

基于 TGF- β_1 /Smad3 信号通路调控的温阳益气方对心梗后结构重塑的干预作用

张会超, 韩丽华*, 索红亮, 袁彬
(河南省中医院, 郑州 450002)

[摘要] **目的:**探讨温阳益气方改善心梗后心力衰竭大鼠肺结构重塑的作用和机制。**方法:**建立大鼠心力衰竭模型,分成6组,温阳益气方高、中、低(2.0,1.0,0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹)剂量组,强的松组(0.1 g·kg⁻¹·d⁻¹),模型组和假手术组(以同等体积的蒸馏水灌胃),连续灌胃8周。灌胃结束后,彩色多普勒超声诊断仪测定左心室舒张末期内径(left ventricular end diastolic diameter, LVIDd),左心室收缩末期内径(left ventricular end systolic diameter, LVISDs),短轴缩短分数(fractional shortening, FS)和射血分数(ejection fraction, EF);测定湿肺/体质量和干肺/体质量,肺组织苏木素-伊红(HE)染色切片,酶联免疫吸附法(ELISA)测定大鼠肺组织转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1),胶原蛋白(Collagen), α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA),p-Smad3 蛋白家族(drosophila mothers against decapentaplegic, p-Smad3)蛋白表达量。**结果:**与模型组比较,温阳益气方高、中剂量组 LVIDd, LVISDs 明显升高,FS,EF 明显降低($P < 0.05$);与假手术组及强的松组比较,温阳益气方低剂量组 LVIDd, LVISDs 明显降低,FS,EF 明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,温阳益气方高、中剂量组湿肺/体质量、干肺/体质量明显升高($P < 0.05$);与假手术组及强的松组比较,温阳益气方低剂量组湿肺/体质量、干肺/体质量明显降低($P < 0.05$),模型组肺泡严重破化,淋巴细胞浸润明显;假手术组及强的松组未见明显肺泡破化,无淋巴细胞浸润,无胶原蛋白沉淀;温阳益气方高、中剂量组肺泡破化轻,胶原蛋白沉淀也较少;温阳益气方低剂量组淋巴细胞浸润明显,肺泡壁明显增厚;与模型组比较,温阳益气方高、中剂量组 α -SMA, Collagen, TGF- β_1 , p-Smad3 明显降低($P < 0.05$),TGF- β_1 , p-Smad3 mRNA 明显降低($P < 0.05$);与假手术组及强的松组比较,温阳益气方低剂量组 α -SMA, Collagen, TGF- β_1 , p-Smad3 明显升高($P < 0.05$)。TGF- β_1 mRNA 与 TGF- β_1 , p-Smad3 mRNA, α -SMA, Collagen; p-Smad3 mRNA 与 p-Smad3, α -SMA, Collagen 正相关关系明显($P < 0.05$)。**结论:**温阳益气方能阻断 TGF- β_1 /Smad3 通路信号传导,抑制 α -SMA, Collagen, TGF- β_1 , p-Smad3 蛋白的表达,进而抑制成纤维细胞的活化增殖,降低肺部胶原蛋白的沉淀,最终达到抑制肺部组织重塑的作用。

[关键词] 温阳益气方; 转化生长因子- β_1 ; 心梗; 心力衰竭; 肺结构重塑

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R256.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)06-0114-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180634

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171226.1153.007.html>

[网络出版时间] 2017-12-27 10:29

Effect of Wenyang Yiqi Decoction on Regulating Lung Structure Remodeling in Rats with Heart Failure After Myocardial Infarction Through Regulating TGF- β_1 /Smad3 Signaling Pathway

