DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.07.009

基于 ATF6/GRP78 通路探讨抗纤益心方对扩张型心肌病小鼠心肌细胞凋亡的影响

常红波[1,2],王振涛[2],吴鸿[1],曾垂义[2],刘舜禹[2],秦楠[2]
(1.河南中医药大学,河南 郑州 450046;2.河南省中医院,河南 郑州 450002)

摘要:目的 观察抗纤益心方对扩张型心肌病(DCM)小鼠心肌细胞凋亡及内质网跨膜蛋白转录激活因子6(ATF6)、分子伴侣葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、C/EBP同源蛋白(CHOP)的影响,探讨抗纤益心方调控GRP78/ATF6信号通路改善DCM心肌细胞凋亡的作用机制。方法 实验中40只 $cTnT^{R141W}$ 转基因DCM小鼠按照随机数字表法分为模型组、抗纤益心方高剂量(5.4 g/kg)组、抗纤益心方低剂量(2.7 g/kg)组、卡托普利(0.01 g/kg)组,每组10只,10只C57BL/6J小鼠作为正常组,药物干预8周,利用小动物超声仪评价心脏功能包括左室舒张末期内径(LVEDD)、左室收缩末期内径(LVESD)、射血分数(EF)、缩短率(FS),HE染色心肌组织病理形态,透射电子显微镜检测内质网超微结构,TUNEL法检测心肌组织凋亡,免疫组化法(IHC)检测心肌组织ATF6、GRP78表达,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测心肌GRP78、ATF6、CHOP mRNA表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测心肌GRP78、ATF6、CHOP、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)蛋白表达。结果 与正常组比较,模型组小鼠LVESD和LVEDD升高、FS和EF降低($P<0.05$),心肌损伤,细胞凋亡数明显增加($P<0.01$),内质网结构受损、肿大;免疫组化GRP78、ATF6表达均增加($P<0.01$);GRP78、ATF6、CHOP mRNA表达均增加($P<0.01$);GRP78、ATF6、CHOP、Bax蛋白表达均增加($P<0.01$),抗凋亡因子Bcl-2蛋白表达降低($P<0.01$);与模型组比较,抗纤益心方高、低剂量组LVESD和LVEDD降低、FS和EF增加($P<0.05$),心肌损伤减轻,细胞凋亡减少($P<0.05$,$P<0.01$),内质网损伤及肿大减轻,免疫组化GRP78、ATF6表达均降低($P<0.05$,$P<0.01$);GRP78、ATF6、CHOP mRNA表达均降低($P<0.05$,$P<0.01$);GRP78、ATF6、CHOP、Bax蛋白表达均降低($P<0.05$,$P<0.01$),抗凋亡因子Bcl-2蛋白表达增加($P<0.05$,$P<0.01$)。结论 抗纤益心方能够抑制DCM小鼠心肌细胞凋亡,提高心脏功能,其作用机制可能与抑制内质网应激、下调ATF6/GRP78信号通路有关。

关键词:抗纤益心方;扩张型心肌病;心肌细胞凋亡;内质网应激;ATF6/GRP78信号通路
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)07-0045-10

Effect of Kangxian Yixin Decoction(抗纤益心方) on Cardiomyocyte Apoptosis in Mice with Dilated Cardiomyopathy Based on ATF6/GRP78 Pathway

CHANG Hongbo[1,2],WANG Zhentao[2],WU Hong[1],ZENG Chuiyi[2],LIU Shunyu[2],QIN Nan[2]
(1. Henan University of Chinese Medicine,Zhengzhou 450046,Henna,China;
2. Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine,Zhengzhou 450002,Henna,China)

Abstract:*Objective* To observe the effects of Kangxian Yixin Decoction(抗纤益心方,KYD) on cardiomyocyte apoptosis and endoplasmic reticulum stress-related factors glucose regulated protein 78(GRP78),activating transcription factor 6(ATF6) and C/EBP homologous protein(CHOP) in mice with dilated cardiomyopathy(DCM),and to explore the mechanism of KYD regulating GRP78/ATF6 signaling pathway to improve the apoptosis of DCM cardiomyocytes. *Methods* According to the random number table method,40 $cTnT^{R141W}$ transgenic DCM mice were divided into model group,KYD high and low dose(5.4 g/kg,2.7 g/kg) groups and captopril(0.01 g/kg) group,with 10 mice in each group. Another C57BL/6J mice were set up as the normal group. Left ventricular end-systolic diameter(LVESD),left ventricular end-diastolic diameter(LVEDD),ejection fraction(EF) and reduction rate(FS) were detected by ultrasonography in small animals. Myocardial pathological morphology was observed by HE staining,endoplasmic reticulum ultrastructure was observed by electron microscopy,and myocardial apoptosis was detected by TUNEL method. The expression levels of GRP78 and ATF6 in myocardial tissue of mice were detected by immunohistochemistry(IHC) method. The mRNA and protein expressions of GRP78,ATF6,CHOP,Bax and Bcl-2 were detected by Real-time PCR and Western blot,respectively. *Results* Compared with those in the normal group,the levels of LVESD and LVEDD were in-

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(82205082);河南省科技研发计划项目(优势学科培育类)(232301420066,252301420073);河南省高等学校重点科研项目(24A360001);河南省中医药科研专项联合共建项目(2025LHZX2056);河南省中医药科学研究专项(2023ZY2086)

作者简介:常红波(1987-),男,河南开封人,副教授、主治医师,硕士研究生导师,博士,研究方向:中医药防治心血管疾病的临床与基础。
通讯作者:王振涛(1962-),男,河南滑县人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中医药防治心血管疾病的临床与基础。E-mail:13803817796@139.com。

creased in the model group, the levels of FS and EF were decreased ($P<0.05$), myocardial pathological injury and apoptosis number increased ($P<0.01$), endoplasmic reticulum structure was damaged and enlarged. The expressions of GRP78 and ATF6 were increased by IHC ($P<0.05$). The mRNA expressions of GRP78, ATF6 and CHOP were increased ($P<0.05$). The expressions of GRP78, ATF6, CHOP and Bax were increased, while the expression of anti-apoptotic factor Bcl-2 was decreased ($P<0.05$). Compared with those in the model group, the levels of LVESD and LVEDD were decreased, the levels of FS and EF were increased ($P<0.05$), myocardial injury was alleviated, the apoptosis was decreased, the endoplasmic reticulum was damaged and enlarged, and IHC results showed that the expressions of GRP78 and ATF6 were decreased ($P<0.05$、$P<0.01$) in the KYD groups. The mRNA expressions of GRP78, ATF6 and CHOP were decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). The expressions of GRP78, ATF6, CHOP and Bax were decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), while the expressions of anti-apoptotic factor Bcl-2 were increased ($P<0.05$, $P<0.01$). *Conclusion* KYD can inhibit DCM cardiomyocyte apoptosis and improve the cardiac function in mice, and its mechanism may be related to inhibiting endoplasmic reticulum stress and down-regulating ATF6/GRP78 signaling pathway.

