

- [10] GREVEN J, PFEIFER R, ZHI Q, et al. Update on the role of endothelial cells in trauma [J]. Eur J Trauma Emerg Surg, 2018, 44(5): 667-677.
- [11] XU Y, ZHENG L, HU Y, et al. Pyroptosis and its relationship to atherosclerosis[J]. Clin Chim Acta, 2018, 476: 28-37.
- [12] ADAM T, BURSZEJN A, SCHMUTZ J. Facial eczema from a sunscreen: scutellaria baicalensis, a novel allergen beginning to attract attention[J]. Contact Dermatitis, 2020, 82(4): 253-254.
- [13] MAO K, CHEN S, CHEN M, et al. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock[J]. Cell Res, 2013, 23(2): 201-212.
- [14] SHI H, WANG Y, LI X, et al. NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component [J]. Nat Immunol, 2016, 17(3): 250-258.
- [15] JIN X, LIQUN L, LANFANG L. NEK7: a novel promising therapy target for NLRP3-related inflammatory diseases[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2016, 48(10): 966-968.
- 【责任编辑：侯丽颖】

基于“动则生阳”理论探讨有氧运动对阳虚证慢性心力衰竭模型大鼠的作用和机制

许禄华^{1,2}, 周旭^{1,2}, 蒋峰¹, 宋银枝¹, 曾志聪¹, 张小朵¹, 魏山寅¹, 林丰夏¹

[1. 广州中医药大学附属宝安中医院, 深圳市宝安中医院(集团), 广东深圳 518133;

2. 广州中医药大学研究生院, 广东广州 510405]

摘要:【目的】基于“动则生阳”中医理论, 探究有氧运动(AE)对阳虚证慢性心力衰竭(CHF)模型大鼠的作用和机制。【方法】采用腹主动脉缩窄术(AAC)建立CHF大鼠模型, AAC结合冷刺激(CS)法建立阳虚证CHF大鼠模型。将健康SD大鼠50只分为假手术组、安静组(Calm组)和运动组(AE组), 其中Calm组包括心力衰竭安静组(AAC+Calm组)和阳虚心力衰竭安静组(AAC+CS+Calm组), AE组包括心力衰竭运动组(AAC+AE组)和阳虚心力衰竭运动组(AAC+CS+AE组), 分别对应处理。运动/安静干预8周后, 使用中医阳虚证候积分表评估阳虚程度, 应用超声、称质量和苏木素-伊红(HE)染色等方法评估心室重构和心功能水平, 蛋白免疫印迹法检测心肌组织自噬相关蛋白微管相关蛋白1轻链3B(LC3B)、p62、Beclin-1表达。【结果】与假手术组比较, Calm组大鼠阳虚证候积分, 左心室舒张末期厚度(LVEDd)、左心室收缩末期厚度(LVESd)、心脏质量/体质量比值(HW/BW)、左心室质量/体质量比值(LVW/BW), Beclin-1表达水平和LC3B-II/LC3B-I比值升高, 左心室射血分数(EF)值和p62表达水平降低(均 $P<0.01$), HE染色结果显示心室重构, 可见心肌细胞呈不同程度的排列紊乱, 心肌肥大, 细胞核肿胀; 而与AAC+Calm组比较, AAC+CS+Calm组大鼠的上述变化程度更明显(均 $P<0.01$)。与Calm组比较, AE组能明显拮抗上述变化(均 $P<0.01$)。【结论】CHF大鼠的阳虚程度与其心室重构程度、心功能恶化程度密切相关, 有氧运动能有效纠正CHF大鼠的阳虚状态, 并拮抗CHF导致的心室重构和心功能恶化, 其机制可能与调节心肌细胞自噬相关。

关键词: 有氧运动; 心力衰竭; 阳虚证; 心室重构; 自噬; 大鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)03-0561-09

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.03.023

收稿日期: 2020-07-17

作者简介: 许禄华(1994-), 男, 硕士研究生, 住院医师; E-mail: 619347785@qq.com

通讯作者: 林丰夏(1989-), 男, 硕士, 主治医师; E-mail: szlinfx@163.com

基金项目: 国家中医药管理局科研项目(编号: 2019 GZY-FJS-2019-004); 深圳市宝安区科技计划项目(编号: 2017JD146)

Exploring Effect and Mechanism of Aerobic Exercise for Yang Deficiency Syndrome of Chronic Heart Failure in Rats Based on Theory of “Exercise Can Generate Yang Qi”

XU Lu-Hua^{1,2}, ZHOU Xu^{1,2}, JIANG Feng¹, SONG Yin-Zhi¹,
ZENG Zhi-Cong¹, ZHANG Xiao-Duo¹, WEI Shan-Yin¹, LIN Feng-Xia¹