ZHANG Hui-chao, HAN Li-hua*, SUO Hong-liang, YUAN Bin
(Henan Traditional Chinese Medicine Hospital, Zhengzhou 450002, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the role and mechanism of Wenyang Yiqi decoction on regulating lung structure remodeling in rats with heart failure after myocardial infarction. **Method:** The heart failure rat model was set up and the rats were divided into 6 groups: Wenyang Yiqi decoction high, middle, and low (2.0, 1.0, 0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹), prednisone group (0.1 g·kg⁻¹·d⁻¹), model group and sham operation group (with the same volume of distilled water gavage), continuous gavage for 8 weeks. After gavage, color Doppler ultrasound diagnostic instrument was used to measure left ventricular end diastolic diameter (LVIDd), left ventricular end systolic diameter (LVISDs), fractional shortening (FS) and ejection fraction (EF); wet lung/body mass and dry lung/body mass, lung tissue hematoxylin-eosin (HE) staining slices, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the expression of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), collagen, α -smooth muscle actin (α -SMA), p-Smad3 protein family (drosophila mothers against decapentaplegic, p-Smad3) protein in rat lung tissue. **Results:** Compared with the model group, the high and middle dose groups of Wenyang Yiqi decoction showed significantly higher LVIDd and LVISDs, and significantly lower FS and EF ($P < 0.05$); compared with the sham operation group and the prednisone group, the low dose group of Wenyang Yiqi decoction showed significantly lower LVIDd and LVISDs, and significantly higher FS and EF ($P < 0.05$); compared with the model group, the high and middle dose groups of Wenyang Yiqi decoction showed significantly higher wet lung/body mass and dry lung/body mass ($P < 0.05$); compared with the sham operation group and the prednisone group, the low dose group of Wenyang Yiqi decoction showed significantly lower wet lung/body mass and dry lung/body mass ($P < 0.05$), the model group showed severe alveolar destruction and obvious lymphocyte infiltration; the sham operation group and the prednisone group showed no obvious alveolar destruction, no lymphocyte infiltration, and no collagen precipitation; the high and middle dose groups of Wenyang Yiqi decoction showed mild alveolar destruction and less collagen precipitation; the low dose group of Wenyang Yiqi decoction showed obvious lymphocyte infiltration and obvious thickening of alveolar wall; compared with the model group, the high and middle dose groups of Wenyang Yiqi decoction showed significantly lower α -SMA, collagen, TGF- β_1 , and p-Smad3 ($P < 0.05$), TGF- β_1 , and p-Smad3 mRNA ($P < 0.05$); compared with the sham operation group and the prednisone group, the low dose group of Wenyang Yiqi decoction showed significantly higher α -SMA, collagen, TGF- β_1 , and p-Smad3 ($P < 0.05$). TGF- β_1 mRNA was positively correlated with TGF- β_1 , p-Smad3 mRNA, α -SMA, and collagen; p-Smad3 mRNA was positively correlated with p-Smad3, α -SMA, and collagen ($P < 0.05$). **Conclusion:** Wenyang Yiqi decoction can block the signal transmission of the TGF- β_1 /Smad3 pathway, inhibit the expression of α -SMA, collagen, TGF- β_1 , and p-Smad3 protein, and thereby inhibit the activation and proliferation of fibroblasts, reduce the precipitation of collagen in the lungs, and ultimately achieve the role of inhibiting lung structure remodeling.

[收稿日期] 20170904(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373610)

[第一作者] 张会超, 硕士, 主治医师, 从事中医药防治心血管疾病研究, E-mail: zhetem@163.com

[通信作者] * 韩丽华, 教授, 博士生导师, 从事中医药治疗心血管疾病研究, E-mail: hlhaa@sina.com

0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹) dose groups, positive control group (prednisone 0.1 g·kg⁻¹·d⁻¹), model group and sham operation group (gavage administration of the same volume of distilled water). All the groups were treated for eight weeks. After gavage administration, the color Doppler ultrasonic diagnostic instrument was used to measure left ventricular end-diastolic diameter (LVIDd), left ventricular end systolic diameter (LVIDs), short axial shortening fraction (FS) and ejection fraction (EF). The wet lung/body weight, dry lung/body weight were determined, and HE staining was used for lung tissue slice. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determinate the tissue growth factor-β₁ (TGF-β₁), Collagen and α-smooth muscle actin (α-SMA), p-Smad3 protein family (p-Smad3) protein expression. **Result:** As compared with the model group, the LVIDd and LVIDs of Wenyang Yiqi decoction high dose group and medium dose group were significantly increased; the FS and EF levels were significantly decreased ($P < 0.05$); the wet lung/body weight and dry lung/body weight were significantly increased ($P < 0.05$). The alveolar was seriously damaged and the wall of alveolar was thickened in the model group. There was no obvious alveolar rupture, no lymphocytic infiltration, and no collagen deposition in the sham operation group and prednisone group. There was light alveolar rupture and less collagen deposition in Wenyang Yiqi decoction high dose group and middle dose group; while in low dose group, there was obvious lymphocyte infiltration and thickened alveolar wall. As compared with the model group, the expression levels of α-SMA, Collagen, TGF-β₁, and p-Smad3 of Wenyang Yiqi decoction high dose group and middle dose group were significantly decreased ($P < 0.05$); and the mRNA of TGF-β₁ and mRNA of p-Smad3 were also significantly decreased in the high dose and middle dose group ($P < 0.05$). As compared with the sham operation group and prednisone group, the α-SMA, Collagen, TGF-β₁, and p-Smad3 levels were significantly increased in Wenyang Yiqi decoction low dose group ($P < 0.05$), and there was an positive relationship between TGF-β₁ mRNA and TGF-β₁, p-Smad3 mRNA, α-SMA, Collagen ($P < 0.05$). **Conclusion:** Wenyang Yiqi decoction can block TGF-β₁/Smad3 pathway signal transduction, inhibit the expression of protein including α-SMA, Collagen, TGF-β₁ and p-Smad3, and then inhibit the activation of fibroblast proliferation, reduce the sedimentation of lung Collagen, and finally reach the role of inhibition of lung tissue remodeling.

