

# 丹皮酚对大鼠急性心肌梗死所致心肌纤维化的影响及机制

时召平, 周晓慧, 徐倩, 曹凯\*

(河北省中药研究与开发重点实验室, 承德医学院 中药研究所, 河北 承德 067000)

**[摘要]** **目的:**观察丹皮酚(paeonol, Pae)对大鼠急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)所导致的心肌纤维化的干预作用,并研究其作用机制是否与Pae影响心肌组织中转化生长因子- $\beta_1$ (transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ ), Smad 2 mRNA及蛋白含量的表达有关。**方法:**采用左冠状前降支(LAD)结扎法制作大鼠急性心肌梗死模型,以心电图出现ST段水平向下或向上偏移 $\geq 0.1$  mV且T波高耸超过同导联R波的1/2、左室前壁颜色变苍白视为心肌梗死(MI)模型成功,将造模成功的大鼠随机分为模型组、丹皮酚低、高剂量组,另有只穿线不结扎的假手术组,共4组,丹皮酚低、高剂量组分别给予ip 8.0, 12.0 mg·kg<sup>-1</sup>剂量的丹皮酚注射液,假手术组与模型组每天ip等体积生理盐水,每天给药1次;28 d后取材,检测左心指数;HE染色,Masson染色分别观察心肌组织病理生理学改变及心肌间质纤维化情况,实时荧光定量RT-PCR和Western blotting法分别检测左室梗死区TGF- $\beta_1$ , Smad2的mRNA和蛋白表达。**结果:**左心指数:与假手术组比较,模型组左心指数明显升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,丹皮酚8.0, 12.0 mg·kg<sup>-1</sup>组左心指数均下降( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ );HE染色结果显示:与假手术组比较,模型组大鼠左室病理生理学改变显著,梗死边缘部分心肌细胞发生肥大、伸长、左心室壁部分心肌凝固性坏死,凋亡细胞胞核固缩,胞质伊红深染,另有部分发生疏松水肿,与模型组比较,丹皮酚8.0, 12.0 mg·kg<sup>-1</sup>组病理改变均不同程度减轻;Masson染色结果显示:与假手术组比较,模型组大鼠心肌胶原纤维明显增多,纤维瘢痕形成,心肌纤维化程度较重,与模型组比较,丹皮酚8.0, 12.0 mg·kg<sup>-1</sup>组大鼠心肌纤维化程度均不同程度减轻;与假手术组比较,模型组TGF- $\beta_1$ , Smad 2 mRNA和蛋白的相对表达量均增多( $P < 0.01$ );与模型组比较,丹皮酚8.0, 12.0 mg·kg<sup>-1</sup>组TGF- $\beta_1$ , Smad 2 mRNA和蛋白表达均降低( $P < 0.01$ )。**结论:**Pae具有抗急性心肌梗死所致大鼠心肌纤维化的作用,其机制可能与其干预TGF- $\beta_1$ /Smad2信号通路的传导有关。

**[关键词]** 丹皮酚; 急性心肌梗死; 心肌纤维化; 心室重构; 转化生长因子- $\beta$ /Smads信号转导通路

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)09-0150-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015090150

## Effect and Mechanism of Paeonol on Myocardial Fibrosis Induced by Myocardial Infarction in Rats

SHI Zhao-ping, ZHOU Xiao-hui, XU Qian, CAO Kai\* (Key Laboratory of Study and Exploiture for New Drugs of Traditional Chinese Medicine (TCM), Institute of TCM Medica of Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of paeonol (Pae) on myocardial fibrosis in rats with acute myocardial infarction (AMI) and to investigate whether its mechanism is related to the expression of transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), Smad2 mRNA and protein. **Method:** *In vivo* model of AMI was made using the ligation of left anterior descending coronary branch. The successful myocardial infarction (MI) modeling was based on the following changes like electrocardiogram (ECG) ST segment level downward or upward shift  $\geq 0.1$  mV and T wave towering over with R wave of 1/2, left ventricular anterior turned pale. The rats were randomly divided into the model group, the sham group, the low-, high-dose Pae groups (8.0, 12.0 mg·kg<sup>-1</sup>). The sham group and model group were given ip volume of saline daily. The left ventricular indexed were measured after 4 weeks. The pathology of myocardial tissue was observed by HE staining, the level of myocardial interstitial fibrosis was observed by Masson staining. The mRNA expression levels of TGF- $\beta_1$ , Smad 2 in myocardial tissues

