

养心康片调节自噬对慢性心力衰竭小鼠心肌纤维化的影响

闫翠, 周政, 梁碧荣, 王陵军, 杨忠奇, 冼绍祥*

(广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

[摘要] **目的:**研究养心康片对心衰后小鼠心肌纤维化的影响,探讨其作用机制。**方法:**采用胸主动脉缩窄法(TAC)建立小鼠慢性心衰模型,建模成功后随机分为假手术组,模型组,3-甲基腺嘌呤(3-MA)组($15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),养心康片高、中、低剂量组($1\ 170, 585, 390\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),假手术组给予等体积蒸馏水灌胃。30 d后行心脏超声检查,收集血流动力学参数;通过心脏石蜡切片,马松(Masson)染色观察心肌细胞形态学变化及心肌纤维化程度;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测微管相关蛋白轻链3(LC3),酵母 ATG6 同源物(Beclin-1),溶酶体膜蛋白(LAMP)心肌自噬蛋白,I型胶原酶(Collagen I),III型胶原酶(Collagen III), α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)心肌纤维化标志性蛋白表达情况。**结果:**与假手术组比较,模型组小鼠左心射血分数(LVEF),短轴缩短分数(FS)明显降低($P < 0.05$),左心室舒张末期内径(LVDd),左心室收缩末期内径(LVDs)明显增大($P < 0.05$),心肌纤维化程度显著加重($P < 0.01$), α -SMA, Collagen I, Collagen III 心肌纤维化标志性蛋白, LAMP, LC3, Beclin-1 自噬蛋白表达均明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,3-MA 组,养心康高、中剂量组心脏超声各项指标均显著改善($P < 0.05$),心肌纤维化程度明显改善($P < 0.01$), α -SMA, Collagen I, Collagen III, LAMP, LC3, Beclin-1 表达明显降低($P < 0.05$),低剂量组心功能、心肌纤维化及各项蛋白表达差异不明显。**结论:**养心康片可通过下调自噬减缓慢性心力衰竭小鼠心肌纤维化,改善心功能。

[关键词] 自噬; 养心康片; 慢性心力衰竭; 心肌纤维化; I型胶原酶(Collagen I); III型胶原酶(Collagen III), α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)

[中图分类号] R289;R541.6+1;R542.2+3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)03-0053-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190340

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181115.0949.020.html>

[网络出版时间] 2018-11-16 15:31

Effect of Yangxinkang Tablets in Regulating Autophagy on Myocardial Fibrosis in Mice After Chronic Heart Failure

YAN Cui, ZHOU Zheng, LIANG Bi-rong, WANG Ling-jun, YANG Zhong-qi, XIAN Shao-xiang*

(The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Yangxinkang tablets on myocardial fibrosis in mice after heart failure, and to explore its mechanism. **Method:** The model of chronic heart failure in mice was established by thoracic aorta constriction (TAC). After successful modeling, mice were randomly divided into sham operation group, model group, 3-methyladenine (3-MA, $15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) autophagy inhibitor group, Yangxinkang tablets high, medium, and low dose groups ($1\ 170, 585, 390\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). The sham operation group received equal volume of distilled water. After 30 days, cardiac ultrasound was performed to collect hemodynamic parameters. Cardiac paraffin slices were stained with Masson to observe the morphological changes and fibrosis of cardiomyocytes. Western blot was used to detect lysosome-associated membrane protein (LAMP), microtubule-

[收稿日期] 20180828(019)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673796,81473621);广东省自然科学基金重点项目(2016A030311030);广州市慢性心力衰竭中医药防治重点实验室项目(201705030006)

