

养心通脉方对大鼠心肌缺血损伤模型 心肌细胞线粒体功能的影响

黄正新¹,黄献平²,袁肇凯²

(1.海南省农垦三亚医院,海南 三亚 572000;2.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

〔摘要〕 **目的** 研究养心通脉方对异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌缺血损伤模型心肌细胞线粒体呼吸功能的影响。**方法** 实验大鼠被随机分为3组(每组15只):对照组、模型组、养心通脉方组,实验结束后所有动物采用脱颈椎法处死,通过测定呼吸控制率(RCR)、二磷酸腺苷/氧(ADP/O)比值及ATP的浓度来评价线粒体的呼吸功能,并对线粒体内胆固醇、磷脂(PL)、甘油三酯(TG)和游离脂肪酸(FFAs)的含量进行测定。**结果** 模型组中大鼠心肌细胞线粒体内RCR、ADP/O比值及ATP浓度均明显低于对照组($P<0.001$),而在养心通脉方组中心肌细胞线粒体内RCR、ADP/O比值及ATP浓度均接近于对照组($P>0.05$)。与对照组相比,模型组中胆固醇、TG和FFAs的水平均明显升高($P<0.001$),同时磷脂(PL)水平明显降低($P<0.001$)。但在养心通脉方组中心肌细胞线粒体内胆固醇、TG、FFAs以及PL的水平均与对照组无明显差异($P>0.05$)。**结论** 养心通脉方对异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌缺血损伤模型心肌细胞线粒体的呼吸功能及其膜完整性具有保护作用。

〔关键词〕 养心通脉方,心肌缺血,心肌细胞,线粒体功能;呼吸控制率;二磷酸腺苷/氧比值

〔中图分类号〕R285.5;R541.4 **〔文献标识码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.07.005

Effect of Yangxin Tongmai Formula on Mitochondrial Function of Cardiomyocyte in Myocardial Ischemia Injury Rat Models

HUANG Zhengxin¹, HUANG Xianping², YUAN Zhaokai²

(1.Hainan Province Nongken Sanya Hospital, Sanya, Hainan 527000, China;2. Hunan University of
Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 Objective To evaluate the effect of Yangxin Tongmai Fang on mitochondrial respiration of cardiomyocyte in the isoproterenol-induced myocardial ischemia injury rats model. **Methods** The experimental rats were divided into three groups: control group, model group, Yangxin Tongmai Fang group, 15 rats in each group. After the experimental period, the animals were sacrificed by cervical decapitation. The mitochondrial respiration of cardiomyocyte was evaluated by the levels of respiratory control ratio (RCR), ADP/O ratio and ATP concentration. The mitochondrial cholesterol, phospholipids (PL), triacylglycerol(TG) and free fatty acids (FFAs) were also determined. **Results** The levels of RCR, ADP/O ratio and ATP concentration in model group were lower than that in control group ($P<0.001$), the RCR, ADP/O ratio and ATP concentration in Yangxin Tongmai group were close to the control group ($P>0.05$). Compared with the control group, the levels of cholesterol, TG and FFAs in model group were significantly increased ($P<0.001$), and the PL content was decreased obviously ($P<0.001$). But there were no significant difference in the levels of cholesterol, TG, FFAs and PL between Yangxin Tongmai Fang group and control Group ($P>0.05$). **Conclusion** Yangxin Tongmai Fang shows protective effect on mitochondrial respiration and its membrane integrity of cardiomyocyte in the isoproterenol-induced myocardial injury rat models.

