

引用:张雪莉,雷瑗琳,姚佳,熊紫嫣.益心附葶饮通过BNIP3/NIX通路调控心肌线粒体自噬治疗心力衰竭的机制[J].
 中医药导报,2026,32(4):48-54.

益心附葶饮通过BNIP3/NIX通路调控心肌线粒体自噬治疗心力衰竭的机制*

张雪莉¹,雷瑗琳²,姚佳²,熊紫嫣²

(1.陕西中医药大学第五临床医学院,陕西 西安 710000;

2.西安市中医医院,陕西 西安 710000)

[摘要] 目的:探讨益心附葶饮通过BNIP3/NIX信号通路调控小鼠心肌(HL-1)细胞线粒体自噬治疗心力衰竭的作用机制。方法:将30只SD大鼠随机分为正常组、益心附葶饮低剂量组(26.25 mg/kg)、益心附葶饮中剂量组(52.50 mg/kg)、益心附葶饮高剂量组(105.00 mg/kg)、曲美他嗪组(10 mg/kg),每组各6只。连续14 d灌胃给药,给药结束后,采集腹主动脉血,制备益心附葶饮含药血清。将HL-1细胞分为正常组,模型组,益心附葶饮低、中、高剂量组,曲美他嗪组,分别加入相应含药血清培养细胞。细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法检测细胞活性;流式细胞术检测细胞活性氧(ROS)水平;蛋白质印迹(Western blotting)法检测细胞Beclin-1、Atg7、p-P62/P62、LC3、BNIP3、NIX蛋白表达水平。结果:与正常组比较,模型组细胞活性降低($P<0.01$),ROS水平升高($P<0.01$),Beclin-1、Atg7、p-P62/P62、LC3、BNIP3、NIX蛋白表达升高($P<0.01$),提示细胞处于氧化应激状态,并启动了以自噬激活为主的适应性反应;与模型组比较,益心附葶饮低、中、高剂量组及曲美他嗪组细胞活性升高($P<0.05$),ROS水平下降($P<0.01$),Beclin-1、Atg7、p-P62/P62、LC3、BNIP3、NIX蛋白表达下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),益心附葶饮疗效呈现剂量-效应依赖关系,且高剂量益心附葶饮疗效不劣于曲美他嗪。结论:益心附葶饮可能通过抑制BNIP3/NIX蛋白表达,从而调控细胞线粒体自噬,进而治疗心力衰竭。

[关键词] 心力衰竭;益心附葶饮;线粒体自噬;BNIP3/NIX通路;心肌细胞;大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2026)04-0048-07

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2026.04.009

Mechanism of Yixin Futing Yin (益心附葶饮) in Treating Heart Failure by Regulating Cardiac Mitophagy through the BNIP3/NIX Pathway

ZHANG Xueli¹, LEI Yuanlin², YAO Jia², XIONG Ziyang²

(1.Fifth Clinical Medical College of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an Shaanxi 710000, China;

2.Xi'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an Shaanxi 710000, China)

[Abstract] Objective: To investigate the mechanism of Yixin Futing Yin in treating heart failure by regulating mitophagy in mouse cardiomyocytes (HL-1) through the BNIP3/NIX signaling pathway. Methods: Totally 30 SD rat were randomly divided into normal group, Yixin Futing Yin low-dose group (26.25 mg/kg), Yixin Futing Yin medium-dose group (52.50 mg/kg), Yixin Futing Yin high-dose group (105.00 mg/kg) and trimetazidine group (10 mg/kg), 6 mice in each group. The drug was administered by gavage for 14 consecutive days, and blood was collected from the abdominal aorta for the preparation of drug-containing serum of Yixin Futing Yin. The HL-1 cells were subdivided into normal group, model group, Yixin Futing Yin low-dose group, Yixin Futing Yin medium-dose group, Yixin Futing Yin high-dose group and trimetazidine group, and the cells were cultured by adding the drug-containing serum. The activity of the cells in each group was detected by CCK-8. The ROS level of the cells in each group was detected by flow cytometry, and Western

*基金项目:陕西省中西医结合心血管病防治重点实验室开放课题(KF202322);陕西省中医药管理局项目(SZY-KJCYC-2023-055)

通信作者:雷瑗琳,女,主任医师,研究方向为中医内科心血管疾病

blotting and was used to detect the protein expressions level of Beclin-1, Atg7, p-P62/P62, LC3, BNIP3 and NIX. Results: Compared with the normal group, the model group showed decreased cell viability ($P<0.01$), increased ROS levels ($P<0.01$), and elevated protein expression of Beclin-1, Atg7, p-P62/P62, LC3, BNIP3, and NIX ($P<0.01$), indicating that the cells were under oxidative stress and initiated an adaptive response mainly characterized by autophagy activation. Compared with the model group, the Yixin Futing Yin low-dose group, Yixin Futing Yin medium-dose group, Yixin Futing Yin high-dose group and trimetazidine group showed increased cell viability ($P<0.05$), decreased ROS levels ($P<0.01$), and reduced protein expression of Beclin-1, Atg7, p-P62/P62, LC3, BNIP3, and NIX ($P<0.05$ or $P<0.01$). The therapeutic effect of Yixin Futing Yin exhibited a dose-dependent relationship, and the high-dose Yixin Futing Yin was non-inferior to trimetazidine. Conclusion: Yixin Futing Yin may treat heart failure by regulating cellular mitophagy through inhibition of BNIP3/NIX protein expression.

