

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.03.015

抗纤益心方对扩张型心肌病模型大鼠心肌纤维化相关因子及心肌组织 β -catenin/PPAR γ 信号通路的影响

刘舜禹¹, 李巧稚¹, 芮浩淼², 王振涛^{2✉}, 常红波¹, 郭宗耀¹, 吴鸿¹

1. 河南中医药大学第二临床医学院, 河南省郑州市金水东路 156 号, 450046; 2. 河南省中医院

摘要 目的 探讨抗纤益心方治疗扩张型心肌病 (DCM) 心肌纤维化的可能作用机制。方法 100 只 Wistar 大鼠随机分为正常组 8 只及造模组 92 只。造模组大鼠采用自主饮用呋喃唑酮水溶液法制备 DCM 大鼠模型, 将造模成功的 40 只大鼠随机分为模型组、卡托普利组及抗纤益心方低、中、高剂量组, 每组 8 只。抗纤益心方低、中、高剂量组分别给予抗纤益心方 0.9、1.8、3.6 g/(kg·d) 灌胃, 卡托普利组给予卡托普利片 10.13 mg/(kg·d) 灌胃, 正常组与模型组给予生理盐水 5.3 ml/(kg·d) 灌胃。干预 4 周后检测各组大鼠左室舒张末期腔径 (LVEDD)、左室收缩末期腔径 (LVESD)、左心室射血分数 (LVEF) 和左室轴缩短率 (LVFS), 观察大鼠心肌组织病理变化情况, 检测纤维化相关指标 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、I 型胶原蛋白表达, β 连环蛋白 (β -catenin)、过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ (PPAR γ) 蛋白及 mRNA 表达。结果与正常组比较, 模型组大鼠 LVEDD、LVESD 升高, LVEF、LVFS 降低 ($P < 0.05$), 心肌病理损害加重, 心肌组织 α -SMA、I 型胶原蛋白、 β -catenin 蛋白及 mRNA 表达升高, PPAR γ 蛋白及 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 抗纤益心方中、高剂量组及卡托普利组大鼠 LVEDD、LVESD 降低, LVEF、LVFS 升高 ($P < 0.05$), 心肌病理纤维化程度减轻, 心肌组织 α -SMA 和 I 型胶原蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 抗纤益心方中、高剂量组大鼠心肌组织 β -catenin 蛋白及 mRNA 表达降低, PPAR γ 蛋白及 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。与卡托普利组比较, 抗纤益心方中、高剂量组大鼠心肌组织 β -catenin 蛋白及 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$), LVEDD、LVESD、LVEF、LVFS、I 型胶原蛋白、PPAR γ 蛋白及 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与抗纤益心方低剂量组比较, 抗纤益心方中、高剂量组 LVEDD、LVESD 降低, LVEF、LVFS、PPAR γ mRNA 表达升高, 抗纤益心方高剂量组 I 型胶原蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 抗纤益心方中、高剂量组组间各指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 抗纤益心方能够有效改善 DCM 大鼠心功能, 抑制心室重构及心肌纤维化发展, 以中、高剂量效果更好, 其作用机制可能与调控心肌组织 β -catenin/PPAR γ 通路有关。

关键词 扩张型心肌病; 心肌纤维化; 抗纤益心方; β 连环蛋白; 过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ

扩张型心肌病 (dilated cardiomyopathy, DCM) 是临床常见的心肌疾病之一, 临床主要表现为进行性心力衰竭^[1]。心肌纤维化是 DCM 的重要病理特点, 也是引起心室重构的关键原因, 延缓心肌纤维化发展对减轻心肌损伤、保护心脏功能十分重要^[2-3]。抗纤益心方是我们治疗 DCM 的经验方, 具有益气升陷、活血利水之效。前期研究^[4]发现, 本方能够改善 DCM 患者心功能, 抑制心室重构,

减轻心力衰竭症状, 其机制可能与抑制心肌纤维化进展有关。 β 连环蛋白 (β -catenin) /过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ (PPAR γ) 信号通路是调控心肌纤维化的重要通路, 且该通路与心肌成纤维细胞转分化密切相关^[5], 故干预 β -catenin/PPAR γ 通路可能有助于延缓心肌纤维化进展。本实验利用自主饮用呋喃唑酮水溶液法制备 DCM 大鼠模型, 通过检测大鼠心脏结构及功能改变, 观察抗纤益心方对 DCM 大鼠心肌纤维化相关因子表达水平及 β -catenin/PPAR γ 信号通路相关蛋白及 mRNA 表达水平的影响, 以探讨其治疗 DCM 的可能作用机制。本研究

基金项目: 国家自然科学基金 (81573920); 河南省中医药科学研究专项课题 (2019JDZX004)

