

## 抵挡陷胸汤对高糖诱导心肌微血管内皮细胞损伤的影响

喻锦<sup>1</sup>, 储全根<sup>1,2\*</sup>, 李飞翔<sup>1</sup>, 蔡正银<sup>1</sup>, 储俊<sup>2</sup>

(1. 安徽中医药大学 中医学院, 合肥 230038;

2. 安徽中医药大学 教育部新安医学重点实验室, 合肥 230038)

**[摘要]** **目的:**基于高糖诱导的心肌微血管内皮细胞(CMECs)模型,观察抵挡陷胸汤对其损伤的影响,并探讨其相关作用机制。**方法:**采用体外培养大鼠原代心肌细胞,给予33 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖造模,造模成功后随机分为模型组(葡萄糖终浓度为33 mmol·L<sup>-1</sup>)、正常组、抵挡陷胸汤低剂量组(葡萄糖+5%抵挡陷胸汤含药血清)、抵挡陷胸汤中剂量组(葡萄糖+10%抵挡陷胸汤含药血清)、抵挡陷胸汤高剂量组(葡萄糖+20%抵挡陷胸汤含药血清)和阿拉氯胺(ALT-711)组(葡萄糖+10%ALT-711含药血清)。采用噻唑蓝(MTT)比色法检测含药血清对CMECs增殖的影响;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测各组c-Jun mRNA相对表达水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测磷酸化蛋白质酪氨酸激酶1(p-JAK1)、磷酸化信号转导和转录激活因子1(p-STAT1)、转化生长因子-β<sub>1</sub>(TGF-β<sub>1</sub>)蛋白的表达水平。**结果:**与正常组比较,模型组细胞中c-Jun mRNA、p-JAK1、p-STAT1及TGF-β<sub>1</sub>蛋白的表达均显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,各治疗组细胞中c-Jun mRNA表达水平显著降低( $P<0.01$ ),抵挡陷胸汤中、高剂量组及ALT-711组中p-JAK1、p-STAT1蛋白表达水平均明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ),抵挡陷胸汤低剂量组变化差异无统计学意义,各用药组TGF-β<sub>1</sub>蛋白均明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ),且抵挡陷胸汤中、高剂量组较低剂量组下降明显。**结论:**抵挡陷胸汤对高糖损伤的CMECs起到保护作用,其机制可能与降低细胞内JAK/STAT信号转导通路活性有关。

**[关键词]** 抵挡陷胸汤; 糖尿病心肌病; 心肌微血管内皮细胞; 蛋白质酪氨酸激酶1/信号转导和转录激活因子(JAK/STAT)信号通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)09-0052-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220805

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220211.1415.002.html>

[网络出版日期] 2022-02-11 15:12

## Effect of Didang Xianxiong Decoction on Cardiac Myocardial Microvascular Endothelial Cell Injury Induced by High Glucose

YU Jin<sup>1</sup>, CHU Quan-gen<sup>1,2\*</sup>, LI Fei-xiang<sup>1</sup>, CAI Zheng-yin<sup>1</sup>, CHU Jun<sup>2</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China;

2. Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

**[Abstract]** **Objective:** This study was designed to observe the effect of Didang Xianxiong decoction on the cardiac myocardial microvascular endothelial cells (CMECs) injury, and to explore its related mechanism based on the CMECs model induced by high glucose. **Method:** Rat primary myocardial cells were cultured *in vitro* and 33 mmol·L<sup>-1</sup> glucose was added for modeling. After modeling, the rats were randomly divided into model group (final glucose concentration: 33 mmol·L<sup>-1</sup>), normal group, Didang Xianxiong decoction low dose group (glucose + 5% Didang Xianxiong decoction containing serum), Didang Xianxiong decoction medium

[收稿日期] 2021-12-15

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774189)