〔Keywords〕 Yangxin Tongmai Fang; myocardial ischemia; cardiomyocyte; mitochondrial function; respiratory control rate; ADP/O ratio

〔收稿日期〕2016-01-19

〔基金项目〕国家自然科学基金项目(81273670);湖南省教育科学“十二五”规划课题资助(XJK011BGD011);中医诊断学国家重点学科开放项目(2013ZYZD16)。

〔作者简介〕黄正新,男,主治医师,医学博士,主要研究方向为心血管疾病的中西医结合防治。

养心通脉方是我国著名中医学大家秦伯未先生用于治疗冠心病“胸痹心痛”的经典名方,其组方原理为“扶养心气,和通血脉”^[1],采用生地黄、人参、丹参、桂枝等药物配伍而成,具有益气养阴、通脉止痛之功效,多年来在治疗冠心病心绞痛的临床应用疗效确切,目前已制成养心通脉有效部位方,其主要成分包括人参皂苷、丹参酮ⅡA、总生物碱、人参多糖等,大量的实验研究表明:研究表明,该方具有良好的抗动脉粥样硬化、抗心肌缺血、抗缺血再灌注损伤、改善血液流变学等作用^[2-3],进一步研究发现养心通脉方还能够改善急性心肌缺血损伤模型的冠脉微循环,使缺血心肌组织中的一氧化氮(NO)水平升高,丙二醛(MDA)水平下降,Na⁺-K⁺-ATP酶及Ca²⁺-ATP酶活性增高^[4-5],从而显示出具有一定的心肌保护作用,但其具体作用机制尚未阐明。

本文通过研究养心通脉方对心肌细胞线粒体呼吸和氧化磷酸化的影响,从而阐明养心通脉方对异丙肾上腺素诱导的急性心肌缺血损伤模型中心肌细胞线粒体的呼吸功能及其膜完整性是否具有保护作用,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本试验中使用的是 SPF 级成年雄性 Wistar 大鼠,购自南方医科大学动物实验中心,体质量 120~140 g,采用动物专用食物喂养,以防止其他食物对试验可能造成的影响。

1.2 药物及试剂

养心通脉方水煎液由人参、丹参、桂枝等 5 味中药组成,在湖南中医药大学中药制剂教研室指导下制成 2 g/mL 备用。异丙肾上腺素针剂(2 mg/支)为西格玛化学公司生产(美国),A095 型 ATP 含量测定试剂盒(上海妙研生物科技有限公司),总胆固醇测定试剂盒(上海聚创生物科技有限公司),磷脂检测试剂盒(德国 Sigma Aldrich 公司),甘油三酯测定试剂盒和游离脂肪酸测定试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司),其他常用试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 仪器设备

漩涡混匀器(北京优晟联合科技有限公司),LXJ-11 型离心机(上海医用分析仪器厂),Oxygraph 氧电极(英国 Hansatech 公司),YJ-875 型超净工作台(苏州净化设备厂),CS501-3C 型恒温器(重庆万达仪器有限公司),UNICO 尤尼柯紫外分光光度计 UV-2600(上海乔枫实业有限公司)。

1.4 实验方案

实验大鼠被随机分为 3 组(每组 15 只):对照组,模型组,养心通脉方组。处理方法为:对照组大

鼠不给予任何药物,模型组大鼠腹腔内注射给予异丙肾上腺素 2 d,剂量为 150 mg/(kg·d),养心通脉方组大鼠在给予异丙肾上腺素剂量为 150 mg/(kg·d)之前一天开始给予养心通脉方水煎液 0.4 mL/(g·d)鼻饲,并在随后 2 d 与异丙肾上腺素一起继续使用。

实验结束后所有动物采用脱颈椎法处死,剥离心脏后使用冰盐水漂洗,过滤纸吸干,然后在 4 ℃、0.25 mmol/L 的蔗糖溶液中使心肌组织均匀化,然后采用 Johnson 和 Lardy 介绍的方法^[6]提取心肌细胞的线粒体,线粒体内的蛋白质含量采用 Lowry 介绍的方法^[7]进行测定。并参照 Katyare 等的方法^[8]采用 Clark 氧电极法测定线粒体呼吸控制率(respiratory control ratio, RCR)、二磷酸腺苷磷/氧(ADP/O)比值,线粒体内 ATP 的浓度采用 Williamson 和 Corkey 介绍的方法^[9]进行测定,在使用 Folch 等的方法^[10]提取总的脂质后再分别测定心肌细胞线粒体内的胆固醇、磷脂(PL)和甘油三酯(TG)和游离脂肪酸的含量(FFAs)。

