

# 滋脾通脉饮对糖尿病心肌病大鼠心肌纤维化和转化生长因子 $\beta 1$ /Smads 信号通路的影响

吴刚强<sup>1</sup>, 熊春红<sup>1</sup>, 毛叶<sup>1</sup>, 温小凤<sup>1</sup>, 谭军<sup>1</sup>, 李非<sup>2</sup>, 卜献春<sup>1</sup>(1. 湖南省中医药研究院附属医院内分泌老年病科, 湖南 长沙 410006; 2. 湖南省中医药研究院附属医院药剂科, 湖南 长沙 410006)

**摘要:** 目的 探讨滋脾通脉饮对糖尿病心肌病大鼠转化生长因子(TGF)- $\beta 1$ /Smads3 信号通路的影响。方法 将 SD 大鼠随机分为空白对照组, 模型组, 滋脾通脉饮高、低剂量组(17.6 g·kg<sup>-1</sup>, 8.8 g·kg<sup>-1</sup>)和依那普利组(0.53 mg·kg<sup>-1</sup>), 空白对照组予以腹腔注射等量柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液, 余组大鼠采用高脂高糖饲料喂养+单次腹腔注射链脲佐菌素的方法构建 2 型糖尿病大鼠模型。造模结束后, 模型组和空白对照组灌服同等容积的蒸馏水, 余组分别给与药物干预, 共干预 4 周。4 周后观察心脏指数和左室指数, PCR 技术检测大鼠心肌组织转化生长因子(TGF)- $\beta 1$  mRNA、Smads3 mRNA 和 Smads7 mRNA 的表达, 蛋白印迹法检测心肌组织 TGF- $\beta 1$ 、Smads3、Smads7 的蛋白表达。Masson 染色观察大鼠心肌结构的改变, 计算胶原容积分数。结果 与空白对照组比较, 模型组心脏指数和左室指数明显升高( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 滋脾通脉饮高剂量组、滋脾通脉饮低剂量组和依那普利组心脏指数和左室指数明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与空白对照组比较, 模型组大鼠 TGF- $\beta 1$  mRNA、Smads3 mRNA 和 TGF- $\beta 1$ 、Smads3 蛋白表达明显升高( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 滋脾通脉饮高剂量组、滋脾通脉饮低剂量组和依那普利组 TGF- $\beta 1$  mRNA、Smads3 mRNA 和 TGF- $\beta 1$ 、Smads3 蛋白表达明显降低( $P < 0.01$ ); 与空白对照组比较, 模型组大鼠 Smads7 mRNA 和 Smads7 蛋白表达明显降低( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 滋脾通脉饮高剂量组、滋脾通脉饮低剂量组和依那普利组 Smads7 mRNA 和 Smads7 蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。Masson 染色结果显示: 空白对照组大鼠肌纤维排列整齐, 肌纤维连接完好。模型组大鼠心肌纤维排列紊乱, 胶原纤维增多, 可见纤维断裂。高剂量组大鼠肌纤维排列整齐, 可见极少量胶原纤维。低剂量组大鼠肌纤维排列稍紊乱。依那普利组可见极少量胶原纤维, 肌纤维断裂不明显。与空白对照组比较, 模型组大鼠胶原容积分数明显升高( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 滋脾通脉饮高剂量组、滋脾通脉饮低剂量组和依那普利组胶原容积分数明显降低( $P < 0.01$ )。结论 滋脾通脉饮能抑制糖尿病心肌病大鼠心肌纤维化, 改善心肌重构, 其作用可能与调节 TGF- $\beta 1$ /Smads 信号通路有关。

**关键词:** 滋脾通脉饮; 糖尿病心肌病; 心肌纤维化; 转化生长因子  $\beta 1$ /Smads 信号通路; 大鼠

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)01-0029-07

**doi:** 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.01.004

## Effect of *Zicuitongmai Yin* on Myocardial Fibrosis and TGF- $\beta 1$ /Smads Signaling Pathway in Diabetic Cardiomyopathy Rats

WU Gangqiang<sup>1</sup>, XIONG Chunhong<sup>1</sup>, MAO Ye<sup>1</sup>, WEN Xiaofeng<sup>1</sup>, TAN Jun<sup>1</sup>, LI Fei<sup>2</sup>, BU Xianchun<sup>1</sup>(1. Department of Endocrinology and Geriatrics, Affiliated Hospital of Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006 Hunan, China; 2. Pharmacy Department of Affiliated Hospital of Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006 Hunan, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the effect of *Zicuitongmai Yin* on TGF- $\beta 1$ /Smads signal pathway in diabetic cardiomyopathy rats. **Methods** SD rats were randomly divided into blank control group, model group, high and low

收稿日期: 2020-04-14

作者简介: 吴刚强, 男, 副主任医师, 医学博士, 研究方向: 糖尿病的中医药防治。Email: wugq2011@126.com。通信作者: 卜献春, 男, 主任医师, 硕士研究生导师。研究方向: 糖尿病的中医药防治。Email: 16319063@qq.com。