[第一作者] 喻锦,在读硕士,从事经方治疗疑难病症机制研究,E-mail:916815407@qq.com

[通信作者] \* 储全根,博士,教授,从事经方治疗疑难病症机制研究,E-mail:286428483@qq.com

dose group (glucose+10% Didang Xianxiong decoction containing serum), Didang Xianxiong decoction high dose group (glucose+20% Didang Xianxiong decoction containing serum) and alagebrium chloride (ALT-711) group (glucose+10% ALT-711 containing serum). The influence of drug-containing serum on the proliferation of CMECs was detected by MTT tetrazolium salt colorimetric assay. The relative mRNA expression of c-Jun was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). The protein expression of phosphorylated Janus kinase 1 (p-JAK1), phosphorylated signal transducer and activator of transcription 1 (p-STAT1) and transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) was determined by Western blot. **Result:** Compared with the conditions in normal group, the mRNA expression of c-Jun and protein expression of p-JAK1, p-STAT1 and TGF- $\beta_1$  were up-regulated in model group ( $P<0.01$ ). Compared with model group, all treatment groups had decreased mRNA expression of c-Jun ( $P<0.01$ ). Didang Xianxiong decoction medium and high dose groups and ALT-711 group showed reduced protein expression of p-JAK1 and p-STAT1 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), while there was no significant change in Didang Xianxiong decoction low dose group. TGF- $\beta_1$  protein expression was lowered in all treatment groups ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and the decrease was more significant in Didang Xianxiong decoction medium and high dose groups than Didang Xianxiong decoction low dose group. **Conclusion:** Didang Xianxiong decoction can protect CMECs with high glucose-induced injury, and the mechanism may be related to reducing the activity of JAK/STAT signaling pathway in cells.

**[Keywords]** Didang Xianxiong decoction; diabetic cardiomyopathy; cardiac myocardial microvascular endothelial cells (CMECs); Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) signaling pathway

糖尿病心肌病(DCM)是糖尿病(DM)心血管并发症之一,其主要病理特征为心肌纤维化、左心室肥厚、心肌细胞坏死、心肌内微血管病变及舒张功能障碍等心肌结构与功能的改变<sup>[1]</sup>。晚期糖基化终末产物(AGEs)是还原糖的活性羰基与蛋白质、脂肪和核酸的自由氨基,发生非酶促反应形成的一系列具有毒性而不可逆的化合物,在与其特异性受体(RAGE)结合后激活多个细胞内信号转导,参与不同类型细胞的氧化应激、炎症反应和血栓形成过程,导致心肌细胞和组织损伤<sup>[2-3]</sup>。研究发现,Janus激酶/信号转导和转录激活因子(JAK/STAT)信号通路是与心肌肥厚密切相关的细胞内信号通路,在细胞的生长、存活、分化和调节中起着关键作用<sup>[4]</sup>。高糖刺激下,AGEs/RAGE通过激活心肌细胞内JAK/STAT信号通路,使JAK蛋白磷酸化,与STAT蛋白结合转移到细胞核中,调节其转录,增加多种炎症介质的表达,进而引起炎症细胞因子向血管内皮黏附和浸润增多,最终导致了心肌内皮细胞的损伤<sup>[5-6]</sup>。

抵当陷胸汤由水蛭、虻虫、桃仁、大黄、黄连、半夏、全瓜蒌组成,是抵当汤与小陷胸汤组成的合方,二方均出于张仲景的《伤寒杂病论》,抵当汤具有逐瘀泻热的作用,小陷胸汤具有清热化痰的作用,两方合用,共奏痰瘀同治之功。基于课题组前期体内

实验研究,发现具有痰瘀同治作用的抵当陷胸汤对糖尿病心肌病变大鼠具有保护干预作用<sup>[7-9]</sup>。鉴于这一基础,本实验通过体外高糖诱导心肌微血管内皮细胞(CMECs)损伤为模型进行研究,以抵当陷胸汤含药血清为干预手段,以对AGEs及其交联结构有裂解作用的AGEs特异性蛋白交联抑制剂阿拉氯胺(ALT-711)<sup>[10]</sup>作为对照,检测CMECs中c-Jun基因、磷酸化(p)-JAK1、p-STAT1及转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )蛋白的表达,探讨抵当陷胸汤对高糖诱导损伤的CMECs的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 选取健康雄性清洁级SD大鼠60只,体质量为(220±20)g,鼠龄为12周,购于济南朋悦实验动物繁育有限公司,并取得大鼠合格证号SCXK(鲁)2019-0003。实验通过安徽中医药大学实验动物中心伦理审批(AHUCM-rats-2019014)。

**1.2 药物** 抵当陷胸汤由虻虫10g、水蛭10g、制大黄10g、桃仁15g、清半夏10g、黄连5g、全瓜蒌30g(批号分别为181201、200501、200301、20210401、201103、20210301、20210701)组成。饮片统一购买于安徽中医药大学国医堂门诊部,由安徽中医药大学药学院金传山教授鉴定,符合2020年版《中华人民共和国药典》项下性状要求。药物煎煮浓缩制备成冻干粉,每次灌胃前称取冻干粉溶解

