

柴胡加龙骨牡蛎汤调控 TGF- β 1/Smads 通路防治心肌梗死后大鼠心肌纤维化的研究

王潇媛^{1,3}, 朱翠玲^{1,2*}, 姜雷¹, 李一卓^{1,2*}, 李晓辉^{1,2}, 刘刚^{1,2},
孙彦琴^{1,2}, 宋森豫¹, 岳朝冲¹

(1. 河南中医药大学 第一附属医院 心脏中心, 河南 郑州 450000; 2. 中西医防治重大疾病河南省协同创新中心, 河南 郑州 450000; 3. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046)

[摘要] 观察柴胡加龙骨牡蛎汤对心肌梗死(MI)模型大鼠心肌纤维化损伤的改善作用,基于转化生长因子- β 1(TGF- β 1)/Smad 同源物(Smads)通路探讨该方对 MI 后心肌纤维化引起的心室重构的影响,以期揭示其潜在的效用机制。采用冠脉结扎法建立大鼠 MI 模型,分为假手术组、模型组、柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组,每组 10 只。柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组分别以 2.09、4.19、8.37 g·kg⁻¹ 剂量灌胃,假手术组和模型组以等容积蒸馏水灌胃,每日 1 次,连续 4 周。采用心脏彩超检测 MI 后大鼠的心功能,天狼星红染色、Masson 染色观察心肌纤维沉积情况及胶原容积分数(CVF),透射电镜观察心肌细胞超微结构变化,酶联免疫吸附测定法检测血清肌酸激酶同工酶(CK-MB)、心肌肌钙蛋白 T(cTnT)和可溶性生长刺激表达基因 2 蛋白(sST2)水平,蛋白免疫印迹法检测心肌纤维化相关蛋白 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、I 型胶原蛋白(Col I)表达,及 TGF- β 1/Smads 通路相关蛋白 TGF- β 1、Smad3、Smad7 的表达。与假手术组相比,模型组大鼠体质量、心功能明显下降,心室结构异常;胶原纤维沉积,纤维化面积增加,CVF 升高;心肌超微结构损伤严重,部分线粒体出现肿胀甚至破裂,肌原纤维排列紊乱溶解,肌节及肌丝断裂出现空隙;cTnT、sST2 和 CK-MB 水平升高,心肌纤维化明显;促纤维化细胞因子 TGF- β 1、Smad3 蛋白表达增多,抑制纤维化细胞因子 Smad7 蛋白表达减少,心肌纤维化相关蛋白 Col I、 α -SMA 表达增加。与模型组相比,各给药组大鼠体质量增加,心功能明显升高,异常心室结构得到改善;胶原纤维沉积减轻,纤维化面积减少,CVF 降低;心肌超微结构较完整,可见较正常的线粒体结构,肌原纤维及肌丝排列尚可;cTnT、sST2 和 CK-MB 水平降低;TGF- β 1、Smad3 蛋白表达减少,Smad7 蛋白表达升高,Col I、 α -SMA 蛋白表达降低。综上,柴胡加龙骨牡蛎汤可能通过调控 TGF- β 1/Smads 通路蛋白表达,进而减少细胞外基质的过度沉积,从而减轻心肌纤维化,改善心室重构。

[关键词] 心肌梗死; 心肌纤维化; 心室重构; 柴胡加龙骨牡蛎汤; TGF- β 1/Smads 通路

Chaihu Jia Longgu Muli Decoction alleviates myocardial fibrosis in rats with myocardial infarction through TGF- β 1/Smads pathway

WANG Xiao-yuan^{1,3}, ZHU Cui-ling^{1,2*}, JIANG Lei¹, LI Yi-zhuo^{1,2*}, LI Xiao-hui^{1,2}, LIU Gang^{1,2},
SUN Yan-qin^{1,2}, SONG Miao-yu¹, YUE Chao-chong¹

(1. Cardiac Center, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;
2. Collaborative Innovation Center of Prevention and Treatment of Major Diseases by Chinese and Western Medicine, Henan Province, Zhengzhou 450000, China; 3. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[收稿日期] 2025-06-07

[基金项目] 国家中医药管理局 2022 年度张仲景传承与创新专项(GZY-KJS-2022-044-2);国家自然科学基金青年科学基金项目(82405290);河南省中医药科学研究专项(2023ZY2027);深圳市医疗卫生三名工程项目(SZZYSM202411009)

[通信作者] * 朱翠玲, 硕士, 主任医师, 教授, 主要从事中医药防治心血管疾病临床研究, E-mail: zhudaifu666@126.com; * 李一卓, 博士, 主治医师, 主要从事中医药防治心血管疾病临床研究, E-mail: liyz2017@foxmail.com

