论著

文章编号:1000-5404(2009)18-1720-04

心复康口服液对慢性压力超负荷大鼠心肌能量代谢的影响

王艳飞[1],曹雪滨[1],徐淑乐[1],张 刚[1],何建成[2],胡元会[3],崔英凯[1],杨 梅[1] ([1]解放军第252医院心血管内科,河北保定 071000;[2]上海中医药大学基础医学院中医诊断学教研室,上海 201203;[3]中国中医科学院广安门医院心血管内科,北京 100053)

摘 要:目的 探讨益气温阳活血化瘀方药——心复康口服液对腹主动脉部分缩窄致压力超负荷模型大鼠心脏功能和心肌能量代谢的影响。**方法** 将120只成年雄性SD大鼠采用随机数字表法分为3组:假手术组、腹主动脉缩窄模型组(模型组)、心复康治疗组(治疗组)。采用腹主动脉部分缩窄法制作压力超负荷大鼠模型,BL-420E+生物信号采集系统测定心功能参数,用高效液相法(HPLC)测定心肌高能磷酸盐的浓度,通过透射电镜观察大鼠心肌线粒体的形态,比较3组大鼠第6、8周心功能的各项指标(SAP、DAP、LVEDP、LVMI、$+dp/dt_{max}$、$-dp/dt_{max}$)及心肌高能磷酸盐(ATP、ADP、AMP、TAN、EC)的含量。**结果** ①与假手术组相比,造模后第6周起,模型组大鼠左心室质量指数(LVMI)、左心室舒张末压(LVEDP)显著升高,左心室内压最大变化速率($+dp/dt_{max}$)显著下降($P<0.01$);心肌ATP、ADP、AMP含量显著降低($P<0.01$);造模后第8周,上述改变更显著($P<0.01$, $P<0.05$)。②和模型组相比,治疗组大鼠心功能指标及ATP、ADP、AMP、TAN的含量均明显改善($P<0.01$)。③治疗组大鼠心功能指标及ATP、ADP、AMP、TAN的含量在8周时明显高于6周($P<0.01$, $P<0.05$)。④治疗组大鼠心肌线粒体的受损程度较模型组轻。**结论** 心复康口服液能明显改善慢性压力超负荷大鼠心肌能量代谢和心脏功能,并对心肌线粒体起到保护作用。

关键词: 压力超负荷;能量代谢;高能磷酸盐;心复康口服液

中图法分类号: R289.5;R322.11;R329.25 **文献标识码:** A

Effects of Xinfukang oral liquid on myocardial energy metabolism in chronic pressure overload rats

WANG Yan-fei[1], CAO Xue-bin[1], XU Shu-le[1], ZHANG Gang[1], HE Jian-cheng[2], HU Yuan-hui[3], CUI Ying-kai[1], YANG Mei[1] ([1]Department of Cardiology, No. 252 Hospital of PLA, Baoding 071000, Hebei Province; [2]School of Basic Medical Sciences, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203; [3]Department of Cardiology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Xinfukang oral liquid on the cardiac function and levels of energy-rich phosphates in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy rats. **Methods** Totally 120 SD rats were randomly divided into 3 groups, sham operation group (SH) ($n=40$), coarctation of abdominal aorta model group (CAA) ($n=40$), and model and Xinfukang oral liquid treatment group (XFK) ($n=40$). Parameters of cardiac function, levels of energy-rich phosphates and morphological changes of the myocardial mitochondria were observed at the 6th and 8th week after the treatment. **Results** In CAA group at the 6th week after operation, the cardiac function parameters (LVMI and LVEDP) were increased and $+dp/dt_{max}$ was decreased, while ATP and ADP were decreased and AMP was increased in comparison with SH group ($P<0.01$). These changes were much obvious in 8 weeks ($P<0.01$, $P<0.05$). Compared with those of CAA group, the parameters of heart function and energy-rich phosphates (ATP, ADP, AMP, TAN) in XFK group were improved significantly ($P<0.01$) at the 6th and 8th week. In XFK group, the parameters of heart