1.5 统计学分析

所有数据资料均采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,然后采用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析,方差齐性时,如有差异再采用 LSD 法进一步进行组间检验,如果方差不齐,则使用 Welch 统计分析, $P < 0.05$ 被认为有统计学差异。

2 结果

2.1 各组心肌细胞线粒体的 RCR、ADP/O 比值和 ATP 含量比较

在异丙肾上腺素所诱导的急性心肌缺血损伤模型组中,心肌细胞线粒体内 RCR、ADP/O 比值和 ATP 浓度均明显低于对照组($P < 0.001$),而在养心通脉方组中可以看到心肌细胞线粒体内 RCR、ADP/O 比值和 ATP 浓度均接近于正常水平($P > 0.05$,与对照组比较),见表 1。

表 1 各组大鼠心肌细胞线粒体的 RCR、ADP/O 比值和

分组	ATP 含量比较		
	RCR	ADP/O 比值	ATP(nmol/mL)
对照组	4.06±0.07	1.68±0.18	4.43±0.26
模型组	3.49±0.24*	1.26±0.13*	3.04±0.28*
养心通脉方组	4.10±0.17 ^{##}	1.62±0.23 ^{##}	4.44±0.32 ^{##}
F	6.979	6.149	9.182

注:与对照组比较,* $P < 0.001$;与模型组比较,## $P < 0.001$ 。

2.2 各组心肌细胞线粒体脂质含量比较

与对照组相比,模型组中胆固醇、TG 和 FFAs 的水平均明显升高($P < 0.001$),同时 PL 水平明显降

低($P<0.001$)。但在养心通脉方组中心肌细胞线粒体内胆固醇、TG、FFAs 以及 PL 的水平均与对照组无明显差异($P>0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠心肌细胞线粒体脂质含量比较 ($\bar{x}\pm s, n=15, \text{nmol/mL}$)

分组	胆固醇	PL	TG	FFAs
对照组	42.77±3.82	547.00±36.50	24.27±2.25	12.79±0.54
模型组	59.18±5.00*	400.70±34.50*	37.44±2.41*	18.69±1.34*
养心通脉方组	42.05±1.62 ^{##}	529.70±34.50 ^{##}	23.54±1.92 ^{##}	11.98±0.31 ^{##}
<i>F</i>	33.674	11.938	40.479	30.592

注:与对照组比较,* $P<0.001$;与模型组比较;^{##} $P<0.001$ 。

3 讨论

高水平的异丙肾上腺素能够过度激活心肌细胞内 Ca^{2+} 依赖的 ATP 酶,引起细胞内钙超载并损伤线粒体的磷酸化能力,从而导致细胞内 ATP 的缺乏,常用来制备心肌缺血损伤的动物模型。心肌缺血时产生的脂质过氧化物能够引起心肌细胞膜和线粒体膜的完整性破坏,通透性发生改变,这会导致细胞内离子水平的改变,从而引起磷脂酶的活化并进一步导致细胞内 ATP 耗竭和不可逆的损伤坏死。

线粒体呼吸和 ATP 合成是线粒体系统能量代谢过程中最重要的两个步骤,有三个重要的调节因素控制着线粒体呼吸速率:线粒体内 ADP 的供应;NAD/NADH₂ 比值;线粒体内钙离子的浓度。当发生心肌缺血时,细胞储存的 ATP 和肌酸磷酸会被耗竭,细胞膜通透性会增加导致细胞质内钠离子(Na^+)和钙离子(Ca^{2+})水平升高,从而引起线粒体的 RCR 降低,出现呼吸功能障碍^[1],本实验中较低的 RCR 表明异丙肾上腺素引起了线粒体能量合成过程中偶联障碍,而 ADP/O 比值的降低则说明线粒体的氧利用与氧化磷酸化解偶联,因此势必会导致 ATP 合成减少,细胞内 ATP 的减少或耗竭与细胞水肿、离子浓度梯度的丧失以及线粒体膜性结构和功能的改变之间有着紧密的联系^[2],在本实验中,给予养心通脉方水煎液预处理能够使心肌细胞线粒体内 RCR、ADP/O 比值和 ATP 浓度均接近于正常水平,这说明:养心通脉方预处理能够使异丙肾上腺素所诱导的线粒体功能障碍得到恢复,从而保持线粒体膜性结构和功能的正常。