[**Key words**] Wenyang Yiqi decoction; transforming growth factor-β₁ (TGF-β₁); myocardial infarction; heart failure; lung structure remodeling

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是一种复杂的临床综合征,由于心脏功能或结构异常,使得心室的射血能力受损,其临床症状主要为液体潴留、呼吸困难、乏力等。CHF 具有死亡率高、治疗复杂、反复住院、降低患者生活质量的特点。我国 2013 年 CHF 患病率为 1.3%,病死率达 8.4% ~ 8.9%,而出院后 30 d 死亡率达 10.4% ~ 10.7%,出院后 1 年死亡率高达 30.5% ~ 32.9%,而我国 2015 年,2016 年 CHF 患病率为 1.4%,1.5%,病死率在 8.5% ~ 9.1%^[1]。肺高压(pulmonary hypertension, PH)是 CHF 晚期的重要并发症,由于心功能障碍,心充盈压逐渐升高,继而肺静脉压升高,随着病情加重,压力上传,最终导致肺动脉高压,约 85% 的 CHF 患者将出现 PH。肺结构重塑是 PH 发生的重要机制^[2-3]。

研究表明^[4-6] 上皮细胞纤维化,细胞基质大量沉淀以及肺间质、肺血管纤维化是 PH 的主要病理

学特征。转化生长因子-β₁ (TGF-β₁)是由 2 个亚基分子通过二硫键连接成同源二聚体,在细胞外基质合成、间质纤维化形成、胶原生成和组织修复、组织炎症发生起着重要的调节作用。Smads 蛋白家族,是 TGF-β₁ 调控下的重要细胞因子,Smads 可分为 L 端区(中间连接区),N 端区(MH₁ 区)和 C 端区(MH₂ 区)。TGF-β₁ 通过与 MH₂ 区形成同源二聚体对下游细胞因子进行调控,胶原蛋白(Collagen),α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)是 TGF-β₁/Smad3 通路调控下的重要细胞因子,在 PH 患者中,往往伴随着 Collagen,α-SMA 的过度表达。

温阳益气方源于明代严用和的《济生续方》所载参附汤,原方益气回阳固脱,入肉桂助附子补火助阳、引火归元,入黄芪助人参大补元气,益气升阳。温阳益气法具有提高心肌作功效率,改善缺血心肌氧、降低外周血管阻力的功效^[7-10],能改善缺血心肌氧的供求平衡,提高心肌作功效率,还可清除氧自由

基、抑制脂质过氧化物,保护心肌,其制剂可能与温阳益气方对肾素-血管紧张素-醛固酮系统的调节有关^[11-13]。本研究探讨温阳益气方通过调控 TGF- β_1 /Smad3 信号通路改善心梗后心力衰竭大鼠肺结构重塑的作用,为心力衰竭伴肺动脉高压的治疗提供理论和临床依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 大鼠 72 只,重庆第三军医大学提供,合格证号 SCXK(渝)2012-0001,动物实验的开展取得了河南大学医学院实验动物伦理学会的批准(编号 DFGC 2016-06-14)。

1.2 药物 温阳益气方(河南省中医院院内制剂,制剂号为豫药制字 Z04010198)由附子、肉桂、人参、黄芪组成,比例为 1:1:1:1,制作工艺为标准制干浸膏,每克干浸膏相当于生药 11.16 g,根据成人剂量公式换算,大鼠高剂量组用药量为成人的 12.5 倍,将药粉溶于蒸馏水,以 20 mL \cdot kg⁻¹体质量灌胃,将药液质量浓度配制成为 0.1 g \cdot mL⁻¹,中、低剂量等倍稀释。

1.3 试剂 α -SMA, Collagen, TGF- β_1 , p-Smad3 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(深圳子科生物科技有限公司,批号分别为 KIT10143-1, KIT10266-7, KIT10168-6, KIT10197-8); trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 15596026); 逆转录试剂盒及实时荧光定量 PCR 试剂盒(碧云天生物技术公司,批号均为 D7226); TGF- β_1 和 Smad3 基因的表达测定采用 UltraSYBR One Step RNA PCR Kit(宝生物工程大连有限公司,批号 D350A)。

