DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.04.022

补肾活血方对心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌纤维化及TGF-β1/Smads信号通路的影响

孔繁达[1],杨硕[2],张罗丹[1],张艳[3]
(1.山西省中医院,山西 太原 030012;2.辽宁中医药大学附属第四医院,辽宁 沈阳 110101;
3.辽宁中医药大学附属医院,辽宁 沈阳 110032)

摘要:目的 观察补肾活血方对心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌纤维化及TGF-β1/Smads信号通路的影响。方法 12周龄雄性SD大鼠120只,应用随机数字法选择20只作为假手术组。其余100只大鼠行冠状动脉前降支结扎术,并结合饥饿及力竭式游泳造成心肌梗死后心力衰竭模型。实验成模大鼠共80只,随机分为模型组、西药组、中药高剂量组、中药中剂量组、中药低剂量组。中药高、中、低剂量组大鼠分别按中药浓度比4∶2∶1给予补肾活血方汤剂灌胃,西药组给予沙库巴曲缬沙坦钠片混悬液灌胃,模型组及假手术组给予等量蒸馏水灌胃。连续用药4周后,应用超声检测6组大鼠左室收缩末期内径(Left ventricular end systolic diameter,LVESD)、左室舒张末期内径(Left ventricular end diastolic diameter,LVEDD)、射血分数(Ejection fraction,EF)及短轴缩短率(Fractional shortening,FS),Masson染色法观察6组大鼠心肌纤维化程度,测定大鼠心肌胶原容积分数(Collagen volume fraction,CVF),蛋白质印迹(Western blotting,WB)法测定6组大鼠心肌组织TGF-β1、p-Smad2、p-Smad3、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ蛋白表达水平,荧光定量聚合酶链反应(Polymerase chain reaction,PCR)法检测6组大鼠心肌组织Smad6 mRNA、Smad7 mRNA表达。结果 用药4周后,与假手术组比较,模型组大鼠LVESD、LVEDD均升高,EF、FS均降低,心肌结构紊乱、CVF升高,心肌组织TGF-β1、p-Smad2、p-Smad3、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ蛋白表达增高,Smad6 mRNA、Smad7 mRNA表达降低($P<0.01$);与模型组相比,西药组、中药各组大鼠LVESD、LVEDD均降低,EF、FS均升高,心肌结构整齐、胶原容积分数(CVF)降低,心肌组织TGF-β1、p-Smad2、p-Smad3、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ蛋白表达降低,Smad6 mRNA、Smad7 mRNA表达升高($P<0.05$或$P<0.01$);与中药高剂量组比较,中药中剂量组大鼠LVESD、LVEDD均升高,EF、FS均降低,心肌组织TGF-β1、p-Smad2、p-Smad3、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ蛋白表达升高,Smad6 mRNA、Smad7 mRNA表达降低($P<0.01$);与中药中剂量组比较,中药低剂量组大鼠LVESD、LVEDD均升高,EF、FS均降低,心肌组织TGF-β1、p-Smad2、p-Smad3、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ蛋白表达升高,Smad6 mRNA、Smad7 mRNA表达降低($P<0.01$或$P<0.05$)。结论 补肾活血方可改善心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌纤维化,其作用机制可能与补肾活血方抑制TGF-β1/Smads激活相关。

关键词:心力衰竭;心肌梗死;心肌纤维化;TGF-β1;Smads;补肾活血方
中图分类号:R289.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-7717(2026)04-0099-07

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82174241);山西省基础研究计划项目(202103021223452)
作者简介:孔繁达(1988-),男,山西朔州人,主治医师,博士,研究方向:中西医结合心血管疾病。

[18] 王引苗, 尹晶平, 付海龙, 等. 乙肝病毒DNA定量与血清学模式及血清丙氨酸氨基转移酶的相关性分析[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2023, 46(6): 571-574.
[19] WANG J, HUANG R, LIU J C, et al. A novel non-invasive model for the prediction of advanced liver fibrosis in chronic hepatitis B patients with NAFLD[J]. J Viral Hepat, 2023, 30(4): 287-296.
[20] 郝慧敏, 魏晓广, 高春献. 血府逐瘀汤加减联合恩替卡韦对乙肝肝硬化失代偿期肝纤维化的影响[J]. 检验医学与临床, 2023, 20(8): 1107-1111.
[21] 黄涛, 王改莉, 范京通, 等. 扶正化瘀胶囊对乙肝肝硬化患者肝硬化、肝功能影响[J]. 临床军医杂志, 2023, 51(4): 387-389.
[22] 张秋芬. 疏肝健脾化瘀方联合恩替卡韦治疗乙肝肝硬化患者的疗效观察及其对肝纤维化指标、凝血功能的影响[J]. 中国中医药科技, 2023, 30(2): 259-261.
[23] KEITOKU T, TAMAKI N, KUROSAKI M, et al. Effect of fatty liver and fibrosis on hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis B who received nucleic acid analog therapy [J]. J Viral Hepat, 2023, 30(4): 297-302.
[24] 冯志刚, 李涛, 赵冰清, 等. 复方鳖甲软肝片联合恩替卡韦对乙肝肝硬化失代偿期患者疗效、肝功能、免疫功能影响研究[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(1): 184-187.
[25] 凌淳, 李媛媛. 40岁以上HBeAg阴性慢性乙肝患者血清HBV DNA水平与肝纤维化的关系探讨[J]. 贵州医药, 2022, 46(1): 27-28.
[26] 段桂姣, 王振常, 蒋锐沅, 等. 柔肝化纤颗粒治疗肝肾阴虚型乙肝后肝纤维化的疗效及作用机制[J]. 中医药导报, 2021, 27(9): 112-116.
[27] 宋杰, 文玲, 雷力民, 等. 扶正化瘀胶囊联合恩替卡韦片治疗慢乙肝肝硬化瘀血阻络证患者临床观察[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(5): 1169-1173.
[28] 陈文林, 梁芳, 张云城, 等. 正肝化瘀方联合恩替卡韦治疗乙肝肝纤维化疗效及对IL-6、TNF-α的影响[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(8): 209-212.
[29] 漆立军, 郑良栋, 吴飞, 等. 茅根祛邪扶正方联合西药治疗慢性乙型肝炎的临床疗效及对肝纤维化程度、安全性的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2022, 21(19): 2036-2040.
[30] 杨超, 周海英. 甘草酸二铵肠溶胶囊联合恩替卡韦对老年慢性乙肝肝纤维化患者细胞因子和氧化应激影响研究[J]. 浙江医学, 2022, 44(8): 851-854, 858.

