

·实验研究·

本文引用: 肖清玄, 郭志华, 罗佳敏, 陈宇霞, 张书萌, 于子璇, 陈伶俐, 李杰. 基于 TGF- β /Smads 信号通路探究养心通脉方调控慢性心力衰竭血瘀证大鼠的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(8): 1353-1360.

基于 TGF- β /Smads 信号通路探究养心通脉方调控慢性心力衰竭血瘀证大鼠的作用机制

肖清玄, 郭志华, 罗佳敏, 陈宇霞, 张书萌, 于子璇, 陈伶俐, 李杰*
湖南中医药大学, 湖南长沙 410208

[摘要] 目的 基于转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)/Smads 信号通路探讨养心通脉方对慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)血瘀证大鼠心肌纤维化和炎症损伤的影响。方法 通过随机数字表法将 45 只 SD 雄性大鼠分为造模组(27 只)、正常组(12 只)和假手术组(6 只),适应性喂养 1 周后行冠脉结扎术造模,术后 10 min 行心电图检测,6 周后检测超声心动图、血清 N 端前脑钠肽(N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-pro BNP)含量和血液流变学相关指标。成模后,运用随机数字表法从造模组中取 18 只大鼠均分为中药组、西医组和模型组,中药组予养心通脉方溶液 12 g/kg 灌胃,西药组予以缬沙坦溶液 0.8 g/kg 灌胃,正常组、假手术组和模型组予等量蒸馏水,每日 1 次,持续 4 周。药物干预结束后,超声心动图检测心功能指标,HE 染色和 Masson 染色观察大鼠心肌组织病理改变及纤维化程度,ELISA 法检测大鼠血清 NT-pro BNP 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)含量,Western blot 法检测大鼠心肌组织 TGF- β /Smads 信号通路相关蛋白表达。结果 与正常组比较,造模组大鼠心电图出现明显的 ST 段上抬,大鼠血清 NT-pro BNP 含量显著升高($P < 0.01$),左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)水平显著下降($P < 0.01$),全血高切黏度、中切黏度、低切黏度显著升高($P < 0.01$)。药物干预 4 周后,与正常组比较,模型组 LVEF 明显降低($P < 0.01$),血清 NT-Pro BNP、TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 水平上升($P < 0.01$),IL-10 水平明显下降($P < 0.01$),心肌组织 ANGPT2、TGF- β 1、Smad 2、Smad 3 蛋白表达明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,中药组、西药组 LVEF 水平上升($P < 0.01$),血清 NT-pro BNP 和 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平降低($P < 0.01$),IL-10 含量增多($P < 0.01$),心肌组织 TGF- β 1、Smad2、Smad3 蛋白表达减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 冠脉结扎术可成功制备 CHF 血瘀证大鼠模型,养心通脉方可能通过抑制 CHF 血瘀证模型大鼠 TGF- β /Smads 信号通路,调控机体炎症损伤和纤维化机制。

[关键词] TGF- β /Smads 信号通路;慢性心力衰竭;血瘀证;养心通脉方;炎症损伤;心肌纤维化

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.08.003

Exploring the mechanism of action for Yangxin Tongmai Formula in regulating rats with chronic heart failure of blood stasis pattern based on TGF- β /Smads signaling pathway

XIAO Qingxuan, GUO Zhihua, LUO Jiamin, CHEN Yuxia, ZHANG Shumeng, YU Zixuan, CHEN Lingli, LI Jie*

Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[收稿日期] 2023-05-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81874375);湖南省自然科学基金项目(2020JJ4464);湖南省中医药科研计划重点项目(2021024);湖南中医药大学研究生创新课题(2022CX57)。

[第一作者] 肖清玄,女,硕士研究生,研究方向:心血管病证候本质研究。

[通信作者] * 李杰,男,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:317768870@qq.com。

