

· 全军老年医学会议专栏 ·

## 心复康口服液对急性力竭大鼠心肌坏死的保护作用

刘海燕, 王晨阳, 崔玉娟, 周玉文, 徐 鹏, 曹雪滨\*

(解放军第252医院心内科, 全军老年心血管病研究诊疗中心, 保定 071000)

**【摘要】目的** 观察急性力竭应激运动后大鼠心肌组织的坏死情况以及心复康口服液的保护作用。**方法** 采用SD雄性大鼠制作急性游泳力竭模型。40只大鼠随机分为4组, 每组10只: 对照组, 低剂量心复康+急性力竭组, 高剂量心复康+急性力竭组, 急性力竭组。其中心复康+力竭组于每天9:00~10:00点用心复康口服液灌胃6周, 对照组与急性力竭组灌胃等量生理盐水。造模成功后即刻取材, 电镜观察各组心肌组织变化; 提取心肌组织总DNA检测基因坏死程度; Western印迹法测定心肌组织细胞外调节蛋白激酶(ERK)及其磷酸化蛋白(p-ERK)的表达情况。**结果** 电镜观察显示急性力竭大鼠心肌组织线粒体肿胀、肌节坏死明显, 且其心肌DNA降解明显。与力竭组相比, 心复康+力竭组的心肌组织电镜形态、DNA完整度均有明显改善, p-ERK表达均明显上升( $P < 0.05$ )。**结论** 预服心复康口服液对心肌坏死有一定程度的预防作用。

**【关键词】** 心复康口服液; 急性力竭; 心肌坏死

**【中图分类号】** R285.5

**【文献标识码】** A

**【DOI】** 10.3724/SP.J.1264.2013.00170

## Protective effect of Xinfukang oral liquid on myocardial necrosis in rats following acute exhausted exercise

LIU Hai-Yan, WANG Chen-Yang, CUI Yu-Juan, ZHOU Yu-Wen, XU Peng, CAO Xue-Bin\*

(Department of Cardiology, Research, Diagnosis and Treatment Center for Senior Cardiovascular Diseases, Chinese PLA No. 252 Hospital, Baoding 071000, China)

**【Abstract】 Objective** To observe cardiomyocyte necrosis in the rats induced by acute exhausted exercise and determine the protective effects of Xinfukang oral liquid (a traditional Chinese medicine) on the necrosis. **Methods** A total of 40 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into 4 groups: control group, the low dose Xinfukang oral liquid [5ml/(kg · d)] + acute exhaustive group, the high dose Xinfukang oral liquid [10ml/(kg · d)] + acute exhaustive group, and acute exhaustive group ( $n = 10$  for each group). The Xinfukang oral liquid groups were treated with Xinfukang oral liquid at corresponding doses for 6 weeks by intragastrical administration before model induction, and the rats from the control group and acute exhaustive group were given normal saline instead of Xinfukang oral liquid. Acute exhausted exercise was carried out according to the classical Thomas' induction, and then identified by the rats' behaviors and signs. Myocardial necrosis was observed by transmission electron microscopy. DNA ladder were detected to observe myocardial cell DNA degradation. Western blotting was used to analyze the expression of total extracellular signal-regulated kinase (ERK) and phosphorylated ERK (p-ERK) in all groups. **Results** Transmission electron microscopy indicated that exhausting exercise group showed significantly more serious mitochondria swelling, obvious myocardial necrosis and DNA degradation. Compared with exhausted group, pretreatment of Xinfukang oral liquid resulted in attenuated injury in both myocardial cells and DNA integrity, and a increased ratio of p-ERK expression( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Pretreatment of Xinfukang oral liquid exerts a preventive effect on cardiomyocyte necrosis induced by acute exhaustive exercise.

**【Key words】** Xinfukang oral liquid; acute exhaustive exercise; cardiomyocyte necrosis

*This work was supported by the Key Project of Scientific Research in Traditional Chinese Medicine of PLA (10ZYZ106).*

*Corresponding author: CAO Xue-Bin, E-mail: caoxb252@163.com*

力竭运动是一种超出机体负荷的应激运动, 急性力竭运动时, 机体代谢速率加快, 血液和氧气的需求

突然增加, 而机体供给的速度相对滞后, 在这种状态下, 容易造成心肌急性相对缺血, 引起心功能障碍及

收稿日期: 2013-07-24; 修回日期: 2013-08-23

基金项目: 军队中医药科研专项重点课题(10ZYZ106)

