

中药干预心肌线粒体内膜能量代谢障碍的疗效:基于动物模型的系统评价

耿彦婷 胡元会 师帅 贾秋蕾

【摘要】 **目的** 系统评价中药对动物心肌线粒体内膜能量代谢障碍的干预疗效。**方法** 计算机检索 PubMed(1966~2015.7)、Embase(1966~2015.7)、CBM(1978~2015.7)、CNKI(1915~2015.7)、VIP(1989~2015.7)及 Wanfang(1990~2015.7)等数据库,纳入中药干预心肌线粒体内膜能量代谢障碍的动物实验,由 2 名研究者独立评价纳入研究的质量、提取数据并交叉核对,使用 RevMan 5.2 软件进行 Meta 分析。**结果** 共纳入 16 个研究,系统评价及 Meta 分析结果显示:中药可提高线粒体态 3 呼吸速率[$P<0.001, I^2=0\%$],增加内膜 C I[$P<0.0001, I^2=0\%$]、C II[$P=0.006, I^2=0\%$]、C IV[$P<0.00001, I^2=0\%$]、Cyt c[$P<0.0001, I^2=40\%$]活性。**结论** 中药可通过干预心肌线粒体内膜能量代谢障碍发挥临床疗效,但基于此病理生理机制的中医药研究尚缺乏系统性。

【关键词】 中药; 心肌线粒体; 内膜; 能量代谢障碍; 动物模型; 系统评价

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.05.030

Efficacy of Chinese herbal medicines in treating myocardial mitochondrial inner membrane energy metabolism disorders: a systematic review based on animal models GENG Yan-ting, HU Yuan-hui, SHI Shuai, et al. Cardiovascular Department, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

Corresponding author: HU Yuan-hui, E-mail: huiyuhui55@sohu.com

【Abstract】 **Objective** To assess the efficacy of Chinese herbal medicines for myocardial mitochondrial inner membrane energy metabolism disorders based on animal models. **Methods** We searched PubMed(1966~2015.7), Embase(1966~2015.7), CBM(1966~2015.7), CNKI(1915~2015.7), VIP(1989~2015.7) and Wanfang(1989~2015.7) databases. All researches based on animal models of treating myocardial mitochondrial inner membrane energy metabolism disorders with Chinese herbal medicines versus untreated groups were included. Data were extracted independently by two reviewers. Meta-analyses were conducted by the RevMan 5.2 software. **Results** Sixteen researches were included. The Meta-analysis results showed that: Chinese herbal medicines could elevate the State 3 respiratory rate of myocardial mitochondria[$P<0.001, I^2=0\%$], and up-regulated the activity of ETC CI[$P<0.0001, I^2=0\%$], CII[$P=0.006, I^2=0\%$], CIV[$P<0.00001, I^2=0\%$] and Cyt c[$P<0.0001, I^2=40\%$]. **Conclusion** Chinese herbal medicines may be clinically effective in treating myocardial mitochondrial inner membrane energy metabolism disorders, while the related researches based on this physiopathological mechanism are still lacking systematicness.

【Key words】 Chinese herbal medicines; Myocardial mitochondria; Mitochondrial inner membrane; Energy metabolism disorders; Animal models; Systematic review

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81373833)

作者单位:100053 北京,中国中医科学院广安门医院心血管科[耿彦婷(博士研究生)、胡元会、师帅];北京中医药大学基础医学院(贾秋蕾)

作者简介:耿彦婷(1988-),女,2013 级在读博士研究生。研究方向:中医内科学。E-mail: qiedexfsh@163.com

通讯作者:胡元会(1963-),博士,主任医师。研究方向:中医治疗心血管疾病。E-mail: huiyuhui55@sohu.com

线粒体作为心肌的能量转换站,在维持心肌舒缩功能方面发挥重要作用,其中,线粒体内膜是线粒体能量代谢的主要场所。线粒体疾病动物模型,如腺苷酸转移酶 1 (adenine nucleotide translocase 1, ANT1) 基因缺陷小鼠已经证实,线粒体能量合成障碍可引发多种疾病的不同临床表现^[1],但引发复杂症候表现的病理生理机制仍未完全阐明。

