

基于“心脑肾轴”理论探究补肾活血方对慢性心衰大鼠心肌线粒体能量代谢及PGC-1 α 、NRF-1、mtTFA mRNA表达影响

刘诗瑶¹, 张艳², 孔繁达¹

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学附属医院, 辽宁 沈阳 110032)

摘要: **目的** 旨在基于“心脑肾轴”理论通过该实验探讨补肾活血方对心肌梗死后慢性心衰(chronic heart failure, CHF)大鼠心肌线粒体能量代谢及PGC-1 α 、NRF-1、mtTFA mRNA和蛋白表达的影响。**方法** 从80只健康雄性大鼠中,随机选取20只大鼠,作为空白对照组,其余大鼠经结扎法配以节食、力竭式游泳以建立慢性心衰大鼠模型,将造模成功的60只大鼠随机分为中药组、西药组以及模型对照组。中药组(9.2 g·kg⁻¹·d⁻¹)、西药组(1.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹),灌胃予以相应药物,空白对照组、模型对照组予以等量的去离子水,对每组大鼠行灌胃处理,每日1次。予以灌胃处理28 d后,通过酶联免疫吸附法(ELISA)检测大鼠外周血中ATP、ADP、NT-proBNP浓度;采用实时荧光定量PCR和免疫蛋白印迹法(Western blot)检测大鼠心肌组织中PGC-1 α 、NRF-1、mtTFA mRNA和蛋白表达量。**结果** 与空白对照组比较,心衰模型对照组、中药组、西药组大鼠的ATP浓度明显下降,ADP、NT-proBNP浓度显著升高($P<0.01$);与模型对照组比较,中药组和西药组大鼠ATP表达升高,ADP、NT-proBNP表达下降($P<0.05$)。与空白对照组比较,心衰模型对照组、中药组、西药组大鼠的PGC-1 α 、NRF-1、mtTFA mRNA和蛋白表达水平降低,组内之间的差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型对照组比较,中药组和西药组大鼠PGC-1 α 、NRF-1、mtTFA mRNA和蛋白表达水平升高,组内之间的差异均有统计学意义($P<0.05$)。中药组与西药组的ATP、ADP、NT-proBNP浓度以及PGC-1 α 、NRF-1、mtTFA mRNA和蛋白表达水平无明显差异,组间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 补肾活血方可使得心梗后心衰大鼠心肌细胞PGC-1 α 、NRF-1、mtTFA mRNA的表达上调,促进PGC-1 α 、NRF-1、mtTFA蛋白含量增加,从而增加线粒体的生成和ATP产能,改进心肌细胞的能量代谢,以此来改善和纠正心衰。

关键词: “心脑肾轴”理论; 补肾活血方; 慢性心衰; 能量代谢; PGC-1 α ; NRF-1; mtTFA

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-842X(2021)05-0022-05

Effect Exploration of Bushen Huoxue Decoction (补肾活血方) on Energy Metabolism of Myocardial Mitochondria and Expression of PGC-1 α , NRF-1, mtTFA mRNA in Rats with Chronic Heart Failure Based on the Theory of “Heart Brain Kidney Axis”

LIU Shiyao¹, ZHANG Yan², KONG Fanda¹

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning, China; 2. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning, China)

Abstract: Objective Based on the theory of “heart brain kidney axis”, to explore the effect of Bushen Huoxue Decoction (补肾活血方) on the energy metabolism of myocardial mitochondria and the expression of PGC-1 α , NRF-1, mtTFA mRNA and protein in rats with chronic heart failure (CHF) after myocardial infarction. **Methods** 20 SPF male rats were randomly selected as the blank control group. The other rats were used to establish the chronic heart failure model by ligation of anterior descending branch of left coronary artery combined with diet and exhaustive swimming. 60 rats were randomly divided into Chinese medicine group, Western medicine group and model control group. The traditional Chinese medicine group (9.2 g·kg⁻¹·d⁻¹), the Western medicine group (1.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹) were given the corresponding drug dose by gavage, the blank control group and the model control group were given the same amount of deionized water, each group was given gavage once a day. After 28 days of intragastric administration, Myocardial tissue and plasma were collected and the concentrations of ATP, ADP and NT-proBNP in peripheral blood of rats were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot were used to detect the expression of PGC-1 α , NRF-1, mtTFA mRNA and protein in the myocardium of rats. **Results** Compared with the blank control group, the concentration of ATP in heart failure model control group, Chinese medicine group and Western medicine group decreased significantly, the concentration of ADP and NT-proBNP increased significantly ($P<0.01$);