Keywords: Kangxian Yixin Decoction(抗纤益心方); dilated cardiomyopathy; cardiomyocyte apoptosis; endoplasmic reticulum stress; ATF6/GRP78 signaling pathway

扩张型心肌病(DCM)是引起心力衰竭的重要病因之一,其病情呈进行性发展,目前其病因及病理机制尚不完全明确[1-2]。研究表明,内质网应激(ERS)在DCM发生发展中具有重要作用。早期适度的ERS反应作为自身保护机制引起心肌肥大使心功能得以代偿,但持续的ERS过载导致心肌细胞凋亡发生,心功能下降[3-5]。在DCM患者中发现内质网(ER)肿胀和功能紊乱,内质网跨膜蛋白转录激活因子6(ATF6)、分子伴侣葡萄糖调节蛋白78(GRP78)表达明显增加[6],激活未折叠蛋白反应,诱导凋亡途径C/EBP同源蛋白(CHOP)激活,导致心肌细胞凋亡[7],促使DCM发展。因此,调控内质网应激及其相关信号转导途径ATF6/GRP78可能成为防治DCM的潜在作用靶点。

抗纤益心方是全国名老中医药专家王振涛教授临床治疗DCM的方剂,取得较好疗效[8-9]。预实验研究发现,抗纤益心方能够减轻心肌细胞凋亡,提高心功能,延缓DCM进程且对内质网具有一定的保护作用。然而,抗纤益心方调节内质网应激的潜在机制尚未阐明。本研究通过建立DCM小鼠模型,以观察抗纤益心方对DCM小鼠心功能、心肌细胞凋亡及内质网应激的影响,探讨其作用机制,为抗纤益心方治疗DCM临床用药提供科学的实验依据。

1 材料

1.1 *动物* 实验所用动物购自中国医学科学院实验动物研究所,生产许可证号SCXK(京)2023-0013,SPF级雄性,cTnT^{R141W}转基因小鼠和C57BL/6J小鼠体质量(20±2)g,动物合格证编号1103262411000078,动物于河南省中医院中心实验室动物中心饲养,动物房室内相对湿度40%~60%,温度20~24 ℃,12 h/12 h交替照明。河南省中医院动物实验伦理委员会评审通过该实验,伦理编号:PZ-HNSZYY-2022-060。

1.2 *药物* 实验中药抗纤益心方由四川新绿药业科技发展有限公司提供,药物组成:黄芪30 g,红参12 g,丹参15 g,益母草15 g,茯苓15 g,白术15 g,泽兰15g,麦冬12 g,升麻9 g,药物质量控制采用GMP认证(证书编号:SC20150037),1.0 g颗粒相当于生药8.0 g。卡托普利片(上海信宜天平药业有限公司生产,国药准字H31021832,批号:187280,25 mg/片)。

1.3 *试剂* BCA蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0010);伊红染色液和苏木精染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号:G1120-3);PVDF膜(美国Millipore公司,批号:IPVH0010);SDS-PAGE凝胶(西安晶彩生物公司,批号:JCPE022);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time-PCR)反转录试剂盒、mRNA提取试剂盒(日本Takara公司,批号分别为FB26KB3904,AK51598A);GRP78、ATF6、CHOP、Bax、Bcl-2、GAPDH抗体(武汉三鹰生物公司,批号:11587-1-AP、24169-1-AP、15204-1-AP、50599-2-lg、12789-1-AP、60004-1-lg)。

1.4 *仪器* VINN06LAB小动物超声仪(飞依诺科技股份有限公司);Mini-PROTEAN SDS-PAGE凝胶电泳系统、Mini Trans-Blot蛋白湿转仪、ChemiDoc XRS+凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);透射电子显微镜(日本电子株式会社,JEM-1400)。

2 方法

2.1 *分组与给药* 按照随机数字表法将cTnT^{R141W}转基因DCM小鼠随机分为4组,即模型组,抗纤益心方高、低剂量组,卡托普利(0.01 g/kg)组,每组10只。将10只C57BL/6J小鼠作为正常组。抗纤益心方高、低剂量小鼠灌胃浓度分别是5.4、2.7 g/kg,灌胃剂量根据临床成人服用剂量换算得到,小鼠每公斤体质量用药量为成人公斤体质量的9倍,除药物组干预外,其余各组给予灌胃对应剂量的生理盐水,连续干预8周。

2.2 *小鼠心脏功能检测* 利用小动物超声心动仪于小鼠乳头肌水平处用二维定向M型测量左室舒张末期内径(LVEDD)、左室收缩末期内径(LVESD)、射血分数(EF)、缩短率(FS)[10-11]。每次需连续检测3个心动周期,以上检测由同一专业超声人员进行操作。

2.3 *心肌组织病理检测* 将取出心脏利用4%多聚甲醛固定,浸泡24 h,常规脱水,然后按照HE染色方法依次进行石蜡包埋,切片,脱洗,染色,封片过夜,每个标本5个视野选取,使用显微镜观察并拍照。

2.4 *心肌内质网超微结构检测* 取心脏左心室小块心肌组织,每块心肌组织体积约1 mm^3,迅速放入2.5%戊二醛EP管中固定4 h,换液,然后按照步骤进行漂洗,加入1%锇酸,丙酮浸染,半薄切片定位、超薄切片,依次滴加饱和醋酸铀溶液、柠檬酸铅溶液,透射电子显微镜观察拍照。

2.5 *心肌组织细胞凋亡检测* 将石蜡切片样本依次放入二甲苯Ⅰ、二甲苯Ⅱ、不同浓度乙醇。用滤纸吸干切片样本周围液体,滴加蛋白酶K溶液孵育。参照TUNEL细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作,荧光显微镜下观察并拍照[10]。

2.6 *免疫组化法检测心肌组织GRP78、ATF6表达* 将心肌组

织石蜡切片，乙醇脱蜡，抗原修复，封闭处理，然后将切片分别与GRP78一抗(1∶200)和ATF6一抗(1∶200)，4 ℃孵育过夜，滴加生物素标记二抗，37 ℃孵育30 min，PBS洗涤，DAB显色剂显色，依次水洗、复染、脱水和透明处理，中性树胶封片，半定量分析，使用ImageProPlus 6.0软件测量阳性区域的积分光密度，计算比值。

2.7 心肌组织GRP78、ATF6、CHOP mRNA表达检测 取每个样品约50 mg心肌组织，按照柱式动物组织总RNA抽提纯化试剂盒操作提取总RNA，用Takara反转录试剂配制反转录体系总体积20 μL，扩增，反转录cDNA，按照试剂盒说明配制反应液，经过95 ℃预变性，变性，退火/延伸，再加热至95 ℃，循环数为40。引物设计在NCBI网站输入GRP78、ATF6、CHOP，获取基因编码序列，引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司提供。引物序列：GRP78上游AGTAAGAGGTGTGACGCCTG，下游GTCTACTCCTCAATGCGACG，bp：119；ATF-6上游ATCACTGTGTCGGTATGGCT，下游TAGGATGTAAGGACGTCGAT，bp：212；CHOP上游GTGACAACTACCTGTCCCAG，下游GCTGTTACGCGATAGCCCAT，bp：160；GAPDH上游ATCGGCTCCTTTGAACCTCG，下游CTTGGTGTCATCCCACTCCC，bp：155。每个样本设3个复孔，取其平均值，重复3次。根据$2^{-\Delta\Delta Ct}$定量法计算各组mRNA表达水平。