1.4 仪器 TKY-BMB 型包埋机(湖北泰康医疗设备有限公司), laikePPDT-12C3 型电脑程控组织脱水机(湖北徕克医疗仪器有限公司), YD-A 型生物组织摊片机(上海五相仪器仪表有限公司), Vivid-i 型彩色多普勒超声诊断仪(美国通用电气有限公司), MK3 型酶标仪(美国热电有限公司), CFX-96 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司), NanoDrop2000c 型蛋白核酸检测仪(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 分组 大鼠 72 只,根据体质量随机分成 6 组,模型组、假手术组、强的松组、温阳益气方高、中、低剂量组,每组 12 只,雌雄各半。

2.2 动物模型的制备^[7] 大鼠以 2% 戊巴比妥钠(40 mg \cdot kg⁻¹)腹腔内注射麻醉,仰卧位固定于鼠板,胸前区备皮,碘伏消毒,行气管插管,连接心电图

机和小动物呼吸机(呼吸频率 75 次/min,潮气量 1.5~3 mL,吸呼比 1:2)。于左胸部三、四肋间开胸,钝性分离皮肤肌肉,安置开胸器,扩大手术视野,暴露心脏,打开心包膜,与右心室流出道和左心耳之间下约 2 mm 处以 5-0 无创丝线结扎左冠状动脉,可见前降支供血区迅速变苍白,同时 ST 段显著抬高或 2 个以上导联 J 点抬高 >0.2 mV,说明手术成功,快速置心脏于胸腔,并立即缝合胸壁。假手术组手术过程同上,不结扎左冠状动脉。手术结束后,连续 3 日,所有动物腹腔注射青霉素 160 U \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹,预防术后并发感染,上述各组大鼠模型存活率为 100% 且稳定。

2.3 给药 根据预实验获得大鼠温阳益气方的药物半数有效量(median effective dose of drug, ED)约为 8 g \cdot kg⁻¹,取大鼠温阳益气方 ED 的 1/4(2 g \cdot kg⁻¹), 1/8(1 g \cdot kg⁻¹), 1/16(0.5 g \cdot kg⁻¹)作为温阳益气方高、中、低剂量组,相当于临床人用药剂量 12.5, 6.25, 3.125 倍。强的松组给予强的松 0.1 g \cdot kg⁻¹。所有大鼠术后恢复 1 周后开始灌胃(20 mL \cdot kg⁻¹),连续灌胃 8 周,每周记录体质量,调节并维持给药量;模型组和假手术组以同等体积的蒸馏水灌胃,干预 8 周。

2.4 超声心动指标 彩色多普勒超声诊断仪测定左心室舒张末期内径(left ventricular end diastolic diameter, LVIDd),左心室收缩末期内径(left ventricular end systolic diameter, LVIDs),短轴缩短分数(fractional shortening, FS)和射血分数(ejection fraction, EF),连续测定 3 次,取平均值。

2.5 湿肺/体质量、干肺/体质量测定及肺组织苏木素-伊红(HE)染色检测 实验结束后,颈椎脱臼处死大鼠,取右肺组织,37℃烘干,分别测定湿肺/体质量、干肺/体质量;同时取左侧部分肺组织进行常规染色切片,剩余左侧部分肺组织-80℃冰箱保存。

2.6 大鼠肺组织 α -SMA, Collagen, TGF- β_1 , p-Smad3 蛋白检测 按照无菌条件操作,实验所有器具在使用前均用高压灭菌,烘干。将保存在-80℃冰箱中的肺组织取出解冻。称取肺组织 0.3 g,加入少量液氮,在研钵中迅速将肺组织碾碎至粉末状;将肺组织粉末转入 2 mL 离心管中,加入 PBS(pH 7.4) 1.2 mL,充分振荡混匀,2 000 \times g, 4℃,离心 20 min。仔细收集上清液。获取肺组织匀浆后,严格按照 ELISA 试剂盒要求检测肺组织中的 α -SMA, Collagen, TGF- β_1 , p-Smad3 的蛋白表达。

2.7 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测大鼠

肺组织 TGF- β_1 , Smad3 mRNA 水平 提取大鼠卵巢组织总 RNA 并检测 RNA 纯度和浓度, 吸光度 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 在 1.8 ~ 2.0。根据 UltraSYBR One Step RNA PCR Kit 说明对待测基因进行 Real-time PCR 反应。测定 TGF- β_1 , Smad3 mRNA 浓度和纯度, 参照 GenBank 数据获取 2 个基因多态性位点的序列, 设计待测基因位点的 PCR 扩增引物和单碱基延伸引物, 按 20 μL 模板和 50 μL 反应液构成 PCR 反应体系, 扩增程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 93 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 61 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 重复 40 个循环, 61 $^{\circ}\text{C}$ 时采集荧光。实时荧光定量 PCR 仪检测其表达量, Bio-Rad CFX96 软件自动生成循环值 (C_t), 对目的基因进行均一化后的相对定量, 计算出 $\Delta\Delta C_t$ 。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 序列见表 1。