[作者简介] 王潇媛, 硕士研究生, E-mail: wxy521225@163.com

[Abstract] This study observed the effect of Chaihu Jia Longgu Muli Decoction on myocardial fibrosis in the rat model of myocardial infarction (MI) and explored the effect of this decoction on ventricular remodeling induced by myocardial fibrosis after MI based on transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)/Smad proteins (Smads) pathway, aiming to reveal the therapeutic mechanism of this decoction. MI model rats were established by coronary artery ligation and assigned into sham, model, and low-dose, medium-dose, and high-dose (2.09, 4.19, and 8.37 g·kg⁻¹, respectively) Chaihu Jia Longgu Muli Decoction groups, with 10 rats in each group. Chaihu Jia Longgu Muli Decoction groups were administrated with the decoction at different doses by gavage, and the sham and model groups received an equal volume of distilled water once daily for 4 weeks. The cardiac function of rats after MI was assessed via echocardiography. Myocardial fiber deposition and collagen volume fraction (CVF) were observed by Sirius red staining and Masson staining. Ultrastructure changes of myocardial cells were observed by transmission electron microscopy. Creatine kinase isoenzymes (CK-MB), cardiac troponin T (cTnT), and soluble growth stimulation expressed gene 2 (sST2) levels were measured by ELISA. Western blot was employed to assess the protein levels of collagen I (Col I) and α -smooth muscle actin (α -SMA) associated with myocardial fibrosis, and TGF- $\beta 1$, Smad3, and Smad7 associated with the TGF- $\beta 1$ /Smads pathway. Compared with the sham group, the model group had significantly decreased body weight, compromised cardiac function, abnormal ventricular structure, collagen fiber deposition, increased fibrosis area and CVF, seriously damaged ultrastructure of myocardium, a part of mitochondria being swollen or even ruptured, disarrangement and lysis of myofibril, and broken myotome and myofilament with emergence of space. Furthermore, the model group showed risen levels of cTnT, sST2 and CK-MB, obvious myocardial fibrosis, up-regulated protein levels of pro-fibrotic cytokines TGF- $\beta 1$ and Smad3, down-regulated protein level of the inhibitory cytokine Smad7, and increased expression of myocardial fibrosis-related proteins Col I and α -SMA. Compared with the model group, Chaihu Jia Longgu Muli Decoction groups showed increased body weight, improved cardiac function and ventricular structure, reduced collagen fiber deposition, fibrosis area, and CVF, intact ultrastructure of myocardium, normal mitochondrial structure, and well-arranged myofibril and myofilament. In addition, Chaihu Jia Longgu Muli Decoction groups presented declined cTnT, sST2, and CK-MB levels, down-regulated protein levels of TGF- $\beta 1$ and Smad3, up-regulated protein level of Smad7, and reduced expression of Col I and α -SMA. Chaihu Jia Longgu Muli Decoction may reduce excessive deposition of extracellular matrix by regulating the expression of proteins in the TGF- $\beta 1$ /Smads pathway, thereby alleviating myocardial fibrosis and ameliorating ventricular remodeling.

[Key words] myocardial infarction; myocardial fibrosis; ventricular remodeling; Chaihu Jia Longgu Muli Decoction; TGF- $\beta 1$ /Smads pathway

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20250914.401

急性心肌梗死(AMI)是指于冠状动脉粥样硬化基础上形成血栓进而导致冠脉急性阻塞,从而使所在供血区域的心肌组织缺血缺氧,最终诱发心肌梗死的急性心血管疾病,也是导致患者死亡的常见原因之一^[1]。目前全球AMI死亡人数可超过发病人数的三分之一,我国近年来AMI病死率与往年相比呈总体上升趋势^[2-3]。AMI后由于心肌坏死发生的心室重构,是进一步诱发心功能降低、心律失常、慢性心力衰竭,甚至心源性猝死的主要原因,也是导致患者近远期预后较差的危险因素^[4]。心肌纤维化(MF)是由于坏死组织引起心肌细胞外基质(ECM)合成与降解失衡从而异常沉积,同时激活心肌成纤维细胞过度增殖、活化并异常转化为肌成纤维细胞,最终导致心肌ECM降解失常使各型胶原比例失调及排列紊乱,从而造成心脏瘢痕化、组织僵硬的病理现象^[5-6]。MF是心肌梗死(MI)后的主要病理变

化,同时也是心室重构的关键病理基础,增加心血管疾病再次发病的风险,严重影响AMI预后^[7]。因此,如何有效延缓MF,减轻心肌重构对改善MI患者预后具有重大意义。而转化生长因子- β (TGF- β)作为高效促纤维化细胞因子,通过刺激心脏成纤维细胞异常增生并激活TGF- $\beta 1$ /Smad同源物(Smads)通路促进ECM沉积及胶原生成异常从而导致MF^[8],可见能通过调节TGF- $\beta 1$ /Smads通路以达到抗AMI后MF的目的,从而减轻心肌重构对心功能造成进一步的损伤。

中医将AMI后MF归于“胸痹”范畴,AMI后少阳枢机不利导致胸腹气机运行失司滞于上焦,使胸阳阻遏不振、气血水湿不运以致邪乘阳位结痹于胸,故多见胸闷、胸痛、周身水肿、乏力,其所表现的症状与张仲景所言“胸满烦惊”“小便不利”“一身尽重,不可转侧”等颇为相似。柴胡加龙骨牡蛎汤作为

《伤寒论》中经典的柴胡类代表方,具有和解少阳、通阳泄热的功效,广泛运用于心血管疾病的临床治疗^[9],效如桴鼓。研究表明,柴胡加龙骨牡蛎汤中的部分中药活性成分如柴胡皂苷D、汉黄芩素等可以通过相关通路作用于心肌组织减轻炎症损伤从而抑制或改善MF^[10-11],然而对于柴胡加龙骨牡蛎汤抑制MF的机制研究鲜有报道。因此,本研究基于AMI后MF大鼠模型,初步探讨柴胡加龙骨牡蛎汤对TGF- β 1/Smads通路相关蛋白表达的影响,旨在阐明其作用机制,为临床用药奠定实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康SPF级雄性SD大鼠50只,购于郑州大学(河南省实验动物中心),7~8周龄,体重(200±20)g,生产许可证号SCXK(豫)2022-0001,合格证编号411006231100102981。动物于河南中医药大学第一附属医院中心实验室动物房饲养。动物房环境条件理想,空气流通良好,室内温度23~25℃,相对湿度55%±5%,昼夜光暗交替12h,期间大鼠自由饮水和摄食。本实验饲养及处理过程严格遵守《实验动物管理和使用指南》要求,实验获河南中医药大学第一附属医院伦理委员会审查批准(伦理批准文号YFYDW2023004)。