Effect of Bushen Huoxue Formula(补肾活血方) on Myocardial Fibrosis and TGF-β1/Smads Signaling Pathway in Rats with Heart Exhaustion After Myocardial Infarction

KONG Fanda[1], YANG Shuo[2], ZHANG Luodan[1], ZHANG Yan[3]
(1. Shanxi Traditional Chinese Medicine Hospital, Taiyuan 030012, Shanxi, China;
2. The Fourth Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110101, Liaoning, China;
3. The First Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning, China)

Abstract: *Objective* To observe the effect of Bushen Huoxue Formula(补肾活血方) on myocardial fibrosis and TGF-β1/Smads signaling pathway in rats with heart failure after myocardial infarction. *Method* 120 male SD rats aged 12 weeks were purchased and 20 were selected as the sham surgery group using the random number method. The remaining 100 rats underwent anterior descending coronary artery ligation, combined with starvation and exhaustive swimming to create a heart failure model after myocardial infarction. A total of 80 model rats were randomly divided into a model group, a Western medicine group, a Chinese medicine high dose group, a Chinese medicine medium dose group and a Chinese medicine low dose group. The rats in the Chinese medicine high, medium and low dose groups were given Bushen Huoxue Formula by gavage at a concentration ratio of 4∶2∶1. The western medicine group was given a suspension of sacubitril and valsartan sodium tablets by gavage. The model group and sham surgery group were given an equal amount of distilled water by gavage. After 4 weeks of continuous medication, ultrasound was used to detect the left ventricular end systolic diameter(LVESD), left ventricular end diastolic diameter(LVEDD), left ventricular ejection fraction(EF) and left ventricular short axis shortening rate(FS) in six groups. Masson staining was used to observe the degree of myocardial fibrosis in the six groups and the collagen volume fraction(CVF) was measured. Western blotting(WB) was used to measure the protein expression levels of TGF-β 1, p-Smad2, p-Smad3, Collagen Ⅰ and Collagen Ⅲ in the myocardial tissue of the six groups. Fluorescence quantitative polymerase chain reaction(PCR) was used to detect the mRNA expressions of Smad6 and Smad7 in the myocardial tissue of the six groups. *Results* After 4 weeks of medication, compared with those of the sham surgery group, the levels of LVESD and LVEDD of the model group increased, while the levels of EF and FS decreased. The myocardial structure was disordered, CVF increased, and the protein expressions of TGF-β1, p-Smad2, p-Smad3, Collagen Ⅰ and Collagen Ⅲ in myocardial tissue increased. The mRNA expressions of Smad6 and Smad7 decreased ($P<0.01$). Compared with those of the model group, the levels of LVESD and LVEDD of rats in the western medicine group and the Chinese medicine low, medium and high dose groups were reduced, while the levels of EF and FS were increased. The myocardial structure was neat, CVF was reduced, and the protein expressions of TGF-β1, p-Smad2, p-Smad3, Collagen Ⅰ and Collagen Ⅲ in myocardial tissue was reduced. The expressions of Smad6 mRNA and Smad7 mRNA were increased($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the Chinese medicine high dose group, the Chinese medicine medium dose group showed an increase in the levels of LVESD and LVEDD, a decrease in the levels of EF and FS, an increase in the protein expressions of TGF-β1, p-Smad2, p-Smad3, Collagen Ⅰ and Collagen Ⅲ in myocardial tissue, and a decrease in mRNA expressions of Smad6 and Smad7($P<0.01$). Compared with the Chinese medicine medium dose group, the Chinese medicine low dose group showed an increase in the levels of LVESD and LVEDD, a decrease in the levels of EF and FS, an increase in the protein expressions of TGF-β1, p-Smad2, p-Smad3, Collagen Ⅰ and Collagen Ⅲ in myocardial tissue, and a decrease in mRNA expressions of Smad6 and Smad7($P<0.01$ or $P<0.05$). *Conclusion* Bushen Huoxue Formula can improve myocardial fibrosis in rats with heart failure after myocardial infarction, and its mechanism of action may be related to the inhibition of TGF-β1/Smads activation by Bushen Huoxue Formula.