基金项目: 国家自然科学基金(81774157)

作者简介: 刘诗瑶(1995-),女,辽宁铁岭人,硕士研究生,研究方向: 中西医结合心血管疾病。

通讯作者: 张艳(1960-),女,辽宁沈阳人,教授、主任医师,博士研究生导师,博士,研究方向: 中西医结合心血管疾病。

compared with the model control group, the expression of ATP in Chinese medicine group and Western medicine group increased, the expression of ADP and NT-proBNP decreased ($P < 0.05$). Compared with the blank control group, the levels of PGC-1 α , NRF-1, mtTFA mRNA and protein in the heart failure model control group, the Chinese medicine group and the Western medicine group decreased significantly ($P < 0.05$); compared with the model control group, the levels of PGC-1 α , NRF-1, mtTFA mRNA and protein in the Chinese medicine group and the Western medicine group increased significantly ($P < 0.05$). There was no significant difference in ATP, ADP, NT-proBNP concentration, PGC-1 α , NRF-1, mtTFA mRNA and protein expression between the Chinese medicine group and the Western medicine group ($P > 0.05$). **Conclusion** Bushen Huoxue Decoction can up regulate the expression of PGC-1 α , NRF-1, mtTFA mRNA, promote the increase of PGC-1 α , NRF-1, mtTFA protein, increase the production of mitochondria and ATP, improve myocardial energy metabolism, so as to improve and correct heart failure.

Keywords: theory of "heart brain kidney axis"; Bushen Huoxue Decoction (补肾活血方); chronic heart failure; energy metabolism; PGC-1 α ; NRF-1; mtTFA

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是心脑血管疾病发生发展的终末阶段,也是导致心脑血管疾病患者病死的主要原因。据国内研究表明,心脑血管疾病已然是城乡居民病死的首要原因,并且随着人口老龄化的加重,心衰发病率呈逐年上升的趋势^[1]。而目前西药治疗CHF仍以药物治疗为主,长期服用西药有一定的不良反应且易产生耐药性。临床上慢性心力衰竭患者常表现出胸闷、气短、咳嗽、胸痛、心悸、尿量少、水肿等症状,亦常伴有失眠、多梦、抑郁、焦虑等精神症状^[2]。根据患者出现的心、脑、肾等多个脏腑功能失调的临床表现,我们团队通过30余年的临床经验,认为心衰的发生尤其和心神、脑髓、肾精相关,基于此提出“心脑肾轴”理论,自拟补肾活血方,从补心、温肾、健脑3个方面,来治疗CHF。中医药在治疗CHF方面有明显的优势且疗效显著,可明显改善症状,提升生活质量等。中医药讲求整体辨证而全面调整,不易造成患者耐药,且不良反应小,因而被患者广泛接受和认可^[3]。

目前研究显示,能量代谢障碍参与心脏病理变化的整个过程,直至衰竭。心肌能量代谢是由线粒体氧化所提供,而线粒体代谢障碍甚至紊乱会产生大量活性氧,使线粒体结构和功能受损,使这种能量代谢过程受阻,导致心功能逐步恶化至心衰。所以,心肌线粒体产能量至关重要,是决定心脏泵血能否支撑整个机体运动的重要条件。过氧化物酶体增殖活化受体 γ 辅助活化因子1 α (peroxisome proliferators-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α)被看成是参与调节线粒体代谢和生物发生的主导协调因子,可诱导与能量代谢状态相关的基因表达,在线粒体的增长过程中,发挥着十分重要的作用^[4]。PGC-1 α 可以增强核呼吸因子-1(nuclear respiratory factors, NRF-1)对线粒体转录因子A(mtTFA)的转录,进而使线粒体DNA的表达和复制增加^[5]。因此,调节PGC-1 α 的中心作用被认为是希望能够改善CHF的靶向治疗目标。