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2016JJ6087)。

dose group ( $17.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $8.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) and enalapril group ( $0.53 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). The blank control group was given the same amount of citric acid-trisodium citrate buffer by intraperitoneal injection, and high fat and high sugar diet plus a single intraperitoneal injection of streptozotocin were used to build the model of type 2 diabetic rats. After the type 2 diabetic model was established, the model group and the blank control group were given the same volume of distilled water, and the other groups were given drug intervention for 4 weeks. 4 weeks later, the cardiac index and left ventricular index were observed. The expression of TGF- $\beta$ 1 mRNA, Smads3 mRNA and Smads7 mRNA were detected by PCR, and the protein expression of TGF- $\beta$ 1, Smads3 and Smads7 were detected by Western blot. Changes of myocardial structure in rats were observed by Masson staining and the collagen volume fraction was calculated. **Results** The heart index and left ventricular index in the model group were significantly higher compared with those in the blank control group ( $P < 0.01$ ); the heart index and left ventricular index of high dose group, low dose group and enalapril group were significantly lower compared with those in the model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); the expression of TGF- $\beta$ 1 mRNA, Smads3 mRNA, TGF- $\beta$ 1 and Smads3 protein in the model group increased significantly compared with those in the blank control group ( $P < 0.01$ ); the expression of TGF- $\beta$ 1 mRNA, Smads3 mRNA, TGF- $\beta$ 1, and Smads3 protein in the high dose group, the low dose group and the enalapril group decreased significantly compared with those in the model group ( $P < 0.01$ ). The expression of Smads7 mRNA and Smads7 protein in the model group decreased significantly compared with those in the blank control group ( $P < 0.01$ ); the expression of Smads7 mRNA and Smads7 protein in high dose group, low dose group and enalapril group increased significantly compared with those in the model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The results of Masson staining showed that the muscle fibers of blank control group were arranged in order and closely connected. In the model group, the disorderly arrangement of myocardial fibers, the increase of collagen fibers and fiber breakage were observed. The orderly arrangement of muscle fibers and small amount of collagen fibers could be seen in high dose group. The arrangement of muscle fibers was slightly disordered in the low dose group. Few collagen fibers and slight fiber breakage were found in enalapril group. The collagen volume fraction of the model group was significantly increased compared with that in the blank control group ( $P < 0.01$ ); The collagen volume fraction in the high dose group, low dose and enalapril group was significantly decreased compared with that in the model group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** *Zicuitongmai Yin* can inhibit myocardial fibrosis and improve the myocardial remodeling of diabetic cardiomyopathy rats, which may be related to the regulation of TGF- $\beta$ 1/Smads signal pathway.

**Keywords:** *Zicuitongmai Yin*; diabetic cardiomyopathy; myocardial fibrosis; transforming growth factor  $\beta$ 1/Smads signal pathway; rats

糖尿病心肌病是糖尿病患者死亡的主要原因之一。该病的早期表现为左心室舒张功能不全，随着病情的进展，逐步出现心肌细胞肥大、心肌纤维化甚至心肌细胞凋亡<sup>[1-2]</sup>。目前转化生长因子(TGF)- $\beta$ 1是被认为与心肌纤维化关系最为密切的细胞因子<sup>[3]</sup>。TGF- $\beta$ 1活化后可以激活TGF- $\beta$ 1受体，受体活化后进一步激活TGF- $\beta$ 1/Smads信号通路的下游蛋白Smad2/Smad3并使其磷酸化，磷酸化的Smad2/Smad3蛋白进入细胞核，启动纤维化基因的表达<sup>[4]</sup>。

滋脾通脉饮为本院名老中医卜献春主任医师的经验方，全方具有益气养阴、活血通络之效。前期临床研究表明，滋脾通脉饮不仅有明显的降糖、降

脂、降低超敏C反应蛋白水平和改善胰岛素抵抗的作用<sup>[5-6]</sup>，而且治疗糖尿病性冠心病疗效显著，能降低患者血液黏稠度和临床症状<sup>[7]</sup>。

本研究拟从TGF- $\beta$ 1/Smads介导的信号通路入手，旨在探讨滋脾通脉饮改善心肌重构的作用机理，以期对糖尿病心肌病找到新的治疗思路。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 70只清洁级6周龄SD大鼠，雌雄各半，SPF级，体质量200~220g，由湖南中医药大学实验动物中心提供，动物许可证号：SCXK(湘)2019-0004，动物合格证编号：1107271911004697。

