

● 实验研究 ●

强心安神方对阿霉素致大鼠心肌损伤模型 心肌细胞能量代谢的影响

李茹¹, 颜旭², 吴玉华², 刘春华², 曹文², 何亚辉², 庄红², 张艳², 赵启²

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙, 410208;

2. 湖南省中医药研究院附属医院, 湖南 长沙, 410006)

[摘要] 目的:通过研究强心安神方对阿霉素性心肌损伤大鼠模型心肌酶、心肌细胞线粒体呼吸功能和细胞色素C氧化酶活性(COX)的影响,探讨该药的作用机制。方法:将Wistar大鼠分为正常对照组、模型组、西药组及强心安神方低、高剂量组,对除正常对照组外的其余组大鼠采用腹腔注射阿霉素法制备心肌损伤模型,予药物干预4周,检测各组大鼠血清心肌酶[包括肌酸激酶同工酶(CK-MB)及乳酸脱氢酶(LDH)的表达,提取大鼠心肌细胞线粒体测定线粒体呼吸功能(呼吸控制比,RCR)及COX活性。结果:与正常对照组比较,模型组CK-MB、LDH表达均升高,COX活性增加,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);强心安神方高、低剂量组大鼠各项指标与西药组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),强心安神方高、低剂量组之间各项指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:强心安神方对损伤心肌细胞的保护作用可能与其降低CK-MB及LDH、改善心肌细胞线粒体呼吸功能及COX活性有关。

[关键词] 心肌损伤;强心安神方;心肌酶;细胞色素C氧化酶;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.12.044

Effect of Qiangxin Anshen prescription on energy metabolism in cardiomyocytes in a rat model of myocardial injury induced by adriamycin

LI Ru¹, YAN Xu², WU Yuhua², LIU Chunhua², CAO Wen², HE Yahui², ZHUANG Hong², ZHANG Yan², ZHAO Qi²

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China;

2. The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the mechanism of action of Qiangxin Anshen prescription by observing its effect on myocardial enzymes, mitochondrial respiratory function in cardiomyocytes, and cytochrome C oxidase (COX) activity in a rat model of myocardial injury induced by adriamycin. Methods: Wistar rats were divided into normal control group, model group, Western medicine group, and low- and high-dose Qiangxin Anshen prescription groups. All rats except those in the normal control group were given intraperitoneal injection of adriamycin to establish a model of myocardial injury. Drug intervention was performed for 4 weeks. Serum levels of myocardial enzymes, including creatine kinase-MB (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH), were measured, and cardiomyocyte mitochondria was collected to measure mitochondrial respiratory function [respiratory control ratio (RCR)] and COX activity. Results: Compared with the normal control group, the model group had significant increases in the expression of CK-MB and LDH and the activity of COX ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). There were significant differences in the above indices between the low- and high-dose Qiangxin Anshen prescription groups and the Western medicine group ($P < 0.05$), while there were no significant differences in these indices between the low- and high-dose Qiangxin Anshen prescription groups ($P > 0.05$). Conclusion: Qiangxin Anshen prescription can exert a protective effect on injured cardiomyocytes, possibly by reducing CK-MB and LDH and improving mitochondrial respiratory function and COX activity.

[Key words] myocardial injury; Qiangxin Anshen prescription; myocardial enzyme; cytochrome C oxidase; experimental study

基金项目: 湖南省中医药科研基金资助项目(编号:2013122); 湖南省自然科学基金科卫联合基金资助项目(编号:2019JJ80114); 湖南省中医药研究院院级重点课题(编号:201703)

第一作者: 李茹,女,2017级硕士研究生,研究方向:中医药防治心血管疾病

通讯作者: 颜旭,男,中医学博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:中医药防治心血管疾病, E-mail: yanxu0116@163.com

