

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.01.015

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

程彦玲, 谢世阳*, 王小晓, 崔琳, 刘素晓, 李彬, 朱明军

河南中医药大学第一附属医院, 河南省郑州市人民路 19 号, 450000

摘要 目的 观察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及可能作用机制。方法 采用结扎大鼠左冠状动脉前降支的方法制备心肌梗死模型, 将造模成功的 32 只 SD 大鼠随机分为模型组、参附常用量组、参附高剂量组、氯沙坦组, 另设只穿线不结扎的假手术组, 均每组 8 只。参附常用量组和参附高剂量组分别给予参附益心颗粒 1.76、8.8 g/(kg·d) 灌胃, 氯沙坦组给予氯沙坦片 10 mg/(kg·d) 灌胃, 假手术组和模型组给予蒸馏水 1 ml/(100 g·d) 灌胃。4 周后超声心动图评价各组大鼠心脏功能, 并计算左室重量指数 (LVWI); Masson 染色法及羟脯氨酸测定法测定心肌组织胶原蛋白分布及含量; Western blot 法确定心肌组织转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、Smad 2、Smad 3 的蛋白表达量; RT-PCR 法检测微小 RNA-21 (miR-21) 和转化生长因子 β III 型受体 (TGF- β III) mRNA 的表达水平。结果 与模型组比较, 参附常用量组、参附高剂量组、氯沙坦组左室收缩末内径 (LVESD) 减小、左室射血分数 (LVEF) 和左室短轴缩短率 (LVFS) 升高, LVWI 和胶原蛋白含量下降, 同时心肌组织 TGF- $\beta 1$ 、Smad 3 蛋白表达量和 miR-21 的 mRNA 表达水平降低, TGF- β III mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与参附常用量组比较, 参附高剂量组 LVESD 减小、LVEF、LVFS 和心肌组织 TGF- β III mRNA 表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 参附益心颗粒可改善心力衰竭大鼠心肌纤维化, 抑制心室重构, 提高心脏功能, 其作用机制可能与调控 miR-21 从而抑制 TGF- $\beta 1$ /Smads 信号通路的过度激活有关。

关键词 心力衰竭; 心肌纤维化; 参附益心颗粒; TGF- $\beta 1$ /Smads 信号通路; 微小 RNA-21

《中国心血管病报告 2017》^[1] 指出, 我国心力衰竭患病率随着年龄增加显著上升, 而心力衰竭死亡率则呈逐年下降趋势。药物治疗心力衰竭近 20 多年来并未有重大突破, 因此, 积极寻找治疗心力衰竭的有效方剂 (或药物) 及新的作用靶点仍然是当前心力衰竭防治领域的重大课题。参附益心颗粒 (原名心力衰竭康) 是孙建芝教授针对气虚血瘀、阳虚水泛型心力衰竭患者而设, 临床效果显著^[2]。对该药进行的基础研究明确了其能通过不同途径发挥抗心力衰竭的作用^[3-4]。微小 RNA-21 (miR-21) 主要在心肌成纤维细胞中表达, 在心力衰竭、缺血缺氧等条件下显著升高, 受其调控的靶基因很多, 目前研究较多的有转化生长因子 β III 型受体 (TGF- β III)、蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTEN)、

软脂酰化磷蛋白 1 (Spry1) 等。研究^[5-6]发现, miR-21 能够通过不同途径导致心肌纤维化而加剧心力衰竭的发展。本研究通过对心力衰竭大鼠心脏的结构和功能、转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) / Smads 信号通路、miR-21 及其靶向调控分子的观察, 以阐明参附益心颗粒对心力衰竭后心肌纤维化的抑制作用, 并进一步探讨发挥该作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级健康 SD 雄性大鼠 68 只, 体重 (220 ± 10) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物许可证编号: SCXK (京) 2016-0011。

1.2 药物与试剂

参附益心颗粒浸膏 (1 g 浸膏 ≈ 9.5 g 生药, 批号: 131101), 山东步长制药有限公司提供, 由人参 6 g、炮附片 10 g、桂枝 12 g、丹参 20 g、赤芍