[Abstract] **Objective** To observe the effects of Yangxin Tongmai Formula (YXTMF) on myocardial fibrosis and inflammatory injury in rats with chronic heart failure (CHF) of blood stasis pattern based on the transforming growth factor- β (TGF- β)/Smads signaling pathway. **Methods** A total of 45 male SD rats were divided into modeling group ($n=27$), normal group ($n=12$) and sham group ($n=6$) by random number table method. Coronary ligation modeling was performed after 1 week of adaptive feeding. Electrocardiography was performed 10 mins after surgery. Echocardiography, serum N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-pro BNP) content, and hemorheological indicators were checked 6 weeks later. After modeling, 18 rats taken from the modeling group by random number table method were randomly subdivided into Chinese medicine group (with YXTMF solution gavage, 12 g/kg), western medicine group (with valsartan solution gavage, 0.8 g/kg) and model group. The normal group, sham group, and model group were given equal amount of distilled water. All groups had been provided with corresponding drugs or distilled water once daily for 4 weeks. After 4 weeks of drug intervention, echocardiography was used to examine the cardiac function indicators; HE staining and Masson staining were used to observe the pathological changes and fibrosis degree of rat myocardial tissue; ELISA method was used to test the levels of serum NT-pro BNP, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-10 (IL-10) in rats; Western blot method was used to check the TGF- β /Smads signaling pathway-related protein expressions in rat myocardial tissue. **Results** Compared with normal group, rats in model group showed significant ST-segment elevation in electrocardiogram, significantly increased serum NT-pro BNP content ($P<0.01$), significantly decreased left ventricular ejection fraction (LVEF) level ($P<0.01$), and significantly increased whole blood viscosity at high, medium, and low shear rate ($P<0.01$). After 4 weeks of drug intervention, compared with normal group, the rats in model group showed significantly decreased LVEF level ($P<0.01$), increased serum NT-pro BNP, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 levels ($P<0.01$), significantly decreased IL-10 level ($P<0.01$), and significantly increased protein expressions of ANGPT2, TGF- β 1, Smad2, and Smad3 in myocardial tissue ($P<0.01$). Compared with model group, Chinese medicine and western medicine groups had increased LVEF level ($P<0.01$), decreased levels of serum NT-pro BNP, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 ($P<0.01$), increased IL-10 content ($P<0.01$), and decreased protein expressions of TGF- β 1, Smad2 and Smad3 in myocardial tissue ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Coronary ligation can successfully prepare CHF rats of blood stasis pattern, and YXTMF may regulate the mechanism of inflammatory injury and fibrosis by inhibiting the TGF- β /Smads signaling pathway of model rats with CHF of blood stasis pattern.

[Keywords] TGF- β /Smads signaling pathway; chronic heart failure; blood stasis pattern; Yangxin Tongmai Formula; inflammatory injury; myocardial fibrosis

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是一种发病率高、病程漫长、致死率高的疾病,临床上难以治愈^[1-2]。当心脏发生结构病变或功能障碍时,若病程进展未得到及时有效防治,最终可演变成心力衰竭^[3-4]。现代研究表明,CHF的发病机制主要与心肌纤维化引起的心室重构、炎症损伤及氧化应激反应、心肌能量代谢异常、肠道菌群失调等相关^[5-7]。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)/Smads 信号通路是目前研究较多的纤维化相关通路,TGF- β 在以炎症和纤维化为特征的各种疾病的诊断和治疗中起关键作用^[8],TGF- β /Smads 信号通路在心血管疾病中扮演着重要角色,对心血管疾病有着重大影响^[9]。

CHF属于中医学“心痹”“心水”“心悸”“心胀”“喘证”等范畴^[10],后续病程主要表现为虚实夹杂之象,气虚与血瘀贯穿疾病始终,血瘀是中心病理环节。

临床研究证实,血瘀证是CHF主要的证型之一^[11]。故中医治疗CHF主要以补养心气、和通血脉为原则,以补气药、活血药为基础,从根本上祛除病根。养心通脉方由袁肇凯教授在名医秦伯未先生创制的治疗胸痹有效名方^[12]基础上精简提炼而成,现方由人参、丹参、桂枝、枳实、泽泻组成,能益气活血化瘀,诸药相伍共同发挥养心通脉的作用。临床上将养心通脉方用于治疗CHF取得了良好的治疗效果,在西医常规药物治疗的基础上加用养心通脉方,患者的血清N端前脑钠肽(N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-pro BNP)含量更低,中医证候疗效积分更高,心功能恢复比仅用西药治疗理想,患者生活质量明显提高^[13-14]。实验研究发现,养心通脉方可缓解肠道机械屏障功能障碍、调节肠道菌群、防止炎症细胞因子过度表达、抑制心室重构、改善心功能等^[15-17]。故本课题基于TGF- β /Smads信号通路探究

养心通脉方调控 CHF 血瘀证的作用机制, 以期为临床 CHF 的中医药防治与规范用药提供充足的实验依据和有力支撑。

1 材料

1.1 实验动物

从湖南安生美药物研究院实验动物有限公司购入 45 只 SD 雄性大鼠, 许可证号为 SYXK(湘)2019-0004, 动物合格证号为 430727221100257174, 体质量(200±10) g, 饲养于湖南中医药大学实验动物中心, 整体实验方案经由湖南中医药大学实验动物伦理委员会审批通过, 伦理编号为 LLBH-202110250001。

1.2 药物

养心通脉方(人参 10 g, 丹参 10 g, 桂枝 10 g, 枳实 10 g, 泽泻 10 g)中药超微配方颗粒, 批号分别为 210412、210747、210551、210355、210312, 购于湖南春光九汇现代中药有限公司; 缙沙坦胶囊(批号: H20103521, 规格: 80 mg/粒, 湖南千金湘江药业股份有限公司); 异氟烷麻醉剂(宠物用)(批号: R510-22, 深圳瑞沃德生命科技有限公司); 乌拉坦(批号: U299635-100, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 生理盐水(批号: H10983065, 四川科伦股份有限公司)。