[第一作者] 闫翠,在读博士,从事中医药防治心血管疾病的研究,E-mail:82829738@qq.com

[通信作者] *冼绍祥,博士,教授,从事中医药防治心血管疾病的研究,E-mail:sxs53y@163.com

associated protein light chain 3 (LC3), Beclin-1 autophagyportein, α -smooth muscle activin (α -SMA), Collagen I, Collagen III protein expression. **Result:** As compared with normal group, the left ventricular ejection fraction (LVEF) and fractional shortening (FS) were significantly decreased ($P < 0.05$), the left ventricular end-diastolic dimension (LVDD) and left ventricular end-systolic dimension (LVDs) were significantly increased ($P < 0.05$), the degree of myocardial fibrosis was significantly aggravated in model group ($P < 0.01$), and the protein expression levels of α -SMA, Collagen I, Collagen III, LAMP, LC3, and Beclin-1 were significantly increased in model group ($P < 0.05$). As compared with model group, the cardiac ultrasound indexes of the 3-MA group, Yangxinkang high and medium dose groups were significantly improved ($P < 0.05$), the degree of myocardial fibrosis was significantly reduced ($P < 0.01$), the protein expression levels of α -SMA, Collagen I, Collagen III, LAMP, LC3 and Beclin-1 were decreased in 3-MA group, Yangxinkang high and medium dose groups ($P < 0.05$), while the protein expression levels between the model group and Yangxinkang low-dose group showed no significant difference. **Conclusion:** Yangxinkang tablets can reduce myocardial fibrosis and improve cardiac function in mice with heart failure probably by down-regulating autophagy.

[**Key words**] autophagy; Yangxinkang tablets; chronic heart failure; myocardial fibrosis; Collagen I; Collagen III; α -smooth muscle activin (α -SMA)

心力衰竭(简称心衰)发病率逐年增加,最新的流行病学数据显示,中国成年人中心衰患者约有 450 万^[1],心衰已经成为心血管疾病领域的重要公共卫生问题。心衰是多种病因引起心肌损害的最终结果^[2],病理性心肌重构在心衰的病理过程中起着举足轻重的作用,心肌纤维化是心肌的重要病理学特点之一,研究显示抑制心肌纤维化可以延缓心衰的发生发展^[3-4],对改善心衰患者的预后具有重要意义。自噬在心脏病中起着关键的作用,过度自噬可能是心衰心肌纤维化的重要机制之一^[5-7],研究显示在应激情况下,心脏将依赖于自噬上调来保证能量供应,并改善心肌重构^[8]。WENG 等^[9]研究发现抑制自噬能改善慢性压力超负荷小鼠模型中的心脏肥大和心功能障碍。养心康片是广州中医药大学第一附属医院益气养阴活血法治疗慢性心衰的院内制剂,已在临床运用 20 余年,疗效显著。本课题组在前期研究中发现,养心康片可改善无症状心力衰竭患者的心脏收缩功能^[10],亦可以改善心肌梗后心衰模型兔的心功能^[11],但养心康片改善心衰心功能的机制尚未明确,其是否通过调控自噬延缓心衰心肌纤维化,而达到改善心功能的作用鲜有报道。本研究旨在探讨养心康片对慢性心力衰竭模型小鼠心肌纤维化的影响,通过观察养心康片对心衰小鼠心肌组织中自噬蛋白溶酶体膜蛋白(LAMP),微管相关蛋白轻链 3(LC3),酵母 ATG6 同源物(Beclin-1)的表达,以及胶原蛋白 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA), I 型胶原酶(Collagen I), III 型胶原酶(Collagen III)表达的影响,探讨养心康片防治心衰心肌纤维化的

机制,为临床研究提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 C57 小鼠 90 只,体质量 (25 ± 3) g,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2013-0002,饲养于广州中医药大学岭南医学研究中心实验动物房。动物室为 IVC 独立通风系统,清洁级,温度 (22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,普通专用小鼠合成饲料喂养和饮水。本实验得到广州中医药大学动物伦理委员会批准。

1.2 药物及试剂 养心康片由广州中医药大学第一附属医院生产,批准文号为粤药制字 Z20071178,1 g 相当于原材料总药材量 2.5 g,生产批号 20160301;3-甲基腺嘌呤(3-MA)自噬抑制剂(美国 Sigma 公司,批号 M9821);SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒,一抗稀释液,二抗稀释液,封闭液(碧云天生物技术研究所,批号分别为 P0012A, P0256, P0258, P0220);小鼠一抗 Collagen I, Collagen III, α -SMA, LC3, Beclin-1, LAMP, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),兔单克隆二抗(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab34710, ab7778, ab7817, ab48394, ab62557, ab25630, ab8245, ab9484);马松(Masson)染色液(武汉塞维生物技术有限公司,批号 20180601)。

1.3 仪器 Smart Spec plus 型核酸蛋白测定仪, Mini 型蛋白电泳系统(美国 Bio-Rad 公司); PA1phaImager HP 型凝胶成像分析系统(美国 AlphaInnotech 公司); VICTOR X5 型多功能酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司); LD4-2 型低速离心机(北京医用离心机厂); TGL-18R 型冷冻高速离心机(珠

