

引用:赵鹏,王洲力,熊鹏,邓文清.基于TGF- β 1/Smad3信号通路探究真武汤对风湿性心脏病大鼠心肌纤维化和免疫紊乱的影响[J].中医导报,2025,31(1):20-26.

基于TGF- β 1/Smad3信号通路探究真武汤对风湿性心脏病大鼠心肌纤维化和免疫紊乱的影响*

赵 鹏¹,王洲力¹,熊 鹏²,邓文清¹

(1.西安交通大学医学部附属三二〇一医院,陕西 汉中 723000;

2.陕西中医药大学附属医院,陕西 咸阳 712000)

[摘要] 目的:研究真武汤对风湿性心脏病(RHD)大鼠转化生长因子- β 1(TGF- β 1)/Smads信号通路及免疫紊乱的影响。方法:将60只Lewis大鼠随机分为正常组、RHD组、曲美他嗪组及真武汤组,每组15只。建立灭活A组- β 型溶血性链球菌(GSA)诱导的大鼠风湿性心脏病模型。各组大鼠每天以相应药物灌胃1次,持续6周。检测大鼠心率;HE染色观察心脏组织病理改变;苦味酸-天狼猩红染色检测心脏组织纤维化;酶联免疫吸附(ELISA)法检测血清脑钠肽(BNP)、肌酸激酶同工酶MB(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、IL-10水平;Western blotting法检测心脏组织中TGF- β 1、p-Smad3、I型胶原蛋白(COL-I)、基质金属蛋白酶1(MMP-1)、基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)、NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、环氧合酶-2(COX-2)相对表达量;免疫荧光法检测心脏组织中TGF- β 1、Smad3、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、波形蛋白(vimentin)阳性表达。结果:正常组大鼠心肌细胞形态正常;RHD组大鼠心肌细胞排列紊乱且松散,可见大量肌纤维断裂,胞浆染色不均;与RHD组比较,曲美他嗪组、真武汤组大鼠心肌损伤有所改善。RHD组大鼠心脏组织相对纤维化面积占比高于正常组($P<0.05$);曲美他嗪组、真武汤组大鼠心脏组织纤维化面积占比均低于RHD组($P<0.05$)。RHD组大鼠心率低于正常组($P<0.05$);曲美他嗪组、真武汤组大鼠心率均高于RHD组($P<0.05$)。RHD组大鼠血清BNP、LDH、CK-MB、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平高于正常组($P<0.05$),IL-10水平低于正常组($P<0.05$);曲美他嗪组、真武汤组大鼠血清BNP、LDH、CK-MB水平均低于RHD组($P<0.05$);真武汤组大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平低于RHD组,IL-10水平高于RHD组($P<0.05$);真武汤组大鼠血清LDH、CK-MB水平低于曲美他嗪组($P<0.05$)。RHD组大鼠心脏组织TGF- β 1、Smad3、 α -SMA、Vimentin阳性表达水平高于正常组($P<0.05$);曲美他嗪组、真武汤组大鼠心脏组织TGF- β 1、Smad3、 α -SMA、Vimentin阳性表达水平均低于RHD组($P<0.05$);真武汤组大鼠心脏组织Smad3阳性表达水平低于曲美他嗪组($P<0.05$)。RHD组大鼠心脏组织TGF- β 1、p-Smad3、COL-I、MMP-1、NLRP3、iNOS、COX-2蛋白相对表达量高于正常组($P<0.05$),Smad7、TIMP-1蛋白相对表达量低于正常组($P<0.05$);曲美他嗪组大鼠心脏组织MMP-1、NLRP3蛋白相对表达量低于RHD组($P<0.05$),Smad7、TIMP-1蛋白相对表达量高于RHD组($P<0.05$);真武汤组大鼠心脏组织TGF- β 1、p-Smad3、COL-I、MMP-1、NLRP3、iNOS、COX-2蛋白相对表达量低于RHD组($P<0.05$),Smad7、TIMP-1蛋白相对表达量高于RHD组($P<0.05$);真武汤组大鼠心脏组织TGF- β 1、p-Smad3、COL-I蛋白相对表达量低于曲美他嗪组($P<0.05$)。结论:真武汤可能通过负反馈调节TGF- β 1/Smad3信号通路,抑制免疫炎症反应,改善RHD大鼠心肌纤维化,减轻心肌病理损伤。