1.2 药物制备 柴胡加龙骨牡蛎汤生药量基于《伤寒论》原方药物比例结合朱翠玲教授临床常规用药剂量而定:柴胡24g、黄芩9g、清半夏12g、龙骨9g、牡蛎9g、茯苓9g、人参9g、桂枝9g、大黄12g、生姜9g、大枣9g,根据《河南省中药配方颗粒标准》将饮片用量按比例换算为中药颗粒剂39.87g·d⁻¹,购自四川新绿色药业科技发展有限公司(批号分别为21100244、21100148、21100259、21090013、21080135、22080301、21050001、21080021、21080178、21100071、21060011)。依据成人(60kg)与动物体表面积等效剂量换算系数^[12],柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组给药剂量分别为2.09、4.19、8.37g·kg⁻¹,将柴胡加龙骨牡蛎汤颗粒加蒸馏水配制成质量浓度分别为0.21、0.42、0.84g·mL⁻¹,保存于4℃冰箱。

1.3 试剂 肌酸激酶同工酶(CK-MB)、心肌肌钙蛋白T(cTnT)、可溶性生长刺激表达基因2蛋白(sST2)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为GM1122、GB113806、GB113275);天狼星红染色试剂盒(武汉

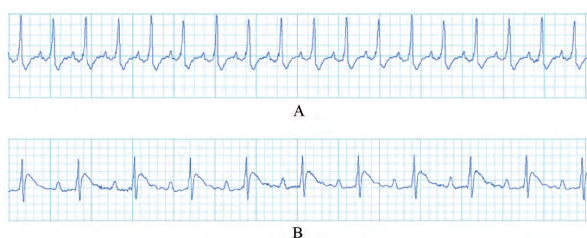
赛维尔生物科技有限公司,批号GP1138);马松(Masson)染色液试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号G1006);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体、I型胶原蛋白(Col I)抗体、TGF- β 1抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为GB15004、GB111364、GB114197、GB111876);Smad同源物3(Smad3)抗体、Smad同源物7(Smad7)抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为66516-Ig、25840-I-AP);HRP山羊抗小鼠二抗、HRP山羊抗兔二抗(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为GB23301、GB23303)。

1.4 仪器 ALC-V8S型小动物呼吸机(上海奥尔科特生物科技有限公司);MICRO MAXX型彩色多普勒超声诊断仪(美国索诺声公司);BL-420F型生物信号采集系统(成都泰盟软件有限公司);KZ-II型高速组织研磨仪、SCG-W2000型化学发光成像仪(武汉赛维尔生物科技有限公司);Epoch型酶标检测仪(美国BioTek公司);Nikon Eclipse C1型正置荧光显微镜(日本尼康公司);HITACHI HT770型透射电子显微镜(日本日立公司)。

2 方法

2.1 造模 大鼠适应性饲养1周后,采用冠状动脉左前降支结扎法构建AMI大鼠模型^[13]。通过腹腔注射1%戊巴比妥钠(5mL·kg⁻¹)将大鼠麻醉后仰卧固定于操作台上,于左侧胸部脱毛备皮、消毒。经口部完成气管插管,使用小动物呼吸机,潮气25mL·kg⁻¹,呼吸比2:1,频率每分钟70次。通过肢体导联连接心电图并记录手术前后心电图变化。选取大鼠心尖搏动最强处的上一肋间(第4肋间)横向做一切口,逐层钝性分离扩开胸壁,暴露第3、4肋骨后钝性分离肋间肌,将撑胸器放至肋间隙以暴露心脏,用6-0眼科缝合线穿过并结扎左冠状动脉前降支根部,即左心耳与肺动脉圆锥间距主动脉根部2~3mm处,假手术组暴露心脏后只穿线不结扎。模型构建成功的标准^[13]为结扎处下方心尖部颜色变白,室壁运动减退,心电图出现ST段弓背抬高。模型复制成功后清除胸腔积血并挤出空气,逐层缝合后拔出气管插管。术后每只大鼠注射2×10⁵U青霉素连续2d以预防感染。造模前后心电图对比见图1。

2.2 分组及给药 随机选取40只大鼠构建AMI模型,随机分为模型组、柴胡加龙骨牡蛎汤低剂量组



A.假手术组; B.模型组。

图 1 造模前后大鼠心电图对比

Fig.1 Comparison of electrocardiograms in rats before and after modeling

($2.09 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、柴胡加龙骨牡蛎汤中剂量组($4.19 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、柴胡加龙骨牡蛎汤高剂量组($8.37 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、每组 10 只;另设假手术组 10 只。柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组大鼠给予对应浓度的药物灌胃,假手术组及模型组灌胃给予等量蒸馏水,每日 1 次,连续 4 周。

2.3 大鼠心功能超声检测 末次给药 24 h 后进行超声心动图检测,运用 M 型超声水平测量并记录连续 3 个心动周期,检测各组大鼠心脏左室收缩末期内径(LVESD)、左室舒张末期内径(LVEDD)、左室射血分数(LVEF)、左室短轴缩短率(LVFS),以评估心脏功能。

2.4 ELISA 测定大鼠血清中 CK-MB、cTnT 和 sST2 水平 麻醉后的大鼠经腹主动脉取血并静置于室温 1 h, 4°C $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,分离血清,采用 ELISA 测定血清中 CK-MB、cTnT 和 sST2 水平。

2.5 天狼星红染色及 Masson 染色观察大鼠心肌组织病理学变化 所有大鼠取血完成后,将开胸剖取的的心脏置于 4% 多聚甲醛中固定 48 h,石蜡包埋制成常规心脏组织切片($4 \mu\text{m}$)。天狼星红染色:取石蜡切片脱蜡至水,经苏木素浸染、天狼星红浸染后脱水封片,正置光学显微镜下观察胶原纤维沉积情况。Masson 染色:将石蜡切片脱蜡至水,经苏木素滴染、酸性乙醇分化返蓝及丽春红和苯胺蓝复染后脱水封片,在光学显微镜下观察 MF 情况,并通过 ImageJ 软件计算其胶原容积分数(CVF)。

2.6 大鼠心肌组织超微结构观察 取大鼠左室心尖部组织,由电镜固定液固定、乙醇、环氧丙烷浸泡脱水、包埋、超薄切片($60 \sim 80 \text{ nm}$)后轴铅双染色,最后用透射电镜观察并镜下采集图像分析。

