DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.04.038

益气温阳活血利水方调控MLK3介导的线粒体未折叠蛋白反应保护心肌细胞作用机制研究

李镇南[1,2],张中正[2],谢抗[3],庄皓文[3],王俊岩[2,3]
(1.浙江大学药学院,浙江 杭州 310058;2. 广州中医药大学中药学院,广东 广州 510006;
3.广州中医药大学第一临床医学院,广东 广州 510405)

摘要:目的 观察益气温阳活血利水方(Yiqi Wenyang Huoxue Lishui Recipe,YWHLR)调控混合谱系酶3(mixed lineage kinase 3,MLK3)介导的线粒体未折叠蛋白反应(mitochondrial unfolded protein response,UPR^{mt})对心肌细胞的保护作用,探讨益气温阳活血利水方防治心力衰竭的作用机制。方法 采用血管紧张素2(angiotensin Ⅱ,AngⅡ)制备小鼠HL-1心肌细胞损伤模型,分别给予URMC-099、寡霉素A(Oligomycin A)、益气温阳活血利水方干预,分为对照组(Control)、AngⅡ组、AngⅡ+URMC-099组、AngⅡ+Oligomycin组、AngⅡ+YWHLR组,收集上述细胞,采用CCK-8法检测细胞活性;RT-qPCR法检测各组HL-1细胞MLK3及UPR^{mt} mRNA水平[MLK3、C/EBP同源蛋白(C/EBP-homologous protein,CHOP)、线粒体离子肽酶1(lon peptidase 1,mitochondrial,LONP1)、热休克蛋白60(heat shock protein 60,HSP60)、热休克蛋白70(heat shock protein 70,HSP70)];Western blot检测各组HL-1细胞MLK3及UPR^{mt}相关蛋白水平(MLK3、CHOP、LONP1、HSP60、HSP70);免疫荧光双标法检测HSP70、MLK3蛋白的表达情况。结果 与对照组相比,AngⅡ组的MLK3表达水平显著上升($P<0.05$),CHOP、LONP1、HSP60、HSP70表达水平显著下降($P<0.05$);与AngⅡ组相比,AngⅡ+URMC-099组MLK3表达水平显著下降($P<0.05$),CHOP、LONP1、HSP60、HSP70表达水平显著上升($P<0.05$);与AngⅡ组相比,AngⅡ+Oligomycin组MLK3表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),CHOP、LONP1、HSP60、HSP70表达水平显著上升($P<0.05$);与AngⅡ组相比,AngⅡ+YWHLR组MLK3表达水平显著下降($P<0.05$),CHOP、LONP1、HSP60、HSP70表达水平显著上升($P<0.05$)。结论 益气温阳活血利水方可能通过调控MLK3介导的线粒体未折叠蛋白反应发挥保护心肌细胞作用。

关键词:线粒体未折叠蛋白反应;益气温阳活血利水方;心力衰竭;MLK3
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)04-0196-08

Protective Mechanism of Cardiomyocytes by Yiqi Wenyang Huoxue Lishui Recipe(益气温阳活血利水方) Through Regulating MLK3-Mediated Mitochondrial Unfolded Protein Response

LI Zhennan[1,2],ZHANG Zhongzheng[2],XIE Kang[3],ZHUANG Haowen[3],WANG Junyan[2,3]
(1. College of Pharmaceutical Sciences,Zhejiang University,Hangzhou 310058,Zhejiang,China;
2. College of Pharmaceutical Sciences,Guangzhou University of Chinese Medicine,Guangzhou 510006,Guangdong,China;
3. The First Clinical Medical School of Guangzhou University of Chinese Medicine,Guangzhou 510405,Guangdong,China)

Abstract:*Objective* The study aimed to observe the cardioprotective effects of Yiqi Wenyang Huoxue Lishui Recipe(益气温阳活血利水方,YWHLR) by regulating the mixed lineage kinase 3(MLK3) mediated mitochondrial unfolded protein response(UPR^{mt}) and to explore the mechanism of YWHLR in preventing and treating heart failure. *Method* The mouse HL-1 cardiomyocyte model was prepared using angiotensin Ⅱ(AngⅡ),followed by interventions with URMC-099,Oligomycin A and YWHLR medicated serum. The mice were divided into control,AngⅡ,AngⅡ+URMC-099,AngⅡ+Oligomycin and AngⅡ+YWHLR groups. Cell viability and proliferation were assessed using the CCK-8 assay. RT-PCR measured the levels of MLK3 and UPR^{mt} mRNA(MLK3,CHOP,LONP1,HSP60,HSP70),and Western blot analyzed the protein levels related to MLK3 and

基金项目:国家自然科学基金项目(8220150462)
作者简介:李镇南(2002-),男,广东广州人,硕士在读,研究方向:中医药防治心血管疾病。
通讯作者:王俊岩(1992-),男,辽宁营口人,副研究员,博士研究生导师,博士,研究方向:中医药防治心力衰竭。E-mail:junyan_wang@163.com。

UPR^{mt} (MLK3, CHOP, LONP1, HSP60, HSP70). Immunofluorescence double staining was employed to detect the expressions of HSP70 and MLK3 proteins. *Results* Compared to the control group, the AngⅡ group showed a significant increase in MLK3 expression ($P<0.01$) and a significant decrease in the levels of CHOP, LONP1, HSP60 and HSP70 ($P<0.01$). The AngⅡ + URMC-099 group exhibited a significant decrease in MLK3 expression ($P<0.01$) and a significant increase in the levels of CHOP, LONP1, HSP60 and HSP70 ($P<0.01$) compared to the AngⅡ group. The AngⅡ + Oligomycin group showed no significant difference in MLK3 expression ($P>0.05$) but a significant increase in the levels of CHOP, LONP1, HSP60 and HSP70 ($P<0.01$). The AngⅡ + YWHLR group demonstrated a significant decrease in MLK3 expression ($P<0.01$) and a significant increase in the levels of CHOP, LONP1, HSP60 and HSP70 ($P<0.01$) compared to the AngⅡ group. *Conclusion* YWHLR medicated serum may exert its therapeutic effects by modulating the MLK3-mediated mitochondrial unfolded protein response.

