

本文引用：叶海峰，曹旭丹. 苦参素注射液改善阿霉素所致慢性心力衰竭大鼠心功能和心室重构的作用及机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(9): 762-770. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.09.004.

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2023)31-09-0762-09

苦参素注射液改善阿霉素所致慢性心力衰竭大鼠心功能和心室重构的作用及机制

叶海峰, 曹旭丹

(邯郸市中心医院心血管外科, 河北省邯郸市 056001)

[摘要] [目的] 探讨苦参素注射液(OMT)对阿霉素所致慢性心力衰竭(CHF)大鼠心功能和心室重构的影响及可能机制。[方法] 采用腹腔注射(ip)阿霉素(1.5 mg/kg, 2次/周, 共6周)的方法构建CHF大鼠模型, 设模型组、卡托普利注射液(CTP, 6.5 mg/kg)组和OMT低(25 mg/kg)、中(50 mg/kg)、高(100 mg/kg)剂量组; 另设对照组, 每组10只。各组分别每天1次腹腔注射给药4周后, 通过小动物超声成像系统检测心功能指标[左心室收缩期末内径(LVESD)、左心室舒张期末内径(LVEDD)、短轴缩短率(LVFS)、射血分数(LVEF)、每搏输出量(SV)], 酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清心肌肌钙蛋白I(cTnI)、脑钠肽(BNP)、基质裂解素2(ST2)含量, 计算左心室肥厚指数(LVHI), HE染色和Masson染色观察心肌组织形态变化和纤维化状况, Western blot法检测胶原蛋白I(Coll-1)、 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、转化生长因子 β 1(TGF- β 1)、Smad2、p-Smad2、Smad3、p-Smad3、Smad7蛋白表达。[结果] 与模型组比较, CTP组和OMT低、中、高剂量组大鼠LVESD和LVEDD分别降低, LVFS、LVEF和SV分别升高(均 $P<0.05$), cTnI、BNP和ST2含量以及LVHI分别降低(均 $P<0.05$), 心肌组织形态病理性改变和纤维化状况明显改善, 胶原容积分数(CVF)分别降低(均 $P<0.05$), Coll-1、 α -SMA和TGF- β 1表达量分别降低, p-Smad2/Smad2比值和p-Smad3/Smad3比值分别下降, Smad7相对表达量分别升高(均 $P<0.05$)。OMT对CHF大鼠各指标的影响具有剂量依赖性, 且OMT高剂量组对各指标的影响明显优于CTP组。[结论] OMT具有改善CHF大鼠心功能、抑制心室重构的作用, 其作用机制可能与抑制TGF- β 1/Smads信号通路有关。

[关键词] 慢性心力衰竭; 苦参素注射液; 心功能; 心室重构; TGF- β 1/Smads信号通路

[中图分类号] R541.6

[文献标识码] A

Effect and mechanism of oxymatrine injection improves cardiac function and ventricular remodeling in adriamycin induced chronic heart failure rats

YE Haifeng, CAO Xudan

(Department of Cardiovascular Surgery, Handan Central Hospital, Handan, Hebei 056001, China)

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect and possible mechanism of oxymatrine injection (OMT) on cardiac function and ventricular remodeling in doxorubicin-induced chronic heart failure (CHF) rats. **Methods** The rat model with CHF was established by intraperitoneal injection (ip) of adriamycin (1.5 mg/kg, twice a week for 6 weeks). The model group, captopril injection (CTP, 6.5 mg/kg) group and OMT low (25 mg/kg), medium (50 mg/kg), high (100 mg/kg) dose group were set up, and the control group was set up, with 10 rats in each group. The rats in each group were treated by intraperitoneal injection once a day. 4 weeks later, the cardiac function indexes (left ventricular end-systolic diameter (LVESD), left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD), left ventricular fractional shortening (LVFS), stroke volume (SV)) were measured through animal ultrasound; the content of cardiac troponin I (cTnI), brain natriuretic peptide (BNP), stromelysin-2 (ST2) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the left ventricular hypertrophy index (LVHI) was calculated; the morphological changes and fibrosis of myocardial tissue were observed by HE staining and Masson staining; the expression of collagen I (Coll-1), α smooth muscle actin (α -SMA), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), Smad2, p-Smad2, Smad3, p-Smad3, Smad7 were detected by

[收稿日期] 2023-05-11

[修回日期] 2023-07-06

[基金项目] 河北省医学科学研究课题(20220550)

[作者简介] 叶海峰, 主治医师, 研究方向为心血管疾病, E-mail: 13343008051@163.com。

Western blot. **Results** Compared with the model group, the LVESD and LVEDD were decreased in CTP group and OMT low, medium, high dose groups; the LVFS, LVEF and SV were increased (all $P<0.05$). The contents of cTnI, BNP and ST2 were decreased (all $P<0.05$). The pathological changes and fibrosis of myocardial tissue were significantly improved, and the collagen volume fraction (CVF) were decreased ($P<0.05$). The expressions of Coll-1, α -SMA and TGF- β 1 were decreased; the ratio of p-Smad2/Smad2 and p-Smad3/Smad3 were decreased; the expression of Smad7 were increased (all $P<0.05$). The effect of OMT on various indexes of CHF rats were dose-dependent, and the effect of OMT high-dose group on various indexes were significantly better than those of CTP group. **Conclusion** OMT can improve cardiac function and inhibit ventricular remodeling in CHF rats, which mechanism may be related to the inhibition of TGF- β 1/Smads signaling pathway.

[KEY WORDS] chronic heart failure; oxymatrine injection; cardiac function; ventricular remodeling; TGF- β 1/Smads signaling pathway

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是由于心脏结构或功能异常所致心室舒张或收缩功能受损而出现的一种临床综合征。目前,全球CHF患者超过6000万,5年生存率约65%,是严重威胁人类健康的公共卫生问题^[1-3]。心肌纤维化所致心室重构是CHF发生和持续性加重的重要原因,转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1,TGF- β 1)是一种强致纤维化因子,TGF- β 1与其下游蛋白Smads构成的信号通路对心、肝、肺、肾等组织纤维化具有关键性调控作用^[4-7]。研究发现,通过药物抑制TGF- β 1/Smads信号通路能够有效减轻CHF大鼠心肌纤维化及心室重构^[8]。因此,以TGF- β 1/Smads信号通路为靶点抑制心肌纤维化或许是延缓CHF进展的有效途径。