✉ 通讯作者: 13803817796@139.com, {0371} 60908742

通过河南省中医院伦理委员会审批 (批号: PZ-HNSZYY-2018-012)。

1 材料与方法

1.1 动物

4 周龄 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 100 只, 体重 (53.4 ± 4.9) g, 购自北京维通利华有限公司, 实验动物合格证编号: SCXK (京) 2016-0006。饲养于河南省中医院实验动物中心, 温度 (22 ± 2) °C, 湿度 (50 ± 5) %, 人工光源 12 h/12 h 明暗交替, 自由摄食。

1.2 药物

抗纤益心方组成: 红参 (批号: 18080058) 12 g, 黄芪 (批号: 18060154) 30 g, 丹参 (批号: 18090064) 15 g, 茯苓 (批号: 18050094) 15 g, 泽兰 (批号: 18040048) 15 g, 益母草 (批号: 18060048) 15 g, 麦冬 (批号: 18010423) 12 g, 升麻 (批号: 18720032) 9 g, 白术 (批号: 18510233) 15 g。免煎颗粒购自四川新绿药业科技发展有限公司。卡托普利片, 20 mg/片, 上海信谊天平药业有限公司, 批号: 63470904。呋喃唑酮片, 0.1 g/片, 天津力生制药股份有限公司, 批号: 1801003。

1.3 主要试剂及仪器

HE 染色试剂盒 (批号: 20180526)、Masson 三色染色液 (批号: 20180427)、高效 RIPA 组织/细胞快速裂解液 (批号: 20190514)、BCA 蛋白浓度试剂盒 (批号: 20190327)、ECL 超敏发光液 (批号: 20190410), 北京索莱宝科技有限公司; α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 兔多克隆抗体 (批号: 14395-1-AP)、I 型胶原兔多克隆抗体 (批号: 14695-1-AP)、GAPDH 鼠单克隆抗体 (批号: 60004-1-Ig)、 β -catenin 兔多克隆抗体 (批号: 17565-1-AP)、PPAR γ 兔多克隆抗体 (批号: 16643-1-AP), 美国 Proteintech 公司; 柱式组织 RNA 提取试剂盒 (批号: B518651-0100), 上海生工生物工程股份有限公司。

IVC 型独立送风隔离笼具, 苏州冯氏实验动物设备有限公司; ACUSON Cypress 型超声诊断系统, 德国西门子医疗系统有限公司; H600L 型显微镜, 日本奥林巴斯公司; OD-2000⁺ 型超微量核酸蛋白测定仪, 美国 One Drop 公司; SIGMA3K 型超速低温离心机, 美国 Sigma Aldrich 公司; Mini-PROTEAN SDS-PAGE 型凝胶系统、042BR17052 型凝胶电泳仪、Universal Hood II 型凝胶成像仪及 Alpha Unit

型基因扩增仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.4 模型制作

大鼠适应性饲养 1 周后, 采用随机数字表法分为正常组 8 只及造模组 92 只。参照前期研究^[6-7]制备 DCM 大鼠模型。造模组大鼠给予自主饮用呋喃唑酮水溶液 (每 1 kg 去离子水加 700 mg 呋喃唑酮粉末); 正常组大鼠给予常规饲养, 自主饮用去离子水。造模 10 周后进行心脏超声心动图检测, 以射血分数较正常组大鼠均值减少 20%, 伴有左室壁运动弥漫性减弱为造模成功标准^[8]。

1.5 分组及给药

抗纤益心方成人用量为 17.2 g/(kg·d), 换算得到大鼠等效灌胃剂量^[9]为 1.8 g/(kg·d)。造模成功的 40 只大鼠按照随机数字表法分为模型组、卡托普利组及抗纤益心方低、中、高剂量组, 每组 8 只。抗纤益心方中剂量组按照等效剂量灌胃, 抗纤益心方低、高剂量组分别给予抗纤益心方 0.9、3.6 g/(kg·d) 灌胃; 卡托普利组给予卡托普利片 10.13 mg/(kg·d) 灌胃; 正常组与模型组给予生理盐水灌胃。各组均灌胃 4 周后进行指标检测。同时除正常组外, 其余各组均继续自主饮用呋喃唑酮水溶液。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 超声心动图 大鼠用 4% 水合氯醛溶液 0.8 ml/100 g 腹腔注射麻醉后仰卧位固定于鼠板上, 心前区备皮, 行超声心动图检测心功能, 检测指标包括左室舒张末期内径 (LVEDD)、左室收缩末期内径 (LVESD)、左心室射血分数 (LVEF) 和左室轴缩短率 (LVFS)。

1.6.2 心肌病理学形态 大鼠末次超声结束后, 开胸腔取心脏, 用预冷的生理盐水洗净残余血液, 吸干水分后, 将左室心肌组织置于 4% 多聚甲醛中固定, 制备切片。行 HE 及 Masson 染色, 显微镜下观察左心室心肌组织病理学形态。根据心肌纤维化胶原增生程度、纤维断裂程度评价心肌组织病理情况。

