

本文引用:宁鑫,张艳.益气活血复方对慢性心衰大鼠 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶及线粒体蛋白的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(9):999-1002.

益气活血复方对慢性心衰大鼠 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶及线粒体蛋白的影响

宁鑫¹,张艳^{2*}

(1.辽宁中医药大学,辽宁 沈阳 110032;2.辽宁中医药大学附属医院,辽宁 沈阳 110032)

〔摘要〕目的 研究益气活血复方对慢性心衰大鼠心肌 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶及线粒体蛋白的影响。方法 SD 大鼠随机选取 10 只为正常对照组,其余大鼠以结扎冠脉前降支联合力竭式游泳及饥饿等手段造成慢性心衰模型。将造模成功大鼠随机分为模型组,曲美他嗪组,益气活血复方低、中、高剂量组,每组 10 只。各组相应予以生理盐水,曲美他嗪和益气活血复方低、中、高剂量连续灌胃 7 周后,取心肌组织和血清。利用线粒体分离方法测定 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶及线粒体蛋白的表达。结果 与正常对照组比较,模型组心肌 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性和线粒体蛋白浓度显著降低($P<0.05$);与模型组比较,曲美他嗪组、益气活血复方组 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性及线粒体蛋白浓度显著上升($P<0.05$)。结论 益气活血复方可能通过促进心肌细胞 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶活性的增强和提高线粒体蛋白浓度,参与调节心肌细胞的能量代谢过程,来发挥其治疗心力衰竭的作用。

〔关键词〕心力衰竭;益气活血复方; $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶; $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶;线粒体蛋白

〔中图分类号〕R285.5

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.09.007

Effect of Compound Yiqi Huoxue Prescription on $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$, and Mitochondrial Protein in Rats with Chronic Heart Failure

NING Xin², ZHANG Yan^{1*}

(1. The Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 110032, China;

2. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 110032, China)

〔Abstract〕 **Objective** To investigate the effect of compound Yiqi Huoxue prescription on $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$, and mitochondrial protein in the myocardium of rats with chronic heart failure. **Methods** Ten Sprague-Dawley rats were randomly selected as normal control group. A rat model of chronic heart failure was established by ligation of the anterior descending branch of the coronary artery combined with exhaustive swimming and hunger. After modeling, the rats were divided into model group, trimetazidine group, and low-, middle-, and high-dose compound Yiqi Huoxue prescription groups, with 10 rats in each group. These groups were treated by normal saline, trimetazidine, and low-, middle-, and high-dose compound Yiqi Huoxue prescription, respectively, by gavage for 7 consecutive weeks, and then the myocardial tissue and serum were harvested. The mitochondrial separation method was used to measure the expression of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$, and mitochondrial protein. **Results** Compared with the normal control group, the model group had significant reductions in the concentrations of $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, and mitochondrial protein in the myocardium ($P<0.05$); compared with the model group, the trimetazidine group and low-, middle-, and high-dose compound Yiqi Huoxue prescription groups had significant increases in the concentrations of $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, and mitochondrial protein in the myocardium ($P<0.05$). **Conclusion** Compound Yiqi Huoxue prescription plays an important role in the treatment of heart failure by promoting the activities of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$, increasing the concentration of mitochondrial protein, and participating in the regulation of energy metabolism of cardiomyocytes.

〔Keywords〕 heart failure; compound Yiqi Huoxue prescription; $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$; $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$; mitochondrial protein

〔收稿日期〕2017-11-17

〔作者简介〕宁鑫,男,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治心脑血管疾病。

〔通讯作者〕*张艳,女,主任医师,E-mail:Yanzhang1016@126.com。

慢性心衰的治疗已经取得重大突破,但其患病率和住院率仍呈上升趋势。近年来发现,Na⁺-K⁺-ATP酶、Ca²⁺-ATP酶、线粒体蛋白与慢性心衰关系密切,引起高度关注。当Na⁺-K⁺-ATP酶、Ca²⁺-ATP酶、线粒体蛋白三者活性或合成量下调时,心肌能量代谢则发生障碍,心脏功能大幅下降,导致心室重构甚至心衰的发生^[1]。益气活血复方是张艳教授20多年来治疗慢性心衰的常用方,临床疗效显著^[2]。本实验从心肌能量代谢的角度出发,观察益气活血复方对Na⁺-K⁺-ATP酶、Ca²⁺-ATP酶、线粒体蛋白的调控机制,为益气活血复方在治疗心衰方面提供科学依据与策略。