基金项目: 国家自然科学基金(30873398);全军医学科研"十一五"科技攻关项目(2006MA064);河北省科技攻关课题(06276012D-114)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30873398), the Tackling Program of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (2006MA064) and the Tackling Project of Science and Technology Research of Hebei Province (06276012D-114)

作者简介: 王艳飞,男,河北省保定市人,硕士研究生,主治医师,主要从事充血性心力衰竭病因、治疗等方面的研究。E-mail: xslsuccess@yahoo.com.cn

通信作者: 曹雪滨,电话:(0312)2058090,E-mail:cxb252@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-05-06;**修回日期:** 2009-06-23

function and energy-rich phosphates were much better at 8th week than at 6th week ($P<0.01$, $P<0.05$). The morphological change of mitochondria was lesser in XFK group than in CAA group. **Conclusion** XFK oral liquid significantly improves the myocardial energy metabolism in pressure overload rats and protects the function of myocardial mitochondria.

Key words: pressure overload; myocardial energy metabolism; energy-rich phosphate; Xinfukang oral liquid

心肌能量代谢障碍是心肌细胞损伤的始动环节,是引起和促进心力衰竭发生、发展的重要因素。我们已有研究证实,应用益气温阳、活血化瘀的中药复方制剂——心复康口服液对改善心肌细胞能量代谢有明确的效果[1]。本实验通过建立压力超负荷大鼠模型,经心复康口服液治疗 6、8 周后,观察压力超负荷大鼠心功能、心肌高能磷酸盐及超微结构变化,进一步研究心复康口服液对压力超负荷大鼠心肌能量代谢的影响及可能机制。

1　材料与方法

1.1　仪器与试剂

BL-420E + 生物信号采集系统(成都泰盟),LDR4-84C 低温离心机(北京医用离心机厂),LC-10ATvp 高效液相仪(日本岛津株式会社)。心复康口服液[中国人民解放军第 252 医院制剂中心,批准文号:北制字(2006)F17003,由人参、黄芪、丹参、附子、淫羊藿、灵芝等药物组成,10 ml/支,每毫升含生药 1.5 g],5′-三磷酸腺苷二钠(ATP)、5′-二磷酸腺苷二钠(ADP)、5′-一磷酸腺苷二钠(AMP)标准品均为美国 Amresco 公司产品。

1.2　色谱条件

色谱柱:岛津公司 VP-ODSC18 反相色谱柱(250 mm × 4.6 mm,粒径 5 μm);流动相:50 mmol/L 的 KH_2PO_4/K_2HPO_4 缓冲液(含 1 mmol/L EDTA,pH 6.0)。检测波长:λ = 259 nm;流速:1.0 ml/min;柱温:25 ~ 30 ℃;进样量:20 μl;灵敏度:0.01 AUSF;吸收率:0.02。

1.3　动物模型制备、分组及给药方法

雄性 SD 大鼠(清洁级Ⅱ)120 只,体质量(225 ± 25)g,河北医科大学实验动物中心提供。采用随机数字表法将 120 只大鼠分为 3 组[2]:假手术组、腹主动脉缩窄模型组(模型组)、心复康口服液治疗组(治疗组),每组 40 只。动物模型制备参照文献[3],模型组和治疗组:10% 水合氯醛 300 mg/kg 腹腔注射麻醉。经左脊肋角区入路,暴露左肾动脉起始部上端腹主动脉 1 cm,以直径为 0.7 ~ 0.8 mm 的不锈钢探针与腹主动脉一起结扎,抽出探针形成腹主动脉狭窄(50% ~ 60%),缝合切口。同时腹腔内注射青霉素 10 万 U 预防感染。模型组用生理盐水(10^{-2} ml · g^{-1} · d^{-1})灌胃,治疗组用心复康口服液(10^{-2} ml · g^{-1} · d^{-1})灌胃。假手术组:腹主动脉下穿线后打一松结,生理盐水(10^{-2} ml · g^{-1} · d^{-1})灌胃。喂养 6 周后,各组取 15 只大鼠作为第 6 周研究对象。喂养 8 周后,假手术组、模型组、治疗组各死亡 6、10、9 只,均以剩余大鼠作为各组第 8 周研究对象。

