

# 生脉散对气阴两虚型心力衰竭小鼠的改善作用及机制研究<sup>△</sup>

康兰芳<sup>1,2\*</sup>, 李 建<sup>3</sup>, 赵雅婷<sup>1</sup>, 陈迎春<sup>1,2</sup>, 陈贵银<sup>1,2</sup>, 聂晓博<sup>4#</sup>, 刘 姣<sup>5</sup>, 程 杰<sup>1,2</sup>(1.河北省中医院药学部, 石家庄 050011; 2.河北省中医药管理局中药评价及转化重点实验室, 石家庄 050011; 3.北京同仁堂制药有限公司, 北京 102629; 4.石家庄医学高等专科学校药学系, 石家庄 050062; 5.河北中医药大学药学院, 石家庄 050200)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)17-2127-07  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.17.08



**摘要** **目的** 研究生脉散对气阴两虚型心力衰竭(HF)小鼠的改善作用及机制。**方法** 将小鼠随机分为空白组(水)、模型组(水)和生脉散低、中、高剂量组[2.61、5.22、10.44 g/kg(以生药量计)]以及阳性对照组(美托洛尔, 30 mg/kg), 每组10只。除空白组外, 其余各组小鼠通过皮下注射D-半乳糖, 并持续限食与负重游泳来建立气阴两虚型HF模型。造模同时, 灌胃相应药液/水, 每天1次, 连续5周。记录小鼠一般状态并进行中医证候评分; 通过行为学实验考察小鼠旷场行动总距离、木僵时间百分比、游泳力竭时间; 检测小鼠心功能相关指标[心率、左心室射血分数(LVEF)、左心室收缩末内径(LVESD)、左心室舒张末内径(LVEDD)、左心室质量指数和全心质量指数]; 检测小鼠血清中天冬氨酸转氨酶(AST)、肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)含量; 观察小鼠心肌组织病理学形态; 检测小鼠心肌细胞凋亡水平; 检测小鼠心肌组织中B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、剪切型胱天蛋白酶3(Cleaved-caspase-3)的mRNA表达水平; 检测小鼠心肌组织中肌质网钙调控相关蛋白[雷诺丁受体2(RyR2)、受磷蛋白(PLB)]的磷酸化水平。**结果** 与空白组比较, 模型组小鼠的体重、旷场行动总距离、游泳力竭时间、LVEF、LVEDD以及心肌组织中Bcl-2 mRNA表达水平和PLB蛋白磷酸化水平均显著降低/缩短( $P < 0.05$ ); 中医证候评分、木僵时间百分比、心率、LVESD、左心室质量指数、全心质量指数、心肌细胞凋亡率, 血清中CK、LDH、AST含量, 心肌组织中Cleaved-caspase-3、Bax mRNA表达水平以及RyR2蛋白磷酸化水平均显著升高( $P < 0.05$ ); 心肌组织存在炎症细胞浸润, 细胞排列紊乱且心肌间质纤维化明显。经生脉散干预后, 小鼠上述大部分定量指标均显著逆转( $P < 0.05$ ), 心肌组织炎症细胞浸润减少, 纤维化程度明显减轻。**结论** 生脉散可改善气阴两虚型HF小鼠心功能, 降低心肌细胞凋亡水平和心肌纤维化程度, 其作用机制可能与调节肌质网钙调控相关蛋白表达有关。

**关键词** 生脉散; 气阴两虚; 心力衰竭; 雷诺丁受体2; 受磷蛋白; 肌质网

## Improvement effect and mechanism of Shengmai powder on heart failure mice with qi-yin deficiency

KANG Lanfang<sup>1,2</sup>, LI Jian<sup>3</sup>, ZHAO Yating<sup>1</sup>, CHEN Yingchun<sup>1,2</sup>, CHEN Guiyin<sup>1,2</sup>, NIE Xiaobo<sup>4</sup>, LIU Jiao<sup>5</sup>, CHENG Jie<sup>1,2</sup>(1. Dept. of Pharmacy, Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China; 2. Key Laboratory of Evaluation and Transformation of Traditional Chinese Medicine, Hebei Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China; 3. Beijing Tongrentang Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing 102629, China; 4. Dept. of Pharmacy, Shijiazhuang Medical College, Shijiazhuang 050062, China; 5. School of Pharmacy, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To study the improvement effect and mechanism of Shengmai powder on heart failure (HF) mice with qi-yin deficiency. **METHODS** The mice were randomly divided into blank group (water), model group (water), Shengmai powder low-, medium-, and high-dose groups [2.61, 5.22 and 10.44 g/kg (based on crude drug dosage)] and positive control group (metoprolol, 30 mg/kg), with 10 mice in each group. Except for the blank group, all other groups were subcutaneously injected with D-galactose, and a qi-yin deficiency HF mice model was established by continuous food restriction and weight-bearing swimming. At the same time of modeling, the corresponding medicine/water was gavaged once a day for five weeks. The general

state of mice was recorded and the traditional Chinese medicine (TCM) syndrome score was evaluated. Behavioral experiments were conducted to investigate the total distance of open field action, the percentage of immobility time, and the swimming exhaustion time of mice. The contents of aspartate

