

· 基础研究 ·

参芪益心方抑制阿霉素诱导大鼠 H9c2 细胞凋亡的机制研究

金娟¹ 董晓阁² 刘莉¹ 赵炎² 郭东浩² 李志鸿¹

摘要 目的 基于心肌细胞内质网应激观察参芪益心方对大鼠 H9c2 心肌细胞内 Ca^{2+} 及半胱氨酸天冬氨酸酶 (Caspase) -3、Caspase-12、葡萄糖调节蛋白 -78 (GRP78)、增强型蛋白同源蛋白 (CHOP)、肌质网钙离子 ATP 酶 (SERCa2a) 蛋白和 mRNA 表达的影响。方法 SD 大鼠制备参芪益心方含药血清。体外培养 H9c2 心肌细胞, 用阿霉素诱导凋亡建立模型, 将细胞分为模型组 (8% 空白血清)、高剂量组 (8% 含药血清)、中剂量组 (4% 含药血清 + 4% 空白血清)、低剂量组 (2% 含药血清 + 6% 空白血清) 和卡托普利 (1×10^{-5} mol/L) 组, 另设空白组 (8% 空白血清)。Real-time PCR 及 Western Blot 分别检测 Caspase-3、Caspase-12、GRP78、CHOP、SERCa2a mRNA 及蛋白的表达, Fluo-3AM 流式细胞仪检测 H9c2 细胞内 Ca^{2+} 荧光强度。结果 与空白组比较, 模型组 Caspase-3、Caspase-12、GRP78、CHOP 的蛋白、mRNA 表达及 Ca^{2+} 荧光强度增加, SERCa2a 蛋白及 mRNA 表达下降 (均 $P < 0.01$)。与模型组比较, 各干预组 Caspase-3、Caspase-12、GRP78、CHOP 蛋白及 mRNA 表达降低, Ca^{2+} 荧光强度降低, SERCa2a 蛋白及 mRNA 表达增加 ($P < 0.01$)。与卡托普利组比较, 中药高剂量组 SERCa2a 蛋白及 mRNA 表达升高, Ca^{2+} 荧光强度升高 ($P < 0.01$)。结论 参芪益心方可通过降低 Ca^{2+} 浓度, 下调 Caspase-3、Caspase-12、GRP78、CHOP 的表达, 上调 SERCa2a 的表达, 减轻内质网的过度应激, 抑制心肌细胞凋亡。

关键词 参芪益心方; 阿霉素; 内质网应激; 心肌细胞; 凋亡

Study on Mechanism of Shenqi Yixin Formula in Inhibiting Adriamycin Induced Apoptosis of Rats H9c2 Cells JIN Juan¹, DONG Xiao-ge², LIU Li¹, ZHAO Yan², GUO Dong-hao², and LI Zhi-hong¹
1 Department of Cardiovascular Medicine, Affiliated First Hospital of Heilongjiang Univeresity of Chinese Medicine, Harbin (150041); 2 Graduate School of Heilongjiang Univeresity of Chinese Medicine, Harbin (150040)

ABSTRACT Objective Based on the endoplasmic reticulum stress in cardiomyocytes, to observe the effect of Shenqi Yixin Formula (SQYXF) on the fluorescence intensity of Ca^{2+} , protein and mRNA expression of Caspase-3, Caspase-12, glucose-regulated protein -78 (GRP78), enhancer-binding protein homologous protein (CHOP), sacro/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCa2a) in rats-derived H9c2 cardiomyocytes. **Methods** SQYSF Drug-containing serum was prepared in SD rats. H9c2 cardiomyocytes were cultured *in vitro*, and apoptotic cell model were established by adriamycin. The apoptotic cells were divided into model group (8% blank serum), high dose group (8% drug-containing serum), medium dose group (4% drug-containing serum), low dose group (2% drug-containing serum) and captopril group (1×10^{-5} mol/L). In addition, a blank group was set up (H9c2 cardiomyocytes treated with 8% blank serum). Real-time PCR and Western Blot were used to detect Caspase-3, Caspase-12, GRP78, CHOP, SERCa2a protein and mRNA expression. Fluorescence intensity of Ca^{2+} in H9c2 cells was measured by fluo-3AM flow cytometry. **Results** Compared

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (No. LH2019H104); 中国博士后科学基金项目 (No. 2015M571452); 黑龙江省博士后基金项目 (No. LBH-Z13194)

作者单位: 1. 黑龙江中医药大学附属第一医院心血管内科 (哈尔滨, 150041); 2. 黑龙江中医药大学研究生院 (哈尔滨, 150040)