2.7 蛋白免疫印迹法测定大鼠 TGF- β 1/Smads 通路相关蛋白表达 取大鼠心肌组织,经 PBS 冲洗后使用 RIPA 裂解液提取总蛋白并通过 BCA 蛋白检测试剂盒进行蛋白定量。经 SDS-PAGE 电泳分离样本中的蛋白后进行转膜,于室温下加入 5% 脱脂奶粉封闭抗体 1 h,加入一抗($1:2\,000$) 4°C 孵育摇床过夜,室温下加二抗($1:5\,000$)于样本中孵育 1 h,化学发光法显色,保存原始图并使用 AIWBwell™ 分析软件进行数据分析。

2.8 统计学处理 数据分析采用 SPSS 25.0 软件,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验;若方差不齐,采用 Dunnett's T3 检验或者非参数检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般状态与体质量变化 因大鼠不耐受 AMI 模型构建等因素,本研究最终纳入每组 8 只大鼠。实验进行前(第 0 周),各组大鼠体质量相当,具有可比性。造模完成后,行药物灌胃,并于第 2、4 周测量大鼠体质量。第 2 周,与假手术组比较,模型组大鼠体质量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组大鼠体质量显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。第 4 周,与假手术组比较,模型组大鼠体质量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组大鼠体质量显著升高($P < 0.01$),见表 1。

表 1 各组大鼠体质量的比较($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)Table 1 Comparison of the weight of rats in each group($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

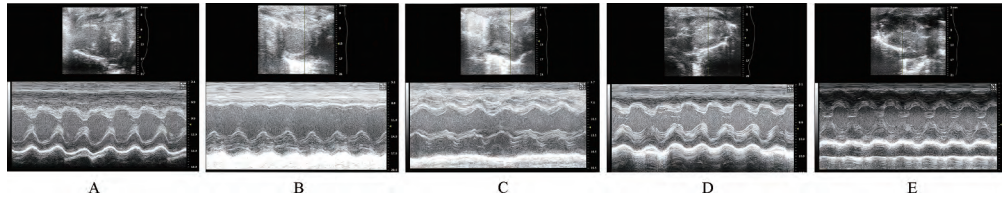
组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	体质量/g		
		第 0 周	第 2 周	第 4 周
假手术	-	193.50 $\pm$ 4.90	244.38 $\pm$ 3.16	259.25 $\pm$ 1.67
模型	-	188.50 $\pm$ 7.60	206.88 $\pm$ 2.03 ¹⁾	212.13 $\pm$ 4.22 ¹⁾
柴胡加龙	2.09	191.25 $\pm$ 9.47	210.25 $\pm$ 3.15 ²⁾	227.38 $\pm$ 2.83 ³⁾
骨牡蛎汤	4.19	194.25 $\pm$ 7.36	219.50 $\pm$ 2.67 ³⁾	235.13 $\pm$ 4.22 ³⁾
	8.37	195.63 $\pm$ 5.71	227.88 $\pm$ 4.16 ³⁾	245.50 $\pm$ 5.98 ³⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2~5 同)。

3.2 柴胡加龙骨牡蛎汤对 MI 后 MF 大鼠心室结构及心功能的影响 给药 4 周后,与假手术组比较,模型组大鼠 LVEF、LVFS 显著降低($P < 0.01$),LVEDD、LVESD 显著升高($P < 0.01$),表明 AMI 后

MF 大鼠模型构建成功且心功能及心室结构异常;与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组大鼠 LVEF、LVFS 均显著升高 ($P<0.01$),LVEDD、

LVESD 均显著降低 ($P<0.05$ $P<0.01$),可见柴胡加龙骨牡蛎汤能够改善 AMI 大鼠心功能及心室结构异常且高剂量组改善效果更加显著,见图 2、表 2。



A.假手术组; B.模型组; C.柴胡加龙骨牡蛎汤低剂量组; D.柴胡加龙骨牡蛎汤中剂量组; E.柴胡加龙骨牡蛎汤高剂量组(图 3~6 同)。

图 2 各组大鼠心脏彩超的对比

Fig.2 Comparison of cardiac ultrasound of rats in each group

表 2 各组大鼠心功能参数的比较($\bar{x}\pm s$ $n=5$)

Table 2 Comparison of cardiac function parameters of rats in each group($\bar{x}\pm s$ $n=5$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	LVEF/%	LVFS/%	LVEDD/mm	LVESD/mm
假手术	—	80.84 ± 1.37	49.48 ± 1.44	4.65 ± 0.02	2.35 ± 0.07
模型	—	$42.74\pm 4.77^{1)}$	$21.57\pm 2.83^{1)}$	$6.68\pm 0.25^{1)}$	$5.11\pm 0.12^{1)}$
柴胡加龙骨牡蛎汤	2.09	$56.75\pm 1.95^{3)}$	$30.34\pm 1.31^{3)}$	$6.02\pm 0.15^{2)}$	$4.21\pm 0.28^{3)}$
	4.19	$64.52\pm 2.28^{3)}$	$35.73\pm 1.87^{3)}$	$5.61\pm 0.46^{2)}$	$3.73\pm 0.20^{3)}$
	8.37	$70.64\pm 1.47^{3)}$	$40.21\pm 1.52^{3)}$	$5.03\pm 0.64^{2)}$	$3.00\pm 0.32^{3)}$

3.3 柴胡加龙骨牡蛎汤对 MI 后 MF 大鼠血清 cTnT、sST2 和 CK-MB 水平的影响 干预 4 周后,与假手术组比较,模型组大鼠血清中 cTnT、sST2 和 CK-MB 水平均显著升高 ($P<0.01$);与模型组

比较,柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组大鼠血清中 cTnT、sST2 和 CK-MB 水平均显著降低 ($P<0.05$ $P<0.01$),且高剂量组降低更明显,见表 3。

表 3 各组大鼠血清生化指标的比较($\bar{x}\pm s$ $n=3$)