Keywords: mitochondrial unfolded protein response; Yiqi Wenyang Huoxue Lishui Recipe (益气温阳活血利水方); heart failure; MLK3

心力衰竭(heart failure, HF)是由诸多原因导致心脏结构和(或)功能异常变化,使心室收缩和(或)舒张功能发生障碍的复杂临床综合征,是21世纪最严重的心血管病症之一[1-2],加重HF发展的主要原因有冠心病、高血压和糖尿病等[3-4]。《中国心血管健康与疾病报告2022》显示我国现有高血压病患者2.45亿人,冠心病患者1139万人。随着人口老龄化发展,HF的潜在人群进一步增加,发病率和病死率逐年升高[5]。我国HF患者年平均住院次数超过3次,平均住院时间超过9 d,人均住院费用超过29 000元,且多数HF患者在接受最大限度的治疗之后,预后情况仍然不佳,出现呼吸困难、易疲劳、尿潴留等严重影响生活质量的症状[4,6]。HF已成为我国严重的公共卫生问题,因此探究其防治措施至关重要。新近研究证明线粒体未折叠蛋白反应(mitochondrial unfolded protein response, UPR^{mt})是一种可以维持或改善线粒体蛋白质稳态的应激反应,可改善线粒体功能,减少应激时心脏损伤,对心肌细胞损伤起保护作用,可能是HF的潜在治疗靶点[7-8]。

益气温阳活血利水方(Yiqi Wenyang Huoxue Lishui Recipe, YWHLR)对HF治疗效果显著,可能通过抑制心脏成纤维细胞激活、提高肠道菌群多样性、抑制心肌细胞自噬等机制实现[9-11]。前期分子对接实验发现益气温阳活血利水方与混合谱系激酶3(mixed lineage kinases, MLK3)结合力较强,本次研究通过观察MLK3在血管紧张素2(angiotensin Ⅱ, AngⅡ)诱导的心肌细胞损伤中的表达水平,并检测MLK3在参与线粒体未折叠蛋白反应中的作用,探讨益气温阳活血利水方治疗心肌细胞损伤的可能机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及实验动物

小鼠HL-1心肌细胞(武汉Procell生命科技有限公司);SD大鼠40只,雄性,SPF级,体质量为180~220 g,购于广州中医药大学实验动物中心[动物许可证号:SYXK(粤)2018-0034,质量合格证号:44005800008163]。动物于广州中医药大学实验动物中心饲养[许可证号:SCXK(粤)2018-0001],环境温度为22~24 ℃,相对湿度为50%~70%,自由摄食与饮水。

1.2 药品及试剂

AngⅡ购自Sigma公司;URMC-099购自MedChemExpress公司;寡霉素A(Oligomycin A)(批号:04876)购自美国Sigma-Aldrich公司;MLK3抗体(批号:11996-1-AP),C/EBP同源蛋白(C/EBP-homologous protein, CHOP)抗体(批号:15204-1-AP),线粒体离子肽酶1(lon peptidase 1, mitochondrial, LONP1)抗体(批号:15440-1-AP)均购自中国Proteintech公司;热休克蛋白60(heat shock protein 60, HSP60)抗体(批号:sc-59567),热休克蛋白70(heat shock protein 70, HSP70)抗体(批号:sc-71278),均购自美国Santa Cruz公司;GAPDH抗体(批号:ab8245)购自英国Abcam公司;HRP标记二抗(批号:7074)购自德国CST公司;FastKing RT反转录试剂盒(批号:R6620)购自北京天根生化科技有限公司;SYBR SelectMaster-Mix(批号:1710054)购自美国LifeTechnology公司。

1.3 仪器

BX53型正置光学显微镜(日本OLYMPUS公司);电泳仪(美国BIO-RAD公司);转膜仪(美国BIO-RAD公司);荧光显微镜(日本Nikon公司);QuantStudio 3型实时荧光定量PCR系统(美国AppliedBiosystems公司);全自动凝胶成像系统(美国BIO-RAD公司);多功能酶标仪(美国Thermo/MultiskanFC公司)。

1.4 方法

1.4.1 制备 将40只雄性SD大鼠适应性喂养7 d,随机等数量分成对照组(Control)与实验组。按照人与动物体表面积进行等效剂量换算。各组大鼠每天灌胃2次,每次2 mL,连续7 d。末次给药灌胃后3 h,采用腹腔注射1.5%苯巴比妥钠溶液麻醉大鼠,腹主动脉取血,在4 ℃冰箱静置1 h后,以15 000 r/min离心10 min,分离血清,将两组血清放置于55 ℃水浴45 min,使用无菌滤器过滤除菌后置于-80 ℃冰箱保存备用。

1.4.2 心肌细胞培养及分组给药 培养HL-1小鼠心肌细胞系,将HL-1细胞培养在含10%胎牛血清,100 U/mL青霉素和100 mg·mL^{-1}链霉素的培养基中培养,培养箱环境设置为37 ℃、95%空气、5% CO_2。当细胞密度达到80%~90%时,进行后续实验。将MLK3抑制剂URMC-099溶解于DMSO中,使终浓度为200 μg·mL^{-1};UPR^{mt}诱导剂寡霉素A(Oligo-

mycin A)溶解于DMSO中,使用浓度为10 μg·mL^{-1}。细胞实验分组为:对照组(Control)、AngⅡ组、AngⅡ + URMC-099组、AngⅡ + Oligomycin组、AngⅡ + YWHLR组。