[关键词] 风湿性心脏病;真武汤;TGF- β 1/Smad3;心肌纤维化;免疫紊乱;大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)01-0020-07

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2025.01.004

Effect of Zhenwu Decoction(真武汤) on Myocardial Fibrosis and Immune Disorder in Rats with Rheumatic Heart Disease Based on TGF- β 1/Smad3 Signaling Pathway

*基金项目:陕西省中医药管理局中医药科研项目(SZY-KJCYC-2023-034)

通信作者:赵鹏,男,副主任医师,研究方向为风湿病及其并发症的防治

ZHAO Peng¹, WANG Zhouli¹, XIONG Peng², DENG Wenqing¹

(1.3201 Hospital of Xi'an Jiaotong University, Hanzhong Shaanxi 723000, China;

2.Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712000, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of Zhenwu decoction on the transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)/Smads signaling pathway and immune dysregulation in rats with rheumatic heart disease (RHD). Methods: Totally 60 Lewis rats were randomly divided into normal group, RHD group, trimetazidine group and Zhenwu decoction group, with 15 rats in each group. A rat model of rheumatic heart disease was established using inactivated group A β -hemolytic streptococcus (GSA). Rats were given the corresponding medication via gavage in each group, once daily for six weeks. Parameters such as heart rate were measured; Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to observe pathological changes in the cardiac tissue. Bitterness acid-cockroach red staining was used to detect fibrosis in the heart tissue. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to measure serum levels of brain natriuretic peptide (BNP), creatine kinase MB isoenzyme (CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β), IL-6, and IL-10. Western blotting was used to analyze the relative expression levels of TGF- β 1, p-Smad3, type I collagen (COL-I), matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1), NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and cyclooxygenase-2 (COX-2) in cardiac tissue. Immunofluorescence was performed to detect the positive expression of TGF- β 1, Smad3, α -smooth muscle actin (α -SMA), and vimentin in the heart tissue. Results: The myocardial cells of the normal group of rats appeared normal in morphology. In the RHD group, the myocardial cells were disorganized and loose, with a significant number of muscle fibers ruptured and uneven cytoplasmic staining. Compared to the RHD group, the myocardial damage showed some improvement in trimetazidine group and Zhenwu decoction group. The relative area of fibrosis in the myocardial tissue of the RHD group was higher than that of the normal group ($P < 0.05$). The fibrotic area in the trimetazidine group and the Zhenwu Decoction group was lower than that of the RHD group ($P < 0.05$). The RHD group showed lower heart rate than normal group ($P < 0.05$). The trimetazidine group and the Zhenwu decoction group showed higher heart rates than the RHD group ($P < 0.05$). The RHD group showed higher serum levels of BNP, LDH, CK-MB, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 than normal group ($P < 0.05$), while lower IL-10 level than normal group ($P < 0.05$). The trimetazidine group and Zhenwu decoction group showed lower serum levels of BNP, LDH, and CK-MB than RHD group ($P < 0.05$). The Zhenwu decoction group showed lower serum levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 than RHD group, while higher IL-10 level than RHD group ($P < 0.05$). The Zhenwu decoction group showed lower serum levels of LDH and CK-MB than trimetazidine group ($P < 0.05$). In cardiac tissue, the positive expression levels of TGF- β 1, Smad3, α -SMA, and Vimentin in the RHD group were higher than that of the normal group ($P < 0.05$). In contrast, the positive expression levels of TGF- β 1, Smad3, α -SMA, and Vimentin in the trimetazidine group and Zhenwu decoction group were lower than that of the RHD group ($P < 0.05$). The Zhenwu decoction group showed lower positive expression level of Smad3 than trimetazidine group ($P < 0.05$). The relative expression levels of TGF- β 1, p-Smad3, COL-I, MMP-1, NLRP3, iNOS, and COX-2 proteins in the cardiac tissue of the RHD group were higher than that of the normal group ($P < 0.05$), while the relative expression levels of Smad7 and TIMP-1 proteins were lower than normal group ($P < 0.05$). In the trimetazidine group, the relative expression levels of MMP-1 and NLRP3 proteins in the cardiac tissue were lower than that of the RHD group ($P < 0.05$), while the relative expression levels of Smad7 and TIMP-1 proteins were higher than RHD group ($P < 0.05$). In the Zhenwu decoction group, the relative expression levels of TGF- β 1, p-Smad3, COL-I, MMP-1, NLRP3, iNOS, and COX-2 proteins in cardiac tissue were lower than RHD group ($P < 0.05$), while the relative expression levels of Smad7 and TIMP-1 proteins were higher than RHD group ($P < 0.05$). The relative expression levels of TGF- β 1, p-Smad3, and COL-I proteins in the cardiac tissue of the Zhenwu decoction group were lower than that of the trimetazidine group ($P < 0.05$). Conclusion: Zhenwu decoction may regulate the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway through negative feedback, inhibiting immune inflammatory responses, improving myocardial fibrosis in rats with rheumatic heart disease, and alleviating myocardial pathological damage.