2.8 统计学方法 采用 Epidata, SPSS 19.0 对数据进行录入、统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析比较, 两两比较采用 LSD- t 检验; α -SMA, Collagen, TGF- β_1 , p-Smad3, TGF- β_1 mRNA, Smad3 mRNA 指标间的相关分析采用 Pearson 相关分析, 检验水准 α 为 0.05。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 2 温阳益气方对大鼠超声心动指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effect of Wenyang Yiqi decoction prescription on echocardiographic indexes in rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	LVIDd/mm	LVIDs/mm	FS/%	EF/%
模型	-	5.70 \pm 0.40	2.90 \pm 0.70	49.09 \pm 7.14	79.68 \pm 6.09
假手术	-	7.80 \pm 0.90	7.10 \pm 1.90	27.34 \pm 7.25	41.23 \pm 6.87
强的松	0.1	7.50 \pm 0.60	6.84 \pm 2.34	29.33 \pm 8.51	46.78 \pm 8.87
温阳益气方	2.0	6.50 \pm 0.30 ¹⁾	5.90 \pm 0.60 ¹⁾	33.23 \pm 7.25 ¹⁾	55.14 \pm 11.34 ¹⁾
	1.0	6.30 \pm 0.10 ¹⁾	5.60 \pm 0.40 ¹⁾	38.14 \pm 10.68 ¹⁾	57.15 \pm 12.13 ¹⁾
	0.5	5.90 \pm 0.90 ^{2,3)}	3.40 \pm 1.20 ^{2,3)}	43.55 \pm 11.26 ^{2,3)}	72.78 \pm 10.45 ^{2,3)}

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

3.2 温阳益气方对大鼠湿肺/体质量、干肺/体质量的影响 与模型组比较, 温阳益气方高、中剂量组湿肺/体质量、干肺/体质量明显升高 ($P < 0.05$), 低剂量组湿肺/体质量、干肺/体质量略微升高, 差异无统计学意义; 与假手术组及强的松组比较, 温阳益气方高、中剂量组湿肺/体质量、干肺/体质量略微降低, 差异无统计学意义, 低剂量组湿肺/体质量、干肺/体质量明显降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.3 温阳益气方对大鼠肺组织变化的影响 模型组肺泡严重破化, 肺泡壁明显增厚, 较多胶原蛋白沉淀于肺间质, 淋巴细胞浸润明显; 假手术组及强的松组未见明显肺泡破化, 无淋巴细胞浸润, 无胶原蛋白沉淀, 温阳益气方高、中剂量组肺泡破化轻, 见少量

表 1 β -actin, TGF- β_1 , Smad3 引物序列

Table 1 Sequence of β -actin, TGF- β_1 and Smad3

基因	引物序列 (5' - 3')	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$	产物大小/bp
β -actin	上游 CGTAAAGACCTCTATGCCAACA	65	160
	下游 CGGACTCATCGTACTCTCTGCT		
TGF- β_1	上游 GGAGACATGAGAGCTGCCAAC	62	162
	下游 CCAGCAGCATGTCTGAAGATC		
Smad3	上游 TGTCCATGAGAGCTCAGCA	62	159
	下游 TCGTACAGCATGTCTGAATGCC		

3 结果

3.1 温阳益气方对大鼠超声心动指标的影响 与模型组比较, 温阳益气方高、中剂量组 LVIDd, LVIDs 明显升高, FS, EF 明显降低 ($P < 0.05$), 低剂量组 LVIDd, LVIDs 略微升高, FS, EF 略微降低, 差异无统计学意义; 与假手术组及强的松组比较, 温阳益气方高、中剂量 LVIDd, LVIDs 略微降低, FS, EF 略微升高, 差异无统计学意义, 低剂量组 LVIDd, LVIDs 明显降低, FS, EF 明显升高 ($P < 0.05$)。见表 2。

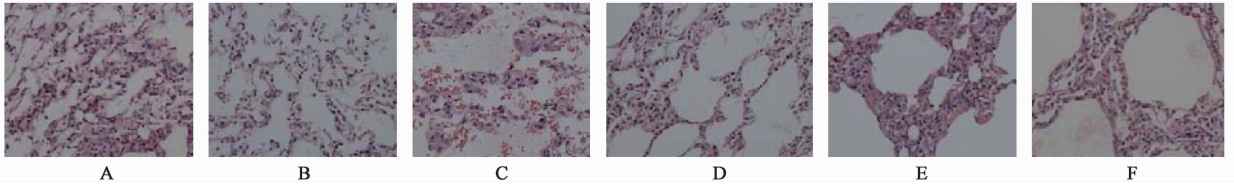
表 3 温阳益气方对大鼠湿肺/体质量、干肺/体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Effect of Wenyang Yiqi decoction prescription on wet lung/body weight, dry lung/weight in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$) %