于蒸馏水中配制成所需浓度。AGEs特异性蛋白交联抑制剂ALT-711(美国MedChemExpress公司,规格为50 mg/支,批号HY-106024B)。

**1.3 试剂** 噻唑蓝(MTT)检测试剂盒(上海贝博生物科技有限公司,批号BB18121);大鼠AGEs试剂盒(武汉基因美科技有限公司,批号GR2019-11);BCA蛋白浓度测定试剂盒、RIPA细胞裂解液、蛋白免疫印迹法(Western blot)一抗、二抗去除液(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为052319190729、111219191219、051418180626);血管性假血友病因子(vWf,上海哈灵生物科技有限公司,批号G1420);ECL超敏发光试剂盒(美国Thermo公司,批号S1257444);TGF- $\beta_1$ 、p-JAK1、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为AD112007、AG11139224、19C10509);p-STAT1(英国Abcam公司,批号GR311501-5);山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G、山羊抗兔IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为142637、136080);TRIzol(美国Life technologies公司,批号204403);Novostart SYBR实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) SuperMix Plus[安诺伦(北京)生物技术有限公司,批号0512841];PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser[宝日医生物技术(北京)有限公司,批号AJ51485A]。

**1.4 仪器** EPS300型电泳仪(上海天能公司),PIKOREAL 96型 Real-time PCR仪(美国Thermo Scientific公司),RT-6000型酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司),JS-1070P型自动曝光仪(上海培清公司)。

## 2 方法

**2.1 含药血清制备** 将60只SD大鼠随机分为6组,每组10只灌胃,根据人和大鼠体表面积折算等效剂量<sup>[11]</sup>,抵挡陷胸汤低、中、高剂量组分别按4.05、8.10、16.20 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>给予相应汤剂灌胃(分别相当于临床等效剂量的0.5、1、2倍),ALT-711组按剂量为0.3 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>溶液灌胃,制备成含药血清;剩余2组大鼠予等体积的蒸馏水灌胃,制备空白血清。灌胃2次/d,连续灌胃1周。末次灌胃1 h后,采用3%戊巴比妥钠(30 mg·kg<sup>-1</sup>)麻醉,腹主动脉取血,静置后将离心机转速设为3 000 r·min<sup>-1</sup>,离心15 min(离心半径7 cm,下同)后取血清,水浴灭活补体,过滤除菌后分装,分别制成各含药血清和空白血清,-80 °C冻存备用。

**2.2 CMECs的培养** 参考文献[12]利用酶消化法

从大鼠心脏中分离出原代CMECs,观察细胞生长状态,利用免疫荧光法鉴定为第一代CMECs后,用10 mL含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素混合液配制的细胞培养液重悬细胞,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,细胞传代至第3代备用。

**2.3 MTT比色法检测含药血清对CMECs增殖的影响** 参考文献[13]以33 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖干预细胞48 h,接种于96孔培养板中,过夜培养,分别加入5%、10%、20%、40%不同浓度的含药血清,分别进行孵育24、48、72 h后,弃去培养基,避光加入MTT溶液,放入培养箱中培养4 h;每孔加入二甲基亚砜150  $\mu$ L,低速振荡10 min,在酶联免疫检测仪490 nm处测量各孔的吸光度A,同时设置调零孔酶标仪,A<sub>490 nm</sub>处检测细胞存活率。

**2.4 实验分组与干预** 将造模成功的CMECs进行消化、离心和重悬,调整细胞密度为1×10<sup>5</sup>个/mL,接种于6孔板,其中正常组:培养基+空白血清+正常CMECs;模型组:培养基+33 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖+空白血清;抵挡陷胸汤低剂量组:培养基+33 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖+5%抵挡陷胸汤含药血清;抵挡陷胸汤中剂量组:培养基+33 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖+10%抵挡陷胸汤含药血清;抵挡陷胸汤高剂量组:培养基+33 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖+20%抵挡陷胸汤含药血清;ALT-711组:培养基+33 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖+ALT-711+空白血清。在培养箱中培养48 h后检测相关指标。