通讯作者: 李志鸿, Tel: 0451-82111401, E-mail: vipzhihong@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200324. 093

with blank group, Caspase-3, Caspase-12, GRP78, CHOP protein and mRNA expression and fluorescence intensity of Ca^{2+} increased, SERCa2a protein and mRNA expression decreased in model group (all $P < 0.01$). Compared with model group, Caspase-3, Caspase-12, GRP78, CHOP protein and mRNA expression and fluorescence intensity of Ca^{2+} decreased, and SERCa2a protein and mRNA increased in intervention groups ($P < 0.01$). Compared with captopril group, SERCa2a protein and mRNA expression and fluorescence intensity of Ca^{2+} increased in the high dose group ($P < 0.01$). **Conclusion** SQYXF can alleviate the excessive stress of endoplasmic reticulum and inhibit cardiomyocyte apoptosis through reducing Ca^{2+} concentration, down-regulating the expression of Caspase-3, Caspase-12, GRP78, CHOP, and up-regulating the expression of SERCa2a.

KEYWORDS Shenqi Yixin Formula; Adriamycin; endoplasmic reticulum stress; cardiomyocytes; apoptosis

心力衰竭 (heart failure, HF) 是多种心血管疾病的终末期, 每年全球住院人数超过 2 600 万^[1]。研究表明, HF 可能与心肌组织的细胞和分子变化相关, 包括钙处理异常^[2], 线粒体^[3]、端粒酶^[4]的变化, 内质网应激^[5]及细胞自噬^[6]等。内质网稳态的破坏与 HF 密切相关, 心肌细胞可发生内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS), 适度的 ERS 是心肌细胞恢复功能、稳态的自我保护, 而过激的 ERS 导致内质网大量增殖和扩张, 会诱导细胞凋亡, 是 HF 的发病机制之一^[5]。因此, 干预 ERS, 抑制细胞凋亡, 成为治疗 HF 的新靶点^[7-9]。

中医药在治疗 HF 方面具有多靶点、多通路等特点, 目前研究表明, 中医药可能通过减轻 ERS 引起的细胞凋亡, 抑制心室重构, 从而为治疗 HF 提供新的选择^[10,11]。纵观心力衰竭中医阳虚水泛、血瘀水停的特点, 刘莉教授在临床发现“利心 I 号”在治疗心衰病中补虚不足, 结合临床故加淫羊藿以温肾阳, 加仙鹤草以补虚形成参芪益心方, 获得较好疗效。参芪益心方在前期的研究中已经证实能上调抑凋亡蛋白 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2), 下调促凋亡蛋白 (pro-apoptotic protein, Bax)^[12]及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (Caspase)-3、Caspase-9 的蛋白及 mRNA 表达^[13], 其机制可能是通过抑制心肌细胞凋亡从而改善心功能。本研究观察参芪益心方对大鼠 H9c2 心肌细胞内 Ca^{2+} , Caspase-3、Caspase-12、葡萄糖调节蛋白 -78 (glucose-regulated protein 78, GRP78)、增强型蛋白同源蛋白 (enhancer-binding protein homologous protein, CHOP)、肌质网钙离子 ATP 酶 (sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCa2a) 蛋白及 mRNA 表达的影响, 进一步了解其作用机制。

材料与方法

1 动物 SPF 级 8 周龄雄性 SD 大鼠 45 只, 体

重 (200±20) g, 用于含药血清制备。购买于黑龙江中医药大学实验动物中心, 许可证号: SCXK (黑) 2018006。本研究通过黑龙江中医药大学伦理委员会审批 (No.2018093001)。

2 细胞及培养 对 H9c2 大鼠心肌细胞株 (上海 ATCC 公司, 批号: 20180841) 进行复苏, 于 10%FBS 的 DMEM 培养基在 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养, 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 至对数期进行试验。

3 药物 参芪益心方水煎剂组成: 人参 20 g 黄芪 20 g 桂枝 10 g 丹参 15 g 白术 15 g 茯苓 20 g 葶苈子 15 g 益母草 15 g 淫羊藿 20 g 仙鹤草 30 g 甘草 10 g, 饮片购买于黑龙江中医药大学附属第一医院草药局, 浓煎至含生药 6 g/mL。卡托普利干粉, Sigma 公司, 批号: 20180841; 阿霉素, 浙江海正药业, 10mg/支, 批号: 200301。