基金项目: 国家自然科学基金 (81603466, 81503419, 81703897, 81373853); 河南省创新型科技团队 (C20130050)

* 通讯作者: xieshiyang0102@163.com, (0371) 66258169

15 g、益母草 30 g、猪苓 15 g、泽泻 15 g、车前子 15 g、砂仁 10 g、大枣 12 g 等组成; 氯沙坦片 (批号: M046996), 杭州默沙东制药有限公司。10% 水合氯醛 (批号: 20160207), 郑州派尼化学试剂厂; 多聚甲醛 (批号: 20170317)、Masson 染色试剂盒 (批号: 20180804)、羟脯氨酸 (HYP) 含量检测试剂盒 (批号: 20180116)、Bradford 蛋白定量试剂盒 (批号: 20170115)、Super ECL Plus 超敏发光液 (批号: 20170811), 北京索莱宝科技有限公司; 小鼠多克隆 TGF- β 1 抗体 (批号: ab92486)、Smad 2 抗体 (批号: ab40855)、Smad 3 抗体 (批号: ab40854)、小鼠单克隆 β -actin 抗体 (批号: ab8226), 美国 Abcam 公司; 总 RNA 提取试剂 Trizol (批号: 15596026), 美国 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒 (批号: R211)、荧光定量 PCR 检测试剂盒 (批号: Q711), 南京诺唯赞生物公司; miRcute miRNA 提取分离试剂盒 (批号: DP501)、miRcute 增强型 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒 (批号: KR211)、miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒 (批号: PF411), 天根生化科技 (北京) 有限公司。

1.3 仪器

Vivid E9 型彩色多普勒超声诊断仪 (挪威 GE 公司); BIOFUGE STRATOS 型低温离心机 (德国 Heraeus 公司); RM2245 型轮转式石蜡切片机 (德国徕卡公司); TK-218 型恒温摊片烤片机 (湖北泰维医疗科技有限责任公司); TB-718E 型生物组织自动包埋机 (湖北泰维医疗科技有限责任公司); SPECTRAMXM3 型多功能读板机 (美国 MD 公司); Power Pac HC 型蛋白质电泳与转膜装置 (美国 Bio-Rad 公司); 7300 型荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo 公司)。

1.4 心力衰竭模型制备

采用随机数字表法将 68 只大鼠分为假手术组 (8 只) 和心肌梗死组 (60 只), 心肌梗死组大鼠采取结扎左冠状动脉前降支的方法制备心肌梗死模型, 具体手术过程参照课题组前期研究^[4], 假手术组大鼠在冠状动脉前降支下只穿线不结扎, 其余操作相同。将模型制备术后存活的 41 只大鼠返笼继续饲养 4 周, 期间自由饮食、饮水, 4 周后利用超声评价心肌梗死组大鼠的左心功能, 其中左室射血分数 (LVEF) <50% 者判定为心力衰竭模型制备成功^[5]。

1.5 动物分组与给药

造模成功的 32 只大鼠采用随机数字表法分为模型组、参附常用量组、参附高剂量组和氯沙坦组, 每组 8 只。参附益心颗粒临床成人常用量为 3.42 g/(kg·d), 根据文献 [6] 方法, 换算成大鼠等效剂量为生药 16.75 g/(kg·d), 按照 1 g 浸膏 $\approx$ 9.5 g 生药计算, 参附常用量组给予参附益心颗粒浸膏 1.76 g/(kg·d) 灌胃; 参附益气颗粒高剂量取常用剂量的 5 倍, 即参附高剂量组给予参附益心颗粒浸膏 8.8 g/(kg·d) 灌胃; 氯沙坦组给予氯沙坦片 10 mg/(kg·d) 灌胃。各药物干预组给药前将药物充分溶解于蒸馏水中, 分别配成浓度为 0.176 g/ml、0.88 g/ml 和 1 mg/ml 的混悬液, 假手术组和模型组给予蒸馏水, 各组均按照 1 ml/(100 g·d) 灌胃, 每天 1 次, 连续 4 周。