Table 3 Comparison of serum biochemical indicators of rats in each group($\bar{x}\pm s$ $n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	cTnT/ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$	sST2/ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$	CK-MB/ $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$
假手术	—	0.58 ± 0.02	24.71 ± 4.19	0.19 ± 0.05
模型	—	$2.92\pm 0.05^{1)}$	$49.56\pm 5.23^{1)}$	$0.79\pm 0.08^{1)}$
柴胡加龙骨牡蛎汤	2.09	$1.34\pm 0.19^{2)}$	$42.23\pm 1.84^{2)}$	$0.60\pm 0.08^{3)}$
	4.19	$1.04\pm 0.05^{3)}$	$38.77\pm 2.02^{3)}$	$0.47\pm 0.05^{3)}$
	8.37	$0.66\pm 0.05^{3)}$	$33.83\pm 0.94^{3)}$	$0.33\pm 0.07^{3)}$

3.4 柴胡加龙骨牡蛎汤对 MI 后大鼠 MF 的影响 天狼星红染色后红色区域为胶原纤维,黄色区域为肌纤维,其他类型胶原纤维不可见。假手术组细胞间质可见少量红色胶原纤维散在分布,且肌丝排列紧密有序;模型组可见间质内胶原纤维增多、变粗,呈束状浸润性分布排列紊乱,红色胶原纤维明显增加;与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量

组大鼠间质内胶原纤维减少、变细,红色胶原纤维显著降低,梗死边缘区纤维化程度明显减轻,见图 3。

Masson 染色结果显示,假手术组心肌纤维规则排列,心肌纹理整齐清晰且呈正常形态结构,未见明显的蓝色胶原纤维及异常沉积;与假手术组比较,模型组心肌纤维排列紊乱,可见大量走行混乱的蓝色胶原纤维及严重胶原沉积且部分出现肌纤维断裂,

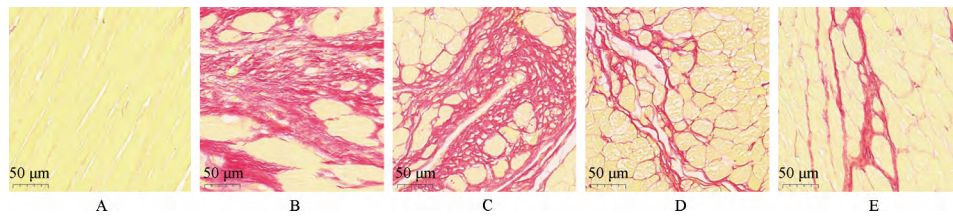


图 3 柴胡加龙骨牡蛎汤对心肌梗死后大鼠心肌组织纤维化的影响(天狼星红染色 $\times 200$)

Fig.3 Effect of Chaihu Jia Longgu Muli Decoction on myocardial fibrosis in rats after myocardial infarction (sirius red staining, $\times 200$)

纤维化面积明显增加,CVF 显著升高($P<0.01$),MF 严重;与模型组相比,柴胡加龙骨牡蛎汤各给药组心

肌纤维紊乱减轻,蓝色胶原纤维减少且胶原沉积改善,CVF 显著降低($P<0.01$),MF 减轻,见图 4、表 4。

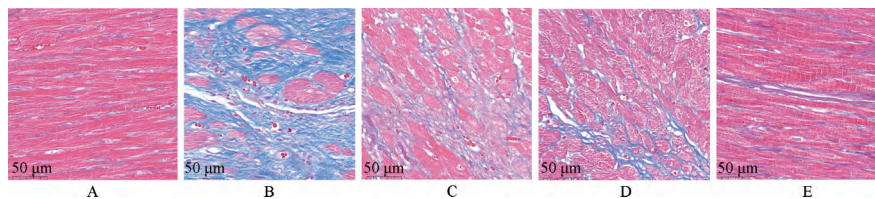


图 4 柴胡加龙骨牡蛎汤对心肌梗死后大鼠心肌组织纤维化的影响(Masson 染色 $\times 200$)

Fig.4 Effect of Chaihu Jia Longgu Muli Decoction on myocardial fibrosis in rats after myocardial infarction (Masson staining, $\times 200$)

表 4 各组大鼠 CVF 的比较($\bar{x}\pm s$ $n=3$)

Table 4 Comparison of CVF of rats in each group($\bar{x}\pm s$ $n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	CVF/%
假手术	—	10.45 $\pm$ 0.30
模型	—	44.10 $\pm$ 0.52 ¹⁾
柴胡加龙骨牡蛎汤	2.09	30.59 $\pm$ 1.50 ³⁾
	4.19	18.91 $\pm$ 1.64 ³⁾
	8.37	13.23 $\pm$ 0.35 ³⁾

3.5 柴胡加龙骨牡蛎汤对 MI 后大鼠心肌组织超微结构的影响 透射电子显微镜显示,假手术组大鼠心肌超微结构相对完好,肌原纤维排列紧密整齐,“Z”带连续,可见相对较完整的正常线粒体;

与假手术组比较,模型组心肌超微结构损伤严重,肌原纤维排列疏松紊乱,部分纤维断裂、溶解,肌节断裂且排列紊乱,“Z”带不连续,肌丝断裂出现空隙,可见排列紊乱、形态不规则、肿胀甚至破裂的受损线粒体;与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组肌原纤维及肌丝排列尚可,可见接近正常的线粒体结构,柴胡加龙骨牡蛎汤低剂量组可见肌原纤维排列较松散,线粒体肿胀部分呈空泡样变性;柴胡加龙骨牡蛎汤中剂量组肌原纤维排列有所改善趋于规则,线粒体部分肿胀空泡化;柴胡加龙骨牡蛎汤高剂量组肌原纤维排列改善明显较紧实规则,线粒体结构相对完整,见图 5。