1.4.3 CCK8法检测细胞活性 将HL-1细胞悬液种植于96孔板中,每孔细胞数目不少于2000个细胞,每孔200 μL。待96孔板细胞贴壁后,给予处理。干预24 h后向每孔加入20 μL的CCK-8溶液,37 ℃孵育4 h。用酶标仪测定在450 nm处的吸光值,并根据OD值测定细胞活力。细胞活力(%) = [(加药-空白)/(不加药-空白)]×100%。

1.4.4 RT-qPCR检测各组细胞中MLK3及UPR^{mt} mRNA水平 按Trizol试剂盒说明提取心肌细胞HL-1总RNA,核酸蛋白分析仪测定RNA纯度。使用All-in-One cDNA Synthesis SuperMix试剂盒将总RNA反转录为cDNA,设置反应条件:42 ℃ 15 min,85 ℃ 2 min,4 ℃ ∞。以2 μL cDNA为模板进行扩增,设置反应条件:95 ℃ 1 min;95 ℃ 15 s→60 ℃ 30 s→72 ℃ 30 s,40个循环;95 ℃ 1 min;95 ℃ 15 s→60 ℃ 1 min→95 ℃ 15 s,1个循环。按$2^{-\Delta\Delta Ct}$法进行定量分析,实验所需引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。见表1。

表1 引物序列

基因	正向序列	反向序列
GAPDH	GGTTGTCTCCTGCGACTTCA	TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC
MLK3	CTTGGATGGCTCCCGAGGTTAT	CACCATAGGCTACGGCAAGACA
CHOP	GGAGGTCCTGTCCTCAGATGAA	GCTCCTCTGTCAGCCAAGCTAG
LONP1	CCAAGCATGTGATGGACGTGGT	GTCCAAGTTCTCATCACTCTGCC
HSP60	TGCTCATCGGAAGCCATTGGTC	TTGACTGCCACAACCTGAAGACC
HSP70	ACAAGTCGGAGAACGTGCAGGA	GTTGTCCGAGTAGGTGGTGAAG

1.4.5 Western blot检测各组细胞中MLK3及UPR^{mt}相关蛋白水平 加入蛋白裂解液提取总蛋白,BCA法测定蛋白浓度。使用Loadingbuffer变性后进行电泳,每泳道上样蛋白30 μg,电泳后电转膜至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭,加入1∶1000兔抗小鼠MLK3、CHOP、LONP1、HSP60、HSP70,4 ℃摇床孵育过夜,TBST洗涤3次,每次10 min,加入HRP标记的羊抗兔二抗,1 h后,TBST洗涤3次,每次10 min,按试剂盒说明书混合发光液A和B,与膜作用3 min后,使用伯乐化学发光成像系统进行曝光。

1.4.6 免疫荧光双标法检测各组细胞中HSP70、MLK3蛋白的表达情况 细胞置于激光共聚焦皿中培养,待干预完成后,采用多聚甲醛固定细胞后行免疫荧光染色。首先加入驴血清(含0.1%曲拉通用于破膜)对细胞进行封闭30 min,封闭完成后弃去封闭液,加入事先准备好的一抗进行孵育,4 ℃孵育过夜后,弃去一抗,加入对应的荧光二抗进行室温孵育1 h后,弃去二抗,清洗后加入DAPI染色液染色5 min,清洗后采用激光共聚焦显微镜进行拍照。

1.4.7 统计学方法 实验数据均为计量资料数据,用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 26.0和GraphPadPrism 8.0软件进行统计分析,组间比较首先进行正态分布检验和单因素方差齐性分析,若方差齐,两组比较采用t检验,若方差不齐,组间比较采用Dunnett T3检验,$P<0.05$时差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK8法检测各组心肌细胞活力

与对照组相比,AngⅡ组细胞活力显著降低($P<0.05$),与AngⅡ组相比,AngⅡ + URMC-099组、AngⅡ + Oligomycin组、AngⅡ + YWHLR组细胞活力显著升高($P<0.05$)。结果提示,AngⅡ刺激能显著降低细胞活力,URMC-099、Oligomycin、YWHLR处理均可以提高AngⅡ处理后的细胞活力。见插页XXXⅣ图1。

2.2 各组心肌细胞相关mRNA表达情况

与对照组相比,AngⅡ组的MLK3 mRNA表达水平显著上升($P<0.05$),CHOP、LONP1、HSP60、HSP70 mRNA表达水平显著下降($P<0.05$);与AngⅡ组相比,AngⅡ + URMC-099组MLK3 mRNA表达水平显著下降($P<0.05$),CHOP、LONP1、HSP60、HSP70 mRNA表达水平显著上升($P<0.05$);与AngⅡ组相比,AngⅡ + Oligomycin组MLK3 mRNA表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),CHOP、LONP1、HSP60、HSP70 mRNA表达水平显著上升($P<0.05$);与AngⅡ组相比,AngⅡ + YWHLR组MLK3 mRNA表达水平显著下降($P<0.05$),CHOP、LONP1、HSP60、HSP70 mRNA表达水平显著上升($P<0.05$)。结果提示,与对照组相比,AngⅡ组MLK3 mRNA表达水平显著升高;在URMC-099与YWHLR干预后MLK3 mRNA表达水平显著降低;在URMC-099、Oligomycin与YWHLR干预后,UPR^{mt}相关CHOP、LONP1、HSP60、HSP70 mRNA的表达水平均显著提高。见插页XXXⅣ图2。