1.6.3 qPCR 法检测心肌组织 β -catenin、PPAR γ mRNA 表达 用随机数字表法每组取 4 只大鼠心肌组织进行裂解, 依照试剂盒方法提取样本总 RNA, 定量并检测样品 RNA 纯度, 将提取的 RNA 用反转录试剂盒合成 cDNA, 扩增目的基因。引物由上海生工生物有限公司合成。引物序列: β -catenin 上游: GGAGCTAAAATGGCACTGCC, 下游: GACAG-CACCTTCAGCACTCT, 扩增片段 242 bp; PPAR γ 上游: AGCTCTGTGGACCTCTCTGT, 下游: ATAATA-

AGGCGGGGACGCAG, 扩增片段 213 bp; GAPDH 上游: GCGAGATCCCGCTAACATCA, 下游: CTCGTG-GTTCACACCCATCA, 扩增片段 178 bp。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 定量法计算 mRNA 表达水平。

1.6.4 Western blot 法检测心肌组织 α -SMA、I 型胶原及 β -catenin、PPAR γ 蛋白表达 用随机数字表法每组取 4 只大鼠心肌组织进行裂解, 样品预冷至 4℃, 12 000 r/s, 离心 5 min (离心半径 10.7 cm), 提取上清蛋白, 根据 BCA 试剂盒说明进行蛋白定量, 加入 5 倍缓冲液及裂解液, 煮沸 10 min 使蛋白变性。上样, SDS-PAGE 电泳跑胶分离蛋白, 转膜, 脱脂奶粉室温封闭, 一抗孵育过夜, 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入二抗 37℃ 恒温摇床孵育 1 h, 再次洗膜, ECL 发光液暗室曝光, 用 Image J pro plus 6.0 软件分析蛋白条带, 测定其灰度值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行数据统计, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 法, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心功能指标比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组大鼠 LVEDD、LVESD 明显升高, LVEF、LVFS 明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 抗纤益心方各剂量组及卡托普利组 LVEDD、LVESD 降低, 抗纤益心方中、高剂量组及卡托普利组 LVEF、LVFS 升高 ($P < 0.05$); 与卡托普利组比较, 抗纤益心方中、高剂量组 LVEDD、LVESD、LVEF、LVFS 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 抗纤益心方低剂量组大鼠 LVEDD、LVESD 升高, LVEF、LVFS 降低 ($P < 0.05$); 与抗纤益心方低剂量组比较, 抗纤益心方中、高剂量组 LVEDD、LVESD 降低, LVEF、LVFS 升高 ($P < 0.05$), 抗纤益心方中、高剂量组两组间各指标比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠心肌病理结果

图 1、图 2 示, 光镜下可见正常组大鼠心肌细胞排列整齐, 组织间隙未见水肿, 偶见少量间质胶原纤维; 模型组大鼠心肌间质胶原纤维明显增生, 心肌排列紊乱, 纤维结缔组织包绕、分割心肌肌束, 纤维化明显; 抗纤益心方低、中、高剂量组心肌组织受损程度及心肌间质胶原纤维增生程度随剂量的增加呈现递减趋势; 卡托普利组大鼠心肌组织分布较为正常, 组织间隙无明显水肿, 心肌间质胶原纤维增生不明显。

2.3 各组大鼠心肌组织 α -SMA、I 型胶原蛋白表达比较

表 2、图 3 示, 与正常组比较, 模型组大鼠心肌组织 α -SMA、I 型胶原蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 抗纤益心方各剂量组及卡托普利组大鼠心肌组织 α -SMA 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 抗纤益心方中、高剂量组及卡托普利组 I 型胶原蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 与卡托普利组比较, 抗纤益心方低剂量组 I 型胶原蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 抗纤益心方中、高剂量组 I 型胶原蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与抗纤益心方低剂量组比较, 抗纤益心方高剂量组大鼠心肌组织 I 型胶原蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 抗纤益心方中剂量组与抗纤益心方高剂量组 α -SMA 及 I 型胶原蛋白表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 各组大鼠心肌组织 β -catenin、PPAR γ mRNA 表达比较

表 3 示, 与正常组比较, 模型组大鼠心肌组织 β -catenin mRNA 表达升高, PPAR γ mRNA 表达降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 抗纤益心方各剂量组大鼠心肌组织 β -catenin mRNA 表达均降低, 抗纤益心方中、高剂量组大鼠心肌组织 PPAR γ mRNA 表达升高 ($P < 0.05$); 与卡托普利组比较, 抗纤益心方各剂量组大鼠心肌组织 β -catenin mRNA