1.4　心功能各项指标的测定

戊巴比妥钠腹腔内注射(50 mg/kg)麻醉。通过 BL-420E + 生物机能实验系统,进入血流动力学模块。经右侧颈总动脉插管,描记动脉收缩压(SAP)、动脉舒张压(DAP)等。记录完毕后继续推入导管 4.5 ~ 5.0 cm 至左心室,测定左心室舒张末压(LVEDP)、收缩期左心室内压上升的最大变化速率($+dp/dt_{max}$)、舒张期左心室内压下降的最大变化速率($-dp/dt_{max}$)。立即剖胸取出心脏,部分心肌组织行透射电镜检查,将左、右心房及右心室剪掉,预冷的 PBS 液冲洗,滤纸拭干后称取左心室湿质量。取心肌组织于液氮中保存备用,计算心左室质量指数(LVMI)。

1.5　心肌高能磷酸盐的检测

参照文献[4],准确称取 200 mg 心肌组织,复融后剪碎加入预冷 0.42 mol/L 的高氯酸 2.0 ml 迅速制成匀浆液,冰水浴静置 5 min,以 4 000 r/min 离心 5 min,取上清液加氯仿、甲醇的 2∶1混合物 0.2 ml 振荡 1 min 抽提脂溶性物质,4 000 r/min 离心 5 min,去脂。取上清液约 1.5 ml,用氢氧化钠滴定至 pH 值 6.5 左右,冰水浴静置 5 min,4 000 r/min 离心 5 min,上清液滤膜过滤,冰浴保存,8 h 内测定。以上操作均在 4 ℃下完成。

1.6　统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 13.0 统计学软件处理,同一时间段各组结果之间比较用单因素方差分析。同一处理组不同时间段两两比较用成组 t 检验,如不服从正态分布,则使用非参数检验。

2　结果

2.1　造模后第 6、8 周大鼠心功能及心肌高能磷酸盐的变化

造模后第 6、8 周时,模型组较同期假手术组大鼠 SAP、DAP、LVEDP、LVMI 明显升高($P<0.01$),ATP、ADP、AMP、总腺苷酸池(TAN)、能荷(EC)显著降低($P<0.01$),提示大鼠出现心功能障碍及心肌能量代谢障碍。模型组 8 周与 6 周时相比,DAP 显著升高($P<0.01$),LVMI 及 $-dp/dt_{max}$ 显著升高($P<0.05$),表明压力超负荷大鼠心功能障碍持续存在并呈恶化趋势(表 1、2)。

治疗组在第 6、8 周时 SAP、DAP、LVMI、LVEDP 较模型组显著降低,$+dp/dt_{max}$ 较模型组显著升高($P<0.01$),说明经治疗后压力超负荷大鼠心功能得到改善。治疗组在第 6、8 周时 ATP、ADP、AMP、TAN 含量与同期模型组相比显著升高($P<0.01$),6 周时与模型组比较 EC 差异无统计学意义($P>0.05$),8 周时与模型组比较 EC 显著升高($P<0.01$),说明经心复康口服液治疗后心肌能量代谢明显改善。治疗组 6 周时 EC 改变不明显,提示心肌能量储备改善缓慢,仅在 8 周时明显改善,可能与 ADP、AMP 向 ATP 的转化过程存在障碍有关(表 1、2)。

