

· 论著 ·

不同剂量养心通脉有效部位方对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠心肌线粒体代谢相关酶及其转运的影响



扫描二维码
查看更多

尹梦影¹, 曹伟¹, 胡鑫¹, 郑景辉², 莫云秋²

【摘要】 目的 分析不同剂量养心通脉有效部位方 (apr-YTF) 对心肌缺血再灌注损伤 (MIRI) 模型大鼠心肌线粒体代谢相关酶及其转运的影响。方法 本实验时间为2020年6月至2021年6月。将70只健康雄性Wistar大鼠随机分为空白对照组、模型组、阴性对照组、阳性对照组及apr-YTF低、中、高剂量组, 每组10只。除空白对照组外, 其他组大鼠构建MIRI模型, 造模期间, 各组大鼠共死亡25只, 为保证实验完整性, 补充造模至每组10只。造模完成后, 空白对照组及模型组大鼠正常饲养, 阴性对照组大鼠给予0.9%氯化钠溶液灌胃, 阳性对照组大鼠给予冠心苏合丸灌胃, apr-YTF低、中、高剂量组大鼠分别给予1.5、3.0、6.0 ml apr-YTF灌胃, 1次/d, 共干预2周。比较空白对照组和模型组造模24 h后血液流变学指标 (包括全血低切、中切、高切黏度)、血清心肌梗死标志物 [肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、心肌肌钙蛋白I (cTnI)、乳酸脱氢酶 (LDH)] 水平。比较七组大鼠造模第14天心肌组织病理学检查结果、线粒体代谢相关酶 [ATP、磷酸果糖激酶1 (PFK1)、琥珀酸脱氢酶 (SDH)、腺苷酸转运体 (ANT)、异枸橼酸脱氢酶 (IDH)] 水平及心肌组织中肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白2 (TNF α IP2)、MIRI1表达水平。结果 模型组全血低切、中切黏度及血清CK-MB、cTnI、LDH水平高于空白对照组 ($P < 0.05$)。模型组ATP水平低于空白对照组, 模型组、阴性对照组PFK1、SDH、ANT、IDH水平高于空白对照组 ($P < 0.05$); 阴性对照组、阳性对照组及apr-YTF低、中、高剂量组ATP水平高于模型组, 阳性对照组及apr-YTF中、高剂量组PFK1、ANT、IDH水平低于模型组, 阳性对照组及apr-YTF低、中、高剂量组SDH水平低于模型组 ($P < 0.05$); apr-YTF低剂量组ATP、ANT水平高于阳性对照组, apr-YTF低、中剂量组PFK1、IDH水平高于阳性对照组 ($P < 0.05$); apr-YTF中剂量组ATP水平低于apr-YTF低剂量组, apr-YTF中、高剂量组PFK1、ANT、IDH水平低于apr-YTF低剂量组, apr-YTF高剂量组SDH水平低于apr-YTF低剂量组 ($P < 0.05$)。模型组、阴性对照组心肌组织中TNF α IP2表达水平高于空白对照组, 心肌组织中MIRI1表达水平低于空白对照组 ($P < 0.05$); 阳性对照组及apr-YTF中、高剂量组心肌组织中TNF α IP2表达水平低于模型组, 阳性对照组及apr-YTF低、中、高剂量组心肌组织中MIRI1表达水平高于模型组 ($P < 0.05$); apr-YTF低剂量组心肌组织中TNF α IP2表达水平高于阳性对照组, apr-YTF低、中、高剂量组心肌组织中MIRI1表达水平低于阳性对照组 ($P < 0.05$); apr-YTF中、高剂量组心肌组织中TNF α IP2表达水平低于apr-YTF低剂量组 ($P < 0.05$)。结论 不同剂量apr-YTF均可有效改善MIRI模型大鼠心肌线粒体代谢相关酶, 进而减轻线粒体能量代谢功能障碍, 其还可减轻线粒体转运障碍; 且中剂量 (3.0 ml)、高剂量 (6.0 ml) apr-YTF的效果相似, 均优于低剂量 (1.5 ml) apr-YTF。

【关键词】 心肌再灌注损伤; 心肌缺血再灌注损伤; 大鼠; 养心通脉有效部位方; 线粒体

【中图分类号】 R 542.2 **【文献标识码】** A DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2023.00.195

Effects of Different Doses of apr-YTF on Myocardial Mitochondrial Metabolism-Related Enzymes and Their Transport in Rats with Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury YIN Mengying¹, CAO Wei¹, HU Xin¹, ZHENG Jinghui², MO Yunqiu²

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China

2. Department of Gastroenterology, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China

Corresponding author: MO Yunqiu, E-mail: 980150190@qq.com

【Abstract】 Objective To analyze the effects of different doses of active principle region of Yangxin Tongmai formula (apr-YTF) on myocardial mitochondrial metabolism-related enzymes and their transport in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI). **Methods** This experiment was conducted from June 2020 to June 2021. Seventy healthy male

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82160875)