恶性肿瘤是仅次于心脑血管疾病的一种常见病及多发病。随着医疗技术的进步,目前肿瘤患者的 5 年存活率已超过 70%,其中化疗药物的作用功不可没。蒽环类化疗药物包括阿霉素、柔红霉素、米托蒽醌等,对于急性白血病、霍奇金病和非霍奇金淋巴瘤、乳腺癌等,该类药物治疗上具有不可替代的作用。然而,蒽环类药物及其联合的化疗方案具有明显的心脏毒性,客观上限制了临床使用。我院心内科及肿瘤科在多年中西医结合临床实践中发现,以益气养阴、强心安神为法组方的强心安神方可以改善心功能,保护心肌细胞^[1-3]。本实验主要研究强心安神方对化疗药物所致的心肌损伤的保护作用及其作用机制,现报告如下。

1 实验材料

1.1 动物 Wistar 大鼠 75 只,体质量 180 ~ 200g,雌雄各半,由湖南中医药大学实验动物中心提供(合格证书编号:医动字第 20 - 002 号)。动物实验室环境:温度 20℃ ~ 25℃,湿度 45% ~ 55%。

1.2 药物 强心安神方药物组成:炙黄芪 10g,制首乌 10g,酸枣仁 15g,阿胶 6g,五加皮 10g,葶苈子 5g,三七 3g,大黄 5g,黄连 3g,肉桂 2g。以上药物采用湖南春光九汇现代中药有限公司制作的超微制剂。盐酸阿霉素注射液(浙江海正药业股份有限公司,批号:1004E1);0.9%氯化钠注射液(湖南科伦制药有限公司,批准文号:国药准字 H43020454,批号:A15111704 - 2,规格:250/瓶);注射用水(国药集团容生制药有限公司提供,批准文号:国药准字 H41024923,批号:14022801,规格:2ml/支);倍他乐克(阿斯利康制药有限公司,批准文号:国药准字 H32025391,批号:1506126,规格:25mg/片×20 片/盒);卡托普利(华中药业股份有限公司,批准文号:国药准字 H42020384,批号:20151011,规格:25mg/片×100 片/瓶)。

1.3 试剂和主要仪器 纯化线粒体细胞色素 C 氧化酶(cytochrome C oxidase,COX)试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司);纯化线粒体呼吸控制率 RCR 定量检测试剂盒(上海宝曼生物科技有限公司)。LXJ - 11 型离心机(上海医用分析仪器厂);PCR 仪[(TC48/T/H(a)型,杭州大和热磁电子有限公司];水平电泳仪[(GE - 100 型)杭州大和热磁电子有限公司]。

2 实验方法

2.1 药物制备 将强心安神方超微制剂以开水浸泡 20min 后,配制浓度为 0.554g/ml 及 0.139g/ml 的溶液备用,以 500ml 消毒无菌玻璃瓶密封,入 4℃冰箱保存,用前摇匀后使用。

2.2 模型制备 根据文献[4]采用腹腔内注射阿霉素法复制 Wistar 大鼠心肌损伤模型。第 1 ~ 3 周按 3mg/kg 剂量进行腹腔注射,第 4 ~ 6 周按 2mg/kg 剂量进行腹腔注射;1 次/周。正常对照组注射等容量 0.9%氯化钠注射液,每周

1 次,连续 6 周。每天观察记录大鼠的精神状态、活动、饮食、体质量的变化及呼吸频率等日常习惯的改变情况。

2.3 动物分组及给药 选取复制心肌损伤模型成功的大鼠 60 只,将其随机分为模型组、西药对照组及强心安神方高、低剂量组,每组 15 只。另取正常大鼠 15 只作为正常对照组,各组动物在相同条件下饲养观察。西药对照组将倍他乐克及卡托普利配制成水溶液,按 2.7mg/(kg·d)灌胃;中药组按成人剂量与动物等效剂量系数换算,为强心安神方低剂量组每天给药剂量为 6.93g/(kg·d);高剂量组按低剂量 4 倍即 27.72g/(kg·d)灌胃给药。正常对照组和模型组每天以同等剂量的 0.9%氯化钠注射液灌胃;各组持续用药 4 周。