<sup>△</sup>基金项目 河北省中医药管理局科研计划项目(No.2022352)  
\*第一作者 主管中药师。研究方向: 中药药效研究及安全性评价。E-mail: 1250031701@qq.com  
#通信作者 副教授, 硕士。研究方向: 中药药效物质及药理机制。E-mail: 251482424@qq.com

transaminase (AST), creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) in the serum of mice were detected; cardiac function indexes [heart rate, left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular end systolic diameter (LVESD), left ventricular end diastolic diameter (LVEDD), left ventricular mass index and whole heart mass index] were all detected; the histopathological morphology of mice myocardium was observed; the level of cardiomyocyte apoptosis in mice was detected; mRNA expression levels of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), and Cleaved-caspase-3 in myocardial tissue of mice were detected; the phosphorylation levels of sarcoplasmic reticulum calcium regulatory related proteins [ryanodine receptor 2 (RyR2) and phospholamban (PLB)] in myocardial tissue of mice were detected. **RESULTS** Compared with the blank group, the body weight, total distance of open field action, swimming exhaustion time, LVEF, LVEDD, Bcl-2 mRNA expression level in myocardial tissue and PLB protein phosphorylation level in the model group were significantly reduced/shortened ( $P<0.05$ ); TCM syndrome score, the percentage of immobility time, heart rate, LVESD, left ventricular mass index, whole heart mass index, cardiomyocyte apoptosis rate, the contents of CK, LDH and AST in serum, mRNA expression levels of Cleaved-caspase-3 and Bax and the phosphorylation level of RyR2 protein in myocardial tissue were significantly increased ( $P<0.05$ ); there were inflammatory cell infiltration, disordered cell arrangement and obvious myocardial interstitial fibrosis in myocardial tissue. After the intervention of Shengmai powder, most of the above quantitative indexes in mice were significantly reversed ( $P<0.05$ ), the inflammatory cell infiltration in myocardial tissue was reduced, and the degree of fibrosis was significantly reduced. **CONCLUSIONS** Shengmai powder can improve cardiac function, reduce the level of cardiomyocyte apoptosis and myocardial fibrosis in HF mice with qi-yin deficiency. Its mechanism may be related to the regulation of the expression of sarcoplasmic reticulum calcium regulation related proteins.

**KEYWORDS** Shengmai powder; qi-yin deficiency; heart failure; ryanodine receptor 2; phospholamban; sarcoplasmic reticulum

心力衰竭(heart failure, HF)是主要以心脏结构受损或功能障碍引起心室舒张或收缩功能异常为特征的心脏循环障碍<sup>[1]</sup>。HF的临床症状通常包括疲劳、呼吸困难、水肿以及心功能下降、器官血液灌注减少等<sup>[2]</sup>。据统计,中国HF患病率为1.10%,已成为我国备受关注的公共卫生问题之一<sup>[3-4]</sup>。研究发现,发生HF时心肌细胞的收缩力减弱与细胞内Ca<sup>2+</sup>调控失衡密切相关<sup>[5]</sup>,心肌细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度的变化不仅与L型钙离子通道引起的Ca<sup>2+</sup>内流有关,还与雷诺丁受体2(ryanodine receptor 2, RyR2)介导的肌质网Ca<sup>2+</sup>释放以及受磷蛋白(phospholamban, PLB)介导的肌质网Ca<sup>2+</sup>回收密切相关<sup>[6]</sup>。细胞凋亡是心肌细胞坏死的重要驱动因素,可致心脏中有效细胞数量减少,使心肌收缩力降低,从而无法维持正常心功能,导致HF<sup>[7]</sup>。

中医中并无HF的概念,根据HF的临床表现,可将其归为“心悸”“怔忡”“喘症”“水肿”范畴。气阴两虚证为HF最常见的证型之一<sup>[8]</sup>,多由年老体衰、外邪入侵或先天不足等引起,可导致心气亏虚、神疲乏力,最终气不化水形成瘀堵,损及心阴、心阳。生脉散出自《内外伤辨惑论》,为益气养阴的代表方剂,由人参、麦冬、五味子3味药组成,可荣养气血、收敛耗散之气,临床实践证实其对气阴两虚型HF治疗有效<sup>[9]</sup>。本课题组前期研究发现,生脉散可通过减少肌质网Ca<sup>2+</sup>渗漏,促进Ca<sup>2+</sup>回收,提高心肌收缩力<sup>[10]</sup>,但是其改善气阴两虚型HF的具体作用机制仍不够明确。基于此,本研究从肌质网钙调控和细

胞凋亡角度出发,继续探讨生脉散对气阴两虚型HF小鼠的改善作用及机制,以期为生脉散的临床应用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

Vevo<sup>®</sup> 2100型超高分辨率小动物超声成像系统购自加拿大FUJIFILM VisualSonics公司;A40426型聚合酶链式反应(PCR)仪、NanoDrop 2000C型超微量分光光度计购自美国Thermo Fisher Scientific公司;BX53型倒置显微镜购自日本Olympus公司;Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra型凝胶电泳槽购自美国Bio-Rad公司。

### 1.2 主要药品与试剂

人参配方颗粒(1 g配方颗粒相当于生药5 g)、五味子配方颗粒(1 g配方颗粒相当于生药1.5 g)、麦冬配方颗粒(1 g配方颗粒相当于生药3.3 g)(批号分别为1035613、A2033953、1081483)均由河北省中医院提供;酒石酸美托洛尔片(批号2211049,规格25 mg/片)购自阿斯利康制药有限公司;D-半乳糖(批号WXBD1824V)购自北京兰杰柯科技有限公司;天冬氨酸转氨酶(aspartate transaminase, AST)、肌酸激酶(creatine kinase, CK)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号分别为JM-10641R2、JM-02031R2、JM-11249R2)均购自江苏晶美生物科技有限公司;TUNEL试剂盒、Masson染色液(批号分别为G1501、G1006)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;

RNA提取试剂盒(批号R6934-01)购自美国Omega公司;苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(批号G1120)购自北京索莱宝科技有限公司;兔源磷酸化RyR2(p-RyR2)、RyR2、磷酸化PLB(p-PLB)、PLB多克隆抗体和鼠源 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)单克隆抗体(批号分别为ab2845459、ab302716、ab15000、ab219626、ab8226)均购自英国Abcam公司;山羊抗兔免疫球蛋白G二抗、山羊抗鼠免疫球蛋白G二抗(批号分别为20001471、20001399)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;B细胞淋巴瘤2(B-cell lymphoma 2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)、剪切型胱天蛋白酶3(Cleaved-caspase-3)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)的PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成并提供,具体引物序列及扩增产物长度见表1。