作者单位: 1.530001广西壮族自治区南宁市, 广西中医药大学 2.530011广西壮族自治区南宁市, 广西中医药大学附属瑞康医院老年病科

通信作者: 莫云秋, E-mail: 980150190@qq.com

Wistar rats were randomly divided into blank control group, model group, negative control group, positive control group, apr-YTF low dose group, apr-YTF medium dose group and apr-YTF high dose group, with 10 rats in each group. Except for the blank control group, the MIRI model was constructed in the other groups of rats. During the modeling period, a total of 25 rats in each group died. To ensure the integrity of the experiment, membrane building was supplemented to 10 rats in each group. After the completion of modeling, the rats in the blank control group and model group were fed normally, the rats in the negative control group were given 0.9% sodium chloride solution by gavage, the rats in the positive control group were given Guanxin Suhe pill by gavage, and the rats in the apr-YTF low-dose group, apr-YTF medium-dose group and apr-YTF high-dose group were given 1.5, 3.0 and 6.0 ml apr-YTF by gavage, once a day, for a total of 2 weeks of intervention. The hemorheological indexes (including whole blood low-cut, mid-cut and high-cut viscosity) and serum myocardial infarction markers [creatin kinase isoenzyme (CK-MB), cardiac troponin I (cTnI) and lactate dehydrogenase (LDH)] levels were compared between the blank control group and the model group 24 h after modeling. The myocardial histological examination results, the levels of mitochondrial metabolism-related enzymes [ATP, phosphofructokinase 1 (PFK1), succinate dehydrogenase (SDH), adenine nucleotide translocator (ANT) and isocitrate dehydrogenase (IDH)] and the expression levels of tumor necrosis factor alpha-induced protein 2 (TNF- α IP2) and MIRO1 in the myocardium of seven groups were compared on the 14th day after modeling.

Results The whole blood low-cut and mid-cut viscosity and serum CK-MB, cTnI and LDH levels in the model group were higher than those in the blank control group ($P < 0.05$). The ATP levels in the model group were lower than those in the blank control group, and the PFK1, SDH, ANT, and IDH levels in the model and negative control groups were higher than those in the blank control group ($P < 0.05$); the ATP levels in the negative control group, positive control group, apr-YTF low-dose group, apr-YTF medium-dose group, and apr-YTF high-dose group were higher than those in the model group, the PFK1, ANT, and IDH levels in the positive control group, apr-YTF medium-dose group, and apr-YTF high-dose group were lower than those in the model group, the SDH levels in the positive control group, apr-YTF low-dose group, apr-YTF medium-dose group, and apr-YTF high-dose group were lower than those in the model group ($P < 0.05$); ATP and ANT levels in apr-YTF low-dose group were higher than those in positive control group, and the PFK1 and IDH levels in apr-YTF low-dose group and apr-YTF medium-dose group were higher than those in positive control group ($P < 0.05$); the ATP levels in the apr-YTF medium-dose group were lower than those in the apr-YTF low-dose group, while the PFK1, ANT, and IDH levels in the apr-YTF medium-group and apr-YTF high-dose group were lower than those in the apr-YTF low-dose group, the SDH levels in the apr-YTF high-dose group were lower than those in the apr-YTF low-dose group ($P < 0.05$). The expression level of TNF- α IP2 in myocardial tissue of model group and negative control group was higher than that of blank control group, and the expression level of MIRO1 in myocardial tissue was lower than that of blank control group ($P < 0.05$); the expression level of TNF- α IP2 in myocardial tissue of positive control group and apr-YTF medium-dose group and apr-YTF high-dose group was lower than that of model group, and the expression level of MIRO1 in myocardial tissue of positive control group and apr-YTF low-dose group, apr-YTF medium-dose group and apr-YTF high-dose group was higher than that of model group ($P < 0.05$); the expression level of TNF- α IP2 in myocardial tissue of apr-YTF low-dose group was higher than that of positive control group, and the expression level of MIRO1 in myocardial tissue of apr-YTF low-dose group, apr-YTF medium-dose group and apr-YTF high-dose group was lower than that of positive control group ($P < 0.05$); the expression level of TNF- α IP2 in myocardium of apr-YTF medium-dose group and apr-YTF high-dose group was lower than that of apr-YTF low-dose group ($P < 0.05$).

Conclusion Different doses of apr-YTF can effectively improve myocardial mitochondrial metabolism-related enzymes in MIRI model rats, thereby alleviating mitochondrial energy metabolism dysfunction and mitochondrial transport dysfunction. And the effects of medium dose (3.0 ml) and high dose (6.0 ml) apr-YTF were similar, and both were better than that of low dose (1.5 ml) apr-YTF.

【Key words】 Myocardial reperfusion injury; Myocardial ischemic reperfusion injury; Rats; Active principle region of Yangxin Tongmai formula; Mitochondria

研究显示,冠心病是心血管疾病的首要死亡原因,其主要治疗方式是对心肌进行早期再灌注^[1-2]。而再灌注可导致心肌线粒体功能紊乱,进而损伤心功能。心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)指心肌血供短暂中断后又迅速恢复正常,导致心肌能量代谢障碍、心肌细胞结构改变等进一

步加重的现象^[3],故修复受损的线粒体是其重要的治疗手段。养心通脉方是由我国著名中医学家秦伯未先生运用“扶养心气,和通血脉”之法治疗胸痹心痛的有效名方,而养心通脉有效部位方(active principle region of Yangxin Tongmai formula, apr-YTF)能促进心肌线粒体的修复,其有效成分——人参皂苷、丹参酮II A、总生