1 材料

1.1 实验动物

选择SPF级健康的SD雄性大鼠,由辽宁中医药大学动物实验中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(辽)2015-0001,体质量(240±20)g。

1.2 药品

益气活血复方(YQHXXFF)由辽宁中医药大学附属医院制剂科生产。处方组成:黄芪40g,太子参10g,丹参30g,益母草20g,红花15g,葶苈子10g,茯苓25g。水煎3次,时间分别为45、60、90min,合并煎煮液后过滤浓缩至低(含生药量0.4g/mL)、中(含生药量0.8g/mL)、高(含生药量1.6g/mL)3种药物浓度。盐酸曲美他嗪片(根克通),由瑞阳制药有限公司生产,20mg/片,批准文号:国药准字H20066534。

1.3 试剂与仪器

超微量ATP酶Na⁺-K⁺测试盒,产品批号:20170305,南京建成;超微量ATP酶Ca²⁺测试盒,产品批号:20170111,南京建成;组织线粒体分离试剂盒,产品型号:ZR0246,上海朝瑞技术有限公司;蛋白浓度测定试剂盒,产品编号:P0011,碧云天生物Beyotime;ACUSON X150彩色超声多普勒诊断仪,西门子公司;RM6240E/EC多道生理信号采集处理系统,成都仪器厂;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。

2 方法

2.1 动物模型的制备

大鼠经腹腔注射10%水合氯醛(5mL/kg),麻醉后进行背位固定,通过气管插管连接小动物呼吸机,设定呼吸频率为80次/min,潮气量为0.8mL。连接多道生理信号采集处理系统,监测II导联,记

录正常心电图。胸部备皮、消毒,然后沿胸腔左侧3、4肋间隙做横向切口,切口长度为1.5~2.5cm。用镊子逐层分离肌肉组织,经3、4肋间隙进入胸腔,迅速的用眼科镊子夹住心包膜,借助小剪刀剪开心包膜,充分暴露心脏。眼科镊子提起左心耳,在左心耳和肺动脉圆锥中间找到左冠状动脉前降支主干,使用6号可吸收缝线在距离左冠状动脉前降支起点处2~3mm的位置进行快速穿线、结扎,结扎处心肌颜色变苍白。心电图示波器显示标II导联S-T段明显抬高(在2mm以上),T波异常。快速关闭胸腔,并用3号缝线逐层缝合胸壁肌肉。缝合完毕后,在创口缝合处,敷用青霉素钠,肌内注射青霉素钠,每天2×10⁶U/kg,连续3d,以防创口感染。先进行5d常规喂养,于第2周将正常饲料量减到一半,引起大鼠饥饿。然后配合力竭式游泳(游泳时间按照大鼠的身体状态而定),1次/d,共4周。此时,大鼠可表现出活动减少,精神疲惫,毛色欠光泽,掉毛,甚至能够闻及哮鸣音等表现。慢性心力衰竭造模成功以第4周彩色超声多普勒诊断仪测定的左心室射血分数(EF)≤60%、心脏指数(CI)≤180mL(min·kg)为依据^[3]。

2.2 分组和干预

选择90只SD雄性大鼠,随机选取10只为正常对照组,其余大鼠造模成功后,再随机分为模型组,曲美他嗪组,益气活血复方高、中、低剂量组,每组10只。各组动物饲养条件一致。等容量的生理盐水对正常对照组和模型组进行灌胃,1次/d。益气活血复方各组分别给予益气活血复方10.8g/(kg·d)、5.4g/(kg·d)、2.7g/(kg·d)。曲美他嗪组予以曲美他嗪5.4mg/(kg·d)(结果按动物与人药物等效剂量的方法计算)。在成功造成慢性心衰模型后对各组大鼠进行7周的灌胃相应干预。