(1. Bao'an Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen 518133 Guangdong, China; 2. Graduate School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect and mechanism of aerobic exercise (AE) for yang deficiency syndrome of chronic heart failure (CHF) in rats based on the theory of “exercise can generate yang qi”. **Methods** Abdominal aortic constriction (AAC) was used to establish CHF model, and then combined with cold stimulation (CS) to establish yang deficiency syndrome of CHF model. Fifty healthy Sprague-Dawley rats were divided into sham operation group, Calm group and AE group, of which Calm group included CHF without exercise group (AAC+ Calm group) and yang deficiency CHF without exercise group (AAC+CS+ Calm group), and the AE group included CHF with exercise group (AAC+AE group) and yang deficiency CHF with exercise group (AAC+CS+AE group), given corresponding treatment. After 8 weeks of exercise/no exercise intervention, the degree of yang deficiency was assessed using the traditional Chinese medicine (TCM) yang deficiency syndrome score scale, levels of ventricular remodeling and cardiac function were assessed by ultrasound, mass weighing and hematoxylin-eosin (HE) staining methods, and expression of autophagy-related protein microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B), p62, Beclin-1 in cardiac muscle tissue were detected by Western blotting assay. **Results** Compared with the sham operation group, the yang deficiency syndrome scores, values of left ventricular end-diastolic dimension (LVEDd), left ventricular end-systolic diameter (LVESd), heart weight (HW)/body weight (BW) ratio, left ventricular weight (LVW)/BW ratio and LC3B-II/LC3B-I ratio and Beclin-1 expression level in the Calm group were increased, ejection fraction (EF) value and p62 expression level were decreased (all $P < 0.01$), and HE staining results showed that the different degrees of cardiomyocytes disorganization, myocardial hypertrophy, nuclear swelling were seen; compared with the AAC+Calm group, the degrees of the above changes were more obvious in the AAC+CS+Calm group (all $P < 0.01$). Furthermore, compared with the Calm group, the above changes were significantly antagonized in the AE group (all $P < 0.01$). **Conclusion** The degree of yang deficiency in CHF rats is closely related to the degree of ventricular remodeling and deterioration of cardiac function. AE can effectively correct the state of yang deficiency in CHF rats and antagonize the ventricular remodeling and deterioration of cardiac function caused by CHF, and its mechanism may be related to the regulation of autophagy of cardiomyocytes.

Keywords: aerobic exercise; heart failure; yang deficiency syndrome; ventricular remodeling; autophagy; rats

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是多种心血管疾病的终末阶段,严重影响患者的生活质量和寿命^[1]。自噬是指细胞成分被转运到溶酶体中并在溶酶体中降解,以实现细胞本身的代谢需要和细胞器更新的一种自我保守现象^[2]。而最新研究^[3]表明,有氧运动(aerobic exercise, AE)等心脏康复手段能拮抗心室重构改善CHF,调节心肌细胞自噬可能是其作用机制^[4]。《黄帝内经》言:“静

则生阴,动则生阳。阳虚动之,阴虚静之。”祖国医学认为阳虚在CHF的发病中占据重要地位^[5]。“动则生阳”理论对CHF治疗有重要指导意义^[6]。有氧运动常被认为可以通过激发人体阳气进而纠正CHF患者的阳虚状态,这与现代医学中有氧运动拮抗心室重构而改善CHF心功能的理论有异曲同工之妙,但目前还没有关于有氧运动对阳虚证CHF作用和机制研究的相关报道。本研究将基于

“动则生阳”理论,通过构建阳虚证CHF大鼠模型,观察有氧运动对其阳虚状态的纠正情况,对其心室重构和心功能的保护作用,和自噬相关蛋白表达水平的影响,以探究有氧运动对阳虚证CHF大鼠的作用和可能机制,亦为“动则生阳”中医理论提供基础支撑,现将研究结果报道如下。

1 材料与方

1.1 动物 8周龄SPF级SD雄性大鼠50只,体重200~220 g,购自深圳市宝安中医院(集团)实验动物中心,动物质量合格证号:11400700344861。实验通过深圳市宝安中医院(集团)伦理委员会批准并于深圳市宝安中医院(集团)实验动物中心执行。

1.2 试剂与仪器 1.0 g/L胰蛋白酶消化液(北京索莱宝科技有限公司);放射免疫沉淀分析(RIPA)缓冲液(美国Sigma-Aldrich公司);二喹啉甲酸(BCA)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);电化学发光(ECL)试剂盒(美国BioVision公司);微管相关蛋白1轻链3B(LC3B)、p62、Beclin-1和GADPH抗体(美国Cambridge公司);苏木素-伊红(HE)染液、中性树胶(广州市秀威贸易有限公司)。WI 5635型12跑道小鼠跑台(北京东西仪器科技有限公司);HPSONOS 5500型彩色超声多普勒检测仪(美国GE公司);JA1003N电子天平(上海精密科学仪器有限公司);ImageQuant LAS 4000型蛋白免疫印迹(Western Blot)条带显影仪(美国GE公司)。

1.3 造模方法 参考文献[7-9]采用腹主动脉缩窄术(abdominal aortic constriction, AAC)结合冷刺激(cold stimulation, CS)法建立压力超负荷性心力衰竭大鼠阳虚证模型。AAC构建压力超负荷心力衰竭模型:SD雄性大鼠适应喂养1周后,以100 g/L水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉成功。常规去毛

备皮消毒,腹部正中切口,逐层打开腹腔,钝性分离腹主动脉,于右肾动脉上方5 mm腹主动脉处放置直径为0.7 mm(22G)的钝化针头。结扎后抽出针头,关闭腹腔,术后给予青霉素注射液(20万单位/d)腿部肌肉注射3 d以预防感染。假手术组的手术步骤同上,但不进行结扎操作。CS法构建大鼠阳虚证模型: AAC术后正常喂养1周后,每日同一时间将大鼠放置于-2~-4℃的冰柜中,每次2 h,共持续2周。