[Keywords] heart failure; Yixin Futing Yin; mitophagy; BNIP3/NIX pathway; cardiomyocytes; rat

心力衰竭(以下简称“心衰”),其临床主要表现包括心悸、喘息、肢体水肿等症状,是各种慢性心血管疾病发展的最终阶段。《中国心血管病报告2020》数据显示,我国心衰病人已达890万人,心衰住院病人病死率可达4.1%^[1]。近年来,多种新型药物相继研发成功并问世,如钠-葡萄糖共转运蛋白2抑制剂和血管紧张素受体脑啡肽酶抑制剂的出现,也让心衰的治疗有了进一步的突破^[2-3]。然而,心衰患者的5年生存率仍然较低,与恶性肿瘤相近。因此,当前心血管研究领域的重点在于积极寻找治疗心衰的有效药物。心脏的能量代谢主要依赖于线粒体,而线粒体功能障碍在心衰的进程中愈发受到重视^[4]。线粒体自噬可以通过形成吞噬泡和自噬体,诱导自噬体与溶酶体融合,最终降解受损的线粒体,使之逐渐被分解为氨基酸、脂肪酸等小分子物质,以此来维护线粒体功能的稳定。BNIP3/NIX作为与线粒体自噬相关的蛋白质,是介导线粒体自噬的一条重要通路。两者均位于线粒体外膜上,可以和LC3结合,能够通过桥接自噬体和线粒体,发挥清除损伤线粒体的功能^[5]。此外,两者能够结合Beclin-2,抑制Beclin-1与Beclin-2之间的相互作用,从而使Beclin-1激活线粒体自噬^[6]。

中医学将心衰纳入“喘证”“心水”“胸痹”等病症范畴,其主要病位在心,与肝肺脾肾均有关。在现代诸多医家的归纳总结下,基本病机已达成共识,即本虚标实之证。本虚决定了心衰的发生,标实则为其变化因素,因此治疗心衰应该以心肾温阳、益气、化痰、利水等为基本原则^[7]。目前,临床上的常规治疗手段以利尿、强心及扩张血管等药物治疗为主,虽然西药治疗获得广泛应用,但是伴有一定的副作用。中医药强调整体观念,在心衰的治疗中占据独特的优势。益心附葶饮为雷瑗琳主任医师治疗心衰的验方。研究表明,益心附葶饮在治疗心衰方面展现出显著疗效^[8],比如可以减轻心肌细胞的炎症反应、改善心室重塑、抑制心肌纤维化进程,从而延缓心衰的发生发展^[9]。本研究旨在从线粒体自噬蛋白BNIP3/NIX的表达角度,探讨益心附葶饮治疗心衰的分子生物学机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与细胞

SPF级SD大鼠30只,雄性,体质量(200±20)g,购自陕西省医学实验动物所。动物生产许可证号:SCXK(陕)2023-002;动物质量合格证号:No.4075。大鼠分笼饲养于陕西中医药大学动物实验中心,动物使用许可证号:SYXK(陕)2023-004。温度(22±2)℃,湿度55%~75%,光照12 h昼夜周期循环,自由饮水、摄食,所有大鼠在实验前先适应环境1周。小鼠心肌(HL-1)细胞(货号:RY-M0042),购自浙江如耀生物科技有限公司。

1.1.2 药物与试剂 益心附葶饮膏剂(西安市中医医院制剂室提供);胎牛血清(以色列BI公司,货号:SNC050022W);DMEM培养基(美国康宁公司,货号:CP24080160186);PBS 1×(美国康宁公司,货号:GA24080050071);双抗(美国康宁公司,货号:CR2408115);胰蛋白酶(美国康宁公司,货号:SNEP08713LB);细胞计数试剂盒-8(CCK-8)试剂盒(美国Target-Mol公司,货号:E1CK-000208);活性氧(ROS)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号:20240715,);Beclin-1(北京博奥森生物技术有限公司,货号:BD05204130);Atg7(北京博奥森生物技术有限公司,货号:BC01094343);P62(北京博奥森生物技术有限公司,货号:BD05067160);LC3(北京博奥森生物技术有限公司,货号:BC12136231);BNIP3(武汉博士德生物工程有限公司,货号:ZP9016BP16);NIX(武汉博士德生物工程有限公司,货号:23F089405K20)。

1.1.3 主要仪器 二氧化碳培养箱(型号:Thermo 371,美国赛默飞世尔公司);厌氧培养箱(型号:YQX-II,上海跃进医疗器械厂);倒置显微镜(型号:MG 306 C Speed,日本Olympus公司);酶标仪(迈瑞医疗国际股份有限公司,型号:MR-96A);低速台式离心机(上海卢湘仪实验室仪器有限公司,型号:TD4);涡旋仪(海门其林贝尔仪器制造有限公司,型号:QL-901);恒温摇床(海门其林贝尔仪器制造有限公司,型号:THZ-100);流式细胞仪(碧迪医疗器械有限公司,型号:Accuri C6);低温高速离心机(安徽方领生物医疗设备有限公司,型号:FL-4001);电泳转移槽(北京凯元信瑞仪器有限公司,型号:WIX-miniBLOT);电泳电源(北京凯元信瑞仪器有限公司,型号:WIX-EP60C);化学发光成像分析仪(北京赛智创业科技有限公司,型号:MiniChemi 500)。