2.3 心衰大鼠线粒体蛋白、Ca²⁺-ATP酶、Na⁺-K⁺-ATP酶测定

相应干预7周后,禁食但不禁水12h,先麻醉后处死。取材部位为大鼠左心室,对线粒体分离采用线粒体分离试剂盒,检测线粒体蛋白应用蛋白浓度试剂盒,操作过程严格依据试剂盒说明书进行,按每小时每毫克心肌组织内ATP酶催化ATP时所释放的1μmol无机磷作为单个ATP酶的计量单位。

2.4 统计学方法

应用SPSS 16.0统计软件进行统计学分析,计量资料用“ $\bar{x}±s$ ”表示,组间比较应用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较时,方差齐则采用LSD法,方差不齐则采用Dunnnett's法, $P<0.05$ 差

具有统计学意义。

3 结果

3.1 心肌 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性比较

与正常对照组比较,模型组心肌 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性显著降低 ($P<0.05$),表明造模成功;与模型组比较,曲美他嗪组和益气活血复方高、中、低剂量组心肌 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性显著上升 ($P<0.05$);曲美他嗪组与益气活血复方高、中、低剂量组心肌 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

表 1 心肌 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

分组	剂量/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	$\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶/($\text{mol}\cdot\text{Pi}\cdot\text{mg}\cdot\text{Prot}^{-1}$)	$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶/($\text{mol}\cdot\text{Pi}\cdot\text{mg}\cdot\text{Prot}^{-1}$)
正常对照组	-	1.68±0.65	3.42±0.72
模型组	-	0.69±0.42*	2.50±0.50*
曲美他嗪组	0.0054	1.30±0.52 [△]	3.31±0.55 [△]
益气活血复方高剂量组	10.8	1.12±0.07 [△]	2.98±0.18 [△]
益气活血复方中剂量组	5.4	1.16±0.22 [△]	3.12±0.46 [△]
益气活血复方低剂量组	2.7	0.98±0.11 [△]	2.84±0.09 [△]
F 值		3 486	4 757

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$ 。

3.2 心肌线粒体蛋白浓度比较

与正常对照组比较,模型组心肌线粒体蛋白浓度降低 ($P<0.05$);与模型组比较,曲美他嗪组、益气活血复方 3 个剂量组心肌线粒体蛋白浓度升高 ($P<0.05$);曲美他嗪组与益气活血复方 3 个剂量组心肌线粒体蛋白浓度比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

表 2 心肌线粒体蛋白浓度比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

分组	剂量/($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	线粒体蛋白浓度(OD 值)
正常对照组	-	1.47±0.11
模型组	-	1.28±0.17*
曲美他嗪组	0.0054	1.46±0.06 [△]
益气活血复方高剂量组	10.8	1.45±0.01 [△]
益气活血复方中剂量组	5.4	1.44±0.05 [△]
益气活血复方低剂量组	2.7	1.42±0.03 [△]
F 值		355

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$ 。

4 讨论

在慢性心力衰竭发病过程中,能量代谢方面的改变是其发病的重要环节。曲美他嗪作为调节心肌细胞能量代谢的主要药物,在临床上已经得到广泛应用,它对线粒体中的 3 酮酰辅酶 A 硫解酶(3-KAT)