2.4 标本采集与检测 1)血清心肌酶的表达。于末次给药后禁食 12h,麻醉后于股动脉处采血 6ml,分别置于肝素、EDTA、肝素抗凝试管中,4℃、3000r/min 离心,分离血浆,低温下保存待测,检测由湖南省中医药研究院附属医院免疫生化室完成。2)心肌细胞线粒体提取。在遵循动物实验伦理原则下,处死动物,迅速取出心脏,剪碎后匀浆分离所得沉淀物即为提取的心肌细胞线粒体。3)线粒体呼吸功能(呼吸控制比,RCR)测定。采用 Clark 氧化电极法,以苹果酸钠和谷氨酸钠为底物,测定心肌线粒体 ST3、ST4 呼吸率,以 ST3/ST4 的比值作为 RCR 值。4)COX 活性测定。提取线粒体,按照 COX 试剂盒说明书测算。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 15.0 统计学软件进行统计学分析。计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组数据分析采用单因素方差分析检验,组间比较用最小显著差数法(LSD)法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠心肌酶表达的比较 模型组 CK - MB、LDH 表达均显著高于正常对照组,差异有统计学意义;与西药对照组比较,强心安神方高、低剂量组 CK - MB、LDH 含量均明显降低,差异有统计学意义;而强心安神方高、低剂量组之间差异无统计学意义。(见表 1)

表 1 各组大鼠心肌酶表达的比较($\bar{x} \pm s$,U/L)			
组别	只数	CK - MB	LDH
正常对照组	15	27.00 ± 2.80	68.00 ± 0.78
模型组	15	41.00 ± 5.70 ^a	274.00 ± 1.10 ^a
西药对照组	15	31.00 ± 3.74	5.71 ± 0.93
强心安神方高剂量组	15	8.51 ± 1.16 ^{bc}	4.21 ± 0.79 ^{bc}
强心安神方低剂量组	15	8.89 ± 1.45 ^b	4.85 ± 0.78 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与西药对照组比较,^b $P < 0.01$;与强心安神方低剂量组比较,^c $P > 0.05$ 。

3.2 各组大鼠心肌细胞线粒体 RCR 与 COX 活性的比较 模型组 RCR、COX 活性表达均显著高于正常对照组,差异有统计学意义;与西药对照组比较,强心安神方高、低剂量组 RCR、COX 活性表达均显著降低,差异有统计学意义;而强心安神方高、低剂量组之间差异无统计学意义。(见表 2)

表 2 各组大鼠心肌细胞线粒体 RCR 与 COX 活性的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	RCR	COX
正常对照组	15	4.23 ± 0.20	98.42 ± 6.71
模型组	15	3.49 ± 0.24 ^a	81.39 ± 5.37 ^a
西药对照组	15	3.84 ± 0.21	87.68 ± 6.26
强心安神方高剂量组	15	4.04 ± 0.22 ^{bc}	92.61 ± 5.54 ^{bc}
强心安神方低剂量组	15	4.02 ± 0.18 ^b	92.33 ± 5.41 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与西药对照组比较,^b $P < 0.05$;与强心安神方低剂量组比较,^c $P > 0.05$ 。

4 讨 论

阿霉素(adriamycin,ADR)是一种广谱蒽环类抗肿瘤药物,对于急性白血病、霍奇金病和非霍奇金淋巴瘤、乳腺癌等的治疗具有不可替代的作用。然而,蒽环类药物及其联合化疗方案具有明显的心脏毒性,客观上限制了临床的使用。ADR与心肌组织具有非常高的亲和力,可导致阿霉素性心肌损伤,其临床特点为心室扩大并伴有心肌重构及收缩功能降低,容易引起心衰。有研究发现,多种还原酶均可将阿霉素的蒽环还原为半醌自由基,半醌自由基与氧结合,从而产生大量的活性氧类(ROS)^[5]。ROS在线粒体富集,干扰线粒体有氧呼吸电子传递链、抑制三磷酸腺苷的合成和分解,导致能量代谢障碍。ROS还可降低线粒体膜结构的完整性,使COX活性与功能下降,从而影响线粒体呼吸功能及呼吸酶的活性。线粒体三态呼吸与四态呼吸之比即线粒体呼吸控制比(RCR),常作为评价线粒体呼吸功能的指标。