苦参素是从豆科植物苦参的干燥根中提取的一类活性生物碱,包括苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、槐定碱等成分,具有较好的免疫调节、抗炎、抗纤维化等作用^[9]。研究发现,苦参素对大鼠肝纤维化和肺纤维化具有抑制作用,其机制与调控TGF- β 1/Smads信号通路有关^[10-11]。苦参素注射液(oxymatrine injection, OMT)是以苦参素为主要成分制成的中药注射剂,目前临幊上主要用于放化疗所致白细胞减少及其他原因引起的白细胞减少症。本研究通过腹腔注射阿霉素制备CHF大鼠模型并给予OMT治疗,探讨OMT对阿霉素所致CHF大鼠心功能和心室重构的作用及可能机制,以期为临幊治疗CHF提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

65只7周龄清洁级雄性SD大鼠[河北伊维沃生物科技有限公司,许可证号SCXK(冀)2020-002],体质量210~240g,分笼饲养于河北工程大学

附属医院动物房,维持室温(24 ± 1)℃、相对湿度($55\pm10\%$)、12 h 光照和12 h 黑暗,自由饮水进食。本实验获得邯郸市中心医院伦理委员会批准。

1.2 药物与试剂

OMT注射液(规格:每毫升0.1g OMT,浙江北生药业汉生制药有限公司,批号:21Z11090014);卡托普利(captopril, CTP)注射液(规格:每毫升25mg CTP,常州制药厂有限公司,批号:20210927);阿霉素(规格:10 mg/瓶,山东新时代药业有限公司,批号:220103-A16)。心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin I,cTnI)、脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)、基质裂解素2(stromelysin-2, ST2)酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号:H149-2、H166、H505-1);高效RIPA裂解液、苏木精-伊红(hematoxylin eosin, HE)染色试剂盒和Masson染色试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司,货号:R0010、G1120、G1340);兔抗大鼠胶原蛋白I(collagen I, Coll-1)、 α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、TGF- β 1、Smad2、p-Smad2、Smad3、p-Smad3、Smad7抗体(北京博奥森生物技术有限公司,货号:bs-7158R、bs-10196R、bs-0086R、bs-0718R、bs-7464R、bs-23580R、bs-5616R、bs-23328R);兔抗大鼠GAPDH抗体、羊抗兔IgG二抗(美国Abcam公司,货号:ab7018、ab6721);BCA法蛋白浓度检测试剂盒、ECL显色液(武汉三鹰生物技术有限公司,货号:PK10026、PK10001)。

1.3 主要仪器

VEVO 3100型小动物超声成像系统(加拿大Visual Sonics公司);EG1150C型分体式石蜡包埋机、RM2235型石蜡切片机(德国Leica公司);YS100型光学显微镜(日本Nikon公司);Varioskan LUX型全波长酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司);PowerPac型电泳仪(美国Bio-Rad公司);DYCZ-40D

型转膜仪(北京六一仪器厂);ALPHA1000-2型数字凝胶成像系统(美国Alpha公司)。

1.4 模型制备与给药

适应性饲养7天后,随机取10只大鼠设为对照组。剩余55只大鼠参照Sun等^[12]报道的方法(腹腔注射阿霉素1.5 mg/kg,2次/周,共6周)构建CHF大鼠模型,左心室射血分数(left ventricular ejection fraction,LVEF)<45%,即可判定CHF模型制备成功。造模过程中死亡3只、造模失败1只,共造模成功51只,去除LVEF最高的1只大鼠,将剩余50只CHF模型大鼠随机分为模型组、CTP组和OMT低、中、高剂量组,每组10只。CTP组每天1次腹腔注射给予6.5 mg/kg CTP(根据人与大鼠剂量换算公式计算),OMT低、中、高剂量组分别每天1次腹腔注射给予25 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg OMT(根据人与大鼠剂量换算公式计算,OMT低、中、高剂量相当于人临床剂量的1/2倍、1倍、2倍),对照组和模型组每天1次腹腔注射给予生理盐水,注射体积均为5 mL/kg,疗程4周。

1.5 心功能指标检测

按0.35 g/kg腹腔注射给予水合氯醛实施麻醉后,通过小动物超声成像系统检测心功能指标,包括左心室收缩期末内径(left ventricular end-systolic diameter,LVESD)、舒张期末内径(left ventricular end-diastolic diameter,LVEDD)、短轴缩短率(left ventricular fractional shortening,LVFS)、LVEF、每搏输出量(stroke volume,SV)。

1.6 血清cTnI、BNP、ST2含量检测

开腹并分离腹主动脉,取血5 mL,4℃离心10 min取血清(转速3 000 r/min,离心半径10 cm),按照ELISA法试剂盒操作说明进行处理后,通过酶标仪检测血清cTnI、BNP、ST2含量。

1.7 左心室肥厚指数计算

称量大鼠体质量(W_0)后,开胸取心脏,剪取左心室并称取其质量(W_1),计算左心室肥厚指数(left ventricular hypertrophy index,LVHI), $LVHI = W_1/W_0$ 。

1.8 心肌组织形态变化和纤维化状况观察

将称量后的部分左心室组织置于10%中性甲醛溶液中固定72 h后,石蜡浸润包埋、4 μm切片、贴片、烤片,梯度乙醇脱蜡水化,按照试剂盒操作说明,分别行HE染色和Masson染色,然后通过光学显微镜观察心肌组织形态变化和纤维化状况。通过Image J图像处理软件计算胶原(蓝色着色)容积分数(collagen volume fraction, CVF), $CVF(\%) = (\text{蓝色着色面积}/\text{总面积}) \times 100\%$ 。

1.9 心肌组织 Coll-1、α-SMA、TGF-β1、Smad2、p-Smad2、Smad3、p-Smad3、Smad7蛋白表达检测

取左心室组织50 mg,加入RIPA裂解液后研磨匀浆,冰上静置30 min后充分裂解,4℃离心25 min提取总蛋白(转速12 000 r/min,离心半径8 cm),BCA法测定总蛋白浓度后,各组均20 μg蛋白量上样,10% SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白,湿法转印至硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)膜,5%牛血清白蛋白封闭液室温封膜1.5 h,加入Coll-1(1:1 000)、α-SMA(1:800)、TGF-β1(1:1 000)、Smad2(1:1 000)、p-Smad2(1:1 000)、Smad3(1:1 000)、p-Smad3(1:1 000)、Smad7(1:1 000)、GAPDH(1:2 000)抗体稀释液4℃孵育过夜,洗膜后加入IgG二抗(1:3 000)稀释液室温孵育1 h,ECL显色后,通过Image J图像处理软件计算条带灰度值,与内参β-actin条带的灰度值比值做为目标蛋白相对表达量。