Keywords: heart failure; miocardial infarction; myocardial fibrosis; TGF-β1; Smads; Bushen Huoxue Formula(补肾活血方)

心力衰竭是各种心脏疾病的终末阶段，临床表现主要为呼吸困难、体力活动受限、体液潴留，具有患病率高、病死率高和再入院率高的特点，心衰患者生活质量低，用药周期长，经济负担重，是世界公共卫生健康难题[1-3]。心肌梗死(Myocardial infarct, MI)是导致心力衰竭的常见病因，在MI后，心脏开始结构重塑，而心肌纤维化则是关键病理环节[4-5]。预防和逆转心肌纤维化是防治心力衰竭的重点。目前研究表明，TGF-β1/Smads信号通路的激活可促进心肌梗死后纤维化的进展[6-7]，可作为潜在干预途径。

在中医学研究中，心力衰竭归属于“水肿”“喘证”等范畴，其病位在心，涉及肺、肝、脾、肾。基于“心肾相关”理论，补肾活血方由菟丝子、龟板胶、黄精、黄芪、丹参、人参、红花、益母草、三七组成，补肾活血，利水消肿，可有效控制心力衰竭进展[8-9]。在前期实验研究中，已经证实补肾活血方可有效改善心室重构，但具体机制尚未明确。本研究采用补肾活血方干预心力衰竭大鼠，观察其对大鼠心肌纤维化程度、心脏结构改变

程度、心肌组织中 TGF－β1、p－Smad2、p－Smad3 等通路标志物的影响，明确补肾活血方对 TGF－β1/Smads 信号通路的干预，探讨补肾活血方改善心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌纤维化的生物学机制，为中医药治疗心力衰竭提供基础研究证据。

1 实验材料

1.1 药物

补肾活血方组成：菟丝子 20 g，龟板胶 15 g，黄精 20 g，黄芪 40 g，丹参 30 g，人参 10 g，红花 15 g，益母草 20 g，三七 5 g，由山西省中医院药剂中心提供草药饮片。沙库巴曲缬沙坦钠片由 Novartis Phama Stein AG 生产，国药准字 HJ20170363，规格：100 mg/片。

1.2 动物

选取 12 周龄清洁级雄性健康 SD 大鼠 120 只，体质量（220±20）g，由北京维通利华实验动物技术有限公司提供，批号［SCXK（京）2022－0052］，采用普通大鼠饲料喂养。

1.3 动物饲养环境

室温（23±2）℃，调节湿度 50%～60%，遮光板调节光线为明暗交替（明 12 h，暗 12 h），大鼠饲料正常喂养，自由饮水，每周更换垫料 3 次。

1.4 主要试剂

Masson 染液（批号：G1006，Servicebio 公司），二甲苯（批号：10023418，国药集团化学试剂有限公司），冰醋酸（批号：10000218，国药集团化学试剂有限公司），SDS－PAGE 凝胶制备试剂盒（批号：AS1012，ASPEN 公司），RIPA 总蛋白裂解液（批号：AS1004，ASPEN 公司），BCA 蛋白质浓度测定试剂盒（批号：AS1086，ASPEN 公司），ECL 化学发光检测试剂盒（批号：AS1059，ASPEN 公司），抗体洗脱液（批号：AS1026，ASPEN 公司），显影定影液（批号：AS1027，ASPEN 公司），一抗稀释液（批号：AS1061，ASPEN 公司），二抗稀释液（批号：AS1058，ASPEN 公司），蛋白可曝光 Marker（批号：DM211，TransGen Biotech 公司），0.45 μm PVDF 膜（批号：IPVH00010，Millipore 公司），β－Actin 一抗（批号：EA014，ELK Biotechnology 公司），p－Smad2 一抗（批号：#18338，CST 公司），p－Smad3 一抗（批号：#9520，CST 公司），TGF－β1 一抗（批号：21898－1－AP，武汉三鹰公司），Collagen Ⅰ一抗（批号：PA5－29569，thermofisher 公司），Collagen Ⅲ一抗（批号：ab184993，abcam 公司），EntiLink™ 1st Strand cDNA Synthesis Super Mix（批号：EQ031，ELK Biotechnology 公司），EnTurbo™ SYBR Green PCR SuperMix（批号：EQ001，ELK Biotechnology 公司）。

1.5 主要仪器

普通光学显微镜（型号：CX21，OLYMPUS 公司），正置白光拍照显微镜（型号：CX31，OLYMPUS 公司），移液枪（型号：KE0003087/KA0056573，Dragon 公司），电泳仪（型号：DYY－6C，北京市六一仪器厂），酶标仪（型号：DR－200Bs，Diatek 公司），台式离心机（型号：TGL－16c，上海安亭科学仪器厂），脱色摇床（型号：WD－9405A，北京市六一仪器厂），扫描仪（型号：LiDE110，Canon 公司），PCR 仪（型号：TC－XP，杭州博日科技公司），荧光定量 PCR 仪（型号：QuantStudio 6 Flex System，Life technologies 公司），超净工作台（型号：SW－CJ－1FD，苏净安泰公司），彩色多普勒超声检测仪（型号：Vivid 7 Dimension，美国通用电气公司）。

2 方法

2.1 造模

大鼠喂养 1 周后通过腹腔注射 10% 的水合氯醛进行麻醉。将大鼠心前区部位脱毛备皮，背位固定后连接心电图仪器，记录术前大鼠心电图。经喉进行气管插管，气道开通后连接小动物呼吸机。应用碘伏在大鼠第 3、4 肋间消毒并开胸，镊子钝性分离胸部肌肉，自制拉钩拉开肋间隙，用小镊子撕开心包。助手挤压对侧胸腔，上抬左侧后背部，使心脏暴露并上移至胸腔开口处。寻找左心耳，手术灯下分辨左冠状动脉，在左冠状动脉开口往下约 2 mm 处，用 4－0 号带针缝合线进行结扎[10]。冠状动脉结扎后可见心电监测中 ST 段明显抬高。挤出大鼠胸腔中的空气，迅速缝合胸壁，待大鼠呼吸平稳后，撤去呼吸机。假手术组大鼠冠状动脉挂线但不结扎，其余步骤与造模大鼠相同。术后给予大鼠腹腔注射青霉素钠（每日 5 万单位）及常规喂养，持续 1 周。第 2 周开始饲料减半，同时进行每日 1 次的力竭式游泳。干预 4 周后对大鼠进行心脏彩超检查，射血分数≤45% 则表示造模成功[11]。