物碱、人参多糖、复方多糖、总挥发油等与养心通脉方相似^[4]。但与养心通脉方相比, apr-YTF中的活性成分更加丰富, 其可以降低用药剂量, 提高抗MIRI的疗效^[5]。本研究旨在分析不同剂量apr-YTF对MIRI模型大鼠心肌线粒体代谢相关酶及其转运的影响, 以期为采用apr-YTF防治MIRI提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验时间 本实验时间为2020年6月至2021年6月。

1.2 实验动物 健康雄性Wistar大鼠95只, 体质量为180~220 g, 购自广西中医药大学实验动物中心, 许可证号: SCXK(湘)2019-0013。大鼠在SPF级实验中心常规饲养, 饲养条件如下: 5只大鼠为一笼, 温度控制在22~25℃, 相对湿度为35%, 大鼠自由饮水, 常规饲料, 不限制进食, 实验室灯光为12 h/12 h日夜交替。

1.3 实验药物 apr-YTF由人参20 g、桂枝15 g、生地15 g、丹参25 g、泽泻10 g组成, 统一由广西中医药大学附属瑞康医院采购, 药材均为同一批次。将方剂放入圆底烧瓶内煎煮, 首煎加8倍水, 煮45 min; 二煎加4倍水, 煮30 min; 搅拌均匀后用武火烧开, 制成apr-YTF。冠心苏合丸由北京同仁堂科技发展股份有限公司中药厂生产(批号: Z11021184, 每10丸8.5 mg)。

1.4 实验仪器与试剂 病理组织切片机购自Thermo Fisher Scientific公司, 光学显微镜购自OLYMPUS, 动物心电监护仪购自美国SurgiVet公司, 小动物呼吸机、小动物麻醉机及手术器械购自Harvard Bioscience公司, 全自动血液细胞分析仪购自上海涵飞医疗器械有限公司, KE-300S血液流变仪购自上海康美国际生化有限公司, Tecan Infinite 200Pro酶标仪购自上海迪奥生物科技有限公司, 1658033型电泳仪、电转仪和电源购自美国Bio-Rad公司。

注射用青霉素钠购自华北制药股份有限公司, 异氟烷购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司, 4%多聚甲醛通用型组织固定液购自Biosharp; 苏木素、伊红染色试剂购自上海蓝季科技发展有限公司, 肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzymes, CK-MB)、心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin I, cTnI)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、磷酸果糖激酶1(phosphofructokinase 1, PFK1)、琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)、腺苷酸转运体(adenine nucleotide translocator, ANT)、异枸橼酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, IDH) ELISA试剂盒及ATP含量生化试剂盒购自江苏酶免实业有限公司, 肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白2(tumor necrosis factor α -induced protein 2, TNF α IP2)抗体购自武汉贝茵莱生物科技有限公司(Bioswamp), MIRO1抗体购自NOVUS公司。

1.5 实验方法

1.5.1 分组及干预方法 将70只健康雄性Wistar大鼠随机分为空白对照组、模型组、阴性对照组、阳性对照组及apr-YTF低、中、高剂量组, 每组10只。除空白对照组外, 其他组大鼠构建MIRI模型, 具体方法为: 将大鼠采用仰卧位固定于手术台, 采用异氟烷进行持续呼吸麻醉, 待大鼠呼吸平稳后, 连接动物心电监护仪, 实时观测心电图变化情况; 将大鼠经背位固定, 充分暴露气管后进行气管插管, 并连接小动物呼吸机, 大鼠呼吸频率与呼吸机一致表明气管插管成功; 于胸前左侧第3~4肋备皮消毒, 逐层剥离并充分暴露心脏, 于左心耳下缘用7-0 mm可吸收线结扎左冠状动脉前降支, 结扎完成后将心脏迅速放回胸腔内; 结扎30 min后进行再灌注2 h。心电图导联ST段弓背向上抬高说明造模成功。缝合胸壁, 待大鼠呼吸频率稳定后暂停机械通气以恢复其自主呼吸。如无异常, 将大鼠放回干净笼内, 密切观察大鼠生命体征。术后常规应用注射用青霉素钠3 d以预防感染。造模期间, 各组大鼠共死亡25只, 为保证实验完整性, 补充造模至每组10只。造模完成后, 空白对照组及模型组大鼠正常饲养, 阴性对照组大鼠给予0.9%氯化钠溶液灌胃, 阳性对照组大鼠给予冠心苏合丸灌胃, apr-YTF低、中、高剂量组大鼠分别给予1.5、3.0、6.0 ml apr-YTF灌胃〔以成年人体质量60 kg为标准, 根据实验动物剂量换算方法计算给药量, 大鼠给药量(g/kg)=成人给药量(g/kg) \times 6.3〕, 1次/d, 不限制饮水、进食, 分笼饲养, 共干预2周。