1.3 主要试剂

Masson 三色染色试剂盒、HE 染色试剂盒[批号: abs9217、abs9347, 爱必信(上海)生物科技有限公司]; 大鼠 NT-pro BNP、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10) ELISA 试剂盒(批号: ML-E-202205703、ML-E-202205123、ML-E-202206708、ML-E-20225761、ML-E-202205836, 上海酶联生物科技有限公司); BCA 蛋白定量试剂盒(批号: E-BC-K318-M, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司); TGF- β 1 抗体(批号: AF03634, 湖南艾方生物科技有限公司); ANGPT2 抗体(批号: A11306, 武汉爱博泰克生物科技有限公司); Smad2、Smad3、GAPDH 抗体(批号: 67343-1-Ig、66516-1-Ig、60004-1-Ig, 武汉三鹰生物技术有限公司); 蛋白预制胶

(4%~20%)(批号: F11420Gel, 长沙安吉行生物科技有限公司); ECL 化学发光试剂盒(批号: GE2301, 美国皆为尔公司)。

1.4 主要仪器

R407 型小动物呼吸机(深圳瑞沃德生命科技有限公司); H1650R 型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器有限公司); GOWEF680 型小动物呼吸麻醉机(长沙临科仪器设备有限公司); 6LAB 型小动物超声仪(北京益仁恒业科技有限公司); SA-6600 型血流变测试仪(北京赛科希德科技发展有限公司); RT-6100 型多功能酶标分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司); BA410E 型研究用三目生物显微镜(厦门麦克奥迪实业集团有限公司); KD-BM II 型包埋机(浙江科迪仪器设备有限公司); M199 型切片刀(上海徕卡显微系统有限公司); HM325 型石蜡切片机(美国赛默飞世尔科技公司); YD-A 型摊片机(浙江益迪医疗设备有限公司); DYY-6C 型电泳仪电源、DYCZ-24DN 型双垂直电泳仪、DYCZ-40D 型转印电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 模型制备与验证

45 只成年 SD 雄性大鼠按照随机数字表法选取 27 只用于制备 CHF 血瘀证大鼠模型, 其余大鼠分为正常组(12 只)和假手术组(6 只)。

采用冠脉结扎术^[8]进行造模: 大鼠麻醉后固定于鼠板, 常规消毒备皮。行气管插管, 以小动物呼吸机辅助呼吸, 呼吸频率为(70±10)次/min, 术中密切关注大鼠状态, 调节潮气量。沿左锁骨中线在皮肤上做 4~5 cm 的竖行切口, 按肌肉纹理逐层钝性分离, 从第 3~4 肋间破开胸腔, 剥离心包膜(注意勿损伤胸腺), 找到冠状动脉左前降支, 垂直血管走行方向于左心耳下 1~2 mm 处进针并迅速结扎, 肉眼观察可见结扎部位下的心肌变白。检查心脏无渗血渗液、无心律失常后关闭胸腔, 逐层缝合。假手术组大鼠只打开胸腔, 不结扎冠状动脉。

6 周后随机抽取正常组、造模组大鼠各 6 只, 检测其心电图、血清 NT-pro BNP 含量、超声心动图及血液流变学指标用于模型验证。

2.2 分组与给药

冠脉结扎术后,运用随机数字表法从造模组中取 18 只随机分为中药组、西医组和模型组,各 6 只。通过人与动物等效剂量换算确定各组给药剂量,中药组予养心通脉方溶液 12 g/kg 灌胃^[9](中药超微颗粒溶解于无菌生理盐水),西药组予缙沙坦溶液 0.8 g/kg 灌胃(除去胶囊外壳,粉剂溶于无菌生理盐水),其他 3 组大鼠予等量蒸馏水。每日 1 次,灌胃周期均为 4 周。

2.3 样本收集

2.3.1 模型验证 随机取造模组、正常组大鼠各 6 只,冠脉结扎术后 10 min 采集造模组心电图数据,隔日同时段采集正常组心电图;造模 6 周后于呼吸麻醉状态下行超声心动图检查;腹主动脉取血,其中肝素钠采血管用于血流变检测,普通采血管室温下放置,自然凝固析出分层后离心,取上清液于-80 ℃冰箱中保存。

2.3.2 取材 药物干预 4 周结束后隔日取材。呼吸麻醉后行超声心动图检查;用腹主动脉采血法进行采血,离心后取上清液于-80 ℃冰箱中冻存,用于后续检测;腹主动脉取血后打开大鼠胸腔,剪取完整心脏,用生理盐水冲洗出心脏内的残留血液,将各组大鼠心脏浸泡于 4%多聚甲醛溶液中保存,用于病理组织学观察;并剪取大鼠的左心室与心尖部位组织,放入冻存管中,存放于-80 ℃冰箱备用。