1.2 方法

1.2.1 制备益心附葶饮浸膏 膏方药物剂量为平常处方的10倍,附子150 g,葶苈子200 g,太子参200 g,麸炒白术300 g,桂枝300 g,生地黄100 g,龙骨300 g,牡蛎300 g,川芎90 g,炙甘草120 g。一开始用大火煎煮,先煎到沸腾,再改用小火慢煎。煮到3 h,过滤取出药液,药渣加冷水再煎。这样反复3次,合并药液。静置沉淀,再用4层纱布过滤3次,尽量减少药液中的杂质。煎出的药液放到小火上煎煮蒸发浓缩,使它逐渐形成稠膏状为止,存入冰箱备用。

1.2.2 制备益心附葶饮含药血清 大鼠适应性饲养1周后随机分为正常组,益心附葶饮低、中、高剂量组(通过预实验-细胞毒性实验,筛选出最适浓度,以生药量为52.50 mg/kg,取1/2和2倍作为低浓度、高浓度),曲美他嗪组,每组各6只,各组动物常规饲养,益心附葶饮组分别给予26.25、52.50、105.00 mg/kg益心附葶饮溶液灌胃,正常组在同一时间灌胃等体积的生理盐水。曲美他嗪组使用盐酸曲美他嗪纯度为97%,给动物剂量为10 mg/kg[根据临床等效剂量换算,大鼠的给药剂量=6.3×(人临床给药量/70 kg)]。配置方法:将128.90 mg盐酸曲美他嗪溶于少于50 mL的生理盐水,再用生理盐水补足至50 mL。给每只大鼠每天灌胃1次。连续14 d给予药物,最后一次给药后1 h,戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔麻醉大鼠,仰卧固定于手术架,常规消毒后从腹正中线皮肤切开腹腔,暴露腹主动脉,在腹主动脉分叉处1~3 mm朝向心端取血,腹主动脉采血,采血后采用吸入二氧化碳处死法处死。随后将采出的血液静置2 h以上使血液自然凝固,将凝固后的血液在3 000 r/min下离心10 min(离心半径为10 cm),以分离上层血清,用水浴锅在56 °C条件下灭活30 min,过滤分装,于-20 °C条件下保存备用。

1.2.3 细胞培养及形态观察 将细胞置于DMEM培养基,培养箱(37 °C,5% CO₂)中孵育,观察贴壁情况。生长状态良好的贴壁细胞经PBS缓冲液洗涤后,以0.25%胰酶对细胞进行消化,待细胞呈纤维样分离脱落用完全培养液终止消化,随后进行传代培养。通过倒置显微镜观察细胞形态的变化,确认细胞状态良好,以备后续检测使用。

1.2.4 实验分组与指标检测 在细胞培养瓶中加入4 000 μL的无糖DMEM基础培养基(即为细胞缺氧培养液)。随后,将培养瓶置入2.5 L的厌氧培养袋中,并同时放入一个2.5 L的厌氧产气包,以构建一个厌氧环境。接着,加入氧气指示剂(该指示剂在厌氧条件下呈粉红色,有氧时则变为蓝色),待指示剂完全转为粉红色后开始计时。此后,将培养瓶置于培养箱内培养6 h,之后移除缺氧培养液,更换为高糖DMEM培养基,并将培养瓶转移至恒温培养箱中进行1 h的复氧培养。

根据参考文献[10],随机将细胞分为正常组,模型组,益心附葶饮低、中、高剂量组,曲美他嗪组。正常组细胞按照常规方式在恒温培养箱中培养7 h;模型组细胞在低氧条件下培养,不进行任何药物干预;益心附葶饮低、中、高剂量组细胞则在缺氧处理时,分别给予益心附葶饮低、中、高剂量的含药血清进行处理;曲美他嗪组细胞加入曲美他嗪血清进行处理。

1.2.5 CCK-8检测细胞活性 培养终止后,移除细胞培养基,

用PBS清洗两次,向每孔加入100 μL含有10% CCK-8溶液,轻晃培养板以帮助混匀,放入培养箱孵育2 h,用酶标仪在450 nm波长处测定其光吸收值。

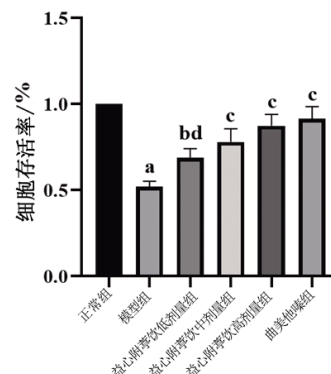
1.2.6 流式细胞术检测细胞ROS水平 除去旧培养基,按照1:1 000将DCFH-DA(2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯)用无血清培养液稀释至10 μmol/L。弃去诱导用药物,每孔(空白孔除外)加入1 mL稀释好的DCFH-DA。将培养板放入培养箱避光培养,孵育30 min,吸去培养基,用PBS清洗3次,以充分除去多余的DCFH-DA,加入胰蛋白酶消化细胞,收集细胞悬液,置入离心机以1 000 r/min(离心半径8~10 cm)离心5 min,弃上清液。最后,加入PBS重新悬浮细胞上机进行测定。

1.2.7 蛋白质印迹(Western blotting)检测细胞Beclin-1、Atg7、p-P62、P62、LC3、BNIP3、NIX蛋白表达水平 将收集到的细胞按照1×10⁶细胞数加入RIPA裂解缓冲液(4 °C预冷含有1%蛋白酶抑制剂),进行裂解处理,裂解物在12 000×g、4 °C条件下离心10 min后立即吸取上清液,放置预冷的1.5 mL的EP管中保存待用。使用BCA试剂盒测定上清液中的蛋白质浓度,以确保蛋白质浓度在合适范围内(1~5 mg/mL),10%SDS-PAGE分离出等量的蛋白(20 μg),转移到提前在的甲醇中激活PVDF膜上。然后用5%脱脂牛奶室温下封闭2 h,再用TBST缓冲液清洗10 min,随后在4 °C条件下与Beclin-1、Atg7、p-P62、P62、LC3、BNIP3、NIX一抗慢摇孵育过夜,次日回收一抗,用TBST缓冲液清洗3次,每次10 min,再将膜与二抗于37 °C条件下慢摇孵育2 h,弃二抗,用TBST快摇洗膜3次。取等量ECL发光试剂A液和B液避光混合,均匀加到PVDF膜上,置于化学发光荧光成像仪上进行可视化处理。