1.5.2 血液流变学指标、血清心肌梗死标志物水平检测方法 造模24 h后, 从空白对照组与模型组中随机选取3只大鼠, 采用5%水合氯醛(0.01 ml/g)腹腔注射进行麻醉, 待大鼠疼痛反射消失后采集其腹主动脉血液5 ml, 室温静置2 h后4 000 r/min离心15 min(离心半径8.6 cm), 取上清液备用。采用KE-300S血液流变仪检测血液流变学指标, 包括全血低切、中切、高切黏度, 严格按照试剂盒说明书进行操作。采用ELISA检测血清心肌梗死标志物水平, 包括CK-MB、cTnI、LDH水平, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.5.3 心肌组织病理学检查 造模第14天, 随机选取各组大鼠3只, 采用5%水合氯醛(0.01 ml/g)腹腔注射进行麻醉; 待大鼠疼痛反射消失后剪开胸腔, 取出心脏, 采用0.9%氯化钠溶液冲洗干净, 使用4%多聚甲醛通用型组织固定液固定标本; 取适量心肌组织并采用10%多聚甲醛溶液浸泡过夜, 采用PBS清洗, 进行乙醇梯度脱水、二甲苯透明, 放入蜡块浸渍, 采用病理组织切片机将蜡块切成3~5 μ m的薄片, 将切片放于热水上, 将石蜡融化展于玻片上, 封固, 采用苏木素、伊红染色试剂

进行染色;将玻片置于光学显微镜下,观察心肌组织病理学变化情况。

1.5.4 线粒体代谢相关酶水平检测方法 造模第14天,随机选取各组大鼠6只,采用5%水合氯醛(0.01 ml/g)腹腔注射进行麻醉,待大鼠疼痛反射消失后采集腹主动脉血液5 ml;室温静置2 h后4 000 r/min离心15 min(离心半径8.6 cm),取上清液备用。采用比色法检测ATP水平,采用ELISA检测PFK1、SDH、ANT、IDH水平,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.5.5 心肌组织中TNF α IP2、MIRO1表达水平检测方法 造模第14天,随机选取各组大鼠3只,采用5%水合氯醛(0.01 ml/g)腹腔注射进行麻醉,待大鼠疼痛反射消失后剪开胸腔,取出心脏,用0.9%氯化钠溶液冲洗干净,使用4%多聚甲醛通用型组织固定液固定标本;取适量左心室心肌组织,用液氮快速冷冻,于-80℃环境下保存备用;采用Western blot法检测心肌组织中TNF α IP2、MIRO1表达水平,方法如下:采用裂解液于冰上裂解心肌组织,研磨后14 000 r/min离心3 min(离心半径10 cm),取上清液;进行蛋白定量及变性、电泳、转膜、封闭、TBST洗涤,加入TNF α IP2及MIRO1一抗(1:1 000)孵育过夜,加入二抗(1:5 000)室温孵育1 h,进行ECL显影;采用Image J软件进行条带灰度分析,以目标蛋白与 β -actin的比值作为目标蛋白表达水平。

1.6 统计学方法 采用Graphpad Prism 8.0统计学软件进行数据分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血液流变学指标、血清心肌梗死标志物水平 模型组全血低切、中切黏度及血清CK-MB、cTnI、LDH水平高于空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);空白对照组与模型组全血高切黏度比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

2.2 心肌组织病理学检查 空白对照组大鼠心肌组织结构完整,心肌纤维组织整齐有序,细胞核形态正常;

模型组大鼠心肌纤维断裂,排列紊乱,大量细胞核分布于细胞外,心肌间质中可见炎症细胞浸润、水肿;阴性对照组可见心肌纤维断裂;与模型组相比,阳性对照组及apr-YTF低、中、高剂量组心肌水肿明显减轻,炎症细胞数量明显减少,见图1。

2.3 线粒体代谢相关酶水平 七组ATP、PFK1、SDH、ANT、IDH水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。模型组ATP水平低于空白对照组,模型组、阴性对照组PFK1、SDH、ANT、IDH水平高于空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);阴性对照组、阳性对照组及apr-YTF低、中、高剂量组ATP水平高于模型组,阳性对照组及apr-YTF中、高剂量组PFK1、ANT、IDH水平低于模型组,阳性对照组及apr-YTF低、中、高剂量组SDH水平低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);apr-YTF低剂量组ATP、ANT水平高于阳性对照组,apr-YTF低、中剂量组PFK1、IDH水平高于阳性对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);apr-YTF中剂量组ATP水平低于apr-YTF低剂量组,apr-YTF中、高剂量组PFK1、ANT、IDH水平低于apr-YTF低剂量组,apr-YTF高剂量组SDH水平低于apr-YTF低剂量组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