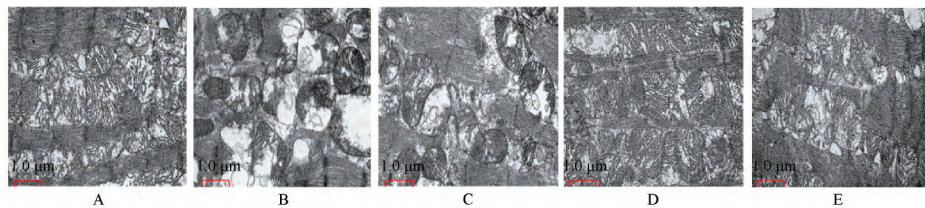


图 5 柴胡加龙骨牡蛎汤对心肌梗死后大鼠心肌组织超微结构的影响(透射电镜 $\times 10\,000$)

Fig.5 Effect of Chaihu Jia Longgu Muli Decoction on ultrastructure of myocardial tissue in rats after myocardial infarction (transmission electron microscope $\times 10\,000$)

3.6 柴胡加龙骨牡蛎汤对 MF 大鼠 α -SMA、Col I 蛋白及 TGF- β 1/Smads 通路相关蛋白表达的影响

干预 4 周后,与假手术组比较,模型组大鼠 α -SMA、Col I、TGF- β 1、Smad3 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$),Smad7 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$),见图 6、表 5。与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤中、高剂量组 α -SMA、Col I、Smad3 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),柴胡加龙骨牡蛎汤低剂量组 α -SMA、Col I、Smad3 蛋白表达虽然存在降低趋势,但差异无统计学意义;与模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤高剂量组 TGF- β 1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$),柴胡加龙骨牡蛎汤低、中剂量组 TGF- β 1 蛋白表达虽然存在降低趋势,但差异无统计学意义;与

模型组比较,柴胡加龙骨牡蛎汤低、中、高剂量组 Smad7 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.01$),见图 6、表 5。

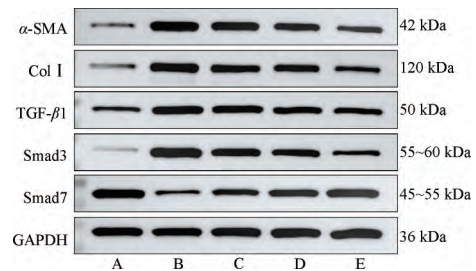


图 6 α -SMA、Col I 及 TGF- β 1/Smads 通路相关蛋白条带
Fig.6 Bands of α -SMA, Col I, and TGF- β 1/Smads pathway related proteins

表 5 各组大鼠 α -SMA、Col I 及 TGF- β 1/Smads 通路相关蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 5 Comparison of the expression of α -SMA, Col I, and TGF- β 1/Smads pathway related proteins of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	α -SMA/GAPDH	Col I /GAPDH	TGF- β 1/GAPDH	Smad3/GAPDH	Smad7/GAPDH
假手术	-	0.14 $\pm$ 0.03	0.29 $\pm$ 0.17	0.27 $\pm$ 0.16	0.15 $\pm$ 0.01	1.41 $\pm$ 0.04
模型	-	1.24 $\pm$ 0.27 ¹⁾	0.99 $\pm$ 0.17 ¹⁾	1.12 $\pm$ 0.27 ¹⁾	1.01 $\pm$ 0.22 ¹⁾	0.22 $\pm$ 0.04 ¹⁾
柴胡加龙骨牡蛎汤	2.09	1.05 $\pm$ 0.21	0.84 $\pm$ 0.14	0.86 $\pm$ 0.34	0.83 $\pm$ 0.19	0.39 $\pm$ 0.08 ³⁾
	4.19	0.81 $\pm$ 0.22 ²⁾	0.70 $\pm$ 0.17 ²⁾	0.73 $\pm$ 0.31	0.65 $\pm$ 0.16 ²⁾	0.56 $\pm$ 0.08 ³⁾
	8.37	0.61 $\pm$ 0.24 ³⁾	0.55 $\pm$ 0.13 ³⁾	0.59 $\pm$ 0.28 ²⁾	0.40 $\pm$ 0.08 ³⁾	0.89 $\pm$ 0.05 ³⁾

4 讨论

MF 是 AMI 后病情进展的基本病理过程,过度的纤维化会导致心室的形态和结构持续性改变,从而使心室病理性重塑进一步引起心脏舒缩功能障碍,最终出现心力衰竭、恶性心律失常等严重心血管疾病^[14-15]。可见 MF 在 AMI 后心室重构的发生发展中发挥关键作用,同时也是造成心力衰竭甚至猝死等不良事件的独立危险因素,控制 MF 可作为改善心肌功能、预防 AMI 后心力衰竭的关键治疗靶点。故明确柴胡加龙骨牡蛎汤通过 TGF- β 1/Smads 通路对 AMI 后 MF 的共病机制十分重要。

AMI 后因机体损伤及摄入食、水减少导致体质量减轻^[16-17]。左心室舒张末期压力(LVEDP)与左心室收缩功能关系密切,而 LVEDP 随体质量的降低而增加,此外 TNF- α 与其他细胞因子通常与饮食失调和心脏恶病质相关,TNF- α 可使心肌细胞和心肌成纤维细胞生成超氧化物,诱导心肌细胞凋亡和调节 ECM 的合成等多种途径参与 MF 的发生、发展^[18]。

本研究结果显示,模型组大鼠体质量显著下降,各给药组大鼠体质量上升,推测柴胡加龙骨牡蛎汤可改善大鼠状态,增加体质量延缓 MF 进程。AMI 后由于心肌组织缺血坏死使心室结构异常改变,收缩、舒张功能下降。本实验通过对各组大鼠进行超声心动图检测发现,不同剂量柴胡加龙骨牡蛎汤干预后,大鼠的 LVEDD、LVESD 水平显著下降,LVEF、LVFS 水平均显著提升,因此柴胡加龙骨牡蛎汤能有效改善 AMI 大鼠心功能。CK-MB 作为心肌细胞能量代谢中的关键酶,心肌损伤或细胞膜通透性改变时出现细胞内物质外漏,导致血清 CK-MB 活性升高,CK-MB 水平升高与心肌损伤呈正相关,是心肌损伤中的特异性标志物^[19]。cTnT 作为心肌细胞中特异性表达的调节蛋白,当出现心肌损伤后会导致大量心肌细胞调控细胞凋亡的基因启动进而导致细胞坏死破裂使 cTnT 迅速释放到血液中,因此可作为反映心肌缺血或损伤程度的标志物。sST2 作为心肌细胞中的一种应激蛋白,由心肌细胞在过重负荷、炎症或