4 试剂 DMEM 高糖培养基、FBS (Gibco 公司, 批号: 12100046、16000044); PBS 缓冲液 (杭州四季青生物有限公司, 批号: 020311); 胰蛋白酶消化液 (Solarbio 公司, 批号: T1350); Real-time PCR 试剂盒、RNA Trizol 提取试剂盒 (上海诺伦生物医药, 批号: LK0106A、R21086); 引物及引物设计 (上海彩佑实业有限公司, 批号: YS02382P); DNA Marker、逆转录试剂盒 (均来自日本 TaKaRa 公司, 批号: 3427A、AK3601); 细胞裂解液、分离胶缓冲液、浓缩胶缓冲液、Fluo-3 AM、TEMED/四甲基乙二胺 ST728 (碧云天生物技术, 批号: P0013B、P0012AC、P0516S、S1056、ST728); 免疫印迹膜 PVDF Transfer Membrane (广州财盛生物科技有限公司, 批号: IPVH00010); DMSO (Sigma 公司, 批号: D5879-100ML); 异丙醇、三氯甲烷 (南京化学试剂股份有限公司, 批号: C0690540223、C0761524023)。

5 仪器 离心机 (宁波新芝生物科技股份有限公司), 型号: HSC-2015L; 二氧化碳培养箱 (日本三

洋公司), 型号: MCO-20AIC; 96 孔板、转膜仪、电泳仪、多功能凝胶图像成像仪 (美国 Bio-Rad 公司), 型号: 2239441、1703940、1645056、1708280; DY-B1 脱色摇床 (南京普阳科学仪器研究所), 型号: TY-80B; 定量基因扩增仪 (上海宾智生物科技有限公司), 型号: Mx3000P; -80°C 超低温冰箱 (中国海尔), 型号: DW-86L729; 倒置荧光显微镜 (东莞市谱标实验器材科技有限公司), 型号: YG202; 流式细胞仪 (美国 BD 公司), 型号: FACSCanto; 色谱分析仪 (德国 Biostep 公司), 型号: CD60; 酶标仪 (上海闪谱生物), 型号: ReadMax。

6 含药血清制备及分组

6.1 含药血清制备 45 只大鼠以随机数字表法分成空白血清组 15 只和含药血清组 30 只, 含药血清组大鼠给予参芪益心方水煎剂灌胃 (剂量按 70 kg 人与 200 g 大鼠体表面积等效剂量的 10 倍灌胃^[14]), 200 g 大鼠每日灌胃量为 34.2 g (5.7 mL/200 g 大鼠), 空白血清组给予等体积量生理盐水。灌胃前禁食 12 h, 每日早晚各灌胃 1 次, 间隔 12 h, 重复给药 3 d, 于末次灌胃后 1~2 h 内眼动脉采血, 3 000 r/min 离心 15 min 分离血清, 56°C 30 min 灭活, $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤、分装, -80°C 保存备用。

6.2 实验分组及干预 将 H9c2 细胞实验前饥饿 12 h, 预处理 4 h 后加入阿霉素, 使最终阿霉素浓度为 $4 \times 10^{-6}\ \text{mol/L}$, 培养箱继续培养 72 h 后制备凋亡细胞模型^[15], 并将细胞分为模型组 (8% 空白血清)、高剂量组 (8% 中药含药血清)、中剂量组 (4% 中药含药血清 + 4% 空白血清)、低剂量组 (2% 中药含药血清 + 6% 空白血清)、卡托普利组 [8% 空白血清 + 卡托普利 ($1 \times 10^{-5}\ \text{mol/L}$)]。另设 H9c2 细胞为空白组 (8% 空白血清)。

7 检测指标及方法

7.1 Western Blot 检测 Caspase-3、Caspase-12、GRP78、CHOP、SERCa2a 蛋白表达 将对数期细胞以每孔 5×10^3 个细胞数目接种于 96 孔板中, 每孔培养基液体为 100 μL , 饥饿处理后进行含药血清干预。分组处理后, 离心 30 min, 裂解液提取总蛋白, 调至相同浓度, 加入缓冲液于 100°C 温度下静置 3 min 使蛋白变性, 将其加入至孔内, 进行 SDS-PAGE 胶电泳后转移至 PDVA 膜上, 后转移至脱脂牛奶封闭液过夜, 1:100 加入一抗, 在室温下摇床孵育 2 h 后, 弃去一抗, 封闭液中 1:10 000 加入二抗, 杂交 1 h, 放光剂对膜进行显色反应, X 胶片曝光、显影、定影。

7.2 Real-Time PCR 检测 Caspase-3、Caspase-12、GRP78、CHOP、SERCa2a mRNA 表达 分组处理后, 参照 Trizol 试剂盒方法提取总 RNA, 根据 OD260/OD280 比值计算 RNA 纯度, 用琼脂糖电泳检查 RNA 的完整性后, 按照逆转录试剂盒操作说明进行逆转录。于 95°C 3 min, 95°C 30 s, 62°C 40 s, 40 个循环进行 RT-PCR, 其所用引物序列见表 1。反应结束后使用 Sequence Detection software version (Applied Biosystems) 以 GAPDH 作为内参, 进行荧光定量。最终通过比较 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值分析基因表达的变化。扩增体系: $2 \times \text{Real-time PCR Master Mix}$ 10 μL ; ACTIN F Primer ($20\ \mu\text{mol/L}$), 0.1 μL ; ACTIN R Primer ($20\ \mu\text{mol/L}$) 0.1 μL ; cDNA Template 2.0 μL ; Taq DNA polymerase ($5\ \text{U}/\mu\text{L}$), 0.2 μL 。 $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{目标基因}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}}$, $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{实验组}} - \Delta\text{Ct}_{\text{对照组}}$ 。