线粒体损伤及功能障碍在疾病发生发展中的病理生理作用日渐成为药理学及临床研究的关注热点,目前已存在包括辅酶 Q10 等以改善线粒体能量代谢障碍为主要治疗作用的临床药物,但由于靶向单一,且受限于线粒体跨膜转运所致药物活性成分的聚集障碍等因素,导致此类药物的临床应用尚未得到广泛的重视。在此方面,中药多位点、综合调控的网络药理学优势得以突显,使中药在以线粒体为靶向的内膜能量代谢障碍的疾病治疗中具有广阔的应用前景。

目前已有大量中药干预动物模型心肌线粒体能量代谢障碍的实验研究,但尚缺乏对此方面的研究成果予以系统评价,证据说服力不强。鉴于此,本文对此方面实验研究进行系统综述,以梳理评价中药干预心肌线粒体内膜能量代谢障碍已取得的研究成果,为存在此病理机制的疾病治疗提供确切的临床前研究相关证据,并期为进一步的相关机制研究探索深入靶向。

1 资料与方法

1.1 检索策略与排除标准

1.1.1 检索策略 检索的数据库包括中国生物医学文献数据库 (CBM, 1978 ~ 2015. 7)、中国期刊全文数据库 (CNKI, 1915 ~ 2015. 7)、中国科技期刊全文数据库 (VIP, 1989 ~ 2015. 7)、万方数据库 (Wanfang database, 1990 ~ 2015. 7)、PubMed (1966 ~ 2015. 7)、Embase (1986 ~ 2015. 7)。检索词为:线粒体、心肌、中药、中医、中医药、动物、“mitochondria, heart”“myocardial mitochondria”“mitochondria, myocardial”“chondriosome”“Chinese medicinal herbs”“Chinese materia medica”“herbs”“animals”。

1.1.2 排除标准 (1) 临床研究及综述类文献;(2) 细胞及其他体外研究;(3) 线粒体损伤不是主要研究点;(4) 除线粒体形态学观察,非以心肌线粒体为检测标本的间接性研究;(5) 研究数据不完整、统

计学错误及干预措施非中药治疗(包括针灸及其他传统中医疗法);(6) 重复和相似研究。

1.2 质量评价与资料提取

根据 ARRIVE^[2] 文献评价标准评价纳入研究的方法学质量,由 2 位研究者各自独立阅读文献,并单独进行质量评价,遇有不一致的评价结果时需由 2 人讨论解决,意见一致后通过,不一致时需由第三人参与讨论解决以达成一致结果。结合文献特点,以 Excel 制订出统一的文献信息提取表,由 2 名系统评价员提取信息,主要包括动物种属、模型特征、干预措施、疗效判定指标、研究结果等共 17 个大项 25 个小项,并进行交叉核对。

1.3 亚组分析

根据中药干预起于模型制备前或造模成功后,将纳入研究按中医理论“治未病”“治已病”进行亚组分析。

1.4 统计学处理

采用 RevMan 5.2 软件进行统计分析。计算效应量时,二分类变量采用相对危险度 (relative risk, RR) 及 95% CI,连续型变量选用权重均数差 (WMD) 及标准均数差 (SMD)。采用 χ^2 检验对各研究结果进行异质性检验,当 $P \geq 0.10$, $I^2 \leq 50\%$ 时,采用固定效应模型进行 Meta 分析;反之,则采用随机效应模型进行 Meta 分析。若数据无法合并则采用描述性分析。倒漏斗图用于判断是否存在发表偏倚。

2 结果

2.1 纳入研究的基本特征

检索到中文文献 384 篇、英文文献 28 篇,共 412 篇。剔除 90 篇,阅读文题及摘要剔除临床研究、综述、细胞研究及其他体外研究文献共 165 篇,参考排除标准详细阅读全文,剔除非内膜线粒体能量代谢障碍研究、检测标本不明确、标本制备方法缺陷、数据不完整、重复发表的文献共 141 篇,最终纳入文献 16 篇,所有实验均在中国进行,除 4 篇^[7,10-11,18] 发表语言为英文外,余 12 篇均以中文形式发表。其中,2 篇^[4,9] 文献因效应量无法合并,未纳入 Meta 分析定量研究。