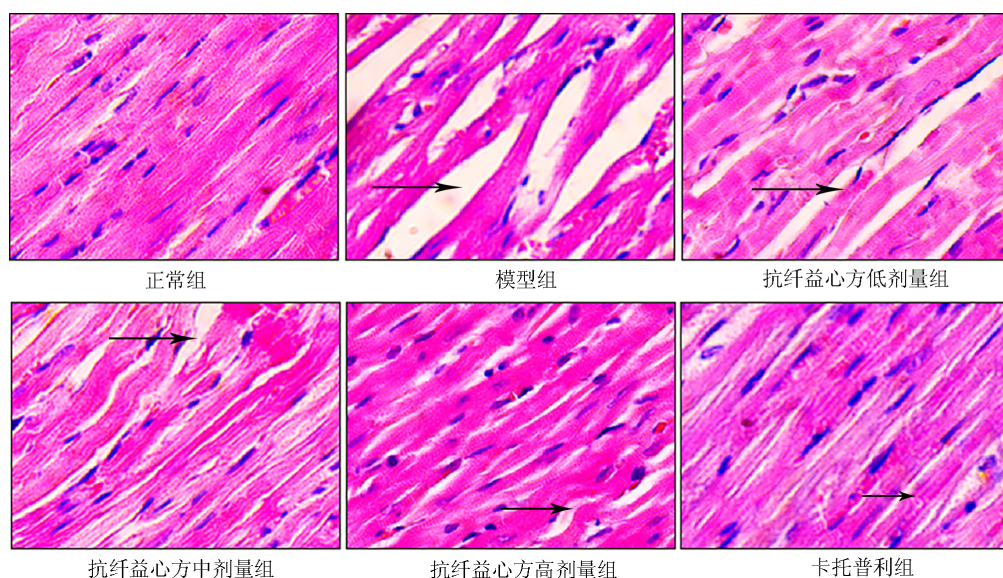
表 1 各组大鼠心功能指标比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	LVEDD/cm	LVESD/cm	LVEF/%	LVFS/%
正常组	8	5.55 $\pm$ 0.24	2.85 $\pm$ 0.11	86.41 $\pm$ 1.27	46.46 $\pm$ 5.74
模型组	8	6.71 $\pm$ 0.23 ^{a)}	4.70 $\pm$ 0.40 ^{a)}	68.78 $\pm$ 2.72 ^{a)}	31.95 $\pm$ 1.94 ^{a)}
抗纤益心方低剂量组	8	5.94 $\pm$ 0.17 ^{b) c)}	4.00 $\pm$ 0.14 ^{b) c)}	69.61 $\pm$ 1.37 ^{c)}	33.59 $\pm$ 1.50 ^{c)}
抗纤益心方中剂量组	8	5.83 $\pm$ 0.12 ^{b) d)}	3.70 $\pm$ 0.04 ^{b) d)}	74.38 $\pm$ 2.04 ^{b) d)}	37.19 $\pm$ 2.43 ^{b) d)}
抗纤益心方高剂量组	8	5.75 $\pm$ 0.05 ^{b) d)}	3.38 $\pm$ 0.07 ^{b) d)}	79.64 $\pm$ 0.79 ^{b) d)}	40.41 $\pm$ 1.97 ^{b) d)}
卡托普利组	8	5.80 $\pm$ 0.20 ^{b)}	3.64 $\pm$ 0.29 ^{b)}	75.15 $\pm$ 3.44 ^{b)}	37.28 $\pm$ 3.14 ^{b)}

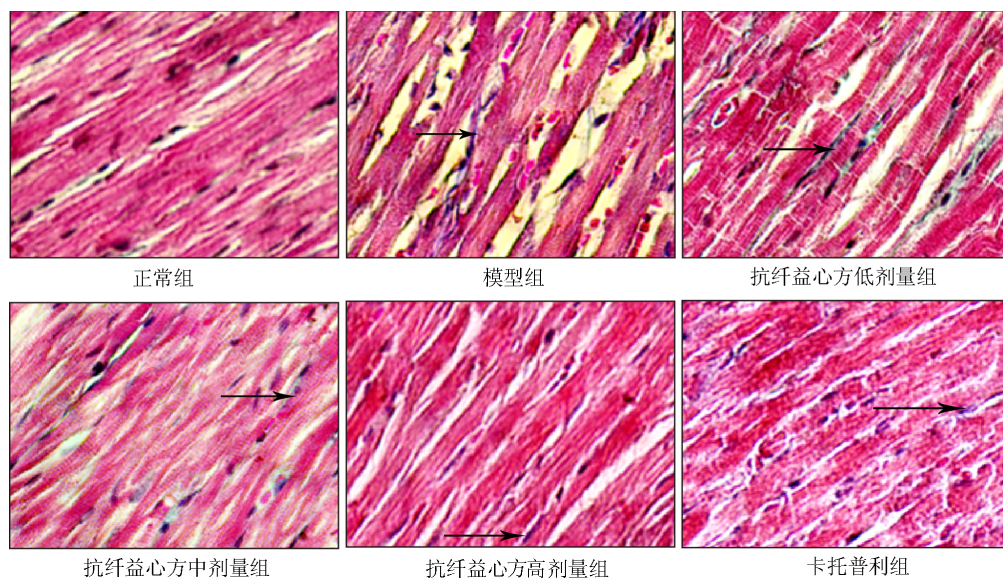
注: LVEDD, 左室舒张末期内径; LVESD, 左室收缩末期内径; LVEF, 左室射血分数; LVFS, 左室轴缩短率。

a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与卡托普利组比较, $P < 0.05$; d) 与抗纤益心方低剂量组比较, $P < 0.05$ 。