表1 PCR引物序列及扩增产物长度

引物名称	引物序列(5'→3')	扩增产物长度/bp
Cleaved-caspase-3	上游:TCTGACTGGAAAGCCGAAACTCTTC	84
	下游:GTCCCACTGTCTGTCTCAATGCC	
Bcl-2	上游:CCGTCGTGACTCGCAGAGATG	97
	下游:ATCCCTGAAGAGTCTCCACCAC	
Bax	上游:GCTACAGGGTTTCATCCAGGATCG	140
	下游:TGCTGTCCAGTTCATCTCCAATTCG	
GAPDH	上游:ACGGCAAGTTCAACGGCACAG	145
	下游:CGACATACTCAGCACCAGCATCAC	

### 1.3 实验动物

本研究所用动物为健康SPF级雄性BALB/c小鼠,共60只,8周龄,体重18~22 g,购于河北伊维沃生物科技有限公司,动物生产许可证号为SCXK(冀)2020-002。购入后,动物饲养于河北中医药大学实验动物管理中心,环境温度为23~25℃、相对湿度为40%~60%、12 h光/12 h暗交替,实验动物使用许可证号为SYXK(冀)2022-010。实验程序经河北省中医院医学伦理委员会批准,批准号为HBZY2022-YS-228-01。

## 2 方法

### 2.1 生脉散的制备

将生脉散组方中各饮片的配方颗粒按照相应比例(人参、麦冬、五味子的质量比为10:15:6)调制成混合颗粒,加适量沸水搅拌溶解后备用。后续根据生药给药量给予对应剂量药液。

### 2.2 分组、建模与给药

使用随机数字表法将小鼠随机分为空白组、模型组和生脉散低、中、高剂量组[2.61、5.22、10.44 g/kg(以生药量计),剂量分别为临床等效剂量的0.5、1、2倍]以及阳性对照组(美托洛尔,30 mg/kg,剂量为临床等效剂量),每组10只。所有小鼠适应性喂养3 d,除空白组外,其余各组小鼠均参考文献[11-13]中方法进行造模:小鼠颈

部皮下注射D-半乳糖125 mg/kg(每日1次,连续5周);同时对小鼠持续限食(进食量为空白组小鼠进食量均值的30%),并让其负重游泳至力竭[负重约5%体重的重物并游泳至疲倦(以鼻子持续低于水面5 s为标准),每日1次,连续5周],以建立气阴两虚型HF小鼠模型。造模的同时,各给药组小鼠灌胃相应药液,空白组和模型组小鼠灌胃等体积水,每天1次,连续5周。本研究中部别小鼠有死亡和造模不成功的情况,故每组选择8只进行后续实验。

### 2.3 小鼠一般状态及中医证候评分

造模前和末次给药后,记录各组小鼠体重及体温,观察小鼠一般状态;参照《慢性心力衰竭中医诊疗专家共识》<sup>[14]</sup>及《中药新药临床研究指导原则(试行)》<sup>[15]</sup>中HF的中医症状分级量化评分表进行中医证候评分。

### 2.4 行为学实验

#### 2.4.1 旷场实验

末次给药0.5 h后开始旷场实验。将旷场分析箱设置为大小相同的16格,并以从上到下、从左到右的顺序编号,以中间的6、7、10、11格为中心格,以其余12格作为边缘格。每次测定时先开启拍摄与计时功能,再提起小鼠尾部将其轻柔地放入旷场分析箱中心,使其自由活动,共拍摄5 min。将小鼠木僵时间与总时间的比值记为木僵时间百分比,同时提取系统后台采集的旷场行动总距离。

#### 2.4.2 游泳力竭实验

于旷场实验结束后2 h开始实验。在小鼠的尾端系上约5%体重的重物,然后将其放入25℃恒温水箱中游泳,保持水深35 cm左右。记录小鼠从入水到鼻子持续低于水面5 s所用的时间,即为游泳力竭时间。

### 2.5 小鼠心功能相关指标检测

于游泳力竭实验2 h后,每组取5只小鼠进行心功能检测。去除小鼠剑突至颈部间的毛发,以异氟烷(2%~3%)麻醉小鼠后,将其仰卧位固定在恒温操作台上,于胸部涂抹耦合剂;采用高分辨率小动物超声成像系统获取小鼠M型超声心动图和B型超声影像图,同时计算心率、左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左心室收缩末内径(left ventricular end systolic diameter, LVESD)、左心室舒张末内径(left ventricular end diastolic diameter, LVEDD)、左心室质量指数(左心室质量指数=左心室质量/体重×100%)和全心质量指数(全心质量指数=心脏质量/体重×100%)以评定小鼠心脏的泵血、收缩功能及心室重塑情况。

### 2.6 小鼠血清中CK、LDH及AST含量检测

超声检测后对小鼠进行摘眼球取血,将全血常温下静置30 min后,以3 000 r/min离心15 min,取上层血清,

按ELISA试剂盒说明书方法操作检测血清中CK、LDH、AST含量。

## 2.7 小鼠心肌组织病理学形态观察

取血完成后,开胸剪下小鼠心脏,每组取5只小鼠的部分心肌组织(剩余部分冻存备用)置于4%多聚甲醛中固定;经梯度乙醇脱水、透明后,包埋制成蜡块,再切成5 μm薄片,贴于载玻片上,烘干24 h后脱蜡;取部分切片进行HE染色,经脱水、封片后,置于显微镜下观察并拍照。另取部分切片进行Masson染色,同法处理后,置于显微镜下观察并拍照。