表 1 待测基因及内参基因 PCR 引物序列

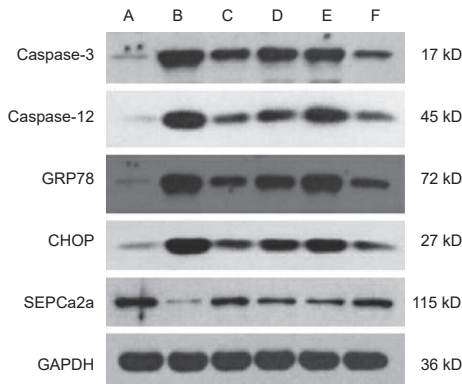
基因名称	引物 (5'-3')	长度 (bp)
Caspase-3	上游 TGTATGCTTACTCTACCGCACCCG	82
	下游 GCGCAAAGTGACTGGATGAACC	
Caspase-12	上游 GAGACAGAATTAATGAAGTTTGCT	107
	下游 TTCACCCACAGATTCCTTCC	
GRP78	上游 CCAAGAACCAACTCACGTCCAAC	80
	下游 AGGGTCATTCCAAGTGCCTCC	
CHOP	上游 TTCACTACTCTTGACCTGCATCC	110
	下游 GAACTCTGACTGGAATCTGGAGAGC	
SERCa2a	上游 GAGAACGCTCACACAAAGACC	120
	下游 CAATTCGTTGGAGCCCCAT	
GAPDH	上游 GATGACATCAAGAAGGTGGTGA	206
	下游 ACCCTGTTGCTGTAGCCATATTC	

7.3 Fluo-3AM 流式细胞仪检测 Ca^{2+} 荧光强度 将离心后的细胞加入 300 μL 浓度为 $5\ \mu\text{mol/L}$ 的 Fluo-3AM 液并重悬细胞, 培养箱内孵育 50 min, 孵育后, 将细胞悬液离心 (1 000 r/min, 5 min) 丢弃上清, 加入 500 μL PBS 重悬, 反复 3 次, 加入流式管中, 上流式细胞仪, 激发波长 488 nm, 记录 10 000 个细胞, 检测细胞荧光强度。

8 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异用单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1 各组 Caspase-3、Caspase-12、GRP78、CHOP、



注：从 A~F 依次为空白组、模型组、高剂量组、中剂量组、低剂量组、卡托普利组；图 2 同

图 1 各组 Caspase-3、Caspase-12、GRP78、CHOP、SEPCa2a 蛋白表达情况

SERCa2a 蛋白表达比较 (图 1) 与空白组比较, 模型组 Caspase-3、Caspase-12、GRP78、CHOP 蛋白表达增加 ($P<0.01$), SERCa2a 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 各干预组 Caspase-3、Caspase-12、GRP78、CHOP 蛋白表达降低 ($P<0.01$), SERCa2a 蛋白表达增加 ($P<0.01$), 且中药干预组呈剂量依赖性。与卡托普利组比较, 高剂量组 SERCa2a 蛋白表达升高 ($P<0.01$)。

2 各组 Caspase-3、Caspase-12、GRP78、CHOP、SEPCa2a mRNA 表达 (表 1) 与空白组比较, 模型组 Caspase-3、Caspase-12、GRP78、CHOP mRNA 表达增加 ($P<0.01$), SERCa2a mRNA 表达降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 含药血清组 Caspase-3、Caspase-12、GRP78、CHOP

mRNA 表达下降 ($P<0.01$), SERCa2a mRNA 增加 ($P<0.01$)。与卡托普利组比较, 中、低剂量组 Caspase-3、GRP78、CHOP mRNA 表达升高, 低剂量组 Caspase-12 mRNA 表达升高, 高剂量组 SERCa2a mRNA 表达升高, 中药低剂量组 SERCa2a mRNA 表达下降 ($P<0.01$)。

3 各组细胞内 Ca^{2+} 荧光强度比较 (表 2) 与空白组比较, 模型组 Ca^{2+} 荧光强度增强 ($P<0.01$)。与模型组比较, 含药血清预处理后 Ca^{2+} 荧光强度降低 ($P<0.01$); 与卡托普利组比较, 中药干预组 Ca^{2+} 荧光强度升高 ($P<0.01$)。