通信作者: 曹雪滨, E-mail: caoxb252@163.com

王晨阳, 为共同第一作者

心肌结构损伤坏死<sup>[1-3]</sup>。运动急性猝死的案例并不少见,如何预防及是否可以通过预服心脏保护药物来降低猝死的研究相对较少<sup>[4-6]</sup>。心复康口服液是以益气活血为立方依据组成的方剂,主要用以治疗充血性心力衰竭及各种心肌损伤,在解放军252医院临床应用多年。本文采用一次性急性力竭游泳训练制作大鼠急性力竭模型,观察急性力竭应激运动后大鼠心肌组织的坏死情况以及心复康口服液的保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

清洁级雄性Sprague-Dawley (SD) 大鼠40只, 体质量(200±25)g, 由军事医学科学院实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(京)2003-1-003。常规分笼饲养, 自由进食和饮水。

40只大鼠随机分为4组: 对照组, 低剂量心复康+急性力竭组, 高剂量心复康+急性力竭组和急性力竭组, 每组10只。每天上午9:00~10:00点对低剂量心复康+急性力竭组以5ml/(kg·d)心复康口服液灌胃, 高剂量心复康+急性力竭组以10ml/(kg·d)心复康口服液灌胃, 同时急性力竭组及对照组分别给予等量生理盐水灌胃。

### 1.2 试剂与药品

戊巴比妥钠购于Sigma公司; 心复康口服液为本院自制, 批准文号: 北制字(2006)F17003; 批号20110406、20110526; 99%红景天苷粉剂购于上海英轩生化试剂有限公司; GAPDH抗体、细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated kinase, ERK)与其磷酸化蛋白(phosphorylated ERK, p-ERK)抗体均购于CST公司, BCA蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE胶等试剂购于北京庄盟试剂公司。

### 1.3 大鼠力竭模型的制作

采用经典Thomas方法制备大鼠急性力竭模型。采用高70cm, 直径50cm的水桶做游泳槽, 水深55cm以上, 水温(30±2)℃, 每个水桶一次至多放入2只大鼠游泳。正式试验前进行一次尾部负重2%的适应性游泳训练, 运动前大鼠称重, 选取5%体质量的铅丝悬挂于大鼠尾部。游泳力竭模型建立的判定标准: 游泳时间超过5h; 呼吸急促, 游泳运动不协调; 10s不上浮; 捞出后现神情疲倦、呆滞、无逃避反应等疲劳症状。

### 1.4 电镜观察心肌组织

麻醉大鼠开胸取心, 在心脏尚在搏动时, 取直径约1mm的心尖部位, 立即用4℃的3%戊二醛、1.5%

多聚甲醛、0.1mmol/L磷酸盐缓冲液固定, 切为1mm<sup>3</sup>的小块, 放入试剂瓶中固定4h, 磷酸盐缓冲液漂洗后用4℃的1%锇酸再固定1.5h, 漂洗后乙醇、丙酮脱水, 环氧树脂包埋。超薄切片60nm, 醋酸铀、柠檬铅染色, 透射电镜下观察。

### 1.5 Western印迹法检测p-ERK和ERK表达量

心肌组织取全部左心室, 匀浆提取蛋白。BCA法测量各组蛋白含量, 将蛋白调节上样量一致, 然后进行SDS-PAGE分离。湿转法将蛋白质电转移至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温孵育1h, 按0.1ml/cm<sup>2</sup>的量加入一抗p-ERK或ERK抗体: 1:2000稀释; GAPDH: 1:2000稀释, 4℃过夜后, TBST洗膜3次, 每次10min。二抗室温孵育1h。TBST清洗3次, ECL显像, 凝胶成像系统自动曝光, 曝光成像、扫描、软件分析。

### 1.6 DNA检测心肌细胞坏死

提取心肌组织DNA, 检测核酸纯度与浓度后于2%琼脂糖凝胶电泳, 80V, 30min, 染色后凝胶成像观察DNA断裂情况。

## 2 结果

### 2.1 电镜观察

电镜结果显示, 对照组可见正常心肌组织, 心肌细胞结构完好, 肌丝清楚, 肌节整齐, 线粒体丰富, 无水肿, 无空泡; 急性力竭组的肌节周基质高度水肿, 线粒体和糖原明显减少, 线粒体大部分嵴和膜融合、模糊不清或缺少; 低剂量心复康口服液用药+急性力竭组中线粒体肿胀, 部分线粒体嵴溶解, 但情况较急性力竭组轻微; 高剂量心复康口服液用药+急性力竭组中核周隙轻度扩张, 接近纵切, 肌节排列整齐, 核周间隙稍微变宽(图1)。

### 2.2 Western印迹法检测

各组心肌细胞ERK总蛋白量表达差异不明显, 而磷酸化蛋白 p-ERK表达有明显变化, 对照组中p-ERK基本不表达, 而急性力竭组中表达量最高, 心复康口服液用药组的表达量处于中间水平, 且与用药剂量相关(图2)。