纳入研究中,于模型制备前给药研究 5 篇^[3-7],造模成功后给药研究 12 篇^[3,8-18]。16 篇纳入研究中,3 篇报道了心肌线粒体呼吸功能^[6,12-13];11 篇报道了心肌线粒体内膜电子传递功能^[3,5,7-8,10-11,14-18];2

篇报道了心肌线粒体膜电位^[4,9];0 篇文献报道了线粒体 ATP 合成酶活性。纳入研究的基本特征见表 1。

2.2 纳入研究的质量评价

所有实验均为随机对照实验。0 篇文献描述了基线数据;仅有 1 篇文献^[8]描述了应用 Excel 随机数字表法进行随机分组;1 篇文献^[11]报道了不良反应与不良事件,但未说明原因;2 篇文献^[7,10]报道了伦理学声明。所有纳入文献均描述了摘要、背景、目的、实验方法、实验动物、样本量、动物分组方法、实验结果、统计学方法、干预措施。纳入文献中,43.75% 的文献报道了动物饲养条件^[4,8,10,12,14-15,17];31.25% 的文献报道了经费来源^[7,10-11,13,16]。

2.3 疗效评价

2.3.1 心肌线粒体呼吸功能 3 篇文献报道了心

肌线粒体呼吸功能^[6,12-13],其中 2 篇^[6,13]报道了线粒体态 3 呼吸、态 4 呼吸的变化,异质性检验提示各研究结果间均不存在异质性 ($P = 0.82, I^2 = 0\%$; $P = 0.69, I^2 = 0\%$),采用固定效应模型进行 Meta 分析,结果提示两组间态 3 呼吸差异有统计学意义 [$MD = 0.96, 95\% CI (0.40, 1.52), P < 0.001$],态 4 呼吸组间差异无统计学意义 [$MD = -0.62, 95\% CI (-3.15, 1.91), P = 0.63$]。3 篇^[6,12-13]文献均报道了中药干预心肌线粒体呼吸控制率 (respiratory control rate, RCR) 的疗效,异质性检验提示各研究结果间存在显著异质性 ($P < 0.00001, I^2 = 92\%$),采用随机效应模型进行 Meta 分析,结果示两组间差异无统计学意义 [$MD = 0.52, 95\% CI (-0.06, 1.1), P = 0.08$],说明中药可在一定程度内改善模型动物心肌线粒体的呼吸功能。见图 1~3。

表 1 纳入研究基本情况

纳入研究	样本数 (中药/模型)	模型特征	治未病 (pre) 或治已病 (not)	结局指标
朱玉真 2001 ^[3]	20/10	wistar 大鼠,雌雄各半(250±20)g	pre and not	(2)
张晓丹 2009 ^[4]	24/8	Wistar 大鼠,雌雄各半(180±20)g	pre	(3)
万福生 2001 ^[5]	10/10	雄性 Wistar 大鼠(215~265)g	pre	(2)
韩玲 2001 ^[6]	14/7	雄性 Wistar 大鼠(250~280)g	pre	(1)
Zhao, HW 2008 ^[7]	6/6	雄性 SD 大鼠(200~240)g	pre	(2)
王巍伟 2008 ^[8]	15/15	雄性 SD 大鼠(225±25)g	not	(2)
田影 2012 ^[9]	10/10	雄性 SD 大鼠(200~251)g	not	(3)
Wu, Z. J. 2014 ^[10]	7/6	雄性 SD 大鼠	not	(2)
刘友章 2006 ^[11]	10/20	SD 大鼠,雌雄不拘(180±20)g	not	(2)
江荣林 2011 ^[12]	20/20	雄性 SD 大鼠(200~250)g	not	(1)
陈良恩 2013 ^[13]	36/12	雄性 SD 大鼠(200±25)g	not	(1)
刘涛 2004 ^[14]	7/7	SD 大鼠,雌雄各半(500±30)g	not	(2)
尹德辉 2004 ^[15]	7/7	SD 大鼠,雌雄各半(500±30)g	not	(2)
辛益妹 2013 ^[16]	36/12	雄性 SD 大鼠(200±25)g	not	(2)
鞠秀丽 2007 ^[17]	30/10	Wistar 大鼠,雌雄各半(180~220)g	not	(2)
欧芹 2007 ^[18]	11/11	昆明种小白鼠,雌雄各半(20±2)g	not	(2)

