曹程浩,韩丽华,张会超. 基于 AMPK 介导的线粒体自噬分析温阳益气方改善大鼠梗死后心衰的药理机制［J］. 中国比较医学杂志, 2019, 29(12): 39-44.
Cao CH, Han LH, Zhang HC. To ameriorate the post-infarction heart failure in rats with a traditional Chinese medicine, Wenyang-Yiqi recipe, and to analyze its pharmacological mechanism by AMPK-mediated mitochondrial autophagy［J］. Chin J Comp Med, 2019, 29(12): 39-44.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 12. 006

基于 AMPK 介导的线粒体自噬分析温阳益气方改善大鼠梗死后心衰的药理机制

曹程浩,韩丽华*,张会超

(河南省中医院心病科,郑州　450000)

【摘要】 **目的**　观察温阳、益气方药对梗死后心力衰竭大鼠模型腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)介导的线粒体自噬的影响,完善其药理机制提供数据支撑。**方法**　将 100 只健康 SPF 级大鼠随机分为 5 组,各组 20 只。除对照组和假手术组以外,均采用冠状动脉结扎法制备梗死后心力衰竭大鼠模型。模型制备成功后,中药干预组采用温阳益气方灌胃,AMPK 激动组在温阳益气方灌胃的基础上肌肉注射 AMPK 激动剂 EX229。干预 4 周,测定左室射血分数(LEVF)与心脏/体重比;采用线粒体呼吸机测定线粒体呼吸控制比(RCR),采用 WB 实验测定磷酸化 AMPK/非磷酸化 AMPK(p-AMPK/AMPK)及自噬标志物微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3II/LC3I)、PINK1、Parkin 的蛋白表达。**结果**　与对照组比较,模型组和 AMPK 激动组心脏/体重比明显升高,state3 呼吸速率与 RCR 明显降低;与模型组比较,中药组心脏/体重比降低,state3 呼吸速率与 RCR 升高;差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,模型组、中药组和 AMPK 激动组心肌组织 p-AMPK/AMPK、LC3II/LC3I、PINK1 及 Parkin 蛋白表达水平升高;与模型组相比,中药组 p-AMPK/AMPK、LC3II/LC3I、PINK1 及 Parkin 蛋白表达水平降低;组间差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论**　温阳、益气方药能够改善梗死后心衰大鼠的心肌功能,其作用机制可能与抑制 AMPK 介导的线粒体自噬有关。

【关键词】 线粒体自噬;心肌梗死;心力衰竭;温阳益气;大鼠
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2019) 12-0039-06

To ameriorate the post-infarction heart failure in rats with a traditional Chinese medicine, Wenyang-Yiqi recipe, and to analyze its pharmacological mechanism by AMPK-mediated mitochondrial autophagy

CAO Chenghao, HAN Lihua*, ZHANG Huichao
(Department of Cardiology, Henan Traditional Chinese Medicine Hospital, Zhengzhou 450000, China)

【**Abstract**】 **Objective**　To observe the effects of the traditional Chinese medicine (TCM), Wenyang-Yiqi recipe, on post-infarction heart failure in rats, and to investigate its pharmacological mechanism by AMPK-mediated mitochondrial autophagy. **Methods**　A total of 100 healthy SPF rats were randomly divided into five groups ($n=20$ per group): control group, sham-operated group, model group, TCM intervention group, and AMPK agonist group. The rat model of post-