1.10 统计学处理

实验数据采用SPSS 20.0软件进行统计分析,计量资料符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心功能指标比较

与对照组比较,模型组LVESD、LVEDD分别升高36.78%、116.24%,LVFS、LVEF、SV分别降低66.99%、56.76%、66.20%(均 $P < 0.05$)。与模型组比较,CTP组和OMT低、中、高剂量组LVESD分别降低13.85%、7.33%、16.07%、22.70%,LVEDD分别降低22.87%、11.60%、26.11%、46.25%,LVFS分别升高126.20%、31.52%、121.40%、164.66%,LVEF分别升高54.74%、20.97%、49.77%、82.36%,SV分别升高87.82%、28.64%、97.84%、138.62%(均 $P < 0.05$);OMT低、中、高剂量组上述效应呈现剂量依赖性($P < 0.05$)。与CTP组比较,OMT低剂量组LVESD、LVEDD分别升高7.57%、14.60%,LVFS、LVEF、SV分别降低41.86%、21.82%、31.51%(均 $P < 0.05$);OMT中剂量组各指标差异无统计学意义($P > 0.05$);OMT高剂量组LVESD、LVEDD分别降低10.27%、30.31%,LVFS、LVEF、SV分别升高17.00%、17.85%、27.05%(均 $P < 0.05$;图1和表1)。

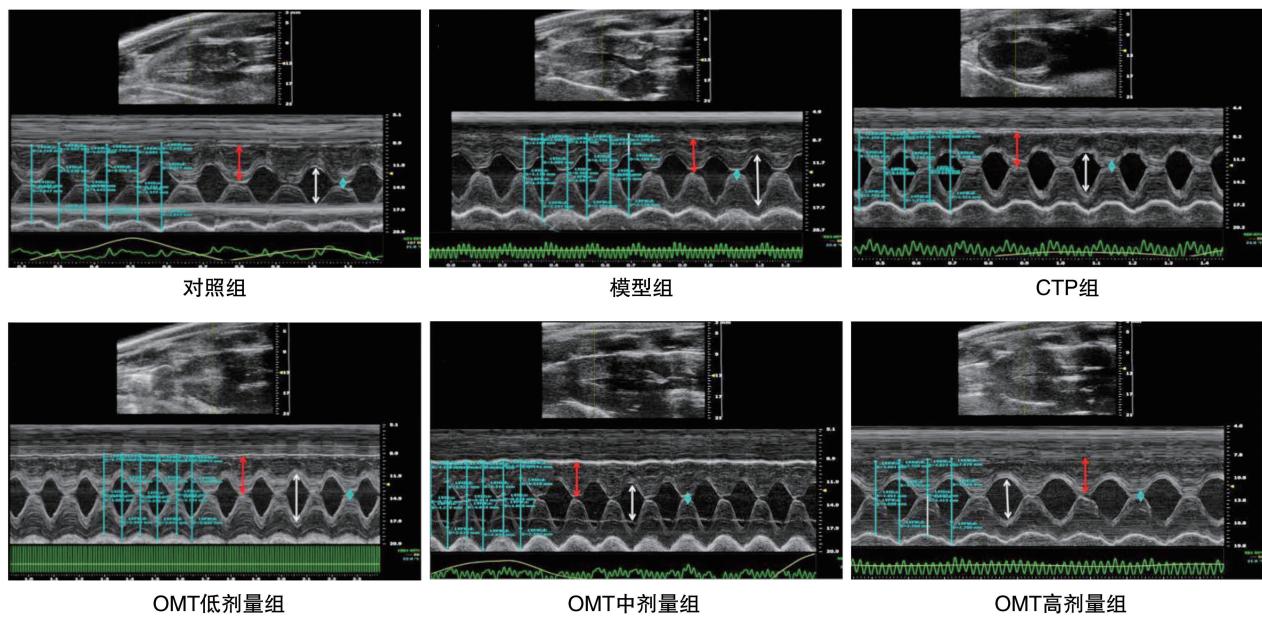


图 1. 各组大鼠心脏超声检测图
Figure 1. Echocardiogram of rats in each group

表 1. 各组大鼠心功能指标比较($n=10$)

Table 1. Comparison of cardiac function indexes of rats in each group ($n=10$)

分组	LVESD/mm	LVEDD/mm	LVFS/%	LVEF/%	SV/ μ L
对照组	6.28±0.43	2.71±0.15	52.38±4.57	82.06±7.91	172.90±15.83
模型组	8.59±0.57 ^a	5.86±0.42 ^a	17.29±1.60 ^a	35.48±3.75 ^a	58.44±6.08 ^a
CTP 组	7.40±0.51 ^b	4.52±0.34 ^b	39.11±3.75 ^b	54.90±6.12 ^b	109.76±11.32 ^b
OMT 低剂量组	7.96±0.52 ^{bc}	5.18±0.39 ^{bc}	22.74±2.06 ^{bc}	42.92±4.36 ^{bc}	75.18±8.14 ^{bc}
OMT 中剂量组	7.21±0.53 ^{bd}	4.33±0.31 ^{bd}	38.28±3.90 ^{bd}	53.14±5.82 ^{bd}	115.62±12.09 ^{bd}
OMT 高剂量组	6.64±0.49 ^{bcd}	3.15±0.20 ^{bcd}	45.76±4.13 ^{bcd}	64.70±7.38 ^{bcd}	139.45±14.27 ^{bcd}

注:a 为 $P<0.05$, 与对照组相比;b 为 $P<0.05$, 与模型组相比;c 为 $P<0.05$, 与 CTP 组相比;d 为 $P<0.05$, 与 OMT 低剂量组相比;e 为 $P<0.05$, 与 OMT 中剂量组相比。

2.2 血清 cTnI、BNP 和 ST2 含量比较

与对照组比较, 模型组血清 cTnI、BNP 和 ST2 含量分别升高 251.02%、110.53%、91.79% (均 $P<0.05$)。与模型组比较, CTP 组和 OMT 低、中、高剂量组血清 cTnI 含量分别降低 49.74%、26.05%、53.29%、65.44%, BNP 含量分别降低 36.35%、15.31%、30.52%、41.29%, ST2 含量分别降低 27.56%、18.54%、30.69%、37.65% (均 $P<0.05$) ; OMT 低、中、高剂量组上述效应呈现剂量依赖性 ($P<0.05$)。与 CTP 组比较, OMT 低剂量组血清 cTnI、BNP、ST2 含量分别升高 47.14%、33.05%、12.45% (均 $P<0.05$) ; OMT 中剂量组各指标差异无统计学意义 ($P>0.05$) ; OMT 高剂量组血清 cTnI、ST2 含量分别降低 31.25%、13.93% (均 $P<0.05$) ,