发挥选择性的抑制作用,引起游离脂肪酸 β 氧化减低,加速了葡萄糖氧化过程,使 ATP 生成增加,从而调节了心肌的能量代谢^[4]。

慢性心力衰竭归属于中医学“心水”“喘症”“心悸”“水肿”“心痹”等范畴^[5]。历代医家对慢性心衰的认识观点各异,但普遍认为慢性心力衰竭为本虚标实之证。其发生与心气亏虚、血脉瘀阻、痰浊水停密切相关^[6]。针对心衰的以上病因病机,益气活血复方中丹参、红花活血化瘀,黄芪、太子参补气,益母草活血、利水,葶苈子、茯苓消肿利水。诸药合用,以益气活血、利水消肿之功,达标本同治之效^[7]。唐斌等^[8]证实,黄芪甲苷通过改变心肌细胞能量代谢异常,阻止了慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化的发展;丹参素可提高心肌能量代谢率,下调心肌脂肪酸氧化,保护缺血再灌注区的心肌组织^[9-11];红花黄色素能够增加心肌三磷酸腺苷(ATP)储备,降低乳酸脱氢酶(LDH)活性,减轻缺血心肌的损伤^[12];太子参、益母草同样具有保护缺血心肌的功能^[13]。由此可见,方中各味药物功效的总和是益气活血复方参与心肌能量代谢调控的科学依据。

心脏作为高耗能器官,需要消耗大量的能量来维持本身的收缩和舒张功能^[4]。研究证明,在慢性心衰发病过程中,心肌能量代谢的改变起主导作用,当心脏发生功能障碍时,心肌能量产生障碍,甚至衰竭^[5]。ATP 是心肌组织可直接利用的能量物质,它在心肌中表达的量与心脏功能呈正相关。 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶即钙泵,其中心肌肌浆网钙泵(SERCA),参与约 2/3 的 Ca^{2+} 的转运,心肌细胞发生兴奋时,SERCA 通过分解 ATP 时所产生的能量,逆浓度梯度对钙离子进行主动跨膜转运。SERCA 功能的发挥需要大量的 ATP,对 ATP 的消耗量仅亚于肌球蛋白。因此,当 ATP 生成的数量减少时,SERCA 功能下调,心肌肌浆网重新摄取钙离子的能力减低,引起心肌收缩功能降低^[16]。研究还证实,在人的衰竭心脏中,肌浆网钙泵的功能下调,心肌舒张弛缓^[17-18]。钠泵即 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶,是一种广泛存在于各器官、组织细胞膜表面的酶蛋白,通过水解 ATP 时所释放的能量,将 2 个钾离子转入细胞内的同时又将 3 个钠离子转出到细胞外,以维持细胞内外电及化学梯度平衡。有研究证实,在发生心力衰竭的大鼠模型中, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性减低^[19]。作为心肌细胞能量产生的中心,线粒体在调节能量代谢方面起到关键作用,发生心衰的心肌细胞中,线粒体(mt)DNA 突变率增长,发生突变的 mtDNA 的连续集聚,干扰了线粒体蛋白的合成和呼吸链相关复合体的活性,进而引起了线粒体的功能紊乱及慢

性心衰的发生、发展^[20]。Na⁺-K⁺-ATP酶、Ca²⁺-ATP酶及线粒体蛋白与心肌细胞能量代谢的过程密切相关,通过对Na⁺-K⁺-ATP酶、Ca²⁺-ATP酶活性及线粒体蛋白浓度的检测,观察心肌细胞的能量代谢的机制和运行是否正常,所以加深对Na⁺-K⁺-ATP酶、Ca²⁺-ATP酶及线粒体蛋白的系统研究意义重大。

本实验结果表明:模型组中Na⁺-K⁺-ATP酶和Ca²⁺-ATP酶活性及线粒体蛋白浓度降低,表明心衰时,存在线粒体蛋白合成减少,心肌能量供应不足,引起Na⁺-K⁺-ATP酶和Ca²⁺-ATP酶活性减弱。曲美他嗪组、益气活血复方组Na⁺-K⁺-ATP酶和Ca²⁺-ATP酶活性及线粒体蛋白浓度增高明显,表明曲美他嗪、益气活血复方可增强Na⁺-K⁺-ATP酶和Ca²⁺-ATP酶活性并提高线粒体蛋白浓度,从而改善心肌的能量代谢。