2.4 检测方法

2.4.1 心电图 冠脉结扎术后 10 min,大鼠仍处于麻醉状态,固定后按照“右上一左上一左下一右下一左胸部”的次序连接各导联,以 PP 连线为基线,当波形平稳后,记录肢体 II 导联心电图,关注心电图 ST 段情况及其波形变化。

2.4.2 超声心动图 使用宠物用异氟烷,借助小动物呼吸麻醉机进行呼吸麻醉,将大鼠固定后,脱除心脏周边毛发,维持麻醉且状态平稳时行超声心动图检查,使用 M 型超声探头,取左室长轴切面,测量大鼠左心室舒张期内径(left ventricular internal dimension diastole, LVIDd)、左心室收缩期内径(left ventricular internal dimension systole, LVIDs)、左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)和左

心室短轴收缩率(left ventricular fraction shortening, LVFS)。

2.4.3 ELISA 法检测血清 NT-pro BNP、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 含量 于-80 ℃冰箱取出冻存血清样本,融化后用于检测血清 NT-pro BNP 和 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 含量,实验操作步骤严格按照试剂盒说明书执行。

2.4.4 血液流变学检测 肝素钠采血管收集血液样本,防止血液凝固,使用 SA-6600 全自动血流变测试仪检测相关指标,整个检测过程在血液样本采集后 4 h 内完成。

2.4.5 心肌组织病理组织学观察 心脏于 4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋、切片、HE 染色后显微镜下观察心肌组织结构变化;Masson 染色后观察心肌组织纤维化病变情况,并通过 Image J 软件进行心肌组织纤维化率分析。

2.4.6 Western blot 法检测心肌组织 TGF- β /Smads 通路相关蛋白表达 称量(75 \pm 5) mg 心肌组织,加入 10 \times 蛋白裂解液、0.1 \times 蛋白酶抑制剂和 0.1 \times 磷酸蛋白酶抑制剂,冰上裂解 25 min;充分溶解后,离心,取上清液,测定各蛋白浓度。配制上样液,95 ℃煮 10 min,冷却后置于-20 ℃条件下保存;上样量为 10 μ L,160 V 电泳 60 min,25 min 快速转膜,5%脱脂奶粉封闭 90 min;TBST 稀释一抗[TGF- β 1(1:2 000)、ANGPT2(1:1 500)、Smad2(1:6 000)、Smad3(1:5 000)、GAPDH(1:8 000)]孵育 120 min。TBST 洗膜 4 次,每次 8 min;TBST 稀释二抗[Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)(1:10 000)、Goat Anti-Mouse IgG (H+L)(1:8 000)]孵育 90 min;重复洗膜操作;使用 ECL 高效化学发光显影液,于凝胶成像系统中成像并保存;使用 Image Lab、Image J 软件进行后续分析,计算各指标相对表达量(指标相对表达量=指标灰度值/GAPDH 灰度值)。

2.5 统计学分析

数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,数据分析采用 SPSS 26.0 软件,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。采用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制图表。

3 结果

3.1 CHF 血瘀证大鼠成模情况

3.1.1 心电图 大鼠行冠脉结扎术后 10 min 行心电图检查发现,造模组大鼠 ST 段明显抬高,心率加快,为 350~450 次/min。详见图 1。



图 1 两组大鼠心电图表现($n=6$)

3.1.2 超声心动图 冠脉结扎术后 6 周,与正常组比较,造模组大鼠 LVIDd、LVIDs 水平明显上升($P<0.01$),LVEF、LVFS 水平显著下降($P<0.01$)。详见表 1。

表 1 两组大鼠超声心动图指标比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	LVIDd/mm	LVIDs/mm	LVEF/%	LVFS/%
正常组	6.37±0.66	2.71±0.27	91.16±1.20	57.38±2.04
造模组	9.06±1.43**	6.47±1.03**	60.50±1.05**	28.60±0.64**

注:与正常组比较,** $P<0.01$ 。

3.1.3 血清 NT-pro BNP 含量和血液流变学相关指标 冠脉结扎术后 6 周,与正常组比较,造模组血清 NT-pro BNP 含量明显增多($P<0.01$),全血高切黏度、中切黏度、低切黏度显著升高($P<0.01$)。详见表 2。

3.2 各组大鼠病理组织学观察结果

3.2.1 HE 染色结果 正常组、假手术组大鼠心肌细

胞组织结构正常,排列整齐,未见病理性改变;与正常组比较,模型组心肌细胞形态大小不等,排列紊乱,各结构之间界限模糊,心肌细胞间质炎症细胞浸润明显,伴有大量纤维结缔组织增生;与模型组比较,中药组大鼠心肌细胞形态逐渐恢复,细胞间质纤维结缔组织增生和炎症细胞浸润明显减少,西药组大鼠心肌细胞形态恢复良好,但细胞间质仍有部分纤维结缔组织增生和炎症细胞浸润。详见图 2。