## 2.8 小鼠心肌细胞凋亡情况检测

取“2.7”项下剩余切片,加入200 μL蛋白酶K消化10 min,加入脱氧核苷酸转移酶、荧光标记的脱氧尿苷三磷酸孵育2 h,再先后置于37 °C封闭液中孵育30 min和荧光标记的地高辛抗体中孵育30 min;封片,采用显微镜观察并拍照(染色后细胞核呈蓝色,凋亡细胞呈绿色),利用Image J软件分析细胞凋亡情况并计算凋亡率(凋亡率=凋亡细胞数/总细胞数×100%)。

## 2.9 小鼠心肌组织中Bcl-2、Cleaved-caspase-3、Bax mRNA的表达检测

取“2.7”项下各组冻存的心肌组织( $n=5$ )适量,加入Trizol试剂低温研磨,提取并纯化RNA,再逆转录得到cDNA。以cDNA为模板进行PCR扩增反应:96 °C预变性5 min;93 °C变性30 s,58 °C退火/延伸30 s,共35个循环;循环结束后,74 °C延伸5 min,结束反应。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目的基因的相对表达量。

## 2.10 小鼠心肌组织中RyR2、PLB蛋白磷酸化水平检测

取“2.7”项下各组冻存的心肌组织( $n=3$ )适量,加入裂解液低温研磨,提取组织中总蛋白,经纯度检测后,加入适量上样缓冲液煮沸变性;取变性后蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,采用湿法将蛋白印迹转到聚偏二氟乙烯膜上,以封闭液封闭;加入RyR2、PLB、p-PLB、p-RyR2、 $\beta$ -actin一抗(稀释度均为1:500)在4 °C下孵育过夜,次日加入二抗(稀释度为1:10 000)在室温下孵育1 h;加入化学发光液显影,使用Image J软件对蛋白图像进行灰度值分析。以目的蛋白与内参蛋白( $\beta$ -actin)条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平,以p-RyR2与RyR2、p-PLB与PLB的灰度值比值表示RyR2、PLB蛋白的磷酸化水平。

## 2.11 统计学方法

采用SPSS 25软件进行统计分析。当数据满足正态分布时,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步组间两两比较采用LSD- $t$ 检验;造模前后同组间两两比较采用配对 $t$ 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 生脉散对小鼠体重和中医证候评分的影响

造模前,各组小鼠的体重和中医证候评分差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。与造模前同组相比,除空白组外,其余各组小鼠给药5周后,体重均显著降低( $P<0.05$ ),中医证候评分均显著升高( $P<0.05$ )。给药5周后,与空白组相比,模型组小鼠体重显著降低( $P<0.05$ ),中医证候评分显著升高( $P<0.05$ );与模型组相比,生脉散各剂量组和阳性对照组小鼠体重均显著升高( $P<0.05$ ),中医证候评分均显著降低( $P<0.05$ )。结果见表2。

表2 各组小鼠体重和中医证候评分比较( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	体重/g		中医证候评分/分	
	造模前	给药5周后	造模前	给药5周后
空白组	24.8±0.5	26.6±0.7	0.10±0.05	0.10±0.09
模型组	24.6±0.4	19.5±0.6 <sup>ab</sup>	0.15±0.09	1.48±0.20 <sup>ab</sup>
阳性对照组	24.2±0.4	20.0±0.8 <sup>bc</sup>	0.18±0.04	0.88±0.11 <sup>bc</sup>
生脉散高剂量组	24.6±0.5	23.0±0.9 <sup>bc</sup>	0.13±0.05	0.75±0.23 <sup>bc</sup>
生脉散中剂量组	24.5±0.5	23.0±0.8 <sup>bc</sup>	0.15±0.05	0.60±0.16 <sup>bc</sup>
生脉散低剂量组	24.4±0.5	21.8±0.5 <sup>bc</sup>	0.20±0.06	1.03±0.31 <sup>bc</sup>

a:与造模前同组相比, $P<0.05$ ;b:与空白组相比, $P<0.05$ ;c:与模型组相比, $P<0.05$ 。

### 3.2 生脉散对小鼠行为学的影响

与空白组相比,模型组小鼠旷场行动总距离、游泳力竭时间均显著缩短( $P<0.05$ ),木僵时间百分比显著升高( $P<0.05$ ),提示造模成功。与模型组相比,生脉散各剂量组小鼠旷场行动总距离和各给药组小鼠游泳力竭时间均显著延长( $P<0.05$ ),各给药组小鼠木僵时间百分比均显著降低( $P<0.05$ )。结果见表3。

表3 各组小鼠行为学相关指标比较( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	旷场行动总距离/cm	木僵时间百分比/%	游泳力竭时间/s
空白组	617.3±153.9	36.1±8.0	716.6±79.6
模型组	372.7±54.2 <sup>a</sup>	69.5±6.0 <sup>a</sup>	247.6±39.6 <sup>a</sup>
阳性对照组	455.6±104.5	45.2±6.4 <sup>b</sup>	406.1±44.4 <sup>b</sup>
生脉散高剂量组	621.7±101.5 <sup>b</sup>	43.1±6.4 <sup>b</sup>	654.8±77.6 <sup>b</sup>
生脉散中剂量组	700.9±125.8 <sup>b</sup>	33.6±5.0 <sup>b</sup>	650.9±61.2 <sup>b</sup>
生脉散低剂量组	645.4±79.1 <sup>b</sup>	43.0±6.9 <sup>b</sup>	473.3±34.9 <sup>b</sup>

a:与空白组相比, $P<0.05$ ;b:与模型组相比, $P<0.05$ 。

### 3.3 生脉散对小鼠心功能的影响

与空白组相比,模型组小鼠的心率、LVESD、左心室质量指数、全心质量指数均显著升高( $P<0.05$ ),LVEF、LVEDD均显著降低( $P<0.05$ )。与模型组相比,各给药组小鼠的心率、LVESD、左心室质量指数、全心质量指数均显著降低( $P<0.05$ ),LVEF(生脉散低剂量组除外)均显著升高( $P<0.05$ )。结果见表4。