1.2.8 统计学方法 通过GraphPad Prism软件进行数据统计分析,计量资料以“均数±标准差”(x̄±s)表示。多组间数据比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用Tukey检验,P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 益心附葶饮对细胞活性的影响 模型组细胞活性低于正常组(P<0.01);益心附葶饮低、中、高剂量及曲美他嗪组细胞活性均高于模型组(P<0.05);益心附葶饮低剂量组细胞活性低于曲美他嗪组(P<0.05)。(见图1、表1)



注:与正常组比较,^aP<0.01;与模型组比较,^bP<0.05,^cP<0.01;与曲美他嗪组比较,^dP<0.01。

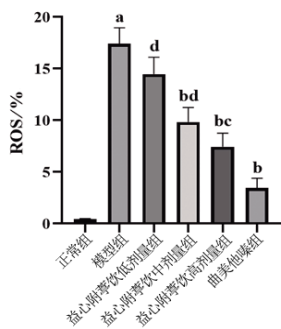
图1 各组细胞活性比较 (x̄±s,n=3)

表 1 各组细胞存活率比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	细胞存活率/%
正常组	3	1.000±0.000
模型组	3	0.522±0.030 ^a
益心附葶饮低剂量组	3	0.690±0.052 ^{b,d}
益心附葶饮中剂量组	3	0.780±0.074 ^e
益心附葶饮高剂量组	3	0.875±0.064 ^e
曲美他嗪组	3	0.916±0.069 ^e
F		28.913
P		0.000

注:与正常组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;与曲美他嗪组比较,^d $P<0.01$ 。

2.2 益心附葶饮对细胞ROS水平的影响 模型组细胞ROS水平高于正常组($P<0.01$);益心附葶饮中、高剂量及曲美他嗪组细胞ROS水平均低于模型组($P<0.01$);益心附葶饮低、中、高剂量组细胞ROS水平均高于曲美他嗪组($P<0.05$)。(见图2~3、表2)



注:与正常组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$;与曲美他嗪组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

图 3 各组细胞 ROS 水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

表 2 各组细胞 ROS 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	ROS/%
正常组	3	0.433±0.058
模型组	3	17.400±1.550 ^a
益心附葶饮低剂量组	3	14.467±1.640 ^d
益心附葶饮中剂量组	3	9.833±1.400 ^{b,d}
益心附葶饮高剂量组	3	7.433±1.330 ^{b,c}
曲美他嗪组	3	3.433±0.950 ^b
F		76.670
P		0.000

注:与正常组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$;与曲美他嗪组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

2.3 益心附葶饮对细胞Beclin-1、Atg7、p-P62/P62、LC3蛋白表达影响 模型组细胞Beclin-1、Atg7、p-P62/P62、LC3蛋白表

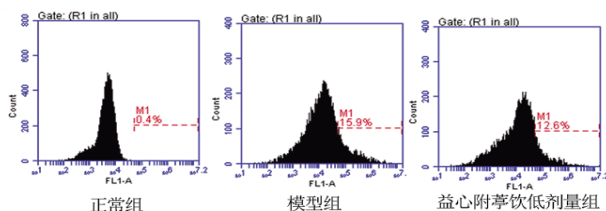
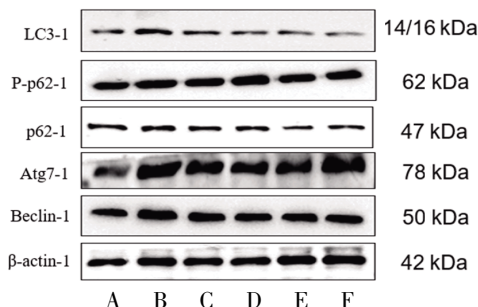


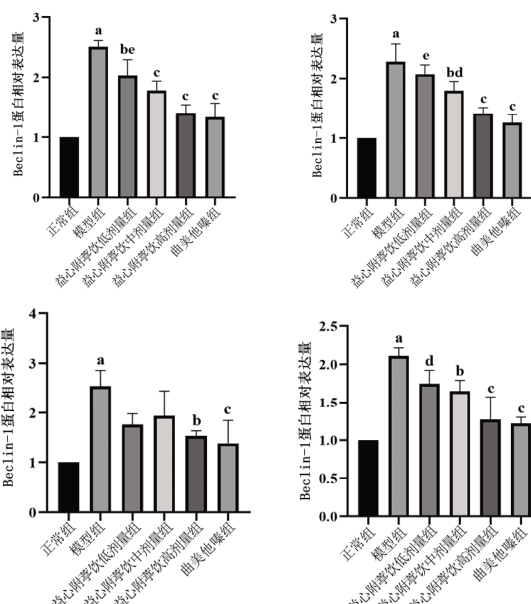
图 2 各组细胞 ROS 水平结果图

达水平平均高于正常组($P<0.01$);益心附葶饮低剂量组细胞 Beclin-1 蛋白表达水平低于模型组 ($P<0.05$);益心附葶饮中剂量组细胞 Beclin-1、Atg7、LC3 蛋白表达水平均低于模型组 ($P<0.05$);益心附葶饮高剂量组细胞 Beclin-1、Atg7、p-P62/P62、LC3 蛋白表达水平均低于模型组 ($P<0.05$);曲美他嗪组细胞 Beclin-1、Atg7、p-P62/P62、LC3 蛋白表达水平均低于模型组 ($P<0.01$);益心附葶饮低剂量组细胞 Beclin-1、Atg7、LC3 蛋白表达水平均高于曲美他嗪组 ($P<0.05$);益心附葶饮中剂量组细胞 Atg7 蛋白表达水平高于曲美他嗪组 ($P<0.05$)。(见图4~5、表3)