3.2.2 Masson 染色结果 正常组、假手术组大鼠心肌组织中无纤维化改变;与正常组比较,模型组大鼠心肌组织中大量胶原蛋白沉积,心肌纤维化率升高($P<0.01$);与模型组比较,中药组大鼠心肌组织中胶原蛋白沉积明显减少,心肌纤维化率降低($P<0.01$),西药组大鼠心肌纤维化率降低($P<0.01$)。详见图 2、表 3。

3.3 各组大鼠超声心动图情况

与正常组比较,模型组大鼠 LVIDd、LVIDs 水平显著上升($P<0.01$),LVEF、LVFS 水平明显降低($P<0.01$)。与模型组比较,中药组、西药组 LVIDd 和 LVIDs 水平均下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),LVEF、LVFS 水平明显上升($P<0.01$)。详见表 4。

3.4 各组大鼠血清 NT-pro BNP 和相关炎症因子比较

与正常组比较,模型组大鼠血清 NT-pro BNP 含量明显增多($P<0.01$),TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 水平显著上升($P<0.01$),IL-10 水平明显下降($P<0.01$);与模型组比较,中药组和西药组 NT-pro BNP 含量减

表 2 两组大鼠血清 NT-pro BNP 和血液流变学相关指标比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	NT-pro BNP/(pg/mL)	全血高切黏度/(mPa·s)	全血中切黏度/(mPa·s)	全血低切黏度/(mPa·s)
正常组	112.30±1.56	4.05±0.41	4.96±0.41	18.87±0.96
造模组	206.80±6.40**	5.55±0.55**	6.98±0.83**	35.68±4.81**

注:与正常组比较,** $P<0.01$ 。

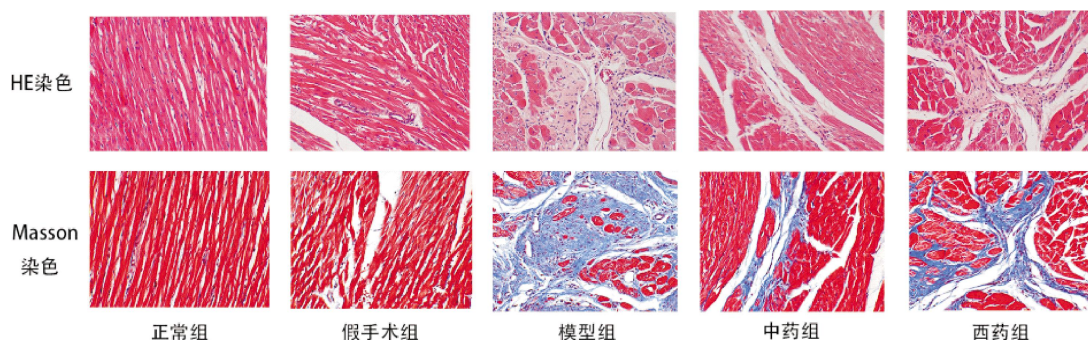


图 2 各组大鼠心肌组织结构观察结果($\times 200$)

表 3 各组大鼠心肌组织纤维化率比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	纤维化率/%
正常组	3.48±1.87
假手术组	5.63±1.06
模型组	47.26±2.71**
中药组	15.20±1.46 [#]
西药组	16.24±1.44 [#]

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$ 。

表 4 各组大鼠超声心动图指标比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	LVIDd/mm	LVIDs/mm	LVEF/%	LVFS/%
正常组	6.82±0.47	3.21±0.12	88.02±2.05	52.81±3.03
假手术组	6.88±0.97	3.65±0.66	83.41±2.75	47.18±2.98
模型组	8.93±0.60**	6.63±0.41**	55.72±3.85**	25.65±2.43**
中药组	7.24±0.98 [#]	4.13±0.38 [#]	78.92±3.35 [#]	42.65±3.43 [#]
西药组	6.81±0.56 [#]	3.80±0.28 [#]	80.57±2.13 [#]	44.08±2.27 [#]

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

少($P<0.01$),血清 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 水平下降($P<0.01$),IL-10 水平明显上升($P<0.01$)。详见表 5。

3.5 各组大鼠心肌组织 TGF- β /Smads 通路相关蛋白比较

与正常组比较,模型组大鼠心肌组织 ANGPT2、TGF- β 1、Smad2、Smad3 蛋白表达均升高($P<0.01$);与模型组比较,中药组、西药组大鼠心肌组织 TGF- β 1、Smad2、Smad3 蛋白表达下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。详见图 3—4。

4 讨论

CHF 是一类以呼吸困难、运动耐力明显下降为主要症状的难治性心血管疾病,炎症损伤机制是其最主要的发病机制之一,炎症损伤往往会导致心血管系统的功能障碍,严重者甚至会引发器质性损害,全身性炎症在 CHF 中很常见^[20]。