因此,本研究基于“心脑肾轴”理论,通过予以补肾活血方,对心梗后慢性心衰大鼠进行治疗并且观察,从而探讨其心肌线粒体能量代谢及PGC-1 α 、NRF-1、mtTFA mRNA和蛋白表达的影响,为中医药治疗CHF提供科学依据和作用靶点。

1 材料

1.1 动物

SPF级,12周健康Wister大鼠80只,雄性,体重为(200 \pm 20)g,由辽宁长生生物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(辽)2015-0001。实验动物饲养于辽宁中医药大学SPF级实验动物中心,饲养环境温度控制在(23 \pm 2) $^{\circ}$ C,湿度适宜,予以常规饲料喂养。

1.2 药物及试剂

补肾活血方(由黄芪、人参、附子、桂枝、白芍、葶苈子、茯苓、丹参、红花、远志、酸枣仁组成)由辽宁中医药大学附属医院药剂科提供和制备,处方中全部药材均符合《中华人民共和国药典》2015年版相关规定,以上各药物经煎煮过滤后浓缩为1g/mL煎剂,分装灭菌,放置于4 $^{\circ}$ C的冰箱保存备用;赖诺普利片,由山东潍坊制药厂有限公司生产,规格:10mg \times 14片,国药准字:H20073720;ATP、ADP、NT-proBNP的ELISA试剂盒,购于南京卡米洛生物工程有限公司,批号分别为CEA349Ge、SFA6005AS、CEA3560Ge;DNA maker、PGC-1 α 、NRF-1、mtTFA PCR试剂盒购自于北京全式金生物技术有限公司;Trizol,购于Invitrogen公司。

1.3 仪器

HX-300小动物呼吸机,由成都泰盟科技有限公司生产;SONO S5500彩色多普勒超声机,由Agilnet公司生产;Stratagene Mx3000p荧光定量PCR仪,由美国Agilnet公司生产;Biofuge28RS低温高速离心机,由德国Heraeus公司生产;MS-2000多媒体化生物信号记录分析系统,由广州市龙飞达科技有限公司生产。

2 方法

2.1 动物分组与造模

将SPF级Wister雄性大鼠适应性喂养一周后,对其一般状态进行观察,选取适应性较好的大鼠80只,从其中随机选取20只,不做干预,设为空白对照组,剩余60只大鼠根据参考文献[6]制备CHF大鼠模型。做好各项准备工作后,先予10%水合氯醛以0.3mL/100g对大鼠进行腹腔内麻醉。进行气管插管,待大鼠呼吸、心率稳定后,对其进行开胸。左胸手术区备皮、消毒,沿3、4肋间隙切开,按照肌肉走向,钝性分离肌肉及筋膜至胸膜,小镊子捅破胸膜,止血钳扩张开胸腔,助手拉钩暴露心脏,术者快

速找到结扎位置,于左冠状动脉前降支处进行结扎,清理外源污物后闭合胸腔,并逐层缝合肌肉、皮肤,待大鼠呼吸、心率平稳后,连接心电图机,心电图示ST-T段上抬即为结扎成功,而后将大鼠放置于笼中,盖上棉花以保暖。术后接续3 d给予青霉素钠4万单位日一次注射以抗感染。术后正常喂养1周后,对大鼠进行力竭式游泳训练,每天1次,密切观察其情况,适当调整训练时长(随着大鼠状态的变差,力竭时间从初始3 h减至30 min),同时配合饲料减半处理以节食,造模时间持续28 d,结束后对所有大鼠进行观察,其精神状态不佳,活动减少,毛色灰暗、掉毛,并且心脏超声显示EF值 $\leq 50\%$,即为造模成功。排除死亡及感染造模成功后,采用随机数字表求余法,将剩余的44只CHF大鼠随机分为中药组(15只)、西药组(15只)以及模型对照组(14只),并选取正常组(空白对照组)15只继续实验。