1.6 观察指标及检测方法

1.6.1 心脏功能及左室重量指数测量 大鼠称重, 10% 水合氯醛 (200 mg/kg) 腹腔麻醉, 利用心脏超声测量室间隔厚度 (IVS)、左室收缩末内径 (LVESD)、左室舒张末期内径 (LVEDD), 计算 LVEF 和左室短轴缩短率 (LVFS)。随后处死大鼠, 迅速取出心脏, 除去心包膜、心房及右室组织, 将缺血危险区心肌组织分别置于 -80℃ 冰箱和 4% 多聚甲醛中备用。取左室称重, 计算左室重量指数 (LVWI) (%) = 左室重量 (mg) / 体重 (g)。

1.6.2 心肌组织胶原蛋白分布及含量测定 采用 Masson 染色法。首先在左心室同一部位剪取厚度约 2 mm 心肌组织, 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋组织切片, 染色步骤严格按照试剂盒说明书操作。然后利用羟脯氨酸测定法确定胶原蛋白含量: 1) 取 0.2 g 心肌组织置于玻璃管中, 加组织提取液水解, 16000 r/min 25℃ 离心 (离心半径 10.7 cm) 20 min 后, 取上清液待测。2) 将待测样品与检测试剂混匀后, 在 560 nm 处测各孔吸光度值 (A560)。3) 羟脯氨酸含量 (mg/g) = $0.308 \times (A560 - 0.0251) / \text{样本质量}$ 。根据羟脯氨酸含量占胶原蛋白的 13% 推算胶原蛋白含量。

1.6.3 心肌组织 TGF- β 1/Smads 通路相关蛋白检测 取心肌组织匀浆, 12000 r/min 4℃ 离心 (离心半径 10.7 cm) 15 min 后取上清液, 用 Bradford 法测定蛋白浓度。以 50 μ g 上样量进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 半干转法转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入一抗 (TGF- β 1、Smad 2、Smad 3 均为 1 : 800, β -actin 为 1 : 10000) 4℃ 孵育过夜, 加

入 1 : 2500 稀释的 HRP 标记的二抗, 37℃ 孵育 1 h, ECL 化学发光法显色。蛋白条带经 Image J V1.8.0 图像分析软件进行分析, 蛋白表达水平以目的蛋白条带 IOD 值/内参 β -actin 的 IOD 值表示。

1.6.4 心肌组织 miR-21 及 TGF- β R III mRNA 表达 分别采用 miRNA 提取试剂盒及 Trizol 法提取心肌组织中总 miRNA 和总 mRNA, 逆转录并进行 RT-PCR。引物序列: TGF- β R III: 上游: CTACTCCACACAGGGGAGA, 下游: GCTAGAGCAGGGGTACTCT, 扩增片段为 118 bp; GAPDH: 上游: ACAGCAA-CAGGGTGGTGGAC, 下游: TTTGAGGGTGCAGCGA ACTT, 扩增片段为 251 bp; miR-21: 上游: CAA-CAGCAGTCGATGGGCTGTC; 下游: AACGCTTCA-CGAATTTGCGT, 扩增片段为 94 bp。RT-PCR 条件为: 95℃、5 min 预变性, 95℃、30 s 变性, 60℃、1 min 退火延伸, 反应循环 40 次。采集荧光信号制作溶解曲线, 目的基因的相对表达率采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析及 Tukey 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心脏超声结果及 LVWI 比较