注:A.正常组;B.模型组;C.益心附葶饮低剂量组;D.益心附葶饮中剂量组;E.益心附葶饮高剂量组;F.曲美他嗪组。

图 4 各组细胞 Beclin-1、Atg7、p-P62/P62、LC3 蛋白表达 Western blotting 图



注:与正常组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;与曲美他嗪组比较,^d $P<0.05$,^e $P<0.01$ 。

图 5 各组细胞 Beclin-1、Atg7、p-P62/P62、LC3 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

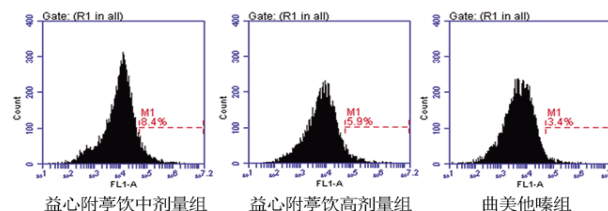
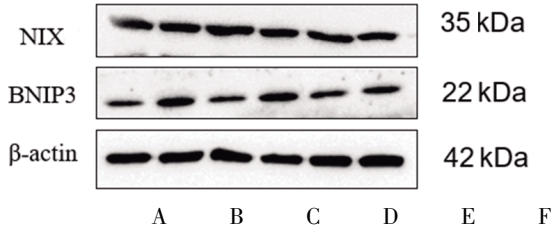


表3 各组细胞 Beclin-1、Atg7、p-P62/P62、LC3

组别	n	蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$)			
		Beclin-1	Atg7	p-P62/P62	LC3
正常组	3	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
模型组	3	2.510±0.104 ^a	2.280±0.301 ^a	2.540±0.310 ^a	2.101±0.104 ^a
益心附葶饮低剂量组	3	2.030±0.260 ^{a,c}	2.070±0.150 ^a	1.760±0.220	1.740±0.180 ^b
益心附葶饮中剂量组	3	1.440±0.140 ^{b,d}	1.800±0.150 ^{b,d}	1.930±0.510	1.640±0.140 ^b
益心附葶饮高剂量组	3	1.400±0.090 ^{b,e}	1.420±0.090 ^b	1.530±0.090 ^b	1.270±0.300 ^c
曲美他嗪组	3	1.330±0.230 ^c	1.260±0.130 ^c	1.380±0.460 ^c	1.210±0.080 ^c
F		29.854	26.690	7.854	18.604
P		0.000	0.000	0.002	0.000

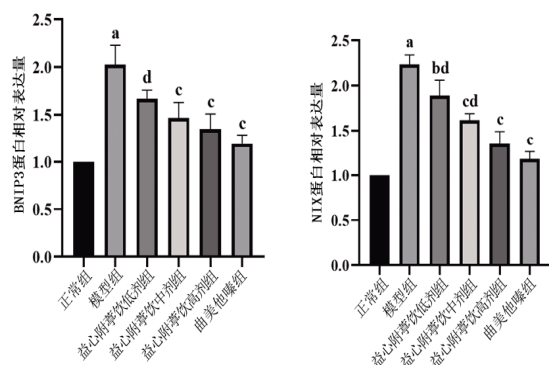
注:与正常组比较,^aP<0.01;与模型组比较,^bP<0.05,^cP<0.01;与曲美他嗪组比较,^dP<0.05,^eP<0.01。

2.4 益心附葶饮对细胞自噬分子信号BNIP3、NIX蛋白表达的影响 模型组细胞BNIP3、NIX蛋白表达水平均高于正常组(P<0.01);益心附葶饮中、高剂量及曲美他嗪组细胞BNIP3蛋白表达水平均低于模型组(P<0.01);益心附葶饮低、中、高剂量组及曲美他嗪组细胞NIX蛋白表达水平均低于模型组(P<0.05);益心附葶饮低剂量组细胞BNIP3蛋白表达水平高于曲美他嗪组(P<0.01);益心附葶饮低、中剂量组细胞NIX蛋白表达水平均高于曲美他嗪组(P<0.01)。(见图6~7、表4)



注:A.正常组;B.模型组;C.益心附葶饮低剂量组;D.益心附葶饮中剂量组;E.益心附葶饮高剂量组;F.曲美他嗪组。

图6 各组细胞 BNIP3、NIX 蛋白表达 Western blotting 图



注:与正常组比较,^aP<0.01;与模型组比较,^bP<0.05,^cP<0.01;与曲美他嗪组比较,^dP<0.01。

图7 各组细胞 BNIP3、NIX 蛋白表达结果

3 讨论

心衰是一种具有高发病率和死亡率的临床综合征^[10],对患者的生活质量造成了严重影响。尽管目前对心衰的治疗有了很大进步,但在有效的药物治疗方面仍然需要长足发展^[11]。因此,如何更有效地治疗心衰始终是研究的重点和热点。心脏为耗能器官,其泵血功能需要大量的能量,而心肌细胞中的