表1 造模后第6、8周各组大鼠心功能指标测定结果（$\bar{x} \pm s$）

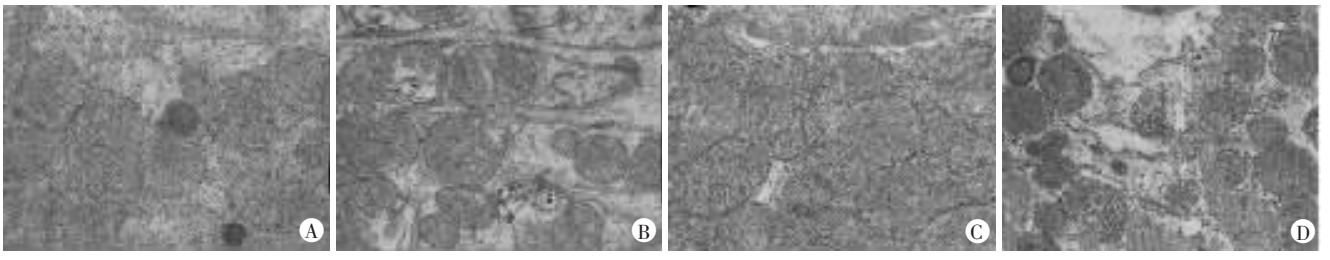
组别	n	SAP(mmHg)	DAP(mmHg)	LVEDP(mmHg)	LVMI	$+dp/dt_{max}$(mmHg/s)	$-dp/dt_{max}$(mmHg/s)
假手术组							
6周	15	105.88±2.83	80.19±2.02	−18.44±5.32	2.05±0.15	3 447.82±121.12	−3 171.14±106.10
8周	19	104.95±2.39	78.93±1.95	−17.69±3.96	2.13±0.09	3 417.53±107.48	−3 101.27±116.45
模型组							
6周	15	135.56±6.22[a]	100.82±4.06[a]	8.32±2.45[a]	2.93±0.11[a]	1 040.11±70.68[a]	−789.70±104.29[a]
8周	15	139.51±2.71[d]	104.18±1.58[cd]	8.71±1.17[d]	3.02±0.12[bd]	918.91±71.00[cd]	−707.06±69.78[bd]
治疗组							
6周	15	122.41±5.91[ac]	91.94±3.40[ac]	1.95±3.19[ac]	2.51±0.10[ac]	2 267.57±135.83[ac]	−2 067.60±150.26[ac]
8周	16	116.47±4.14[def]	89.09±2.00[def]	−2.35±2.78[de]	2.34±0.06[def]	2 415.86±85.31[def]	−2 157.17±93.23[de]

a:$P<0.01$,与6周时假手术组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与6周时模型组比较;d:$P<0.01$,与8周时假手术组比较;e:$P<0.01$,与8周时模型组比较;f:$P<0.01$,与6周时治疗组比较

表2 造模后第6、8周各组大鼠心肌高能磷酸盐含量变化（mg/g, $\bar{x} \pm s$）

组别	n	ATP	ADP	AMP	TAN	EC
假手术组						
6周	15	0.459 6±0.025 4	0.854 9±0.038 5	0.842 3±0.019 6	2.156 7±0.065 3	0.411 2±0.063 0
8周	19	0.459 8±0.019 3	0.856 6±0.034 6	0.836 8±0.020 6	2.153 2±0.047 2	0.412 4±0.007 8
模型组						
6周	15	0.185 2±0.034 5[a]	0.379 5±0.050 4[a]	0.683 9±0.019 1[a]	1.248 6±0.057 6[a]	0.299 9±0.012 3[a]
8周	15	0.177 8±0.022 0[c]	0.307 2±0.036 2[c]	0.654 0±0.020 8[c]	1.139 1±0.038 4[c]	0.290 8±0.014 2[c]
治疗组						
6周	15	0.348 7±0.053 3[ab]	0.754 2±0.077 0[ab]	1.311 7±0.033 9[ab]	2.414 7±0.119 0[ab]	0.299 9±0.017 6[a]
8周	16	0.385 7±0.039 9[cde]	0.838 7±0.042 7[df]	1.372 3±0.026 4[cdf]	2.596 8±0.077 0[df]	0.309 8±0.011 3[cd]

a:$P<0.01$,与6周时假手术组比较;b:$P<0.01$,与6周时模型组比较;c:$P<0.01$,与8周时假手术组比较;d:$P<0.01$,与8周时模型组比较;e:$P<0.05$,f:$P<0.01$,与6周时治疗组比较



A:模型组6周(×20 000); B:模型组8周(×20 000); C:治疗组6周(×20 000); D:治疗组8周(×10 000)

图1 造模后第6、8周各组大鼠心肌细胞线粒体形态学观察（TEM）

2.2 心肌细胞透射电镜检查

模型组、治疗组大鼠均有不同程度的肌原纤维松弛、模糊、排列紊乱,心肌细胞内水肿,线粒体嵴紊乱、模糊不清或减少,内有空泡形成,糖原颗粒明显减少,脂肪小滴增加,肌浆网扩张,间质水肿。模型组8周超微结构损伤较6周加重,表现为心肌细胞水肿加重,线粒体嵴紊乱、模糊不清,糖原颗粒明显减少等。治疗组8周和6周电镜结果比较显示超微结构损伤没有明显加重(图1)。