1.4 分组及运动方案 将50只雄性SD大鼠按随机数字表分为假手术组、心力衰竭组(AAC组)和阳虚心力衰竭组(AAC+CS组),各组分别为10、20、20只。按上述方法造模后,假手术组、AAC组和AAC+CS组各有3、6、8只大鼠死亡。然后按照安静、运动干预的不同, AAC组大鼠分为心力衰竭安静组(AAC+Calm组)、心力衰竭运动组(AAC+AE组),每组各7只; AAC+CS组大鼠分为阳虚心力衰竭安静组(AAC+CS+Calm组)和阳虚心力衰竭运动组(AAC+CS+AE组),每组各6只。其中, AAC+Calm组和AAC+CS+Calm组统称为Calm组, AAC+AE组和AAC+CS+AE组统称为AE组。

运动方案: AE组大鼠在12跑道跑台无负重跑台运动,程序参照Bedford方案^[10],运动强度参照潘月顺等^[11]研究结果中对CHF大鼠心功能改善最佳的运动负荷。具体运动方案:运动强度为80%最大摄氧量($VO_{2\max}$),跑步机倾斜角度为6°,运动频率为32 m/min×12 min/次×3次/d,共运动8周。假手术组和Calm组大鼠置于限制其活动的笼子中8周,饲养条件同AE组。

1.5 中医证候(阳虚证)积分评估 在既往研究^[8-9]的基础上,结合CHF的临床特征及中医阳虚理论,制定CHF大鼠阳虚证候积分评分标准(见表1)。总分为18分,6~7分为无阳虚证表现,为轻度;8~12分为阳虚证,但症状不明显,为中

表1 大鼠阳虚证候评分标准

Table 1 Scoring criteria for yang deficiency syndrome in rats

分值(分)	体温	皮毛情况	行动	精神情况	足背水肿	抓起情况
1	下降<0.5℃或正常	光泽、白色无竖立	活动多	活泼	无凹陷或按压凹陷<1 mm	反抗剧烈,咬人
2	下降0.5~1.0℃	欠光泽、黄白相兼、多数竖立	活动较少	精神萎靡、多呈蜷缩、拱背	按压凹陷2~3 mm	反抗较轻,有咬人倾向
3	下降>1.0℃	枯槁、黄白相兼、竖立	活动少	精神萎靡、蜷缩、拱背明显	按压凹陷>3 mm	反抗轻,基本不咬人

度; 13~18分为阳虚症状明显, 为重度。运动/安静干预8周后对各组大鼠进行评估。

1.6 心脏超声评价各组大鼠心功能 运动/安静干预8周后, 对各组大鼠行心脏超声检查。超声测量参照美国超声心动图学会制定的标准, 使用心脏超声多普勒仪, 超声探头为GE公司10S心脏探头, 频率12 MHz, 探测深度2~3 cm, 扫描速度100 mm/s进行检查。步骤: 大鼠空腹状态下称体质量, 予以100 g/L水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉成功后, 固定于操作台上, 心率控制在350~450 bpm。胸前区域备皮, 寻找最佳左室长轴切面, 将M型取样线置于二尖瓣、乳头肌位置, 测量左心室舒张末期厚度(LVEDd)、左心室收缩末期厚度(LVESd)和左心室射血分数(EF), 连续测量3个心动周期, 取平均值。

1.7 心脏标本取材及称体质量 运动/安静干预8周后, 大鼠称体质量。脱颈椎处死, 开胸获取大鼠心脏, 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗滤纸吸净, 电子天平称质量获取整体心脏质量, 将整体心脏质量与大鼠体质量相除, 得到心脏质量和体质量的比值(HW/BW)。然后切去心房和右心室, 称取左心室质量计算左心室质量与体质量比值(LVW/BW)。称质量完成后, 将心室切成小块(50~100 mg)迅速放入液氮中冷冻, 置于-80℃保存。

1.8 HE染色观察左心室心肌病理学形态改变 心肌组织以40 g/L多聚甲醛固定24 h后, 石蜡包埋, 5 μm切片, 80℃烤片0.5 h, 二甲苯脱蜡, 乙醇梯度水化。进行HE染色, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 正置显微镜下观察心肌组织病理变化。

1.9 Western Blot法检测心肌组织自噬相关蛋白LC3B、p62、Beclin-1的表达水平 取左心室梗死边缘区0.5 mm以内心肌组织50 mg, 使用RIPA液裂解, 匀浆后转移至EP管, 离心后上清液与上样缓冲液按4:1比例, 加入5×上样缓冲液。充分混匀, 煮沸10 min, 离心取上清于-80℃保存。采用十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE), 组装电泳装置、上样、电泳、转膜。进行抗体杂交, 与相应稀释倍数的一抗和二抗反应, 用化学发光法检测抗原抗体结合区带, 用凝胶图象处理系统软件对电泳条带进行密度扫描, 以GADPH为内参照进行定量分析。

1.10 统计方法 采用IBM SPSS Statistics 26.0统

计软件进行数据分析, 实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间均数的比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠阳虚证候积分比较 表2结果显示: 与假手术组比较, Calm组大鼠的阳虚证候积分均明显升高; 而与AAC+Calm组(中度阳虚)比较, AAC+CS+Calm组(重度阳虚)的阳虚证候积分明显更高, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。与Calm组比较, AE组阳虚证候积分均明显降低, 其中AAC+AE组大鼠运动后由中度阳虚变化为轻度阳虚, AAC+CS+AE组则由重度阳虚变化为中度阳虚, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

表2 各组大鼠阳虚证候积分比较

Table 2 Comparison of the yang-deficiency syndrome scores in rats of various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	阳虚证候积分(分)	阳虚等级
假手术组	7	6.85 ± 0.89	轻度
AAC+Calm组	7	11.71 ± 1.38 ^①	中度
AAC+CS+Calm组	6	15.85 ± 2.19 ^②	重度
AAC+AE组	7	7.57 ± 0.97 ^③	轻度
AAC+CS+AE组	6	10.85 ± 0.89 ^③	中度