2.8 心肌组织GRP78、ATF6、CHOP、Bax、Bcl-2蛋白表达检测 从-80 ℃取冻存心肌组织约100 mg，RIPA裂解，匀浆，冰上裂解1 h，离心，以4∶1比例加入蛋白上样缓冲液，在100 ℃条件下煮蛋白5 min，制胶，上样，凝胶电泳和转模，室温下5%脱脂奶粉封闭1 h，一抗GRP78、ATF6、CHOP、Bax、Bcl-2(稀释比例均为1∶1000)，4 ℃一抗孵育过夜，清洗5次，1次/5 min，孵育二抗(稀释比例均为1∶2000)1 h，1×TBST洗膜3次，于ECL超敏发光液中显影，结果使用Image J软件分析条带的光密度值，以目的蛋白/GAPDH比值表示目的蛋白相对表达量[12]。

2.9 统计学方法 采用SPSS 21.0统计软件对实验数据分析，符合正态分布以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，多组间比较用单因素方差分析，方差齐时采用LSD法检验，方差不齐时采用Tamhane′s法检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 抗纤益心方改善DCM小鼠心脏功能 如插页Ⅻ图1和表1所示，与正常组比较，模型组小鼠LVESD和LVEDD增加($P<0.05$)，FS和EF降低($P<0.05$)；与模型组比较，抗纤益心方高、低剂量组和卡托普利组LVESD、LVEDD有不同程度降低($P<0.05$)，FS和EF有不同程度增加($P<0.05$)。

3.2 抗纤益心方减轻DCM小鼠心肌病理损伤 由插页Ⅻ图2可知，与正常组比较，模型组心肌受损明显，细胞核排列不规则，肌纤维排列、走形紊乱，胶原沉积，局部心肌纤维化严重；与模型组比较，抗纤益心方高、低剂量组和卡托普利组心肌受损均不同程度减轻，其中抗纤益心方高剂量组减轻显著，心肌细胞形态与纤维排列顺序明显改善，胶原沉积明显减少。

3.3 抗纤益心方减轻DCM小鼠心肌细胞凋亡 与正常组比较，模型组细胞凋亡明显增加($P<0.01$)；与模型组比较，抗纤益心方高、低剂量组和卡托普利组比较，不同程度细胞凋亡减少($P<0.01$，$P<0.05$)，抗纤益心方高剂量组和卡托普利组细胞凋亡比较，差异无统计学意义($P>0.05$)，而抗纤益心方低剂量组和卡托普利组细胞凋亡比较，差异有统计学意义($P<0.05$)。结果见插页ⅩⅣ图3、表2。

3.4 抗纤益心方改善DCM小鼠心肌细胞内质网超微结构 由插页ⅩⅤ图4可知，与正常组比较，模型组内质网明显出现肿胀、结构破裂、失去正常形态；与模型组比较，抗纤益心方高、低剂量组和卡托普利组内质网腔被压缩和延长，内质网肿胀得到不同程度明显减轻，其中抗纤益心方高剂量组减轻显著。

3.5 抗纤益心方对DCM小鼠心肌GRP78、ATF6表达的影响 如插页ⅩⅥ图5和表3所示，与正常组比较，模型组GRP78、ATF6表达增加($P<0.01$)；与模型组比较，抗纤益心方高、低剂量组和卡托普利组GRP78、ATF6不同程度降低($P<0.01$，$P<0.05$)，抗纤益心方高剂量组和卡托普利组GRP78、ATF6比较，差异无统计学意义($P>0.05$)，而抗纤益心方低剂量组和卡托普利组GRP78、ATF6比较，差异有统计学意义($P<0.05$)。

3.6 抗纤益心方降低DCM小鼠心肌GRP78、ATF6、CHOP mRNA表达 由表4可知，与正常组比较，模型组GRP78、ATF6、CHOP mRNA表达明显增加($P<0.05$，$P<0.01$)；与模型组比较，抗纤益心方高、低剂量组GRP78、ATF6、CHOP mRNA表达不同程度降低($P<0.05$，$P<0.01$)，抗纤益心方高剂量组和卡托普利组GRP78、ATF6、CHOP mRNA比较，差异无统计学意义($P>0.05$)，而抗纤益心方低剂量组和卡托普利组GRP78、ATF6、CHOP mRNA比较，差异有统计学意义($P<0.05$)。

3.7 抗纤益心方对DCM小鼠心肌凋亡因子Bax、Bcl-2蛋白表达的影响 与正常组比较，模型组凋亡因子Bax蛋白表达明显增加($P<0.01$)，抗凋亡因子Bcl-2蛋白表达降低($P<0.01$)；与模型组比较，抗纤益心方高、低剂量组和卡托普利组Bax蛋白表达降低($P<0.01$，$P<0.05$)，抗纤益心方高剂量组和卡托普利组Bax蛋白表达比较，差异无统计学意义($P>0.05$)，而抗纤益心方低剂量组和卡托普利组Bax蛋白表达比较，差异有统计学意义($P<0.05$)；抗纤益心方高、低剂量组和卡托普利组Bcl-2蛋白表达增加($P<0.05$)，药物干预组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见图6、表5。

3.8 抗纤益心方降低DCM小鼠心肌GRP78、ATF6、CHOP蛋白表达 与正常组比较，模型组GRP78、ATF6、CHOP蛋白表达降低($P<0.01$)；与模型组比较，抗纤益心方高、低剂量组和卡托普利组GRP78、ATF6、CHOP蛋白表达增加($P<0.01$，$P<$

表1 各组小鼠心脏超声结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量/(g/kg)	LVESD/(mm)	LVEDD/(mm)	FS/(%)	LVEF/(%)
正常组	10	-	2.78±0.22	1.81±0.24	34.90±1.21	72.42±1.96
模型组	10	-	3.88±0.31▲	3.37±0.23▲	13.15±0.86▲	34.48±1.63▲
抗纤益心方高剂量组	10	5.4	3.18±0.24#	2.43±0.46#	23.68±1.37#	55.38±1.42#
抗纤益心方低剂量组	10	2.7	3.49±0.23#	2.73±0.19#	21.78±1.21#	52.13±1.26#
卡托普利组	10	0.01	3.47±0.27#	2.69±0.18#	22.48±1.43#	53.40±1.31#

注：▲与正常组比较，$P<0.05$；#与模型组比较，$P<0.05$。

表 2 各组小鼠心肌细胞凋亡结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(g/kg)	凋亡/(%)
正常组	6	–	6.10 ± 1.28
模型组	6	–	39.50 ± 3.02▲▲
抗纤益心方高剂量组	6	5.4	12.27 ± 1.33##
抗纤益心方低剂量组	6	2.7	23.03 ± 2.63#
卡托普利组	6	0.01	13.41 ± 1.13##