3 讨论

正常心脏的能量代谢主要为心肌细胞摄取脂肪酸及葡萄糖后在线粒体氧化磷酸化产生大量的三磷酸腺苷(ATP)供能,其中脂肪酸氧化供能占60%~80%,葡萄糖供能只占20%~40%。心力衰竭时线粒体膜上的ATP酶蛋白破坏从而造成其活性下降,ATP的产生能力降低。有证据显示在衰竭的心脏,能量代谢由优先利用脂肪酸向更多的碳水化合物氧化转换,能够提高血氧的利用率,改善收缩功能,并减慢泵衰竭的进展[5,6]。心肌能量代谢紊乱和高能磷酸盐的耗竭是导致心肌损伤的重要原因,心肌ATP含量可作为衡量细胞完整性及功能恢复可行性的指标。在生理和应急状态下,能荷值通过腺苷酸激酶对能量代谢起短暂可逆性调节作用,可有效评估组织细胞的能量储备状态,是心肌能量储备的反映[7]。

缩窄腹主动脉导致压力超负荷可造成大鼠肾脏缺血,导致肾素生成增加。肾素作用于血管紧张素原,引起血管紧张素Ⅰ、Ⅱ的含量增加,并通过对交感神经的作用而使儿茶酚胺增加,血压升高。狭窄腹主动脉可

直接使血压升高，心脏后负荷加重,造成左心室肥厚导致左心衰竭。我们以往的工作观察了心复康口服液对自发性高血压大鼠(SHR)心室重构及左心室功能的影响,结果提示心复康治疗组可以降低 LVEDP、HMI、LVMI、胶原蛋白含量、AngⅡ和 ALD。提示心复康口服液可通过抑制 AngⅡ和 ALD 防止抑制心室重构,改善 SHR 大鼠左心室功能[8]。

心复康口服液是我们临床治疗充血性心力衰竭的经验方,该方由黄芪、人参、淫羊藿、灵芝、丹参、当归、川芎等组成。其中黄芪、人参健脾益气,药理研究证实黄芪具有强心作用,可使心脏收缩振幅增大,排血量增加,对中毒或病劳衰竭的心脏更为明显,在心衰时,强心作用更为明显。中医学认为,“欲温心阳,必助肾阳”,是故用淫羊藿温肾助阳,以达补肾益心之目的。灵芝可保神滋阴。气虚则血必瘀,瘀血又可阻碍气血运行,故加丹参、当归、川芎活血化瘀,以助气血运行,诸药共用,合奏益气温阳,活血化瘀之功。实验研究提示,心复康口服液可保护心肌缺血性损害,改善心功能,具有多方面的药理作用。特别是我们在国内率先证实具有益气温阳活血化瘀功效的中药对改善心肌能量代谢有明确作用,可能是中药治疗充血性心力衰竭的重要机制之一[9,10]。本研究结果显示,心复康治疗组大鼠心肌 ATP、ADP、AMP、TAN 水平均有升高,能量代谢障碍得到改善。由于 EC 含量只在 8 周时较模型组明显升高($P<0.01$),说明经 8 周心复康口服液治疗后,大鼠心肌能量储备升高。研究证实经心复康口服液治疗的大鼠心肌细胞超微结构损伤改善明显,心肌细胞水肿减轻,线粒体数量、结构改善,线粒体嵴排列整齐,糖原颗粒增加。说明心复康口服液可改善压力超负荷大鼠的细胞膜损害和细胞水肿,维持膜结构的稳定。心复康口服液具有益气温阳、活血化瘀功效,实验证实经心复康口服液治疗后压力超负荷大鼠心功能得到改善,从药理学角度证实心复康口服液可改善心脏的收缩、舒张功能,改善心肌线粒体三羧酸循环和氧化磷酸化过程,从而改善心肌能量供应不足[11]。