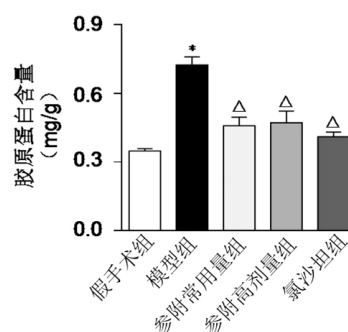
表 1 示, 与假手术组比较, 模型组 LVESD、LVESD、LVWI 升高, IVS、LVEF 和 LVFS 值明显降低, 差异具有统计学意义 (P < 0.01); 与模型组比较, 氯沙坦组和参附高剂量组 LVESD、LVESD、LVWI 明显降低, IVS、LVEF 和 LVFS 值均明显升高, 参附常用量组 LVESD、LVWI 明显降低, LVEF 和 LVFS 均显著提高 (P < 0.05 或 P < 0.01); 与氯沙坦组比较, 参附常用量组 LVESD、LVESD 和 LVWI 升高, IVS、LVEF 和 LVFS 明显降低, 参附高剂量组 LVESD、LVESD 和 LVWI 升高,

LVEF 明显降低 (P < 0.05 或 P < 0.01); 与参附常用量组比较, 参附高剂量组 IVS、LVEF 和 LVFS 明显升高, LVESD 明显降低 (P < 0.05 或 P < 0.01)。

2.2 各组大鼠心肌组织胶原蛋白分布和含量比较

假手术组心肌细胞排列成束、结构完整, 胶原纤维着色不明显。模型组可见心肌细胞数量明显减少、排列紊乱, 梗死和非梗死心肌多混杂, 胶原纤维明显增多, 网络结构破坏。参附常用量组和参附高剂量组胶原蛋白有不同程度的增多, 横切面上胶原纤维膜有不完整现象。氯沙坦组胶原蛋白增多但网络结构尚存, 心肌细胞排列整齐, 未见明显瘢痕组织。从形态上看, 各药物干预组比模型组均有所改善。

胶原蛋白定量结果 (图 1) 显示, 模型组胶原蛋白含量较假手术组明显增高 (P < 0.01); 与模型组比较, 氯沙坦组及参附常用量组、参附高剂量组胶原蛋白含量均明显降低 (P < 0.01); 与氯沙坦组比较, 参附常用量组、参附高剂量组中胶原蛋白含量差异无统计学意义 (P > 0.05); 参附常用量组与参附高剂量组心肌胶原蛋白含量比较差异无统计学意义 (P > 0.05)。



注: 与假手术组比较, * P < 0.01; 与模型组比较, Δ P < 0.01

图 1 各组大鼠心肌组织胶原蛋白含量比较

2.3 各组大鼠心肌组织 TGF- β 1、Smad 2、Smad 3 蛋白表达比较

图 2 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌

表 1 各组大鼠心脏超声结果及 LVWI 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IVS (mm)	LVESD (mm)	LVEDD (mm)	LVFS (%)	LVEF (%)	LVWI (%)
假手术组	8	3.41 $\pm$ 0.32	3.39 $\pm$ 0.71	7.15 $\pm$ 0.89	52.39 $\pm$ 8.21	81.55 $\pm$ 7.52	1.85 $\pm$ 0.14
模型组	8	1.51 $\pm$ 0.79*	8.75 $\pm$ 0.52*	10.07 $\pm$ 0.72*	15.66 $\pm$ 6.09*	31.90 $\pm$ 12.88*	2.11 $\pm$ 0.11*
氯沙坦组	8	3.06 $\pm$ 0.44 $\Delta\Delta$	4.96 $\pm$ 0.84 $\Delta\Delta$	7.67 $\pm$ 1.20 $\Delta\Delta$	35.37 $\pm$ 3.34 $\Delta\Delta$	62.98 $\pm$ 4.58 $\Delta\Delta$	1.78 $\pm$ 0.12 $\Delta\Delta$
参附常用量组	8	1.91 $\pm$ 0.97 $\Delta\Delta$	7.58 $\pm$ 0.96 $\Delta\Delta\Delta$	9.74 $\pm$ 0.82 $\Delta\Delta$	22.42 $\pm$ 3.80 $\Delta\Delta\Delta$	42.94 $\pm$ 6.41 $\Delta\Delta\Delta$	1.96 $\pm$ 0.15 $\Delta\Delta\Delta$
参附高剂量组	8	2.97 $\pm$ 0.66 $\Delta\Delta\Delta$	6.31 $\pm$ 1.33 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	8.85 $\pm$ 1.01 $\Delta\Delta$	29.32 $\pm$ 8.03 $\Delta\Delta\Delta$	53.45 $\pm$ 12.24 $\Delta\Delta\Delta$	1.97 $\pm$ 0.10 $\Delta\Delta\Delta$