### 3.4 生脉散对小鼠血清中CK、LDH、AST含量的影响

与空白组相比,模型组小鼠血清中CK、LDH、AST含量均显著升高( $P<0.05$ )。与模型组相比,阳性对照组和生脉散中、高剂量组小鼠血清中CK、LDH、AST含量均显著降低( $P<0.05$ )。结果见表5。

表4 各组小鼠心功能指标比较( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	心率/(次/min)	LVEF/%	LVEDD/mm	LVESD/mm	左心室质量指数/%	全心质量指数/%
空白组	406.5±31.8	60.8±4.7	70.4±4.4	28.0±3.9	1.8±0.2	4.6±0.6
模型组	512.6±37.0 <sup>a</sup>	44.3±2.1 <sup>a</sup>	59.4±5.4 <sup>a</sup>	40.1±3.5 <sup>a</sup>	3.5±0.3 <sup>a</sup>	7.9±0.6 <sup>a</sup>
阳性对照组	412.7±26.8 <sup>b</sup>	61.9±3.5 <sup>b</sup>	61.3±6.0	27.8±3.5 <sup>b</sup>	2.3±0.3 <sup>b</sup>	5.0±0.5 <sup>b</sup>
生脉散高剂量组	389.7±35.1 <sup>b</sup>	55.6±3.9 <sup>b</sup>	63.5±4.8	30.2±2.8 <sup>b</sup>	2.2±0.2 <sup>b</sup>	5.2±0.5 <sup>b</sup>
生脉散中剂量组	409.0±34.7 <sup>b</sup>	53.3±3.7 <sup>b</sup>	62.1±5.7	31.8±3.1 <sup>b</sup>	2.6±0.3 <sup>b</sup>	5.9±0.5 <sup>b</sup>
生脉散低剂量组	427.3±39.9 <sup>b</sup>	48.8±3.7	61.8±4.3	33.3±3.5 <sup>b</sup>	3.0±0.2 <sup>b</sup>	6.2±0.8 <sup>b</sup>

a: 与空白组相比,  $P < 0.05$ ; b: 与模型组相比,  $P < 0.05$ 。

表5 各组小鼠血清中CK、LDH、AST含量和心肌细胞凋亡率比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	CK(n=8)/(U/L)	LDH(n=8)/(U/L)	AST(n=8)/(U/L)	心肌细胞凋亡率(n=5)/%
空白组	87.9±13.3	0.8±0.1	62.6±11.0	12.3±1.3
模型组	125.5±15.2 <sup>a</sup>	1.5±0.3 <sup>a</sup>	87.0±9.1 <sup>a</sup>	42.1±2.3 <sup>a</sup>
阳性对照组	91.3±13.9 <sup>b</sup>	0.9±0.2 <sup>b</sup>	70.1±10.2 <sup>b</sup>	29.8±6.0 <sup>b</sup>
生脉散高剂量组	88.4±13.0 <sup>b</sup>	1.0±0.2 <sup>b</sup>	69.4±9.5 <sup>b</sup>	14.6±1.4 <sup>b</sup>
生脉散中剂量组	105.1±11.4 <sup>b</sup>	1.2±0.2 <sup>b</sup>	70.6±9.5 <sup>b</sup>	16.0±1.8 <sup>b</sup>
生脉散低剂量组	113.7±16.5	1.4±0.2	78.6±7.4	23.4±2.8 <sup>b</sup>

a: 与空白组相比,  $P < 0.05$ ; b: 与模型组相比,  $P < 0.05$ 。

### 3.5 生脉散对小鼠心肌组织病理学形态的影响

HE染色结果(图1)显示,空白组小鼠心肌细胞结构清晰,大小均一,排列整齐、紧密。模型组小鼠心肌细胞外间隙增宽,且存在炎症细胞浸润,心肌间质出现脂滴、液泡,细胞排列紊乱且细胞核大小不一。生脉散高剂量组与阳性对照组小鼠心肌组织形态较模型组显著改善,局部有炎症细胞浸润,心肌细胞排列整齐。生脉散低、中剂量组小鼠相比于模型组,心肌间质仍存在少量脂滴、液泡,心肌细胞外间隙较宽,但炎症细胞浸润减少。

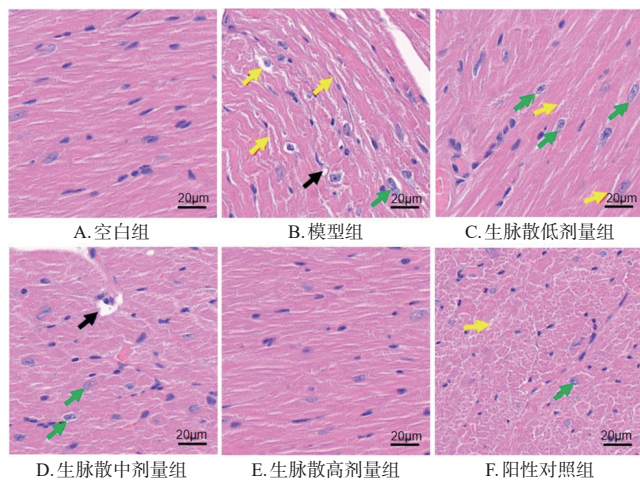


图1 各组小鼠心肌组织HE染色显微图  
黄色箭头: 心肌细胞外间隙增宽; 绿色箭头: 炎症细胞浸润; 黑色箭头: 脂滴、液泡。

图1 各组小鼠心肌组织HE染色显微图

Masson染色结果(图2)显示,染色后心肌组织呈洋红色,胶原纤维呈蓝色。与空白组相比,模型组小鼠心肌间质纤维化程度较高;与模型组相比,生脉散各剂量组及阳性对照组小鼠心肌间质纤维化程度明显减轻。