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	湿肺/体质量	干肺/体质量
模型	-	5.86 \pm 2.16	1.25 \pm 0.36
假手术	-	10.78 \pm 2.75	1.96 \pm 0.20
强的松	0.1	10.12 \pm 2.59	1.90 \pm 0.23
温阳益气方	2.00	9.78 \pm 3.24 ¹⁾	1.65 \pm 0.46 ¹⁾
	1.00	9.08 \pm 3.54 ¹⁾	1.53 \pm 0.56 ¹⁾
	0.50	6.36 \pm 2.33 ^{2,3)}	1.32 \pm 0.47 ^{2,3)}

淋巴细胞浸润, 胶原蛋白沉淀也较少; 温阳益气方低

剂量组淋巴细胞浸润明显,肺泡严重破化,肺泡壁明显增厚。见图 1。



A. 模型组; B. 假手术组; C. 强的松组; D~F. 温阳益气方高、中、低剂量组

图 1 温阳益气方对大鼠肺组织变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Wenyang Yiqi decoction on temperature and positive gas on lung tissue changes in rats (HE, ×200)

3.4 温阳益气方对大鼠 α -SMA, Collagen, TGF- β_1 , p-Smad3 水平的影响 与模型组比较,温阳益气方高、中剂量组 α -SMA, Collagen, TGF- β_1 , p-Smad3 明显降低 ($P < 0.05$),温阳益气方低剂量组 α -SMA, Collagen, TGF- β_1 , p-Smad3 略微降低,差异无统计学

意义;与假手术组及强的松组比较,温阳益气方高、中剂量组 α -SMA, Collagen, TGF- β_1 , p-Smad3 略微升高,但差异无统计学意义,温阳益气方低剂量组 α -SMA, Collagen, TGF- β_1 , p-Smad3 明显升高 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 温阳益气方对大鼠 α -SMA, Collagen, TGF- β_1 , p-Smad3 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	α -SMA	Collagen	TGF- β_1	p-Smad3
模型	-	45.77 ± 6.46	87.66 ± 9.47	79.75 ± 7.37	83.67 ± 5.63
假手术	-	27.86 ± 6.98	47.13 ± 5.95	39.46 ± 5.57	40.73 ± 6.65
强的松	0.1	29.45 ± 6.98	48.44 ± 5.04	41.05 ± 5.96	41.14 ± 6.78
温阳益气方	2.00	30.15 ± 10.69 ¹⁾	49.45 ± 8.76 ¹⁾	42.81 ± 9.60 ¹⁾	43.17 ± 9.69 ¹⁾
	1.00	33.63 ± 12.73 ¹⁾	53.23 ± 10.73 ¹⁾	46.31 ± 12.76 ¹⁾	47.58 ± 13.74 ¹⁾
	0.50	39.58 ± 8.97 ^{2,3)}	74.14 ± 12.74 ^{2,3)}	69.35 ± 8.88 ^{2,3)}	75.13 ± 7.83 ^{2,3)}

3.5 温阳益气方对大鼠 TGF- β_1 , p-Smad3 mRNA 相对表达的影响 与模型组比较,温阳益气方高、中剂量组 TGF- β_1 , p-Smad3 mRNA 明显降低 ($P < 0.05$),温阳益气方低剂量组 TGF- β_1 , p-Smad3 mRNA 略微降低,差异无统计学意义;与假手术组及强的松组组比较,温阳益气方高、中剂量组 TGF- β_1 , p-Smad3 mRNA 略微升高,但差异无统计学意义,温阳益气方低剂量组 TGF- β_1 , p-Smad3 mRNA 明显升高 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 温阳益气方对大鼠 TGF- β_1 , p-Smad3 mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of Wenyang Yiqi decoction on TGF- β_1 and p-Smad3 mRNA in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TGF- β_1	p-Smad3
模型	-	1.97 ± 0.32	1.89 ± 0.24
假手术	-	0.97 ± 0.67	1.01 ± 0.34
强的松	0.1	1.01 ± 0.60	1.04 ± 0.37
温阳益气方	2.00	1.24 ± 0.14 ¹⁾	1.12 ± 0.45 ¹⁾
	1.00	1.47 ± 0.24 ¹⁾	1.35 ± 0.24 ¹⁾
	0.50	1.79 ± 0.54 ^{2,3)}	1.65 ± 0.54 ^{2,3)}

3.6 各指标间的相关性分析 TGF- β_1 mRNA 与 TGF- β_1 , p-Smad3 mRNA, α -SMA, Collagen; p-Smad3 mRNA 与 p-Smad3, α -SMA, Collagen 均为正相关关系 ($P < 0.05$)。见表 6。