**[收稿日期]** 20141023(008)

**[基金项目]** 河北省自然科学基金项目(C2011406009);河北省卫生计生厅医学科学研究重点课题计划项目(20100137)

**[第一作者]** 时召平, 硕士, 从事心血管药理学科研研究, Tel:13623246881, E-mail:13623246881@163.com

**[通讯作者]** \*曹凯, 硕士, 教授, 从事生物化学教学与科研研究, Tel:0314-2290999, E-mail:caokai58@163.com

were detected using real-time quantitative PCR (RT-PCR) technique. **Result:** Compared with the sham group, the left cardiac index was significantly higher ( $P < 0.01$ ) in the model group. Compared with the model group, the left cardiac index was decreased ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ) in all dose Pae groups. HE staining showed that compared with the sham group pathological changes were significantly in the model group, there were cardiac hypertrophy, elongation and coagulation necrosis in injured myocardial hypertrophy edge part, while some loose edema occurred in left ventricular myocardial wall portion. Compared with the model group, the pathological changes were decreased. Masson staining showed that compared with the sham group, collagen fibers increased significantly in model group, and there appeared fiber epilepsy marks, and also severe myocardial fibrosis, Compared with the model group, the level of myocardial fibrosis in all dose Pae groups were decreased. Compared with the sham group, TGF- $\beta_1$ , Smad 2 mRNA and protein expression levels were significantly increased ( $P < 0.05$ ); compared with the model group, the TGF- $\beta_1$ , Smad 2 mRNA and protein expression level were decreased ( $P < 0.01$ ) in all dose Pae groups. **Conclusion:** Pae has anti-myocardial fibrosis effect in AMI rats. Its mechanism may be related to the intervention of TGF- $\beta_1$ /Smad2 signaling pathways.

[**Key words**] paeonol; acute myocardial infarction; myocardial fibrosis; ventricular remodeling; transforming growth factor- $\beta$ /Smads signaling pathway

心室重构是指急性心肌梗死(AMI)后心室发生结构与功能的改变,包括早期的梗死区伸展和晚期的整体心室扩张,是各种心脏病发展为心力衰竭过程中的共同环节。心肌纤维化(myocardial fibrosis, MF)是梗死后心室重构的重要内容之一,也是影响患者预后的关键因素<sup>[1]</sup>。而转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )/Smads 信号转导通路(TGF- $\beta$ /Smads) 信号通路对 MF 的发生和发展起着关键性的作用,丹皮酚又称牡丹酚,是毛茛科植物牡丹根皮和萝藦科植物徐长卿干燥根或全草的主要有效成分,研究表明,Pae 具有抗炎、抗氧化、抗血栓、抗 AS、抗肿瘤等广泛的药理作用<sup>[2]</sup>,本课题前期研究已证实丹皮酚对实验性 AMI 大鼠进行性心室重构具有显著的改善作用<sup>[3]</sup>。但其是否经由 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路干预心室重构目前尚不明确,相关研究国内外亦尚未见报道。本研究通过结扎冠状动脉法复制 AMI 大鼠模型,利用组织形态学和分子生物学技术手段,研究丹皮酚对 TGF- $\beta_1$ /Smad2 相关因子表达水平的影响。以期为临床上心血管疾病的防治提供新的思路和理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康雄性 SD 大鼠,SPF 级,体重 220 ~ 240 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号 SCXK(京)2009-0004。

**1.2 药物与试剂** 丹皮酚注射液(宁波天真制药有限公司,批号 20110603),注射用青霉素钠(华北制药股份有限公司,批号 Y1001328),Trizol Reagent 总 RNA 提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号