2.2 分组与药物治疗

在 120 只 SD 大鼠中随机选取 100 只造模，剩余 20 只作为假手术组。其中造模成功的存活大鼠共 80 只，应用随机数表法分为模型组、西药组、中药高剂量组、中药中剂量组、中药低剂量组，每组 16 只。假手术组存活 20 只，为平衡组数，随机选出 16 只作为最终的假手术组。中药中剂量组给予补肾活血汤（每日 17.5 g/kg）灌胃，中药低剂量组中药用量是中剂量组的 1/2，中药高剂量组中药用量是中剂量组的 2 倍，西药组给予由沙库巴曲缬沙坦钠片配成的混悬液（每日 20 mg/kg）灌胃，模型组及假手术组每日给予等量蒸馏水灌胃。各组大鼠均灌胃 4 周。

2.3 动物取材

大鼠禁食不禁水 12 h 后，腹腔注射 10% 水合氯醛进行麻醉。将麻醉后的大鼠固定于鼠板，打开大鼠胸腔，剪刀剪取大鼠心脏，置于 0.9% 氯化钠溶液中清洗 3 次，洗去残余血液或血块。剪去大鼠心脏中心房组织，保留心室组织。将心室组织放入液氮中，准备蛋白质印迹（Western blotting，WB）、荧光定量聚合酶链反应（Polymerase chain reaction，PCR）实验。将部分心室组织浸泡于 4% 多聚甲醛溶液，准备 Masson 染色。

2.4 指标检测

2.4.1 超声检测 各组大鼠灌胃 4 周后，采用彩色多普勒超声检测仪行心脏超声检测。连续测量 3 个心动周期中的左室收缩末期内径（Left ventricular end systolic diameter，LVESD）、左室舒张末期内径（Left ventricular end diastolic diameter，LVEDD），计算射血分数（Ejection fraction，EF）及短轴缩短率（Fractional shortening，FS），并取平均值。

2.4.2 Masson 染色及心肌胶原容积分数（Collagen volume fraction，CVF）测定 心肌组织经脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、贴片、脱蜡等过程处理。病理切片准备好后，按照以下流程染色：①核染液染色 60 s，甩掉染液，用冲洗液冲洗 30 s→②浆染液染色 30 s，甩掉染液，用冲洗液冲洗 30 s→③分色液分色 6～8 min，甩掉分色液→④蓝色复染液染色 5 min，甩掉复染液，无

水乙醇冲洗干净→⑤吹干切片，中心树胶封片，显微镜下观察并拍照。显微镜下观察蓝染胶原纤维的分布情况，拍摄并测量不相连的视野，软件计算蓝染胶原纤维占视野面积的百分比，即CVF。

2.4.3 心脏组织TGF－β1、p－Smad2、p－Smad3、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ蛋白表达测定 取材后将心脏组织进行研磨、离心、蛋白变性处理，采用BCA法测定样品蛋白浓度。将样品加至电泳仪中跑电泳，使不同分子大小的蛋白逐渐分离，进而转印到聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上。分别加入TGF－β1、p－Smad2、p－Smad3、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ一抗，再加入对应的二抗、显色液，放入成像仪中显影，可见灰色条带，将胶片进行扫描存档，AlphaEaseFC软件处理系统分析目标带的光密度值。

2.4.4 心脏组织Smad6 mRNA、p－Smad7 mRNA表达测定 （1）取出保存的心肌组织，充分研磨后加入三氯甲烷，混匀并离心。吸取上清液，加入等体积预冷异丙醇，静置15 min。再次离心，倒掉液体，加入预冷75%乙醇，颠倒数次，清洗RNA沉淀，离心后倒掉液体，于超净工作台中干燥数分钟，将乙醇充分挥发干净，加入RNase－Free Water，充分溶解RNA。（2）第一链cDNA的合成采用EntiLink™ 1st Strand cDNA Synthesis Super Mix进行（ELK Biotechnology，EQ031），主要步骤如下：反应液：2×EntiLink™ Synthesis Super Mix 10.0 μL，Total RNA 2 μg，ddH_2O 20.0 μL；逆转录程序：25 ℃ 5min，42 ℃ 30 min，85 ℃ 5 min。（3）实时荧光定量PCR是在Life technologies公司的QuantStudio 6 Flex System PCR仪上完成，每个样品均作3个复孔，使用EnTurbo™ SYBR Green PCR Super-Mix试剂盒进行（ELK Biotechnology，EQ001）：①反应程序为：预变性95 ℃，30 s；循环（40次）95 ℃，10 s→58 ℃，30 s→72 ℃，30 s；熔解曲线仪器默认设置。②反应体系为：2×Master Mix 5.0 μL，引物工作液（2.5 μmol/L）1.0 μL，Template 1.0 μL，ddH_2O 2.0 μL，Rox 1.0 μL。引物信息：R－Smad6 TGGATCTGTCCGATTCTACATTG/GGTAGGTCGTAGAAGATGCTGAC，R－Smad7 GGGCTTTCAGATTCCCAACTT/GCCGATCTTGCTCCTCACTT，R－ACTIN CGTTGACATCCGTAAAGACCTC/TAGGAGCCAGGGCAGTAATCT。

2.5 统计学方法

应用SPSS 25.0统计软件分析数据。计量资料符合正态分布时以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，组间比较采用Dunnett－t检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 心脏超声指标比较

用药4周后，与假手术组比较，模型组LVESD、LVEDD均增大，EF、FS均降低，差异均有统计学意义（$P<0.01$）；与模型组比较，西药组、中药各组大鼠LVESD、LVEDD均降低，EF、FS均升高（$P<0.01$）；与中药高剂量组比较，中药中剂量组大鼠LVESD、LVEDD均升高，EF、FS均降低（$P<0.01$）；与中药中剂量组比较，中药低剂量组大鼠LVESD升高，FS均降低（$P<0.01$），LVEDD升高，EF降低（$P<0.05$）。见表1。