2.3 各组心肌细胞相关蛋白表达情况

与对照组相比,AngⅡ组的MLK3蛋白表达水平显著上升($P<0.05$),CHOP、LONP1、HSP60、HSP70蛋白表达水平显著下降($P<0.05$);与AngⅡ组相比,AngⅡ + URMC-099组MLK3蛋白表达水平显著下降($P<0.05$),CHOP、LONP1、HSP60、HSP70蛋白表达水平显著上升($P<0.05$);与AngⅡ组相比,AngⅡ + Oligomycin组,MLK3表达水平差异无统计学意义,CHOP、LONP1、HSP60、HSP70蛋白表达水平显著上升($P<0.05$);与AngⅡ组相比,AngⅡ + YWHLR组MLK3蛋白表达水平显著下降($P<0.05$),CHOP、LONP1、HSP60、HSP70蛋白表达水平显著上升($P<0.05$)。结果提示,与对照组相比,AngⅡ组MLK3蛋白表达水平显著提高;在URMC-099与YWHLR干预后MLK3蛋白表达水平显著降低;在URMC-099、Oligomycin与YWHLR干预后,UPR^{mt}相关CHOP、LONP1、HSP60、HSP70蛋白的表达均显著提高。见插页XXXⅤ图3。

2.4 各组心肌细胞HSP70、MLK3蛋白表达情况

免疫荧光染色结果显示,与对照组相比,AngⅡ组的MLK3蛋白表达水平显著上升($P<0.05$),HSP70蛋白表达水平显著下降($P<0.05$);与AngⅡ组相比,AngⅡ + URMC-099组MLK3蛋白表达水平显著下降($P<0.05$),HSP70蛋白表达水平显著上升($P<0.05$);与AngⅡ组相比,AngⅡ + Oligomycin组,MLK3表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),HSP70蛋白

表达水平显著上升($P<0.05$);与AngⅡ组相比,AngⅡ+YWHLR组MLK3蛋白表达水平显著下降($P<0.05$),HSP70蛋白表达水平显著上升($P<0.05$)。结果提示,与对照组相比,AngⅡ组MLK3蛋白表达水平显著提高;在URMC-099与YWHLR干预后MLK3蛋白表达水平显著降低;在URMC-099、Oligomycin与YWHLR干预后,HSP70蛋白的表达均显著提高。见插页XXXVII图4。

3 讨论

HF的发生发展涉及多种分子和细胞机制,其中线粒体功能障碍是一个关键因素。线粒体质量控制是对抗线粒体功能障碍,维持和恢复线粒体稳态,治疗HF的关键[12-14]。UPR^{mt}是一种重要的应激反应,是线粒体质量控制的重要环节。当线粒体蛋白质折叠环境受到干扰,导致错误折叠和功能失调的蛋白质产生和累积时,UPR^{mt}会被激活,这一反应对于蛋白质稳态和线粒体功能具有重要意义[15-16]。

在哺乳动物中,CHOP是UPR^{mt}的关键调控因子之一,CHOP可作为转录因子结合UPR^{mt}相关基因的启动子,从而诱导线粒体伴侣、蛋白酶的表达[17-18]。UPR^{mt}被激活后,通过线粒体伴侣蛋白和腺苷三磷酸(adenosine triphosphate,ATP)依赖蛋白酶的表达来维持线粒体蛋白的稳定性,伴侣蛋白主要由热休克蛋白(heat shock protein,HSP)组成,负责蛋白质的错误折叠部分展开进行正确的再折叠以及新导入的蛋白质正确折叠,其中HSP60帮助基质定位核编码蛋白的折叠和线粒体基因组编码的13种呼吸链蛋白的组装,HSP70防止蛋白质反向扩散到细胞质中,阻止折叠蛋白的聚集,而ATP依赖蛋白酶主要有线粒体Lon蛋白酶(LONP1)和酪蛋白裂解酶P(ClpP),负责降解线粒体内受损或错误折叠的蛋白质[19-21]。另外有研究显示内源性的UPR^{mt}激活似乎不足以完全预防心肌损伤,有必要使用UPR^{mt}激活剂进一步提高UPR^{mt}活性并提供额外的心脏保护作用[17]。

在本研究中,相比对照组,AngⅡ组的CHOP、LONP1、HSP60和HSP70等UPR^{mt}相关mRNA与蛋白表达水平显著降低,提示小鼠心肌细胞经过AngⅡ处理后,UPR^{mt}反应受到抑制,而对比AngⅡ组,AngⅡ+URMC-099组、AngⅡ+Oligomycin组、AngⅡ+YWHLR组CHOP、LONP1、Hsp60和Hsp70 mRNA与蛋白表达水平显著提高,表明URMC-099、Oligomycin和益气温阳活血利水方能上调UPR^{mt},这表明三者可以改善AngⅡ导致的小鼠心肌细胞的UPR^{mt}被抑制状态。这也与AngⅡ+URMC-099组、AngⅡ+Oligomycin组、AngⅡ+YWHLR组CHOP显著提高相吻合。此外,Oligomycin作为UPR^{mt}诱导剂,AngⅡ+Oligomycin组的CHOP、LONP1、HSP60和HSP70等UPR^{mt}相关mRNA/蛋白表达显著提高,但是MLK3的表达与AngⅡ组相比并无显著差异,这说明Oligomycin诱导UPR^{mt}可能不是通过MLK3途径,URMC-099作为MLK3抑制剂,暂无研究报道其有上调UPR^{mt}的作用,但实验结果显示AngⅡ+URMC-099组的CHOP、LONP1、HSP60和HSP70等UPR^{mt}相关mRNA及蛋白表达显著提高,这说明特异性抑制MLK3可以上调UPR^{mt}[22-23]。AngⅡ+YWHLR组数据趋势与URMC-099相同,结合我们前期的研究MLK3为YWHLR的关键靶点,说明益气温阳活血利水方可能通过抑制MLK3来改善UPR^{mt},减少心肌细胞损伤,从而改善心脏功能。