47321),SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> [Tli RNaseH Plus, 宝生物(大连)有限公司,批号 AK3604], PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser [Perfect Real Time,宝生物工程(大连)有限公司,批号 AK8203],TGF- $\beta_1$  抗体(美国 Santa Cruz 公司,货号 sc-146),Smad2 抗体(英国 Abcam 公司,货号 ab40855)。

**1.3 仪器** DW3000-B 型小动物人工呼吸机(淮北正华生物科技有限公司),ECG-6511 型心电图机(上海光电医用电子仪器有限公司),ABI 7300 型 Real-time PCR System(美国 ABI 公司),DU800 型紫外-可见分光光度计(美国 Ckman Coulter 公司),ELx808 型酶标仪(美国 Bio Tek 公司),DYY-8C 型电泳仪(北京市六一仪器厂),2K15 型高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物造模** 根据文献[4],采用结扎左冠状动脉前降支(LAD)的方法制备大鼠 AMI 模型,以心电图出现 ST 段水平偏移  $\geq 0.1$  mV 且 T 波高耸超过同导联 R 波的 1/2,同时肉眼观察结扎区域左室壁心肌变苍白视为模型制作成功,逐层缝合关胸,待自主呼吸恢复后,拔掉气管插管并清理口腔内分泌物。假手术组绕过左冠状动脉打松结。余步骤同造模组,手术全程在恒温无菌下进行。

**2.2 分组** 术后大鼠注射青霉素(每只  $4 \times 10^5$  U·d<sup>-1</sup>,连续 3 d 预防感染。适应性饲养 3 d 后将存活大鼠随机分为模型组、丹皮酚低、高剂量组(8.0, 12.0 mg·kg<sup>-1</sup>),连同假手术组共 4 组,每组 10 只,

丹皮酚 *ip* 给药,各给药组每天定时给予相应药物 1 次,连续给药 4 周。假手术组与模型组每天 *ip* 等体积生理盐水。

**2.3 取材及检测** 大鼠麻醉称重,处死并迅速摘取心脏,左心室和全心称重并测量左心指数,计算公式为:左心指数=(左心质量/全心质量),沿心肌梗死区的左心室长轴切开,一部分经固定、常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,切片处理,另取部分左心室近心底梗死区心肌组织编号冷藏于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  低温冰箱,用作后续 RT-PCR 和 Western blotting 实验。

**2.3.1 观察心肌组织病理学变化** 参照文献[5]中的方法,石蜡切片常规脱蜡至水,每个标本横切面连续切片 3 张用于 HE 染色。乙醇梯度脱水后,经苏木素染色,0.5% 盐酸乙醇分化,伊红复染,中性树胶固定后观察,细胞核呈蓝色,细胞浆及其他组织呈粉色,每张切片( $\times 200$ )随机取 10 个梗死区视野进行观察并拍照,采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件进行分析。

**2.3.2 观察心肌组织胶原含量变化** 参考文献[6]中的方法并加以改进,石蜡切片常规脱蜡至水,每个标本取心脏横切面切片。苏木素染色,1% 盐酸乙醇分化,丽春红酸性品红液复染,苯胺蓝液复染,中性树胶封片固定后观察,胶原纤维呈蓝色,心肌纤维和肌肉呈红色,红细胞呈橘黄色,细胞核呈蓝(黑)色,普通光镜下观察,每张切片( $\times 200$ )随机取 10 个梗死区视野进行观察并拍照,采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件进行分析,测定心肌胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF),即胶原面积/(胶原面积+心肌面积),作为心肌纤维化指标。