注：图中箭头所指为心肌间隙。

图 1 各组大鼠心肌病理 HE 染色图 (×400)



注：图中箭头所指为胶原纤维沉积。

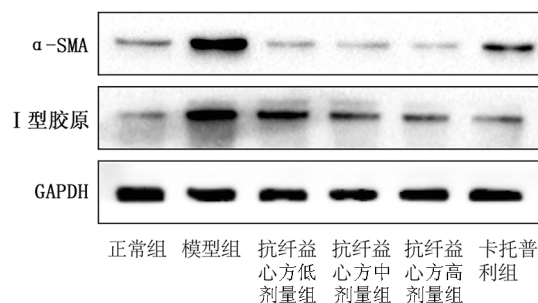
图 2 各组大鼠心肌病理 Masson 染色图 (×400)

表 2 各组大鼠心肌组织 α -SMA、I 型胶原蛋白表达比较 (灰度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	α -SMA	I 型胶原
正常组	4	1.01 ± 0.06	1.05 ± 0.13
模型组	4	3.41 ± 1.33 ^{a)}	2.68 ± 1.10 ^{a)}
抗纤益心方低剂量组	4	1.38 ± 0.72 ^{b)}	1.93 ± 0.91 ^{c)}
抗纤益心方中剂量组	4	0.96 ± 0.45 ^{b)}	1.53 ± 0.53 ^{b)}
抗纤益心方高剂量组	4	1.11 ± 0.68 ^{b)}	1.13 ± 0.42 ^{b)} d)
卡托普利组	4	1.91 ± 1.17 ^{b)}	1.47 ± 0.51 ^{b)}

注: α -SMA, α 平滑肌肌动蛋白。

a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$;
c) 与卡托普利组比较, $P < 0.05$; d) 与抗纤益心方低剂量组比较, $P < 0.05$ 。



注: α -SMA, α 平滑肌肌动蛋白。

图 3 各组大鼠心肌组织 α -SMA 及 I 型胶原蛋白表达电泳图

表达降低 ($P < 0.05$)，PPAR γ mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；与抗纤益心方低剂量组比较，抗纤益心方高、中剂量组大鼠心肌组织 PPAR γ mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)；抗纤益心方高剂量组与抗纤益心方中剂量组 β -catenin、PPAR γ mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 各组大鼠心肌组织 β -catenin、PPAR γ

mRNA 表达比较		$(2^{-\Delta\Delta CT}, \bar{x} \pm s)$	
组别	鼠数	β -catenin	PPAR γ
正常组	4	1.00 $\pm$ 0.00	1.05 $\pm$ 0.09
模型组	4	2.96 $\pm$ 0.41 ^{a)}	0.65 $\pm$ 0.10 ^{a)}
抗纤益心方低剂量组	4	0.71 $\pm$ 0.62 ^{b) c)}	0.77 $\pm$ 0.26
抗纤益心方中剂量组	4	0.87 $\pm$ 0.57 ^{b) c)}	1.07 $\pm$ 0.32 ^{b) d)}
抗纤益心方高剂量组	4	0.71 $\pm$ 0.34 ^{b) c)}	1.02 $\pm$ 0.24 ^{b) d)}
卡托普利组	4	2.25 $\pm$ 1.99	0.90 $\pm$ 0.13

注： β -catenin， β 连环蛋白；PPAR γ ，过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 。

a) 与正常组比较， $P < 0.05$ ；b) 与模型组比较， $P < 0.05$ ；c) 与卡托普利组比较， $P < 0.05$ ；d) 与抗纤益心方低剂量组比较， $P < 0.05$ 。

2.5 各组大鼠心肌组织 β -catenin、PPAR γ 蛋白表达比较

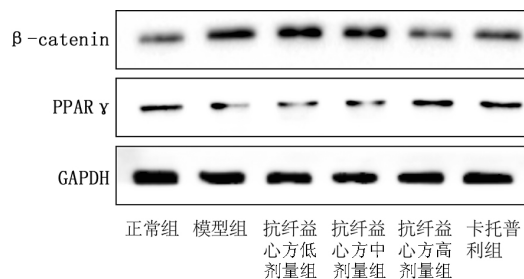
表 4、图 4 示，与正常组比较，模型组大鼠 β -catenin 蛋白表达升高，PPAR γ 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)；与模型组比较，抗纤益心方高剂量组大鼠 β -catenin 蛋白表达降低，抗纤益心方中、高剂量组及卡托普利组大鼠 PPAR γ 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)；与卡托普利组比较，抗纤益心方中、高剂量组 β -catenin 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)，PPAR γ 蛋白表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；与抗纤益心方低剂量组比较，抗纤益心方高剂量组 β -catenin 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)；抗纤益心方高剂量组与抗纤益心方中剂量组 β -catenin 及 PPAR γ 蛋白表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 4 各组大鼠心肌 β -catenin、PPAR γ 蛋白表达