作为丝裂原活化蛋白激酶的家族成员,MLK3与益气温阳活血利水方保护心肌细胞有密切关系。团队前期研究发现益气温阳活血利水方可以通过抑制MLK3通路起到抗HF的作用,并且发现HF模型小鼠的UPR^{mt}相关基因表达显著减少[24]。AngⅡ诱导心肌细胞损伤(如心肌肥厚)是目前研究HF常用的细胞模型[25-28],基于此,我们抑制MLK3的表达,检测UPR^{mt}相关基因的表达,结果显示YWHLR可能通过调控MLK3介导的UPR^{mt}来改善心肌细胞损伤。然而本文的局限是没有彻底阐明MLK3如何调控UPR^{mt},研究发现c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase,JNK)作为MLK3下游因子在运动诱导的骨骼肌UPR^{mt}中至关重要,这提示可以从MLK3/JNK途径进一步探讨益气温阳活血利水方调控UPR^{mt}的机制[29]。

中医学认为HF根本原因为心阳虚,既为发作因素,亦贯穿病程始终,而现代医学认为线粒体功能障碍为HF关键病因,与其发生和进程都高度相关[30-32]。《素问·生气通天论篇》曰:“阳气者,若天与日,失其所则折寿而不彰,故天运当以日光明”。中医理论认为阳气为人体之根本。一直以来,阳气被认为是一种能量,而现代医学认为线粒体是细胞活动的发动机,也被认为是能量的代表,两者有一定的相似之处。《内经·灵枢》称:“人到四十,阳气不足,损与日至”,意思是人的阳气随着年龄的增长会逐渐亏耗,线粒体与阳气相似,其氧化磷酸化效率随年龄增长而下降,与年龄相关的肌肉线粒体功能障碍与老年人线粒体DNA含量降低有关。在阳虚证大鼠模型,其糖脂代谢水平显著下降;在阳虚证患者中,线粒体相关能量分子的代谢减弱[33]。阳气与线粒体的关系也反映中医的益气温阳法与调控线粒体相关反应保护心肌细胞可能存在一定关系。益气温阳活血利水方由黄芪、红参、淫羊藿、益母草、毛冬青、葶苈子、车前子组成。其中黄芪可发挥补气升阳之力,并兼具利水消肿之能;淫羊藿能够补肾壮阳,温煦机体阳气;红参具有大补元气之效,且可益气摄血,稳固气血;益母草与毛冬青协同作用,共行活血化瘀通络之功,此外益母草还可利水消肿;葶苈子和车前子均擅于利水,二者合力通调水道。诸药合用,相辅相成,共同达成益气温阳、活血通络以及利水平喘的卓越功效[34-37]。因此进一步研究益气温阳活血利水方通过调控线粒体相关反应保护心脏,丰富其药理学机制网络,可以为阐明中医药现代科学意义提供支撑。

综上,本研究显示益气温阳活血利水方可以显著改善AngⅡ诱导的小鼠心肌细胞损伤,其作用可能是通过调控MLK3介导的线粒体未折叠蛋白反应实现。

参考文献

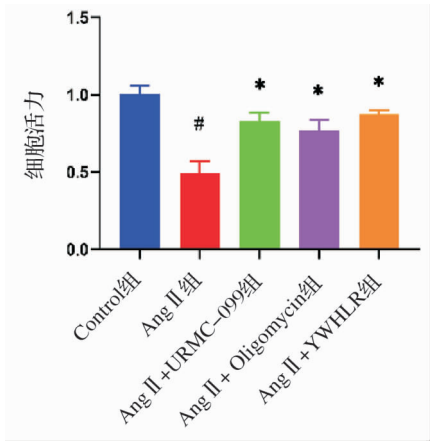
[1] SAVARESE G,BECHER P M,LUND L H,et al. Global burden of heart failure: a comprehensive and updated review of epidemiology [J]. Cardiovasc Res,2023,118(17): 3272-3287.

[2] DIAGNOSIS P G O T C M G F,TREATMENT OF CHRONIC HEART FAILURE C A O C M. 慢性心力衰竭中医诊疗指南(2022年)[J]. 中医杂志,2023,64(7): 743-756.