**2.3.3 检测 TGF- $\beta_1$ , Smad2 mRNA 的表达** 对提取的总 RNA 进行逆转录合成,产物 cDNA 于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下储存备用,作为 RT-PCR 反应模板,进行 RT-PCR 反应对目的片段进行扩增,选用管家基因  $\beta$ -actin 作为内参。逆转录及 PCR 扩增体系均按 RT-PCR 试剂盒说明书操作,先进行 TGF- $\beta_1$ , Smad2 和  $\beta$ -actin 的 mRNA 的 PCR 扩增,所有引物均由宝生物(大连)有限公司设计并合成。引物信息:TGF- $\beta_1$  上游 5'-TGCTCTTGTGACAGCAAAGATAA-3', 下游 5'-CTCTGTGGAGCTGAAGCAATAGT-3', 扩增产物为 244 bp; Smad2 上游 5'-AAGCCATCACCCTCAGAAT-TG-3', 下游 5'-CACTGATCTACCGTATTTGCTGT-3', 扩增产物为 100 bp;  $\beta$ -actin 上游 5'-GAGAGG-GAAATCGTGCCTGAC-3', 下游 5'-CATCTGCTGGAAG-

GTGGACA-3', 扩增产物为 452 bp。Real-Time PCR 反应条件为:Stage 1 预变性  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,重复 1 次,Stage 2 PCR 反应  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 s,退火温度为  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  (TGF- $\beta_1$ ),  $53\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Smad2),  $57\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\beta$ -actin), 退火时间 30 s,重复 40 个循环。每份样本平行设置 2 个复孔,每组标本重复检测 5 次,另外设立  $\beta$ -actin 做内参对照,由溶解曲线检测扩增产物的特异性,取 PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳,经溴化乙锭(EB)染色后在紫外分析仪下根据相对分子质量的大小进行结果判断并拍照,取其循环阈值(*Ct*)均值,利用 Real-Time PCR 测得的目的基因和参照基因的 *Ct* 值,参照文献[7]将 *Ct* 值转化为相对倍数,从而计算目的基因表达量:采用 Comparative Delta-delta *Ct* 法,以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  作指标进行相对定量分析。实验组/对照组 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  进行计算,表示样品目的基因初始 cDNA 相对表达量;其中  $\Delta\Delta Ct$  = 心肌梗死组(靶基因 *Ct* 值 - 内参 *Ct* 值) - 假手术组(靶基因 *Ct* 值 - 内参 *Ct* 值)。不同组各基因相对内参的改变倍数 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

**2.3.4 检测心肌组织 TGF- $\beta_1$ , Smad2 蛋白的表达** 用 RIPA 蛋白裂解液提取心肌组织总蛋白,BCA 法测定蛋白含量并制作标准曲线,样品按试剂说明书加入适量  $5\times$  SDS 上样缓冲液,PCR 仪  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  加热 5 min 变性,12% SDS-PA 凝胶电泳(浓缩胶体积分数为 12%,分离胶体积分数为 5%)分离蛋白,湿转法至 PVDF 膜上,丽春红染色观察蛋白质转移情况。5% 脱脂牛奶室温封闭 4 h, TGF- $\beta_1$  一抗(1:400), Smad2 一抗(1:1 000),内参  $\beta$ -actin 一抗(1:500),  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入 1:3 000 辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入 ECL 发光液,显色 2 min,在暗室里显影、定影,采用 Quantity One 凝胶分析软件对曝光于 X 射线片的目的蛋白条带进行半定量分析。

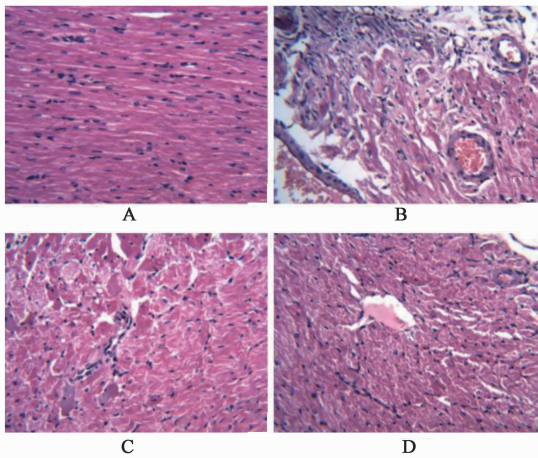
**2.4 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行统计处理,实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间计量资料比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法多重比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对大鼠左心指数的影响** 与假手术组左心指数( $0.23 \pm 0.02$ )相比,模型组大鼠心脏左心指数( $0.30 \pm 0.01$ )明显升高( $P < 0.01$ )。Pae 低、高剂量组左心指数分别为( $0.27 \pm 0.01$ ), ( $0.25 \pm 0.02$ ),与模型组比较 Pae 低、高剂量组左心指数均明显降低( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。