		(灰度值, $\bar{x} \pm s$)	
组别	鼠数	β -catenin	PPAR γ
正常组	4	1.03 $\pm$ 0.03	1.03 $\pm$ 0.03
模型组	4	1.93 $\pm$ 0.22 ^{a)}	0.53 $\pm$ 0.15 ^{a)}
抗纤益心方低剂量组	4	1.58 $\pm$ 0.48	0.66 $\pm$ 0.34
抗纤益心方中剂量组	4	1.50 $\pm$ 0.42 ^{c)}	0.86 $\pm$ 0.19 ^{b)}
抗纤益心方高剂量组	4	1.23 $\pm$ 0.30 ^{b) c) d)}	0.97 $\pm$ 0.05 ^{b)}
卡托普利组	4	1.97 $\pm$ 0.29	0.93 $\pm$ 0.07 ^{b)}

注： β -catenin， β 连环蛋白；PPAR γ ，过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 。

a) 与正常组比较， $P < 0.05$ ；b) 与模型组比较， $P < 0.05$ ；c) 与卡托普利组比较， $P < 0.05$ ；d) 与抗纤益心方低剂量组比较， $P < 0.05$ 。



注： β -catenin， β 连环蛋白；PPAR γ ，过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 。

图 4 各组大鼠心肌组织 β -catenin 及 PPAR γ 蛋白表达电泳图

3 讨论

DCM 为本虚标实之证，本虚为宗气亏虚，标实则主要有瘀血、痰饮、水湿等，其中“宗气下陷”是核心病机^[10-11]。宗气功能失调存在于 DCM 发病的各个时期。DCM 发病之初症状并不明显，盖因宗气亏虚尚能代偿；日久出现宗气下陷，此时心力衰竭症状逐渐加重，如疲乏无力、胸闷气短及呼吸困难等；后期多出现多脏腑功能失调的情况，病情危重，病机复杂。抗纤益心方中红参、黄芪补益宗气，茯苓、白术、升麻健脾升陷，丹参、泽兰、益母草活血利水，麦冬节制诸药燥热之性。全方以补益宗气为本，兼顾活血利水治标，具有补益而不壅滞、活血而不伤正、利水而不伤阴的特点。在前期临床研究^[12]中我们发现抗纤益心方能改善 DCM 患者证候学指标，改善心功能，缩小 LVEDD，提高 LVEF。

心肌纤维化的主要病理特征包括在细胞外基质中成纤维细胞过度增殖及分化，胶原纤维过量沉积以及各型胶原比例改变等。心肌纤维化可使心肌顺应性降低，心肌收缩舒张功能障碍，心脏电生理结构改变并导致心室重构，最终发展为心力衰竭^[13]。研究证实，多种中药及中药复方可通过抑制心肌纤维化发展治疗心力衰竭^[14-16]。在 DCM 病情发展过程中，心肌纤维化起到了至关重要的作用^[17]。I 型胶原是心肌间质网络的主要成分，病理性心肌重塑时，I 型胶原过度增多是引起心功能由代偿转向失代偿及心力衰竭的重要原因之一^[18]。 α -SMA 是存在于胞浆中的一种细胞骨架蛋白，是成纤维细胞转分化为肌成纤维细胞的特异性标志物。 β -catenin/PPAR γ 是多种组织纤维化的关键通路^[19]。研究^[20]表明， β -catenin 与 PPAR γ 能够相互作用， β -catenin 的降解能够激活下游 PPAR γ ，阻止成纤维细胞向肌成纤维细胞的转分化，从而改

善心肌纤维化水平。前期研究^[21]结果显示,抗纤益心方能够降低心肌转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 表达,从而改善心肌纤维化。 β -catenin 是 Wnt 信号通路的关键蛋白之一,组织纤维化与 β -catenin 信号转导密切相关^[22]。相关研究^[23]显示,益气活血方能够通过调控 Wnt/ β -catenin 相关因子来延缓慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化进程。PPAR γ 是核受体转录因子超家族成员之一,参与脂质代谢、细胞凋亡等多种生理功能。PPAR γ 的激活能够改善血管紧张素 II 诱导的心肌纤维化^[24]。卡托普利是目前被证实能够改善心肌纤维化的代表药物^[25],也是临床中治疗 DCM 的基石药物,因此本实验选择卡托普利作为西药对照药物。