[3] DICK S A, EPELMAN S. Chronic heart failure and inflammation: What do we really know [J]. Circ Res, 2016, 119(1): 159 - 176.
[4] ZIAEIAN B, FONAROW G C. Epidemiology and aetiology of heart failure [J]. Nat Rev Cardiol, 2016, 13(6): 368 - 378.
[5] HEALTH T W C O T R O C, CHINA D I. 中国心血管健康与疾病报告2022概要 [J]. 中国循环杂志, 2023, 38(6): 583 - 612.
[6] 中国心衰中心工作报告(2021)——心力衰竭患者的诊疗现况 [J]. 中国介入心脏病学杂志, 2022, 30(5): 328 - 336.
[7] ZHOU B, FANG L, DONG Y, et al. Mitochondrial quality control protects photoreceptors against oxidative stress in the H(2)O(2) - induced models of retinal degeneration diseases [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(5): 21 - 36.
[8] WANG Y, JASPER H, TOAN S, et al. Mitophagy coordinates the mitochondrial unfolded protein response to attenuate inflammation - mediated myocardial injury [J]. Redox Biology, 2021, 45: 102049.
[9] 梁碧容, 周政, 何嘉琪, 等. 心阳片通过抑制AGEs介导的心脏成纤维细胞激活改善心力衰竭小鼠心肌纤维化的作用机制 [J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(7): 863 - 869.
[10] 谭小翠, 李硕, 高安然, 等. 心阳片改善低压低氧致右心衰竭模型大鼠右心结构和功能及其可能的作用机制 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2023, 37(5): 321 - 330.
[11] 张璐, 何嘉琪, 梁碧容, 等. 心阳片通过抑制心肌细胞自噬改善心力衰竭小鼠心功能的作用研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(3): 276 - 280.
[12] SVAGUŠA T, MARTINIĆ M, MARTINIĆ M, et al. Mitochondrial unfolded protein response, mitophagy and other mitochondrial quality control mechanisms in heart disease and aged heart [J]. Croat Med J, 2020, 61(2): 126 - 138.
[13] ZHOU B, TIAN R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure [J]. Journal of Clinical Investigation, 2018, 128(9): 3716 - 3726.
[14] 王佳琬, 李裕静, 张浩, 等. 线粒体稳态失衡与心脏衰老及相关疾病 [J]. 中国科学:生命科学, 2024, 54(2): 260 - 282.
[15] LIN Y F, HAYNES C M. Metabolism and the UPR(mt) [J]. Mol Cell, 2016, 61(5): 677 - 682.
[16] SMYRNIAS I, GRAY S P, OKONKO D O, et al. Cardioprotective effect of the mitochondrial unfolded protein response during chronic pressure overload [J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 73(14): 1795 - 1806.
[17] ROCCA C, SODA T, DE FRANCESCO E M, et al. Mitochondrial dysfunction at the crossroad of cardiovascular diseases and cancer [J]. Journal of Translational Medicine, 2023, 21(1): 635.
[18] SUáREZ - RIVERO J M, PASTOR - MALDONADO C J, POVEA - CABELLO S, et al. Activation of the mitochondrial unfolded protein response: a new therapeutic target [J]. Biomedicines, 2022, 10(7): 240358.
[19] ZHU M X, MA X F, NIU X, et al. Mitochondrial unfolded protein response in ischemia - reperfusion injury [J]. Brain Research, 2022, 1797: 148116.
[20] LIU J, HE X, ZHENG S, et al. The Mitochondrial unfolded protein response: a novel protective pathway targeting cardiomyocytes [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2022, 2022: 6430342.
[21] HAMON M P, GERGONDEY R, L'HONORÉ A, et al. Mitochondrial Lon protease - depleted HeLa cells exhibit proteome modifications related to protein quality control, stress response and energy metabolism [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2020, 148: 83 - 95.
[22] WANG Y T, LIM Y, MCCALL M N, et al. Cardioprotection by the mitochondrial unfolded protein response requires ATF5 [J]. American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology, 2019, 317(2): 472 - 478.
[23] KUMAR S, SINGH S K, VISWAKARMA N, et al. Mixed lineage kinase 3 inhibition induces T cell activation and cytotoxicity [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(14): 7961 - 7970.
[24] WANG J, DENG B, LIU Q, et al. Pyroptosis and ferroptosis induced by mixed lineage kinase 3(MLK3) signaling in cardiomyocytes are essential for myocardial fibrosis in response to pressure overload [J]. Cell Death & Disease, 2020, 11(7): 574.
[25] TUO P, ZHAO R, LI N, et al. Lycorine inhibits Ang Ⅱ - induced heart remodeling and inflammation by suppressing the PI3K - AKT/NF - κB pathway [J]. Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology, 2024, 128: 155464.
[26] ZHANG F F, ZHANG L, HU G, et al. Rectifying METTL4 - mediated n(6) - methyladenine excess in mitochondrial DNA alleviates heart failure [J]. Circulation, 2024, 2024: 68358.
[27] WU Q, LIU W J, MA X Y, et al. Zonisamide attenuates pressure overload - induced myocardial hypertrophy in mice through proteasome inhibition [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2024, 45(4): 738 - 750.
[28] ALVES - FIGUEIREDO H, SILVA - PLATAS C, ESTRADA M, et al. Mitochondrial Ca(2+) uniporter - dependent energetic dysfunction drives hypertrophy in heart failure [J]. JACC Basic to translational science, 2024, 9(4): 496 - 518.
[29] GASPAR R S, KATASHIMA C K, CRISOL B M, et al. Physical exercise elicits UPR(mt) in the skeletal muscle: The role of c - Jun N - terminal kinase [J]. Molecular Metabolism, 2023, 78: 101816.
[30] 尹克春, 吴焕林. 邓铁涛治疗心力衰竭经验介绍 [J]. 江苏中医药, 2002(7): 9 - 10.
[31] 邹旭, 潘光明, 盛小刚, 等. 慢性心力衰竭中医证候规律的临床流行病学调查研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(7): 903 - 908.
[32] GALLO G, RUBATTU S, VOLPE M. Mitochondrial dysfunction in heart failure: from pathophysiological mechanisms to therapeutic opportunities [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(5): 13456.
[33] LUO J J, SHEN S W, XIA J J, et al. Mitochondria as the essence of Yang qi in the human body [J]. Phenomics, 2022, 2(5): 336 - 348.
[34] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
[35] 范颖, 乔铁, 滕飞. 黄芪功效主治的衍化及其应用与发展 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(8): 1164 - 1167.
[36] 张雪, 宋玉琴, 杨雨婷, 等. 益母草活血化瘀化学成分与药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(2): 214 - 217.
[37] 林炜基, 陈洁, 袁天慧, 等. 从"毒损心络"探讨毛冬青治疗心力衰竭 [J]. 现代中西医结合杂志, 2022, 31(17): 2392 - 2395.