## 2.5 检测指标

**2.5.1 Real-time PCR检测c-Jun mRNA的表达水平** 用TRIzol法提取细胞的mRNA,并测定其纯度,然后逆转录成cDNA后进行PCR扩增,采用2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>T</sub></sup>法计算各组基因的相对表达水平。以 $\beta$ -actin为内参,反应程序为95 °C预变性1 min,95 °C变性20 s,60 °C退火延伸1 min,40个循环,然后进行60~95 °C的熔解曲线分析。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
c-Jun	上游 TTCTGACCAACTGCCTGGAT	74
	下游 AAGGGACTCTCCAAGTGCTC	
$\beta$ -actin	上游 CCCATCTATGAGGGTTACGC	150
	下游 TTTAATGTCACGCACGATTTC	

**2.5.2 Western blot检测CMECs中p-JAK1、p-STAT1和TGF- $\beta_1$ 蛋白的表达水平** 将体外培养的心肌细胞,吸去培养基后,预冷磷酸盐缓冲液(PBS)

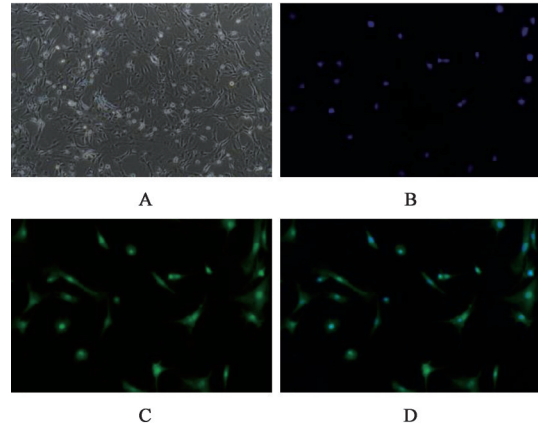
洗2次,加入适量胰蛋白酶消化液,37℃消化,以12 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min。处理之后按照试剂盒的要求加入细胞裂解液于冰上裂解,提取总蛋白,SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白后转膜,5%脱脂奶粉室温封闭2 h。加入一抗p-JAK1(1:300)、p-STAT1(1:5 000)、TGF-β<sub>1</sub>(1:1 000)、β-actin(1:1 000)稀释,4℃孵育过夜,漂洗后予以二抗(1:1万)室温下孵育2 h,再漂洗,参照ECL发光试剂盒说明书,在凝胶成像仪分析仪采集图像,使用Image J软件进行胶片条带的分析。

**2.6 统计学分析** 采用SPSS 23.0统计软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组数据组之间采用两独立样本*t*检验,三组或多组间之间采用单因素方差分析法比较,均数多重比较采用最小显著性差异法(LSD)检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 CMECs 鉴定** 倒置荧光显微镜下观察显示,贴壁细胞散在分布,形态呈梭形、三角形或多角形,边界清楚,呈“鹅卵石”样形态结构。免疫荧光细胞化学染色显示,绿色染色为vWF蛋白,DAPI将细胞核染成蓝色,因采取体外分离法剥离血管,表明细胞不是大血管内皮细胞,可以鉴定为CMECs。见图1。

**3.2 MTT 比色法检测含药血清对CMECs增殖的影响** 采用百分比为5%、10%、20%的抵当陷胸汤含药血清,对造模成功的CMECs干预24、48、72 h。33 mmol·L<sup>-1</sup>的葡萄糖作用CMECs 24 h后,其凋亡率显著增加( $P<0.01$ )。与模型组比较,作用24 h后,抵当陷胸汤5%含药血清促进CMECs的增殖不显著;10%、20%的抵当陷胸汤含药血清促进CMECs的增殖显著( $P<0.01$ )。作用48 h和72 h后,抵当陷胸汤5%、10%、20%的含药血清均可显著促进CMECs的增殖,差异有显著统计学意义( $P<$



注:A. Morphology; B. DAPI; C. vWF; D. Merge

图1 CMECs鉴定(vWF因子检测)(免疫荧光,×200)

Fig. 1 Identification of CMECs (vWF factor detection) (IF, ×200)

0.01)。见表2。

### 3.3 对CMECs的c-Jun mRNA表达水平的影响

与正常组比较,模型组中的c-Jun mRNA表达水平均显著上调( $P<0.01$ );与模型组比较,各用药组c-Jun mRNA表达水平显著下调( $P<0.01$ );用药组组间比较发现,抵当陷胸汤中剂量组比低剂量组的c-Jun mRNA表达水平下调更显著( $P<0.01$ )。见表3。