AAC: 腹主动脉缩窄术; Calm: 安静; CS: 冷刺激法; AE: 有氧运动。下表同。① $P < 0.01$, 与假手术组比较; ② $P < 0.01$, 与AAC+Calm组比较; ③ $P < 0.01$, 与相应的Calm组比较

2.2 各组大鼠心功能比较 表3结果显示: 与假手术组比较, Calm组大鼠心室的LVEDd、LVESd、HW/BW和LVW/BW明显升高, EF明显降低(均 $P < 0.01$); 而与AAC+Calm组比较, AAC+CS+Calm组大鼠的上述变化程度更大, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。与Calm组比较, AE组大鼠的LVEDd、LVESd、HW/BW和LVW/BW明显降低, EF明显升高, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 各组大鼠心肌组织HE染色结果比较 图1结果显示: 假手术组大鼠心肌细胞未见明显肥厚、排列整齐、规则。Calm组大鼠心肌细胞呈不同程度的排列紊乱, 心肌肥大, 细胞核肿胀, 大小不一, 而与AAC+Calm组比较, AAC+CS+Calm组大鼠的上述变化程度更甚。与Calm组比较, AE组大鼠心肌细胞的上述变化程度明显减轻。

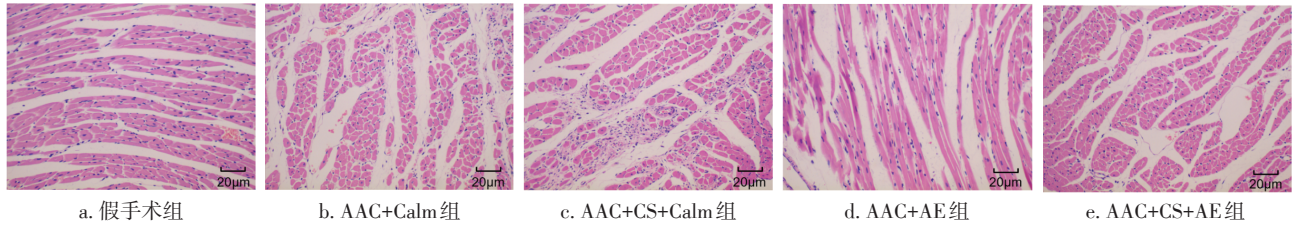
表3 各组大鼠心功能情况

Table 3 Comparison of the cardiac functions in rats of various groups

 $(\bar{x} \pm s)$

组别	鼠数(只)	LVEDd (mm)	LVESd (mm)	EF(%)	HW/BW(mg·g ⁻¹)	LVW/BW(mg·g ⁻¹)
假手术组	7	5.85 ± 0.66	3.25 ± 0.46	75.25 ± 6.21	2.69 ± 0.22	2.03 ± 0.15
AAC+Calm组	7	8.18 ± 1.12 ^①	5.16 ± 0.73 ^①	43.88 ± 3.54 ^①	3.57 ± 0.46 ^①	2.65 ± 0.25 ^①
AAC+CS+Calm组	6	8.85 ± 1.26 ^{①②}	5.98 ± 0.65 ^{①②}	38.91 ± 3.08 ^{①②}	3.84 ± 0.37 ^{①②}	2.81 ± 0.26 ^{①②}
AAC+AE组	7	7.24 ± 0.89 ^③	4.36 ± 0.56 ^③	54.38 ± 4.03 ^③	3.19 ± 0.32 ^③	2.13 ± 0.15 ^③
AAC+CS+AE组	6	7.75 ± 0.74 ^③	5.05 ± 0.51 ^③	51.25 ± 3.77 ^③	3.25 ± 0.32 ^③	2.23 ± 0.15 ^③

① $P < 0.01$, 与假手术组比较; ② $P < 0.01$, 与 AAC+Calm 组比较; ③ $P < 0.01$, 与相应的 Calm 组比较



AAC: 腹主动脉缩窄术; Calm: 安静; CS: 冷刺激法; AE: 有氧运动。下图同

图1 各组大鼠心肌组织HE染色结果比较(×400)

Figure 1 Comparison of HE staining results of myocardial tissues in rats of various groups (×400)

2.4 各组大鼠心肌组织自噬相关蛋白表达水平比较 图2、表4结果显示:与假手术组比较, Calm组大鼠心肌组织的LC3B-Ⅱ/LC3B-Ⅰ比值和 Beclin-1表达水平明显升高, p62表达水平明显降低;而与AAC+Calm组比较, AAC+CS+Calm组大鼠的LC3B-Ⅱ/LC3B-Ⅰ比值和Beclin-1、p62表达水平的变化程度更大, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与Calm组比较, AE组大鼠的LC3B-Ⅱ/LC3B-Ⅰ比值、Beclin-1表达水平明显降低, p62表达水平明显升高, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