2.2 给药方法

空白对照组和模型组均给予等量的去离子水灌胃,每次3 mL,日1次。西药组($1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)予以赖诺普利日1次灌胃,中药组($9.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)予以补肾活血方日1次灌胃,持续给药干预28 d。

2.3 标本采集

由于灌胃给药期间4组大鼠出现不同程度的死亡,因此每组从剩余大鼠中分别选取12只在后续实验中参与相关指标的检测。大鼠连续予以灌胃处理28 d后,予以腹腔麻醉,于腹主动脉采血,静置,以3000 r/min离心15 min后取上清放置于 -80°C 条件下保存,同时打开胸腔,取全心,冷冻后保存待检。

2.4 指标检测

(1)采用ELISA检测各组大鼠血清ATP、ADP、NT-proBNP的含量,具体步骤按照试剂盒说明进行。(2)采用实时荧光定量PCR检测大鼠心肌组织中PGC-1 α 、NRF-1、mt TFA mRNA的表达,取心脏组织50~100 mg,剪碎,按照Trizol试剂盒提取心肌细胞总RNA,按逆转录试剂盒说明书合成cDNA,引物由北京三博远志生物技术有限公司设计合成,PCR过程按Agilent Technologies提供的Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix试剂盒说明书在Stratagene Mx3000p荧光定量PCR仪上进行,从而计算目的基因相对表达量。(3)采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠心肌组织中PGC-1 α 、NRF-1、mtTFA蛋白表达量,取心脏组织100 mg剪碎,加入适量RIPA裂解液进行蛋白提取,采用聚丙烯酰胺凝胶测目的蛋白,经电泳后将蛋白从凝胶转移至PVDF膜上,染色后用去离子水漂洗以洗去红色条带,置于Western blot封闭液中室温摇动1 h,取出PVDF膜,用TBST洗膜3次,5 min/次,加入相应的一抗(1:1000),4 $^\circ\text{C}$ 缓慢摇动过夜,再用TBST洗膜3次,5 min/次。加入相应稀释好的二抗(1:2000),室温轻摇1 h, TBST洗膜3次,5 min/次,最后进行化学发光显影(ECL),观察结果。

2.5 统计学方法

应用SPSS 17.0统计软件,进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间采用单因素方差分析(one-way AONVA)进行统计, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠一般情况比较

空白对照组大鼠神态体态正常,活动度正常,皮毛润泽,一般状态良好;模型对照组大鼠神色萎靡不佳,活动度降低,懒动蜷卧,食欲减退,毛色暗淡、脱毛,爪子及口唇青紫,一般状态较差;中药组与西药组大鼠的一般状态较模型对照组尚可,活动度较比模型对照组亦灵活,食欲尚可。

3.2 各组大鼠血清中ATP、ADP、NT-proBNP含量的比较

与空白对照组比较,治疗组(中药组、西药组)及模型对照组中ATP含量均下降,ADP、NT-proBNP含量均升高,组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型对照组比较,中药组与西药组ATP含量上升,ADP、NT-proBNP含量下降,组间差异有统计学意义($P < 0.05$);中药组与西药组比较,组间差异无统计学意义($P > 0.05$),说明药物治疗能够提高心肌组织中ATP的含量,降低ADP、NT-proBNP的含量,提示药物治疗能够促进能量的释放,但中、西药物的疗效相当。见表1。

表1 各组大鼠血清中ATP、ADP、NT-proBNP含量比较

组别	n	ATP ($\mu\text{g/L}$)	NT-proBNP (ng/L)	ADP ($\mu\text{g/L}$)
空白对照组	12	754.60 \pm 150.35	230.72 \pm 47.16	27.43 \pm 8.31
模型对照组	12	410.60 \pm 137.26*	600.24 \pm 130.39*	87.64 \pm 22.04*
中药组	12	542.07 \pm 252.30**	380.45 \pm 87.93**	64.23 \pm 18.17**
西药组	12	583.30 \pm 244.91**	375.37 \pm 85.23**	62.84 \pm 17.45**