注:▲▲与正常组比较,$P<0.01$;#与模型组比较,$P<0.05$;##与模型组比较,$P<0.01$。

表 3 各组小鼠心肌组织 GRP78、ATF6 表达结果比较($\bar{x} \pm s$)

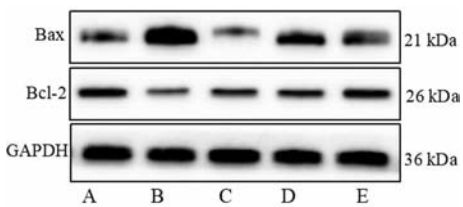
组别	n	剂量/(g/kg)	GRP78	ATF6
正常组	6	–	0.60 ± 0.13	0.76 ± 0.06
模型组	6	–	1.57 ± 0.16▲▲	1.75 ± 0.23▲▲
抗纤益心方高剂量组	6	5.4	0.76 ± 0.08##	0.89 ± 0.06##
抗纤益心方低剂量组	6	2.7	1.13 ± 0.12#	1.38 ± 0.16#
卡托普利组	6	0.01	0.65 ± 0.11##	0.76 ± 0.20##

注:▲▲与正常组比较,$P<0.01$;#与模型组比较,$P<0.05$;##与模型组比较,$P<0.01$。

表 4 各组小鼠心肌组织 GRP78、ATF6、CHOP mRNA 表达结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(g/kg)	GRP78	ATF6	CHOP
正常组	3	–	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型组	3	–	1.99 ± 0.31▲▲	1.67 ± 0.17▲▲	1.92 ± 0.42▲▲
抗纤益心方高剂量组	3	5.4	1.16 ± 0.32##	1.07 ± 0.16##	1.10 ± 0.15##
抗纤益心方低剂量组	3	2.7	1.53 ± 0.19#	1.41 ± 0.08#	1.51 ± 0.13#
卡托普利组	3	0.01	1.15 ± 0.21##	1.14 ± 0.04##	1.13 ± 0.14##

注:▲▲与正常组比较,$P<0.01$;#与模型组比较,$P<0.05$;##与模型组比较,$P<0.01$。



注:A. 正常组,B. 模型组,C. 抗纤益心方高剂量组,D. 抗纤益心方低剂量组,E. 卡托普利组。

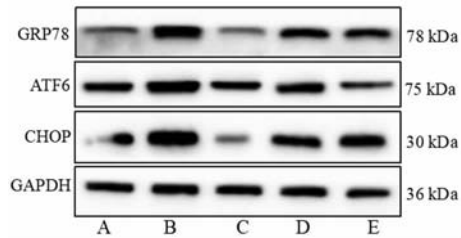
图 6 各组小鼠心肌 Bax、Bcl-2 蛋白表达

表 5 各组小鼠心肌组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(g/kg)	Bax	Bcl-2
正常组	3	–	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.02
模型组	3	–	2.04 ± 0.16▲▲	0.46 ± 0.09▲▲
抗纤益心方高剂量组	3	5.4	0.49 ± 0.03##	0.82 ± 0.04#
抗纤益心方低剂量组	3	2.7	0.73 ± 0.86#	0.81 ± 0.11#
卡托普利组	3	0.01	0.60 ± 0.14##	0.95 ± 0.13#

注:▲▲与正常组比较,$P<0.01$;#与模型组比较,$P<0.05$;##与模型组比较,$P<0.01$。

0.05),抗纤益心方高剂量组和卡托普利组 GRP78、ATF6 蛋白表达比较,差异无统计学意义($P>0.05$),而抗纤益心方低剂量组和卡托普利组 GRP78、ATF6 蛋白表达比较,差异有统计学意义($P<0.05$);CHOP 蛋白表达方面,抗纤益心方高剂量组和卡托普利组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),而抗纤益心方低剂量组和卡托普利组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见图 7、表 6。



注:A. 正常组,B. 模型组,C. 抗纤益心方高剂量组,D. 抗纤益心方低剂量组,E. 卡托普利组。

图 7 各组小鼠心肌 GRP78、ATF6、CHOP 蛋白表达

表 6 各组小鼠心肌组织 GRP78、ATF6、CHOP 蛋白表达结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(g/kg)	GRP78	ATF6	CHOP
正常组	3	–	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.02
模型组	3	–	1.88 ± 0.38▲▲	2.03 ± 0.05▲▲	2.08 ± 0.23▲▲
抗纤益心方高剂量组	3	5.4	0.79 ± 0.12##	1.16 ± 0.20##	0.65 ± 0.20##
抗纤益心方低剂量组	3	2.7	1.50 ± 0.15#	1.63 ± 0.25#	0.87 ± 0.06#
卡托普利组	3	0.01	1.19 ± 0.11##	0.85 ± 0.20##	0.91 ± 0.22#

注:▲▲与正常组比较,$P<0.01$;#与模型组比较,$P<0.05$;##与模型组比较,$P<0.01$。

4 讨论

中医药治疗 DCM 具有一定优势。中医学将其归属“心胀”“心衰”“喘证”等范畴,为本虚标实证,我们团队王振涛教授长期从事于 DCM 临床研究,其认为宗气下陷为 DCM 核心病机,标实责之瘀血、水湿等。根据我们团队长期大量的临床观察,拟定了临床治疗 DCM 有效方药-抗纤益心方,由黄芪、红参、丹参、益母草、茯苓、白术、泽兰、麦冬、升麻等组成。方中黄芪为君药,发挥“益气升陷”的功效,臣药用红参,补中焦脾胃之气,白术运脾强胃利水,由于 DCM 患者发展过程中,常伴有瘀血、水湿停留,故加入丹参、茯苓、益母草、泽兰活血化瘀利水;麦冬为佐药,其性甘凉,制约补气药的燥性;升麻为使药,起升提引经、直达病所作用,与补气药合用提高临床疗效[10-11]。

本研究采用广泛使用的 $cTnT^{R141W}$ 转基因小鼠作为 DCM 模型[13-14],模型组小鼠心腔扩大、心肌受损明显,LVESD 和 LVEDD 增加、FS 和 EF 降低,心肌纤维紊乱、胶原大量沉积,心肌细胞凋亡明显增多。给予抗纤益心方高、低剂量组干预后,心肌损伤、心肌纤维紊乱、胶原沉积均得到不同程度减轻。细胞凋亡在 DCM 发生发展过程中起着关键作用[15]。在 DCM 患者早期已有细胞凋亡现象,并且随着细胞凋亡增多,DCM 加重[16-17]。本实验利用 $cTnT^{R141W}$ 转基因 DCM 小鼠模型,发现心肌组织细胞凋亡数明显增多,凋亡因子 Bax 表达增加,抗凋亡因子 Bcl-2 降低,给予抗纤益心方高、低剂量组干预后,细胞凋亡数减少,凋亡因子 Bax 表达下调,抗凋亡因子 Bcl-2 表达上调,抑制细胞凋亡,减缓了 DCM 发展,尤以抗纤益心方高剂量组作用显著,这可能是抗纤益心方发挥益气升陷作用治疗 DCM 效果。然而其机制有待进一步探讨。