慢性心衰患者心肌收缩、舒张功能障碍,继发引起输出量不足,患者 3 年内的生存率极低,若合并肺动脉高压,则患者生存期中位数约为 2.8 年,因此对慢性心衰合并肺动脉高压发病机制及药物干预的研究尤为重要^[17]。

4 讨论

肺组织重塑被认为是慢性心衰合并肺动脉高压发病过程中的重要环节,其与肺纤维化则密切相关。

研究报道,2014 年全球慢性心衰患者总人数高达 2250 万人,而绝大部分患者 (72% ~ 79%) 出现不同程度的肺动脉高压。2014 年,我国慢性心力衰竭伴肺动脉高压的患病率为 326/10 万^[14-16]。由于

表6 各变量的相关分析

Table 6 Correlation analysis of each variable

变量1	变量2	相关系数	P
TGF-β ₁ mRNA	TGF-β ₁	0.48	0.03
	p-Smad3	0.46	0.01
	α-SMA	0.53	0.01
	Collagen	0.36	0.01
p-Smad3 mRNA	p-Smad3	0.33	0.01
	α-SMA	0.34	0.01
	Collagen	0.47	0.03

胶原蛋白代谢调控失衡是肺组织重塑的重要诱因,在众多参与胶原蛋白代谢调节的细胞因子中,TGF-β₁是调节胶原蛋白代谢的总管,其参与了胶原蛋白代谢的启动和维持,是肺组织重塑过程中肺间质纤维化形成与发展的诱导剂和启动子^[18]。研究已证实肺组织的上皮细胞、成纤维细胞、肺泡巨噬细胞可表达TGF-β₁,而当肺部存在损伤时,则TGF-β₁高度表达,进而成纤维细胞分化、增殖、增生、修复被损伤细胞,引起胶原蛋白在肺部中的广泛沉淀,最终引起肺间质纤维化^[19]。此外TGF-β₁活化后通过TβRI与Smad3形成活性异源聚合体,引发自身发生磷酸化,激活一系列反应(磷酸化TβRI区的GS结构域)从而激活下游的Smads信号通路的转导。Smads在结构上存在异构性,在Smads的结构上存在一个未被激活的无活性构象,其含有脯氨酸的连接区,存在于MH₁区和MH₂之间。此外Smad4不能被TβRI直接磷酸化(Smad4结构中的MH₂区没有Ser/Thr结构),而Smad2/3由于存在众多磷酸化位点,且其无活性构象易被破化,最容易接受磷酸化后与TβRI受体分离,激活转录反应^[20]。

本研究结果显示高、中剂量的温阳益气方能明显增加心脏搏出量,改善心脏收缩舒张功能,改善心肌肥厚,抑制心肌重塑,而低剂量的温阳益气方则效果不明显。而HE染色结果显示温阳益气方高、中剂量组肺泡破化轻,见少量淋巴细胞浸润,胶原蛋白沉淀也较少,温阳益气方低剂量组淋巴细胞浸润明显,肺泡严重破化,肺泡壁明显增厚。说明高剂量、中剂量的温阳益气方可显著抑制成纤维细胞的活化增殖,降低肺部胶原蛋白的沉淀,低剂量的温阳益气方则效果不明显。此外温阳益气方高、中剂量组α-SMA, Collagen, TGF-β₁, p-Smad3明显降低,说明高、中剂量的温阳益气方能通过抑制α-SMA, Collagen, TGF-β₁, p-Smad3蛋白水平的表达达到阻

断TGF-β₁/Smad3通路信号传导的效果。进一步的TGF-β₁, p-Smad3基因水平分析显示与模型组比较,温阳益气方高、中剂量组TGF-β₁, p-Smad3 mRNA明显降低,与假手术组组比较,温阳益气方低剂量组TGF-β₁, p-Smad3 mRNA明显升高,说明高、中剂量的温阳益气方能从基因水平上抑制TGF-β₁, Smad3的表达,而相关分析显示TGF-β₁ mRNA与TGF-β₁, p-Smad3 mRNA, α-SMA, Collagen; p-Smad3 mRNA与p-Smad3, α-SMA, Collagen正相关关系明显,说明温阳益气方通过TGF-β₁/Smad3通路信号对TGF-β₁, p-Smad3 mRNA, α-SMA, Collagen蛋白及基因层面产生抑制,进而抑制成纤维细胞的活化增殖,降低肺部胶原蛋白的沉淀,最终达到抑制肺部组织重塑的作用。

综上所述,温阳益气方能阻断TGF-β₁/Smad3通路信号传导,抑制α-SMA, Collagen, TGF-β₁, p-Smad3蛋白的表达,进而抑制成纤维细胞的活化增殖,降低肺部胶原蛋白的沉淀,最终达到抑制肺部组织重塑的作用。

【参考文献】

[1] 钟春妍, 贾文钗, 王征, 等. 脉搏指示连续心搏出量检测技术对严重肺部感染合并心力衰竭患者预后的影响[J]. 内科急危重症杂志, 2017, 23(1):14-17.