BNP 含量差异无统计学意义 ($P>0.05$; 表 2)。

表 2. 各组大鼠血清 cTnI、BNP 和 ST2 含量比较($n=10$)

Table 2. Comparison of serum cTnI, BNP, ST2 contents of rats in each group ($n=10$)

分组	cTnI/(ng/L)	BNP/(ng/L)	ST2/(g/L)
对照组	58.74±6.03	165.33±14.92	593.08±62.14
模型组	206.19±21.84 ^a	348.07±36.15 ^a	1137.45±130.92 ^a
CTP 组	103.63±12.27 ^b	221.54±20.83 ^b	823.96±91.74 ^b
OMT 低剂量组	152.48±17.30 ^{bc}	294.77±30.60 ^{bc}	926.53±101.75 ^{bc}
OMT 中剂量组	96.31±10.25 ^{bd}	241.83±26.71 ^{bd}	788.40±86.51 ^{bd}
OMT 高剂量组	71.25±7.43 ^{bcd}	204.36±21.59 ^{bcd}	709.15±76.42 ^{bcd}

注:a 为 $P<0.05$, 与对照组相比;b 为 $P<0.05$, 与模型组相比;c 为 $P<0.05$, 与 CTP 组相比;d 为 $P<0.05$, 与 OMT 低剂量组相比;e 为 $P<0.05$, 与 OMT 中剂量组相比。

2.3 LVHI 比较

与对照组比较,模型组 LVHI 升高 62.18% ($P<0.05$)。与模型组比较, CTP 组和 OMT 低、中、高剂量组 LVHI 分别降低 22.13%、12.65%、21.34%、28.85% (均 $P<0.05$) ; OMT 低、中、高剂量组上述效应呈现剂量依赖性 ($P<0.05$)。与 CTP 组比较, OMT 低剂量组 LVHI 升高 12.18% ($P<0.05$) ; OMT 中剂量 LVHI 差异无统计学意义 ($P>0.05$) ; OMT 高剂量组 LVHI 降低 8.63% ($P<0.05$; 图 2)。

2.4 心肌组织形态改变

对照组大鼠心肌纤维纹路清晰,心肌细胞排列整齐、胞核居中,间质区未见肿胀和炎性浸润。模型组心肌纤维可见肿胀、断裂、纹路模糊或消失,心肌细胞排列紊乱、胞质空泡样变、核膜核仁边界不清,间质区肿胀、炎性细胞浸润等病理性形态改变。与模型组比较, CTP 组和 OMT 低、中、高剂量组病理性形态改变不同程度改善,其中 OMT 中剂量组优于

OMT 低剂量组, OMT 高剂量组优于 CTP 组和 OMT 低、中剂量组(图 3)。

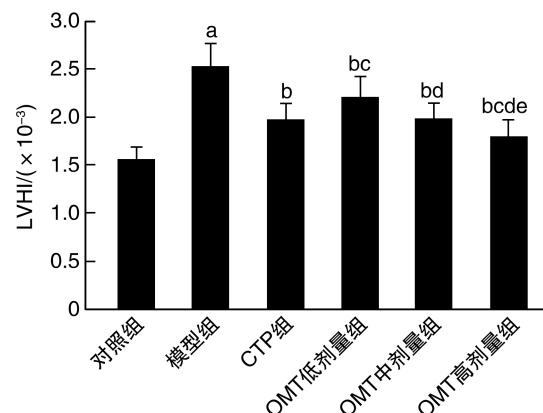


图 2. 各组大鼠 LVHI 比较 ($n=10$)

a 为 $P<0.05$, 与对照组相比;b 为 $P<0.05$, 与模型组相比;
c 为 $P<0.05$, 与 CTP 组相比;d 为 $P<0.05$, 与 OMT 低剂量组相比;
e 为 $P<0.05$, 与 OMT 中剂量组相比。

Figure 2. Comparison of LVHI of rats in each group ($n=10$)

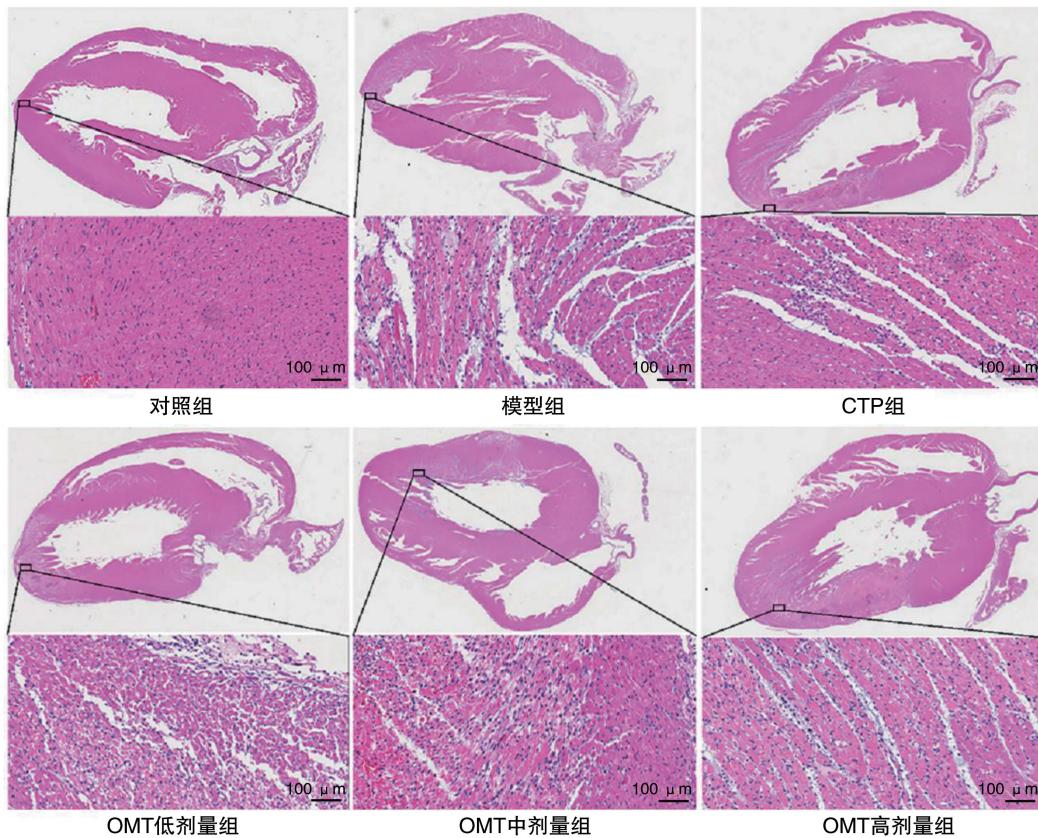


图 3. HE 染色观察各组大鼠心肌组织形态改变

Figure 3. The morphological changes of myocardial tissue were observed by HE staining