海黑马医学公司);RV8V 型旋转蒸发器(德国 IKA 公司);QPlus 型超级纯水仪(美国 Millipore 公司);TS-1 型脱色摇床(海门其林贝尔公司);Vevo 2100 型高分辨率小动物超声实时影像系统(加拿大 Visual Sonics 公司)。

2 方法

2.1 模型制备及分组 采用 0.5% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠,剂量为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,小鼠固定手术台上,75% 乙醇消毒手术区域 3 次,气管插管。自胸骨上窝向下,剪开至第二肋分离胸骨上窝处的组织,弯镊轻轻分离开遮挡主动脉弓的胸腺和脂肪组织。用“钝头玻璃分针”游离头臂干和左颈总之间的主动脉弓区域,1 cm 长 6.0 丝线穿入穿线器,生理盐水湿润后穿入已游离的主动脉弓处,打结后插入 marker 结扎活结,取出 marker,用 5.0 的线缝合皮肤^[12-13]。将青霉素涂抹在皮肤缝合处。术后 4~6 周行心脏超声确诊小鼠左室射血分数(LVEF)低于 50% 为心衰造模成功^[14-15],动物进行随机分组,分为模型组,3-MA 组和养心康高、中、低剂量组及假手术组(各 12 只),假手术组术中只穿线不结扎。

2.2 给药 心衰小鼠养心康片灌胃给药,小鼠药量折算方法按照《药理实验方法学》中人与动物用药剂量的公式换算,低剂量($390 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),中剂量是低剂量的 1.5 倍($585 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),高剂量是低剂量的 3 倍($1170 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[16],配置养心康水溶液灌胃 30 d。3-MA 组给予心衰小鼠 3-MA $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射^[17]。

2.3 超声心动图检测 小鼠异氟烷吸入麻醉,仰卧位固定后胸部备皮,用高分辨率小动物超声实时影像系统进行心脏超声检测,探头频率为 13 MHz,深度 3.5 cm,速度 $200 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。在取得满意的胸骨旁左心室短轴二维图像后,于乳头肌水平将 M 型取样线垂直于室间隔和左心室后壁获得 M 型超声心动图,测定左心室舒张末期内径(LVDd),左心室收缩末期内径(LVDs),短轴缩短分数(FS),LVEF,连续取 3 个心动周期,取其平均值。

2.4 样品制备 给药 30 d 后,将小鼠麻醉,开胸左心耳剪开约 0.2 mm,0.9% NaCl 灌注心脏,取出心脏,剥除外周结构血管,清理心脏周围血液及组织,置于 4% 多聚甲醛中固定,持续 48 h 以上,石蜡包埋,用于组织学分析。

2.5 病理形态观察 4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,4 μm 切片,进行 Masson 染色,倒置显微镜下

观察病变组织的形态变化。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测心脏组织蛋白表达 取适量左心室心肌组织用干净眼科剪剪成碎块,加入细胞裂解液,低温机器匀浆混匀,移入离心管中 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,低温离心 3 min,取上清蛋白定量后制成蛋白样品。3 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 上样,进行经 SDS-PAGE 凝胶电泳,行湿转法蛋白转膜,封闭液快速封闭 0.5 h。Collagen-I, Collagen-III, α -SMA, LC3, Beclin-1, LAMP 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,浓度分别为 1:5 000, 1:3 000, 1:200, 1:1 000, 1:1 000, 1:5 000。二抗室温孵育 1 h,浓度为 1:3 000。经洗涤、显影、灰度扫描后,用 Image J 分析软件对电泳条带进行测定,分别以目的条带与内参条带 GAPDH 的比值表示 Collagen-I, Collagen-III, α -SMA, LC3, Beclin-1, LAMP 蛋白的表达水平。

2.7 统计方法 采用 SPSS 22.0 统计软件分析,本研究所有数据均为计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。通过单因素方差分析,判断各组间差异有无统计学意义,采用 SNK-*q* 检验进行多重比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 实验动物存活情况 胸主动脉缩窄术(TAC)中及术后小鼠共死亡 7 只;实验过程中,模型组死亡 4 只,养心康中剂量组死亡 1 只,3-MA 组死亡 2 只,假手术组及养心康高、低剂量组全部存活。