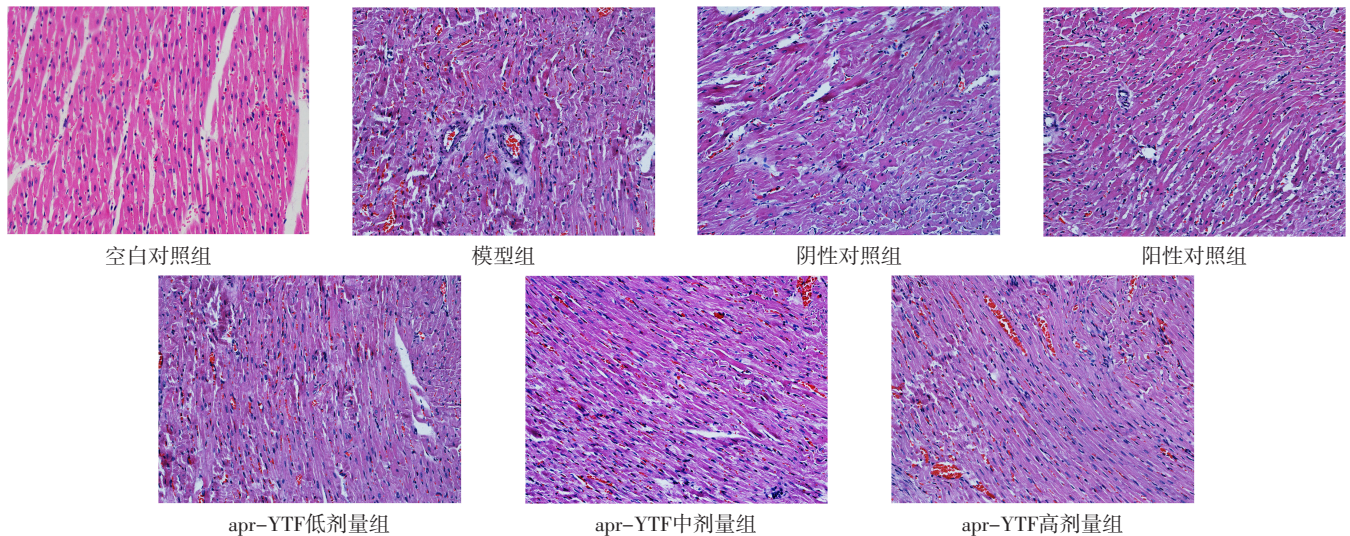
2.4 心肌组织中TNF α IP2、MIRO1表达水平 七组心肌组织中TNF α IP2、MIRO1表达水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。模型组、阴性对照组心肌组织中TNF α IP2表达水平高于空白对照组,心肌组织中MIRO1表达水平低于空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);阳性对照组及apr-YTF中、高剂量组心肌组织中TNF α IP2表达水平低于模型组,阳性对照组及apr-YTF低、中、高剂量组心肌组织中MIRO1表达水平高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);apr-YTF低剂量组心肌组织中TNF α IP2表达水平高于阳性对照组,apr-YTF低、中、高剂量组心肌组织中MIRO1表达水平低于阳性对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);apr-YTF中、高剂量组心肌组织中TNF α IP2表达水平低于apr-YTF低剂量组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表3。

表1 空白对照组与模型组血液流变学指标、血清心肌梗死标志物水平比较($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Comparison of hemorheology indexes and serum myocardial infarction marker levels between blank control group and model group

组别	血液流变学指标 (mPa·s)			血清心肌梗死标志物		
	全血低切黏度	全血中切黏度	全血高切黏度	CK-MB (ng/ml)	cTnI (ng/L)	LDH (ng/L)
空白对照组	27.7 ± 2.2	6.3 ± 0.4	4.6 ± 0.3	16.1 ± 2.2	447.3 ± 65.1	23.4 ± 3.9
模型组	41.3 ± 6.2	7.6 ± 0.7	4.9 ± 0.2	27.0 ± 2.0	662.9 ± 56.3	32.9 ± 1.5
t 值	4.669	3.470	1.864	10.980	7.512	6.783
P 值	0.016	0.008	0.099	<0.001	<0.001	<0.001

注:CK-MB=肌酸激酶同工酶,cTnI=心肌肌钙蛋白I,LDH=乳酸脱氢酶



注：apr-YTF=养心通脉有效部位方

图1 七组大鼠心肌组织病理学检查结果（HE染色，×20）

Figure 1 Histopathology examination results of myocardium in seven groups

表2 七组线粒体代谢相关酶水平比较（ $\bar{x} \pm s$, $n=6$ ）

Table 2 Comparison of mitochondrial metabolism-related enzyme levels in seven groups

组别	ATP (U/mg)	PFK1 (U/L)	SDH (U/mg)	ANT (pg/ml)	IDH (U/L)
空白对照组	2.6 ± 0.6	56.2 ± 13.6	154.0 ± 17.4	127.7 ± 15.2	16.3 ± 2.5
模型组	0.7 ± 0.1 ^a	202.0 ± 28.0 ^a	276.7 ± 26.7 ^a	338.2 ± 40.8 ^a	64.7 ± 7.5 ^a
阴性对照组	3.3 ± 0.6 ^b	202.6 ± 14.5 ^a	272.8 ± 49.4 ^a	344.9 ± 20.2 ^a	67.3 ± 3.6 ^a
阳性对照组	1.6 ± 0.8 ^b	101.9 ± 41.5 ^b	198.4 ± 34.9 ^b	198.2 ± 51.7 ^b	32.3 ± 13.2 ^b
apr-YTF低剂量组	2.5 ± 0.7 ^{bc}	176.7 ± 27.4 ^c	226.9 ± 39.5 ^b	308.8 ± 41.8 ^c	58.5 ± 9.1 ^c
apr-YTF中剂量组	1.7 ± 0.4 ^{bd}	137.8 ± 25.6 ^{bcd}	206.2 ± 37.6 ^b	243.7 ± 37.6 ^{bd}	43.6 ± 8.6 ^{bcd}
apr-YTF高剂量组	1.8 ± 0.7 ^b	125.1 ± 31.9 ^{bd}	181.3 ± 31.3 ^{bd}	228.9 ± 50.0 ^{bd}	41.7 ± 10.3 ^{bd}
F值	23.49	46.62	20.27	50.20	56.22
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：PFK1=磷酸果糖激酶1，SDH=琥珀酸脱氢酶，ANT=腺苷酸转运体，IDH=异枸橼酸脱氢酶，apr-YTF=养心通脉有效部位方；^a表示与空白对照组比较， $P<0.05$ ；^b表示与模型组比较， $P<0.05$ ；^c表示与阳性对照组比较， $P<0.05$ ；^d表示与apr-YTF低剂量组比较， $P<0.05$