2.5 心肌组织纤维化状况及 CVF 比较

对照组大鼠心肌组织可见极少量丝状散在胶原纤维。模型组心肌组织血管周围和间质区胶原

纤维明显增粗、呈片状增多、分布不均。与模型组比较, CTP 组和 OMT 低、中、高剂量组心肌组织纤维化状况不同程度减轻, OMT 高剂量组优于其他组。

与对照组比较,模型组 CVF 升高 1 567.07% ($P<0.05$)。与模型组比较,CTP 组和 OMT 低、中、高剂量组 CVF 分别降低 49.67%、26.23%、55.58%、78.92% (均 $P<0.05$) ;OMT 低、中、高剂量组效应呈剂量依赖性 ($P<0.05$)。与 CTP 组比较,OMT 低剂量组 CVF 升高 46.58%,OMT 中、高剂量组分别降低 11.73%、58.11% (均 $P<0.05$; 图 4)。

2.6 心肌组织 Coll-1、 α -SMA 蛋白表达

与对照组比较,模型组大鼠心肌组织 Coll-1、 α -SMA 相对表达量分别升高 1 466.67%、1 733.33% (均 $P<0.05$)。与模型组比较,CTP 组和 OMT 低、

中、高剂量组 Coll-1 相对表达量分别降低 70.21%、19.15%、55.32%、76.60%, α -SMA 相对表达量分别降低 70.91%、16.36%、63.64%、83.64% (均 $P<0.05$) ;OMT 低、中、高剂量组上述效应呈现剂量依赖性 ($P<0.05$)。与 CTP 组比较,OMT 低剂量组 Coll-1、 α -SMA 相对表达量分别升高 171.43%、187.50% (均 $P<0.05$) ;OMT 中剂量组 Coll-1 相对表达量升高 50.00% ($P<0.05$), α -SMA 相对表达量差异无统计学意义 ($P>0.05$) ;OMT 高剂量组 Coll-1、 α -SMA 相对表达量分别降低 21.43%、43.75% (均 $P<0.05$; 图 5)。

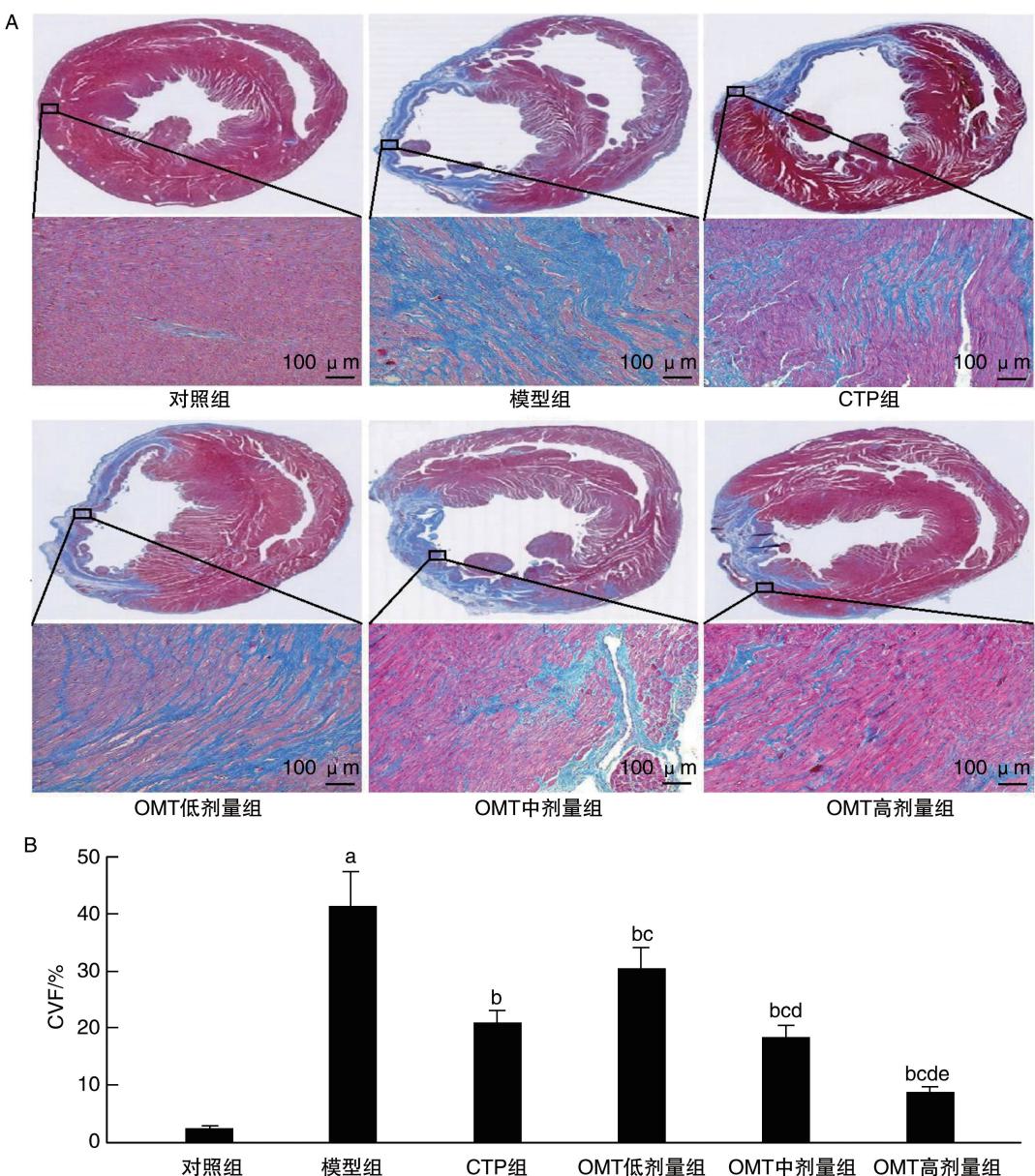


图 4. 各组大鼠心肌组织纤维化状况比较

A 为 Masson 染色观察心肌组织纤维化状况;B 为心肌组织 CVF 柱状统计图 ($n=10$)。a 为 $P<0.05$, 与对照组相比;
b 为 $P<0.05$, 与模型组相比;c 为 $P<0.05$, 与 CTP 组相比;d 为 $P<0.05$, 与 OMT 低剂量组相比;e 为 $P<0.05$, 与 OMT 中剂量组相比。