表4 各组大鼠心肌组织自噬相关蛋白表达水平比较

Table 4 Comparison of the expression levels of autophagy-related proteins in rat cardiac muscle

tissue of various groups		$(\bar{x} \pm s, \%)$		
组别	鼠数(只)	LC3B-Ⅱ/LC3B-Ⅰ	p62/GADPH	Beclin-1/GADPH
假手术组	7	1.09 ± 0.13	0.72 ± 0.05	0.80 ± 0.05
AAC+Calm组	7	1.35 ± 0.15 ^①	0.47 ± 0.03 ^①	1.31 ± 0.14 ^①
AAC+CS+Calm组	6	1.49 ± 0.18 ^{①②}	0.23 ± 0.01 ^{①②}	1.59 ± 0.26 ^{①②}
AAC+AE组	7	1.22 ± 0.15 ^③	0.53 ± 0.05 ^③	0.95 ± 0.09 ^③
AAC+CS+AE组	6	1.33 ± 0.17 ^③	0.36 ± 0.03 ^③	1.29 ± 0.13 ^③

① $P < 0.01$, 与假手术组比较; ② $P < 0.01$, 与 AAC+Calm 组比较; ③ $P < 0.01$, 与相应的 Calm 组比较

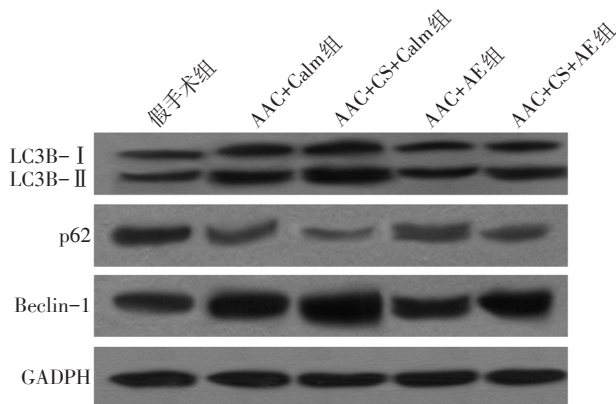


图2 各组大鼠心肌组织自噬相关蛋白
Western Blot电泳条带

Figure 2 Western Blotting strips of autophagy-related proteins in rat cardiac muscle tissue of various groups

3 讨论

3.1 慢性心力衰竭(CHF)与阳虚的关系 祖国医学对CHF的认识源远流长,早在《黄帝内经》就有CHF的相关记载,“心胀者,烦心短气,卧不安”“心痹者,脉不通,烦则心下鼓,上气而喘”,指出心气不足,心血瘀阻是CHF的基本病机。而随着中医学对CHF认识的不断深入,目前大多认为CHF的病机为本虚标实,以“气虚、阳虚”为本,以“痰浊、瘀血、水停”为标^[12]。其病理演变过程可以概括为“心气虚→血瘀→水停→阳虚(心气虚加重)”,这一过程类似于现代医学中CHF“心功能不全→神经内分泌激活→心室重塑→

心功能不全加重”的病理生理机制。气在功能上为阳,有推动、温煦的作用,气虚不能行血、化饮,则导致瘀血、水饮停心,瘀血、水饮为阴,又会耗气伤阳。阳虚为气虚之极,心气虚日久必然会导致心阳虚。且《素问·五运行大论》明示“南方生热,热生火……在脏为心……其用为躁”,心在五行属火,主一身之阳气,为阳中之阳,心力衰竭必然引起阳气的虚衰。可见,阳虚在CHF的发病中占据重要地位。

现代医学研究也发现,心气虚是CHF的病理基础,心阳虚是CHF疾病发展的标志,且是CHF的必然归宿,与CHF的不良预后具有强相关性^[13]。张松等^[14]采用数据挖掘方法,对近10年知网等数据库中关于CHF的文献进行分析,发现CHF中医证候整体上以气虚血瘀为主,但随着病情进展,心功能逐渐恶化,则发展为以阳虚水泛为最。阳虚已被证实可以从多个途径影响CHF。如血流动力学方面,王恒和等^[15]研究发现,心阳虚证CHF患者常伴随更低的射血分数和心输出量,以及更高的心功能分级和N-末端脑钠肽前体(NT-proBNP)水平;神经内分泌方面,曹雪滨等^[16]研究表明,相比其他证型,心阳虚证CHF患者的血浆肾素、血管紧张素Ⅱ、醛固酮、降钙素基因相关肽等水平明显更高;心肌能量代谢方面,戎靖枫等^[17]证实通过改善CHF的阳虚状态,心肌的能量代谢可以得到不同程度的改善,其机制可能涉及调节脂质和糖代谢、保护线粒体、提高ATP酶活性及调节心肌能量代谢相关信号调控通路等^[18]。

本研究结果显示,相比假手术组,AAC组和AAC+CS组大鼠心室明显肥厚,表现为室腔增大、心室质量增加和心功能下降,且AAC+CS组大鼠的上述变化程度明显更显著,说明AAC结合CS方法构建CHF阳虚证大鼠动物模型的可行性。而假手术组、AAC组和AAC+CS组大鼠的阳虚证候积分依次增高,分别对应轻度、中度、重度心力衰竭标准,说明该阳虚证候积分评分标准的可靠性,同时也说明CHF的阳虚程度和心室肥厚程度、心功能水平具有明显的相关性。

3.2 “动则生阳”理论在CHF中的应用 CHF患者运动耐量下降,稍动即喘,故以往大多认为CHF患者应卧床休息以待病情好转,然非也。如前所述,CHF辨证多属本虚标实之证,且以阳气