注: *与空白对照组比较, $P < 0.05$; #与模型对照组比较, $P < 0.05$ 。

3.3 各组大鼠心肌PGC-1 α 、NRF-1、mt TFA mRNA表达的比较

与空白对照组比较,治疗组(中药组、西药组)及模型对照组中PGC-1 α 、NRF-1、mt TFA mRNA的表达均降低,组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型对照组比较,中药组与西药组中PGC-1 α 、NRF-1、mt TFA mRNA的表达均升高,组间差异有统计学意义($P < 0.05$);中药组与西药组比较,组间差异无统计学意义($P > 0.05$),说明治疗组药物可提升心肌组织中PGC-1 α 、NRF-1、mt TFA的含量,提示药物治疗能够使线粒体生成增加,但中、西药物的疗效相当。见表2。

表2 各组大鼠心肌PGC-1 α 、NRF-1、mt TFA mRNA表达比较

组别	n	PGC-1 α	NRF-1	mt TFA
空白对照组	12	0.46 \pm 0.03	0.67 \pm 0.03	0.45 \pm 0.03
模型对照组	12	0.17 \pm 0.04*	0.25 \pm 0.02*	0.16 \pm 0.02*
中药组	12	0.26 \pm 0.02**	0.56 \pm 0.02**	0.31 \pm 0.02**
西药组	12	0.26 \pm 0.02**	0.57 \pm 0.03**	0.32 \pm 0.02**

注: *与空白对照组比较, $P < 0.05$; #与模型对照组比较, $P < 0.05$ 。

3.4 各组大鼠心肌PGC-1 α 、NRF-1、mt TFA蛋白表达的比较

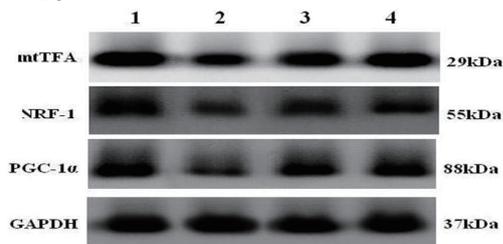
与空白对照组比较,治疗组(中药组、西药组)及模型对照组中PGC-1 α 、NRF-1、mt TFA蛋白的表达均降低,组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型对照组比较,中药组与西药组中PGC-1 α 、NRF-1、mt TFA蛋白的表达均升高,组间差异有统计学意义($P < 0.05$);中药组与西药组比较,组间差异无统计学意义($P > 0.05$),说明治疗组药物可提升

心肌组织中 PGC-1 α 、NRF-1、mt TFA 的含量,提示药物治疗能够使线粒体生成增加,但中、西药物的疗效相当。见表3和图1。

表3 各组大鼠心肌PGC-1 α 、NRF-1、mt TFA蛋白表达比较

组别	n	PGC-1 α	NRF-1	mt TFA
空白对照组	12	0.82 \pm 0.03	0.74 \pm 0.03	1.05 \pm 0.01
模型对照组	12	0.33 \pm 0.01*	0.32 \pm 0.02*	0.39 \pm 0.02*
中药组	12	0.63 \pm 0.02*#	0.55 \pm 0.01*#	0.74 \pm 0.03*#
西药组	12	0.65 \pm 0.02*#	0.56 \pm 0.02*#	0.76 \pm 0.02*#

注:*与空白对照组比较, $P<0.05$;#与模型对照组比较, $P<0.05$ 。



注:1.空白对照组;2.模型对照组;3.中药组;4.西药组。

图1 各组大鼠心肌组中PGC-1 α 、NRF-1、mt TFA蛋白表达

4 讨论

4.1 “心脑肾轴”理论与CHF的关系

CHF病情复杂多样,临床表现有一定差异性。从中医辨证角度来看,其应归属于中医的“水肿”“喘证”“心悸”“痰饮”等病证范畴^[7]。“心脑肾轴”理论将心、脑、肾三者进行密切地联系,主要分为3个方面:第一,“血脉相通”,脉道血液在心气推动下,上荣脑髓,下养肾精,循环往复,营养周身;第二,“精神相关”,血脉连接心和脑,又因心主血脉,所以只有当心主血脉功能正常时,脑才能和心同主神志,肾藏精,精生髓以充脑,肾为元神之府,具有温煦心阳的作用^[8],因此,心、脑、肾三者之间密切相关;第三,“经脉相连”,心、脑、肾三者通过督脉相互联系。