注: IVS, 室间隔厚度; LVESD, 左室收缩末内径; LVEDD, 左室舒张末期内径; LVEF, 左室射血分数; LVFS, 左室短轴缩短率; LVWI, 左室重量指数; 与假手术组比较, * P < 0.01; 与模型组比较, Δ P < 0.05, $\Delta\Delta$ P < 0.01; 与氯沙坦组比较, $\Delta\Delta$ P < 0.05, $\Delta\Delta\Delta$ P < 0.01; 与参附常用量组比较, $\Delta\Delta$ P < 0.05, $\Delta\Delta\Delta$ P < 0.01

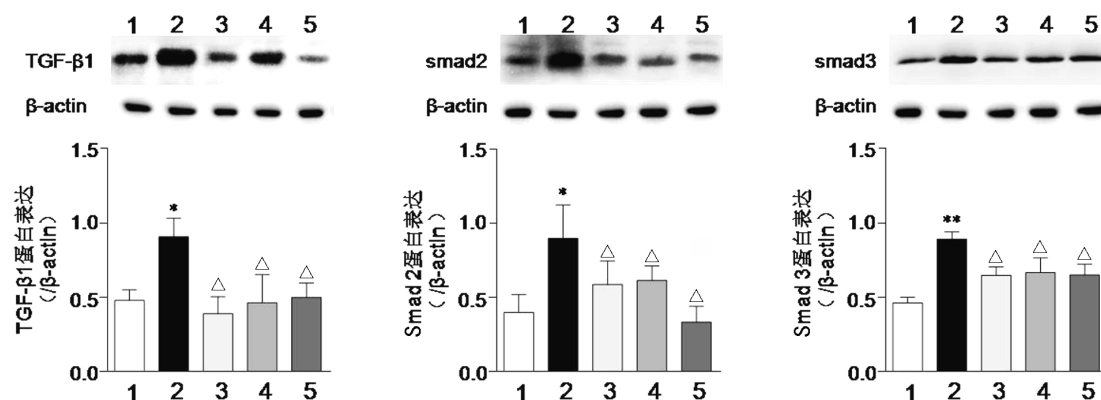


图2 各组大鼠心肌组织 TGF-β1、Smad 2 和 Smad 3 蛋白表达比较及电泳图

注: TGF-β1, 转化生长因子 β1; 1, 假手术组; 2, 模型组; 3, 参附常用量组; 4, 参附高剂量组; 5, 氯沙坦组; 与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, Δ $P < 0.05$

TGF-β1、Smad 2 和 Smad 3 的蛋白表达量明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 氯沙坦组、参附常用量组、参附高剂量组 TGF-β1、Smad 2 和 Smad 3 的蛋白表达量均明显下降 ($P < 0.05$); 与氯沙坦组比较, 参附常用量、参附高剂量组 TGF-β1、Smad 2、Smad 3 蛋白表达量差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 参附常用量组与参附高剂量组 TGF-β1、Smad 2、Smad 3 蛋白表达量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 各组大鼠心肌组织 miR-21 及 TGF-βR III mRNA 表达比较

表 2 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌组织 miR-21 表达量升高, TGF-βR III mRNA 表达量减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 氯沙坦组、参附常用量组、参附高剂量组 miR-21 的表达量降低, TGF-βR III mRNA 表达量明显增高 ($P < 0.01$); 与氯沙坦组比较, 参附常用量组 miR-21 表达升高 ($P < 0.05$), 参附高剂量组 miR-21 和 TGF-β R III RNA 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 与参附常用量组比较, 参附高剂量组 TGF-βR III mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠心肌组织 miR-21、TGF-βR III mRNA 表达比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	miR-21	TGF-βR III
假手术组	8	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.20
模型组	8	3.70 ± 0.74*	0.29 ± 0.03*
氯沙坦组	8	1.27 ± 0.32Δ	0.81 ± 0.23Δ
参附常用量组	8	1.76 ± 0.39Δ▲	0.66 ± 0.21Δ
参附高剂量组	8	1.45 ± 0.53Δ	0.91 ± 0.25Δ#