3.2 养心康片对心衰小鼠心脏功能的影响 养心康片灌胃 30 d 后,与假手术组比较,模型组小鼠心脏 LVEF,FS 明显降低($P < 0.05$),LVDd,LVDs 明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,3-MA 组,养心康高、中剂量组,LVEF,FS 明显升高,LVDd,LVD 明显降低($P < 0.05$)。见表 1。

3.3 养心康片对心衰小鼠心肌组织病理形态的影响 心肌组织 Masson 染色结果显示,与假手术组比较,模型组心肌纤维化程度显著加重($P < 0.01$),模型组可清晰显示心肌细胞呈红色,胶原纤维呈蓝色,假手术组心肌细胞排列整齐,细胞间质略有少量蓝色胶原纤维;与模型组相比,养心康高、中剂量组,3-MA 组胶原纤维呈分支状排列在心肌细胞间,心肌纤维化程度显著减轻($P < 0.01$)。见图 1,表 2。

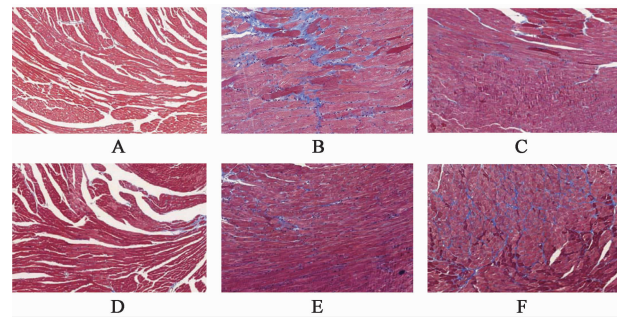
3.4 养心康片对心衰小鼠心肌 LAMP, LC3, Beclin-1, α -SMA, Collagen I, Collagen III 蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组小鼠 α -SMA, Collagen I, Collagen III, LAMP, LC3, Beclin-1 蛋白

表 1 养心康片对心衰小鼠心脏超声的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Yangxinkang tablets on echocardiography in heart failure mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	LVEF/%	FS/%	LVDd/mm	LVDs/mm
假手术	-	12	71.25 ± 10.68	44.00 ± 9.01	3.13 ± 0.26	1.49 ± 0.19
模型	-	8	21.00 ± 9.66 ¹⁾	10.00 ± 4.47 ¹⁾	4.43 ± 0.46 ¹⁾	3.96 ± 0.56 ¹⁾
3-MA	15	10	42.75 ± 19.61 ²⁾	22.00 ± 12.02 ²⁾	3.77 ± 0.25 ²⁾	3.06 ± 1.00 ²⁾
养心康片	1 170	12	48.40 ± 9.71 ²⁾	23.80 ± 5.93 ²⁾	3.86 ± 0.28 ²⁾	2.97 ± 0.49 ²⁾
	585	11	50.20 ± 5.35 ²⁾	25.40 ± 3.64 ²⁾	3.65 ± 0.48 ²⁾	2.65 ± 0.55 ²⁾
	390	12	24.75 ± 12.44	11.25 ± 6.55	4.56 ± 0.37	4.01 ± 0.58

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



A. 假手术组; B. 模型组; C. 3-MA 组; D. 养心康片中剂量组; E. 养心康片高剂量组; F. 养心康片低剂量组(图 2 同)

图 1 养心康片对心衰小鼠心肌组织病理形态的影响 (Masson, × 200)
Fig. 1 Effect of Yangxinkang tablets on myocardial histopathology in heart failure mice (Masson, × 200)

表达均明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,3-MA 组,养心康片高、中剂量组 α -SMA, Collagen I,

表 2 养心康片对心衰小鼠左心室纤维化面积的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Yangxinkang tablets on left ventricular fibrosis area in heart failure mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	心肌纤维化率/%
假手术	-	12	0.90 ± 0.11
模型	-	8	8.28 ± 0.59 ¹⁾
3-MA	15	10	3.06 ± 0.85 ²⁾
养心康片	1 170	12	2.44 ± 0.97 ²⁾
	585	11	3.0 ± 1.12 ²⁾
	390	12	7.73 ± 1.1

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

Collagen III, LAMP, LC3, Beclin-1 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05$)。见表 3,图 2。