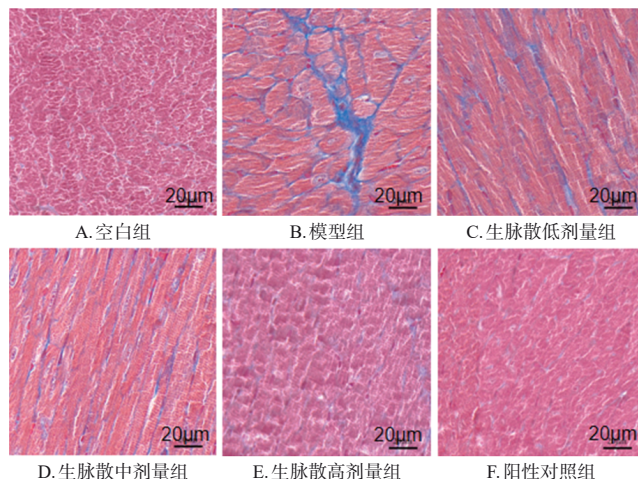


图2 各组小鼠心肌组织的Masson染色显微图

### 3.6 生脉散对小鼠心肌细胞凋亡的影响

与空白组相比,模型组小鼠心肌细胞凋亡率显著升高( $P < 0.05$ )。与模型组相比,各给药组小鼠心肌细胞凋亡率均显著降低( $P < 0.05$ )。结果见表5、图3。

### 3.7 生脉散对小鼠心肌组织中Bcl-2、Cleaved-caspase-3、Bax mRNA表达的影响

与空白组相比,模型组小鼠心肌组织中Cleaved-caspase-3、Bax mRNA表达水平均显著升高( $P < 0.05$ ), Bcl-2 mRNA表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。与模型组相比,各给药组小鼠心肌组织中Cleaved-caspase-3、Bax mRNA表达水平均显著降低( $P < 0.05$ ), Bcl-2 mRNA表达水平(生脉散低剂量组除外)均显著升高( $P < 0.05$ )。结果见表6。

### 3.8 生脉散对小鼠心肌组织中RyR2、PLB蛋白磷酸化水平的影响

与空白组相比,模型组小鼠心肌组织中PLB蛋白磷酸化水平显著降低( $P < 0.05$ ), RyR2蛋白磷酸化水平显著升高( $P < 0.05$ )。与模型组相比,生脉散中、高剂量组和阳性对照组小鼠心肌组织中RyR2蛋白磷酸化水平均显著降低( $P < 0.05$ ),生脉散中、高剂量组小鼠心肌组织中PLB蛋白磷酸化水平均显著升高( $P < 0.05$ )。结果见图4、表7。

## 4 讨论

随着社会老龄化进程的加快, HF的发病率增长迅速,成了一个亟待解决的公共健康难题。临床研究证实,生脉散对气阴两虚型HF具有良好的治疗作用<sup>[9]</sup>。为了探究生脉散治疗HF的机制,本研究通过皮下注射D-半乳糖,对小鼠持续限食,令其游泳至力竭,以构建小鼠气阴两虚型HF模型。气阴两虚型HF患者表现为形体消瘦、体虚乏力、心悸、神疲等。造模5周后,小鼠表现出与气阴两虚型HF患者相似的症状,如心率加快与气阴两虚证中“心悸”表现一致,体重减轻与“形体消瘦”表现

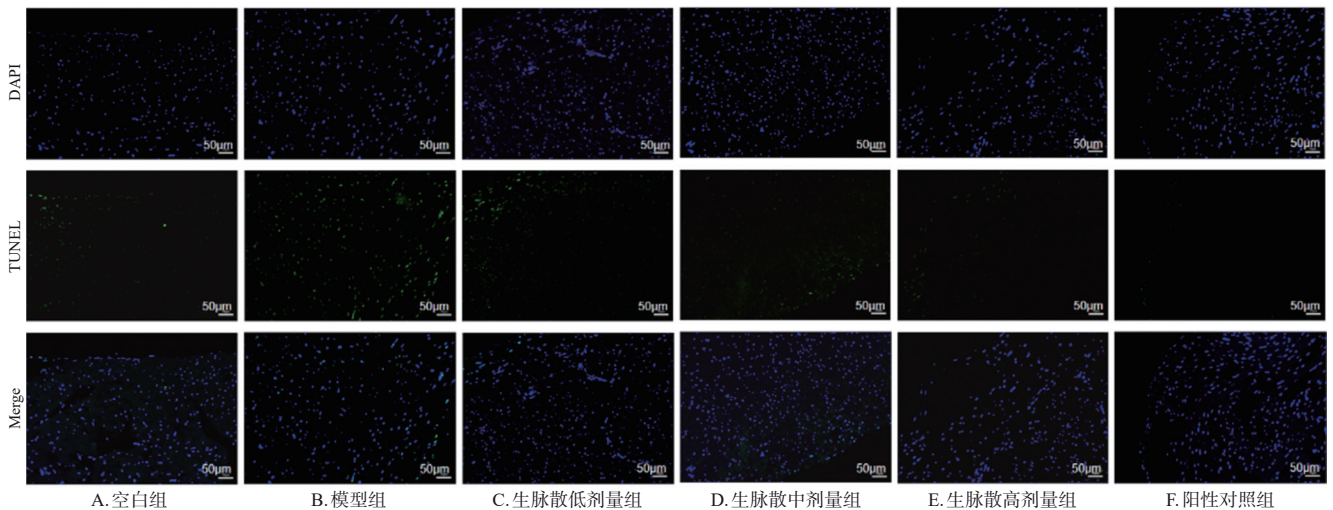
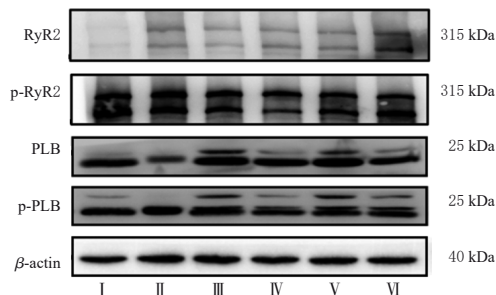