注: miR-21, 微小 RNA-21; TGF-βR III, 转化生长因子 β III 型受体; 与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, Δ $P < 0.01$; 与氯沙坦组比较, ▲ $P < 0.05$; 与参附常用量组比较, # $P < 0.05$

3 讨论

中医学认为, 心力衰竭的发生多由于外邪入侵、饮食偏嗜、情志所伤、先天不足、年老体衰等因素, 久之影响及心, 致心气衰弱, 气不行血, 血不利则为水, 瘀水互结, 损及心阳、心阴, 气血衰败, 发展为心力衰竭。心力衰竭的病位在心, 病变脏腑涉及肺、肝、脾、肾。病机为本虚标实, 本虚为气虚、阳虚, 标实为血瘀、水湿、痰饮, 标本俱病, 虚实夹杂, 贯穿于心力衰竭病程始终。综上所述, 心力衰竭的中医证候主要为气虚血瘀、阳虚水停, 故益气温阳、活血利水为其基本治法。参附益心颗粒具有益气温阳、活血利水的功效, 方中人参益气, 附子、桂枝温肾阳、通心脉, 丹参、赤芍、益母草活血化瘀利水, 猪苓、泽泻、车前子化湿利水、泻肺逐饮, 砂仁、大枣健脾利湿、温补中焦, 全方标本兼顾, 扶正不滞邪, 利水不伤阴。

心肌纤维化可引起心肌僵硬升高, 左室顺应性下降, 舒张末压增高, 最终导致心脏收缩和/或舒张功能发生障碍^[4]。纤维化过程涉及多种调控因子, 其中 TGF-β1 是最重要的促纤维化生长因子之一, 当其与受体结合后, 可激活 Smad 2、Smad 3, 并进一步转移到核内, 上调与细胞外基质合成相关的基因表达, 促进 ECM 的沉积, 并能够介导成纤维细胞的转化, 诱导胶原蛋白和纤维连接蛋白的合成, 从而促进纤维化的进展^[1-12]。本研究观察到模型组大鼠心肌胶原网络紊乱、含量增加, 提示心力衰竭后心肌纤维化程度加重, 同时 TGF-β1/Smads 信号通路明显被激活, 以上改变与既往报道^[3]一致, 符合大鼠心力衰竭后心肌病理变化特点。

研究^[4-13]发现, 多种 miRNA 在不同原因所致

的心肌损伤后都存在明显的异常表达,并通过不同途径对心肌细胞的凋亡、肥大、肌成纤维细胞的增殖以及细胞外基质代谢进行调控。在众多 miRNA 中,miR-21 已被充分证明是导致心力衰竭发展的一个重要调节因子。miR-21 能够通过沉默靶蛋白 TGF- β R III 的基因表达,激活 TGF- β 1/Smads 通路及基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 的蛋白表达量,促进肌成纤维细胞分化并大量分泌胶原纤维参与心肌纤维化的进程^[6-17]。本研究结果显示,模型组中 miR-21 和 TGF- β R III 的 mRNA 均表达异常,再次表明 miR-21 参与心力衰竭时的病理变化。另外,参附益心颗粒及氯沙坦片对 miR-21 具有明显的抑制作用。miR-21 表达降低,则对其靶基因 TGF- β R III 的沉默作用减弱,使 TGF- β R III 的表达相对增多,而 TGF- β R III 能够调节 TGF- β 1 与 TGF- β I 型受体 (TGF- β R I)、TGF- β II 型受体 (TGF- β R II) 的结合以及下游信号的转导^[18],故各药物干预组中 TGF- β 1 和 Smad 3 的蛋白表达量均下降。