### 3.4 对CMECs中p-JAK1、p-STAT1和TGF-β<sub>1</sub>的蛋白表达水平的影响

与正常组比较,模型组CMECs中p-JAK1、p-STAT1及TGF-β<sub>1</sub>蛋白的表达水平显著增高( $P<0.01$ );与模型组比较,抵当陷胸汤中、高剂量组及ALT-711组中p-JAK1、p-STAT1蛋白的表达水平明显下降( $P<0.05, P<0.01$ ),其中,与抵当陷胸汤低剂量组比较,抵当陷胸汤中剂量组下降更显著( $P<0.01$ ),抵当陷胸汤低剂量组蛋白表达水平差异无统计学意义;与模型组比较,各用药组中TGF-β<sub>1</sub>蛋白的表达水平明显下降( $P<0.05, P<0.01$ ),其中,抵当陷胸汤中、高剂量组及ALT-711组较低剂量组下降更显著( $P<0.01$ )。见图2和表4。

表2 MTT法检测含药血清对CMECs增殖的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 2 MTT assay was used to detect effect of drug-containing serum on proliferation of CMECs ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	含药血清/%	A		
		24 h	48 h	72 h
正常组		1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组		0.61±0.02 <sup>1)</sup>	0.53±0.03 <sup>1)</sup>	0.59±0.03 <sup>1)</sup>
抵当陷胸汤低剂量组	5	0.66±0.04	0.70±0.04 <sup>3)</sup>	0.72±0.03 <sup>3)</sup>
抵当陷胸汤中剂量组	10	0.76±0.06 <sup>3)</sup>	0.90±0.03 <sup>3)</sup>	0.84±0.04 <sup>3)</sup>
抵当陷胸汤高剂量组	20	0.70±0.02 <sup>2)</sup>	0.82±0.02 <sup>3)</sup>	0.81±0.05 <sup>3)</sup>

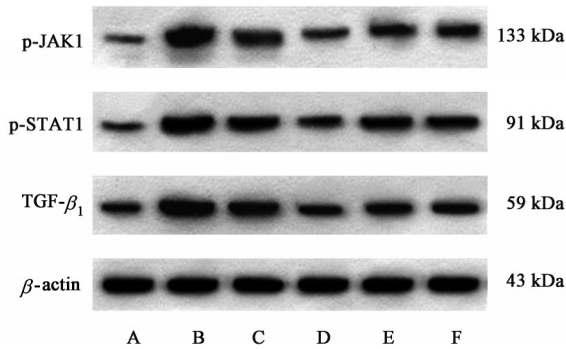
注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05, ^3)$  $P<0.01$

表3 抵挡陷胸汤对CMECs的c-Jun mRNA表达水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of Didang Xianxiong decoction on c-Jun mRNA expression level of CMECs ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	c-Jun
正常组		1.00±0.11
模型组		2.98±0.57 <sup>1)</sup>
抵挡陷胸汤低剂量组	4.05	2.19±0.14 <sup>2)</sup>
抵挡陷胸汤中剂量组	8.10	1.43±0.11 <sup>2,3)</sup>
抵挡陷胸汤高剂量组	16.20	1.89±0.09 <sup>2)</sup>
ALT-711组	0.30	1.75±0.14 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.01;与抵挡陷胸汤低剂量组比较<sup>3)</sup>P<0.01



注:A. 正常组;B. 模型组;C. 抵挡陷胸汤低剂量组;D. 抵挡陷胸汤中剂量组;E. 抵挡陷胸汤高剂量组;F. ALT-711组

图2 各组CMECs p-JAK1、p-STAT1、TGF-β<sub>1</sub>蛋白表达电泳  
Fig. 2 Electrophoresis of p-JAK1, p-STAT1, TGF-β<sub>1</sub> protein expression in each groups

#### 4 讨论

古代医籍中对DCM并没有独立的病名描述,根据其症状特征可归属于中医“消渴病”并发“胸痹”“心悸”等范畴<sup>[14]</sup>。DM发展到DCM一般病程较长,符合“久病”特征,心肌微血管和细胞外基质分别与“血络”“气络”相吻合<sup>[15]</sup>,AGEs是经糖基化反应而形成的复合物,研究表明,高糖环境下AGEs在