表 2 各组 Ca^{2+} 荧光强度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Ca^{2+} 荧光强度
空白	6	10.26 ± 1.06
模型	6	$31.97 \pm 2.44^*$
高剂量	6	$20.77 \pm 2.10^{\Delta\Delta}$
中剂量	6	$26.76 \pm 2.42^{\Delta}$
低剂量	6	$28.15 \pm 2.55^{\Delta}$
卡托普利	6	$16.48 \pm 1.86^{\Delta}$

注：与空白组比较, $^*P<0.01$; 与模型组比较, $^{\Delta}P<0.01$; 与卡托普利组比较, $^{\Delta\Delta}P<0.01$

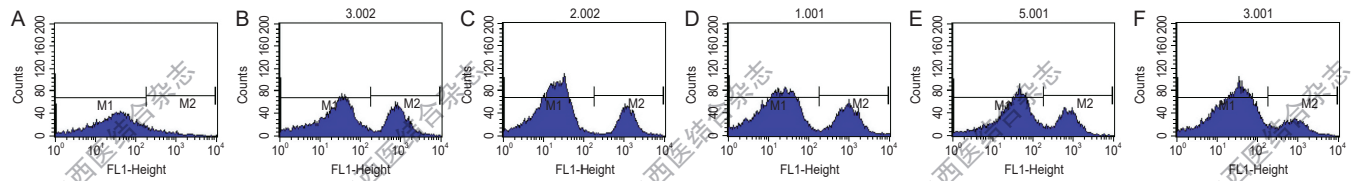
讨 论

细胞凋亡是受基因精确调控的细胞程序化主动死亡的过程, 近年研究发现, 细胞凋亡存在于各种 HF 的病因病程中, 诱导心室重构, 导致并加重 HF。其中过度的 ERS, 可能诱导心肌细胞凋亡, 进而可能进展至 HF。

表 1 各组 Caspase-3、Caspase-12、GRP78、CHOP、SEPCa2a mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Caspase-3	Caspase-12	GRP78	CHOP	SERCa2a
空白	6	0.85 ± 1.16	0.88 ± 1.12	0.82 ± 1.19	0.84 ± 1.16	0.85 ± 1.17
模型	6	$3.23 \pm 4.13^*$	$2.09 \pm 2.71^*$	$2.39 \pm 3.10^*$	$2.70 \pm 3.73^*$	$0.18 \pm 0.26^*$
高剂量	6	$1.26 \pm 1.66^{\Delta}$	$1.18 \pm 1.43^{\Delta}$	$1.06 \pm 1.41^{\Delta}$	$1.10 \pm 1.55^{\Delta}$	$0.78 \pm 1.04^{\Delta\Delta}$
中剂量	6	$1.46 \pm 1.83^{\Delta\Delta}$	$1.63 \pm 1.96^{\Delta}$	$1.93 \pm 2.52^{\Delta\Delta}$	$1.58 \pm 2.04^{\Delta\Delta}$	$0.49 \pm 0.64^{\Delta}$
低剂量	6	$2.54 \pm 3.55^{\Delta\Delta}$	$1.90 \pm 2.38^{\Delta\Delta}$	$2.10 \pm 2.77^{\Delta\Delta}$	$2.71 \pm 3.10^{\Delta\Delta}$	$0.26 \pm 0.37^{\Delta\Delta}$
卡托普利	6	$0.97 \pm 1.30^{\Delta}$	$0.88 \pm 1.08^{\Delta}$	$1.15 \pm 1.52^{\Delta\Delta}$	$0.90 \pm 1.03^{\Delta}$	$0.70 \pm 0.91^{\Delta}$

注：与空白组比较, $^*P<0.01$; 与模型组比较, $^{\Delta}P<0.01$; 与卡托普利组比较, $^{\Delta\Delta}P<0.01$