[基金项目]国家自然科学基金项目(813736210); 河南省高等学校重点科研项目计划(15B360006)。
[作者简介]曹程浩(1977—)男,硕士研究生,主治医师,研究方向:主要从事中医内科心血管方向研究。E-mail: cch7711@163.com
[通信作者]韩丽华(1956—)女,本科,主任医师,研究方向:中医内科心血管方向。E-mail: hlhaa@sina.com

infarction heart failure was established by coronary artery ligation except for the control group and the sham operation group. Then, the TCM intervention group was given Wenyang-Yiqi recipe, 0.10 mL/kg by intragastric gavage once a day for four weeks, while the AMPK agonist group received the same dose of Wenyang-Yiqi recipe plus an intramuscular injection of EX229 at the same time. After 4 weeks of intervention, the left ventricular ejection fraction (LEVF) and heart/body weight ratio of the rats were measured. The mitochondrial respiratory control ratio (RCR) was determined by a mitochondrial ventilator, and the protein expressions of p-AMPK/AMPK, LC3II/LC3I, PINK1 and Parkin were determined by western blotting assay. **Results** Compared with the control group, the heart/body weight ratio of the model group and AMPK agonist group was increased, while the state3 respiratory rate and RCR were decreased. Compared with the model group, the heart/body weight ratio of the TCM intervention group was decreased, while the state3 respiratory rate and RCR were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the control group, the expression levels of p-AMPK/AMPK, LC3II/LC3I, PINK1 and Parkin in the myocardial tissue of the model group, TCM intervention group and AMPK agonist group were significantly increased, and compared with the model group, the expression levels of p-AMPK/AMPK, LC3II/LC3I, PINK1 and Parkin proteins in the TCM intervention group were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusions** The traditional Chinese medicine Wenyang-Yiqi recipe improves the myocardial function of rats with post-infarction heart failure, and the mechanism might be related to the inhibition of AMPK-mediated mitochondrial autophagy.

【**Keywords**】 mitochondrial autophagy; myocardial infarction; heart failure; traditional Chinese medicine; Wenyang-Yiqi recipe; rat

慢性充血性心力衰竭(简称心衰)是各种心脏病的终末阶段,多发生于中老年人,长期的缺血和再灌注损伤导致心肌细胞坏死,心肌组织纤维化增生和心室结构重塑,患者 5 年内病死率极高[1]。近年,线粒体自噬与心血管疾病的关系受到广泛关注,心力衰竭患者心脏组织活检结果显示自噬标志物微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)Ⅱ表达升高,且其变化程度可能受到线粒体融合蛋白 2 的调控[2]。进一步研究表明,适当的线粒体自噬对清除功能丧失线粒体,维持心肌细胞能量供应至关重要,线粒体自噬活性过高则可能清除健康线粒体导致能量供应不足和代谢功能障碍[3]。本课题组应用温阳益气方治疗心衰多年,并证实该药在改善梗死后心衰大鼠的心室重构方面具有积极作用,但其药理机制尚不明确。本研究从线粒体自噬入手,观察温阳益气方对梗死后大鼠腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)介导的线粒体自噬的影响,为完善其药理机制奠定数据支撑。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康清洁级 Wistar 大鼠 100 只,雌雄各半,月龄 6~8,体重(220±20)g,购自山东鲁抗动物中心[SCXK(鲁)2015-0001]。所有大鼠饲养于河南中医药大学动物房[SYXK(豫)2015-0017],常规饲养,自由进食进水,温度 22℃~25℃,湿度 40%~60%。本研究经河南中医药大学动物实验伦理委员会批准(审批号:20151016),实验期间按照 3R 原则给予实验动物人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

温阳益气方:为自制中药粉剂,每 1 g 干粉含有原生药 3 g,其中附子 0.50 g,肉桂 0.50 g,红参 1.0 g,黄芪 1.0 g。AMPK 激动剂 EX229(美国 Selleck Chemicals 公司,批号 20150122);戊巴比妥钠(北京岚泰化工科技有限公司,批号 20141125);总蛋白质抽提试剂盒、BCA 蛋白质定量试剂盒、ECL 显色试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司,批号依次为 20150608、20151122、20141122);自噬相关标志物 p-AMPK、AMPK、LC3II、LC3I、PINK1、Parkin、β-actin 一抗(美国 Santa Cruz 公司,批号 sc-16315、sc-151144、sc-160532、sc-150861、sc-14855、sc-160213、sc15433);辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(美国 Abbkine 公司,批号 A21013);线粒体提取试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20150316)。大鼠解剖板(上海玉研科学仪器有限公司);垂直电泳和电转印装置(伯乐生命医学产品(上海)有限公司);台式低速冷冻离心机(湖南凯达科学仪器有限公司);倒置显微镜(德国奥林巴斯);线粒体呼吸测定仪(英国汉莎仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备与评价方法