心肌细胞局部聚集,激活核转录因子,从而介导心肌血管炎症反应,导致心肌微血管内皮的损伤、心肌的纤维化,使气血在脉络中运行不畅或产生阻塞,形成“痰浊”“瘀阻”,这些病变与中医的“久病入络”相类似,故课题组提出糖尿病心肌病变的病理过程中存在“痰瘀互结阻络”的病机<sup>[16]</sup>。前期研究表明,具有痰瘀同治作用的经方抵挡陷胸汤对DCM大鼠心肌具有较好的保护作用,能有效改善DCM大鼠心肌纤维化和微血管病变,降低炎症反应<sup>[7-9,13,17]</sup>。因此在既往研究基础上,以“痰瘀同治”为防治原则,抵挡汤与小陷胸汤合方(简称抵挡陷胸汤)为主方,探讨其对CMECs损伤的作用机制。方中水蛭咸苦平,虻虫苦微寒,二药均可破血逐瘀通络,且虫类药物走窜,能深入细窄的络脉中,以深搜剔络脉伏邪<sup>[18]</sup>;桃仁苦平,大黄苦寒,二药均可破血逐瘀泻热;半夏味辛性温,燥湿化痰,消痞散结;黄连苦寒,清热燥湿,泻火解毒;瓜蒌性寒,味甘、微苦,清热化痰,宽胸散结;现代药理学研究表明,半夏具有止咳、祛痰、降血脂和抗心律失常等作用;黄连具有抗炎、解热、降血糖、抗心律失常、保护心肌缺血等多种药理作用;瓜蒌具有祛痰、减轻炎症、抑菌、抑制溃疡形成、扩张冠状动脉、抑制血小板凝集等作用。诸药合用,搜络化瘀,化痰宽胸,共奏“痰瘀同治”之功<sup>[19]</sup>。

JAK/STAT信号通路是多种细胞因子和生长因子的主要信号传导通路,参与调节细胞的增殖、分化、迁移、凋亡和免疫调节等多种生物学反应,其与压力负荷引起的心肌肥厚、心力衰竭、缺血-再灌注引起的心功能障碍等密切相关,对DCM的发生和发展具有重要的调控作用<sup>[20-22]</sup>。JAK/STAT信号通路还参与AGEs刺激细胞分泌细胞外基质蛋白的过程<sup>[23]</sup>,在被JAK磷酸化后,STAT蛋白转入细胞核,结合到靶基因的启动子区域,并调节其转录在心脏

表4 抵挡陷胸汤对CMECs中p-JAK1、p-STAT1和TGF-β<sub>1</sub>的蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of Didang Xianxiong decoction on p-JAK1, p-STAT1 and TGF-β<sub>1</sub> expression level of CMECs ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p-JAK1/β-actin	p-SAT1/β-actin	TGF-β <sub>1</sub> /β-actin
正常组		0.41±0.13	0.48±0.10	0.57±0.09
模型组		1.10±0.10 <sup>1)</sup>	1.13±0.02 <sup>1)</sup>	1.19±0.03 <sup>1)</sup>
抵挡陷胸汤低剂量组	4.05	0.87±0.19	0.96±0.10	1.06±0.03 <sup>2)</sup>
抵挡陷胸汤中剂量组	8.10	0.49±0.10 <sup>3)</sup>	0.64±0.10 <sup>3,4)</sup>	0.74±0.07 <sup>3,4)</sup>
抵挡陷胸汤高剂量组	16.20	0.61±0.15 <sup>2)</sup>	0.81±0.09 <sup>3)</sup>	0.73±0.04 <sup>3,4)</sup>
ALT-711组	0.30	0.59±0.27 <sup>2)</sup>	0.79±0.06 <sup>3)</sup>	0.65±0.05 <sup>3,4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.05,<sup>3)</sup>P<0.01;与抵挡陷胸汤低剂量组比较<sup>4)</sup>P<0.01