图注：M1 代表 Fluo-3 AM 未与 Ca^{2+} 结合的荧光强度；M2 代表各组细胞的 Ca^{2+} 荧光强度

图 2 各组 Ca^{2+} 荧光强度比较

内质网是分泌蛋白合成和成熟的主要位点,其重要功能依赖于形态的完整性^[16]。非 ERS 状态下,内质网中的分子伴侣蛋白 GRP78 蛋白与蛋白激酶样 ER 激酶 (protein kinase receptor-like ER kinase, PERK)、肌醇需求酶 1 (inositol requiring enzyme 1, IRE1) 和转录激活因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6) 结合,以复合物的形式存在^[17,18]。缺血/再灌注或缺氧等损伤时 ERS 启动^[19,20],GRP78 从复合物状态中解离并激活^[21]通过 PERK、ATF6、IRE1 三条途径^[17,18],激活下游的 CHOP、Caspase-12 等通路以诱导恢复内质网的稳态和功能,而过激的 ERS 破坏内质网稳态,激活下游的凋亡蛋白酶 Caspase-3 等^[5],最终导致 Caspase 不可逆有限水解底物的级联放大反应,使细胞走向凋亡。研究发现心肌细胞凋亡模型中 GRP78、CHOP、Caspase-12 凋亡蛋白上调,Caspase-3 活性增强^[22],Pollak AJ 等^[23]用 SERCa 抑制剂处理小鼠细胞,细胞受到 Ca^{2+} 应激诱导的细胞凋亡,观察到 CHOP 强烈表达,与实验模型组实验结果一致。

抑制内质网过度应激治疗 HF,是目前生物医学领域的热点之一。Binder P 等^[21]通过基因过度表达的方法激活蛋白激酶 2,抑制蛋白质磷酸酶 -2A 活性,刺激 IRE-1/X-盒结合蛋白 -1 (X-box binding protein 1, XBP1) 信号传导,降低 CHOP 的裂解、下调 Caspase-3 蛋白表达,缓解 ERS,减少心脏肥大、改善心脏功能和减少细胞凋亡,从而延缓 HF 的进展,为治疗 HF 提供新靶点。中药在抑制 ERS 方面亦取得一定的研究成果,中药提取物黄连素通过心肌梗死后 HF 心肌组织中的 CHOP 和 Caspase-12 凋亡信号通路,上调 Bcl-2/bax 表达,下调 Caspase-3 来实现减少 ERS,抑制心脏重塑,保护心脏功能^[10]。研究发现强心 1 号方可下调 Caspase-3、Caspase-12 的表达,降低 CHOP 和 GRP78 的表达,增加抗凋亡蛋白的表达,防止小鼠心肌细胞凋亡^[11]。本实验参芪益心方含药血清组可下调分子伴侣蛋白 GRP78,从而抑制下游 CHOP、Caspase-12 通路的激活,减少下游的凋亡蛋白酶 Caspase-3 释放,抑制 ERS 的过度反应,降低细胞损伤,改善大鼠 H9c2 心肌细胞凋亡。

Ca^{2+} 在心肌细胞动作电位形成和兴奋-收缩耦联中起不可或缺作用^[18,24],内质网调控 Ca^{2+} 的储存和转导,通过钠/钙交换剂 ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, NCX) 进行 Ca^{2+} 循环^[25],钙稳态失衡直接影响心肌细胞的收缩舒张功能^[26],引发一系列 Ca^{2+} 依赖的信

号通路异常,导致心肌细胞结构和功能改变,是 HF 发生发展的关键。SERCa2a 对胞质 Ca^{2+} 进行主动再摄取,是心肌收缩力的主要调节器^[27]。研究发现蛋白激酶 (family with sequence similarity 20, number C, FAM20C) 缺陷小鼠心肌细胞的 Ca^{2+} 瞬变的峰值振幅降低 (与 sr-Ca^{2+} 释放程度相对应),松弛常数 tau 增加 (与 sr-Ca^{2+} 再摄取时间相对应),收缩功能下降伴有左室壁变薄、心脏肥大和 HF 的基因标记物的表达增加,推测可能是 FAM20C 缺陷导致内质网 Ca^{2+} 稳态失衡导致细胞老化诱导舒张性 HF^[28]。HF 者 SERCa2a 的活性下降^[9],导致内质网回摄 Ca^{2+} 的能力下降^[23],细胞内游离 Ca^{2+} 浓度增加,钙稳态失衡。同时 HF 者肥大心肌细胞扩散距离增加,SERCa 泵的数量减少,环磷酸腺苷的产生减少、细胞内酸中毒或代谢堆积,导致心肌收缩力不能随着心率的增加而增加的负性弓沟效应,导致 HF 者心肌收缩力下降,加重 HF 的程度^[29]。本研究模型组大鼠 H9c2 心肌细胞 SERCa2a 表达降低, Ca^{2+} 浓度增加,证明阿霉素诱导大鼠 H9c2 心肌细胞 HF 造模成功。