本实验研究表明,抗纤益心方能够抑制心肌间质胶原纤维沉积,明显降低 α -SMA、I 型胶原的表达,从而改善 DCM 大鼠心室重构及心功能,这与我们既往研究结论^[26]相符。同时在本研究中我们发现, β -catenin/PPAR γ 信号通路参与 DCM 大鼠心肌纤维化的过程,而抗纤益心方能够抑制 DCM 大鼠 β -catenin 蛋白及 mRNA 的表达,激活 PPAR γ 蛋白及 mRNA 的表达。 β -catenin 基因及蛋白表达水平随抗纤益心方剂量的增加均有不同程度降低,抗纤益心方高剂量组效果更佳;PPAR γ 基因及蛋白表达水平随抗纤益心方剂量的增加明显升高,抗纤益心方中、高剂量组效果更佳。以上结果提示抗纤益心方改善 DCM 大鼠心肌纤维化可能与 β -catenin/PPAR γ 信号通路有关,但其具体作用机制仍有待进一步探讨。

本研究通过在体实验观察了抗纤益心方对 DCM 大鼠心肌纤维化的抑制作用及对 DCM 大鼠心肌组织 β -catenin/PPAR γ 信号通路的影响,但并未能直接验证两者间具体的调控关系。下一步将运用 β -catenin 相关抑制剂,通过细胞实验进一步阐明抗纤益心方通过调控 β -catenin/PPAR γ 信号通路对 DCM 大鼠心肌纤维化的可能作用机制。

参考文献

- [1] BOZKURT B, COLVIN M, COOK J, et al. Current diagnostic and treatment strategies for specific dilated cardiomyopathies: a scientific statement from the american heart association [J]. Circulation, 2016, 134(23): 753-756.
- [2] GULATI A, JABBOUR A, ISMAIL TF, et al. Association of fibrosis with mortality and sudden cardiac death in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy [J]. JAMA, 2013, 309(9): 896-908.
- [3] MOORE T, GUIMARAES N, YUTZEY KE, et al. Cardiac fibroblasts: from development to heart failure [J]. J Mol Med, 2015, 93(8): 823-830.
- [4] 王振涛,刘舜禹,柴松波,等. 抗纤益心方治疗扩张型心肌病的队列研究 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(2): 378-380.
- [5] SONG LL, ZHANG Y, ZHANG XR, et al. Theacrine attenuates myocardial fibrosis after myocardial infarction via the SIRT3/ β -catenin/PPAR γ pathway in estrogen-deficient mice [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(12): 5477-5486.
- [6] 柴松波,王振涛,张淑娟,等. 抗纤益心方对扩张型心肌病大鼠内质网应激 CHOP 通路的影响 [J]. 中药药理与临床, 2019, 35(2): 128-134.
- [7] 李竹. 呋喃唑酮诱发大鼠扩张型心肌病胶原重塑的研究 [J]. 遵义: 遵义医学院, 2016.
- [8] 江德勤,田杰,白永虹,等. 彩色超声心动图监测大鼠心肌病模型的建立 [J]. 中国超声医学杂志, 2005, 21(8): 567-569.
- [9] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [10] 陆曙,沈丽娟,任春,等. 扩张型心肌病患者中医证素与抗心肌抗体的相关性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18): 152-156.
- [11] 陈兴娟,戴洪,尹萌萌,等. 浅述扩张型心肌病的中医辨治研究进展 [J]. 四川中医, 2014, 32(8): 181-184.
- [12] 曾垂义,王振涛,陈磊. 抗纤益心方对扩张型心肌病患者心脏超声指标的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(1): 109-111.
- [13] 李高,赖应龙. 心肌纤维化相关生物标志物的研究进展 [J]. 中华心血管病杂志, 2018, 46(7): 584-587.
- [14] 程彦玲,谢世阳,王小晓,等. 参附益心颗粒对心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响 [J]. 中医杂志, 2020, 61(1): 68-73.
- [15] 高鹏荣,张建,刘俊杰,等. 芪参颗粒对心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响 [J]. 中医杂志, 2019, 60(13): 1152-1157.
- [16] 刘甜甜,王擎擎,姚魁武. 活血温通方对心肌缺血模型大鼠心肌组织 Sirt1 信号通路的影响 [J]. 中医杂志, 2020, 61(9): 804-809.
- [17] 吕仕超,张军平. 以心肌纤维化为病理基础的心系疾病证候差异 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(1): 83-85.
- [18] 于瑞,王幼平,崔琳,等. 心肌纤维化的发病机制及其研究进展 [J]. 中国现代医生, 2015, 53(13): 157-160.
- [19] SABATINO L, PANCIONE M, VOTINO C, et al. Emerging role of the beta-catenin-PPAR gamma axis in the pathogenesis of colorectal cancer [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(23): 7137-7151.
- [20] AKHMETSHINA A, PALUMBO K, DEES C, et al.

Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- β -mediated fibrosis [J]. Nat Commun, 2012, 3: 735 - 736. doi: 10.1038/ncomms1734.