本研究结果进一步证实经心复康口服液治疗 6、8 周后的大鼠心功能明显改善,同时显著改善心肌高能磷酸盐水平,从而证实心复康口服液改善压力超负荷大鼠心脏功能与其改善心肌能量代谢密切相关,为进一步探讨中医药治疗充血性心力衰竭的机制提供了依据。我们近来的研究表明心复康口服液改善缺血性心力衰竭大鼠能量代谢,并证实心复康口服液可上调心肌梗死后心衰大鼠心肌细胞 GLUT1 mRNA 表达,增加心肌组织中 ATP 含量,有效改善心肌梗死后心衰大鼠心肌能量代谢,从而保护心功能[12,13]。另一项研究证实心复康口服液可在改善心肌梗死后心力衰竭模型大鼠心脏功能的同时,上调心肌中链酰基辅酶 A 脱氢酶基因表达[14]。因此心复康口服液对心肌能量代谢的保护作用是其治疗充血性心力衰竭的重要机制之一,对其机制的深入研究有助于探讨中医药治疗心力衰竭多作用、多靶点机制,进而为其在临床应用提供依据。

参考文献:

[1] 胡元会, 车维新, 曹雪滨, 等. 心复康口服液对大鼠实验心衰模型心肌细胞 Ca^{2+}-ATPase 及琥珀酸脱氢酶活性的影响[J]. 中医药学报, 2000, 15(2): 31－33, 48.

[2] 高　歌, 艾自胜. 使用计算机随机分组与随机抽样的方法及应用[J]. 中国卫生统计, 2002, 19(1): 48－49.

[3] 王艳飞, 曹雪滨, 崔英凯, 等. 改良大鼠左心室插管术及心衰大鼠左心功能指标的测定[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(12): 34－36.

[4] Volonte M G, Yuln G, Quiroga P, *et al*. Development of an HPLC method for determination of metabolic compounds in myocardial tissue [J]. J Pharm Biomed Anal, 2004, 35(3): 647－653.

[5] Belardinelli R, Purcaro A. Effects of trimetazidine on the contractile response of chronically dysfunctional myocardium to low-dose dobutamine in ischaemic cardiomyopathy[J]. Eur Heart J, 2001, 22(23): 2164－2170.

[6] Fragasso G, Piatti-Md P M, Monti L, *et al*. Short- and long-term beneficial effects of trimetazidine in patients with diabetes and ischemic cardiomyopathy[J]. Am Heart J, 2003, 146(5): E18.

[7] Manfredi G, Yang L, Gajewski C D, *et al*. Measurements of ATP in mammalian cells[J]. Methods, 2002, 26(4): 317－326.

[8] 李俊峡, 曹雪滨, 赵春生, 等. 心复康口服液对自发性高血压大鼠心肌纤维化及左室功能的影响[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(17): 1576－1578.

[9] 曹雪滨, 李培建, 黄河玲, 等. 心复康口服液对大鼠实验性心肌缺血的保护作用[J]. 中国药科大学学报, 1998, 29(增刊): 196－198.

[10] 胡元会, 车维新, 李新毅, 等. 心复康口服液对亚急性阿霉素心肌损伤大鼠心功能及自由基代谢的影响[J]. 中医药研究, 1999, 15(5): 38－39.

[11] 王振涛, 王硕仁, 赵明镜, 等. 活血和益气方药对心肌梗死后左心衰大鼠左心室重构影响的比较研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(5): 376－378.

[12] 吴华芹, 胡元会, 王　阶, 等. 心复康口服液对心梗后心衰大鼠心肌组织 ATP 含量及 GLUT1 基因表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(4): 268－270.

[13] 胡元会, 吴华芹, 王　阶, 等. 心复康口服液对心肌梗死后心衰大鼠心功能及心肌葡萄糖转运因子 1 表达的影响[J]. 上海中医药杂志, 2008, 42(6): 75－77.

[14] 吴华芹, 胡元会, 马铁民, 等. 心复康口服液对心力衰竭大鼠心功能及心肌中链酰基辅酶 A 脱氢酶基因表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2007, 5(12): 1205－1207.

(编辑　吴培红)