表4 各组细胞 BNIP3、NIX 蛋白表达结果 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	BNIP3	NIX
正常组	3	1.000±0.000	1.000±0.000
模型组	3	2.020±0.200 ^a	2.230±0.100 ^a
益心附葶饮低剂量组	3	1.660±0.090 ^d	1.880±0.170 ^{b,d}
益心附葶饮中剂量组	3	1.460±0.160 ^e	1.610±0.070 ^{b,d}
益心附葶饮高剂量组	3	1.350±0.150 ^e	1.340±0.140 ^e
曲美他嗪组	3	1.190±0.090 ^e	1.170±0.080 ^e
F		21.429	52.292
P		0.000	0.000

注:与正常组比较,^aP<0.01;与模型组比较,^bP<0.05,^cP<0.01;与曲美他嗪组比较,^dP<0.01。

线粒体为其提供了90%的能量供应^[12],线粒体可将脂肪、碳水化合物等转化为三磷酸腺苷,源源不断地为心脏提供能量^[13]。而当线粒体功能障碍时,心肌细胞能量来源受到抑制,引起失代偿发生,因此在心衰的发生、发展中,线粒体功能障碍的地位逐渐受到重视。此外,线粒体是细胞内产生ROS主要场所之一,ROS水平影响着线粒体膜电位的变化,进一步影响线粒体的功能。在正常情况下,ROS的生成与抗氧化防御系统之间保持着一种平衡状态。然而,当线粒体功能障碍时,促使ROS过度生成,不仅会直接损害细胞内的DNA、蛋白质等生物分子,还会以信号分子的形式激活炎症相关的信号通路,促进炎症介质的生成,进而加重心肌细胞的氧化损伤和炎症反应。两者相互影响,形成一个复杂的调节网络,共同维护细胞的稳态。而线粒体自噬作为自噬的一种特定类型,在ROS压力、营养缺乏、细胞衰老等多种因素的作用下,也会造成细胞内的线粒体的损伤^[14]。也有研究发现,心血管疾病与线粒体自噬密切相关,如在程序性心肌细胞死亡中,BNIP3/NIX可以感知心脏应激,并通过激活Bcl-2相关X蛋白(Bax)和Bcl-2拮抗因子(Bak),组装成大型复合体,启动线粒体外膜孔的形成,导致线粒体外膜通透化^[15],从而清除受损线粒体,减轻氧化应激和炎症反应,改善心肌的能量代谢^[16]。研究发现,结扎升主动脉诱导的心衰模型由于持续的超负荷的应激导致了线粒体的过度自噬,从而引起细胞异常凋亡;而用线粒体自噬抑制剂处理后,其心功能得到了明显的改善^[17]。在心肌肥大相关研究中,当MSTN基因敲除时会使小鼠对心肌肥大刺激的敏感性显著升高,进而发展为更严重的病理性心肌肥大。而MSTN的表达可通过阻断两条关键信号通路(AMPK/mTOR通路、miR-128/PPAR γ /NF- κ B通路)抑制心肌过度自噬,最终起到减轻心肌肥大的效应^[18]。因此在心衰的晚期阶段,过度的线粒体自噬将可能会导致健康的线粒体被清除,过度消耗关键因子,造成线粒体功能障碍,影响细胞的正常功能,还可能会引起细胞凋亡与坏死,损害细胞与组织,进一步加重心衰的进展,若此及时抑制线粒体过度自噬,可以很大程度上延缓疾病进展^[19-20]。

益心附葶饮由制附子、太子参、桂枝、川芎等药物组成,为雷瑗琳主任医师治疗慢性心力衰竭多年来总结的验方。该方中,君药制附子和葶苈子温阳利水,太子参补气益脾胃,茯苓淡渗利湿,白术健脾祛湿,桂枝通阳化气,共同辅助君药温阳化气利水,为臣药。川芎则负责活血化痰。此方剂配伍巧

妙,与病机高度契合。太子参中含有丰富的人参皂苷Rg1,可以促进线粒体的形成,介导线粒体自噬清除受损线粒体,对心血管疾病具有预防作用^[21]。而川芎中的川芎嗪可以通过调节线粒体膜电位,提高心肌细胞线粒体的氧化应激,从而抑制线粒体自噬,改善心肌细胞功能^[22]。有研究表明,附子可以抑制Bax和Caspase-3等蛋白、促进Bcl-2蛋白的表达,逆转线粒体应激状态,调控线粒体自噬^[23]。乙酸乙酯作为桂枝的提取物可以抑制ROS聚集,减轻氧化应激,以维护线粒体的功能^[24]。经前期实验研究,益心附葶饮能够抑制HIF-1/VEGF信号通路和降低HIF-1蛋白的表达来介导炎症反应,抑制心室重塑的进程、修复线粒体、介导AMPK信号通路调节心肌细胞能量代谢^[25]。