Figure 4. Comparison of myocardial fibrosis in rats of each group

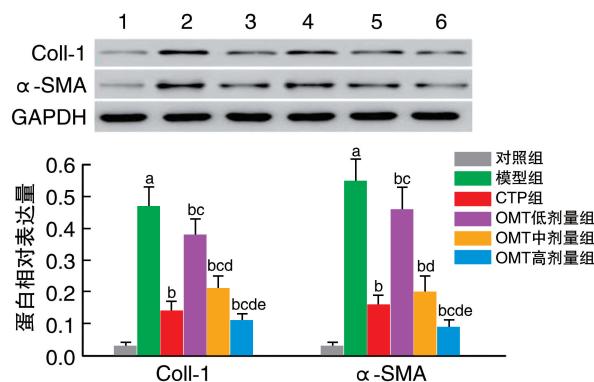


图5. 各组大鼠心肌组织 Coll-1、 α -SMA 蛋白表达比较($n=10$)

1为对照组,2为模型组,3为CTP组,4~6分别为OMT低、中、高剂量组。a为 $P<0.05$,与对照组相比;b为 $P<0.05$,与模型组相比;c为 $P<0.05$,与CTP组相比;d为 $P<0.05$,与OMT低剂量组相比;e为 $P<0.05$,与OMT中剂量组相比。

Figure 5. Comparison of the expression of Coll-1, α -SMA in myocardium of rats in each group ($n=10$)

2.7 心肌组织 TGF- β 1、Smad2、p-Smad2、Smad3、p-Smad3、Smad7 蛋白表达

与对照组比较,模型组大鼠心肌组织 TGF- β 1、p-Smad2、p-Smad3 相对表达量及 p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 比值分别升高 575.00%、866.67%、966.67%、857.14%、1125.00%,Smad7 相对表达量

降低 75.76% (均 $P<0.05$)。与模型组比较,CTP 组和 OMT 低、中、高剂量组 TGF- β 1 相对表达量分别降低 72.22%、14.81%、68.52%、79.63%,p-Smad2 相对表达量分别降低 67.24%、43.10%、72.41%、77.59%,p-Smad3 相对表达量分别降低 62.50%、18.75%、59.38%、71.88%,p-Smad2/Smad2 比值分别降低 65.67%、41.79%、71.64%、77.61%,p-Smad3/Smad3 比值分别降低 65.31%、20.41%、61.22%、73.47%,Smad7 相对表达量分别升高 137.50%、37.50%、87.50%、287.50% (均 $P<0.05$);OMT 低、中、高剂量组上述效应呈现剂量依赖性 ($P<0.05$)。与 CTP 组比较,OMT 低剂量组 TGF- β 1、p-Smad2、p-Smad3 相对表达量和 p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 比值分别升高 206.67%、73.68%、116.67%、69.57%、129.41%,Smad7 相对表达量降低 42.11% (均 $P<0.05$);OMT 中剂量组 Smad7 相对表达量降低 21.05% ($P<0.05$),其他指标差异无统计学意义 ($P>0.05$);OMT 高剂量组 TGF- β 1、p-Smad2、p-Smad3 相对表达量和 p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 比值分别降低 26.67%、31.58%、25.00%、34.78%、23.53%,Smad7 相对表达量升高 63.16% (均 $P<0.05$;图 6)。

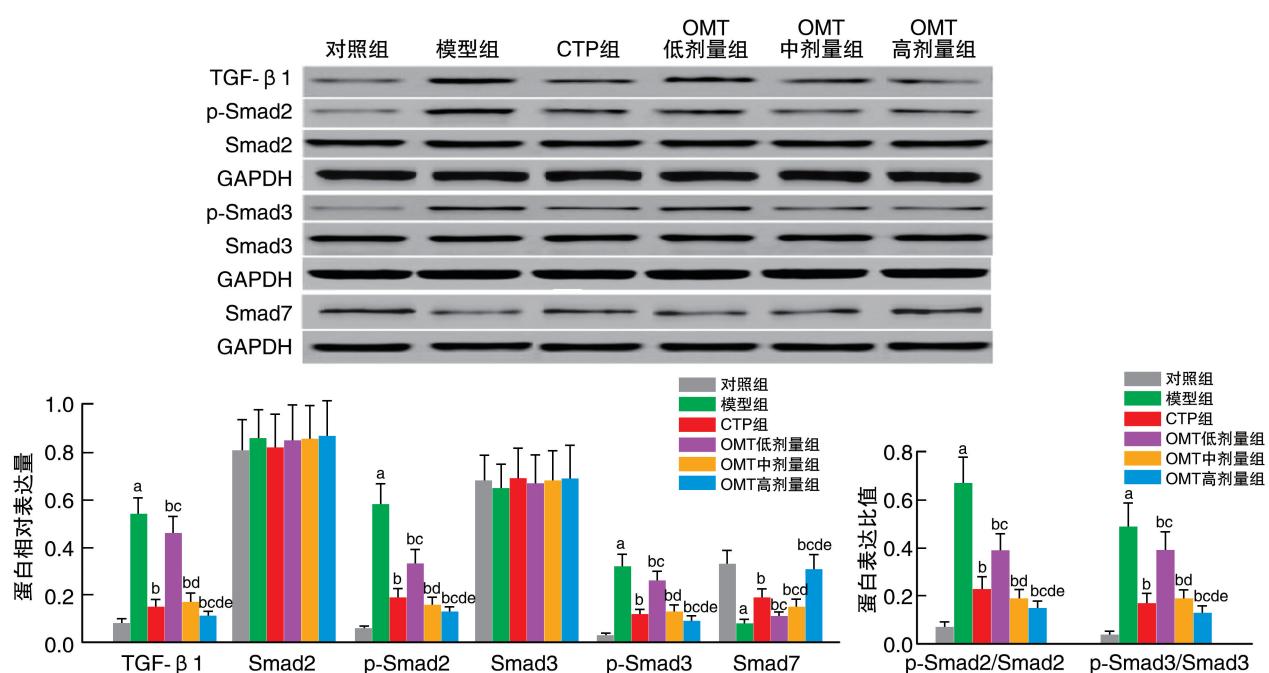


图6. 各组大鼠心肌组织 TGF- β 1、Smad2、p-Smad2、Smad3、p-Smad3、Smad7 蛋白表达及 p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 比值比较($n=10$)