图3 各组小鼠心肌组织凋亡的TUNEL染色显微图

表6 各组小鼠心肌组织中Bcl-2、Cleaved-caspase-3、Bax mRNA表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	Cleaved-caspase-3	Bcl-2	Bax
空白组	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.05
模型组	3.43 ± 0.23 <sup>a</sup>	0.30 ± 0.41 <sup>a</sup>	4.01 ± 0.20 <sup>a</sup>
阳性对照组	1.21 ± 0.16 <sup>b</sup>	1.50 ± 0.13 <sup>b</sup>	1.57 ± 0.28 <sup>b</sup>
生脉散高剂量组	0.90 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.94 ± 0.14 <sup>b</sup>	1.79 ± 0.08 <sup>b</sup>
生脉散中剂量组	1.50 ± 0.20 <sup>b</sup>	0.77 ± 0.05 <sup>b</sup>	2.33 ± 0.38 <sup>b</sup>
生脉散低剂量组	1.75 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.38 ± 0.03	3.31 ± 0.35 <sup>b</sup>

a: 与空白组相比,  $P < 0.05$ ; b: 与模型组相比,  $P < 0.05$ 。



I: 空白组; II: 模型组; III: 阳性对照组; IV: 生脉散高剂量组; V: 生脉散中剂量组; VI: 生脉散低剂量组。

图4 各组小鼠心肌组织中RyR2、PLB及其磷酸化蛋白表达的电泳图

表7 各组小鼠心肌组织中RyR2、PLB蛋白磷酸化水平比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	p-RyR2/RyR2	p-PLB/PLB
空白组	0.29 ± 0.16	1.02 ± 0.31
模型组	0.57 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.60 ± 0.30 <sup>a</sup>
阳性对照组	0.28 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.85 ± 0.20
生脉散高剂量组	0.33 ± 0.12 <sup>b</sup>	1.06 ± 0.08 <sup>b</sup>
生脉散中剂量组	0.33 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.06 ± 0.12 <sup>b</sup>
生脉散低剂量组	0.39 ± 0.15	0.98 ± 0.21

a: 与空白组相比,  $P < 0.05$ ; b: 与模型组相比,  $P < 0.05$ 。

一致, 游泳力竭时间、旷场行动总距离缩短和木僵时间百分比升高与“神疲、乏力”表现一致。LVEF是评价左心室收缩功能的主要指标(LVEF低于50%即为心功能不全)<sup>[16]</sup>; 心室重塑是诱发HF的重要因素, 包括心脏形

状及结构改变、心肌细胞纤维化等<sup>[17]</sup>。本研究中模型组小鼠的LVEF低于50%, 左心室质量指数、全心质量指数较空白组均显著升高, 心肌组织存在炎症细胞浸润和明显的纤维化情况。综合以上结果可知, 气阴两虚型HF模型复制成功。经生脉散干预后, 气阴两虚型HF小鼠上述指标均不同程度逆转, 表明生脉散可明显改善模型小鼠的气阴两虚、HF表现, 抑制心室重塑, 进而改善心功能。

CK、LDH与AST可在一定程度上反映细胞损伤, 正常心肌细胞的细胞质中含有大量的CK、LDH和AST; 当细胞发生损伤后, 大量的CK、LDH和AST被释放到细胞外, 从而导致血清中含量升高<sup>[18]</sup>。细胞凋亡是程序性死亡, 也是心肌细胞坏死的重要驱动因素<sup>[17]</sup>。研究表明, Cleaved-caspase-3是细胞凋亡过程中重要的终末剪切酶, 其激活后将启动细胞凋亡程序<sup>[19]</sup>; 抗凋亡蛋白Bcl-2与促凋亡蛋白Bax同属于Bcl-2家族, 是反映细胞凋亡情况的重要指标<sup>[20]</sup>。经生脉散干预后, 小鼠血清中CK、LDH、AST含量及心肌组织中Bax、Cleaved-caspase-3 mRNA表达水平均不同程度降低, Bcl-2 mRNA表达水平不同程度升高。这提示生脉散可通过抑制心肌细胞凋亡来保护模型小鼠的心功能。

心肌细胞的基本功能是维持心脏的正常收缩, 心肌的收缩和舒张运动主要是由细胞内游离Ca<sup>2+</sup>浓度的升高和降低所主导; 细胞质中的游离Ca<sup>2+</sup>主要有2种来源: 一是细胞外Ca<sup>2+</sup>通过L型钙离子通道进入细胞质, 二是肌质网内蓄积的Ca<sup>2+</sup>通过RyR2进入细胞质, 且第2种方式引起的Ca<sup>2+</sup>渗漏可能是导致HF的重要原因<sup>[21]</sup>。RyR2是心肌细胞肌质网释放Ca<sup>2+</sup>的通道之一, HF发生时肾上腺素能神经兴奋, RyR2过度磷酸化, 导致肌质网的Ca<sup>2+</sup>渗漏增加, 钙泵储备减少, 从而抑制心肌细胞收缩<sup>[22]</sup>。PLB则是调控细胞质内Ca<sup>2+</sup>稳态的另一个关键蛋白, 磷酸化