### 2.3 DNA检测

对照组和高剂量心复康口服液用药组DNA完整无降解, 力竭组DNA降解明显, 大部分断裂为2000bp左右的片段, 低剂量心复康口服液用药组DNA也有降解, 但与急性力竭组比较程度有所减轻(图3)。

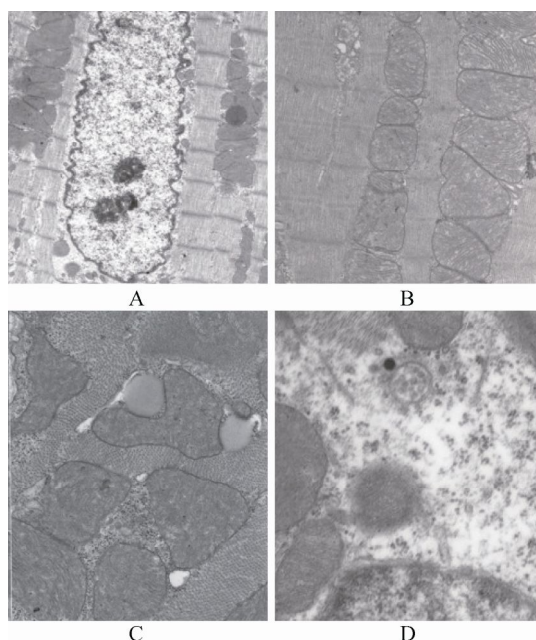


图1 各组心肌组织电镜结果

Figure 1 Transmission electron microscopy of all groups ( $\times 15\,000$ )  
A: control group; B: high dose Xinfukang oral liquid + acute exhausted exercise group; C: low dose Xinfukang oral liquid + acute exhausted exercise groups; D: acute exhaustive group

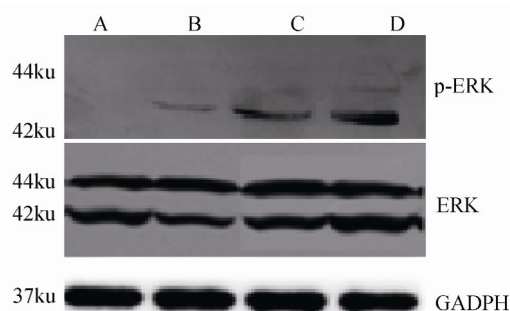


图2 各组心肌组织 Western 印迹法结果

Figure 2 Western blot results of all groups  
A: control groups; B: high dose Xinfukang oral liquid + acute exhausted exercise groups; C: low dose Xinfukang oral liquid + acute exhausted exercise groups; D: acute exhaustive group

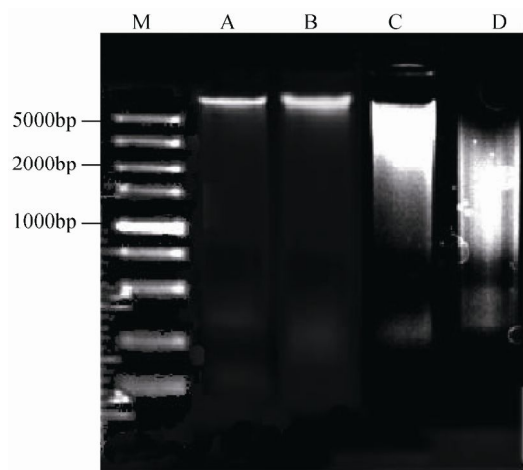


图3 各组心肌组织DNA电泳结果

Figure 3 DNA electrophoresis results of all groups  
M: marker; A: control groups; B: high dose Xinfukang oral liquid + acute exhausted exercise groups; C: low dose Xinfukang oral liquid + acute exhausted exercise groups; D: acute exhaustive group

### 3 讨论

力竭运动是指过度运动超过机体自身的调节能力。力竭运动会造成心脏损伤,主要表现在心肌损伤、心功能受损、心肌结构改变、心脏生化改变等方面<sup>[7,8]</sup>。探讨力竭运动损伤机制及从传统的中医药角度去缓解力竭损伤有着重要意义。本实验从力竭性运动诱发心肌损伤的角度,探讨心复康口服液对力竭运动后心脏损伤的保护作用及可能机制。

我们的电镜实验结果显示急性力竭能严重影响心脏的微观形态,与对照组相比,即刻力竭大鼠的肌原纤维从极度收缩的有组织状态变为肌原纤维失去方向的无组织状态,肌节周极度水肿,线粒体表现为肿胀并伴有嵴的瓦解和线粒体膜之间的间隙变窄,这与以往报道一致<sup>[9-11]</sup>。与急性力竭组比较,以心复康口服液10ml/(kg·d)灌胃6周后再力竭,心肌受损明显减轻,说明心复康口服液可以有效预防力竭运动造成的心肌损伤。