表3 七组心肌组织中TNF α IP2、MIR1表达水平比较（ $\bar{x} \pm s$, $n=3$ ）

Table 3 Comparison of expression levels of TNF α IP2 and MIR1 in myocardial tissue in seven groups

组别	TNF α IP2	MIR1
空白对照组	0.37 ± 0.11	0.99 ± 0.07
模型组	1.11 ± 0.08 ^a	0.75 ± 0.11 ^a
阴性对照组	0.99 ± 0.15 ^a	0.72 ± 0.08 ^a
阳性对照组	0.64 ± 0.06 ^b	1.23 ± 0.07 ^b
apr-YTF低剂量组	1.10 ± 0.11 ^c	0.98 ± 0.05 ^{bc}
apr-YTF中剂量组	0.52 ± 0.03 ^{bd}	1.05 ± 0.06 ^{bc}
apr-YTF高剂量组	0.49 ± 0.04 ^{bd}	1.06 ± 0.02 ^{bc}
F值	35.14	20.09
P值	<0.001	<0.001

注：TNF α IP2=肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白2；^a表示与空白对照组比较， $P<0.05$ ；^b表示与模型组比较， $P<0.05$ ；^c表示与阳性对照组比较， $P<0.05$ ；^d表示与apr-YTF低剂量组比较， $P<0.05$

3 讨论

线粒体是决定心肌细胞生存率的重要因素，而心肌缺血缺氧会损伤线粒体功能，进而影响心肌细胞的正常运转，因而线粒体功能与MIR1息息相关^[6]。MIR1期间心肌的缺血缺氧会导致心肌细胞内的线粒体产生大量的活性氧（reactive oxygen species, ROS），从而导致钙超载、氧化应激等^[7]，在这些因素协同作用下机体发生线粒体膜电位紊乱、细胞中ATP生成减少、糖酵解反应增强以及氧化磷酸化解偶联^[8]，其实质是三大物质代谢紊乱导致心肌能量发生改变，主要表现为脂肪酸的 β 氧化转向糖酵解，导致心肌障碍、心脏超微结构及功能的异常^[9]。研究表明，心肌能量代谢被破坏以及线粒体功能障碍与心肌重塑相关，而减少缺血再灌注对线粒体的损伤是提高心肌缺血患者治疗效果、改善其预后

的重要措施^[10]。养心通络方具有“扶养心气,和通血脉”的作用,其最早在1989年被用于治疗冠心病心绞痛^[11]。临床研究表明,养心通络方治疗冠心病心绞痛的有效率较高^[4]。本课题组前期研究表明,apr-YTF不仅具有明显的抗心肌缺血、加快血液流动速率、抗动脉粥样硬化的作用,而且对于线粒体损伤有一定的修复作用^[12]。本研究旨在分析不同剂量apr-YTF对MIRI模型大鼠心肌线粒体代谢相关酶及其转运的影响。

在血液流变学中,血浆黏度指标中的任何一项高于参考范围即可判定为血液流变学异常。心肌受损后机体的泵血功能会发生改变,血流速度减慢并处于高凝状态^[13]。血清CK-MB、cTnI、LDH是反映心肌坏死的标志物,对于判断病情的严重程度和预后极为重要。研究表明,MIRI模型大鼠心肌细胞膜的通透性增大,从而释放大量CK-MB、LDH和cTnI到血清中,进而加重大鼠心肌缺血缺氧^[14]。本研究结果显示,模型组全血低切、中切黏度及血清CK-MB、cTnI、LDH水平高于空白对照组,提示模型组大鼠血液处于高凝状态,且心肌受损,再次验证MIRI模型构建成功。

本研究心肌组织病理学检查结果显示,空白对照组大鼠心肌组织结构完整,心肌纤维组织整齐有序,细胞核形态正常;模型组大鼠心肌纤维断裂,排列紊乱,大量细胞核分布于细胞外,心肌间质中可见炎症细胞浸润、水肿;阴性对照组可见心肌纤维断裂;与模型组相比,阳性对照组及apr-YTF低、中、高剂量组心肌水肿明显减轻,炎症细胞数量明显减少;提示apr-YTF可减轻MIRI模型大鼠的心肌损伤程度。