亏虚为本,气滞、痰饮、瘀血为标。《灵枢·邪客》指出宗气由水谷精微与肺气所化,具有“以贯心脉,而行呼吸”的作用,对于辅心行血具有重要的意义。阳虚则喜静而恶动,“久卧耗气”“气行则血行,气虚则血滞”,长时间的静卧会导致阳衰瘀水的加重,而痰饮、瘀血的加重反过来又会损伤心之阳气,使病情难以康复。因此,久卧实非CHF良策,动之方为正解。“动则生阳”理论渊源最早可追溯至《黄帝内经》,《素问·阴阳应象大论》中指出“阴静阳躁,阳生阴长”,强调了阳气主动的观点。而朱丹溪在《格致余论》中明确提出:“太极动而生阳,静而生阴。阳动而变,阴静而合。”黄元御也在《素灵·微蕴》中提出:“静则阴生,动则阳化,阴生则降,阳化则升。”这对后世采用运动疗法治疗阳虚证CHF具有很高的指导价值。通过运动,加强脾胃的运化功能和推动血液运行,就可以生发阳气,正合民间“药补不如食补,食补不如动补”的奥义。然而运动也是有节度的,如《黄帝内经》所提倡的,做到“形劳而不倦”,即今时之有氧运动也。因此,有氧运动实际乃“扶阳”要药,可助阳气长。阳气充则脉道通利,全身气血运行通畅,濡养脏腑经络,进而发挥改善CHF的作用。这也正如《后汉书·华佗传》中所叙:“人体欲得劳动,但不当使极尔,动摇则谷气得消,血脉流通,病不得生,譬犹户枢,终不朽也。”

现代医学也并非一开始就认识到有氧运动对CHF的作用。20世纪70年代末CHF仍被列为运动康复的禁忌证,运动被普遍认为会加重CHF病情。随着对CHF病理生理基础研究的深入,医学家们才逐渐认识到运动对CHF的益处。在2013年美国心脏病学会基金会/美国心脏学会(ACCF/AHA)《心力衰竭管理指南》中^[19],运动康复首次被列为CHF治疗的IA类推荐,至此心脏康复正式成为CHF的标准治疗措施。随着心脏康复研究的不断进展,有氧运动等心脏康复手段被证明可以明显改善CHF患者的运动耐量和生活质量^[20],且可以降低CHF患者的再发病率、再入院率和死亡率^[21-22],明显改善CHF患者远期预后。而有氧运动作为心脏康复的最重要手段之一,无论在临床^[23]还是基础^[24]研究中,均显示出明显的拮抗心室重构和改善心功能的作用。至于有氧运动改善CHF的可

能机制,目前认识仍未非常清晰,但认为可能涉及改善血流动力学^[25]、增强骨骼肌肌力^[26]、改善心肌能量代谢^[27]、减少心肌细胞凋亡^[24,28]和调节自噬通量^[4,24]等。但有关结合中医角度针对有氧运动对阳虚证CHF作用的研究,目前还未见相关报道。

本研究结果显示,与Calm组比较,AE组包括AAC+AE组和AAC+CS+AE组大鼠的心肌肥厚程度明显减轻,表现为心室腔大小和心室质量降低,以及心功能明显改善,提示有氧运动具有降低CHF大鼠包括阳虚证CHF大鼠心室肥厚程度,改善心功能的作用;同时AE组大鼠的阳虚证候积分均明显下降,与AAC+Calm、AAC+CS+Calm组的中度、高度阳虚比较,AAC+AE组和AAC+CS+AE组大鼠的阳虚等级分别为轻度和中度,表明有氧运动可以明显纠正CHF大鼠的阳虚状态,发挥“动则生阳”的作用。

3.3 自噬在有氧运动改善CHF过程中的作用 自噬是普遍存在于真核细胞中的一种自我生存机制,可以通过溶酶体降解大分子细胞器及细胞质成分,以实现细胞本身的代谢需要及细胞器的更新,进而保持细胞内物质循环再利用和维持细胞稳态^[2]。自噬包括自噬泡形成、自噬体形成、自噬溶酶体形成和自噬体内容物降解4个阶段,可以通过检测各阶段特异性的分子标志物,包括ubiquitin/Beclin-1、LC3B、cathepsin D和p62的水平,以明确自噬各阶段的活化水平^[29]。其中,除p62是溶酶体酶的降解底物,其水平与自噬水平呈负相关外,其余分子标志物均与自噬各阶段的活化水平呈正相关。需要注意的是,如LC3B水平增加提示自噬体水平增加,但其原因可能是自噬体活化待降解物聚集,也可能是溶酶体形成步骤被阻断,自噬体无法清除,因此,某一阶段分子标志物水平的变化不能反映整体自噬水平的改变。细胞自噬是一个动态的过程,对细胞整体自噬水平的评估需要通过至少3个阶段的变化,即自噬通量的变化才能准确评估^[30]。本研究通过检测LC3B-II/LC3B-I和Beclin-1、p62蛋白的表达水平评估了各组大鼠体内的自噬水平。

自噬在维持心脏稳态中有着重要的作用,自噬已被证明与CHF的发生发展密切相关,自噬对CHF心室重构的作用表现为双重性^[31]。一方面,基础自噬是维持心肌细胞内环境稳定所必需的,自