中,STATs调节与血管生成、细胞外基质组成、炎症、凋亡和细胞信号传导相关的基因编码蛋白的表达<sup>[24-25]</sup>。目前JAKs家族中发现4种激酶,JAK1、JAK2、JAK3、Tyk2,其中JAK1是表达最多的JAK激酶,参与多种细胞因子的信号转导过程,STATs是JAKs的靶蛋白存在于胞质中的一个转录因子家族,STAT有7种蛋白,STAT1是STAT家族中最早被发现和克隆的成员,被激活的p-JAK1磷酸化其下游信号蛋白STAT1(即形成p-STAT1),使其脱离受体并转运到细胞核<sup>[26]</sup>。p-STAT1在细胞核中作为转录因子诱导靶基因的转录<sup>[27]</sup>,JAK是早期生长应答基因c-Jun mRNA表达的主要介导者,激活JAK/STAT信号转导通路可上调原癌基因c-Jun的表达,形成的异源二聚体AP-1可以激活TGF- $\beta_1$ 基因启动子,引起TGF- $\beta_1$ 的基因表达增多<sup>[23,28]</sup>。TGF- $\beta_1$ 是一种调节细胞生长分化的多肽<sup>[29]</sup>,作为促进心肌纤维化最重要的因素之一,TGF- $\beta_1$ 能促使多种胶原基质蛋白合成分泌增加,也促进细胞外基质的合成和沉积,而胶原蛋白的改变将破坏心肌的力学性质、心室的结构与功能<sup>[30]</sup>,从而促使I型、III型胶原蛋白过度表达,在心肌ECM聚积,引起心肌的纤维化,心肌细胞的损伤<sup>[31]</sup>。

本实验结果表明,在高糖环境下,采用10%抵当陷胸汤(即中剂量)含药血清干预受损的CMECs 48 h后,细胞活力改善情况最佳,说明抵当陷胸汤含药血清对高糖诱导的CMECs有保护作用。Real-time PCR、Western blot检测发现,模型组CMECs中的c-Jun mRNA、p-JAK1、p-STAT1及TGF- $\beta_1$ 蛋白的表达较正常组明显升高,提示CMECs的损伤可能有JAK/STAT通路的参与;各用药组均能显著降低高糖诱导的CMECs的c-Jun mRNA、TGF- $\beta_1$ 蛋白的表达,抵当陷胸汤中、高剂量组均能显著降低p-JAK1、p-STAT1蛋白表达,而抵当陷胸汤低剂量组p-JAK1、p-STAT1蛋白表达与模型组比较差异无统计学意义,提示抵当陷胸汤可能在低剂量下对JAK/STAT信号通路无明显的抑制作用;在对上述指标的干预方面,抵当陷胸汤总体上与ALT-711组效果相当。

综上,抵当陷胸汤可能通过抑制JAK/STAT信号通路的活性,降低c-Jun mRNA、TGF- $\beta_1$ 蛋白的表达,减轻心肌的纤维化,从而减轻对CMECs的损伤。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] JIA G H, WHALEY-CONNELL A, SOWERS J R. Diabetic cardiomyopathy: A hyperglycaemia- and insulin-resistance-induced heart disease [J]. *Diabetologia*, 2018, 61(1): 21-28.
- [2] 苏中州, 吴铿. 晚期糖基化终末产物在糖尿病心肌病发病机制中的作用研究进展[J]. *医学综述*, 2013, 19(14): 2597-2599.
- [3] 李晓燕, 钱玲玲, 王如兴. 晚期糖基化终末产物对糖尿病心肌病影响的研究进展[J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2021, 21(2): 3895-3898.
- [4] BOENGLER K, BUECHERT A, HEINEN Y, et al. Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice[J]. *Circ Res*, 2008, 102(1): 131-135.
- [5] 轩云. “痰瘀同治”干预糖尿病大鼠心肌AGEs-RAGE轴所致病变的作用机理研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2020.
- [6] 杨爽. 基于JAK/STAT通路探讨桂枝芍药知母汤对TNF- $\alpha$ 诱导的MH7A细胞的抗炎作用[D]. 成都: 成都中医药大学, 2019.
- [7] 蔡正银, 储全根, 储俊, 等. 化痰化瘀通络法对糖尿病大鼠心肌微血管和细胞外间质的影响及机制研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2020, 40(8): 948-954.
- [8] 蔡正银, 储全根, 轩云, 等. 抵当陷胸汤对糖尿病大鼠肝脏TGF- $\beta_1$ /Smad3信号通路的影响[J]. *安徽中医药大学学报*, 2020, 39(3): 56-59.
- [9] 李飞翔, 储全根, 王盼, 等. 痰瘀同治调控TLR4/NF- $\kappa$ B/IKK $\beta$ 通路对糖尿病大鼠心肌炎症反应的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(22): 59-64.
- [10] CHEN N X, SRINIVASAN S, O'NEILL L, et al. Effect of advanced glycation end-products (AGE) lowering drug ALT-711 on biochemical, vascular, and bone parameters in a rat model of CKD-MBD [J]. *J Bone Miner Res*, 2020, 35(3): 608-617.
- [11] 徐叔云. *药理实验方法学*[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 192.
- [12] 辛毅, 刘小希, 赵伟, 等. 差速贴壁法分离兔骨髓源性间充质干细胞和内皮祖细胞及其生物学特性的研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2013, 21(3): 746-753.
- [13] 许笑雯, 储全根, 储俊, 等. 痰瘀同治法对糖尿病大鼠心肌微血管病变AGEs/RAGE轴及氧化应激的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2021, 41(10): 1527-1533.
- [14] 张驰. 冠心病合并2型糖尿病中医证型分布特点及与冠脉病变的相关性研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [15] 常成成, 李红蓉, 刘红利, 等. 络病学说营卫交会生理理论探讨[J]. *中医杂志*, 2017, 58(1): 2-5.

