut microbiota in atherosclerosis[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2017, 14(2): 79.

[2] 底彬, 鹿育萨, 张国江. 兔动脉粥样硬化对心脏胶原的影响及培哌普利干预[J]. *实用医技杂志*, 2016, 23(11): 1164-1166, 1265.

[3] Worke L J, Barthold J E, Seelbinder B, et al. Densification of type I collagen matrices as a model for cardiac fibrosis [J]. *Adv Healthc Mater*, 2017, 6(22): 1700114.

[4] Papademetriou V, Katsiki N, Doumas M, et al. Halting arterial aging in patients with cardiovascular disease: hypolipidemic and antihypertensive therapy [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(40): 6339-6349.

[5] 蔡倩玮, 于远望. 中医药防治心肌纤维化的实验研究进展[J]. *中医药导报*, 2017, 23(1): 76-79.

[6] 陈凯, 刘馨, 管怡晴, 等. 基于网络药理学构建新型中药复方降压抗纤方抗高血压心肌纤维化的作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(20): 115-122.

[7] 孙艳梅, 贾连群, 张妮, 等. 化痰祛痰方调控 AMPK 介导自噬对高脂血症大鼠肝脏脂质损伤的影响[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2017, 20(3): 312-316.

[8] 陈丝, 贾连群, 宋囡, 等. 化痰祛痰方调控线粒体自噬相关蛋白减少动脉粥样硬化家兔肝脏脂质沉积的研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2018, 41(4): 310-315.

[9] 陈宁, 宋囡, 贾连群, 等. 化痰祛痰方对 AS 家兔肝脏线粒体呼吸链酶复合物的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(7): 171-176.

[10] 贾连群, 杨关林, 任路, 等. 化痰祛痰方药及其拆方对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 EA.hy926 细胞凋亡的影响及机制研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2012, 23(1): 5-10.

[11] 于洁, 高传玉, 许文克, 等. 超声检查和血管造影对兔动脉粥样硬化狭窄模型的评价[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(40): 51-53, 193.

[12] HU D Y. New guidelines and evidence for prevention and treatment of dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease in China [J]. *CDTM*, 2016, 44

(10): 826.

[13] Bale B F, Doneen A L, Vigerust D J. High-risk periodontal pathogens contribute to the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Postgrad Med J*, 2017, 93(1098): 215-220.

[14] Wiehe R S, Gole B, Chatre L, et al. Endonuclease G promotes mitochondrial genome cleavage and replication [J]. *PLoS One*, 2018, 9(26): 18309-18326.

[15] O'Reilly J, Pangilinan F, Hokamp K, et al. The impact of common genetic variants in the mitochondrial glycine cleavage system on relevant metabolites [J]. *Mol Genet Metab*, 2018, 16: 20-22.

[16] YANG F, WU R, JIANG Z, et al. Leptin increases mitochondrial OPA1 via GSK3-mediated OMA1 ubiquitination to enhance therapeutic effects of mesenchymal stem cell transplantation [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5): 556.

[17] 具星, 贾连群, 张哲, 等. 益气健脾化痰祛痰方对脾虚痰浊动脉粥样硬化巴马小型猪心脏线粒体蛋白质组的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(8): 3659-3662.

[18] 冷雪, 李阳, 宋囡, 等. 化痰祛痰方对 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠主动脉 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(4): 116-121.

[19] 王英, 贾连群, 宋囡, 等. 健脾祛痰化痰方药对脾虚痰浊动脉粥样硬化巴马猪肝脏线粒体能量代谢基因表达的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2017, 44(11): 2427-2429.

[20] Cali T, Ottolini D, Negro A, et al. A-Synuclein controls mitochondrial calcium homeostasis by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria interactions [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(22): 17914.

[21] PENG K, TAO Y, ZHANG J, et al. Resveratrol regulates mitochondrial biogenesis and fission/fusion to attenuate rotenone-induced neurotoxicity [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, article a259: 1-12.

[22] Kim H, Scimia M C, Wilkinson D, et al. Fine-tuning of Drp1/Fis1 availability by AKAP121/Siah2 regulates mitochondrial adaptation to hypoxia [J]. *Mol Cell*, 2011, 44(4): 532-544.

[23] Chandhok G, Lazarou M, Neumann B. Structure, function, and regulation of mitofusin-2 in health and disease [J]. *Biol Rev*, 2017, 93(2): 933-949.

[24] Son J M, Sarsour E H, Kakkerla B A, et al. Mitofusin 1 and optic atrophy 1 shift metabolism to mitochondrial respiration during aging [J]. *Aging Cell*, 2017, 16(5): 1136-1145.

[25] LIU Q, KANG L, WANG L, et al. Mitofusin 2 regulates the oocytes development and quality by modulating meiosis and mitochondrial function [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 30561.

[责任编辑 孙丛丛]