内质网应激凋亡途径是独立于细胞凋亡经典途径之外的重要凋亡通路[4,18-19]。研究表明 ER 中蛋白质的多余积累可触发 ERS,过度的 ERS 诱导心肌细胞凋亡导致并加重 DCM。在 DCM 患者中发现 ER 肿胀和功能紊乱,激活未折叠蛋白反应,诱导凋亡途径 CHOP 表达增加[20-21],促使 DCM 发展。本

实验发现模型组 ER 结构破裂、肿大、排列紊乱，细胞凋亡亦显著增多，在这一过程中，内质网结构受损与应激可能是导致心肌细胞凋亡加重 DCM 心力衰竭的重要病理机制。ATF6 是内质网应激重要通路[22-23]，GRP78 是位于内质网上的分子伴侣蛋白，对维持内质网蛋白质合成及正确折叠和细胞钙稳态方面具有重要作用[24-25]，其表达增高是 ERS 发生和存在的标志，CHOP 为内质网应激凋亡的关键途径[26-27]。本实验研究发现 DCM 小鼠 GRP78、ATF6 基因和蛋白表达均明显增加，提示 DCM 发生时内质网处于应激状态，给予抗纤益心方高、低剂量组干预后，心肌 GRP78、ATF6、CHOP 基因和蛋白表达均降低，心肌细胞凋亡减少，且凋亡因子 Bax 表达下调，Bcl-2 表达上调，尤以抗纤益心方高剂量组作用显著。此研究表明 GRP78/ATF6 信号通路是 DCM 细胞凋亡重要的内质网应激通路之一，其抑制作用可显著改善 DCM 细胞凋亡，揭示了其在 DCM 心肌细胞凋亡中的关键作用。这些发现不仅加深了对 DCM 发病机制的理解，也为开发靶向 GRP78 和 ATF6 的治疗策略提供科学依据。未来，可通过进一步研究 GRP78/ATF6 通路的下游分子效应，优化抗纤益心方治疗靶点的设计和应用，为 DCM 患者提供更精准、高效的治疗选择。

参考文献

[1] 中华医学会心血管病学分会，中国心肌炎心肌病协作组. 中国扩张型心肌病诊断和治疗指南[J]. 临床心血管病杂志，2018，34(5)：421-434.

[2] MERLO M，CANNATÀ A，GOBBO M，et al. Evolving concepts in dilated cardiomyopathy[J]. Eur J Heart Fail，2018，20(2)：228-239.

[3] JIN B，LUO X P，NI H C，et al. Cardiac matrix remodeling following intracoronary cell transplantation in dilated cardiomyopathic rabbits[J]. Mol Biol Rep，2010，37(6)：3037-3042.

[4] CHEN J H，YANG X，LI W W，et al. Endoplasmic reticulum stress-related gene expression causes the progression of dilated cardiomyopathy by inducing apoptosis[J]. Front Genet，2024，15：1366087.

[5] 王振涛，常红波，郭宗耀，等. 基于扩张型心肌病大鼠模型研究内质网应激介导细胞凋亡和相关信号转导通路的时相性变化[J]. 中华中医药杂志，2020，35(4)：1705-1708.

[6] 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.

[7] HAN K，HASSANZADEH S，SINGH K，et al. Parkin regulation of CHOP modulates susceptibility to cardiac endoplasmic reticulum stress[J]. Sci Rep，2017，7(1)：2093.

[8] 曾垂义，王振涛，陈磊. 抗纤益心方治疗扩张型心肌病患者疗效观察[J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19(23)：321-323.

[9] 王振涛，刘舜禹，柴松波，等. 抗纤益心方治疗扩张型心肌病的队列研究[J]. 时珍中医中药，2020，31(2)：378-380.

[10] 常红波，王振涛，吴鸿，等. 抗纤益心方通过调控线粒体动力学对扩张型心肌病小鼠心肌细胞凋亡的作用机制研究[J]. 北京中医药大学学报，2023，46(10)：1391-1399.

[11] 常红波，王振涛，吴鸿，等. 抗纤益心方对扩张型心肌病小鼠线粒体嵴重构及其结构蛋白 Mic10、Mic60、Mic19 的影响[J]. 中华中医药学刊，2025，43(8)：83-87.

[12] 常红波，王振涛，吴鸿，等. 抗纤益心方通过调控 xCT/GPX4 通路介导的铁死亡改善扩张型心肌病小鼠心功能的作用机制[J]. 中药药理与临床，2024，40(12)：21-26.

[13] 赵海苹. 中药单体对 cTnT～(R141W)转基因扩张型心肌病小鼠模型的治疗作用及机理研究[D]. 北京：中国协和医科大学，2009.

[14] 李峥. 真武汤对 cTnT～(R141W)转基因扩张型心肌病小鼠的心肌保护作用及其机制的研究[D]. 沈阳：辽宁中医药大学，2018.

[15] HONG B K，KWON H M，BYUN K H，et al. Apoptosis in dilated cardiomyopathy[J]. Korean J Intern Med，2000，15(1)：56-64.

[16] GLUMAC S，PEJIĆ S，KOSTADINOVIC S，et al. Apoptosis in endomyocardial biopsies from patients with dilated cardiomyopathy[J]. Folia Biol(Praha)，2016，62(5)：207-211.

[17] QIU Z B，CHEN W，LIU Y F，et al. LncRNA AC061961.2 overexpression inhibited endoplasmic reticulum stress induced apoptosis in dilated cardiomyopathy rats and cardiomyocytes *via* activating Wnt/β-catenin pathway[J]. J Recept Signal Transduct Res，2021，41(5)：494-503.

[18] YEH J N，SUNG P H，CHIANG J Y，et al. Early treatment with combination of SS31 and entresto effectively preserved the heart function in doxorubicin-induced dilated cardiomyopathic rat[J]. Biomed Pharmacother，2021，141：111886.

[19] AO L J，CHEN Z T，YIN J C，et al. Chinese herbal medicine and active ingredients for diabetic cardiomyopathy：molecular mechanisms regulating endoplasmic reticulum stress[J]. Front Pharmacol，2023，14：1290023.

[20] ZHANG S S，CAO M K，FANG F. The role of epigallocatechin-3-gallate in autophagy and endoplasmic reticulum stress(ERS)-induced apoptosis of human diseases[J]. Med Sci Monit，2020，26：e924558.

[21] LI J Y，YANG K Y，DAI S S，et al. ERS mediated by GRP-78/PERK/CHOP signaling is involved in fluoride-induced ameloblast apoptosis[J]. Biol Trace Elem Res，2024，202(3)：1103-1114.

[22] ZHANG R J，BIAN C，GAO J，et al. Endoplasmic reticulum stress in diabetic kidney disease：adaptation and apoptosis after three UPR pathways[J]. Apoptosis，2023，28(7)：977-996.