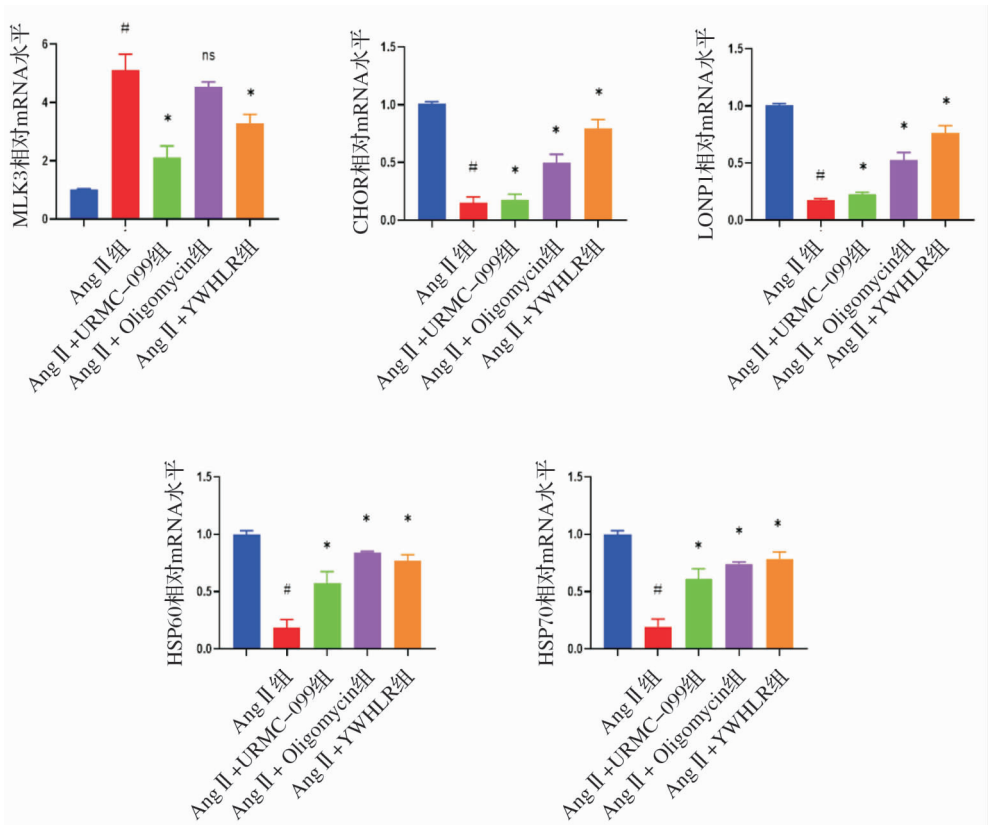
益气温阳活血利水方调控 MLK3 介导的线粒体未折叠蛋白反应保护心肌细胞作用机制研究

（正文见 196－200 页）



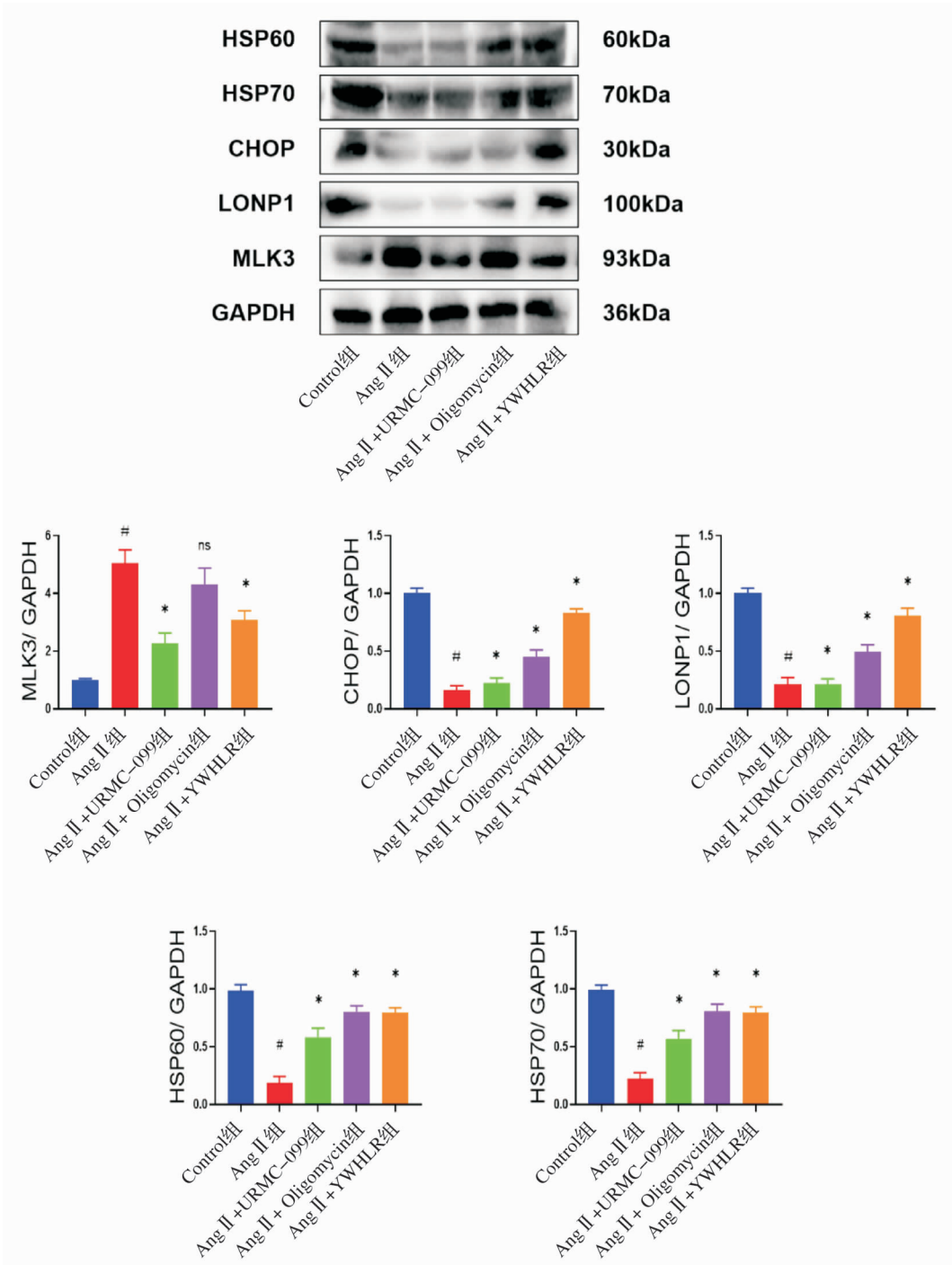
注：#与对照（Control）组比较，$P<0.05$；＊与 Ang Ⅱ组比较，$P<0.05$。