3.2 Masson染色及CVF比较

假手术组大鼠心肌组织纤维束排列紧密有序，未见明显胶原纤维增生，胶原纤维主要分布于血管周围；模型组大鼠心肌胶原纤维增生明显，部分心肌被胶原组织取代，局部可见大面积胶原增生，并蔓延至心肌纤维束间，呈网状分布，心肌细胞排列凌乱。经治疗后，中药各组及西药组大鼠心肌细胞排列比较整齐，以点灶状的胶原纤维为主。与假手术组比较，模型组CVF增高（$P<0.01$）；与模型组比较，中药高剂量组、中药中剂量组及西药组CVF降低（$P<0.01$），中药低剂量组CVF降低（$P<0.05$）；与中药高剂量组比较，中药中剂量组CVF升高（$P<0.01$）；与中药中剂量组比较，中药低剂量组CVF升高（$P<0.01$）。见表2、插页Ⅴ图1。

表1 6组大鼠心脏超声指标比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	LVESD/（mm）	LVEDD/（mm）	EF/（%）	FS/（%）
假手术组	16	3.54±0.57	7.16±0.73	76.31±5.13	50.56±4.37
模型组	16	8.32±0.71△	10.80±0.87△	34.65±4.20△	22.62±3.18△
西药组	16	4.20±0.68▲	7.47±0.65▲	63.28±5.63▲	43.78±5.03▲
中药高剂量组	16	4.87±0.52▲	8.23±0.80▲	59.53±5.70▲	40.83±5.43▲
中药中剂量组	16	6.11±0.46▲□	9.14±0.72▲□	53.48±5.31▲□	33.15±5.16▲□
中药低剂量组	16	7.06±0.63▲■	9.75±0.79▲#	49.77±4.82▲#	25.54±4.88▲■

注：△与假手术组比较，$P<0.01$；▲与模型组比较，$P<0.01$；□与中药高剂量组比较，$P<0.01$；■与中药中剂量组比较，$P<0.01$；#与中药中剂量组比较，$P<0.05$。

表2 6组大鼠用药4周后CVF比较（$\bar{x} \pm s$） 单位：%

组别	n	心肌胶原容积分数
假手术组	16	4.27±0.87
模型组	16	34.16±4.90△
西药组	16	8.09±5.75▲
中药高剂量组	16	10.75±4.64▲
中药中剂量组	16	19.24±6.52▲□
中药低剂量组	16	30.68±5.52*■

注：△与假手术组比较，$P<0.01$；▲与模型组比较，$P<0.01$；*与模型组比较，$P<0.05$；□与中药高剂量组比较，$P<0.01$；■与中药中剂量组比较，$P<0.01$。

3.3 心肌组织TGF－β1、p－Smad2、p－Smad3、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ蛋白表达比较

用药4周后，与假手术组比较，模型组大鼠心肌组织TGF－β1、p－Smad2、p－Smad3、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ蛋白表达增高（$P<0.01$）；与模型组相比，西药组、中药各组大鼠心肌组织TGF－β1、p－Smad2、p－Smad3、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ蛋白表达降低（$P<0.01$）；与中药高剂量组比较，中药中剂量组大鼠心肌组织TGF－β1、p－Smad2、p－Smad3、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ蛋白表达升高（$P<0.01$）；与中药中剂量组比较，中药低剂量组大鼠心肌组织TGF－β1、p－Smad2、p－Smad3、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ蛋白表达升高（$P<0.01$）。见表3、图2。

3.4 心肌组织Smad6 mRNA、Smad7 mRNA表达比较

用药4周后，与假手术组比较，模型组大鼠心肌组织Smad6 mRNA、Smad7 mRNA表达降低（$P<0.01$）；与模型组相比，西药组、中药各组大鼠心肌组织Smad6 mRNA、Smad7 mRNA表达升高（$P<0.01$）；与中药高剂量组比较，中药中剂量组大鼠心肌组织Smad6 mRNA、Smad7 mRNA表达降低（$P<0.01$）；与中药中剂量组比较，中药低剂量组大鼠心肌组织Smad6 mRNA、Smad7 mRNA表达降低（$P<0.01$）。见表4。

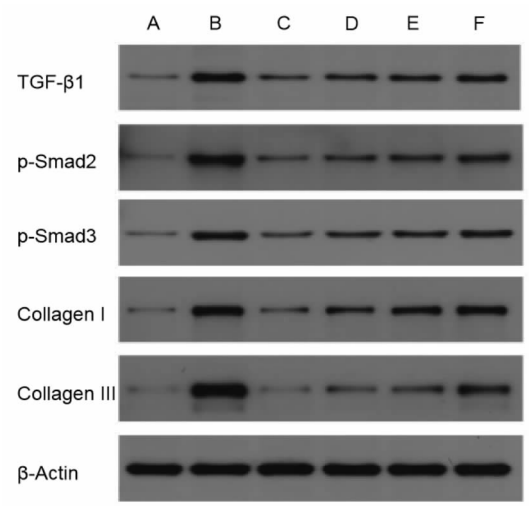
4 讨论

中医学对慢性心衰的研究历史悠久。早在《黄帝内经》中

表3 6组大鼠用药4周后心肌组织TGF－β1、p－Smad2、p－Smad3、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ蛋白表达相对值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TGF－β1	p－Smad2	p－Smad3	Collagen Ⅰ	Collagen Ⅲ
假手术组	16	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01
模型组	16	15.54±2.32△	13.19±1.77△	12.56±2.03△	10.62±2.16△	21.62±3.58△
西药组	16	4.30±0.95▲	3.14±0.86▲	3.92±0.71▲	2.35±0.57▲	2.96±0.68▲
中药高剂量组	16	6.81±1.15▲	4.96±1.30▲	5.76±1.05▲	4.04±0.95▲	6.00±1.42▲
中药中剂量组	16	10.08±1.46▲□	7.00±1.49▲□	7.78±1.37▲□	5.24±1.04▲□	9.69±1.25▲□
中药低剂量组	16	12.60±1.98▲■	9.26±1.71▲■	9.76±1.80▲■	8.24±1.65▲■	15.75±2.03▲■