常规条件饲养, 室温 20~27 ℃, 湿度 50%~60%。

**1.2 药物及试剂** 滋脾通脉饮: 主要由黄芪、生地、麦冬、玄参、山茱萸、天花粉、地龙、生蒲黄、丹参、川芎、鬼箭羽、全蝎、水蛭、僵蚕、山楂等药物组成, 功能: 益气养阴、活血通络。其中黄芪(批号: 2019090471)、麦冬(批号: 2019090141), 安徽盛海堂中药饮片有限公司; 生地(批号: 190814)、玄参(批号: 190601)、山茱萸(批号: 190601)、天花粉(批号: 190501)、全蝎(批号: 190501)、生蒲黄(批号: 190702)、丹参(批号: 190601), 安徽民顺堂中药科技有限公司; 地龙, 湖南省华夏湘众药业饮片有限公司, 批号: 190342; 川芎, 湖南三湘中药饮片有限公司, 批号: 2019090704; 鬼箭羽, 湖南省松龄堂中药饮片有限公司, 批号: 191001; 水蛭, 安徽尚德中药饮片有限公司, 批号: 190201; 僵蚕, 湖南省华夏湘众药业饮片有限公司, 批号: 190431; 山楂, 湖南聚仁中药饮片有限公司, 批号: 190812。将以上药物按照适当比例配置, 加水提取 2 次。一煎加 8 倍量水提取 1.5 h, 二煎加 6 倍量水提取 1 h; 合并提取液, 过滤, 浓缩; 微波真空干燥制成干浸膏, 粉碎制粒, 加适量糊精, 制成颗粒剂; 后 60 ℃以下干燥整粒成成品, 于 4 ℃冰箱中保存备用。

依那普利片(规格: 5 mg/片), 扬子江药业集团江苏制药股份有限公司, 批号: 09142720; 逆转录试剂盒 promegaA3500 由上海联硕生物科技有限公司提供(批号: E20190912); RIPA 蛋白裂解液(货号: CW2321S)、5X SDS-PAGE loading buffer(货号: ECS004310)、彩色预染蛋白 marker(货号: CW0120)、速泳 SDS-PAGE 电泳液(货号: CW0022)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(批号: E20191018)、Western 抗体稀释液(货号: CW0030S), 均由北京 CWBIO 提供; PVDF 膜 0.45 μm(货号: IPVH00010)、PVDF 膜 0.22 μm(货号: ISEQ10010)由美国 millipore 公司提供; 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称	片段大小/bp	上游引物系列(5'-3')	下游引物系列(5'-3')
TGF-β1	102	gattaccacctggcgttgg	gcactgcttcccgaatctg
Smad3	118	tagacgacggcgaacaccg	ctctgatagtggaagat
Smad7	98	tcgacctgaccgacgaag	agcctgagcagctccagg
Actin	95	tgtgaaagatgttactcgac	catcttttcacggtt

**1.3 仪器** Lambda 35 紫外/可见分光光度计, 美国 Perkin Elmar 公司; AE240 精密分析天平, 瑞士 Mettler 公司; 902-ULTS -80 ℃超低温冰箱, 美国 Thermo 公司提供; D30 核酸蛋白分析仪, 德国 eppendorf 公司; DYY-6E 电泳仪, 北京六一仪器厂; Biosens SC750 凝胶成像分析仪, 美国 Bio-Rad 公司; Biometra TOne 96G PCR 仪, 德国耶拿公司; 3120000283 微量移液器, 德国 eppendorf 公司; Neofuge 23R 冷冻离心机, 上海力康生物医疗科技控股有限公司; 752 紫外分光光度计, 上海现科分光仪器有限公司; HJ-10-A 磁力搅拌器, 常州澳华仪器有限公司; 灰度分析软件, 上海佰晔生物科技有限公司; 图像分析软件, 美国 Adobe 公司。

**1.4 模型复制、分组及给药** 70 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机抽取 10 只作为空白对照组, 采用普通饲料喂养。剩余 60 只用于造模, 采用高脂饲料饮食(猪油 10%、胆固醇 2%、胆酸盐 0.5%、蔗糖 20%、普通饲料 67.5%), 连续喂养 4 周, 建立胰岛素抵抗模型。后 60 只模型组大鼠隔夜禁食(不禁水) 12 h 以上, 将链脲佐菌素(STZ)溶入到配好的 pH=4.3, 0.1 mmol·L<sup>-1</sup>的柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液中, 配置成 2%的浓度, 以 30 mg·kg<sup>-1</sup>单次将其注入大鼠腹腔内, 建立 2 型糖尿病大鼠模型。空白对照组予以腹腔注射等量柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液。造模 3 d 后大鼠禁食(不禁水) 8 h 以上, 对大鼠尾静脉采血, 血糖仪检测空腹血糖, 若空腹血糖 > 11.1 mmol·L<sup>-1</sup>为模型制备成功<sup>[8]</sup>。造模成功后大鼠再高脂饲养 2 周以强化胰岛素抵抗模型<sup>[9]</sup>。造模过程中死亡 14 只, 剩余 46 只。