Bcl-2蛋白家族的BNIP3和NIX位于线粒体外膜上,且都包含有能与LC3结合的BH3结构可直接通过LIR与LC3相互作用,从而启动线粒体自噬^[26],也可以通过磷酸化作用,增强与LC3的相互结合,调节线粒体自噬的起始和进展,以此来保护线粒体质量^[27]。BNIP3也可以抑制PINK1水解,使其通过TOMM复合物聚集在线粒体外膜上,通过自磷酸化形成同源二聚体以激活酶活性,进一步召集线粒体自噬蛋白与LC3结合形成自噬小体,与溶酶体融合促进线粒体自噬。LC3是自噬的核心标志。LC3-II(磷脂化的形式)是与自噬体膜结合的活性形式,其表达水平与自噬活动密切相关^[28]。P62作为自噬途径的关键蛋白,可被包裹在自噬体内被蛋白水解酶降解。因此,当P62积聚时,通常意味着自噬流受到了阻碍,而其水平下降则表明自噬活动增强^[29]。而在氧化应激或者毒物刺激下,P62作为一种应激蛋白,其水平也可以伴随着自噬激活而升高^[30]。Beclin-1是形成自噬体的必须分子,可与磷脂酰肌醇激酶相互作用,启动自噬的成何步骤,并作用于自噬体与溶酶体的融合。此外,Beclin-2还可以与自噬相关蛋白反应调控自噬体的形成与成熟,其表达量的增加通常与自噬的激活有关^[31]。ATG7是自噬过程中的关键蛋白质,可以与其他自噬相关蛋白形成复合物,通过磷酸化与其他蛋白结合,以调控自噬囊泡的膜融合和延伸,同时ATG7在自噬流中起到E1样酶的作用,生成ATG12-ATG5和LC3的脂质化,调节自噬体的形成和降解,保证自噬过程的高效进行从而发挥作用。它的表达和活性与自噬的形成密切相关^[32]。本研究结果表明,益心附葶饮可明显改善心肌细胞活性与活性氧ROS聚集。相较于正常组,模型组细胞活性降低,ROS水平升高,Beclin-1、Atg7、p-P62/P62、LC3、BNIP3、NIX蛋白表达升高,提示细胞处于氧化应激状态,并启动了以自噬激活为主的适应性反应;相较于模型组,益心附葶饮低、中、高剂量及曲美他嗪组细胞活性升高,ROS水平下降,Beclin-1、Atg7、p-P62/P62、LC3、BNIP3、NIX蛋白表达下降。益心附葶饮疗效呈现剂量-效应依赖关系,且高剂量益心附葶饮疗效不劣于曲美他嗪。

综上所述,BNIP3/NIX作为线粒体自噬的重要通路,调节着心肌细胞的能量代谢、凋亡及ROS的生成。益心附葶饮可能是通过抑制BNIP3/NIX信号通路介导的线粒体过度自噬,改善受损线粒体的功能,抑制活性氧ROS聚集,提高心肌细胞活性,从而阻止心衰的进展,为后续心衰机制研究提供参考。

参考文献

- [1] 《中成药治疗优势病种临床应用指南》标准化项目组.中成药治疗心力衰竭临床应用指南(2021年)[J].中国中西医结合杂志,2022,42(3):261-275.
- [2] 匡丽萍,单春燕.心力衰竭治疗药物研究进展[J].慢性病学杂志,2020,21(11):1656-1659.
- [3] 杨杰孚.心力衰竭药物治疗进展[J].心电与循环,2019,38(5):367-371.
- [4] DEY S, DEMAZUMDER D, SIDOR A, et al. Mitochondrial ROS drive sudden cardiac death and chronic proteome remodeling in heart failure[J]. Circ Res,2018,123(3):356-371.
- [5] WANG L M, LU G, SHEN H M. The long and the short of PTEN in the regulation of mitophagy[J]. Front Cell Dev Biol,2020,8:299.
- [6] NEY P A. Mitochondrial autophagy: Origins, significance, and role of BNIP3 and NIX[J]. Biochim Biophys Acta,2015,1853(10 Pt B):2775-2783.
- [7] 李莉.温阳利水法对改善老年患者充血性心力衰竭的临床观察[J].中医药导报,2014,20(4):46-48.
- [8] 陈铭钦,雷瑗琳,师瑞瑞,等.益心附葶饮对慢性心力衰竭心肾阳虚证大鼠HIF-1/VEGF信号通路的影响[J].陕西中医,2023,44(11):1527-1531.
- [9] 刘婧,张妍,李凡勃,等.基于TGF- β /Smad通路研究益心附葶饮抗腹主动脉缩窄大鼠心肌纤维化的机制[J].中西医结合心脑血管病杂志,2021,19(22):3886-3890.
- [10] 辛高杰,刘子馨,陈原原,等.延胡索乙素通过ULK1/FUNDC1通路抑制线粒体自噬减轻H9c2心肌细胞缺氧/复氧损伤[J].中国中药杂志,2024,49(5):1286-1294.
- [11] MCMURRAY J J, PFEFFER M A. Heart failure [J]. Lancet,2005,365(9474):1877-1889.
- [12] TOMASONI D, ADAMO M, LOMBARDI C M, et al. Highlights in heart failure[J]. ESC Heart Fail,2019,6(6):1105-1127.
- [13] JENNINGS R B, GANOTE C E. Mitochondrial structure and function in acute myocardial ischemic injury [J]. Circ Res,1976,38(5 Suppl 1):I80-I91.
- [14] 周喆.线粒体自噬在糖尿病心脏病心脏纤维化中的作用研究[D].成都:西南交通大学,2023.
- [15] PICCA A, FAITG J, AUWERX J, et al. Mitophagy in human health, ageing and disease[J]. Nat Metab,2023,5(12):2047-2061.
- [16] DORN G W. Mitochondrial pruning by nix and BNIP3: An essential function for cardiac-expressed death factors[J]. J Cardiovasc Transl Res,2010,3(4):374-383.
- [17] GIVVIMANI S, MUNJAL C, TYAGI N, et al. Mitochondrial division/mitophagy inhibitor (Mdivi) ameliorates pressure overload induced heart failure[J]. PLoS One, 2012,7(3):e32388.