### 3.2 对大鼠心脏组织病理变化的影响

**3.2.1 HE 染色** 假手术组:心肌组织结构完整,肌纤维排列规则,心肌细胞间隙均匀清楚,细胞核、浆清晰可辨,无明显病理学改变;模型组:心肌细胞染色不均匀,心肌纤维排列紊乱且其间隙变窄,肌丝断裂,并伴随溶解和坏死,在坏死区炎性浸润明显、纤维结缔组织增生严重。另外细胞核固缩、碎裂,胞浆减少或缺失,种种病理变化预示着心肌进行修复性纤维化;Pae 各给药组:均有相对明显轻微的病理改变,心肌细胞染色基本均匀,外观基本正常,排列基本整齐,心肌细胞间隙多数均匀,偶尔可见心肌细胞间隙变窄和较轻微的肥大,梗死区有少量心肌坏死和轻微炎性浸润,纤维结缔组织增生不明显,见图 1。

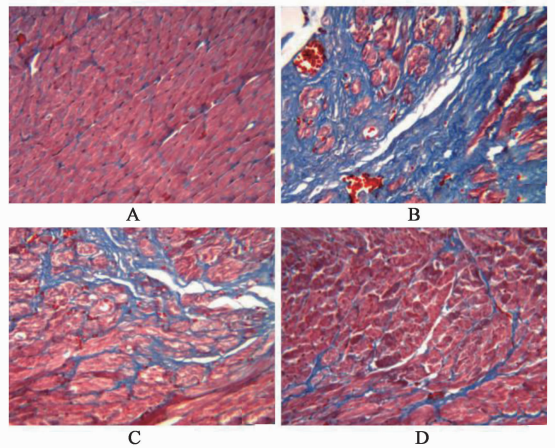


A. 假手术组;B. 模型组;C. 丹皮酚 8.0 mg·kg<sup>-1</sup>组;D. 丹皮酚 12.0 mg·kg<sup>-1</sup>组(图 2 同)

**图 1 Pae 对急性心肌梗死后左室心梗区病理改变的影响(HE, ×200)**  
**Fig. 1 Influence of paeonol on the pathological changes of left ventricular myocardial infarcts after AMI in rats(HE, ×200)**

**3.2.2 Masson 染色** 假手术组未见明显病理学改变,心肌纤维有轻微的增生。心肌组织胶原容积分数(CVF)为(14.49 ± 5.78)%;与假手术组相比较,模型组心肌纤维排列紊乱且间隙变窄,结缔组织增生严重,部分凝固性坏死,核消失,细胞排列紊乱,梗死边缘有瘢痕出现,心肌胶原 CVF 为(46.32 ± 8.63)% ( $P < 0.01$ );与模型组比较,Pae 低、高剂量给药组上述病理改变均不同程度减轻。梗死区有少量心肌坏死和轻微炎性浸润,纤维结缔组织增生不明显,心肌胶原 CVF 分别为(27.51 ± 4.29)%,(22.42 ± 4.67)% ,与模型组比较均明显降低( $P < 0.01$ ),见图 2。