造模结束后从造模成功的 46 只大鼠中随机抽取 40 只按照完全随机设计方法分为模型组、依那普利组及滋脾通脉饮高剂量组、滋脾通脉饮低剂量组, 每组各 10 只, 加上空白对照组, 一共 5 组。实验动物每天上午按下列剂量灌胃给药 1 次: 用药组根据成人体表面积换算法, 折算后生药量为滋脾通脉饮高剂量组灌服 17.6 g·kg<sup>-1</sup>, 滋脾通脉饮低剂量组灌服 8.8 g·kg<sup>-1</sup>, 依那普利组按照 0.53 mg·kg<sup>-1</sup>灌胃, 模型组和空白对照组灌服同等容积的蒸馏水; 均每日 1 次。共用药 4 周。以上计量均按 60 kg 成人体表面积换算。灌胃容量为 10 mL·kg<sup>-1</sup>体质量。

**1.5 体质量、心脏质量测定** 称取大鼠体质量, 解剖大鼠, 称取心脏质量, 计算心脏指数、左室指数。

心脏指数=心脏质量/大鼠体质量, 左室指数=左室质量/大鼠体质量。

**1.6 PCR 法检测大鼠心肌组织 TGF- $\beta$ 1 mRNA、Smads3 mRNA、Smads7 mRNA 的表达** Trizol 法提取心肌组织中总 RNA。经纯度和浓度检测后, 取 1.0  $\mu$ g 总 RNA, 根据逆转录试剂盒说明书合成 cDNA, 备用。以 cDNA 为模板, 混合特异性引物等配制 qPCR 反应体系, 在相应的扩增程序(94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94  $^{\circ}$ C, 30 s、60  $^{\circ}$ C, 30 s、72  $^{\circ}$ C, 5 min, 扩增 40 cycles; 72  $^{\circ}$ C 延伸 5min)完成扩增和荧光信号采集。计算  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  进行数据分析。

**1.7 Western Blot 法检测大鼠心肌组织 TGF- $\beta$ 1、Smads3、Smads7 的蛋白表达** RIPA 裂解液(含蛋白酶抑制剂)提取心肌组织中总蛋白。经 BCA 法测蛋白浓度后, 取 20 mg 总蛋白按比例加入 5 $\times$ SDS 蛋白变性液, 煮沸 10 min, 备用。配制 SDS-PAGE 预制胶, 加入上述变性后的蛋白样本进行电泳分离蛋白, 电泳后 200 mA 转膜 1 h, 将蛋白转至 PVDF 膜。以 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h 后, 进行免疫印迹反应: 加入目的蛋白一抗, 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 在室温下脱色摇床上洗 5 min  $\times$  3 次, 加入相应二抗室温下孵育 30 min 后, 用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 3 次, 每次 5 min。避光现配 ECL 化学发光液, 于暗室中加至 PVDF 膜的蛋白面, 充分接触, 1~2 min 后, 去尽残液, 包好, 放入暗匣中曝光。最后用显影、定影试剂进行显影和定影。将胶片进行扫描, 以 PhotoShop 整理去色, Alpha 软件处理系统分析目标带的光密度值。

**1.8 Masson 染色观察心肌组织病理改变** 取出经过多聚甲醛固定的心肌组织, 用预备好的冰生理盐水冲洗, 取待检心肌组织, 常规脱蜡至水。将切片置于丽春红染液 2 min; 入 0.2% 冰醋酸水溶液 2 min; 5% 磷钼酸水溶液酶染 2 min; 0.2% 冰醋酸水溶液洗 2 min; 甲基绿染色 3 min, 自来水冲洗; 95% 酒精分色, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明 5 min, 中性树胶封片。Image-Pro Plus 图片处理软件分析心肌胶原容积分数。

**1.9 统计学处理方法** 计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 所有数据均进行正态性检验和方差齐性检验。多个样本之间的均数比较采用方差分析, 方差齐时采用 LSD 法、Dunnett 法; 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。数据采用统计软件 SPSS 16.0 进行统计分析。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠体质量、心脏质量和心肌重构指标比较** 与空白对照组比较, 模型组体质量和心脏质量明显降低( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 滋脾通脉饮高剂量组、滋脾通脉饮低剂量组和依那普利组体质量和心脏质量明显升高( $P < 0.01$ )。与空白对照组比较, 模型组心脏指数和左室指数明显升高( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 滋脾通脉饮高剂量组、滋脾通脉饮低剂量组和依那普利组心脏指数和左室指数明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结果见表 2、表 3。

表 2 各组大鼠体质量和心脏质量比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Table 2 Comparison of body weight and heart weight of rats in each group( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

分组	体质量/g	心脏质量/mg
空白对照组	380.44 $\pm$ 16.63	1006.68 $\pm$ 75.38
模型组	248.19 $\pm$ 13.89**	879.64 $\pm$ 93.18**
滋脾通脉饮高剂量组	347.63 $\pm$ 17.4 <sup>▲▲</sup>	965.17 $\pm$ 88.81 <sup>▲▲</sup>
滋脾通脉饮低剂量组	326.82 $\pm$ 15.47 <sup>▲▲</sup>	990.64 $\pm$ 119.59 <sup>▲▲</sup>
依那普利组	300.81 $\pm$ 12.87 <sup>▲▲</sup>	961.02 $\pm$ 58.07 <sup>▲▲</sup>