高水平的异丙肾上腺素能够改变线粒体内脂质含量的水平,线粒体内胆固醇含量的明显升高与心肌缺血密切相关。线粒体膜中胆固醇含量的改变会影响膜的流动性、对各种离子的通透性以及膜表面结合酶的活性,并增强膜磷脂的降解,在心肌线粒体中 PL 最主要的作用就是稳定膜结合酶的构象,而在异丙肾上腺素预处理的大鼠心肌细胞中可以看到 FFAs 水平显著升高并伴有 PL 含量的明显下降,这

很可能是由于膜磷脂被磷脂酶加速降解的缘故,而膜磷脂加速降解与线粒体膜功能障碍以及不可逆的缺血性损伤密切相关,因此,在缺血心肌组织中磷脂水解的现象非常明显,这种亚细胞组分的代谢改变能够引起心肌细胞线粒体膜的损伤,从而导致电解质代谢异常和心肌收缩功能障碍^[3]。在本实验中,养心通脉方预处理能够使心肌细胞线粒体内胆固醇、TG、FFAs 以及 PL 的水平均接近于正常水平,这说明:养心通脉方预处理能够逆转异丙肾上腺素引起的线粒体膜性结构的损伤,维持线粒体膜性结构的稳定性与完整性。

总之,我们的研究结果证实养心通脉方能够明显减轻线粒体损伤,稳定线粒体膜,从而在异丙肾上腺素所诱导的大鼠心肌缺血损伤模型中发挥很强的细胞保护作用。

参考文献:

- [1] 秦伯未. 谦斋医学讲稿[M]. 上海:上海科学技术出版社,1978:208.
- [2] 黄献平,袁肇凯,杨涛,等. 养心通脉片对兔动脉粥样硬化斑块的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2007,27(6):27-29.
- [3] 袁肇凯,陈清华,黄献平,等. 养心通脉方有效成分部位的最佳剂量配伍抗急性心肌缺血的研究[J]. 湖南中医药大学学报,2008,28(6):21-25.
- [4] 袁肇凯,曹金枝,黄献平,等. 养心通脉液对心肌缺血再灌注损伤大鼠冠状微循环的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2004,2(12):715-717.
- [5] 韩景波,赵海顺. 养心通脉方对异丙肾上腺素诱导大鼠急性心肌缺血的保护作用的实验研究[J]. 陕西中医,2008,23(11):1554-1555.
- [6] Burton KP, McCord JM, Ghai G. Myocardial alterations due to free radical generation [J]. Am J Physiol 1984, 246: H776-83.
- [7] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with folin-phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265-275.
- [8] Katyare SS, Fatterpaker P, Sreenivasan A. Effect of 2, 4-dinitrophenol (DNP) on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria [J]. Arch Biochem Biophys, 1971, 144: 209-215.
- [9] Williamson JR, Corkey BE. Assays of intermediates of the citric acid cycle and related compounds by fluorimetric enzyme methods[J]. Methods in enzymology, 1969, 13: 488-491.
- [10] Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues [J]. J Biol Chem, 1957, 226: 497-509.
- [11] Jiang SJ, Li W, An W. Adenoviral gene transfer of hepatic stimulator substance confers resistance against hepatic ischemia-reperfusion injury by improving mitochondrial function [J]. Hum Gene Ther, 2013, 24(4): 443-56.
- [12] Schriewer JM, Peek CB, Bass J, et al. ROS-mediated PARP activity undermines mitochondrial function after permeability transition pore opening during myocardial ischemia-reperfusion. J Am Heart Assoc [J]. 2013,18, 2(2): e000159.
- [13] Fillmore N, Mori J, Lopaschuk GD. Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy [J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(8): 2080-2090.

(本文编辑 杨 瑛)