所有大鼠随机分为 5 组:对照组、假手术组、模型组、中药组、AMPK 激动组。模型组、中药组、

AMPK 激动组均采用冠状动脉结扎法制备梗死后心力衰竭模型,模型制备过程中连接小动物呼吸机维持呼吸,心电监护。结扎左冠状动脉后观察心电图,待结扎部位明显缺血,Ⅱ导联 ST 段持续抬高时,说明心肌梗死模型制备成功,此时可沿软管空心剪除结扎线。归纳心脏,依次缝合伤口,无菌敷料包扎,常规抗生素预防感染。对照组不予以任何手术,正常饲养,假手术组仅给与开胸和剥离冠状动脉的刺激,不结扎。术后第 2 天,心脏超声心动图测试左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF),≤50%者为梗死后心衰模型成功标准。剔除死亡鼠和模型制备失败鼠,对照组、假手术组、模型组、中药组、AMPK 激动组获得的大鼠分别为 20 只、19 只、16 只、17 只、17 只。

1.3.2　药物干预方法

模型制备成功的大鼠进行药物干预,中药组予以自制的温阳益气方干粉,取 2 g 溶于 100 mL 水,按每天 0.10 mL/kg 大鼠灌胃。AMPK 激动组在温阳益气方灌胃的基础上肌肉注射 EX229,用量为每天 2.0 mg/kg,相当于成人剂量的 8 倍。对照组、假手术组和模型组予以相同条件的溶剂或溶媒刺激,共干预 4 周,每周称重、测定 LVEF。

1.3.3　取材方法和实验分配

药物干预完毕第 2 天取材,各组随机取 5 只大鼠,取心脏,生理盐水冲洗干净,吸水纸吸除水分,测定心脏重量,计算心脏/体重比。再随机取 5 只,取心肌组织,提取线粒体,测定用于线粒体活性。最终对照组、假手术组、模型组、中药组、AMPK 激动组剩余数量为 10 只、9 只、6 只、7 只、7 只,用于测定自噬标志物及 AMPK 的蛋白表达。

1.3.4　线粒体活性测定方法

取左心室心肌组织,生理盐水冲洗干净血液,置于 EP 管,电动匀浆,采用线粒体提取试剂盒提取线粒体,操作步骤严格按照说明书要求进行。所得线粒体采用线粒体呼吸仪测定 state 3 的呼吸速率和 state 4 的呼吸速率,计算线粒体呼吸控制比(respiratory control ratio, RCR)。RCR = state 3 / state 4。

1.3.5　自噬标志物和 AMPK 表达的测定方法

取左心室心肌组织,采用总蛋白质抽提试剂盒提取蛋白质,采用免疫蛋白印记(WB)实验测定磷酸化 AMPK(p-AMPK)、AMPK、微管相关蛋白 1 轻链 3B(LC3B,含 LC3II、LC3I 双条带)、磷酸酶基因诱导假定激酶 1(PINK1)、Parkin、β-actin(内参)的蛋白表达水平。主要步骤:配置 SDS-聚丙烯酰胺凝胶和电泳液,预电泳清除胶内杂质,每个电泳通道加入 10 μg 蛋白,再 90 V 电泳 1 h。将 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中的蛋白转印至硝酸纤维素膜,1.0%的丽春红染液观察条带分离度。4%脱脂牛奶封闭 90 min,抗体孵育,一抗孵育浓度为 1∶1500~1∶2500,4℃摇床过夜;PBST 液清洗后二抗孵育,二抗孵育浓度为 1∶2000~1∶2500,37℃摇床 90 min。ECL 显色,暗室显影,采用影像学分析软件 Image J 分析 p-AMPK/AMPK、LC3II/LC3I、PINK1/β-actin 及 Parkin/β-actin 的灰度值。