噬表现为对CHF心室重构的有益作用。如Oyabu等^[32]研究发现,特异性敲减Atg5抑制自噬后,CHF小鼠心肌肥厚加重并出现心功能不全,而雷帕霉素处理激活自噬后小鼠无明显心肌肥厚和心功能不全。另一方面,过量的自噬活动可能加重心肌肥厚,表现为对CHF的有害作用。如Zhu等^[33]研究发现,压力负荷诱发的CHF小鼠心肌细胞的自噬水平明显增加,敲减Beclin-1降低自噬水平可以明显改善心室重构,过表达Beclin-1增强自噬后小鼠心室重构加重。因此,自噬的保护性或破坏性在不同的情况下有所不同。其中,手术模型、动物品系和遗传操作上的差异可能是导致这些变异的原因^[34],如主动脉弓缩窄术(TAC)、肺动脉高压、冷应激、慢性酒精摄入和机械应力诱导的自噬表现为对心肌肥厚的促进作用,而小檗碱、二甲双胍、多西环素和过氧化氢酶等诱导的自噬则可以拮抗心肌肥大。另外,自噬在心肌肥厚中的作用也可能取决于疾病的分期和严重程度。如李燕辉等^[35]通过TAC法构建CHF小鼠模型,于不同时间节点评估小鼠心功能和自噬相关蛋白表达水平,结果显示心肌代偿性肥厚阶段(3周内)小鼠自噬水平降低,而失代偿阶段(4周始)至心力衰竭阶段(第8周)自噬水平明显升高。本研究中AAC组和AAC+CS组大鼠的Beclin-1、LC3B-II/LC3B-I水平明显增加,p62水平明显降低,且AAC+CS组的上述变化程度更明显,说明CHF大鼠心室重构的进展以及心功能的下降可能为心肌细胞自噬增强所诱导,同时,阳虚证CHF大鼠有更严重的心室重构和心功能恶化,可能与其更活跃的自噬水平有关。

目前,有氧运动已被证实可以介导自噬参与多种心血管系统疾病的发生发展,但仅有少数报道介绍了有氧运动介导自噬参与CHF的过程。其中,潘月顺等^[11]使用冠状动脉左前降支(LAD)结扎法构建CHF大鼠模型,发现模型组大鼠心功能明显下降同时伴随较低的自噬水平,而中等强度负荷运动组大鼠心功能明显改善并伴随较高的自噬水平,提示有氧运动改善CHF的机制可能与自噬途径的激活有关。类似的,Campos等^[4]在LAD结扎致CHF大鼠模型中发现有氧运动可以诱导自噬减弱改善CHF,他们同时还发现有氧运动可以改善假手术组大鼠的线粒体功能和氧化能量,但是对

其自噬通量却没有明显影响,提示有氧运动对CHF大鼠自噬的调节可能不是固定的增强或者减弱,而是与个体自噬的基础水平密切相关,这也和已被大量研究证实的自噬对CHF的双向作用有相似之处。另外值得注意的是,在我们的研究中,自噬水平由高到低分别为Clam组、AE组和假手术组,提示有氧运动抑制了CHF介导的自噬激活,这与上述研究中有氧运动增强了CHF介导的自噬抑制的结果是相反的。分析其中原因可能包括以下2点:首先,如前所述,CHF造模方式、阶段以及CHF程度不同,对自噬水平及强弱变化的影响也不同,本研究采用AAC/AAC+CS法造模成功后表现为自噬增强,而上述研究采用LAD结扎法造模成功后表现为自噬减弱。其次,如上所述,有氧运动对自噬水平的调节可能是双向作用,取决于个体的基础自噬水平,LAD结扎法致CHF模型大鼠的自噬水平是不足的,有氧运动表现为诱导自噬,而本研究AAC/AAC+CS法致CHF模型大鼠的自噬水平是过度的,因此有氧运动表现为抑制自噬。

综上所述,本研究结果表明,AAC结合CS的造模方法是构建阳虚证CHF大鼠模型的可行方法,CHF大鼠的阳虚程度与其心室重构程度、心功能恶化程度密切相关,而有氧运动能有效纠正CHF大鼠的阳虚状态,并拮抗CHF导致的心室重构和心功能恶化,其机制可能与其调节心肌细胞自噬相关。值得注意的是,类似于自噬对CHF的双面性,有氧运动对CHF大鼠自噬水平的影响可能也表现为双向性,即自噬不足时有氧运动表现为增强自噬,自噬过度时有氧运动则表现为抑制自噬。

参考文献:

- [1] 胡盛寿,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告2018》概要[J].中国循环杂志,2019,34(3):209-220.
- [2] PARZYCH K R, KLIONSKY D J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation [J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(3): 460-473.
- [3] 中华医学会心血管病学分会心力衰竭学组,中国医师协会心力衰竭专业委员会,中华心血管病杂志编辑委员会.中国心力衰竭诊断和治疗指南2018[J].中华心血管病杂志,2018,46(10):760-789.
- [4] CAMPOS J C, QUELICONI B B, BOZI L H M, et al. Exercise reestablishes autophagic flux and mitochondrial quality control in heart failure[J]. Autophagy, 2017, 13(8): 1304-1317.
- [5] 韩栋,姚成增,蒋梅先.温补法在慢性心力衰竭现代中医治疗中的应用[J].河北中医药学报,2010,25(4):39-41.
- [6] 李海霞.论“扶阳”法则与心脏康复[J].中西医结合心脑血管病杂志,2017,15(8):1011-1014.
- [7] 谷韶科,王帅,李彬,等.心力衰竭不同中医证型动物模型的研究概述[J].中西医结合心脑血管病杂志,2020,18(5):766-769.
- [8] 徐攀,许海顺,陈京,等.慢性心力衰竭心阳虚证大鼠模型的建立与评价研究[J].中华中医药学刊,2016,34(8):1957-1960.
- [9] 杨喆,柴洪佳,王大伟.阳虚型慢性心力衰竭SD大鼠模型的制备及指标判定[J].中西医结合心脑血管病杂志,2016,14(14):1593-1596.
- [10] BEDFORD T G, TIPTON C M, WILSON N C, et al. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures [J]. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1979, 47(6): 1278-1283.
- [11] 潘月顺,仇琪.不同负荷运动训练对慢性心力衰竭大鼠心功能及自噬相关蛋白表达的影响[J].中国运动医学杂志,2020,39(2):133-137.
- [12] 伊璠.慢性心力衰竭的中医证治规律及临证经验数据挖掘研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2014.
- [13] 黄敏华,徐燕,姚成增,等.慢性心力衰竭心气虚、心阳虚、心肾阳虚3个不同病程阶段中医药干预临床研究[J].辽宁中医杂志,2014,41(6):1095-1098.
- [14] 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.
- [15] 王恒和,刘兴磊,程刚,等.慢性心力衰竭患者中医证型与超声心动图的相关性研究[J].天津中医药,2015,32(12):716-721.
- [16] 曹雪滨,胡元会,王士雯,等.充血性心力衰竭辨证分型与血管活性肽的关系[J].辽宁中医杂志,1999(10):441-443.
- [17] 戎靖枫,周华,郭蔚,等.益气温阳方对心力衰竭大鼠心脏血流动力学及心肌能量代谢的影响[J].上海中医药大学学报,2012,26(5):81-84.
- [18] 舒华,陈新宇.中药干预慢性心力衰竭心肌能量代谢治疗进展[J].中国老年学杂志,2017,37(3):742-745.
- [19] YANCY C W, JESSUP M, BOZKURT B, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines [J]. Circulation, 2013, 128(16): e240-e327.
- [20] WILLIAMS M A, POZEHL B. Reasonable expectations: how much aerobic capacity, muscle strength, and quality of life can improve with exercise training in heart failure [J]. Heart Fail Clin, 2015, 11(1): 37-57.
- [21] CHEN Y W, WANG C Y, LAI Y H, et al. Home-based cardiac rehabilitation improves quality of life, aerobic capacity, and readmission rates in patients with chronic heart failure [J].

- Medicine (Baltimore), 2018, 97(4): e9629.
- [22] DING R. Exercise based rehabilitation for heart failure: clinical evidence[J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 1000: 31-49.
- [23] TUCKER W J, BEAUDRY R I, LIANG Y, et al. Meta-analysis of exercise training on left ventricular ejection fraction in heart failure with reduced ejection fraction: a 10-year update [J]. Prog Cardiovasc Dis, 2019, 62(2): 163-171.
- [24] MORADI F, IMANI A R, FAGHIHI M. Effects of regular exercise plus food restriction on left ventricular pathological remodeling in heart failure-induced rats [J]. Bratisl Lek Listy, 2019, 120(4): 243-248.
- [25] TUCKER W J, LIJAUCO C C, HEARON C M J R, et al. Mechanisms of the improvement in peak VO₂ with exercise training in heart failure with reduced or preserved ejection fraction [J]. Heart Lung Circ, 2018, 27(1): 9-21.
- [26] JIA D, CAI M, XI Y, et al. Interval exercise training increases LIF expression and prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle atrophy in rats[J]. Life Sci, 2018, 193: 77-86.
- [27] WANG L, GAO K, WANG D. Exercise training has restorative potential on myocardial energy metabolism in rats with chronic heart failure[J]. Iran J Basic Med Sci, 2018, 21(8): 818-823.
- [28] SOUZA R W, FERNANDEZ G J, CUNHA J P, et al. Regulation of cardiac microRNAs induced by aerobic exercise training during heart failure [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015, 309(10): H1629-H1641.
- [29] 朱琪, 林芳. 自噬的分子标志物[J]. 药学报, 2016, 51(1): 33-38.
- [30] 崔龙彪, 圣娟娟, 王云英, 等. 腹主动脉缩窄20周大鼠心肌细胞的自噬通量[J]. 生理学报, 2013, 65(3): 301-308.
- [31] LI J, CAI Y. The dual effects of autophagy in myocardial hypertrophy[J]. Acta Cardiol, 2015, 70(4): 493-498.
- [32] OYABU J, YAMAGUCHI O, HIKOSO S, et al. Autophagy-mediated degradation is necessary for regression of cardiac hypertrophy during ventricular unloading [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 441(4): 787-792.
- [33] ZHU H, TANNOS P, JOHNSTONE J L, et al. Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress [J]. J Clin Invest, 2007, 117(7): 1782-1793.
- [34] LI L, XU J, HE L, et al. The role of autophagy in cardiac hypertrophy [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2016, 48(6): 491-500.
- [35] 李燕辉, 刘磊, 邹曼. 探讨心力衰竭不同阶段自噬水平变化[J]. 临床心血管病杂志, 2017, 33(4): 376-380.

【责任编辑: 侯丽颖】

《中药新药与临床药理》“临床研究”栏目2021年扩大征稿

为更全面地反映中医药学术研究成果, 打造高质量的中医药学术交流平台, 优化杂志学科内容结构及满足作者的需求, 本刊拟从2021年起加强对临床中药研究科研成果的报道。栏目论文基本要求:

1. 研究对象: 中药新药(各期临床研究)、新上市后的中药制剂、医院中药制剂及已有一定研究基础的中药汤剂等。

2. 研究类型: 临床随机对照试验。

投稿网站: www.zyxy.com.cn。本刊只接受稿件采编系统投稿, 不接收纸质和Email投稿, 系统投稿不收审稿费。

入选核心期刊情况: 本刊为中国中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库来源期刊(CSCD)及RCCSE中国核心学术期刊。

·《中药新药与临床药理》编辑部·

2020年12月