中医学认为 CHF 发病伊始多因心气虚、心阳虚,随着病程发展,在此基础上,瘀血、痰饮、水湿等病理产物在体内堆积,阻滞心脉,加重 CHF 病情,形成恶

性循环。养心通脉方可扶养心气、和通血脉,方中人参、丹参常用于心血管疾病中药处方,魏佳明等^[21]发现,丹参、人参等药物使用频次居于中医治疗 CHF 用药频次前列,且 CHF 治疗中使用频次较高的药物大多都具有益气活血化瘀的功效。

炎症因子可通过多种途径参与 CHF 的病变过程^[22],炎症反应系统的激活促使心肌纤维化加快,造成不可逆的心室重塑。炎症因子 TNF- α 是反映 CHF 病情严重程度的一个典型指标,CHF 患者血浆中 TNF- α 含量明显增多^[23];IL-1 β 可进入全身血液循环,与炎症反应密切相关,还可引起心肌纤维化,导致心室重构;IL-6 是早期反映 CHF 的一个极为敏感的指标,与 CHF 的预后密切相关,其含量与血清 NT-pro BNP 含量呈正相关,与 LVEF 呈负相关^[24];TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 在 CHF 病程中均发挥促炎作用,IL-10 为抗炎因子,其血清含量水平与 CHF 病情严重程度呈负相关^[25]。本研究发现,CHF 血瘀证大鼠经养心通脉方干预 4 周后,血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量显著降低,IL-10 生成明显增多,证明养心通脉方能改善 CHF 血瘀证大鼠炎症损伤。

TGF- β 存在于人体各种组织细胞中,是典型的促心肌纤维化因子^[26],具有多种生物学效应,密切参与人体胚胎发育、生殖细胞分化、炎症反应、组织修复和机体免疫调节^[27]。TGF- β 下游信号蛋白分子主要为 Smads 蛋白,Smads 家族可介导 TGF- β 的细胞内信号转导,其中以 Smad2、Smad3 为最主要的正反馈转导蛋白分子,在 TGF- β 1 诱导的纤维化中起重要作用^[28-29]。研究发现,TGF- β 1 可调节机体炎症反应,在组织受伤后被激活,促使炎症因子 IL-1 和 TNF- α 等释放,活化后的炎症因子又可加速 TGF- β 1 的分泌,还可诱导成纤维细胞增加细胞外基质的合成与分泌,促使纤维结缔组织增生^[30]。但也有研究发现,炎症反应得到控制后,TGF- β 1 含量下降,其对炎症

表 5 各组大鼠血清 NT-pro BNP 和相关炎症因子水平比较($\bar{x}\pm s, n=6, \text{pg/mL}$)

组别	NT-pro BNP	TNF- α	IL-1 β	IL-6	IL-10
正常组	140.40±1.96	18.51±2.43	4.59±0.27	18.53±1.17	55.09±2.34
假手术组	142.70±1.85	18.76±2.67	4.92±0.23	20.40±1.40	50.36±1.01
模型组	310.30±9.60**	43.00±3.60**	8.00±0.51**	34.60±1.38**	23.06±1.66**
中药组	155.50±3.34 [#]	24.60±1.81 [#]	5.47±0.16 [#]	24.03±0.65 [#]	47.25±1.65 [#]
西药组	159.30±3.93 [#]	22.92±2.16 [#]	5.71±0.19 [#]	22.39±1.15 [#]	47.71±1.68 [#]

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$ 。

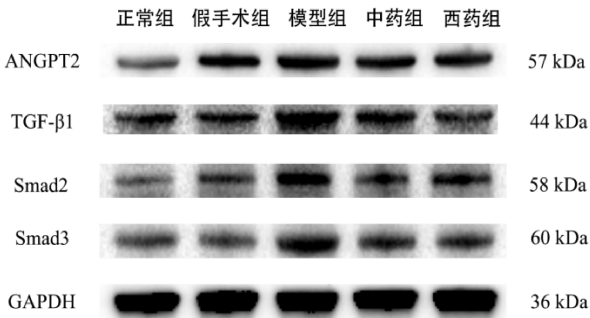


图3 各组大鼠心肌组织 TGF- β /Smads 信号通路相关蛋白印迹图

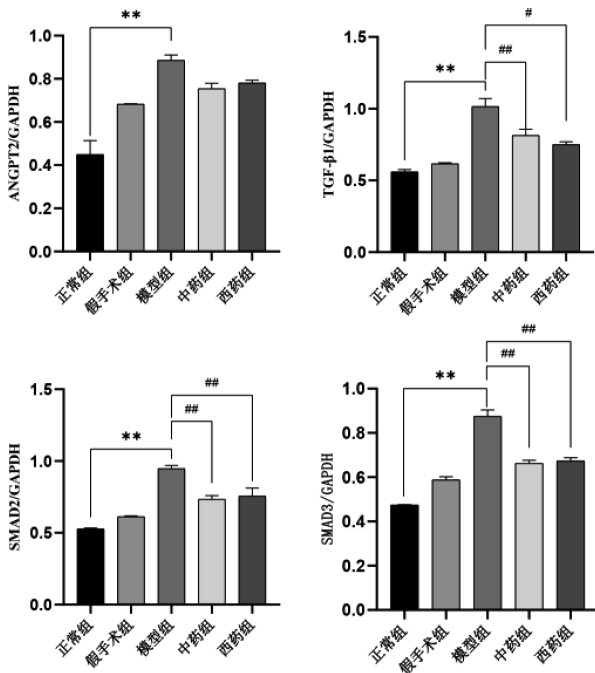


图4 各组大鼠心肌组织 TGF- β /Smads 信号通路相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