CHF多表现为胸痛、胸闷、气短,活动后加重,咳嗽,少尿,双下肢水肿等,且常伴有抑郁、失眠、多梦等精神方面的症状^[9]。首先中医认为,肾为先天之本,为人的元阳、命门,若肾阳不足,命门火衰,温煦失调,则无法上济心阳,导致心阳亏虚,无力运行血脉,血行失畅,闭阻心脉而出现心悸、胸痛等症状;肾又藏精,精血同源,肾精亏虚时,血化失源,无以生血,则心血不足,心脉失于润养,阻滞脉道亦可出现心悸、气短、胸痛等表现^[10-11]。其次血不利则为水,血瘀日久而导致津液运行失畅,泛滥肌肤而出现水肿的症状;又因肾主水,若肾阳亏虚,气化失司,津液失于气化,则津液内停,水饮运化不利,阻碍津液运行而溢于肌肤,亦可表现为水肿、少尿等症状^[12];若此时水气上凌心胸,则会出现胸闷、咳嗽等症状。另外脑为元神之府,心主神志,肾主骨生髓,脑为髓海,若肾精不足时,髓海不充,脑失所养,神失所主,从而易出现失眠、多梦、夜卧难安等症状^[13]。

由此可见CHF的临床表现与“心脑肾轴”理论不谋而合,以心气虚、肾阳虚、脑髓空虚、血脉瘀阻、神失所养等为其主要病机。因此,在其治疗上,通过中医学的辨证论治,应用补心温肾、活血安神之法,使肾阳得温,脑髓得充,心神得养,方可维持心脏的

正常生理功能。据此提出补肾活血方,此复方由黄芪、人参、附子、桂枝、白芍、葶苈子、茯苓、丹参、红花、远志、酸枣仁等中药组成。人参、黄芪共为君药以补气;附子、桂枝、白芍三药共奏补火助阳之功;葶苈子、茯苓以利水消肿,同时又可补益肺脾,使邪去而正气不伤;丹参、红花共为佐药以活血化瘀、瘀祛新生;远志、酸枣仁共为使药以养心安神。诸药合用,共奏补益心肾、活血安神之功^[14]。

4.2 PGC-1 α →NRF-1→mt TFA→ATP途径与CHF的关系

有研究证实,心力衰竭发生时,心肌内心肌能量代谢障碍加重^[15]。心脏的收缩功能是需要大量能量来支持才可以进行的,当正常的心肌开始能量供应时,线粒体的氧化呼吸链和ATP的生成是偶联的,当心衰发生时线粒体的氧化功能受到抑制,偶联机制被破坏,线粒体数量增加,同时能量代偿会增加,因此呼吸功能和ATP的合成会受到抑制^[16]。若心肌受损或长期处于高负荷工作状态下,便会出现一系列代偿反应,最终导致心力衰竭。有研究发现在心衰模型中会出现PGC-1 α 表达的降低,亦发现其下游的NRF-1、mt TFA也会相应的发生降低,也就是说,在心衰发生时,心肌内线粒体生物合成中出现了PGC-1 α /NRF-1/mt TFA整条通路的下降,因此PGC-1 α /NRF-1/mt TFA通路是调节线粒体生物合成的重要通路之一^[17]。PGC-1 α 是该通路中的关键转录辅助激活因子,对线粒体的生物发生起着至关重要的作用^[18]。而其下游信号分子NRF-1在线粒体的生物发生中承上启下,当PGC-1 α 与NRF-1结合后,立刻便会激活其下游目标基因mt TFA,PGC-1 α 通过增强NRF-1对线粒体转录因子mt TFA的转录,三者协同作用,使线粒体DNA复制能力提升、DNA表达增加,从而调节心肌细胞能量代谢情况,纠正慢性心衰^[19]。