注: (1)呼吸功能;(2)电子传递功能;(3)膜电位。

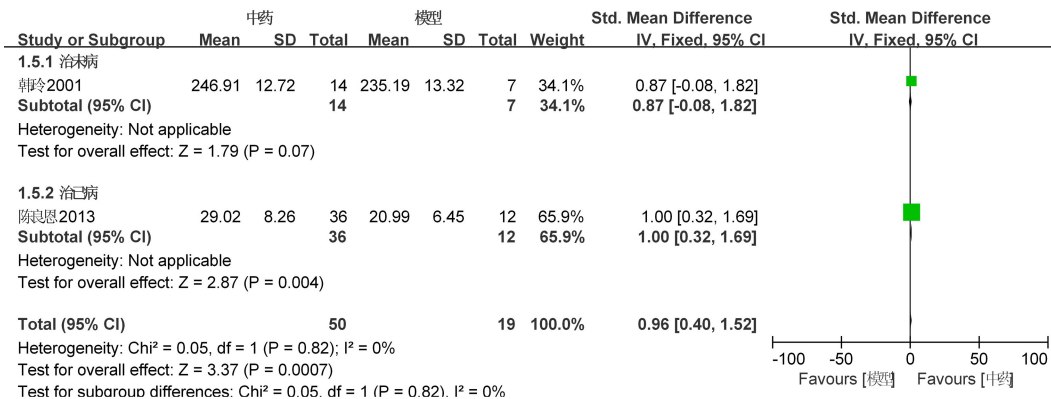


图 1 两组心肌线粒体态 3 呼吸比较的 Meta 分析

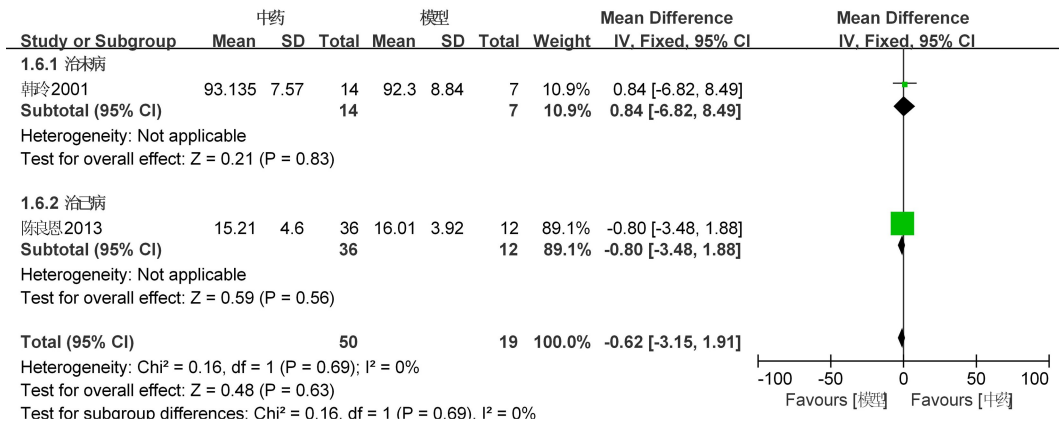


图 2 两组心肌线粒体态 4 呼吸比较的 Meta 分析

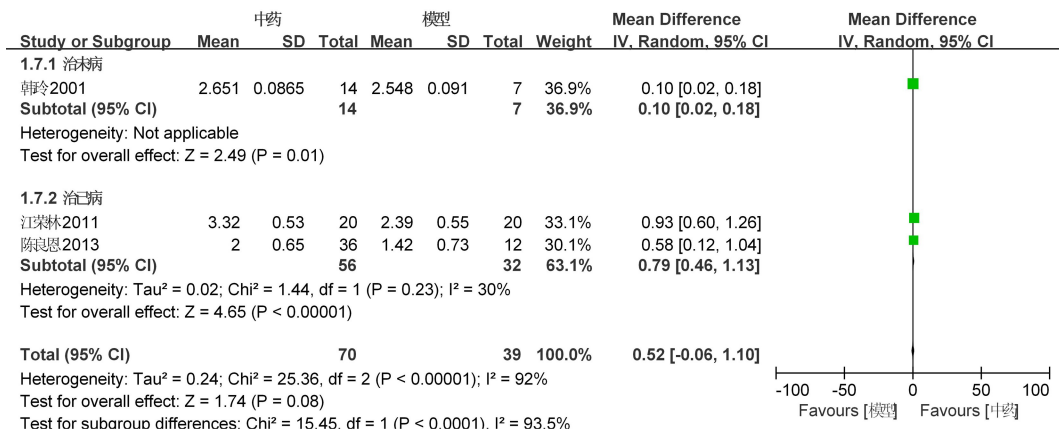


图 3 两组心肌线粒体 RCR 比较的 Meta 分析

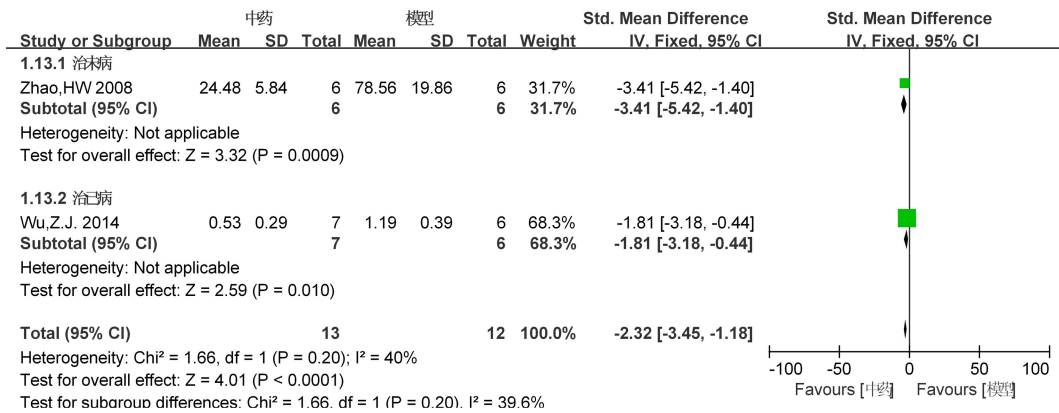


图 4 两组心肌线粒体 Cyt c(2) 比较的 Meta 分析

2.3.2 心肌线粒体内膜电子传递功能 11 篇文献报道了心肌线粒体内膜电子传递功能^[3,5,7-8,10-11,14-18],其中,5 篇文献报道了电子传递链 (electron transport chain,ETC) 复合体 I (complex I, C I) 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶 (NADH dehydrogenase) 的疗效^[8,14-16,18];3 篇文献报道了电子传递链复合体 II (complex II,C II) 琥珀酸脱氢酶

(succinate dehydrogenase, SDH) 及复合体 III (complex III,C III) 的疗效^[8,16,18];7 篇文献报道了电子传递链复合体 IV (complex IV,C IV) 细胞色素 C 氧化酶 (cytochrome c oxidase, COX) 的疗效^[3,5,8,11,14-16];5 篇文献报道了细胞色素 c (cytochrome c, Cyt c) 的疗效,因效应量表示方法差异^[3,5,7,10,17],3 篇文献以 nmol 每毫克线粒体蛋白