巨噬细胞激活下诱导产生,其作为心肌成纤维细胞激活剂从而参与 MF 病理过程^[20]。目前研究表明,sST2 蛋白可生成促进心肌成纤维细胞的活性氧和炎症分子从而使 MF 的程度加重^[21],同时 sST2 还能通过调节 TGF- β 蛋白表达使纤维化相关通路被激活进而介导成纤维细胞活化及胶原纤维的异常增生与沉积,从而引起 MF^[22],因此其表达水平也可作为评估 MF 程度的潜在标志物。本实验结果显示,各给药组大鼠血清中 CK-MB、cTnT、sST2 水平均显著下降,表明柴胡加龙骨牡蛎汤能够明显减轻 AMI 大鼠心肌损伤,延缓 MF 的病理过程。

TGF- β 1/Smads 通路广泛参与了成纤维细胞异常增殖及胶原合成的过程,是病理性纤维化的关键使动通路^[23]。TGF- β 1 是 TGF- β 超家族中最强的致纤维化生长因子,同时也是 MF 的主要驱动蛋白^[24]。当 TGF- β 1 被过度释放与激活后可以诱导心脏成纤维细胞异常增殖并活化成肌成纤维细胞,同时导致肌原蛋白合成异常及纤维连接蛋白沉积从而引起 MF^[25-26]。Smads 蛋白是 TGF- β 1 下游特异性胞内转导蛋白,可以将 TGF- β 1 的信号从细胞膜受体转入细胞核内^[27],在促进 MF 和心肌重构过程中发挥重要作用。研究表明,TGF- β 1 异常激活后与细胞膜上受体结合诱导 T β R-I 磷酸化进而特异性调控下游细胞质介体 Smads(主要是 Smad2/3)磷酸化,继而磷酸化的 Smad2/3 与 Smad4 结合导致异源三聚体复合物形成并进一步转至细胞核内介导促纤维化基因的表达^[28]。 α -SMA 作为 MF 的重要标志物,其异常表达代表了肌成纤维细胞的过度增殖、迁移、活化,同时也能增强胶原蛋白及纤维连接蛋白的合成加剧纤维化的发生^[29-30]。Col I 蛋白作为心肌 ECM 的主要胶原蛋白,因其厚纤维的特性而具有抗拉伸的能力,只有心肌 ECM 中 Col I 与 Col III 的含量及比例适度时才能使心脏舒缩功能正常发挥^[31-32]。当 AMI 后心肌细胞坏死释放出大量促炎因子使 TGF- β 1/Smads 通路被过度激活,导致 Smads 复合物形成并转移到核内进一步上调 Col I、Col III 和 α -SMA 靶基因的转录,使胶原蛋白比例及代谢失衡,进一步加剧 ECM 沉积,最终诱导心脏间质纤维胶原的累加及排列紊乱,从而促进 MF 进展。Smad7 作为特异性的抗 Smads 蛋白,通过与被激活的 TGF- β 1 受体竞争性结合以阻断磷酸化的 R-Smads 合成,进一步干预促纤维化基因的表达,从而对 TGF- β 1/

Smads 通路的信号传递起负调控作用以改善 MF 的过程并延缓心室重构的发生^[33];梁浩等^[34]研究发现 miR-92a 可能通过靶向调控 Smad7 的表达来干预 TGF- β 1/Smads 信号传导进而改善 MF。本研究通过天狼星红、Masson 染色及透射电镜观察,表明 MI 后大鼠心脏组织出现较为明显的 MF 损伤,经柴胡加龙骨牡蛎汤治疗后 MI 大鼠 MF 损伤呈现出不同程度改善。本研究结果显示,各给药组大鼠 α -SMA、Col I、TGF- β 1、Smad3 蛋白表达与模型组相比均存在下降趋势,而 Smad7 蛋白表达明显升高,可见柴胡加龙骨牡蛎汤可能通过抑制 α -SMA、Col I、TGF- β 1、Smad3 蛋白表达同时促进 Smad7 蛋白表达,进而调控 TGF- β 1/Smads 通路降低心肌胶原蛋白表达水平以达改善 MF 的目的。

综上,柴胡加龙骨牡蛎汤能改善 AMI 后大鼠 MF 损伤。其作用机制可能与减轻心肌结构损伤,调控 TGF- β 1/Smads 通路蛋白表达水平,进而减少胶原纤维合成及 ECM 的过度沉积,从而减轻 MF,改善心室重构有关。

[参考文献]

- [1] GULATI R, BEHFAR A, NARULA J, et al. Acute myocardial infarction in young individuals [J]. Mayo Clin Proc, 2020, 95 (1): 136.
- [2] REED G W, ROSSI J E, CANNON C P. Acute myocardial infarction [J]. Lancet, 2017, 389(10065): 197.
- [3] 张赤道, 黄金雨, 王永霞, 等. 中成药治疗急性心肌梗死后心力衰竭的临床研究证据图分析 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49 (6): 1673.
- [4] KAPUR N K, THAYER K L, ZWECK E. Cardiogenic shock in the setting of acute myocardial infarction [J]. Methodist Debakey Cardiovasc J, 2020, 16(1): 16.
- [5] ZHANG Q J, HE Y, LI Y, et al. Matricellular protein Cilp1 promotes myocardial fibrosis in response to myocardial infarction [J]. Circ Res, 2021, 129(11): 1021.
- [6] VAN PUTTEN S, SHAFIEYAN Y, HINZ B. Mechanical control of cardiac myofibroblasts [J]. J Mol Cell Cardiol, 2016, 93: 133.
- [7] WANG S, LIU Y, HU X, et al. Identification of ceRNA (lncRNA-miRNA-mRNA) regulatory network in myocardial fibrosis after acute myocardial infarction [J]. Int J Gen Med, 2021, 14: 9977.
- [8] WU M, GUO Y, WU Y, et al. Protective effects of sacubitril/valsartan on cardiac fibrosis and function in rats with experimental myocardial infarction involves inhibition of collagen synthesis by myocardial fibroblasts through downregulating TGF- β 1/Smads pathway [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 696472.
- [9] 刘恒亮, 金子轩, 苏克雷, 等. 基于现代病理生理机制的柴胡加