注: 与空白对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$

表 3 各组大鼠心脏指数和左室指数比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Table 3 Comparison of cardiac index and left ventricular index in each group( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

分组	心脏指数/( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	左室指数/( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )
空白对照组	2.65 $\pm$ 0.23	2.07 $\pm$ 0.26
模型组	3.55 $\pm$ 0.39**	3.01 $\pm$ 0.29**
滋脾通脉饮高剂量组	2.78 $\pm$ 0.27 <sup>▲▲</sup>	2.56 $\pm$ 0.24 <sup>▲▲</sup>
滋脾通脉饮低剂量组	3.02 $\pm$ 0.24 <sup>▲▲</sup>	2.79 $\pm$ 0.2 <sup>▲</sup>
依那普利组	3.20 $\pm$ 0.19 <sup>▲▲</sup>	2.64 $\pm$ 0.2 <sup>▲▲</sup>

注: 与空白对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ , <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$

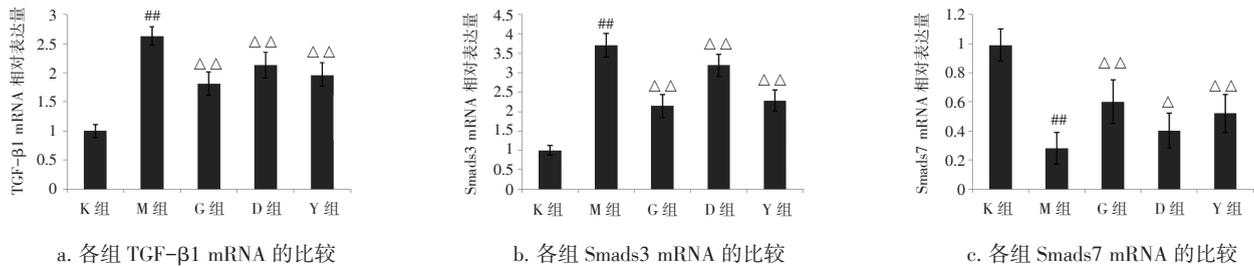
### 2.2 各组大鼠 TGF- $\beta$ 1、Smads3 和 Smads7 mRNA 比较

见图 1。结果显示, 与空白对照组比较, 模型组大鼠 TGF- $\beta$ 1 mRNA、Smads3 mRNA 明显升高( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 滋脾通脉饮高、低剂量组和依那普利组 TGF- $\beta$ 1 mRNA、Smads3 mRNA 明显降低( $P < 0.01$ )。与空白对照组比较, 模型组大鼠 Smads7 mRNA 明显降低( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 滋脾通脉饮高剂量组、滋脾通脉饮低剂量组和依那普利组 Smads7 mRNA 明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

**2.3 各组大鼠心肌组织 TGF- $\beta$ 1、Smads3 和 Smads7 蛋白表达的比较** 见图 2。与空白对照组比较, 模型组大鼠 TGF- $\beta$ 1、Smads3 蛋白表达明显升

高( $P < 0.01$ )；与模型组比较，滋蔺通脉饮高、低剂量组和依那普利组 TGF- $\beta$ 1、Smads3 蛋白表达明显降低( $P < 0.01$ )。与空白对照组比较，模型组大鼠

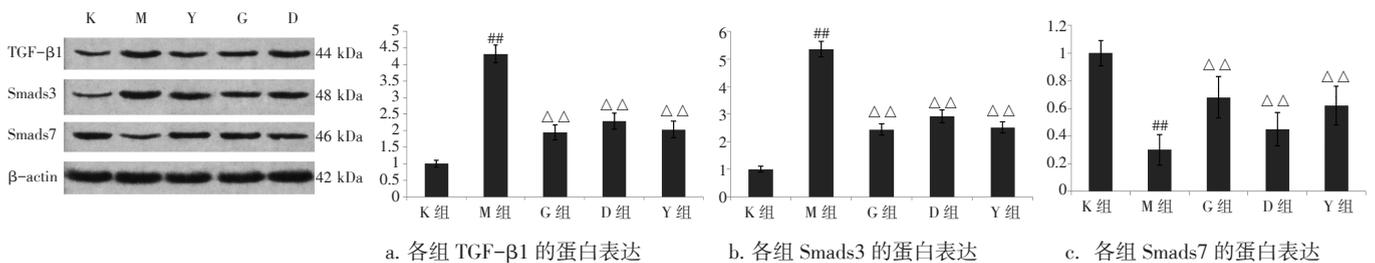
Smads7 蛋白表达明显降低( $P < 0.01$ )；与模型组比较，滋蔺通脉饮高、低剂量组和依那普利组 Smads7 蛋白表达明显升高( $P < 0.01$ )。