的PLB能够促进2型肌质网钙泵和Ca<sup>2+</sup>结合,加速肌质网对Ca<sup>2+</sup>的再摄取,使其在细胞质中的浓度降低,从而导致心肌舒张<sup>[6]</sup>。经生脉散干预后,小鼠心肌组织中PLB蛋白磷酸化水平升高、RyR2蛋白磷酸化水平降低。这提示生脉散可通过抑制RyR2蛋白磷酸化,减少肌质网中的Ca<sup>2+</sup>渗漏,以及通过促进PLB蛋白磷酸化,加速细胞质中的Ca<sup>2+</sup>回收至肌质网内,从而改善模型小鼠心功能。

综上所述,生脉散可改善气阴两虚型HF小鼠心功能,降低心肌细胞凋亡水平,减轻心肌纤维化程度,其作用机制可能与调节肌质网内钙调控相关蛋白表达有关。本课题组后续将进行膜片钳实验,观察生脉散对心肌细胞膜Ca<sup>2+</sup>通道的影响,以进一步探讨生脉散改善气阴两虚型HF的作用机制。

### 参考文献

[1] 柴珂,杨杰孚.心力衰竭诊断和治疗的现状和思考[J].心脑血管病防治,2020,20(1):10-12,24.

[2] VAN DER MEER P, GAGGIN H K, DEC G W. ACC/AHA versus ESC guidelines on heart failure: JACC guideline comparison[J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 73(21): 2756-2768.

[3] WANG H, CHAI K, DU M H, et al. Prevalence and incidence of heart failure among urban patients in China: a national population-based analysis[J]. Circ Heart Fail, 2021, 14(10):e008406.

[4] ROTH G A, FOROUZANFAR M H, MORAN A E, et al. Demographic and epidemiologic drivers of global cardiovascular mortality[J]. N Engl J Med, 2015, 372(14): 1333-1341.

[5] ROSENBERG P. VDAC2 as a novel target for heart failure: Ca<sup>2+</sup> at the sarcomere, mitochondria and SR[J]. Cell Calcium, 2022, 104:102586.

[6] LANDSTROM A P, DOBREV D, WEHRENS X H T. Calcium signaling and cardiac arrhythmias[J]. Circ Res, 2017, 120(12):1969-1993.

[7] DEL RE D P, AMGALAN D, LINKERMANN A, et al. Fundamental mechanisms of regulated cell death and implications for heart disease[J]. Physiol Rev, 2019, 99(4): 1765-1817.

[8] 张松,廖宪勇,李白雪.中医治疗慢性心力衰竭的证候分析[J].四川中医,2020,38(2):208-211.

[9] 杨月东,汪茂林,赵娟,等.基于CMR评价生脉散颗粒抑制慢性心力衰竭气阴两虚证患者心肌纤维化的临床疗

效[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(23):89-97.

[10] 张忠,李雅姝,胡庆汐,等.生脉散调控钙稳态影响心肌细胞收缩的机制研究[J].河北中医药学报,2025,40(4): 78-81.

[11] 黄聪,孙明杰,崔海峰,等.基于网络药理学探讨生脉散降低钙泄漏保护糖尿病大鼠心肌收缩功能的机制研究[J].药学学报,2022,57(10):3115-3123.

[12] 王柏惠,王经,王琦,等.D-半乳糖致心脏衰老动物模型的建立及评估[J].华中科技大学学报(医学版),2025,54(2):211-216.

[13] 李宗源,郝莉雨,孙建辉,等.3种气虚证动物模型的比较与评价[J].中医杂志,2022,63(18):1773-1778.

[14] 毛静远,朱明军.慢性心力衰竭中医诊疗专家共识[J].中医杂志,2014,55(14):1258-1260.

[15] 郑筱萸.中药新药临床研究指导原则:试行[M].北京:中国医药科技出版社,2002:352-353.

[16] 鲁江斌,王英莉,杨登魁,等.LVEF≤50%的急性冠状动脉综合征患者行经皮冠状动脉介入治疗前后微循环、心功能变化及预后影响因素分析[J].临床和实验医学杂志,2024,23(18):1920-1924.

[17] 马慕稔,董英杰,雷珊珊,等.黄精不同炮制品对气阴两虚模型大鼠的药效研究[J].上海中医药杂志,2019,53(10):83-89.

[18] 张俊彪,郭军霞.红景天苷对人心肌细胞缺氧损伤的保护作用及可能机制[J].中国现代医学杂志,2017,27(8): 21-26.

[19] 张欣欣,宋瑞婧,高飞,等.基于内质网应激GRP78/PERK/CHOP信号通路探讨益肾通络方对膜性肾病大鼠足细胞凋亡的影响[J].中药药理与临床,2021,37(5): 102-109.

[20] 何泽,成光宇,吕美香,等.解毒通络保肾法对实验性DM大鼠肾足细胞凋亡相关因子Bax、Bcl-2、Caspase-3的影响[J].中国老年学杂志,2019,39(6):1414-1417.

[21] WU Y, WANG M L, XU J, et al. Signature network-based survey of the effects of a traditional Chinese medicine on heart failure[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 283: 114750.

[22] VADUGANATHAN M, CLAGGETT B L, JHUND P S, et al. Estimating lifetime benefits of comprehensive disease-modifying pharmacological therapies in patients with heart failure with reduced ejection fraction: a comparative analysis of three randomised controlled trials[J]. Lancet, 2020, 396(10244): 121-128.

(收稿日期:2025-04-12 修回日期:2025-08-03)

(编辑:唐晓莲)