- [1] 王振涛, 韩丽华, 惠玲, 等. 抗纤益心方对扩张型心脏病大鼠心肌 TGF- β 1 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1430 - 1431.
- [2] TAN RJ, ZHOU D, ZHOU L, et al. Wnt/beta-catenin signaling and kidney fibrosis [J]. Kidney Int Suppl (2011), 2014, 4(1): 84 - 90.
- [3] 方子寒, 谢盈彧, 王铭扬, 等. 益气活血方对慢性心力衰竭大鼠心室重构的干预作用及其机制 [J]. 中国实

验方剂学杂志, 2020, 26(4): 82 - 87.

- [4] MUKOHDA M. Role of PPAR gamma, a transcription factor in cardiovascular disease [J]. Nihon Yakurigaku Zasshi, 2019, 154(2): 56 - 60.
- [5] BRILLA CG, MATSUBARA LS, WEBER KT. Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism [J]. J Mol Cell Cardiol, 1993, 25(5): 563 - 575.
- [6] 王振涛, 韩丽华, 柴松波, 等. 抗纤益心方对扩张型心脏病心力衰竭大鼠心肌基质金属蛋白酶-1 及其抑制剂表达的影响 [J]. 中医杂志, 2011, 52(16): 1406 - 1408.

Effects of *Kangxian Yixin Recipe* (抗纤益心方) on Myocardial Fibrosis Related Factors and β -catenin/PPAR γ Signaling Pathway in Myocardial Tissue of Dilated Cardiomyopathy Model Rats

LIU Shunyu¹, LI Qiaozhi¹, RUI Haomiao², WANG Zhentao², CHANG Hongbo¹, GUO Zongyao¹, WU Hong¹

1. The Second Clinical Medical College of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, 450046; 2. Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT **Objectives** To investigate the effects and possible mechanism of *Kangxian Yixin Recipe* (抗纤益心方) on myocardial fibrosis in dilated cardiomyopathy (DCM). **Methods** Totally 100 rats were randomly divided into normal group (8 rats) and model making group (92 rats). The DCM model was established by drinking the solution of furazolidone aqueous autonomously. Forty successful modeling rats were further randomly divided into model group, captopril group, *Kangxian Yixin Recipe* low, medium and high dose groups, with eight rats in each group. *Kangxian Yixin Recipe* low, medium and high dose group rats were administered with *Kangxian Yixin Recipe* by gavage at a dose of 0.9 g/(kg·d), 1.8 g/(kg·d), and 3.6 g/(kg·d), respectively; captopril 10.13 mg/(kg·d) by gavage was given to captopril group, while normal saline 5.3 ml/(kg·d) by gavage was given to the normal group and model group. After four weeks, the left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD), left ventricular end-systolic diameter (LVESD), left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular fractional shortening (LVFS) levels were detected; the pathological changes of myocardial tissues was assessed; the protein and mRNA expression of α -smooth muscle actin (α -SMA), type I collagen, β -catenin and peroxisome proliferators-activated receptor γ (PPAR γ) were determined. **Results** Compared to the normal group, LVEDD and LVESD levels in the model group significantly increased, while LVEF and LVFS levels decreased ($P < 0.05$); the myocardial pathological damage was aggravating; the protein and mRNA expression of α -SMA, type I collagen and β -catenin increased, while the expression of PPAR γ protein and mRNA decreased ($P < 0.05$). Compared to the model group, the LVEDD and LVESD levels were reduced, the LVEF and LVFS levels increased; the degree of myocardial pathologic fibrosis and the protein expression of α -SMA and type I collagen decreased in *Kangxian Yixin Recipe* medium and high dose groups and captopril group ($P < 0.05$); the expression of β -catenin protein and mRNA significantly decreased, while the expression of PPAR γ protein and mRNA increased in *Kangxian Yixin Recipe* medium and high dose groups ($P < 0.05$). Compared to captopril group, *Kangxian Yixin Recipe* medium and high dose groups had lower expression levels of β -catenin protein and mRNA ($P < 0.05$), while no significant differences were found in LVEDD, LVESD, LVED, LVFS levels, and the protein and mRNA expression of type I collagen and PPAR γ ($P > 0.05$). Compared to *Kangxian Yixin Recipe* low dose group, there were lower LVEDD and LVESD levels, higher LVEF, LVFS levels and PPAR γ mRNA expression in the medium and high dose groups, as well as lower expression of type I collagen protein in the high dose group ($P < 0.05$). The comparison between *Kangxian Yixin Recipe* medium dose and high dose group was not significantly different in all indicators ($P > 0.05$). **Conclusion** *Kangxian Yixin Recipe* can effectively improve the cardiac function of DCM rats, and inhibit ventricular remodeling and myocardial fibrosis; and the effect is better with medium and high doses. The mechanism may be related to the regulation of β -catenin/PPAR γ pathway expression. **Keywords** dilated cardiomyopathy; myocardial fibrosis; *Kangxian Yixin Recipe* (抗纤益心方); β -catenin; peroxisome proliferators-activated receptor γ

(收稿日期: 2020-08-04; 修回日期: 2020-09-26)

编辑: 王利芬