[nmol/(mg · mt · pro)] 表示线粒体内 Cyt c 含量^[3,5,17]; 2 篇^[7,10]文献以胞浆 Cyt c 与线粒体 Cyt c 的比值间接评价线粒体内 Cyt c 水平变化,因此分别命名为 Cyt c(1)与 Cyt c(2)予以评价。异质性检验结果分别为 CI ($P < 0.01, I^2 = 76%$)、CII ($P < 0.0001, I^2 = 93%$)、CIII ($P < 0.01, I^2 = 79%$)、CIV ($P < 0.0001, I^2 = 90%$)、Cyt c(1) ($P < 0.0001, I^2 = 94%$)、Cyt c(2) ($P = 0.20, I^2 = 40%$),提示 Cyt c(2)的各研究结果间不存在异质性,采用固定效应模型进行 Meta 分析(见图 4),余各研究结果间均存在显著异质性,采用随机效应模型进行 Meta 分析。结果分别提示 CI、CII、CIV、Cyt c(1)、Cyt c(2)的两组间差异均有统计学意义 [$MD = 1.9, 95\% CI (0.92, 2.89), P < 0.001$; $MD = 4.95, 95\% CI (0.61, 9.28), P < 0.05$; $MD = 3.79, 95\% CI (2.38, 5.21), P < 0.00001$; $MD = 0.15, 95\% CI (0.05, 0.25), P < 0.01$; $MD = -2.32, 95\% CI (-3.45, -1.18), P < 0.0001$]; CIII 的两组间差异无统计学意义 [$MD = 1.23, 95\% CI (-0.16, 2.61), P = 0.08$],提示中药可增加心肌线粒体内膜 C I、C II、C IV、Cyt c 的活性。

2.3.3 线粒体 ATP 合成酶活性 纳入研究中,未

见中药干预模型动物心肌线粒体内膜 ATP 合成酶活性的相关报道。

2.3.4 线粒体膜电位 2 篇文献报道了心肌线粒体膜电位(membrane potential, MMP)变化^[4,9]。因两篇文献效应量采用的结果表示方法不同,且未获得相关原始数据,未纳入定量研究行 Meta 分析。1 篇文献以心肌线粒体膜电位检测荧光强度描述实验结果^[4](模型组 MMP: 125.7 ± 32.806 ; 中药组 MMP: $126.41 \pm 26.26, P < 0.05$), 1 篇文献以心肌线粒体膜电位没有降低的百分率(%)表示实验结果^[9](模型组: 45.59 ± 2.97 ; 中药组: $66.61 \pm 3.99, P < 0.05$),上述结果均表明中药可恢复模型动物心肌线粒体膜电位的异常降低。

2.3.5 敏感性分析 将应用相同动物种属、动物体重相当、给药途径及时间相同的研究纳入敏感性分析^[8,14-16]。结果显示,与模型组比较,中药可上调线粒体内膜 CI、CIII、CIV 的活性 [$MD = 1.04, 95\% CI (0.52, 1.56), P < 0.0001, I^2 = 0\%$; $MD = 0.70, 95\% CI (0.20, 1.19), P = 0.006, I^2 = 0\%$; $MD = 5.04, 95\% CI (3.94, 6.14), P < 0.00001, I^2 = 0\%$]。见图 5~7。