4.3 “心脑肾轴”与PGC-1 α /NRF-1/mt TFA轴

“心脑肾轴”是根据中医学整体观念和藏象学说而提出的,将心、脑、肾三者之间相互联系,密切且合理地整合,归纳总结而来的一个虚拟假设的轴。而PGC-1 α /NRF-1/mt TFA通路是在线粒体生物发生过程中一个真实存在的轴。两者从两个不同的理论体系上同时影响着同一种疾病的进程,运用中医取象比类的建构思路,把两种不同理论体系联系起来加以比较,找出两者之间相似或共同的地方,从而将有关的治疗方法和治疗相结合与探讨,加强中医与西医的内在联系,提供一个新的思维方式,在临床上更好地进行中西医结合治疗,为慢性心衰的预防和治疗提供新的思路^[20]。

基于“心脑肾轴”理论而拟的补肾活血方在治疗CHF的过程中可通过升高PGC-1 α 、NRF-1、mt TFA mRNA及蛋白的表达,使心肌细胞线粒体的产值增加,提供给心肌细胞足够的能量以参与代谢,进而使心衰的症状与体征有所好转,或者起到预防作用,为中医药防治CHF提供客观、可信的科学实验依据。◆

参考文献

- [1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告2016》概要[J].中国循环杂志,2017,32(6):521-530.
- [2] 姚歌圳,黄晶一,王倩,等.慢性心力衰竭治疗难点与对策[J].

基于肾虚体质大鼠海马Ca⁺信号异常表达探讨补肾 中药改善学习记忆能力机制

孙瑜孺, 孙理军, 李翠娟, 张若琚

(陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046)

摘要:目的 通过肾虚体质大鼠海马区钙调神经磷酸酶(CaN)和钙蛋白酶1(Calpain-1)的异常表达,探讨补肾中药对肾虚体质大鼠学习记忆能力改善的调节机制。方法 “猫吓鼠”造模法恐吓受孕母鼠至产子,将子代鼠(后称“仔鼠”)分为模型组、补肾组、补心组和疏肝组,并持续恐吓4周;恐吓的同时开始用药物治疗12周;补肾组、补心组和疏肝组分别灌胃给予六味地黄丸、天王补心丹、逍遥丸0.937 5 g·kg⁻¹·d⁻¹;空白组仔鼠产自正常孕鼠,给予生理盐水对照。比较各组仔鼠生长发育情况, Morris水迷宫检测仔鼠学习记忆能力,免疫组化检测海马区CaN、Calpain-1的阳性表达变化。结果 Morris水迷宫实验,模型组与空白组比较,潜伏期和总路程增加(P<0.01);与模型组比较,补肾组潜伏期和总路程减少(P<0.01),补心组、疏肝组潜伏期减少(P<0.01);与补心组和疏肝组比较,补肾组潜伏期和总路程均减少(P<0.05)。对各组仔鼠称重并取脑组织称重,模型组仔鼠体质量、脑质量较空白组降低(P<0.01);中药治疗后,补肾组、补心组、疏肝组体质量、脑质量均较模型组升高(P<0.05);与疏肝组比较,补肾组体质量增高差异有统计学意义(P<0.05)。免疫组化实验结果显示,与空白组比较,模型组CaN、Calpain-1阳性细胞数升高(P<0.01);与模型组比较,补肾组、疏肝组CaN、Calpain-1阳性细胞数降低(P<0.05);与补心组比较,补肾组CaN、Calpain-1阳性细胞数降低(P<0.05)。结论 实验结果证实,肾虚体质大鼠低下的学习记忆能力与海马区CaN、Calpain-1阳性表达升高有关。中药治疗后,补肾组、补心组、疏肝组通过降低CaN、Calpain-1的阳性表达,一定程度上改善了仔鼠的学习记忆能力。补肾组仔鼠通过补肾治疗直接改善肾脏功能,肾藏精、精生髓、髓通脑,故学习记忆能力的改善优于补心组和疏肝组,实验结果也证实了实验中肾虚体质动物模型构建的合理性和可行性。

关键词: 肾虚体质; 钙调神经磷酸酶; 钙蛋白酶1; 学习记忆能力

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1673-842X(2021)05-0026-05

Mechanism of Kidney Tonifying Medicine on Improving Learning and Memory Ability During Abnormal Ca⁺ Regulatory Signal Expression in Hippocampus of Rats with Kidney Deficiency Constitution