[23] LI X，LU K，GUO S，et al. TRPV4 blockade alleviates endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis in hypoxia-induced cardiomyocyte injury[J]. Cell Signal，2024，114：110973.

[24] DING L L，ZHU H L，WANG K，et al. Quercetin alleviates cadmium-induced BRL-3A cell apoptosis by inhibiting oxidative stress and the PERK/IRE1α/ATF6 signaling pathway[J]. Environ Sci Pollut Res Int，2023，30(60)：125790-125805.

[25] XU W，SHEN Y. Curcumin affects apoptosis of colorectal cancer cells through ATF6-mediated endoplasmic reticulum stress[J]. Chem Biol Drug Des，2024，103(1)：e14433.

[26] LIN R J，MA M J，HAN B，et al. Esophageal cancer stem cells reduce hypoxia-induced apoptosis by inhibiting the GRP78-perk-eIF2α-ATF4-CHOP pathway *in vitro*[J]. J Gastrointest Oncol，2023，14(4)：1669-1693.

[27] ZUO M Y，TANG T J，WANG X，et al. Atractylenolide Ⅲ attenuates apoptosis in H9c2 cells by inhibiting endoplasmic reticulum stress through the GRP78/PERK/CHOP signaling pathway[J]. Evid Based Complement Alternat Med，2022，2022：1149231.

基于 ATF6/GRP78 通路探讨抗纤益心方对扩张型心肌病小鼠心肌细胞凋亡的影响

(正文见 45－49 页)

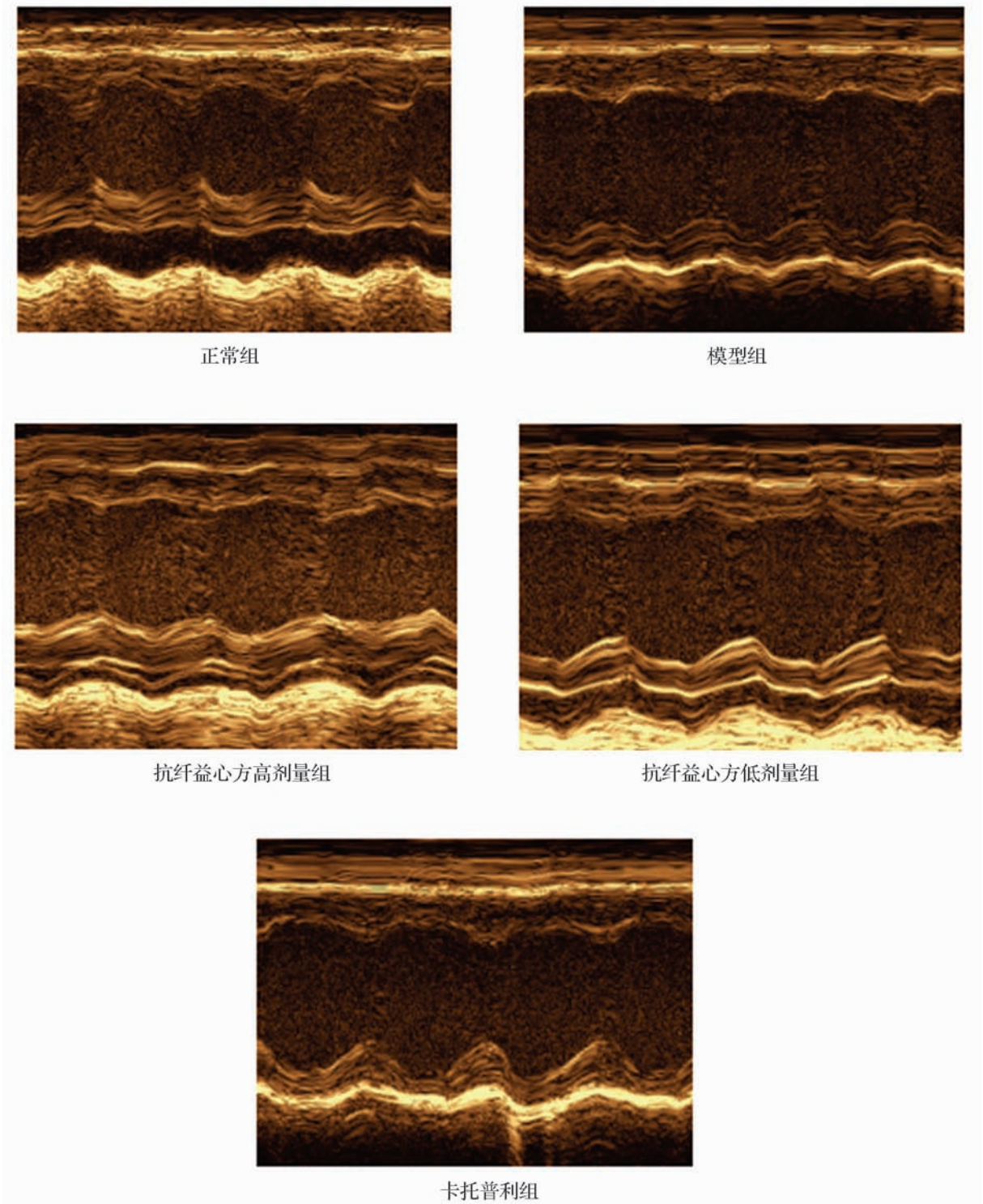


图 1 各组小鼠心脏超声结果(40×,$n=10$)