有研究表明,通过抑制 PERK 或 IRE1 通路,维持离子通道活性可能是预防 HF、心律失常的新模式^[18]。研究发现 Speg 磷酸化 SERCa2a,恢复 SERCa2a 的活性,可以增强其钙转运活性,增加钙再摄取到肌浆/内质网中,抑制内质网的过度应激^[30]。雷诺拉嗪可以通过恢复 NCX 诱导的钙超载,抑制由压力超负荷触发的活化 T 细胞 (nuclear factor of activated T cells, NFAT) 肥大信号通路,即 Ca^{2+} 依赖性钙调素 (Calmodulin CaM)/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II)/肌细胞增强因子 -2 和 CaM/CaMK II/钙依赖磷酸酶/T 细胞核因子通路,达到抑制晚期 NCX,缓解 ERS 和内质网启动引起的心肌细胞凋亡,可能为治疗心脏肥大和 HF 提供一种新的治疗策略^[31]。参芪益心方含药血清组上调 SERCa2a 的表达,调节胞质对 Ca^{2+} 的主动再摄取,恢复心肌细胞中游离 Ca^{2+} 浓度,钙稳态恢复,心肌的收缩舒张功能改善,从而达到改善 HF 的状态。

中医学认为 HF 在于心阳虚衰、水停血阻,血不利则为水,气不足则阳衰,阳衰则水无以为输,故治疗心衰应以温阳利水、益气活血为主。参芪益心方集古籍验方与现代医学研究结果,以黄芪、人参益气,桂枝、淫羊藿振奋阳气,丹参、益母草活血,茯苓、葶苈子、白术、仙鹤草利水,全方综益气温阳、活血

利水之效。前期研究证明参芪益心方可上调抑蛋白凋亡, 下调促凋亡蛋白, 达到抑制细胞凋亡的效果^[12]。本研究参芪益心方可能通过下调大鼠 H9c2 心肌细胞内 CHOP、GRP78、Caspase-3、Caspase-12 蛋白及 mRNA 的表达, 上调 SERCa2a 的表达及活性, 降低 Ca^{2+} 浓度来调控 ERS, 抑制内质网过度应激, 延缓心肌细胞凋亡, 抑制心室重构相关, 从而达到治疗 HF 的目的。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] Chapman B, DeVore AD, Mentz RJ, et al. Clinical profiles in acute heart failure: an urgent need for a new approach[J]. ESC Heart Fail, 2019, 6 (3): 464–474.
- [2] Giorgio V, Burchell V, Schiavone M, et al. Ca^{2+} binding to F-ATP synthase β subunit triggers the mitochondrial permeability transition[J]. EMBO Rep, 2017, 18 (7): 1065–1076.
- [3] Cao T, Fan S, Zheng D, et al. Increased calpain-1 in mitochondria induces dilated heart failure in mice: role of mitochondrial superoxide anion[J]. Basic Res Cardiol, 2019, 114 (3): 17.
- [4] Ait-Aissa K, Heisner JS, Norwood Toro LE, et al. Telomerase deficiency predisposes to heart failure and ischemia-reperfusion injury[J]. Front Cardiovasc Med, 2019, 6: 31.
- [5] Li J, Yue G, Ma W, et al. Ufm1-specific ligase Ufl1 regulates endoplasmic reticulum homeostasis and protects against heart failure[J]. Circ Heart Fail, 2018, 11 (10): e004917.
- [6] Gil-Cayuela C, López A, Martínez-Dolz L, et al. The altered expression of autophagy-related genes participates in heart failure: NRBP2 and CALCOCO2 are associated with left ventricular dysfunction parameters in human dilated cardiomyopathy[J]. PLoS One, 2019, 14 (4): e0215818.
- [7] Peng H, Xu J, Yang XP, et al. AC-SDKP treatment protects heart against excessive myocardial injury and heart failure in mice[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2019, 97 (8): 753–765.
- [8] Chen Q, Thompson J, Hu Y, et al. Cardiac specific knockout of p53 decreases ER stress-induced mitochondrial damage[J]. Front Cardiovasc Med, 2019, doi: 10.3389/fcvm.2019.00010.
- [9] Gorski PA, Jang SP, Jeong D, et al. Role of SIRT1 in modulating acetylation of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in heart failure[J]. Circ Res, 2019, 124 (9): e63–e80.
- [10] Liao Y, Chen K, Dong X, et al. Berberine inhibits cardiac remodeling of heart failure after myocardial infarction by reducing myocardial cell apoptosis in rats[J]. Exp Ther Med, 2018, 16 (3): 2499–2505.
- [11] Xu X, Liu Q, He S, et al. Qiang-Xin 1 formula prevents sepsis-induced apoptosis in murine cardiomyocytes by suppressing endoplasmic reticulum-and mitochondria-associated pathways[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 818.
- [12] 金娟, 吴丹, 邹国良, 等. 参芪益心方对 CHF 大鼠心肌细胞凋亡指数及 Bax、Bcl-2 表达的影响[J]. 山东中医杂志, 2014, 33 (5): 388–390.
- [13] 金娟, 马林沁, 邹国良, 等. 参芪益心方对慢性心力衰竭大鼠心肌组织 Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白表达的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2014, 9 (2): 151–155.
- [14] 熊远珍. 实验动物与人用药量的新换算[J]. 江西医学院学报, 1997, 37 (4): 41.
- [15] 张媛. AMPK 活化在 H₂S 拮抗阿霉素诱导大鼠 H9c2 心肌细胞凋亡中的作用[D]. 湖南: 南华大学, 2014.
- [16] Ortega A, Roselló-Lletí E, Tarazón E, et al. Endoplasmic reticulum stress induces different molecular structural alterations in human dilated and ischemic cardiomyopathy[J]. PLoS One, 2014, 9 (9): e107635.
- [17] Depaoli MR, Hay JC, Graier WF, et al. The enigmatic ATP supply of the endoplasmic reticulum[J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 2019, 94 (2): 610–628.
- [18] Liu M, Dudley SC Jr. The role of the unfolded protein response in arrhythmias[J]. Channels (Austin), 2018, 12 (1): 335–345.
- [19] Ke ZP, Xu P, Shi Y, et al. MicroRNA-9 inhibits ischemia-reperfusion induced cardiomyocyte apoptosis by targeting P TEN[J]. Oncotarget, 2016, 7 (20): 28796–28805.
- [20] Yan LJ, Fan XW, Yang HT, et al. MiR-93 inhibition ameliorates OGD/R induced cardiomyocyte