注：K 组，空白对照组；M 组，模型组；Y 组，依那普利组；G 组，滋蔺通脉饮高剂量组；D 组，滋蔺通脉饮低剂量组。与空白对照组比较，<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与模型组比较，<sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ，<sup>ΔΔ</sup> $P < 0.01$

图 1 各组 TGF- $\beta$ 1 mRNA、Smads3 mRNA 和 Smads7 mRNA 的比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Figure 1 Comparison of TGF- $\beta$ 1 mRNA, Smads3 mRNA and Smads7 mRNA in each group( $\bar{x} \pm s, n=10$ )



注：K 组，空白对照组；M 组，模型组；Y 组，依那普利组；G 组，滋蔺通脉饮高剂量组；D 组，滋蔺通脉饮低剂量组。与空白对照组比较，<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与模型组比较，<sup>ΔΔ</sup> $P < 0.01$

图 2 各组 TGF- $\beta$ 1、Smads3 和 Smads7 的蛋白表达( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Figure 2 Protein expression of TGF- $\beta$ 1, Smads3 and Smads7 in each group( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

**2.4 各组大鼠心肌组织胶原改变** 见图 3、表 4。空白对照组大鼠心肌纤维排列整齐，横纹较清楚，肌纤维连接完好。模型组大鼠心肌纤维排列紊乱，增粗，胶原纤维增多，可见纤维断裂。滋蔺通脉饮高剂量组：肌纤维排列整齐，可见极少量胶原纤维。滋蔺通脉饮低剂量组：肌纤维排列稍紊乱，可见少

量胶原纤维堆积，肌纤维增粗。依那普利组：肌纤维排列致密，可见极少量胶原纤维，肌纤维断裂不明显。与空白对照组比较，模型组大鼠胶原容积分数明显升高( $P < 0.01$ )；与模型组比较，滋蔺通脉饮高剂量组、滋蔺通脉饮低剂量组和依那普利组胶原容积分数明显降低( $P < 0.01$ )。

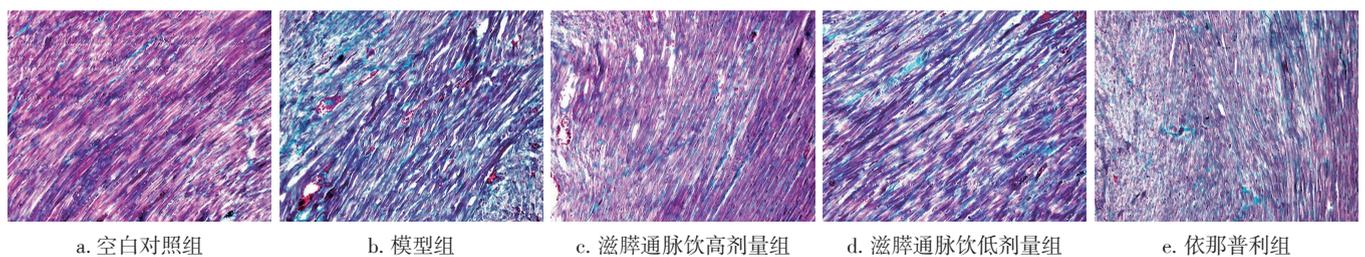


图 3 各组心肌组织胶原纤维的改变(Masson 染色,  $\times 200$ )

Figure 3 Changes of collagen fibers in myocardium(Masson staining,  $\times 200$ )

表4 各组大鼠胶原容积分数比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )Table 4 Comparison of collagen volume fraction in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

分组	胶原容积分数/%
空白对照组	4.94±1.26
模型组	19.35±2.38**
滋脾通脉饮高剂量组	13.72±2.1**
滋脾通脉饮低剂量组	16.09±2.33**
依那普利组	13.26±2.39**