a 为 $P<0.05$,与对照组相比;b 为 $P<0.05$,与模型组相比;c 为 $P<0.05$,与 CTP 组相比;

d 为 $P<0.05$,与 OMT 低剂量组相比;e 为 $P<0.05$,与 OMT 中剂量组相比。

Figure 6. Comparison of the expression of TGF- β 1, Smad2, p-Smad2, Smad3, p-Smad3, Smad7 and the ratio of p-Smad2/Smad2, p-Smad3/Smad3 in myocardial tissue of rats in each group ($n=10$)

3 讨 论

CHF 是高血压、动脉粥样硬化、心肌梗死、病毒性心肌炎等多种心血管疾病共同的终末期表现, 目前, 临幊上主要采取利尿剂、正性肌力药、 β 受体阻滞剂、血管紧张素受体拮抗剂等药物治疗, 能够一定程度上延缓心室重构, 但总体疗效并不理想, 并且长期用药易引发多种不良反应, 增加疾病风险和治疗难度。因此, 探索新型 CHF 治疗药物迫在眉睫。

中医药在慢性病治疗方面具有独特的优势, 在中医 CHF 可归属“心痹”“喘证”“心水”“水肿”等范畴, 其病机在于气血亏虚、血瘀痰浊阻滞, 宜采取益气温阳、活血利水等方案治疗。中药苦参是以豆科植物苦参的干燥根入药, 味苦性寒, 归心、肝、胃、大肠经, 具有补气化瘀、清热燥湿等功效。苦参素为中药苦参的主要活性成分, 研究证实, 苦参素对肝、肺等组织纤维具有抑制作用, 并且其机制与调控 TGF- β 1/Smads 信号通路有关^[10-11]。CHF 动物模型制备方法主要有主动脉缩窄术和药物造模两大类, 其中药物造模具有无创伤、操作简便、成功率高等优点。最常用的造模药物有异丙肾上腺素和阿霉素两种, 异丙肾上腺素是一种 β 受体激动剂, 通过加快心率、加重心脏负荷进而导致 CHF, 适用于缺血性心脏病所致 CHF 病理机制及药物研究; 阿霉素是一种蒽环类广谱化疗药物, 具有较强的心脏毒性, 可导致剂量依赖性和时间累积效应的 CHF, 可预测 CHF 形成时间, 是建立 CHF 模型的理想药物, 适用于充血性 CHF、扩张型心肌病以及化疗药物所致 CHF 等病理机制及药物研究^[13]。本实验采用腹腔注射阿霉素的方法构建 CHF 大鼠模型, 结果显示, CHF 模型大鼠心功能明显受损 (LVESD、LVEDD 升高, LVFS、LVEF、SV 降低), 心力衰竭标志性指标血清 cTnI、BNP、ST2 含量明显升高, LVHI 明显升高, 心肌组织可见心肌纤维肿胀、断裂、细胞排列紊乱、空泡样变、间质区肿胀, 以及血管周围、间质区胶原纤维等病理性改变, 与 Long 等^[14] 和 Wen 等^[15] 报道一致。进一步研究发现, 经 OMT 治疗 4 周能够明显降低 CHF 模型大鼠 LVESD、LVEDD 并提高 LVFS、LVEF、SV, 降低血清 cTnI、BNP、ST2 含量和 LVHI, 减轻心肌组织病变和心肌纤维化, 降低 CVF, OMT 上述作用呈现一定剂量依赖性, 并且 OMT 高剂量组效果优于 CTP 组, 提示 OMT 具有改善 CHF 大鼠心功能、抑制其心室重构的作用。

TGF- β 1 具有较强的促纤维化作用, 有文献报道

TGF- β 1 能够促使心肌成纤维细胞增殖与分化, 诱导 α -SMA 蛋白和胶原蛋白 (Coll-1 等) 转录与表达, 使细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 过度生成而沉积, 最终导致心室顺应性下降而影响其舒张与收缩功能^[16-17]。Smads 为 TGF- β 1 下游信号传导因子, TGF- β 1 通过与 TGF- β I 型跨膜受体 (T β R I) 和 II 型跨膜受体 (T β R II) 结合而诱导 Smad2、Smad3 磷酸化, p-Smad2 和 p-Smad3 核转位后与 DNA 特异位点结合而促进心肌成纤维细胞增殖以及 ECM 生成^[18-19]。Smad7 为抑制性 Smad 蛋白, 能够与 Smad2、Smad3 竞争性结合 T β R I 和 T β R II, 而对 TGF- β /Smads 信号通路起到负向调控作用^[20]。本研究结果显示, CHF 模型大鼠心肌组织 Coll-1、 α -SMA、TGF- β 1 表达量及 p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 比值明显升高, Smad7 表达量明显降低; 经 OMT 治疗 4 周能够明显降低 Coll-1、 α -SMA、TGF- β 1 表达量及 p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 比值, 明显升高 Smad7 表达量, 提示 OMT 改善 CHF 大鼠心功能和抑制其心室重构的作用机制可能与抑制 TGF- β 1/Smads 信号通路有关。这与赵娜等^[21] 报道苦参素通过抑制 TGF- β /Smads 信号通路改善糖尿病心肌大鼠心肌纤维化和心功能的报道相似。