- [18] MAO S, TIAN S N, LUO X H, et al. Overexpression of PLK1 relieved the myocardial ischemia-reperfusion injury of rats through inducing the mitophagy and regulating the p-AMPK/FUNDC1 axis[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1):2676-2687.
- [19] QI H P, REN J, BA L N, et al. MSTN attenuates cardiac hypertrophy through inhibition of excessive cardiac autophagy by blocking AMPK/mTOR and miR-128/PPAR γ /NF- κ B[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19:507-522.
- [20] 吴雁泽,熊文俊.PINK1/parkin信号通路介导的线粒体自噬在心力衰竭中的作用[J].*中国病理生理杂志*, 2021, 37(10):1894-1899.
- [21] GUAN S B, XIN Y F, DING Y G, et al. Ginsenoside Rg1 protects against cardiac remodeling in heart failure via SIRT1/PINK1/parkin-mediated mitophagy[J]. *Chem Biodivers*, 2023, 20(2):e202200730.
- [22] 陈乘波,陈天宝,许友榜.川芎嗪通过JAK2/STAT3信号通路调节线粒体自噬减轻心肌缺血再灌注损伤的机制研究[J].*中国免疫学杂志*, 2021, 37(7):819-823.
- [23] 邸松蕊,朱映黎,李一芄,等.基于药证相应探讨附子对虚寒、虚热证候一氧化氮/线粒体能量代谢信号通路的影响[J].*中华中医药杂志*, 2024, 39(8):3996-4001.
- [24] 谢丽钰,卢健棋,罗宇东,等.桂枝及桂枝类方治疗心血管疾病研究进展[J].*辽宁中医药大学学报*, 2024, 26(7):82-86.
- [25] 杨敏,雷瑗琳,张立,等.益心附葶饮对心衰大鼠心肌能量代谢的影响[J].*临床医学研究与实践*, 2023, 8(28):22-25, 150.
- [26] 吴梦瑶,张卉,王陆,等.线粒体自噬受体蛋白BNIP3的研究进展[J].*中国病理生理杂志*, 2023, 39(3):534-542.
- [27] LI Y, WANG Y A, KIM E, et al. Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mammalian target of rapamycin by interacting with Rheb[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(49):35803-35813.
- [28] SHIRES S E, GUSTAFSSON Å B. Mitophagy and heart failure[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2015, 93(3):253-262.
- [29] CHEN Y M, CHANG C Y, CHEN H H, et al. Association between autophagy and inflammation in patients with rheumatoid arthritis receiving biologic therapy[J]. *Arthritis Res Ther*, 2018, 20(1):268.
- [30] 顾超,杨家龙,舒超,等.FOXM1c调控选择性自噬接头蛋白p62启动子活性的研究[J].*塔里木大学学报*, 2024, 36(4):98-104.
- [31] 曾小芳.Becn1-1敲除抑制非经典线粒体自噬改善高脂诱导的心肌损伤[D].长沙:中南大学, 2023.
- [32] 卢少华,庄海霞,朱晨,等.线粒体自噬在心血管疾病中的作用[J].*中国病理生理杂志*, 2025, 41(1):142-156.

(收稿日期:2025-06-16 编辑:刘国华)

(上接第22页)

- [14] 孙婉玉,黄敏,成金罗,等.温暖暴露对SAMP6小鼠骨密度及CTX-1和ALP水平的影响[J].*中国老年学杂志*, 2024, 44(22):5544-5547.
- [15] 张玉凤,吴小红,辜向东,等.老年性骨质疏松模型小鼠的颅骨增龄性变化[J].*动物医学进展*, 2015, 36(4):73-78.
- [16] AZUMA K, ZHOU Q, KUBO K Y. Morphological and molecular characterization of the senile osteoporosis in senescence-accelerated mouse prone 6 (SAMP6)[J]. *Med Mol Morphol*, 2018, 51(3):139-146.
- [17] TAN C, CONG S B, XIE Y M, et al. Mechanistic integration of network pharmacology and in vivo validation: TFRD combat osteoporosis via PI3K/AKT pathway activation[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(8):3650.
- [18] WANG Y G, QU X H, YANG Y, et al. AMPK promotes osteogenesis and inhibits adipogenesis through AMPK-Gli1-OPN axis[J]. *Cell Signal*, 2016, 28(9):1270-1282.
- [19] REN M X, LIU H D, JIANG W K, et al. Melatonin repairs osteoporotic bone defects in iron-overloaded rats through PI3K/AKT/GSK-3 β /P70S6k signaling pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2023, 2023:7718155.
- [20] ZHANG R R, OYAJOBIB O, HARRIS S E, et al. Wnt/ β -catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts[J]. *Bone*, 2013, 52(1):145-156.
- [21] GAUR T, LENGNER C J, HOVHANNISYAN H, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(39):33132-33140.
- [22] LI H B, YANG C L, LAN M, et al. Arctigenin promotes bone formation involving PI3K/Akt/PPAR γ signaling pathway[J]. *Chem Biol Drug Des*, 2020, 95(4):451-459.
- [23] 刘志恒,武永刚,阿日奔吉日嘎拉,等.骨碎补总黄酮通过调控PI3K/AKT/NF- κ B信号通路对老年骨质疏松大鼠的影响[J].*中国老年学杂志*, 2025, 45(15):3688-3692.

(收稿日期:2025-07-14 编辑:蒋凯彪)