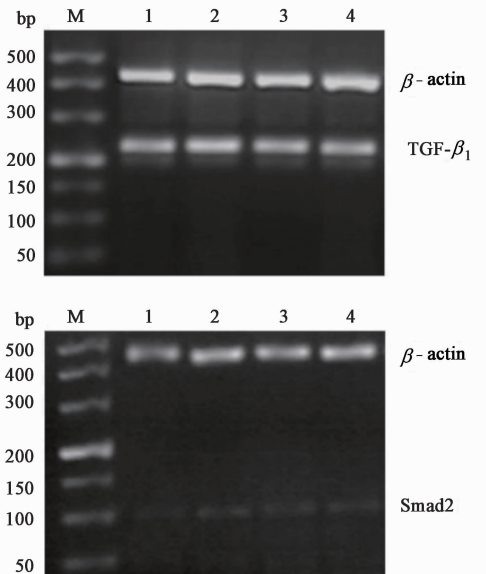
**3.3 对心脏组织 TGF-β<sub>1</sub>, Smad 2 mRNA 表达的影响** 与假手术组比较,模型组 TGF-β<sub>1</sub>, Smad 2 mRNA 表



**图 2 Pae 对急性心肌梗死后左室心梗区胶原含量的影响(Masson, ×200)**

**Fig. 2 Influence of paeonol on collagen fibers contents of left ventricular myocardial infarcts after AMI in rats(Masson, ×200)**

达明显升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,Pae 低、高剂量组 TGF-β<sub>1</sub>, Smad 2 mRNA 表达明显减少( $P < 0.01$ ),见图 3 和表 1。



M. marker;1. 假手术组;2. 模型组;3. 丹皮酚 8.0 mg·kg<sup>-1</sup>组;4. 丹皮酚 12.0 mg·kg<sup>-1</sup>组(图 4 同)

**图 3 RT-PCR 检测急性心肌梗死大鼠心肌组织中 TGF-β<sub>1</sub>, Smad2 mRNA 的表达**

**Fig. 3 TGF-β<sub>1</sub>, Smad2 mRNA expression in AMI rat heart detected by RT-PCR**

**3.4 对心脏组织 TGF-β<sub>1</sub>, Smad2 蛋白表达的影响** 与假手术组比较,模型组 TGF-β<sub>1</sub>, Smad2 蛋白相对表达量均增强( $P < 0.01$ );与模型组比较,Pae 低、高剂量组 TGF-β<sub>1</sub>, Smad2 蛋白相对表达量均减弱( $P < 0.01$ ),见图 4 和表 2。

表 1 各处理组 TGF-β<sub>1</sub>, Smad2 mRNA 的相对表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 1 Relative expression of TGF-β<sub>1</sub>, Smad2 mRNA in each treatment group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	TGF-β <sub>1</sub> /β-actin	Smad2/β-actin
假手术	-	0.260 ± 0.014	0.095 ± 0.013
模型	-	0.506 ± 0.020	0.460 ± 0.024
丹皮酚	8.0	0.425 ± 0.015 <sup>1)</sup>	0.390 ± 0.020 <sup>1)</sup>
	12.0	0.407 ± 0.023 <sup>1)</sup>	0.320 ± 0.018 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> P < 0.01 (表 2 同)。

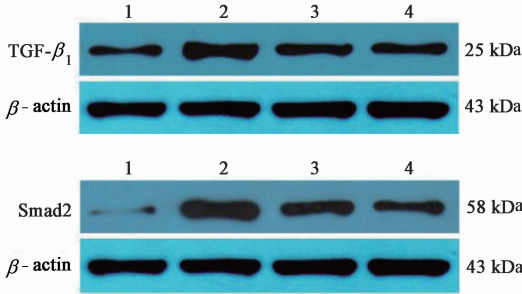


图 4 Western blot 检测急性心肌梗死大鼠心肌组织中 TGF-β<sub>1</sub>, Smad2 蛋白的表达

Fig. 4 TGF-β<sub>1</sub>, Smad2 protein expression in AMI rat heart detected by Western blot

表 2 各处理组 TGF-β<sub>1</sub>, Smad2 蛋白的相对表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Relative expression of TGF-β<sub>1</sub>, Smad2 Protein in each treatment group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	TGF-β <sub>1</sub> /β-actin	Smad2/β-actin
假手术	-	0.24 ± 0.06	0.11 ± 0.04
模型	-	0.67 ± 0.10	0.70 ± 0.11
丹皮酚	8.0	0.45 ± 0.08 <sup>1)</sup>	0.40 ± 0.06 <sup>1)</sup>
	12.0	0.39 ± 0.07 <sup>1)</sup>	0.33 ± 0.05 <sup>1)</sup>