表 3 养心康片对心衰小鼠心肌组织蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Yangxinkang tablets on protein expression in myocardial tissues of heart failure mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	α -SMA /GAPDH	Collagen I /GAPDH	Collagen III /GAPDH	LAMP /GAPDH	LC3 /GAPDH	Beclin-1 /GAPDH
假手术	-	12	100	100	100	100	100	100
模型	-	8	234.76 ± 21.76 ¹⁾	174.05 ± 40.12 ¹⁾	136.14 ± 5.81 ¹⁾	150.75 ± 25.88 ¹⁾	133.51 ± 21.67 ¹⁾	182.20 ± 29.68 ¹⁾
3-MA	15	10	112.10 ± 6.38 ²⁾	122.71 ± 12.52 ²⁾	96.84 ± 7.05 ²⁾	119.97 ± 10.15 ²⁾	90.58 ± 11.91 ²⁾	127.46 ± 18.05 ²⁾
养心康片	1 170	12	136.10 ± 64.01 ²⁾	111.73 ± 6.13 ²⁾	103.70 ± 9.78 ²⁾	118.32 ± 12.66 ²⁾	94.21 ± 6.59 ²⁾	123.15 ± 11.25 ²⁾
	585	11	187.39 ± 86.52	128.61 ± 10.38 ²⁾	109.30 ± 33.3 ²⁾	118.12 ± 14.16 ²⁾	86.06 ± 7.38 ²⁾	159.55 ± 24.97
	390	12	230.40 ± 58.30	192.54 ± 23.26	136.58 ± 8.20	161.40 ± 23.92	122.95 ± 16.78	206.42 ± 15.76

4 讨论

心衰是由于任何心脏结构或功能异常导致心室充盈或射血能力受损的一种具有高发病率和死亡率的临床综合征,这一严重的公共健康问题,给全球 2 300 多万患者带来沉重的经济负担^[18]。心肌纤维化表现为心肌组织中胶原纤维过度沉积,胶原含量显著增加等,是心脏重塑的重要病理学表现,也是

心力衰竭的主要发病机制。在心衰心肌纤维化的病理过程中,当心肌受损,心脏成纤维细胞大量增殖,并被激活分化为肌成纤维细胞,肌成纤维细胞合成的间质性细胞外基质大量沉积^[19],导致心肌硬化和心室收缩舒张功能障碍,最终导致心功能衰竭^[20-21],因此延缓或逆转心肌纤维化是防治心力衰竭的重要治疗策略。

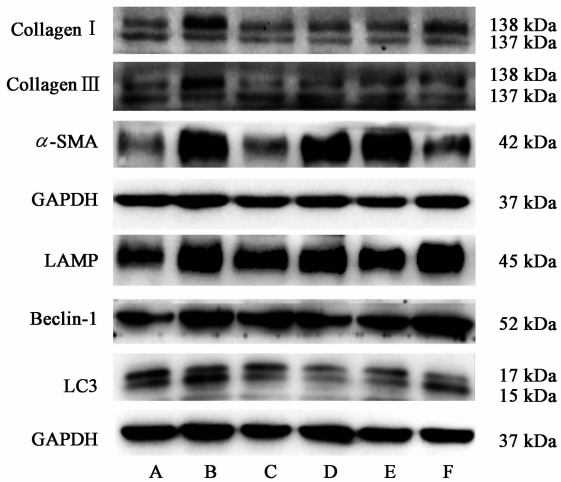


图 2 小鼠心肌组织蛋白 Collagen I, Collagen III, α -SMA, LAMP, Beclin-1, LC3, GAPDH 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Collagen I, Collagen III, α -SMA, LAMP, Beclin-1, LC3, and GAPDH protein in myocardial tissues of mice

益气养阴活血法是治疗心力衰竭的主要治法之一,研究证实益气养阴活血法具有治疗心衰,抗心室重构的作用^[22-24],其代表药养心康片由人参、黄芪、麦冬、五味子、毛冬青等组成。其中人参大补元气,补脾益肺,黄芪补中益气、生津养血,二者在方中起到益气的功效;麦冬养阴润肺,清心除烦,五味子敛肺滋肾,生津敛肺,二者在方中具有养阴生津的功效;毛冬青活血通脉,在方中起到活血祛瘀通脉的作用。全方以人参补益心气、麦冬养心阴为君,黄芪、五味子分别助红参、麦冬补气养阴为臣,佐以毛冬青活血利水,诸药配伍共奏益气养阴,活血通络,宣肺平喘,利水之功效。本研究结果显示,养心康片具有改善心衰后小鼠心功能作用,与报道研究结果一致^[25-26]。养心康高、中剂量组,3-MA 自噬抑制剂组,心脏 LVEF, FS, LVDD, LVDs 均明显改善。低剂量组心功能改善不明显,原因可能是低剂量药物浓度低,所用剂量远远达不到养心康片有效阈剂量,导致低剂量治疗效果不佳^[27]。