1.4　统计学分析

所有数据均采用统计学软件 SPSS 19.0 进行分析,计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,本组符合正态分布,3 组之间的比较采用 one-way ANOVA 法分析,有统计学差异者进一步采用 LSD-t 检验分析两两间的差异;$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　模型制备结果

不同时间点的大鼠体重和 LVEF 如表 1 和表 2 所示,各组大鼠基线值差异无统计学意义($P>0.05$)。T1~T2,与对照组相比,模型组 LVEF 降低($P<0.01$),体重变化不明显($P>0.05$);与模型组相比,其余各组变化不明显($P>0.05$)。T3~T5,与对照组相比,模型组体重和 LVEF 均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组相比,中药组体重和 LVEF 均升高,组间差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.2　心脏/体重比

与对照组比较,模型组心脏/体重比明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,中药组和 AMPK 激动组变化不大($P>0.05$),见表 3。

2.3　心肌组织线粒体活性

与对照组相比,模型组 state3 呼吸速率与 RCR 降低($P<0.01$);与模型组相比,中药组 state3 呼吸速率与 RCR 升高($P<0.05$),其余各组变化不大($P>0.05$),见表 4。

2.4　线粒体自噬标志物

与对照组比较,模型组心肌组织 p-AMPK/AMPK、LC3II/LC3I、PINK1 及 Parkin 蛋白表达水平升高($P<0.01$);与模型组相比,中药组 p-AMPK/

AMPK、LC3II/LC3I、PINK1 及 Parkin 蛋白表达水平 ($P>0.05$),见表 5、图 1。
降低($P<0.01$),其余各组差异无统计学意义

表 1 各组大鼠不同时间段体重($\bar{x}\pm s$,$n=5$,g)

Table 1 The weight of rats in each groups at different time periods

组别 Groups	T0	T1	T2	T3	T4	T5
对照组 Control group	220.3±20.3	235.6±18.2	253.5±21.3	264.3±20.6	275.5±22.6	287.5±23.6
假手术组 Sham-operated group	221.2±22.5	232.6±16.5	250.2±21.3	263.3±21.2	275.0±21.3	285.6±21.5
模型组 Model group	222.5±19.6	233.0±18.2	240.3±20.3	249.5±20.61[1)]	255.3±18.71[1)]	261.2±19.11[1)]
中药组 TCM group	220.6±22.3	232.1±19.2	242.1±19.6	252.3±19.33[3)]	262.3±19.23[3)]	271.3±18.23[3)]
AMPK 激动组 AMPK agonist group	222.3±19.2	233.6±19.2	241.3±21.3	247.2±19.3	254.6±20.3	258.6±20.1

注:T0:基线值;T1:模型制备后、药物干预前;T2:药物干预 1 周;T3:药物干预 2 周;T4:药物干预 3 周;T5:药物干预 4 周。与对照组比较,[1)] $P<0.05$,[2)] $P<0.01$;与模型组比较,[3)] $P<0.05$,[4)] $P<0.01$。

Note. T0, base line; T1, after model preparation and before drug intervention; T2, 1 week after drug intervention; T3, 2 weeks after drug intervention; T4, 3 weeks after drug intervention; T5,4 weeks after drug intervention. Compared with the control group,[1)] $P<0.05$, [2)] $P<0.01$. Compared with the model group, [3)] $P<0.05$, [4)] $P<0.01$.