[Keywords] rheumatic heart disease; Zhenwu decoction; TGF- β 1/Smad 3; myocardial fibrosis; immune disorders; rat

风湿性心脏病(rheumatic heart disease,RHD)是一种由A组 β -溶血性链球菌感染引发的自身免疫性疾病,以急性风湿热(acute rheumatic fever,ARF)活动为主要病理表现。长期反复或严重的风湿热发作引起的瓣膜疾病将导致不可逆的瓣膜增厚和纤维化^[1]。尽管二尖瓣是RHD最常见的受累部位,但RHD的病理特征是累及心脏的所有层,包括心包、心肌和内膜。这种病理变化是导致与RHD相关的致死性疾病的主要原因,如心力衰竭、心房颤动、卒中、感染性心内膜炎等^[2]。心肌纤维化是目前公认的RHD常见并发症之一,以细胞外基质(extracellular matrix,ECM)重塑为主要病理表现。其特征是I型胶原蛋白沉积增加和心脏成纤维细胞活化^[3]。转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β ,TGF- β 1)为纤维化过程中的关键生长因子。在RHD患者中TGF- β 1的慢性过度表达可刺激成纤维细胞增殖,并产生病理性ECM成分,促进瓣膜和心肌纤维化^[4]。研究^[5]表明,TGF- β 1可通过下游Smad信号通路和非Smad依赖性通路促进心肌纤维化的发生。

目前RHD的临床治疗主要选择青霉素、利尿剂、洋地黄类、血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)/血管紧张素II受体阻滞剂(ARB)、 β 受体阻滞剂等缓解患者临床症状和控制并发症,或手术对病变瓣膜进行修复或者置换,但术后更广泛的心肌纤维化与术后发病风险增加相关^[6]。中医学认为本病以心肾阳虚为主,治宜补益心肾,温阳利水,代表方首选真武汤^[7]。研究^[8-9]表明,真武汤可能通过抑制心肌纤维化、抗氧化应激、抗炎、抗凋亡、改善血管内皮功能及心肌细胞能量代谢,达到治疗心脏相关疾病的作用。因此,本研究以TGF- β 1/Smads通路为切入点,研究真武汤对RHD大鼠心肌纤维化和免疫紊乱的影响,旨在为真武汤临床治疗RHD提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级雄性Lewis大鼠60只,2~3个月龄,体重(160.24 $\pm$ 10.09)g,购自四川成都达硕实验动物公司,动物生产许可证号:SCXK(川)2022-0039。动物质量合格证号:430727230102256917。大鼠饲养于西安交通大学医学部附属三二〇一医院实验协同中心标准动物房,12 h/12 h明暗交替,温度(25 $\pm$ 3) $^{\circ}$ C,湿度(55 $\pm$ 10)%,噪声 $\leq$ 60 dB,自由饮水进食。本研究经西安交通大学医学部附属三二〇一医院实验动物福利伦理委员会批准执行,伦理批号:SE0Y2022011。