[2] 韩安邦, 张健, 路迎冬, 等. 芪苈强心胶囊对心肌梗死大鼠心肌纤维化及TGF-β₁/Smad3信号通路的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(1):41-47.

[3] 邱静, 李万成. TGF-β₁/Smad3在博来霉素肺纤维化大鼠中的作用[J]. 成都医学院学报, 2017, 12(3):271-276.

[4] WEI L L, XIN X W, ZHU S M. BNIP3L promotes cardiac fibrosis in cardiac fibroblasts through [Ca²⁺]_i TGF-β-Smad2/3 pathway[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):45-47.

[5] 石振国, 苏锦, 任永乐, 等. 鬼针草提取物通过TGF-β₁/Smad3/Angptl4信号保护急性胰腺炎大鼠肺损伤的实验研究[J]. 四川中医, 2017, 7(2):67-69.

[6] LI J, DU S, SHENG X, et al. MicroRNA-29b inhibits endometrial fibrosis by regulating the Sp1-TGF-β₁/Smad-CTGF axis in a rat model[J]. Reprod Sci, 2016, 23(3):386-391.

[7] 方统念, 王清海, 赵丽芸, 等. 温阳益气法对严重脓毒症患者PiCCO监测指标的影响[J]. 中国中医急症, 2017, 26(2):314-316.

[8] 王健, 曾庆宁, 周晓露, 等. 益气温阳活血利水方对慢性心力衰竭患者ICAM-1水平的影响[J]. 四川中

- 医, 2017, 35(2):76-78.
- [9] 周洪武, 程时杰, 李雅琴. 中药益气温阳活血利水方对慢性心力衰竭患者心功能及 NT-proBNP 水平的影响[J]. 心脑血管病防治, 2017, 17(4):318-320.
- [10] 何志良, 高江宝, 甄杰武, 等. 温阳益气活血利水法治疗心衰病的临床观察[J]. 中医药学报, 2017, 45(4):79-82.
- [11] 韩丽华, 王振涛, 柴松波, 等. 温阳、益气方药对心肌梗死后心力衰竭大鼠肾素、血管紧张素 II 及醛固酮时相性变化的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(11):4103-4105.
- [12] 徐三彬, 刘宗军. 温阳益气、活血利水法治疗慢性心力衰竭研究进展[J]. 山东中医药大学学报, 2015, 39(5):483-485.
- [13] 黄纪文, 陈次滨. 温阳益气方剂辅助治疗对 ACS 患者血清 hs-CRP 及预后的影响[J]. 山东医药, 2010, 50(43):75-76.
- [14] 王花. 芪苈强心胶囊对冠心病合并心力衰竭患者血清脂联素水平及心功能的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 26(22):2450-2452.
- [15] 张少利, 王学惠, 陈志刚, 等. 慢性心力衰竭患者血清胱抑素 C 水平与疾病严重程度及预后的相关性研究[J]. 解放军医药杂志, 2017, 29(3):46-48, 56.
- [16] 曾强林, 白志勋, 王丹, 等. 抑制 TGF- β_1 对慢性环孢素肾病小鼠 Smad2/3 及 ILK 信号分子的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(4):511-515.
- [17] 徐文洋, 吴若云, 鲁玉辉. 基于 TGF- β_1 /Smad 信号通路探讨加味茵芍散含药血清对大鼠肝星状细胞增殖作用的影响及机制[J]. 世界中西医结合杂志, 2016, 11(5):630-635.
- [18] 张义, 由松, 王文澜, 等. TGF- β_1 /Smad 通路在周期性牵张诱导大鼠成纤维细胞胶原合成中的作用[J]. 世界中西医结合杂志, 2016, 11(1):34-37.
- [19] LIU L, WANG Y, RUI Y, et al. Oxymatrine inhibits renal tubular EMT induced by high glucose *via* upregulation of SnoN and inhibition of TGF- β_1 /Smad signaling pathway [J]. PLoS One, 2016, 11(3):986-990.
- [20] 秦静, 张小强, 庞国中, 等. 还原型谷胱甘肽通过抑制转化生长因子- β_1 /Smads 信号通路减轻博莱霉素致大鼠肺纤维化[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23(2):143-146.
- [21] DA C, LIU Y, ZHAN Y, et al. Nobiletin inhibits epithelial-mesenchymal transition of human non-small cell lung cancer cells by antagonizing the TGF- β_1 /Smad3 signaling pathway [J]. Oncol Rep, 2016, 35(5):2767-2769.

[责任编辑 邹晓翠]