综上所述, OMT 具有改善 CHF 大鼠心功能、抑制心室重构的作用, 其作用机制可能与抑制 TGF- β 1/Smads 信号通路有关。本研究结果为 OMT 用于 CHF 治疗提供了实验依据, 但其作用机制还有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] JAMES S L, ABATE D G, ABATE K H, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990—2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017 [J]. Lancet, 2018, 392 (10159): 1789-1858.
- [2] SHARMA K, PREMCHAND R K, MITTAL S, et al. Long-term follow-up of patients with heart failure and reduced ejection fraction receiving autonomic regulation therapy in the ANTHEM-HF pilot study [J]. Int J Cardiol, 2021, 323: 175-178.
- [3] 王羽, 刘志玄, 邱洪斌, 等. 心力衰竭重症患者院内死亡率的预测模型: 基于 MIMIC-III 数据库的回顾性研究 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(3): 245-252.
WANG Y, LIU Z X, QIU H B, et al. Nomogram for predicting hospital mortality in critically ill patients with heart failure: a retrospective study based on MIMIC-III database

- [J]. Chin J Arterioscler, 2023, 31(3): 245-252.
- [4] YANG H X, XU G R, ZHANG C, et al. The aqueous extract of Gentianella acuta improves isoproterenol induced myocardial fibrosis via inhibition of the TGF- β 1/Smads signaling pathway[J]. Int J Mol Med, 2020, 45(1): 223-233.
- [5] LIU F, SUN C F, CHEN Y F, et al. Indole-3-propionic acid-aggravated CCl₄-induced liver fibrosis via the TGF- β 1/Smads signaling pathway[J]. J Clin Transl Hepatol, 2021, 9(6): 917-930.
- [6] 朱茜文, 安海燕, 张亚平. 黄芪多糖通过调控 TGF- β 1/Smads 信号通路对百草枯诱导的大鼠肺纤维化的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2020, 41(4): 617-623.
- ZHU Q W, AN H Y, ZHANG Y P. Effects of astragalus polysaccharide on paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats by regulating TGF- β 1/Smads signaling pathway[J]. J Xi'an Jiaotong Univ Med Sci, 2020, 41(4): 617-623.
- [7] YE Z, XIAN W, LING G U, et al. Efficacy of danggui buxue decoction on diabetic nephropathy-induced renal fibrosis in rats and possible mechanism[J]. J Tradit Chin Med, 2023, 43(3): 507-513.
- [8] 林琳, 莫秋兰, 何革新, 等. 扶阳强心方对慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化及转化生长因子- β 1/Smad 信号通路表达的影响[J]. 广西医学, 2022, 44(3): 284-288, 295.
- LIN L, MO Q L, HE G X, et al. Effect of Fu Yang Qiang Xin Fang on myocardial fibrosis and expression of transforming growth factor- β 1/Smad signaling pathway in rats with chronic heart failure[J]. Guangxi Med J, 2022, 44(3): 284-288, 295.
- [9] LAN X, ZHAO J N, ZHANG Y, et al. Oxymatrine exerts organ- and tissue-protective effects by regulating inflammation, oxidative stress, apoptosis, and fibrosis: from bench to bedside[J]. Pharmacol Res, 2020, 151: 104541.
- [10] WU X L, ZENG W Z, JIANG M D, et al. Effect of oxymatrine on the TGF beta-Smad signaling pathway in rats with CCl₄-induced hepatic fibrosis[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(13): 2100-2105.
- [11] 刘勇, 朋汤义, 张晓悦. 苦参素抑制大鼠肺纤维化及机制研究[J]. 现代中药研究与实践, 2018, 32(5): 23-26.
- LIU Y, PENG T Y, ZHANG X Y. Inhibitory effect of oxymatrine on pulmonary fibrosis in rats and its mechanism [J]. Res Pract Chin Med, 2018, 32(5): 23-26.
- [12] SUN X T, SONG Y J, XIE Y, et al. Shenlijia attenuates doxorubicin-induced chronic heart failure by inhibiting cardiac fibrosis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 6659676.
- [13] 张倩, 卫晓红, 陈洁, 等. 慢性心力衰竭常用动物模型的研究进展及其在中医药研究中的应用[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(3): 614-624.
- ZHANG Q, WEI X H, CHEN J, et al. Advances in animal models of chronic heart failure and its applications in traditional Chinese medicine[J]. Chin J Chin Mater Med, 2023, 48(3): 614-624.
- [14] LONG K, ZHAO Z, CHEN J, et al. Yang-xin-xue keli exerts therapeutic effects via regulating mitochondrial homeostasis and function in doxorubicin-induced rat heart failure[J]. Front Pharmacol, 2022, 13(8): 931453.
- [15] WEN J X, ZHANG L, WANG J, et al. Therapeutic effects of higenamine combined with 6-gingerol on chronic heart failure induced by doxorubicin via ameliorating mitochondrial function[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(7): 4036-4050.
- [16] ZHANG X Q, QU H Y, YANG T, et al. Regulation and functions of NLRP3 inflammasome in cardiac fibrosis: current knowledge and clinical significance[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 143: 112219.
- [17] 邓华. 杜仲多糖通过 TGF- β 1/Smad 信号通路抑制 ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞增殖和迁移[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(6): 499-505.
- DENG H. Eucommia ulmoides polysaccharide inhibits the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells induced by oxidized low density lipoprotein through TGF- β 1/Smad signaling pathway[J]. Chin J Arterioscler, 2021, 29(6): 499-505.
- [18] CHE H, WANG Y, LI H, et al. Melatonin alleviates cardiac fibrosis via inhibiting lncRNA MALAT1/miR-141-mediated NLRP3 inflammasome and TGF- β 1/Smads signaling in diabetic cardiomyopathy[J]. FASEB J, 2020, 34(4): 5282-5298.
- [19] SUN Z F, LUO D, WANG S, et al. Salvianolic acid B inhibits myofibroblast differentiation and extracellular matrix accumulation in nasal polyp fibroblasts via the TGF- β 1 signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(6): 478.
- [20] LIU J F, KONG D L, QIU J F, et al. Praziquantel ameliorates CCl₄-induced liver fibrosis in mice by inhibiting TGF- β /Smad signalling via up-regulating Smad7 in hepatic stellate cells[J]. Br J Pharmacol, 2019, 176(24): 4666-4680.
- [21] 赵娜, 潘硕, 张勇, 等. TGF- β /Smads 信号通路参与苦参素抑制糖尿病心肌病大鼠心肌纤维化及改善心功能作用[J]. 山西医科大学学报, 2015, 46(11): 1056-1060.
- ZHAO N, PAN S, ZHANG Y, et al. TGF- β /Smads signal pathway is involved in the anti-fibrotic effect of matrine and improvement of the cardiac function in the diabetic cardiomyopathy rats[J]. J Shanxi Med Univ, 2015, 46(11): 1056-1060.

(此文编辑 许雪梅)