表 2 各组大鼠不同时间段 LVEF($\bar{x}\pm s$,$n=5$,%)

Table 2 The LVEF of rats in each groups at different time periods

组别 Groups	T0	T1	T2	T3	T4	T5
对照组 Control group	72.3±6.2	73.1±5.6	72.5±7.0	73.2±6.2	71.6±6.8	73.8±6.5
假手术组 Sham-operated group	71.5±5.6	72.3±5.8	71.9±6.2	73.3±7.0	73.5±6.0	73.6±7.1
模型组 Model group	71.8±6.0	38.3±4.6 [2)]	39.6±5.6 [2)]	41.6±5.1 [2)]	41.6±5.5 [2)]	40.8±6.8 [2)]
中药组 TCM group	72.6±6.3	39.2±5.0	41.3±6.8	48.2±6.2 [4)]	52.6±6.5 [4)]	53.6±6. 24[4)]
AMPK 激动组 AMPK agonist group	72.3±7.2	37.9±6.9	39.2±6.7	40.1±5.6	40.8±7.1	41.2±7.0

注:T0:基线值;T1:模型制备后、药物干预前;T2:药物干预 1 周;T3:药物干预 2 周;T4:药物干预 3 周;T5:药物干预 4 周。与对照组比较,[1)] $P<0.05$,[2)] $P<0.01$;与模型组比较,[3)] $P<0.05$,[4)] $P<0.01$。

Note. T0, base line; T1, after model preparation and before drug intervention; T2, 1 week after drug intervention; T3, 2 weeks after drug intervention; T4, 3 weeks after drug intervention; T5, 4 weeks after drug intervention. Compared with the control group, [1)] $P<0.05$, [2)] $P<0.01$. Compared with the model group, [3)] $P<0.05$, [4)] $P<0.01$.

表 3 各组大鼠心脏/体重比($\bar{x}\pm s$,$n=5$)

Table 3 Heart/body weight ratio of the rats in each group

组别 Groups	心脏/体重比 heart weight/body weight ratio (HW/BW)
对照组 Control group	0.344±0.045
假手术组 Sham-operated group	0.351±0.039
模型组 Model group	0.407±0.041 [1)]
中药组 TCM group	0.375±0.039
AMPK 激动组 AMPK agonist group	0.411±0.044 [1)]

注:与对照组比较,[1)] $P<0.05$,[2)] $P<0.01$;与模型组比较,[3)] $P<0.05$,[4)] $P<0.01$。

Note. Compared with the control group, [1)] $P<0.05$, [2)] $P<0.01$. Compared with the model group, [3)] $P<0.05$, [4)] $P<0.01$.

表 4 各组大鼠心肌组织线粒体活性比较($\bar{x}\pm s$,$n=5$)

Table 4 Comparison of mitochondrial activity in myocardial tissues of the rats in each group

组别 Groups	状态 3 State3 (nmol O_2/(min·mg pro))	状态 4 State4 (nmol O_2/(min·mg pro))	呼吸控制比 RCR
对照组 Control group	46.3±5.01	8.26±1.22	5.61±0.66
假手术组 Sham-operated group	45.2±4.03	8.35±1.07	5.41±0.57
模型组 Model group	34.5±4.22[2)]	8.33±1.11	4.14±0.60[2)]
中药组 TCM group	40.6±4.09 [3)]	8.15±1.09	4.98±0.50 [3)]
AMPK 激动组 AMPK agonist group	34.4±3.85[2)]	8.41±0.95	4.09±0.55

注:与对照组比较,[1)] $P<0.05$,[2)] $P<0.01$;与模型组比较,[3)] $P<0.05$,[4)] $P<0.01$。

Note. Compared with the control group, [1)] $P<0.05$, [2)] $P<0.01$. Compared with the model group, [3)] $P<0.05$, [4)] $P<0.01$.