胶原蛋白代谢失衡是导致心肌纤维化发生的主要原因,如胶原蛋白分泌过多或降解不足所导致的含量增加、胶原蛋白成分 (主要是 I 型和 III 型胶原) 比例失调,以及正常胶原被降解并被缺乏连接结构的纤维性结构所取代等,纤维化的发生导致心室硬度的增加与心功能不全的加重,而纤维化的减少则产生相反的、有益的影响^[19-20]。本研究结果显示,参附益心颗粒及氯沙坦片干预后,大鼠心肌胶原蛋白含量降低、LVEF 及 LVFS 升高,可见参附益心颗粒和氯沙坦片具有抑制心肌纤维化、提高心功能的作用,而参附益心颗粒在对心功能的改善方面显示出明显的剂量依赖性,表明参附益心颗粒抑制纤维化是其提高心功能的途径之一,随着剂量的增加,可能有其他的途径参与其中。

本研究虽然观察了参附益心颗粒对心肌纤维化的抑制作用,同时观察了参附益心颗粒对心力衰竭大鼠心肌中 TGF- β 1/Smads 信号通路相关蛋白及 miR-21 表达的影响,但对两者之间的关系并未进行直接验证。下一步将通过离体细胞实验,通过运用 miR-21 阻断剂,进一步阐明参附益心颗粒通过 miR-21 靶向调节 TGF- β 1/Smads 信号通路,从而抑制心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌纤维化的作用机制。

综上所述,心肌纤维化是心力衰竭时最重要的病理改变,能同时影响心脏的收缩和舒张功能,导致心力衰竭的进展。参附益心颗粒具有显著的抑制心肌纤维化的作用,这可能是其改善心力衰竭的主

要途径之一。miR-21 参与以上病理过程,并可能是参附益心颗粒调控的重要靶点。

参考文献

- [1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2017》概要 [J]. 中国循环杂志,2018,33(1):1-8.
- [2] 晋献春,孙建芝,朱明军,等.心力衰竭康治疗充血性心力衰竭的临床研究 [J]. 中国中医药科技,1997,4(5):266-268.
- [3] 王永霞,张群生,任红杰,等.参附益心颗粒对慢性心力衰竭大鼠血浆与心肌血管紧张素 II 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(21):226-229.
- [4] 谢世阳,王幼平,王小晓,等.参附益心颗粒对心力衰竭大鼠心肌 ATP 含量及解偶联蛋白-2 的影响 [J]. 中华中医药杂志,2017,32(10):4412-4415.
- [5] MOON JC, TREIBEL TA, SCHELBERT EB. Myocardial fibrosis in hypertensive heart failure: does quality rather than quantity matter? [J]. J Am Coll Cardiol, 2016, 67(3):261-263.
- [6] ROY S, KHANNA S, HUSSAIN SR, et al. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue [J]. Cardiovasc Res, 2009, 82(1):21-29.
- [7] 谢世阳,王幼平,李彬,等.加参方对急性心肌梗死模型大鼠心肌组织单核-巨噬细胞及血管细胞黏附分子 1 表达的影响 [J]. 中医杂志,2016,57(12):1065-1068.
- [8] CHEN A, LI M, SONG L, et al. Effects of the galanin receptor antagonist M40 on cardiac function and remodeling in rats with heart failure [J]. Cardiovasc Ther, 2015, 33(5):288-293.
- [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] SEQUERA AM, FRAZIER OH, BUJA LM. Fibrosis and heart failure [J]. Heart Fail Rev, 2014, 19(2):173-185.
- [11] KHALIL H, KANISICAK O, PRASAD V, et al. Fibroblast-specific TGF- β -Smad 2/3 signaling underlies cardiac fibrosis [J]. J Clin Invest, 2017, 127(10):3770-3783.
- [12] ROCKEY DC, BELL PD, HILL JA. Fibrosis: a common pathway to organ injury and failure [J]. N Engl J Med, 2015, 372(12):1138-1149.
- [13] HAO J, WANG B, JONES SC, et al. Interaction between angiotensin II and Smad proteins in fibroblasts in failing heart and in vitro [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 279(6):H3020-H3030.
- [14] WANG H, CAI J. The role of microRNAs in heart failure [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863