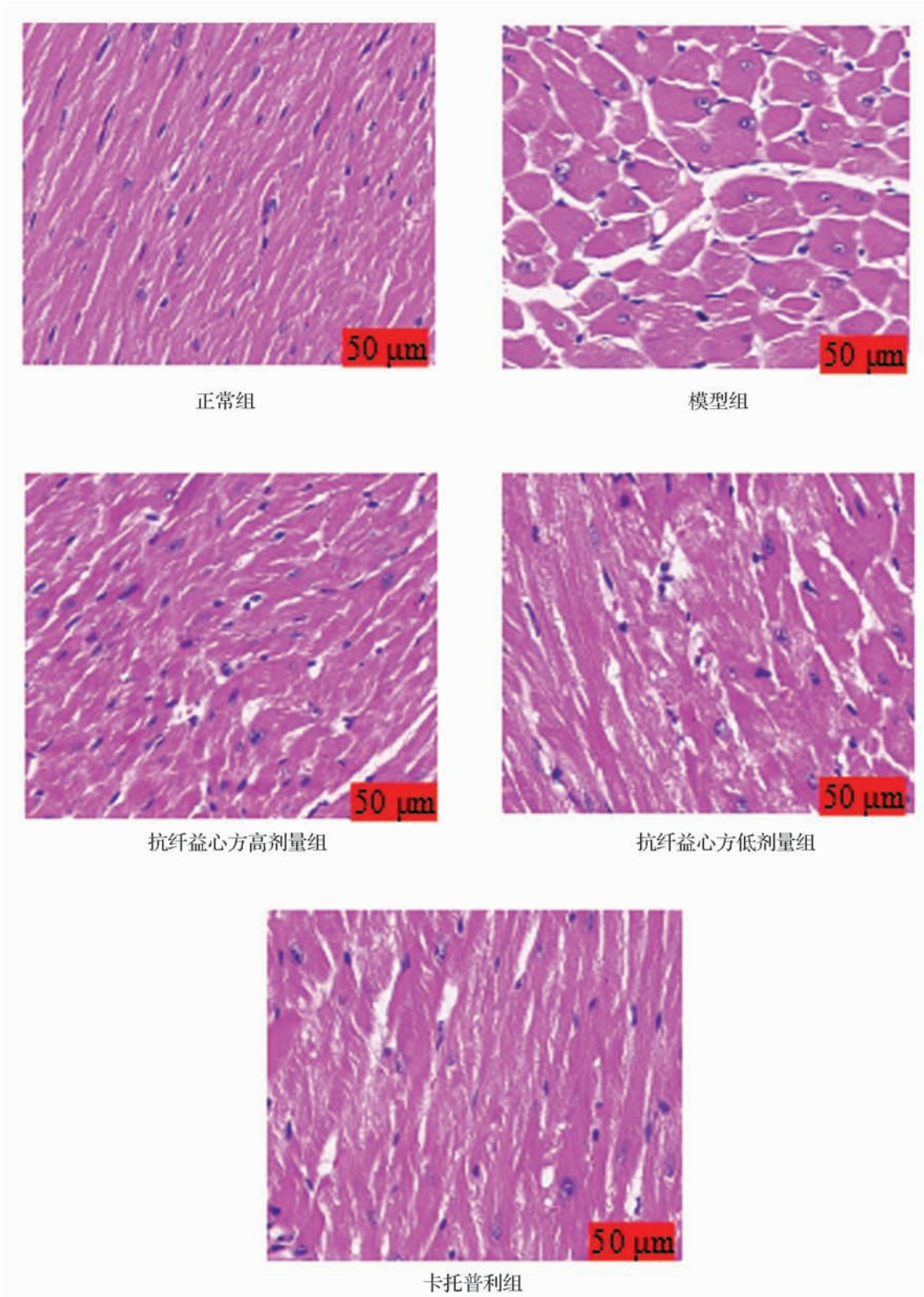


图 2 各组小鼠心脏组织病理变化(HE 染色,50 μm,$n=6$)

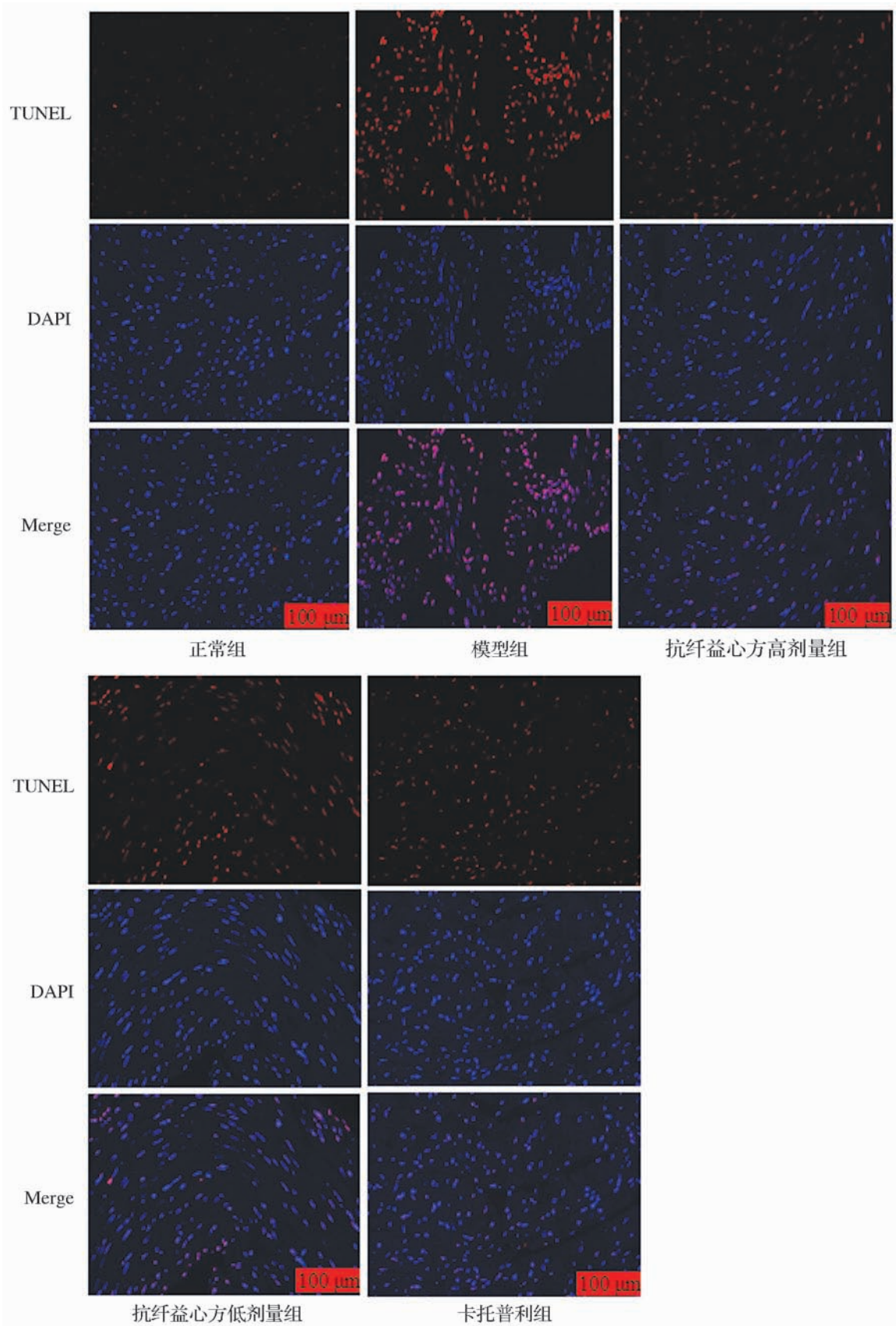
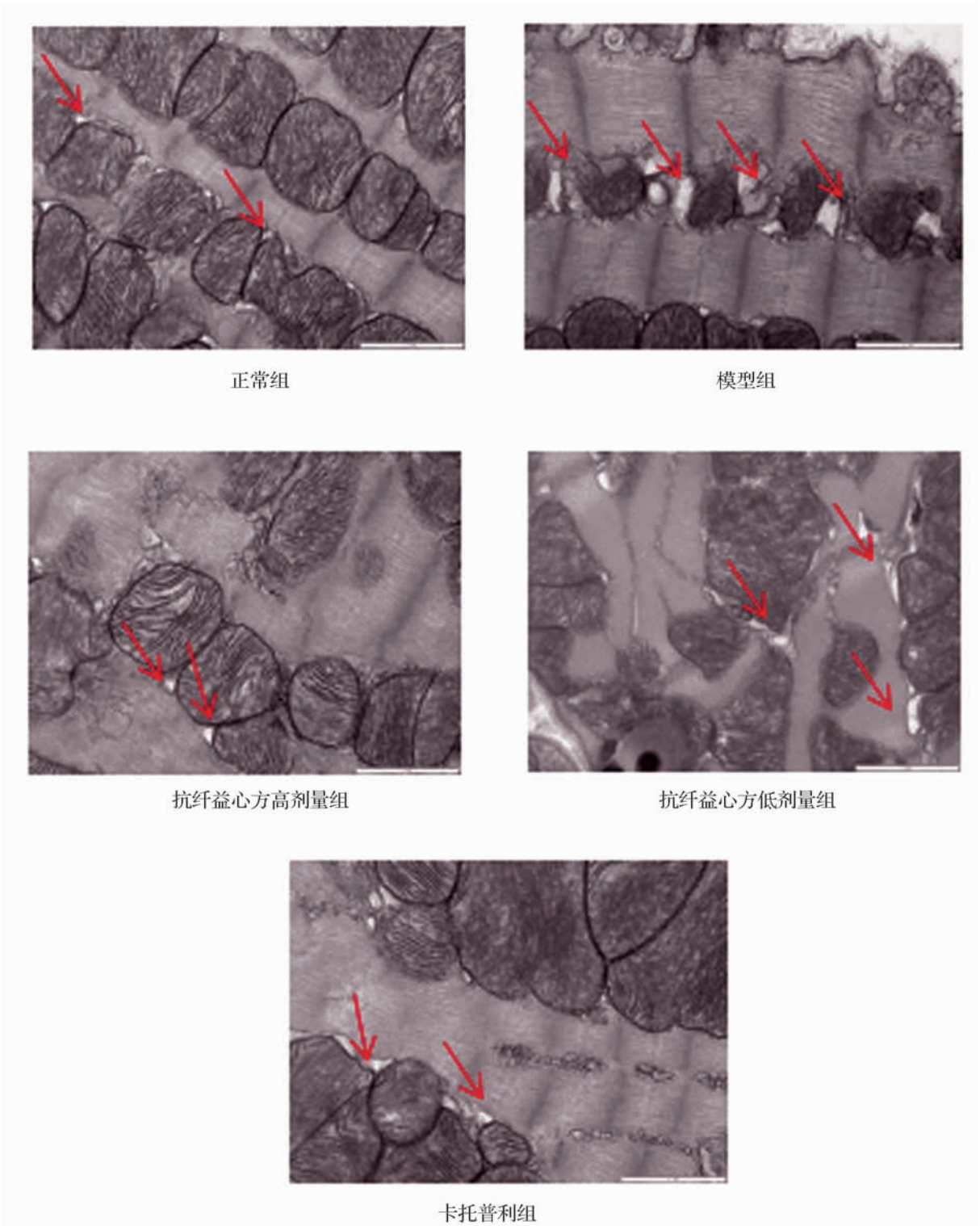