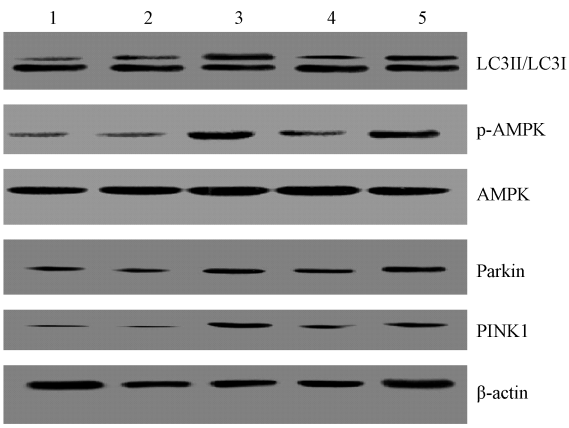
表 5　各组大鼠心肌组织 p-AMPK/AMPK 和线粒体自噬标志物表达比较

Table 5　Comparison of the expressions of p-AMPK/AMPK and mitochondrial autophagy markers in myocardial tissue of the rats in each group

组别 Groups	*n*	磷酸化与非磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶比值 p-AMPK/AMPK	微管相关蛋白 3II 型与 3 I 型比值 LC3II/LC3I	磷酸酶基因诱导假定激酶 1 PINK1	帕金蛋白 Parkin
对照组 Control group	10	0.085±0.021	0.066±0.016	0.011±0.015	0.025±0.011
假手术组 Sham-operated group	9	0.096±0.018	0.074±0.017	0.009±0.010	0.033±0.016
模型组 Model group	6	0.468±0.054 [2)]	0.411±0.038 [2)]	0.204±0.033 [2)]	0.212±0.025 [2)]
中药组 TCM group	7	0.135±0.027 [4)]	0.189±0.022 [4)]	0.088±0.012 [4)]	0.135±0.0174 [)]
AMPK 激动组 AMPK agonist group	7	0.447±0.050	0.442±0.045	0.195±0.026	0.227±0.035

注：与对照组比较，[1)] $P<0.05$，[2)] $P<0.01$；与模型组比较，[3)] $P<0.05$，[4)] $P<0.01$。

Note. Compared with the control group, [1)] $P<0.05$, [2)] $P<0.01$. Compared with the model group, [3)] $P<0.05$, [4)] $P<0.01$.



注：1：对照组；2：假手术组；3：模型组；4：中药组；5：AMPK 激动组。LC3II/LC3I 为 LC3B 抗体的两条条带，以比值作为 LC3B 的活性。

图 1　心肌组织 p-AMPK/AMPK 和线粒体自噬标志物 Western blot 图

Note: 1, Control group; 2, Sham-operated group; 3, Model group; 4, TCM group; 5, AMPK agonist group. LC3II and LC3I are two bands of LC3B antibody, and their ratio is used as the activity of LC3B.

Figure 1　Results of Western blotting of p-AMPK/AMPK and mitophagy markers in the rat myocardial tissues

3　讨论

慢性充血性心力衰竭属“胸痹”范畴，张仲景在《金匮要略》中将“胸痹”的病因病机概括未为“阳微阴弦”，主张治以散寒、宣痹和化湿。至明清时期，有医家认为胸痹的病机与血瘀有关，提出以活血化瘀为主的治疗方法。现代中医学认为，胸痹病机为本虚标实，本虚有气虚、阴虚、阳虚等，以气虚最为常见，标实有血瘀、气滞、痰浊等，以血瘀最为显著[4]。本研究所用温阳益气方由附子、肉桂、红参、黄芪四味中药组成，其中附子味辛、甘，性大热，可回阳救逆，补火助阳，散寒止痛，现代药理学研究表明，附子可增强心肌收缩力，扩张血管，改善血液循环，其回阳救逆功能主要源于其强心、抗休克作用。肉桂味辛、甘，性大热，有散寒止痛，温通经脉之效，现代药理学研究证实，肉桂具有扩血管和降压的作用，可用于心脑血管疾病的日常保健。红参和黄芪均为补益良药，其中红参大补元气、复脉固脱、益气摄血，适用于各种虚劳之证，而黄芪益可补气升阳，益气固表，脱毒生肌，适用于各种气衰血虚。各方药协同作用，行气、活血、温阳、补虚，可达标本兼治之效。