- apoptosis by targeting Nrf2[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21 (23): 5456–5461.
- [21] Binder P, Wang SY, Radu M, et al. Pak2 as a novel therapeutic target for cardioprotective endoplasmic reticulum stress response[J]. *Circ Res*, 2019, 124 (5): 696–711.
- [22] Guo J, Li S, Li Y, et al. HSP90 inhibitor 17-AAG prevents apoptosis of cardiomyocytes via miR-93-dependent mitigation of endoplasmic reticulum stress[J]. *J Cell Biochem*, 2018, doi: 10.1002.
- [23] Pollak AJ, Liu C, Gudlur A, et al. A secretory pathway kinase regulates sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} homeostasis and protects against heart failure[J]. *Elife*, 2018, doi: 10.7554.
- [24] Balcazar D, Regge V, Santalla M, et al. SERCA is critical to control the Bowditch effect in the heart[J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 12447.
- [25] Rouhana S, Farah C2, Roy J, et al. Early calcium handling imbalance in pressure overload-induced heart failure with nearly normal left ventricular ejection fraction[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865 (1): 230–242.
- [26] Sugiyama A, Hagiwara-Nagasawa M, Kambayashi R, et al. Electropharmacological effects of intracellular Ca^{2+} handling modulator caldaret on the heart assessed in the halothane-anesthetized dogs[J]. *J Pharmacol Sci*, 2019, 139 (3): 180–185.
- [27] Sitsel A, De Raeymaecker J, Drachmann ND, et al. Structures of the heart specific SERCA2a Ca^{2+} -ATPase[J]. *EMBO J*, 2019, 38 (5), pii: e100020. doi: 10.15252.
- [28] Chen XW, Zhang XY, Gross S, et al. Acetylation of SERCA2a, another target for heart failure treatment?[J]. *Circ Res*, 2019, 124 (9): 1285–1287.
- [29] Usman A, Gandhi J, Gupta G. Physiology, Bowditch effect[M]. *Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*, 2019, 13–15.
- [30] Quan C, Li M1, Du Q, et al. SPEG controls calcium reuptake into the sarcoplasmic reticulum through regulating SERCA2a by its second kinase-domain[J]. *Circ Res*, 2019, 124 (5): 712–726.
- [31] Nie J, Duan Q, He M, et al. Ranolazine prevents pressure overload-induced cardiac hypertrophy and heart failure by restoring aberrant Na^{+} and Ca^{2+} handling[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234 (7): 11587–11601.

(收稿: 2019-07-18 在线: 2021-06-05)

责任编辑: 邱 禹

Chinese Journal of Integrative Medicine (《中国结合医学杂志》)

2019 年 SCI 影响因子为 1.545

2020 年 6 月 29 日, 科睿唯安公布 2019 年 *Journal Citation Reports*, *Chinese Journal of Integrative Medicine* (CJIM, 《中国结合医学杂志》英文版) 影响因子为 1.545。

Chinese Journal of Integrative Medicine 创办于 1995 年, 2007 年被 SCI 收录。杂志由中国中医科学院和中国中西医结合学会主办, 国家中医药管理局主管, 主编为陈可冀院士。本刊 2012—2019 年连续被中国知网评选为最具国际影响力学术期刊之一。2019 年入选中国科技期刊卓越行动计划。

期刊以创办国际化期刊为目标, 不断促进结合医学发展为己任, 欢迎大家积极向我刊投稿、赐稿。在今后的工作中, 我们将力争为广大读者、作者提供更好服务!