- 龙骨牡蛎汤方证解读及临床运用体会[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(10): 2620.
- [10] 李耀征, 白保强, 孙亚勤, 等. 基于 Nox4/PKC α /Gal-3 通路探讨柴胡皂苷 D 对心肌梗死大鼠心肌纤维化的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21(20): 3724.
- [11] 霍雨佳, 阳远舟, 邹成丽, 等. 汉黄芩素调节 Hippo/YAP 信号通路对慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2024, 22(15): 2740.
- [12] 黄娟萍, 罗裕, 江力, 等. 中药药动学研究中给药剂量的现状分析[J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(21): 1685.
- [13] FANG Z L, LAI D X, LEI L, et al. LMK235 ameliorates inflammation and fibrosis after myocardial infarction by inhibiting LSD1-related pathway [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 23450.
- [14] MURTHA L A, SCHULIGA M J, MABOTUWANA N S, et al. The processes and mechanisms of cardiac and pulmonary fibrosis [J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 777.
- [15] DEFILIPPIS A P, CHAPMAN A R, MILLS N L, et al. Assessment and treatment of patients with type 2 myocardial infarction and acute nonischemic myocardial injury [J]. *Circulation*, 2019, 140(20): 1661.
- [16] FARIA T O, BALDO M P, SIMÕES M R, et al. Body weight loss after myocardial infarction in rats as a marker of early heart failure development [J]. *Arch Med Res*, 2011, 42(4): 274.
- [17] 寿松涛, 林美光, 毛用敏, 等. 急性心肌梗死模型大鼠经血管内皮生长因子 121 基因治疗后的血管新生(英文) [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(7): 1241.
- [18] 王健, 李芳, 周晓露, 等. 加味真武汤辨治慢性心力衰竭阳气亏虚证心肌纤维化的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(11): 173.
- [19] YANG R, JIA Q, LIU X F, et al. Effect of genistein on myocardial fibrosis in diabetic rats and its mechanism [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 2929.
- [20] DUDEK M, KALUŻNA-OLEKSY M, MIGAJ J, et al. sST2 and heart failure-clinical utility and prognosis [J]. *J Clin Med*, 2023, 12(9): 3136.
- [21] MATILLA L, IBARROLA J, ARRIETA V, et al. Soluble ST2 promotes oxidative stress and inflammation in cardiac fibroblasts: an *in vitro* and *in vivo* study in aortic stenosis [J]. *Clin Sci*, 2019, 133(14): 1537.
- [22] MATILLA L, ARRIETA V, JOVER E, et al. Soluble St2 induces cardiac fibroblast activation and collagen synthesis via neuropilin-1 [J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1667.
- [23] CHAMBERS D M, MORETTI L, ZHANG J J, et al. LEM domain-containing protein 3 antagonizes TGF β -SMAD2/3 signaling in a stiffness-dependent manner in both the nucleus and cytosol [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(41): 15867.
- [24] AKHURST R J, HATA A. Targeting the TGF β signalling pathway in disease [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11(10): 790.
- [25] HU H H, CHEN D Q, WANG Y N, et al. New insights into TGF β /Smad signaling in tissue fibrosis [J]. *Chem Biol Int*, 2018, 292: 76.
- [26] XIE J, TU T, ZHOU S H, et al. Transforming growth factor (TGF) β 1 signal pathway: a promising therapeutic target for attenuating cardiac fibrosis [J]. *Int J Cardiol*, 2017, 239: 9.
- [27] ALGECIRAS L, PALANCA A, MAESTRO D, et al. Epigenetic alterations of TGF β and its main canonical signaling mediators in the context of cardiac fibrosis [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2021, 159: 38.
- [28] LI N, HANG W J, SHU H Y, et al. Pirfenidone alleviates cardiac fibrosis induced by pressure overload via inhibiting TGF- β 1/Smad3 signalling pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(16): 4548.
- [29] LIU T J, GONZALEZ DE LOS SANTOS F, HIRSCH M, et al. Noncanonical Wnt signaling promotes myofibroblast differentiation in pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2021, 65(5): 489.
- [30] CUI X Y, LI Y F, YUAN S G, et al. Alpha-kinase 1 promotes tubular injury and interstitial inflammation in diabetic nephropathy by canonical pyroptosis pathway [J]. *Biol Res*, 2023, 56(1): 5.
- [31] CAO Z C, WANG H M, CHEN J L, et al. Silk-based hydrogel incorporated with metal-organic framework nanozymes for enhanced osteochondral regeneration [J]. *Bioact Mater*, 2022, 20: 221.
- [32] GAO J P, GUO Z H, ZHANG Y, et al. Age-related changes in the ratio of type I / III collagen and fibril diameter in mouse skin [J]. *Regen Biomater*, 2022, 10: rbac110.
- [33] MENG X M, NIKOLIC-PATERSON D J, LAN H Y. TGF- β : the master regulator of fibrosis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(6): 325.
- [34] 梁浩, 张娜, 赵乐, 等. miR-92a 通过调控 TGF- β 1/Smads 通路对心房颤动心肌纤维化的影响[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(16): 4015.

[责任编辑 马超一]