当发生心肌缺血时,细胞储存的ATP和肌酸磷酸会被耗竭,从而引起RCR降低,出现线粒体呼吸功能障碍^[6]。本实验中模型组出现RCR显著下降,表明阿霉素导致的心肌缺血引起了线粒体能量代谢障碍,给予强心安神方干预后,心肌细胞线粒体内RCR与COX活性均恢复至接近正常水平,这说明强心安神方能够使阿霉素性心肌损伤大鼠心肌细胞线粒体功能障碍得到恢复,从而使线粒体呼吸功能及

细胞色素C氧化酶活性保持正常。

本研究发现,造模成功后模型组大鼠心肌酶较空白对照组明显升高,心肌细胞线粒体RCR比值与COX活性下降,提示心肌损伤。强心安神方及西药干预后均可见心肌酶学改善及RCR比值与COX活性升高,提示药物干预均可不同程度减轻心肌损伤,且强心安神方高、低剂量组与西药对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),提示强心安神方可能通过改善心肌细胞线粒体呼吸功能与COX活性从而达到减轻心肌损伤的作用。强心安神方的上述作用未见明显量效依赖关系,强心安神方组结果明显优于模型组及西药对照组。根据前期的临床及实验研究,发现强心安神方对神经内分泌因子及内质网应急也有良好的干预作用,故本研究结果是否为其心肌保护作用的主要方面,尚需进一步实验研究以证实。

参考文献

[1] 颜旭,刘春华,蔡光先,等.超微强心安神方治疗慢性心力衰竭48例疗效观察[J].湖南中医杂志,2011,27(2):1-3.

[2] 颜旭,刘春华,庄红,等.强心安神汤对慢性心衰大鼠AngⅡ及AT1mRNA表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(4):393-396.

[3] 颜旭,刘春华,庄红,等.超微养心安神汤对慢性心力衰竭大鼠神经内分泌因子及心肌组织结构的影响[J].北京中医药,2016,35(7):660-663.

[4] 李梅秀,田国忠,欧叶涛,等.大鼠阿霉素慢性心衰模型的制备与心衰指标的判定[J].解剖学研究,2005,27(3):176-178.

[5] Lukasz A, Beutel G, Kumpers P, et al. Angiotensin-2 in adults with congenital heart disease and heart failure[J]. PLoS One, 2013,8(6):e66861.

[6] Jiang SJ, Li W, An W. Adenoviral gene transfer of hepatic stimulator substance confers resistance against hepatic ischemiareperfusion injury by improving mitochondrial function[J]. Hum Gene Ther, 2013,24(4):443-456. (收稿日期:2019-04-28)

冬季养生话“民谚”(三)

健身怡情宜顺应天时

冬季健身既要早睡晚起,养精蓄锐,又要因时而动,顺其自然。民谚说:“水停百日生虫,人停百日生病。”“运动劲出来,歇着病出来”“冬天动一动,少闹一场病;冬天懒一懒,多喝药一碗。”这些是说冬天不能怕冷,不能赖床,要勤活动、多锻炼。民谚还说,“练雪不练雾”“冬练日出最佳时,雾中锻炼身受伤”,是说冬季健身要讲究科学方法,尽量选择日出之后、日落之前、没有雾霾的天气。此外,当冬季来临,气温下降,雨雪雾岚天气增多,人们情绪难免有所波动。对此民间谚语也有涉及,“找个医生不如交个朋友”,这是说要经常走出沉闷封闭的暖气房间,串串门,唠唠嗑,多交朋友心情好;“书要多读,食要少吃”“书多可养心,食少可健身”,这是说潜下心、静住气,读读心仪已久的名篇佳作,沉浸其中,那些忧郁、烦恼就会无影无踪;“艺不离手,曲不离口”“听听曲、唱唱戏,欢欢乐乐过日子”,是说经常唱歌学戏,心情越唱越愉悦。俗话说,十里不同风,百里不同俗。不同的地方会有不同风格的养生保健方面俗语,这些俗语风趣幽默,朗朗上口,好记、实用、易掌握,去其糟粕,取其精华,为我所用,岂不妙哉。(http://paper.cntcm.com.cn/html/content/2019-11/27/content_620342.htm)