#### 4 讨论

冠心病引发的心肌梗死发病率逐年升高,目前已成为严重威胁人类健康,病死率居首位的疾病之一,心肌梗死发生后,心肌缺血性损伤,局部甚至全身的神经激素系统被激活,机体由此发生代偿性改变,从而加速心肌细胞坏死、凋亡、心肌纤维化、心室重构的进程。因此,阻止或逆转心肌纤维化,将抑制心肌纤维化作为研究方向,确定相关治疗靶点的研究工作目前已成热点。

急性心肌梗死后,梗死区膨展、非梗死区心肌的反应性肥厚,导致心脏质量参数和心室重构参数的改变,因此,心脏质量参数和心室重构参数以及梗死灶的大小是直接反映心肌梗死后心肌重塑的指标<sup>[8]</sup>。本实验中,冠脉结扎 4 周后,与假手术组比较,模型组

大鼠心脏质量参数、心室重构参数的改变均提示发生了心肌重塑,与模型组比较,Pae 各剂量组大鼠心脏质量参数、心室重构参数均不同程度降低,提示心肌重塑状况有不同程度的缓解。研究结果提示 Pae 能够降低 AMI 大鼠的心肌重塑状况,改善 AMI 大鼠的心功能。

心肌纤维化是心室重构的主要表现之一,心肌纤维化以后心室壁僵硬增加、心室舒张功能进行性障碍、冠状动脉储备下降,甚至引发猝死,是导致心力衰竭的重要因素<sup>[9]</sup>。心肌纤维化主要病理改变为细胞外基质合成与降解失衡,间质中胶原纤维过量聚集、排列发生紊乱,各型比例失调,这些特征性的结构改变,可导致心功能失调甚至心力衰竭。Masson 染色显示 AMI 大鼠心肌间质纤维增生,各药物剂量组不同程度发生心肌纤维化。而 Pae 干预后,胶原蛋白含量减少,心肌间质纤维化程度减轻,提示 Pae 对 AMI 所致的心肌纤维化有一定的抑制作用。

TGF-β/Smads 信号转导通路与心血管疾病密切相关,在高血压病、动脉粥样硬化、冠心病、心肌梗死、心肌病、心力衰竭及心房纤颤等疾病发病中 TGF-β/Smads 信号通路被认为发挥了重要作用<sup>[10]</sup>,TGF-β<sub>1</sub>是最重要的促纤维化生长因子,可诱导心肌成纤维细胞分化为肌成纤维细胞<sup>[11]</sup>。活化的转化生长因子 β 可通过诱导的 Smads 蛋白的磷酸化而促进心肌成纤维细胞的转化和增殖<sup>[10-11]</sup>,多个研究表明,TGF-β<sub>1</sub> 发挥作用的主要通路是 TGF-β<sub>1</sub>/Smads 信号转导通路,对心肌纤维化的发生和发展起着关键性的作用。且可能是诸多因素导致心肌纤维化最后共同的中介物之一<sup>[12]</sup>,TGF-β<sub>1</sub> 存在细胞表面和细胞基质中,被激活后,与 TGF-β<sub>1</sub> II 型受体结合形成受体复合物,并进一步使 TβR 丝/苏氨酸激酶激活。而 Smads 蛋白是丝/苏氨酸激酶受体的下游信号分子,也是 TGF-β 受体胞内激酶的唯一底物,具有转录激活作用<sup>[13]</sup>。TGF-β<sub>1</sub> 主要通过 Smad 蛋白介导细胞内的信号传递,发挥生物学效应。研究还证实,Smad2 是传导 TGF-β<sub>1</sub> 的主要信息分子,Smad2 在发生纤维化的心肌组织中的表达明显增加,具体过程为活化的 TβRI 分子使 Smad2, Smad3 分子磷酸化,磷酸化的 Smad2, Smad3 分子依次与 Smad4 形成复合物,复合物由胞浆转移到细胞核内,与转录因子相互作用并参与调控靶基因的转录,从而进一步促进心肌纤维化的发生、发展。