自噬是由溶酶体介导的细胞内蛋白质和细胞器再循环利用的高度保守的细胞机制^[28],心肌过度自噬是心衰进展的关键过程之一,有研究发现主动脉弓缩窄可导致心肌组织细胞自噬增加,发生心衰和心脏纤维化,压力负荷导致的心衰大鼠心肌细胞自噬明显激活,应用特异性自噬抑制剂 3-MA 后,能明显改善大鼠心功能,改善心肌纤维化^[29-30],敲除 Beclin-1 自噬相关蛋白,降低心肌细胞自噬并减少心脏病理重塑,而 Beclin-1 过表达增强了自噬活性,

从而加重心脏病理性重塑^[31]。因此,心肌在应对各种病理性损伤时,心肌成纤维细胞和肌成纤维细胞合成大量的 I 型和 III 型胶原并且过量积聚,胶原比例发生改变,导致心功能受损,引发心衰。有研究证实,降低自噬可减轻心肌纤维化,提高大鼠心梗后心衰的心功能^[32]。 α -SMA 是国际认可的肌成纤维细胞标志蛋白^[33]。本实验研究显示,应用 3-MA 自噬抑制后,TAC 模型小鼠的心功能改善,与研究报道一致。本研究结果显示,心衰发生时,自噬蛋白 LAMP, LC3, Beclin-1 表达上调,模型组 α -SMA, Collagen I, Collagen III 蛋白表达明显上调。当使用自噬抑制剂及养心康片干预治疗后,3-MA 组,养心康片高、中剂量组自噬蛋白表达下调,同时 Collagen I, Collagen III, α -SMA 表达也显著下调,小鼠心肌纤维化程度明显降低,达到改善心衰后小鼠心功能目的。

综上所述,在慢性心衰发生时,养心康片可通过下调自噬,延缓心室重构,抑制心肌纤维化,从而达到改善心功能的作用。

[参考文献]

- [1] Mozaffarian D, Benjamin E J, Go A S, et al. Heart disease and stroke statistics—2016 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2016, 133(4):38-360.
- [2] Fonseca C, Maggioni A P, Marques F, et al. A systematic review of in-hospital worsening heart failure as an endpoint in clinical investigations of therapy for acute heart failure [J]. *Int J Cardiol*, 2018, 250:215-222.
- [3] Schelbert E B, Piehler K M, Zareba K M, et al. Myocardial fibrosis quantified by extracellular volume is associated with subsequent hospitalization for heart failure, death, or both across the spectrum of ejection fraction and heart failure stage [J]. *J Am Heart Assoc*, 2015, 4(12).
- [4] QIAO B, HE B X, CAI J H, et al. MicroRNA-27a-3p modulates the Wnt/ β -catenin signaling pathway to promote epithelial-mesenchymal transition in oral squamous carcinoma stem cells by targeting SFRP1 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:44688.
- [5] ZHOU L C, MA B H, HAN X Z. The role of autophagy in angiotensin II-induced pathological cardiac hypertrophy [J]. *Mol Endocrinol*, 2016, 57(4):143-152.
- [6] LIU L, WANG C, SUN D, et al. Calhex231 ameliorates cardiac hypertrophy by inhibiting cellular autophagy *in vivo* and *in vitro* [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(4):1597-1612.