SUN Yuru, SUN Lijun, LI Cuijuan, ZHANG Ruojuan

(Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shaanxi, China)

基金项目: 陕西省教育厅重点实验室研究项目(17JS033); 陕西省科技厅研究项目(2018SF-312); 陕西省中医药管理局中医藏象理论重点研究室建设项目(SZDYJS-2); 陕西中医药大学中医经典理论创新团队建设项目(2019-YL01)

作者简介: 孙瑜孺(1983-),女,湖北武汉人,高级实验师,硕士,研究方向: 中医药分子生物学与免疫学实验研究。

通讯作者: 孙理军(1961-),女,陕西咸阳人,教授,硕士,研究方向: 中医基础理论与体质学研究。

新中医,2016,48(7):3-4.

- [3] 彭玉霞,卢桂林,张斌霞. 中医药治疗慢性心力衰竭的研究进展[J]. 中国中医急症,2020,29(2):373-376.
- [4] 季春影,张瑞英. 心力衰竭与心肌线粒体代谢[J]. 心血管病学进展,2020,41(1):63-66.
- [5] 吴文胜,刘闰男,霍海洋,等. 人血管平滑肌细胞PGC-1/NRF-1/mtTFA的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008(28):5418-5421.
- [6] 李军,吕双红,薛剑,等. 大鼠心肌梗死后心力衰竭模型的建立及评价[J]. 标记免疫分析与临床,2015,22(10):1037-1041.
- [7] 邹燕,李文杰. 真武汤联合西药治疗慢性心力衰竭患者临床观察[J]. 辽宁中医药大学学报,2016,18(4):79-81.
- [8] 王剑,郑洪新,杨芳. “肾藏精”藏象理论探析[J]. 中国中医基础医学杂志,2011,17(2):119-121.
- [9] 陈可冀,吴宗贵,朱明军,等. 慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识[J]. 中国中西医结合杂志,2016,36(2):133-141.
- [10] 孔繁达,张艳,朱爱松,等. 补肾活血中药对慢性心力衰竭大鼠Klotho蛋白及心肌细胞形态的影响[J]. 中华中医药学刊,2019,37(3):619-623.
- [11] 李瑞奕,张艳. 张艳从心肾论治冠心病经验总结[J]. 中医药临床杂志,2018,30(11):2015-2017.
- [12] 孔繁达,张艳,朱爱松,等. 补肾活血方对慢性心力衰竭大鼠

心功能及肾组织水通道蛋白2的影响[J]. 中医杂志,2019,60(6):522-526.

- [13] 关梓桐,徐雅. 试述中医心、脑、神志相关性的研究进展[J]. 世界中医药,2014,9(9):1243-1246.
- [14] 孔繁达,张艳,朱爱松,等. 基于“肾藏精起亟”理论观察补肾活血中药对慢性心力衰竭大鼠骨桥蛋白影响[J]. 中华中医药杂志,2018,33(12):5373-5376.
- [15] 舒华,陈新宇. 中药干预慢性心力衰竭心肌能量代谢治疗进展[J]. 中国老年学杂志,2017,37(3):742-745.
- [16] 孙晓辉,王懿,张艳. 参茸通脉颗粒影响慢性心力衰竭大鼠血栓形成的实验研究[J]. 天津中医药大学学报,2016,35(5):314-317.
- [17] KELLY DP, SCARPULLA RC. Transcriptional regulatory circuits control—ling mitochondrial biogenesis and function[J]. Genes Dev, 2004, 18(4): 357-368.
- [18] VENTURA-CLAPIER, R, GARNIER A, VEKSLER V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α [J]. Cardiovasc Res, 2008, 79(2): 208-217.
- [19] EVANS MJ, SCARPULLA RC. NRF-1: a trans-activator of nuclear encoded respiratory genes in animal cells[J]. Genes Dev, 1990, 4(6): 1023-1034.
- [20] 石勇. 中医取象比类与概念隐喻理论[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(7): 2893-2897.