研究显示,心肌长时间缺氧可导致线粒体相关代谢酶活性降低、ATP耗竭及心肌收缩功能受损;无氧条件下机体主要通过糖酵解产生ATP,因此,在心肌缺血缺氧期间,心肌的能量来源主要依靠糖酵解^[15]。而PFK是糖酵解过程中的关键酶^[16]。SDH和IDH是有氧氧化的关键酶,不仅可反映有氧氧化水平,还可反映心肌线粒体相关代谢酶活性^[17]。ANT在线粒体能量生成及利用的过程中发挥着关键作用,其影响着整个细胞能量代谢的全过程^[18]。本研究结果显示,模型组ATP水平低于空白对照组,PFK1、SDH、ANT、IDH水平高于空白对照组,提示MIRI模型大鼠存在线粒体能量代谢功能障碍。本研究结果还显示,阳性对照组及apr-YTF低、中、高剂量组ATP水平高于模型组,SDH水平低于模型组;阳性对照组及apr-YTF中、高剂量组PFK1、ANT、IDH水平低于模型组;提示不同剂量apr-YTF均可有效减轻MIRI模型大鼠线粒体能量代谢功能障碍。此外,apr-YTF中、高剂量组PFK1、ANT、IDH水平低于apr-YTF低剂量组,apr-YTF高剂量组SDH水平低于apr-YTF低剂量组,而apr-YTF中、高剂量组ATP、

PFK1、SDH、ANT、IDH水平比较差异无统计意义,提示中剂量(3.0 ml)、高剂量(6.0 ml) apr-YTF减轻MIRI模型大鼠线粒体能量代谢功能障碍的效果相似,且优于低剂量(1.5 ml) apr-YTF。

心肌缺血再灌注时过度的氧化应激可使细胞内ROS增多和细胞膜的通透性增大,从而导致线粒体功能障碍^[16]。心肌发生急性炎症反应时会释放大量的TNF α IP2,同时产生大量的ROS自由基,从而损伤线粒体内膜^[19]。MIRO1为线粒体衔接蛋白,定位于线粒体外膜上,线粒体损伤后MIRO1发生磷酸化和泛素降解使受损的线粒体与微管分离,从而诱导线粒体功能障碍^[20]。本研究结果显示,模型组心肌组织中TNF α IP2表达水平高于空白对照组,MIRO1表达水平低于空白对照组,提示MIRI模型大鼠可能存在线粒体转运障碍;阳性对照组及apr-YTF中、高剂量组心肌组织中TNF α IP2表达水平低于模型组,阳性对照组及apr-YTF低、中、高剂量组心肌组织中MIRO1表达水平高于模型组,apr-YTF中、高剂量组心肌组织中TNF α IP2表达水平低于apr-YTF低剂量组,而apr-YTF中、高剂量组心肌组织中TNF α IP2、MIRO1表达水平比较差异无统计学意义,提示不同剂量apr-YTF均可有效减轻MIRI模型大鼠线粒体转运障碍,且中剂量(3.0 ml)、高剂量(6.0 ml) apr-YTF的效果相似,均优于低剂量(1.5 ml) apr-YTF。

综上所述,不同剂量apr-YTF均可有效改善MIRI模型大鼠心肌线粒体代谢相关酶,进而减轻线粒体能量代谢功能障碍,其还可减轻线粒体转运障碍;且中剂量(3.0 ml)、高剂量(6.0 ml) apr-YTF的效果相似,均优于低剂量(1.5 ml) apr-YTF。但本研究为基础实验,样本量较小,尚需要大样本量的临床试验进一步验证本研究结论。

作者贡献:尹梦影进行研究的构思与设计、实施与可行性分析,论文撰写及修订,数据分析;曹伟、胡鑫进行数据收集;郑景辉、莫云秋负责质量控制及审校;莫云秋对文章整体负责,监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] LIU H, LIU X, ZHOU J X, et al. Mitochondrial DNA is a vital driving force in ischemia-reperfusion injury in cardiovascular diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 6235747. DOI: 10.1155/2022/6235747.
- [2] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告2021概要 [J]. *中国循环杂志*, 2022, 37(6): 833-854. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3614.2022.06.001.
- [3] PENG J F, SALAMI O M, LEI C, et al. Targeted mitochondrial drugs for treatment of myocardial ischaemia-reperfusion injury [J]. *J Drug Target*, 2022, 30(8): 833-844. DOI:

- 10.1080/1061186X.2022.2085728.
- [4] 郑景辉.养心通脉方研究述评[J].吉林中医药, 2015, 35(2): 187-190.DOI: 10.13463/j.cnki.jlzyy.2015.02.028.
- [5] 黄献平, 袁肇凯, 陈清华, 等.养心通脉方主要与次要有效部位交互作用抗心肌缺血的研究[J].现代生物医学进展, 2009, 9(13): 2505-2507.
- [6] 秦秀男, 秦臻, 冉珂, 等.七氟醚预处理通过线粒体NAD⁺-SIRT3通路减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤[J].中南大学学报(医学版), 2022, 47(8): 1108-1119.DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2022.200708.
- [7] XU J M, BIAN X Y, ZHAO H H, et al.Morphine prevents ischemia/reperfusion-induced myocardial mitochondrial damage by activating δ -opioid receptor/EGFR/ROS pathway[J].Cardiovasc Drugs Ther, 2022, 36(5): 841-857.DOI: 10.1007/s10557-021-07215-w.
- [8] ZHOU B, TIAN R.Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure[J].J Clin Invest, 2018, 128(9): 3716-3726. DOI: 10.1172/JCI120849.
- [9] 王小康, 叶振, 崔永春, 等.容量负荷导致的心肌重构过程中心肌能量代谢模式的转化[J].中国分子心脏病学杂志, 2020, 20(5): 3559-3563.DOI: 10.16563/j.cnki.1671-6272.2020.10.012.
- [10] LI Y, MA Y, DANG Q Y, et al.Assessment of mitochondrial dysfunction and implications in cardiovascular disorders[J].Life Sci, 2022, 306: 120834.DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120834.
- [11] 秦伯未.谦斋医学讲稿[M].上海: 上海科学技术出版社, 1978.
- [12] 郑景辉.基于线粒体脂质-蛋白质组学的养心通脉有效部位方抗大鼠心肌缺血再灌注损伤机制的研究[D].南宁: 广西中医药大学, 2021.
- [13] 郑景辉, 袁肇凯, 莫云秋, 等.心血瘀阻证模型大鼠心肌微环境p38信号通路的变化及在骨髓间充质干细胞移植中的作用[J].中医杂志, 2014, 55(10): 875-878.DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.10.019.
- [14] 郭阳, 徐巧巧, 代金枝.参芍片对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].中成药, 2019, 41(12): 2882-2887.DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.12.011.
- [15] GUAN W, LIU Y, LIU Y, et al.Proteomics research on the protective effect of mangiferin on H9C2 cell injury induced by H₂O₂[J].Molecules, 2019, 24(10): 1911.DOI: 10.3390/molecules24101911.
- [16] WANG J, ZHOU H.Mitochondrial quality control mechanisms as molecular targets in cardiac ischemia-reperfusion injury[J].Acta Pharm Sin B, 2020, 10(10): 1866-1879.DOI: 10.1016/j.apsb.2020.03.004.
- [17] 王静, 贾凌梅, 刘畅, 等.养心定悸胶囊在缺血再灌注损伤心肌组织中的保护作用研究[J].河北医学, 2021, 27(7): 1191-1197.DOI: 10.3969/j.issn.1006-6233.2021.07.029.
- [18] IGAMBERDIEV A U, KLECZKOWSKI L A.Optimization of ATP synthase function in mitochondria and chloroplasts via the adenylate kinase equilibrium[J].Front Plant Sci, 2015, 6: 10.DOI: 10.3389/fpls.2015.00010.
- [19] 李喆, 吕建瑞, 周华成.吸入高浓度氢气对大鼠肺缺血再灌注损伤的影响[J].临床肺科杂志, 2022, 27(12): 1896-1899.DOI: 10.3969/j.issn.1009-6663.2022.12.022.
- [20] DI RITA A, PESCHIAROLI A, D ACUNZO P, et al.HUWE1 E3 ligase promotes PINK1/PARKIN-independent mitophagy by regulating AMBRA1 activation via IKK α [J].Nat Commun, 2018, 9(1): 3755.DOI: 10.1038/s41467-018-05722-3.
- (收稿日期: 2023-01-12; 修回日期: 2023-03-31)
(本文编辑: 崔丽红)

(上接第86页)

- [7] 景乐乐, 王中群, 胡惠林.肠道菌群代谢物TMAO对糖尿病冠状动脉钙化的预测价值[J].中南医学科学杂志, 2022, 50(1): 17-20.DOI: 10.15972/j.cnki.43-1509/r.2022.01.004.
- [8] CROYAL M, SAULNIER P J, AGUESSE A, et al.Plasma trimethylamine N-oxide and risk of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes[J].J Clin Endocrinol Metab, 2020, 105(7): dgaa188.DOI: 10.1210/clinem/dgaa188.
- [9] VELMURUGAN G, DINAKARAN V, RAJENDHRAN J, et al.Blood microbiota and circulating microbial metabolites in diabetes and cardiovascular disease[J].Trends Endocrinol Metab, 2020, 31(11): 835-847.DOI: 10.1016/j.tem.2020.01.013.
- [10] SHANAHAN F, GHOSH T S, O'TOOLE P W.The healthy microbiome—what is the definition of a healthy gut microbiome?[J].Gastroenterology, 2021, 160(2): 483-494.DOI: 10.1053/j.gastro.2020.09.057.
- [11] 龙厚东, 陈晓旦, 郭善禹, 等.血清D-乳酸、HDC、PCT联合检测对腹部手术患者肠道屏障受损的预测价值[J].国际检验医学杂志, 2021, 42(9): 1037-1041, 1045.DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.09.004.
- [12] 谭展飞, 张业昊, 李浩, 等.颈动脉粥样硬化患者单核细胞亚群、血脂水平与血管内皮功能关联分析[J].中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35(10): 749.DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2021.10.052.
- [13] HAGHIKIA A, LI X S, LIMAN T G, et al.Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide predicts risk of cardiovascular events in patients with stroke and is related to proinflammatory monocytes[J].Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018, 38(9): 2225-2235.DOI: 10.1161/ATVBAHA.118.311023.
- [14] WIERTSEMA S P, VAN BERGENHENEGOUWEN J, GARSSEN J, et al.The interplay between the gut microbiome and the immune system in the context of infectious diseases throughout life and the role of nutrition in optimizing treatment strategies[J].Nutrients, 2021, 13(3): 886.DOI: 10.3390/nu13030886.
- [15] VISHNYAKOVA P, POLTAVETS A, KARPULEVICH E, et al.The response of two polar monocyte subsets to inflammation[J].Biomedicine Pharmacother, 2021, 139: 111614.DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111614.
- (收稿日期: 2023-01-08; 修回日期: 2023-05-12)
(本文编辑: 谢武英)