注:与空白对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较, \*\* $P < 0.01$

### 3 讨论

糖尿病心肌病是糖尿病诱发的一种慢性心肌的病理改变,是糖尿病的一种血管并发症,与糖尿病患者心力衰竭的发生发展密切相关,主要表现为心肌间质的纤维化, TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路与心肌纤维化的发生发展密切相关<sup>[10]</sup>。研究<sup>[11]</sup>显示, TGF- $\beta$ 1 水平明显上升,与心室重构关系密切,可作为早期诊断糖尿病心肌病的依据。Smads 蛋白是目前所知的主要的 TGF- $\beta$ 1 受体胞内激活底物,参与 TGF- $\beta$ 1 信号传导的 Smad 蛋白主要有 Smads2、Smads3、Smads4 和 Smads7,主要参与纤维化的过程<sup>[12]</sup>。有研究<sup>[13]</sup>显示,糖尿病大鼠心肌组织 TGF- $\beta$ 1/Smads3 信号通路中 TGF- $\beta$ 1、Smads3 表达明显高于正常对照组,而 Smads7 表达明显低于正常对照组,从而说明 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路参与了糖尿病心肌病变的过程。调节该信号通路可能有效地抑制了心肌纤维化,从而延缓心肌重构和心力衰竭的发生发展。近年来,关于糖尿病心肌病的治疗手段颇多,但主要集中在 ACEI 类和 ARB 类药物的治疗方面。研究<sup>[14-15]</sup>显示,ACEI 类药物能抑制糖尿病心肌纤维化,抑制心肌细胞凋亡,保护心功能,改善糖尿病心肌病患者预后。但该类药物存在一定的副作用,长期运用易引起低血压、高血钾、肝功能损伤和胃肠道反应,因此寻求一种有效的纯中药制剂防治糖尿病心肌病,降低再住院率,方便广大的糖尿病心肌病患者,实属必要。

随着中医药工作者的不懈努力,中医药治疗糖尿病心肌病已取得丰硕的成果。现代研究表明,中医药治疗糖尿病心肌病疗效确切,不仅可改善患者中医证候疗效<sup>[16]</sup>,而且可以降低糖尿病大鼠血糖、下调 TGF- $\beta$ 1 蛋白及其受体 TGF- $\beta$ R II,上调 Smads7 蛋白的表达,改善心功能,干预糖尿病心肌病变<sup>[17-18]</sup>,具有疗效好、毒副作用小等优势。本研究结

果显示,滋脾通脉饮能明显降低糖尿病大鼠 TGF- $\beta$ 1、Smads3 的蛋白表达,上调 Smads7 的蛋白表达,调节 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路,这与文献研究结果相符;Masson 染色结果显示,滋脾通脉饮还能抑制心肌纤维化,同时明显降低心脏指数和左室指数,改善心肌重构。推测滋脾通脉饮可能通过调节 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路而改善心肌重构。

糖尿病心肌病归属于中医“消渴”“胸痹心痛”“心悸”“真心痛”等病的范畴。本病的病位在心。糖尿病心肌病的病机可以简单地概括为“虚”和“瘀”,基本病理变化为虚、瘀作祟,阻滞了络脉。消渴病机多为阴虚燥热,消渴日久,耗气伤阴,因此“虚”即为我们所说的气虚和阴虚。气阴两虚、络脉空虚是本病发生的始动因素,而络脉瘀阻是本病形成的病理基础。有研究显示,气虚、阴虚、血瘀是糖尿病心肌病的主要病机,运用益气养阴活血法治疗糖尿病心肌病,不仅有辅助降糖、调脂的作用,还能改善心室的舒张功能,改善中医的证候疗效<sup>[19]</sup>。

滋脾通脉饮系《医学衷中参西录》“滋脾饮”加活血通络药物组成。方中生地、麦冬、玄参、山茱萸、天花粉滋养五脏之阴,生津润燥。药理研究显示,麦冬的活性成分对实验性心肌梗死有一定保护作用<sup>[20]</sup>;玄参的有效成分玄参多糖对糖尿病大鼠有明显的降低血糖的作用<sup>[21]</sup>,同时玄参活性部位能有效抑制心室重构大鼠 III 型胶原 mRNA 表达,改善心室重构<sup>[22]</sup>。方中丹参、川芎、生蒲黄、地龙、水蛭、鬼箭羽活血化瘀。现代药理研究显示,鬼箭羽具有降糖、降脂、保护心脑血管作用<sup>[23]</sup>;丹参提取物丹参多酚酸盐能降低糖尿病患者血糖,发挥血管保护作用,改善血管内皮功能<sup>[24]</sup>;川芎活血化瘀,对心肌缺血有明显的保护作用<sup>[25]</sup>。方中黄芪益气升阳,助主药活血通络,药理研究<sup>[26]</sup>显示,黄芪的有效成分黄芪三萜皂苷能抑制 TGF- $\beta$ 1/Smads2 信号通路而改善心肌纤维化。佐以僵蚕、全蝎熄风通络,山楂消食活血,同时防止滋阴活血药物碍胃。全方具有益气养阴、活血通络之效。本研究结果显示,滋脾通脉饮能调节 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路,抑制心肌纤维化,改善心肌重构。

综上所述,滋脾通脉饮能抑制糖尿病心肌病大鼠心肌纤维化,改善心肌重构,其作用可能与调节 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路有关,这可能也是滋脾通脉饮治疗糖尿病心肌病的作用机制。