- [16] 李禄伟,于健. 糖基化终末产物与糖尿病微血管病变的研究进展[J]. 华夏医学,2020,33(3):173-177.
- [17] 程婕.“痰瘀同治”对糖尿病大鼠心肌AGEs蓄积及所致病变的干预作用研究[D]. 合肥:安徽中医药大学,2019.
- [18] 朱立,赵进喜,刘宁,等. 水蛭虻虫,活血可通络;[庶虫]虫鳖甲,化痰能散结[J]. 环球中医药,2019,12(9):1339-1341.
- [19] 国家药典委员会. 临床用药须知·中药饮片卷[M]. 北京:中国医药科技出版社,2011:833.
- [20] 李欣,张杰群,房辉. 链脉佐菌素致糖尿病大鼠心肌结缔组织生长因子及蛋白激酶C表达的实验研究[J]. 海南医学院学报,2013,19(8):1012-1015.
- [21] KIU H, NICHOLSON S E. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways [J]. Growth Factors,2012,30(2):88-106.
- [22] MONTERO P, MILARA J, ROGER I, et al. Role of JAK/STAT in interstitial lung diseases; molecular and cellular mechanisms[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(12): 6211.
- [23] HUANG J S, GUH J Y, HUNG W C, et al. Role of the Janus kinase (JAK)/signal transducers and activators of transcription (STAT) cascade in advanced glycation end-product-induced cellular mitogenesis in NRK-49F cells[J]. Biochem J, 1999, 342(Pt1): 231-238.
- [24] HILFIKER-KLEINER D, HILFIKER A, DREXLER H. Many good reasons to have STAT3 in the heart[J]. Pharmacol Ther,2005,107(1):131-137.
- [25] SNYDER M, HUANG X Y, ZHANG J J. Identification of novel direct Stat3 target genes for control of growth and differentiation[J]. J Biol Chem, 2008,283(7):3791-3798.
- [26] 晁鹏. JAK/STAT信号转导通路与心力衰竭的研究进展[J]. 心血管病学进展,2017,38(6):729-735.
- [27] WANG Y J, LI Y, WANG X L, et al. Effect of total flavonoids of oxytropis falcata bunge on the expression of p-JAK1-and p-STAT1-related proteins in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Evid Based Complement Alternat Med,2020,2020:2407239.
- [28] 芦文娟,方敬爱,孙艳艳,等. 益肾胶囊对糖尿病肾病大鼠肾组织JAK/STAT信号通路的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2011,12(7):574-577.
- [29] WANG L, LI J, LI D. Losartan reduces myocardial interstitial fibrosis in diabetic cardiomyopathy rats by inhibiting JAK/STAT signaling pathway[J]. Int J Clin Exp Pathol,2015,8(1):466-473.
- [30] 陈冰,彭娇娇,蔡启航,等. 不同胶原蛋白及TGF- $\beta_1$ 参与糖尿病心肌纤维化的形成[J]. 徐州医学院学报,2015,35(5):281-285.
- [31] 范美玲,应苗法,赵蕊,等. TGF- $\beta$ 信号通路在纤维化疾病中的作用研究进展[J]. 解放军医学杂志,2020,45(11):1171-1177.

[责任编辑 周冰冰]