- (8): 2019-2030.
- [5] GIDLÖF O, ERLINGE D. MicroRNAs in the failing heart-novel therapeutic targets? [J]. Scand Cardiovasc J, 2014, 48(6): 328-334.
- [6] LIANG H, ZHANG C, BAN T, et al. A novel reciprocal loop between microRNA-21 and TGFβR III is involved in cardiac fibrosis [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(12): 2152-2160.
- [7] CHEN C, PONNUSAMY M, LIU C, et al. MicroRNA as a therapeutic target in cardiac remodeling [J]. Biomed Res Int, 2017: 1278436. doi: 10.1155/2017/1278436.
- [8] LOPEZ-CASILLAS F, PAYNE HM, ANDRES JL, et al. Bataglycan can act as adual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites [J]. J Cell Biol, 1994, 124(4): 557-568.
- [9] KONG P, CHRISTIA P, FRANGOIANNIS NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis [J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(4): 549-574.
- [10] EGHBAI M, WEBER KT. Collagen and the myocardium: fibrillar structure, biosynthesis and degradation in relation to hypertrophy and its regression [J]. Mol Cell Biochem, 1990, 96(1): 1-44.

Effects of *Shenfu Yixin Granules* (参附益心颗粒) on Myocardial Fibrosis in Rats with Post-infarction Heart Failure

CHENG Yanling, XIE Shiyang, WANG Xiaoxiao, CUI Lin, LIU Suxiao, LI Bin, ZHU Mingjun

The First Affiliated Hospital, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

ABSTRACT Objective To observe the effects of *Shenfu Yixin Granules* (参附益心颗粒) (SFYX) on the myocardial fibrosis of rats with post-infarction heart failure (HF) and to explore the possible mechanism. **Methods** A model of myocardial infarction was prepared by ligating the left anterior descending coronary artery of rats. The 32 successfully modeled rats were randomly divided into a model group, a normal dose SFYX group, a high dose SFYX group and a losartan group. A sham operation group that was only threaded but not ligated was set, with 8 rats in each group. The normal dose SFYX group and the high dose SFYX group were given the corresponding drugs by gavage at 1.76 and 8.8 g/(kg·d), and the losartan group was given losartan tablets at 10 mg/(kg·d) by gavage. The sham operation group and the model group were given by gavage with distilled water at 1 ml/(100 g·d). Cardiac function was evaluated by echocardiography after 4 weeks, and left ventricular weight index (LVWI) was calculated. The distribution and content of myocardial collagen were determined by Masson staining and hydroxyproline assay. Myocardial transformation growth factor β1 (TGF-β1), Smad 2 and Smad 3 protein expression levels were determined by western blot; RT-PCR method was used to detect miR-21 and transforming growth factor β type III receptor (TGF-βR III) mRNA expression levels. **Results** Compared with the model group, left ventricular end systolic diameter (LVESD) was decreased, left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular fraction shortening (LVFS) were significantly increased, and LVMI and collagen contents were decreased, and also TGF-β1, Smad3 protein expression and miR-21 gene expression levels were depressed, while TGF-βR III was increased in the normal dose of SFYX group, the high dose of SFYX group, and the losartan group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** SFYX can attenuate myocardial fibrosis, inhibit ventricular remodeling and improve cardiac function in rats with HF, whose mechanism might be related with regulating miR-21 so as to inhibit the excessive activation of TGF-β1/Smads signaling pathway.

Keywords heart failure; myocardial fibrosis; *Shenfu Yixin Granules* (参附益心颗粒); TGF-β1/Smads signaling pathway; miR-21

(收稿日期: 2019-02-15; 修回日期: 2019-06-22)

编辑: 王利芬