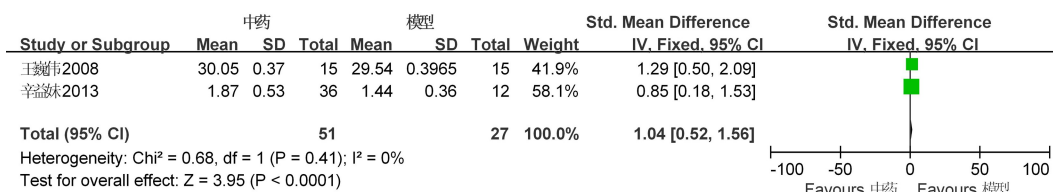


图 5 两组心肌线粒体 ETC CI 比较的敏感性分析

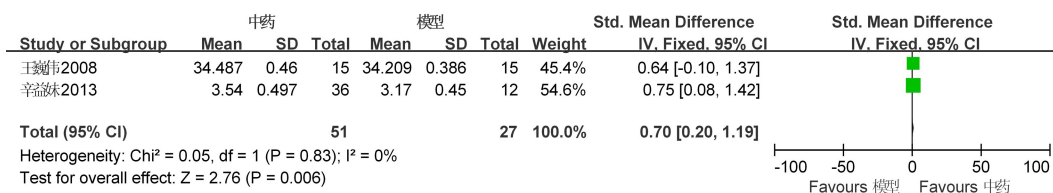


图 6 两组心肌线粒体 ETC CIII 比较的敏感性分析

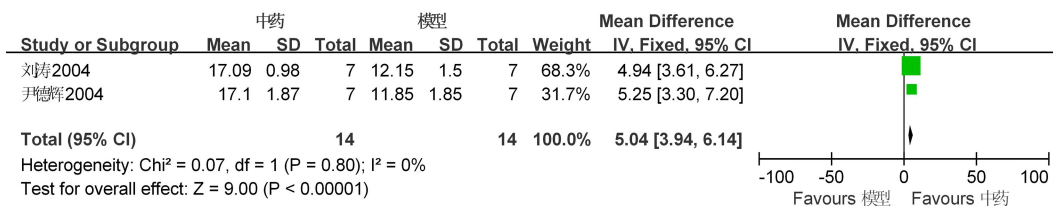


图 7 两组心肌线粒体 ETC CIV 比较的敏感性分析

2.3.6 发表偏倚 根据 6 篇文章^[3,8,11,14-16]评价电子传递链 CIV 变化的文献制作漏斗图。分别以纳入文献的 SMD 值为横坐标,以 SE(SMD)为纵坐标绘制倒漏斗图。漏斗图基本对称,提示纳入文献的发表偏倚不大,见图 8。

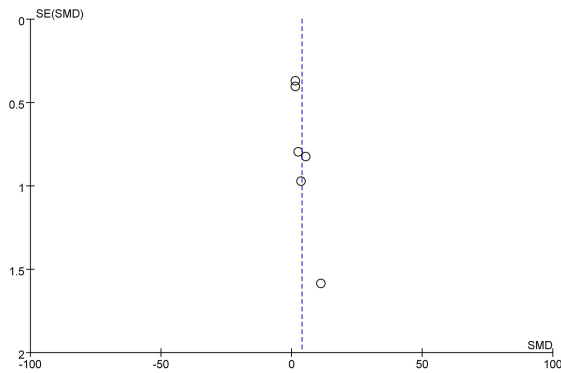


图 8 漏斗图

3 讨论

丙酮酸、脂肪酸等有机酸氧化产生的氢原子,经线粒体内膜电子传递链复合体 I-IV、辅酶 Q10、Cyt c 的氧化递传,与原子氧结合生成水。电子传递过程中释放的势能驱动质子由线粒体基质侧泵出线粒体内膜,形成外+(酸)内-(碱)的电化学梯度。质子经 ATP 合成酶膜组分 FO 中的质子通道顺电化学梯度流回至线粒体基质,质子流驱动 ADP 及 Pi 合成 ATP,ATP 与胞质内消耗的 ADP 经 ANT 进行交换,通过这种方式,ETC 介导的氧消耗与 ADP 磷酸化经 ATP 合成酶在电化学梯度驱动下完成偶联。

本研究对纳入文献进行定性及定量分析,结果显示中药可通过改善模型动物心肌线粒体呼吸功能、增加内膜 C I、C II、C III、C IV 及 Cyt c 活性、上调模型动物病理性降低的心肌线粒体膜电位等内膜能量代谢的关键环节,改善线粒体能量合成。但本研究中无心肌线粒体内膜 ATP 合成酶活性的相关文献纳入,考虑由研究的质量较低、研究结果报告的规范性较差等因素导致无高质量、具可引证性的文献予以系统评价。且本研究发现,当前针对心肌线粒体内膜能量代谢障碍的整体动物研究仍仅仅停留于线粒体自身结构与功能损伤的层面,缺乏与内质网等其他细胞器的关联性研究及对细胞、组织、器官及动物死亡率等终点性结局评价指标的观察,导致现阶段研究仍存在研究层次单薄、靶向重复、缺乏系统性等不足。