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

因子的生物学活性减弱,此时 TGF- β /Smads 信号通路中发挥传导作用的下游分子以 Smad6、Smad7 为主,而这两者属于抑制性 Smads, TNF- α 等炎症细胞因子随之减少,此时 TGF- β 1 则表现为抗炎作用^[31]。除影响炎症反应和心肌纤维化外, TGF- β 还可与 Ang II 形成工作网影响心室重构,当心肌损伤或心脏负荷过重时, TGF- β /Smads 通路信号转导是心室重构的重要机制之一^[32]。TGF- β 1 过量表达会引起心肌肥厚和心肌纤维化, TGF- β 1 参与心室重构发生发展的全过程^[33]。Ang II 在增加 TGF- β 1 基因表达的同时,还会抑制 TGF- β 1 降解,使得 TGF- β 1 含量更高^[34],诱发心室肥厚^[35];心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌细胞 TGF- β 1 表达上调, Smad2、Smad3 表达下调^[36],抑制 TGF- β /Smads 通路信号转导或可成为减

轻心室重构、防止心力衰竭疾病发生发展的有效切入点。本研究发现, CHF 血瘀证大鼠心肌组织中 TGF- β /Smads 信号通路相关蛋白表达明显上调;经过养心通脉方干预后,其 TGF- β 1、Smad2、Smad3 蛋白水平下降,证明养心通脉方能调控 TGF- β /Smads 信号通路相关蛋白表达,有效缓解心肌纤维化,降低心室重构,改善炎症损伤,促使 CHF 血瘀证大鼠心功能恢复。

综上所述, TGF- β /Smads 信号通路活化可激活机体炎症反应系统,促使心肌纤维化,加快心室重构,导致心力衰竭。养心通脉方可通过抑制 TGF- β /Smads 信号通路相关蛋白表达,有效降低心肌纤维化程度,改善 CHF 血瘀证模型大鼠的炎症损伤,缓解心力衰竭病情进展并促使心功能恢复。本研究将为 CHF 临床中医药防治提供较好的参考意义和科学依据。

参考文献

- [1] HOPPER I, EASTON K. Chronic heart failure [J]. Australian Prescriber, 2017, 40(4): 128-136.
- [2] 马 妍, 任得志, 邱克伟, 等. 慢性心力衰竭利尿剂抵抗的发病机制与治疗进展[J]. 世界中医药, 2022, 17(4): 590-594.
- [3] 朱 杰, 林兆奋, 胡 聃, 等. 中西医结合治疗慢性心力衰竭研究进展[J]. 陕西中医, 2020, 41(9): 1342-1344.
- [4] 钱 旻. 慢性心力衰竭临床辨治心得[J]. 中医临床研究, 2019, 11(6): 42-44.
- [5] BAO J W, SUN B, MA P P, et al. Rosuvastatin inhibits inflammatory response and resists fibrosis after myocardial infarction[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2018, 22(1): 238-245.
- [6] VILAHUR G, CASANÍ L, PEÑA E, et al. Silybum marianum provides cardioprotection and limits adverse remodeling post-myocardial infarction by mitigating oxidative stress and reactive fibrosis[J]. International Journal of Cardiology, 2018, 270(11): 28-35.
- [7] ZHOU G F, JIANG Y H, MA D F, et al. Xiao-Qing-long Tang prevents cardiomyocyte hypertrophy, fibrosis, and the development of heart failure with preserved ejection fraction in rats by modulating the composition of the gut microbiota[J]. BioMed Research International, 2019, 2019: 9637479.
- [8] ZHANG Y, ZHANG W, ZHANG R, et al. Knockdown of FBLN2 suppresses TGF- β 1-induced MRC-5 cell migration and fibrosis by downregulating VTN[J]. Tissue and Cell, 2023, 81: 102005.