目前已有学者从抗炎、抗纤维化、抗心肌细胞损伤与凋亡等方向揭示了益气活血方治疗梗死后心衰的机制[5-7]。细胞自噬是指细胞吞噬并降解自身细胞器及大分子蛋白质的一种机制，是细胞回收利用胞内成分，完成物质转运和更新的重要途径[8]。线粒体是真核生物合成 ATP 的主要场所，细胞 ATP 不足可促进 AMPK 磷酸化，进而抑制雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamyein，mTOR）促进细胞自噬，AMPK 是介导线粒体自噬的关键分子之一[9]。心肌组织属于线粒体富集组织，能量代谢活跃，在心衰的病理进程中，反复的缺血缺氧性损伤和缺血再灌注损伤极易破坏心肌细胞线粒体，目前研究已证实[10-11]，AMPK 介导的线粒体自噬是梗死后心衰病理机制的重要组成部分。

本研究采用左冠状动脉结扎的方法制备梗死后心衰大鼠模型，模型制备后，大鼠体重增长减慢，心脏重量增加，整体心脏/体重比有所升高。国内学者张世田等[12]指出，梗死后心力衰竭大鼠心脏体积增大，非梗死区心肌肥厚，前壁变薄，心室内壁出现不均匀增生，偶见壁瘤。本研究在模型制备后 4 周测量心脏/体重比，发现在模型制备 4 周时，大鼠心脏体积已有增大趋势。中药干预后，大鼠 LVEF 和体重有所升高，心脏/体重比降低，初步证实温阳益气方对缓解大鼠心室重构和提高心肌功能有积极作用。进一步研究发现，温阳益气方的这一作用

可被 AMPK 激动剂所拮抗,说明其药理机制可能与 AMPK 有关。

为观察温阳益气方的药理作用是否与 AMPK 以及 AMPK 介导的线粒体自噬有关,研究对心肌组织的线粒体活性、p-AMPK/AMPK 蛋白表达、自噬标志物 LC3II/LC3I、PINK1、Parkin 蛋白表达均做了测定。从线粒体活性的测定结果来看,模型组大鼠的线粒体呼吸功能减弱,温阳益气方可改善线粒体功能,且其作用可被 AMPK 激动剂拮抗。之所以测定 p-AMPK/AMPK 的蛋白表达比,是因为 p-AMPK 是 AMPK 的主要活性形式,这一比值可代表 AMPK 的活化程度[13],AMPK 激动剂也正是通过促进 AMPK 来发挥作用。LC3 是细胞自噬的经典标志物,其中 LC3II 为胞浆型,不具有自噬活性,而 LC3I 为膜型,是自噬激活的标志,LC3II/LC3I 是目前公认的较成熟的自噬标志物,在心力衰竭、冠状动脉粥样硬化、心肌病中,均发现了 LC3II/LC3I 的异常表达[14-15]。有学者指出,过高的 LC3II/LC3I 表达水平与缺血组织再灌注损伤程度密切相关,可作为衡量患者预后的一个重要指标[16]。本研究发现梗死后心衰大鼠的心肌组织 p-AMPK/AMPK 和 LC3II/LC3I 表达同时升高,支持 AMPK 介导的细胞自噬参与梗死后心衰病理机制这一观点。

考虑到 LC3II/LC3I 不是线粒体自噬的特异性标志物,研究对 PINK1 与 Parkin 也做了测定。线粒体自噬与其他细胞自噬类似,受到多种外膜受体的的调控,包括 BNIP3、NIX、FUNDC1、PINK1 等,目前研究较成熟的是 PINK1[17]。PINK1 介导的线粒体自噬主要用于清除受损线粒体,正常线粒体外膜 PINK1 可被跨膜转运至线粒体内部进行降解,含量极低[18]。Parkin 是一种 E3 泛素酶,主要存在于细胞浆中。当线粒体受损后,PINK1 聚集于外膜,募集 parkin 而启动线粒体自噬[19]。本研究结果证实 PINK1 与 Parkin 的表达水平与 LC3II/LC3I 一致,在模型组中显著升高,中药干预后得到降低,且中药干预效果能被 AMPK 激动剂所阻断。证实 AMPK 介导的线粒体自噬可能是温阳益气方发挥药理作用的重要环节。

综上所述,温阳、益气方药能够改善梗死后心衰大鼠的心肌功能,其作用机制可能与抑制 AMPK 介导的线粒体自噬有关。

参考文献:

[1] 林红, 何媛媛, 亓凯. 不同病因心衰患者低密度脂蛋白水平和全因死亡率的关系 [J]. 医药论坛杂志, 2018, 39(8): 21-24.