本研究结果表明,大鼠心肌梗死以后,TGF-β<sub>1</sub>, Smad2 mRNA 表达上调,Pae 可明显下调 AMI 所致的左室 TGF-β<sub>1</sub> 和 Smad2 mRNA 和蛋白的表达。这和预

期的结果一致,提示了 TGF- $\beta_1$ /Smad2 信号传导通路参与了实验性 AMI 大鼠心室重构过程。Pea 能显著抑制 TGF- $\beta_1$ , Smad2 mRNA 和蛋白的表达,提示该药物可能通过调控 TGF- $\beta_1$ , Smad2 mRNA 和蛋白的表达水平来干预实验性 AMI 大鼠心室重构的进程。

综上所述, TGF- $\beta_1$ /Smads 信号通路与心血管疾病的发生、发展密切相关。信号转导与疾病发生是当今生命科学研究的热点课题,更深层次上探讨疾病发生的分子机制,通过干预信号转导通路来防治疾病将会有良好的应用前景, TGF- $\beta_1$ /Smads 信号转导通路有望成为心血管疾病防治策略的潜在靶点。

[参考文献]

[ 1 ] Elias N, Tarasoutchi F, Spina G S, et al. Myocardial fibrosis and ventricular remodeling in severe chronic aortic regurgitation[J]. *Arq Bras Cardiol*, 2009, 92(1): 63-67.

[ 2 ] 周晓慧,牛成伟,曹凯,等. 丹皮酚通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路下调高脂血清诱导的人脐静脉内皮细胞黏附分子的表达[J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(2): 249.

[ 3 ] 赵静怡,张树峰,徐倩,等. 丹皮酚对大鼠急性心肌梗死后心室重构及心功能的影响[J]. *承德医学院学报*, 2013, 30(3): 194-196.

[ 4 ] Cheng K, Malliaras K, Shen D, et al. Intramyocardial injection of platelet gel promotes endogenous repair and augments cardiac function in rats with myocardial infarction[J]. *Am Coll Cardiol*, 2012, 59(3): 256-264.

[ 5 ] 熊兰英. 浅谈石蜡制片-HE 染色点滴体会[J]. *检验医学与临床*, 2006, 3(4): 169-181.

[ 6 ] 王伯运,李玉松,黄高昇. 病理学技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:61-75.

[ 7 ] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.

[ 8 ] Kitayama J, Faraci F M, Gunnett C A, et al. Impairment of dilator responses of cerebral arterioles during diabetes mellitus: role of inducible NO synthase[J]. *Stroke*, 2006, 37(8): 2129-2133.

[ 9 ] Hiyoshi H, Yayama K, Takano M, et al. Stimulation of cyclic GMP production via AT2 and B2 receptors in the pressure-overloaded aorta after banding [ J ]. *Hypertension*, 2004, 43(6): 1258-1263.

[ 10 ] 陈蓉,谢梅林. TGF- $\beta$ /Smads 信号通路在心肌纤维化发生和治疗中应用前景的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(9): 1189-1192.

[ 11 ] Li P, Wang D, Lucas J, et al. Atrial natriuretic peptide inhibits transforming growth factor beta-induced Smad signaling and myofibroblast transformation in mouse cardiac fibroblasts [ J ]. *Circ Res*, 2008, 102(2): 185-192.

[ 12 ] 廖火城,刘勇,周彬,等. 四逆汤对异丙肾上腺素引起的大鼠心肌纤维化和 TGF- $\beta_1$  表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(7): 2151-2155.

[ 13 ] Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system[J]. *BMBO J*, 2000, 19(8): 1745-1754.

[责任编辑 聂淑琴]