注：△与假手术组比较，$P<0.01$；▲与模型组比较，$P<0.01$；□与中药高剂量组比较，$P<0.01$；■与中药中剂量组比较，$P<0.01$。



注：A 假手术组；B 模型组；C 西药组；D 中药高剂量组；E 中药中剂量组；F 中药低剂量组。

图2 6组大鼠用药4周后心肌组织TGF－β1、p－Smad2、p－Smad3、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ蛋白表达

表4 6组大鼠用药4周后心肌组织Smad6 mRNA、Smad7 mRNA表达相对值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Smad6 mRNA	Smad7 mRNA
假手术组	16	1.00±0.01	1.00±0.01
模型组	16	0.13±0.03△	0.15±0.02△
西药组	16	0.78±0.05▲	0.82±0.06▲
中药高剂量组	16	0.63±0.04▲	0.65±0.04▲
中药中剂量组	16	0.49±0.03▲□	0.52±0.03▲□
中药低剂量组	16	0.34±0.02▲■	0.29±0.02▲■

注：△与假手术组比较，$P<0.01$；▲与模型组比较，$P<0.01$；□与中药高剂量组比较，$P<0.01$；■与中药中剂量组比较，$P<0.01$。

就有关于心衰的论述，张仲景首先提出了“心水”病名[12]，而孙思邈则在《备急千金要方·心脏门》中首次直接提出“心衰”这一病名[13]。慢性心衰病机总属本虚标实，本虚以气虚为主，常兼阳虚、阴虚；标实以血瘀为主，常兼水饮、痰浊[14]，其病机演变主要为“气虚－血瘀－水停”[15]。在心衰病机演变中，肾的作用贯穿始终。肾藏五脏之精，以备不时之需。肾精肾气充足，则心气心阳化生有源，鼓动气血运行，不至心衰病发。若肾精不足，心气亏虚时心气不得充，气虚则血运不行，瘀血痹阻血脉，心失所养而发为心衰。肾主水，若肾气亏虚，化气行水失职，水液内停，痰浊内生，阻滞经脉，加重心衰。综上所述，补肾活血利水为慢性心衰基本治法，补肾活血方具有补肾益气、活血利水的功效，方中菟丝子、龟板胶、黄精补肾益精，黄芪、人参、益母草补气利水，丹参、红花、三七活血化瘀，全方标本兼顾，扶正而不滞邪，利水而不伤阴。

临床上，补肾活血方可有效治疗慢性心衰，缓解患者气喘、水肿、心慌等症状，改善患者心脏功能指标，改善患者心室结构，提高射血分数，增加患者活动耐量，增加患者尿量，改善利尿剂抵抗[16－17]。基础研究方面，前期多项心肌梗死后心衰大鼠实验研究证实，补肾活血方降低心衰大鼠血清BNP表达，减轻左心室质量，降低左心室指数，修复心衰大鼠心肌纤维排列紊乱，改善其心室重构[18－19]。本次实验中大鼠心脏结构及心肌病理形态结果显示，在给予补肾活血方汤剂治疗后，中药各组大鼠LVESD、LVEDD均降低，EF、FS均升高，心肌结构整齐、CVF降低，中药高剂量的效果尤为显著，说明补肾活血方能降低心肌梗死后心衰大鼠心肌纤维化程度，有效抑制心室重塑，提高心功能。

研究发现，心肌纤维化是导致心功能下降的主要原因，心肌纤维化程度加重后，心肌僵硬度增加，进而导致心室顺应性下降，心脏功能发生障碍[20－21]。研究表明，多种生物因子参与心肌纤维化的发生发展，其中TGF－β1是一种常见的促纤维化生长因子，TGF－β1/Smads信号通路是介导纤维化发展的重要通路[22－25]。TGF－β家族是一种分泌因子家族，广泛参与组织或细胞的异常增殖、分化等调控过程。TGF－β有5种亚型，TGF－β1表达于成纤维细胞、内皮细胞、造血细胞和结缔组织中，在心肌组织中表达程度高，与心肌纤维化密切相关[26]。Smads蛋白是TGF－β1/Smads信号通路中关键转导蛋白，负责将细胞膜上的信号传导入细胞核，最终影响基因调控表达[27]。在哺乳动物中，Smads蛋白分为受体调节型、共同介导型、抑制型。其中，受体型主要有Smad1、Smad2、Smad3、Smad5、Smad8、Smad9，共同介导型有Smad4，抑制型有Smad6、Smad7。Smad2、Smad3参与信号通路的正向调节，促进纤维化进展，Smad4属于通路信号转枢部分，Smad6、Smad7抑制信号通路[28－30]。在病理状态下，TGF－β1/Smads信号通路激活，TGF－β1大量释放。TGF－β1与细胞膜上的转化生长因子β受体Ⅱ（Transforming growth factor beta receptor Ⅱ，TGF－βR－Ⅱ）结合并使其活化，进一步募集、磷酸化转化生长因子β受体Ⅰ（Transforming growth factor beta receptor Ⅰ，TGF－βR－Ⅰ）。磷酸化的TGF－βR－Ⅰ可特异性识别并磷酸化细胞介质Smad2、Smad3。Smad4与磷酸化的Smad2、Smad3结合形成复合物，后转移到细胞核中，诱导纤维细胞向成纤维细胞的转化，激活促纤维化基因的表达，提高Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、弹性蛋白、纤维蛋白、α平滑肌肌动蛋白合成，促进细胞外基质的沉积，胶原蛋白代谢失衡，心肌纤维化加重，心肌重塑[31－32]。本