[2] 李凤娇, 顾雯, 俞捷, 等. 线粒体自噬机制、相关疾病及中药对其调节作用的研究进展 [J]. 中国药房, 2018, 29(20): 2865-2871.

[3] 王建礼, 刘秀华. 线粒体自噬与心肌保护 [J]. 生理科学进展, 2016, 47(3): 215-218.

[4] 成青莲. 益气活血方对冠心病稳定型心绞痛(气虚血瘀证)运动耐量的影响 [D]. 河南: 河南中医药大学; 2018.

[5] 易建光. 益气活血方对早期心衰大鼠心脏重塑影响及心脏细胞形态变化研究 [J]. 四川中医, 2018, 36(5): 59-62.

[6] 钟伟, 韩蕊, 区少兰, 等. 益气活血方对慢性心衰患者 RAAS 系统及炎性因子的影响 [J].中国处方药, 2014, 12(8): 116-117.

[7] 邢俊娥, 吴鹏, 杨清华, 等. 益气活血方对气虚血瘀型心衰大鼠心肌细胞凋亡的影响 [J].湖北中医杂志, 2017, 39(3): 5-7.

[8] 王瑜, 王天龙, 赵磊, 等. 局部脑缺血再灌注损伤对小鼠 TMEM166 基因和神经细胞自噬的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(7): 28-32.

[9] 王培, 付宇, 郑恒, 等. 线粒体自噬与疾病 [J]. 河北医科大学学报, 2018, 39(7): 853-857.

[10] 王凯, 夏中元. 线粒体自噬在心肌缺血再灌注损伤中的研究进展 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2017, 9(10): 1266-1268.

[11] Kong HL, Hou AJ, Liu NN, et al. The effects of ginsenoside Rb1 on fatty acid beta-oxidation, mediated by AMPK, in the failing heart [J]. Iran J Basic Med Sci, 2018, 21(7): 731-737.

[12] 张世田, 庞路路, 唐汉庆, 等. 大鼠心肌缺血模型制备方法的比较及改进浅析 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(7): 98-101.

[13] Li X, Liu J, Lu Q, et al. AMPK: A therapeutic target of heart failure-not only metabolism regulation [J]. Biosci Rep, 2019, 39(1): 1-17.

[14] Wang R, Hu H, Guo J, et al. Nano-hydroxyapatite modulates osteoblast differentiation through autophagy induction via mTOR signaling pathway [J]. J Biomed Nanotechnol, 2019, 15(2): 405-415.

[15] Su F, Shi M, Zhang J, et al. Simvastatin protects heart from pressure overload injury by inhibiting excessive autophagy [J]. Int J Med Sci, 2018, 15(13): 1508-1516.

[16] 温建麟, 黄锋, 曾志羽. 线粒体自噬在心肌缺血再灌注损伤中作用的研究进展 [J]. 山东医药, 2018, 58(17): 84-86.

[17] 郎秀娟, 王燕. PIN K1/parkin 通路调控线粒体自噬机制的研究进展 [J]. 微生物与感染, 2018, 13(2): 102-106.

[18] 尚画雨, 张荷, 夏志, 等. PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬在运动性骨骼肌损伤中的作用 [J]. 上海体育学院学报, 2018, 42(3): 103-110.

[19] 谭淑娜, 冯津萍, 冯超, 等. 曲美他嗪对心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌自噬水平的影响 [J]. 天津医药, 2018, 46(2): 152-156,225.

〔收稿日期〕2019-04-24