- [9] 张永花. 当归补血汤经 TGF- β 1/Smad2 及 PI3K/Akt 信号通路对 Ang II 诱导心肌细胞肥大的影响[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2018: 34-37.
- [10] 郝丽梅, 毛静远, 王贤良. 中医学对心力衰竭认识的历史脉络考略[J]. 中医杂志, 2013, 54(8): 637-639.
- [11] 侯 晔. 慢性心力衰竭的中医证型分布规律及临床特点[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2021: 14-15.
- [12] 郑景辉. 养心通脉方研究述评[J]. 吉林中医药, 2015, 35(2): 187-190.
- [13] 何新兵, 卢健棋, 刘雪玲, 等. 养心通脉饮对慢性心衰患者心室重构及 NT-ProBNP 影响临床研究[J]. 新中医, 2014, 46(7): 25-27.
- [14] 何新兵, 温志浩, 刘雪玲, 等. 养心通脉饮对慢性心力衰竭患者心功能及神经内分泌因子的影响[J]. 中国当代医药, 2017, 24(5): 140-142.
- [15] 王 诗, 李 杰, 刘垠杏, 等. 基于小肠黏膜菌群及肠紧密连接探讨养心通脉方对冠心病血瘀证大鼠的作用机制[J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(8): 85-92.
- [16] 官广舵, 陈远平, 李瑜欣, 等. 养心通脉颗粒 II 方对气虚血瘀型心衰大鼠血清 Ang II, IL-6, TNF- α 水平的影响[J]. 广西中医药大学学报, 2010, 13(4): 1-3.
- [17] 梁逸强, 岑 倩, 朱 涛, 等. 养心通脉方对心衰大鼠心肌横管重构及其相关蛋白 Juncophilin-2 和 caveolin-3 的影响[J]. 心血管外科杂志(电子版), 2019, 8(2): 7-8.
- [18] 杨 硕, 张 艳, 王思尹, 等. 参草通脉颗粒逆转慢性心衰气虚血瘀证大鼠模型疗效分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(5): 50-53.
- [19] 曾雪芹. 从“心—肠—菌”出发探讨养心通脉方对冠心病血瘀证大鼠模型肠道微生态平衡的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2020.
- [20] COCCO G, JERIE P, AMIET P, et al. Inflammation in heart failure: Known knowns and unknown unknowns[J]. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2017, 18(12): 1225-1233.
- [21] 魏佳明, 刘承鑫, 李 雅, 等. 基于数据挖掘与网络药理学的慢性心力衰竭中医证型、用药规律及相关药理分析[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(1): 139-150.
- [22] 韩额尔德木图, 马月宏, 王海燕, 等. 慢性心衰的病理生理及发病机制研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(12): 1349-1352.
- [23] 宋 暖. 慢性心力衰竭患者血浆 BNP、TNF- α 及血脂水平的变化[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2016, 4(18): 146-147.
- [24] 刘 青, 宋立冬, 王希涛, 等. 重症肺炎合并心衰患者血清 TNF- α 、cTnI 水平与心功能的关系[J]. 心血管康复医学杂志, 2022, 31(5): 606-609.
- [25] 刘 尚. 温阳振衰颗粒对慢性充血性心力衰竭模型免疫因子 IL-4、IL-10 水平表达影响的实验研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2014.
- [26] PENG D D, FU M Y, WANG M N, et al. Targeting TGF- β signal transduction for fibrosis and cancer therapy[J]. Molecular Cancer, 2022, 21(1): 104.
- [27] MIYAZAWA K, MIYAZONO K. Regulation of TGF- β family signaling by inhibitory smads[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2017, 9(3): a022095.
- [28] FATHY SAMAH M, MAHMOUD MOHAMMED S. Protective effect of dexamethasone against paraquat-triggered toxicity in A549 cells through inhibiting inflammation, apoptosis and TGF- β 1/Smad3 pathway[J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2022, 35(2): 539-546.
- [29] BROWN K A, HAM A J, CLARK C N, et al. Identification of novel Smad2 and Smad3 associated proteins in response to TGF- β 1[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2008, 105(2): 596-611.
- [30] YOSHIMATSU Y, WAKABAYASHI I, KIMURO S, et al. TNF- α enhances TGF- β -induced endothelial-to-mesenchymal transition via TGF- β signal augmentation[J]. Cancer Science, 2020, 111(7): 2385-2399.
- [31] 易嘉莉, 聂连桂, 李亚灵, 等. 外源性硫化氢调节 TGF- β 1/Smad7 信号通路改善高同型半胱氨酸血症所致的大鼠心肌纤维化[J]. 重庆医科大学学报, 2021, 46(2): 151-155.
- [32] 梁逸强. TGF- β /Smads 信号传导通路与心室重构的研究现状[J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(16): 1817-1819.
- [33] MARTOS R, BAUGH J, LEDWIDGE M, et al. Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction[J]. Circulation, 2007, 115(7): 888-895.
- [34] ZHOU D X, LIANG Q S, HE X X, et al. Changes of c-fos and c-Jun mRNA expression in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy and effects of sodium tanshinone II A sulfonate[J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology, 2008, 28(5): 531-534.
- [35] XIAO H, ZHANG Y Y. Understanding the role of transforming growth factor- β signalling in the heart: overview of studies using genetic mouse models[J]. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2008, 35(3): 335-341.
- [36] 高连如, JOHN, TEERLINK, 等. 慢性心力衰竭大鼠转化生长因子- β /Smads 信号传导通路的调节异常 [J]. 中华心血管病杂志, 2001, 29(3): 177-180.