次实验结果显示,模型组大鼠心肌组织 TGF－β1、p－Smad2、p－Smad3、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ表达增高,说明在心肌梗死后心衰状态下 TGF－β1/Smads 信号通路激活,下游胶原蛋白表达异常,在应用西药和补肾活血汤剂干预模型大鼠后,可观察到大鼠上述指标得到改善,且在加大补肾活血汤剂量时,信号通路关节分子蛋白表达也发生变化,差异有统计学意义($P<0.01$)。Smad6、Smad7 属于通路抑制信号蛋白,在模型组大鼠心肌的表达中降低,在补肾活血组及西药组中表达升高,说明补肾活血汤对 TGF－β1/Smads 信号通路中正向、负向调控因子均有调节作用。

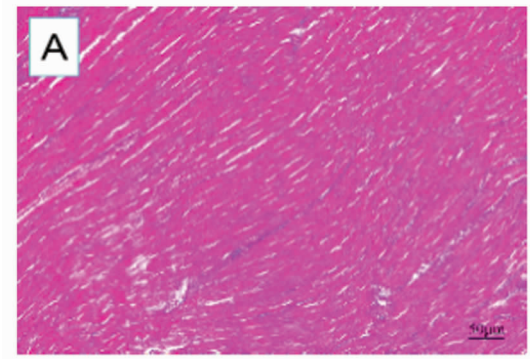
综上所述,心肌梗死后心衰时重要的病理改变是心室重塑,而心肌纤维化的进展在心室重塑过程中占有重要地位。TGF－β1/Smads 信号通路活化可加重心肌纤维化,加速心室重塑,促进心力衰竭的进展。补肾活血方可有效调节 TGF－β1/Smads 信号通路的表达,抑制心肌纤维化,改善模型大鼠心脏功能,治疗心力衰竭,为中医药防治心力衰竭提供科学依据。

参考文献

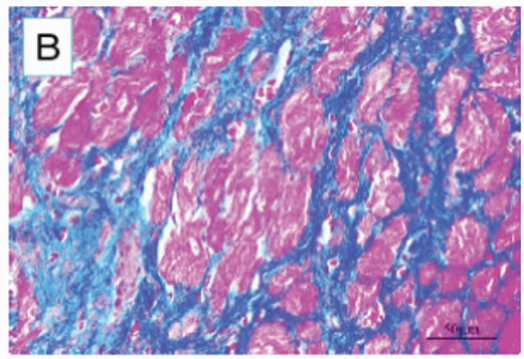
[1] 王华,李莹莹,柴坷,等. 中国住院心力衰竭患者流行病学及治疗现状[J]. 中华心血管病杂志,2019,47(11):865－874.
[2] IAEIAN B, FONAROW G C. Epidemiology and aetiology of heart failure[J]. Nat Rev Cardiol, 2016, 13(6): 368－378.
[3] ROGER V L. Epidemiology of heart failure: a contemporary perspective[J]. Circ Res, 2021, 128(10): 1421－1434.
[4] HEUSCH G, LIBBY P, GERSH B, et al. Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure[J]. Lancet, 2014, 383(9932): 1933－1943.
[5] PEZEL T, VIALLON M, CROISILLE P, et al. Imaging interstitial fibrosis, left ventricular remodeling, and function in stage A and B heart failure[J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2021, 14(5): 1038－1052.
[6] HAO J, JU H, ZHAO S, et al. Elevation of expression of Smads 2, 3, and 4, decorin and TGF－beta in the chronic phase of myocardial infarct scar healing[J]. J Mol Cell Cardiol, 1999, 31(3): 667－678.
[7] BROOKS W W, CONRAD C H. Myocardial fibrosis in transforming growth factor beta(1) heterozygous mice[J]. J Mol Cell Cardiol, 2000, 32(2): 187－195.
[8] 白斌, 张艳. 从肾论治慢性心力衰竭[J]. 实用中医内科杂志, 2016, 30(4): 44－45.
[9] 王辰, 张艳, 宫丽鸿. 参草通脉颗粒治疗气虚血瘀水停型慢性心力衰竭的临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(10): 2521－2523.
[10] 马金. 益气活血复方联合运动训练对慢性心衰大鼠的心功能及左室重构影响的实验研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2011.
[11] 廖佳丹, 张艳, 宫丽鸿, 等. 益气活血利水不同配伍对慢性心衰大鼠 AT1、ERK2 影响的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(10): 2270－2273.
[12] 彭琴文. 中医治疗慢性心力衰竭临床研究进展[J]. 河北中医, 2016, 38(9): 1432－1435.
[13] 周亚滨, 邬慧美, 孙静, 等. 慢性心力衰竭中医治疗进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(1): 8－10.
[14] 陈可冀, 吴宗贵, 朱明军, 等. 慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识[J]. 中国中西医结合杂志,2016(2):133－141.
[15] 马金, 张艳. 慢性心力衰竭中医病机“气虚－血瘀－水停”与“心室重构”的相关性探讨[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(17): 1936－1938.
[16] 张艳, 何佳, 张伟, 等. 补肾活血方联合常规西药治疗射血分数中间值心衰气虚血瘀证患者 129 例随机对照临床观察[J]. 中医杂志, 2024, 65(4): 376－381.
[17] 孙雨晨, 张艳, 尹文浩, 等. 补肾活血方治疗慢性心力衰竭利尿剂抵抗的疗效观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(21): 123－129.
[18] 孔繁达, 张罗丹, 张艳. 补肾活血方对心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响[J]. 中国民间疗法, 2023, 31(20): 69－74.
[19] 何佳, 付博, 张艳, 等. 补肾活血复方调控 Wnt 通路抑制心力衰竭心肌损伤及细胞凋亡的机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(7): 65－69, 261.
[20] SEQURA A M, FRAZIER O H, BUJA L M. Fibrosis and heart failure[J]. Heart Fail Rev, 2014, 19(2): 173－185.
[21] LEADER C J, WILKINS G T, WALKER R J. The effect of spironolactone on cardiac and renal fibrosis following myocardial infarction in established hypertension in the transgenic Cyp1a1Ren2 rat[J]. PLoS One, 2021, 16(11): e0260554.
[22] ZHANG Y J, ZHANG W S, ZHANG R, et al. Knockdown of FBLN2 suppresses TGF－β1－induced MRC－5 cell migration and fibrosis by downregulating VTN[J]. Tissue Cell, 2023, 81: 102005.
[23] WYNN T A, RAMALINGAM T R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease[J]. Nat Med, 2012, 18(7): 1028－1040.
[24] TEN DIJKE P, ARTHUR H M. Extracellular control of TGF beta signalling in vascular development and disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(11): 857－869.
[25] AKHURST R J, HATA A. Targeting the TGFβ signalling pathway in disease[J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(10): 790－811.
[26] HU H H, CHEN D Q, QANG Y N, et al. New insights into TGF－β/Smad signaling in tissue fibrosis[J]. Chen Biol Interact, 2018, 292: 76－83.
[27] GAARENSTROOM T, HILL C S. TGF－β signaling to chromatin: how Smads regulate transcription during self－renewal and differentiation[J]. Semin Cell Dev Biol, 2014, 32: 107－118.
[28] WRNAJ L. The secret life of Smad4[J]. Cell, 2009, 136(1): 13－14.
[29] TRIPATHI S, MIYAKE T, MCDERMOTT J C. Smad7: β－catenin complex regulates myogenic gene transcription[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(6): 387.
[30] DZIAŁO E, TKACZ K, BŁYSZCZUK P. Crosstalk between TGF－β and WNT signalling pathways during cardiac fibrogenesis[J]. Acta Biochim Pol, 2018, 65(3): 341－349.
[31] DERYNCK R, ZHANG Y E. Smad－dependent and Smad－independent pathways in TGF－beta family signalling[J]. Nature, 2003, 425(6958): 577－584.
[32] GONZÁLEZ A, SCHELBERT E B, DÍEZ J, et al. Myocardial interstitial fibrosis in heart failure: biological and translational perspectives[J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 71(15): 1696－1706.