在对急性力竭的研究中,很多报道都集中在对凋亡的研究上。我们进行DNA检测发现,实验中的力竭大鼠DNA并未表现出凋亡应出现的DNA ladder现象,而是出现了大面积的弥散,表明DNA发生了降解,这说明在急性力竭过程中,DNA发生了损伤。同样,心复康口服液有效缓解了力竭运动对心肌造成的损害,这可能与心复康口服液降低心肌耗氧量及心肌摄取率有关。在心肌中绝大多数是线粒体,线粒体是对各种损伤最为敏感的细胞器之一,在力竭过程中,心肌细胞缺血缺氧,很可能由于大量的自由基攻击线粒体,造成线粒体DNA断裂,最终线粒体肿胀坏死。

细胞外调节蛋白激酶-丝裂原活化蛋白激酶(ERK-mitogen-activated protein kinase, ERK-MAPK)是由Boulton等在1990年初期先后分离鉴定的一种蛋白激酶,是MAPK家族中的重要成员,由一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶酸化而成<sup>[12,13]</sup>。ERK-MAPK对细胞应激具有特异性反应,包括细胞增殖、细胞分化、细胞存活,能被大量的胞外因子激活<sup>[14]</sup>,研究ERK-MAPK信号转导系统对阐明力竭心脏的病理生理机制和研究防治机制有重要意义。我们的研究发现力竭运动能引起ERK-MAPK的磷酸化,但不影响ERK-MAPK总蛋白表达量,说明ERK信号转导途径参与了机体对力竭产生的应激。

力竭运动中局部组织和细胞的死亡称为坏死,当各部分损伤作用达到一定的强度和持续时间,受损的组织、细胞代谢完全停止,即可引起组织和细胞的死亡。进一步研究力竭造成的脏器损伤及运用

广泛的中药资源来有效地预防, 对提高运动效率, 减少训练心脏损伤有着重要意义。

# 【参考文献】

- [1] 王晓伟, 曹雪滨. 力竭性运动对心脏影响的研究进展[J]. 医学研究与教育, 2012, 29(4): 60-64.
- [2] 王福文, 胡志力, 李 杰. 力竭性运动致运动性心肌损伤的产生机制[J]. 中国临床康复, 2005, 9(8): 144-146.
- [3] 李 爽, 李燕舞, 阿拉木. 力竭性运动对大鼠胃组织损伤的研究[J]. 成都体育学院学报, 2008, 34(1): 81-83.
- [4] Harmon KG, Asif IM, Klossner D, *et al.* Incidence of sudden cardiac death in national collegiate athletic association athletes[J]. Circulation, 2011, 123(15): 1594-1600.
- [5] 董玉福. 学生运动性猝死频发的原因及预防对策探析[J]. 大理学院学报, 2013, 12(3): 26-30.
- [6] Estes NA 3rd, Link MS. Preparticipation athletic screening including an electrocardiogram: an unproven strategy for prevention of sudden cardiac death in the athlete[J]. Prog Cardiovasc Dis, 2012, 54(5): 451-454.
- [7] 王福文, 赵敬国, 王 燕, 等. 力竭性运动后大鼠血清CK、CK-MB活性和心肌组织形态学的动态改变[J]. 中国应用生理学杂志, 2011, 27(1): 52-55, 134.
- [8] Lin X, Jiang C, Luo Z, *et al.* Protective effect of erythropoietin on renal injury induced in rats by four weeks of exhaustive exercise[J]. BMC Nephrol, 2013, 14(1): 130.
- [9] 韦小英, 马 彬, 吴洪海, 等. 游泳运动对大鼠心房里肌细胞超微结构的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2013, 28(4): 319-324.
- [10] Lucena MC, Paniagua R. Structural changes in the rat myocardium after exhaustive exercise[J]. Acta Cardiol, 1984, 39 (1): 41-54.
- [11] Lucena MC, Paniagua R. Effects of exercise to exhaustion in rat myocardium. A stereological study[J]. Acta Cardiol, 1984, 39(6): 463-477.
- [12] Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, *et al.* An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control[J]. Sciences, 1990, 249(4964): 64-67.
- [13] Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, *et al.* ERKs: a family of protein serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF[J]. Cell, 1991, 65(4): 663-675.
- [14] Torii S, Nakayama K, Yamamoto T, *et al.* Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinases[J]. J Biochem, 2004, 136(5): 557-561.
- [15] Sugden PH, Clerk A. Oxidative stress and growth-regulating intracellular signaling pathways in cardiac myocytes[J]. Antioxid Redox Signal, 2006, 8(11-12): 2111-2124.
- [16] Bueno OF, Molkentin JD. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death[J]. Circ Res, 2002, 91(9): 776-781.

(编辑: 张青山)