综上所述,益气活血复方能够改善慢性心力衰竭大鼠心肌细胞中Na⁺-K⁺-ATP酶和Ca²⁺-ATP酶活性及线粒体蛋白浓度,参与调节心肌细胞的能量代谢过程,促进了心脏功能的恢复,其具体作用机制仍需深入研究。

参考文献:

- [1] 苗梦露,李七一,严士海,等.抗心衰颗粒对舒张性心衰大鼠模型心肌细胞内钙离子、ATP酶及心肌线粒体超微结构的影响[J].北京中医药大学学报,2013,36(7):468-471.
- [2] 张艳,杨硕,庞敏,等.益气活血复方对慢性心衰大鼠心肌组织AngII及PKC的影响[J].中华中医药杂志,2008,23(11):999-1001.
- [3] 宫丽鸿,张艳,高峰.益气活血复方对慢性心力衰竭大鼠心肌组织MMP-1、I型胶原、BNP的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2011,9(2):189-190.
- [4] 乔锐,李超,乔峰,等.高剂量曲美他嗪对扩张型心肌病心衰患者预后影响[J].临床军医杂志,2017,5(5):501-503.
- [5] 魏志静,吉中强.吉中强教授治疗心衰经验[J].湖南中医药大学学报,2016,36(6):68-70.
- [6] 张艳,礼海,王彩玲.浅谈慢性心衰中医病名病机研究[J].辽宁中医杂志,2011,38(1):12-13.
- [7] 张艳,宫丽鸿,于睿,等.浅谈慢性心力衰竭中医辨证康复治疗体会[J].天津中医药,2011,28(2):131-132.
- [8] 唐斌,张金国,谭洪勇,等.黄芪甲苷对慢性心衰大鼠心肌纤维化及能量代谢的影响[J].中国病理生理杂志,2017,33(3):411-416.
- [9] 张琳,常勃勃,曹婉雯,等.丹参素对大鼠离体心脏缺血再灌注心肌能量代谢的影响[J].中国药科大学学报,2010,41(3):278-282.
- [10] 黄黎华,陈渊成,程昱,等.丹参水溶性成分含量变化对大鼠离体心肌能量代谢调节的影响[J].中国药科大学学报,2011,42(4):348-353.
- [11] 丁芳萍.丹参注射液对冠心病心绞痛患者心肌能量代谢的影响[J].临床合理用药杂志,2015,8(1):120-121.
- [12] 林永哲,金鸣,臧宝霞,等.红花黄色素改善大鼠缺氧心肌能量代谢的研究[J].中草药,2003,34(5):436-439.
- [13] 刘湘湘,阮君山.太子参多糖对大鼠心肌缺血的保护作用[J].中国民族民间医药,2017,26(17):18-20.
- [14] TAEGTMEYERH. Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications applications [J]. Currprobl Cardiol, 1994,19(2):61-86.
- [15] NEUBAUERS. The failing heart -an engine out of fuel[J].New England Journal of Medicine, 2007,356(11):1140-1151.
- [16] MAACK C, O'ROURKER. Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics[J]. Basic research in cardiology, 2007,102(5):369-392.
- [17] HASENFUSS G, SCHILLINGER W, LEHNARTSE, et al. Relationship between Na⁺/Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium[J]. Circulation, 1999,99(5):641-648.
- [18] PIACENTINO V. 3rd Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes [J].Circulation Research,2003,92(6):651-658.
- [19] 储岳峰,柯永胜,俞国华,等.大鼠心肌缺血再灌注损伤对心肌细胞Na⁺-K⁺-ATP酶亚基因表达的影响与意义[J].中国动脉硬化杂志,2007,15(3):173-176.
- [20] SANBE A, TAKEO S, YAMAGUCHI F, et al. Effects of long-term with ACEI inhibitors, captopril, enalapril and trandolapril, on myocardial energy metabolism in rats with heart failure following myocardial infarction[J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1995,27(10):2209-2222.

(本文编辑 杨 璞)