补肾活血方对心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌纤维化及 TGF－β1/Smads 信号通路的影响

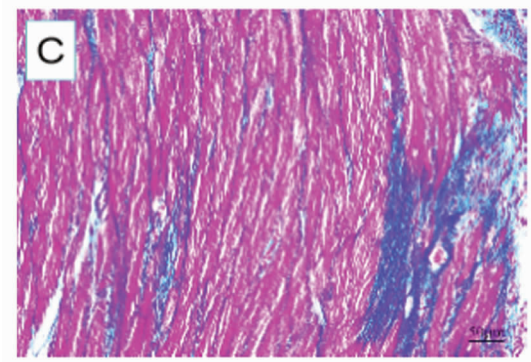
（正文见 99－104 页）



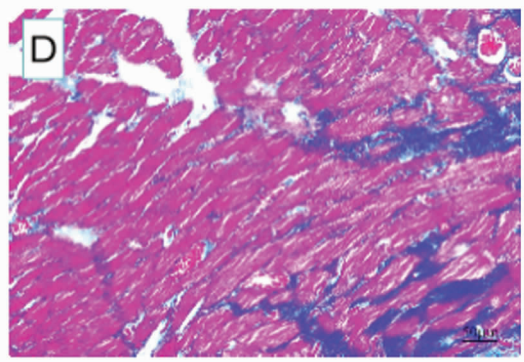
假手术组



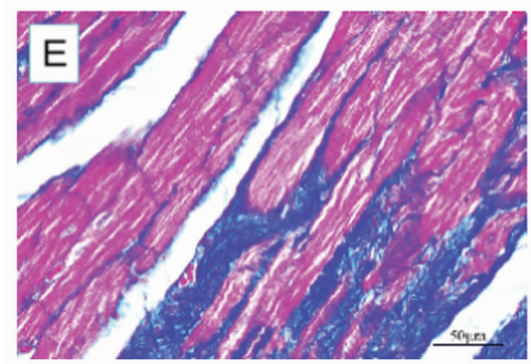
模型组



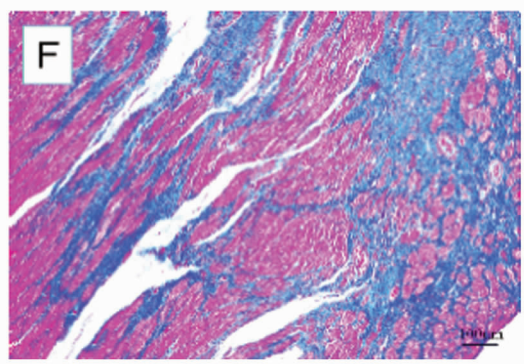
西药组



中药高剂量组



中药中剂量组



F中药低剂量组

图 1　6 组大鼠用药 4 周后 Masson 染色（×200）