由于本研究仅检索了已发表文献,可能存在漏

检。此外,各研究在设计上未清楚交代是否采用盲法和分配隐藏,且研究模型制备方法、中药制剂形式、给药途径、干预周期等差异将可能影响结果的可靠性,亟待大量可靠的系统性研究结果进一步提供中药干预模型动物心肌线粒体内膜能量代谢障碍的疗效证据。

参 考 文 献

- [1] Wallace DC. Mitochondrial Diseases in Man and Mouse [J]. Science, 283(5407):1482-1488.
- [2] Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research [J]. PLoS Biol, 2010, 8(6): e1000412.
- [3] 朱玉真. 扶正解毒汤防治镍对心肌线粒体酶活性的影响 [J]. 卫生毒理学杂志, 2001, 15(1): 35-36.
- [4] 张晓丹, 张婷娜, 渠永清, 等. 蒺藜提取物对 ADR 所致大鼠心肌线粒体损伤的保护作用 [J]. 中成药, 2009, 31(2): 198-202.
- [5] 万福生, 刘波, 赵小曼, 等. 川芎嗪对缺血再灌注损伤心肌重要呼吸酶的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17(1): 58-60.
- [6] 韩玲, 陈可冀. 益心康胶囊对大鼠心肌线粒体结构及功能损伤的保护作用 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26(11): 773-777.
- [7] Zhao H, Qin F, Liu Y, et al. Antiapoptotic mechanisms of Chinese medicine formula, Guan-Xin-Er-Hao, in the rat ischemic heart [J]. The Tohoku Journal of Experimental Medicine, 2008, 216(4): 309-316.
- [8] 王巍巍. 卡托普利、心复康口服液对慢性心衰大鼠心肌线粒体呼吸酶复合物活性的影响 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2008.
- [9] 田影, 尤胜义, 李楠, 等. 参芪扶正注射液对重症急性胰腺炎大鼠心肌保护的作用 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2012, (6): 577-580.
- [10] Wu ZJ, Yu J, Fang QJ, et al. Sodium ferulate protects against daunorubicin-induced cardiotoxicity by inhibition of mitochondrial apoptosis in juvenile rats [J]. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2014, 63(4): 360-368.
- [11] 刘友章, 王昌俊, 周俊亮, 等. 四君子汤修复脾虚大鼠线粒体细胞色素氧化酶的作用及机制 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(35): 118-122.
- [12] 江荣林, 雷澍, 蔡莉娟, 等. 参附注射液对脓毒症大鼠心肌氧化应激和线粒体呼吸功能的影响 [C] // 中国中西医结合学会第 2 届全国中西医结合重症医学大会论文集. 南京, 2011: 173-178.
- [13] 陈良恩, 吴峰, 辛益妹, 等. 复方中药天芪航力片对高+Gz 应激大鼠心肌线粒体功能的影响 [J]. 解放军医学杂志, 2013(11): 935-939.
- [14] 刘涛. 脾气虚证衰老大鼠心肌组织线粒体呼吸链酶复合物活性和线粒体 DNA 缺失的实验研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医学院, 2004.
- [15] 尹德辉. 脾阴虚证衰老大鼠心肌、脑组织 mtDNA 缺失及滋补脾阴方药调节机制的实验研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医学院, 2004.
- [16] 辛益妹, 陈良恩, 吴峰, 等. 复方红景天制剂对大鼠+10Gz 暴露后心肌线粒体 ATP 酶和呼吸链复合物活性的影响 [J]. 华南

- 国防医学杂志,2013,(5):291-293,304.
- [17] 鞠秀丽. 车前子多糖对衰老模型大鼠心肌线粒体氧化损伤影响的实验研究[D]. 佳木斯:佳木斯大学,2007.
- [18] Ou Q, Wei XD, Wang D, et al. Protective effect of Portulaca water extract on the myocardial mitochondria of aging model mice induced by D-galactose [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2007, 11(8):1570-1572.

(收稿日期: 2015-08-24)

(本文编辑: 董历华)