- [7] Garcia A G, Wilson R M, Heo J, et al. Interferon- γ ablation exacerbates myocardial hypertrophy in diastolic heart failure [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 303(5): 587-596.
- [8] Nakai K, Tsuboi J, Okabayashi H, et al. Development of a signal-averaged vector-projected 187-channel high-resolution electrocardiogram for the evaluation of the spatial location of high-frequency and abnormal ventricular repolarization [J]. *Int Heart J*, 2007, 48(6): 701-713.
- [9] WENG L Q, ZHANG W B, YE Y, et al. Aliskiren ameliorates pressure overload-induced heart hypertrophy and fibrosis in mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2014, 35(8): 1005-1014.
- [10] 任培华, 王鹏, 廖东江, 等. 养心康片对心梗后心力衰竭模型兔血管紧张素 II、醛固酮和心肌病理形态的影响 [J]. *中国中医急症*, 2018, 27(2): 205-207, 218.
- [11] 沈凌, 王嵩. 养心康治疗无症状心力衰竭临床研究 [J]. *新中医*, 2014, 46(9): 26-27.
- [12] Tavakoli R, Nemska S, Jamshidi P, et al. Technique of minimally invasive transverse aortic constriction in mice for induction of left ventricular hypertrophy [J]. *J Vis Exp*, 2017, dio: 10.3791/56231.
- [13] Songstad N T, Johansen D, How O J, et al. Effect of transverse aortic constriction on cardiac structure, function and gene expression in pregnant rats [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89559.
- [14] 唐晓霞. 高分辨力超声评价小鼠心脏结构和功能的价值 [D]. 南京: 南京医科大学, 2006.
- [15] 赵菁, 王迎超, 张玲. 超声心动图评价不同心肌梗死模型小鼠心功能的改变 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2015, 24(11): 1242.
- [16] 魏伟, 吴希美, 李健. 药理实验方法学, 第四版 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1698.
- [17] YI J, HE G, YANG J, et al. Heat acclimation regulates the autophagy-lysosome function to protect against heat stroke-induced brain injury in mice [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(1): 101-114.
- [18] Go A S, Mozaffarian D, Roger V L, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics-2014 update; a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2014, 129(3): 399-410.
- [19] Porter K E, Turner N A. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling [J]. *Pharmacol Ther*, 2009, 123(2): 255-278.
- [20] Weber K T, SUN Y, et al. Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological re-modelling of the heart [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2013, 10(1): 15-26.
- [21] Sw V D B, Diez J, Blankesteijn W M, et al. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2010, 7(1): 30-37.
- [22] 陈艳俏, 陈少军, 曲畅. 益气养阴活血法配合西医综合疗法治疗慢性充血性心力衰竭疗效观察 [J]. *辽宁中医杂志*, 2012, 39(7): 1307-1308.
- [23] 郑颖, 黄芪, 张运. 益气养阴活血中药治疗慢性心力衰竭急性加重 36 例临床疗效观察 [J]. *天津中医药*, 2014, 31(7): 412-415.
- [24] 黄衍寿, 洗绍祥, 吴辉. 养心康治疗充血性心力衰竭临床研究 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2000, 7(2): 71-74.
- [25] 任培华, 洗绍祥, 孙敬和, 等. 养心康对慢性心功能不全兔心室重构的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2012, 23(1): 58-60.
- [26] XIAN S X, YANG Z Q, REN P H, et al. Effect of yangxinkang tablets on chronic heart failure: a multicenter randomized double-blind placebo-controlled trial [J]. *Chin J Integr Med*, 2015, 21(10): 733-742.
- [27] 徐国良, 余日跃, 李冰涛, 等. 中药复方量效关系剂量阈研究方法探讨 [J]. *世界中医药*, 2014, 9(1): 11-13.
- [28] FENG Y, HE D, YAO Z, et al. The machinery of macroautophagy [J]. *Cell Res*, 2014, 24(1): 24-41.
- [29] LI B, SUN Y, WANG J P. Antioxidant N-acetylcysteine inhibits maladaptive myocyte autophagy in pressure overload induced cardiac remodeling in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 839: 47-56.
- [30] Mariño G, Pietrocola F, KONG Y, et al. Dimethyl α -ketoglutarate inhibits maladaptive autophagy in pressure overload-induced cardiomyopathy [J]. *Autophagy*, 2014, 10(5): 930-932.
- [31] ZHU H X, Tannous P, Johnstone J L, et al. Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress [J]. *Clin Invest*, 2007, 117(7): 1782-1793.
- [32] WANG H B, YANG X, YANG Q Q, et al. Parp-1 inhibition attenuates cardiac fibrosis induced by myocardial infarction through regulating autophagy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(3): 1625-1632.
- [33] Sw V D B, Isobe S, Verjans J W, et al. Molecular imaging of interstitial alterations in remodeling myocardium after myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 52(24): 2017-2028.

[责任编辑 孙丛丛]