## 参考文献:

- [1] HUYNH K, BERNARDO B C, MCMULLEN J R, et al. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms and new treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways[J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 142(3): 375-415.
- [2] ISFORT M, STEVENS S C, SCHAFFER S, et al. Metabolic dysfunction in diabetic cardiomyopathy[J]. *Heart Fail Rev*, 2014, 19(1): 35-48.
- [3] 宋亚男, 王烙佩, 郑杰, 等. 参总皂苷通过调节 TGF- $\beta$ 1/Smad3 通路改善衰老大鼠心肌纤维化的作用研究[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(22): 4513-4518.
- [4] AMARAKOON R, OVERSTREET J M, HIGGINS P J. TGF- $\beta$  signaling in tissue fibrosis: redox controls, target genes and therapeutic opportunities[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(1): 264.
- [5] 卜献春, 李佑生, 宁泽璞, 等. 滋脾通脉饮治疗糖尿病高粘血症并脑循环障碍 104 例[J]. *湖南中医药导报*, 1995, 1(1): 18-21.
- [6] 吴刚强, 温小凤, 谭军, 等. 滋脾通脉饮对 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗和超敏 C 反应蛋白的影响[J]. *中医药导报*, 2017, 23(4): 101-103.
- [7] 黄建强, 卜献春. 滋脾通脉饮治疗糖尿病性冠心病 65 例疗效观察[J]. *湖南中医杂志*, 2010, 26(3): 8-9, 39.
- [8] GAO Y, ZHANG M, WU T, et al. Effects of D-Pinitol on insulin resistance through the PI3K/Akt signaling pathway in type 2 diabetes mellitus rats[J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(26): 6019-6026.
- [9] 陆梓华, 吕雄, 曹明满, 等. 舒正颗粒对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢异常 PI3K/AKT 信号通路的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2020, 37(1): 128-134.
- [10] 白晓丽, 武鸿儒, 刘晶, 等. 脂联素通过 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路对 2 型糖尿病大鼠心肌病变的保护作用[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17(7): 1001-1004.
- [11] 李晓丽, 刘玲玲, 赵龙, 等. 2 型糖尿病患者血浆 TGF- $\beta$ 1 水平及其与心脏结构和功能的关系[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2015, 25(4): 317-321.
- [12] TANDON A, TOVEY J C, SHARMA A, et al. Role of transforming growth factor Beta in corneal function, biology and pathology[J]. *Curr Mol Med*, 2010, 10(6): 565-578.
- [13] 刘晶, 武鸿儒, 高晓芳, 等. 脂联素对 2 型糖尿病大鼠心肌组织 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17(4): 514-518.
- [14] 巩璐伟, 周丽珍, 苏国海. 培哚普利通过调节 Akt-FoxO1 通路保护糖尿病性心肌病大鼠心功能损伤[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2017, 55(10): 65-70.
- [15] 王宪娟. 贝那普利治疗糖尿病心肌病的临床疗效观察[J]. *临床合理用药*, 2016, 9(4): 33-34.
- [16] 董丽, 江云东, 陈乔, 等. 蛭龙活血通瘀胶囊治疗糖尿病心肌病心功能不全的临床观察[J]. *西南医科大学学报*, 2019, 42(3): 271-274.
- [17] 储全根, 刘新萍, 张凯, 等. 抵当汤及其拆方对糖尿病大鼠心肌 TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ R II 及 Smad7 蛋白表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(1): 93-97.
- [18] 张会超, 聂恒, 芮浩森, 等. 抗纤益心方通过 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路改善糖尿病心肌病大鼠心肌纤维化和心功能的研究[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2018, 37(3): 415-419.
- [19] 张艳, 王澎澎, 蔡欢. 益气养阴活血方治疗早期糖尿病心肌病的临床观察[J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(5): 543-546.
- [20] 陈晨, 楚世峰. 麦冬抗缺血性心脑血管疾病药理研究进展[J]. *神经药理学报*, 2018, 8(6): 38.
- [21] 赵洪伟, 张, 李自辉, 等. 玄参多糖对 2 型糖尿病大鼠降糖作用的研究[J]. *中医药信息*, 2017, 34(5): 8-12.
- [22] 黄小燕, 王坤, 陈长勋. 玄参活性部位对冠状动脉结扎致心室重构大鼠心肌纤维化的影响[J]. *中医学报*, 2012, 27(173): 1292-1296.
- [23] 张艳霞. 鬼箭羽在糖尿病中的实验研究及临床应用概况[J]. *全科口腔医学杂志*, 2018, 5(32): 31-32.
- [24] 许艳玲, 赵玉珠. 丹参多酚酸盐对糖尿病患者的血管保护作用及血浆 ET-1、VEGF、PIGF 水平的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(16): 1778-1780.
- [25] 姜溪, 邵凤, 郑敬, 等. 川芎救心滴丸对动物实验性心肌缺血的保护作用研究[J]. *现代药物与临床*, 2014, 29(5): 476-480.
- [26] 张兰, 刘晶, 刘天龙, 等. 肖黄芪三萜皂苷通过抑制 TGF- $\beta$ 1/Smads2、p38MAPK 信号抑制 CVB3 诱导的心肌纤维化[J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2018, 10(5): 2631-2634.

(编辑: 修春)