图3 各组小鼠心肌细胞凋亡结果(TUNEL染法,100 μm,$n=6$)



注:红色箭头指内质网。

图4 各组小鼠心肌细胞内质网结构变化(30 000×,$n=6$)

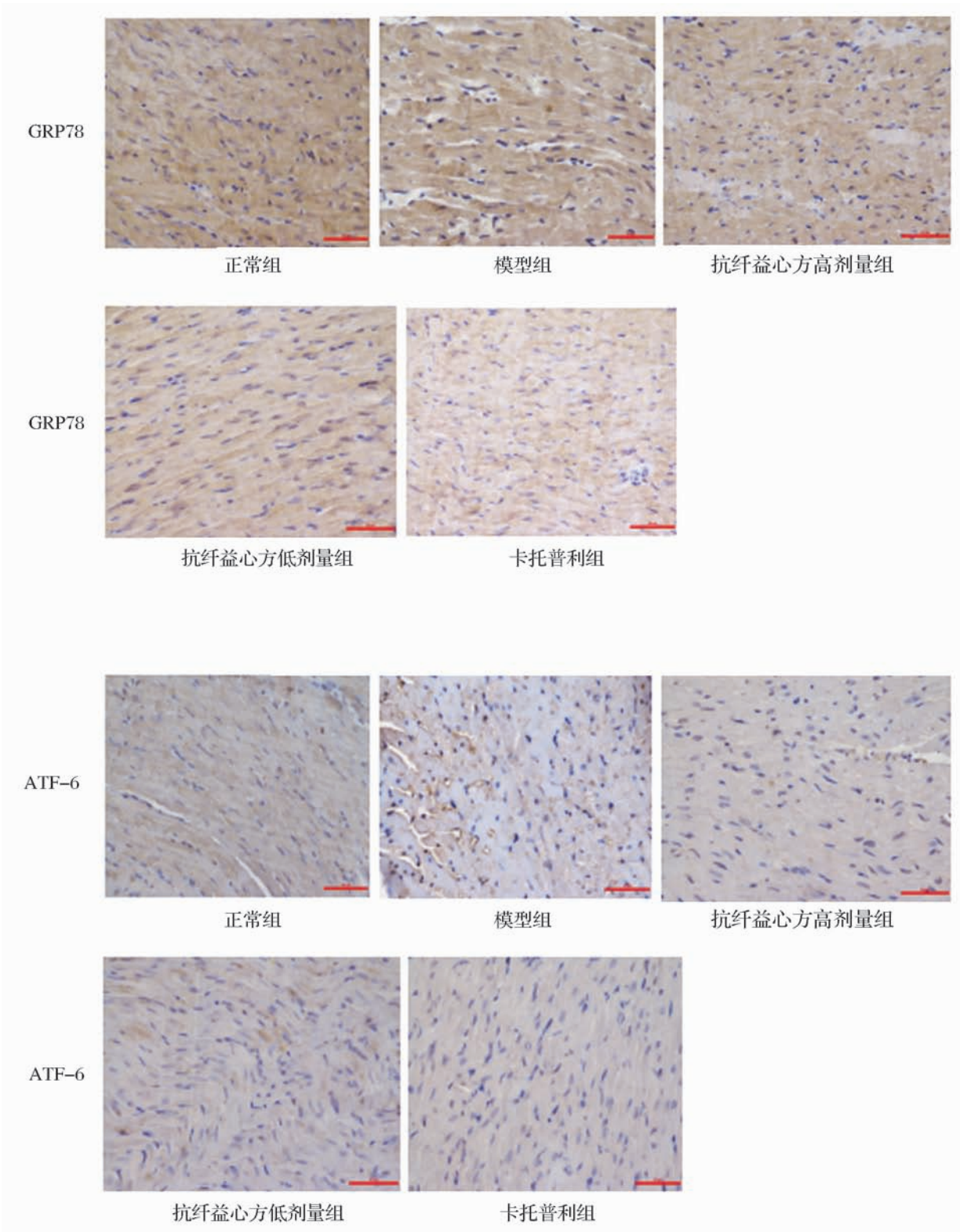


图5 各组小鼠心肌GRP78、ATF6表达结果(免疫组化染法,50 μm,n=6)