图 1　各组心肌细胞活力比较



注：#与对照（Control）组比较，$P<0.05$；＊与 Ang Ⅱ组比较，$P<0.05$；ns 与 Ang Ⅱ组比较，$P>0.05$。

图 2　各组心肌细胞 MLK3、CHOP、LONP1、HSP60、HSP70 mRNA 表达水平变化



注：#与对照（Control）组比较，$P<0.05$；＊与 Ang Ⅱ 组比较，$P<0.05$；ns 与 Ang Ⅱ 组比较，$P>0.05$。

图 3　各组心肌细胞 MLK3、CHOP、LONP1、HSP60、HSP70 蛋白表达水平

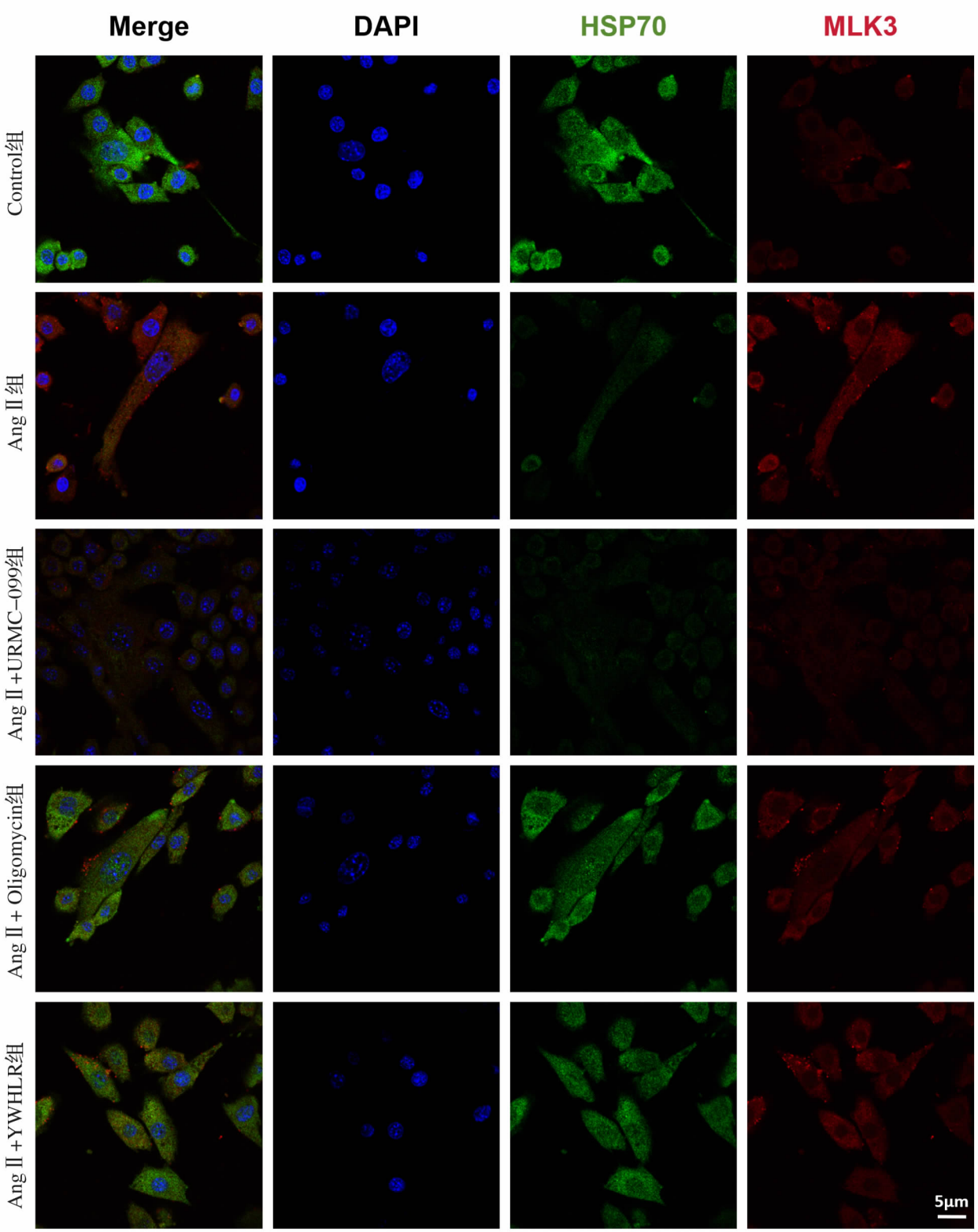


图 4 各组心肌细胞 HSP70、MLK3 蛋白表达水平变化(免疫荧光,×400)