1.2 主要试剂 完全弗氏佐剂(德国Sigma公司,批号:SLCF1390);GAS菌株(北京索莱宝公司,批号:LA0531-2EA);天狼猩红染色试剂盒(上海翊圣生物公司,批号:30417ES61);苏木素染色剂(批号:AWI002a)、伊红染色剂(批号:AWI009a)均购自长沙艾碧维生物公司;兔基质金属蛋白酶1(matrix metalloproteinase-1,MMP-1)单克隆抗体(批号:11593-2-AP)、兔基质金属蛋白酶抑制剂-1(tissue inhibitor of metalloproteinases 1,TIMP-1)单克隆抗体(批号:12417-2-AP)均购自美国PROTEINTECH GROUP公司;兔 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)单克隆抗体(武汉博士德公司,批号:BM0121);兔TGF- β 1单克隆抗体(批号:ab46852)、兔Smad3单克隆抗体(批号:ab62076)、兔Smad3(phospho S423+S425)单克隆抗体(批号:ab62173)、兔Smad7多克隆抗

体(批号:ab32753)均购自美国Abcam公司;I型胶原蛋白(collagen I,COL-I)抗体(上海联迈生物公司,批号:LM-8269R);兔NLRP3单克隆抗体(批号:15711-2-AP)、兔诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)单克隆抗体(批号:12698-2-AP)、兔环氧合酶-2(cyclooxygenase 2,COX-2)多克隆抗体(批号:15401-2-AP)均购自美国PROTEINTECH GROUP公司;白介素-10(IL-10)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(批号:CSB-E04595r)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA试剂盒(批号:CSB-E11987r)、白介素-6(IL-6)ELISA试剂盒(批号:CSB-E04640r)、白介素-1 β (IL-1 β)ELISA试剂盒(批号:CSB-E04610r)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)ELISA试剂盒(批号:CSB-E11324r)、肌酸激酶同工酶MB(creatine kinase isoenzymes,CK-MB)ELISA试剂盒(批号:CSB-E14403r)、脑钠素/脑尿钠肽(brain natriuretic peptide,BNP)ELISA试剂盒(批号:CSB-E07972r)均购自武汉华美生物公司。

1.3 主要仪器 倒置荧光显微镜(日本尼康公司,型号:DS-U3);石蜡切片机(德国徕卡公司,型号:RM2235);高分辨率小动物超声影像系统(加拿大Visual Sonic公司,型号:Vevo 770);多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司,型号:SpectraMax5);高速冷冻离心机(日本日立公司,型号:CR22G II);BX43光学显微镜(日本Olympus公司,型号:IX73-U);蛋白凝胶电泳系统(美国Bio-RAD公司,型号:Gel Doc XR+)。

1.4 药物 根据《伤寒论》结合相关文献[10]推算出真武汤的现代用量应为:制附片25.0 g,茯苓46.8 g,白芍46.8 g,白术31.2 g,生姜46.8 g。全方共计196.6 g。中药经三二〇一医院药学部李明杰主任药师鉴定为正品,符合2020年版《中华人民共和国药典》(一部)各品种项下的相关规定。煎煮方法:制附片加适量饮用水浸泡30 min,先煎1 h,茯苓、白芍、白术、生姜加入适量饮用水浸泡30 min,然后将所有药物混合,再武火、文火各煎煮20 min,滤除药渣,最后加热浓缩至3.932 g/mL。盐酸曲美他嗪片(北京万生药业公司,20mg/片,批号:21B220652),使用双蒸水配置为1 mg/mL的曲美他嗪溶液。

1.5 动物分组、模型制备及药物干预 将60只大鼠随机分为正常组、RHD组、曲美他嗪组及真武汤组,每组15只。根据文献[11]中的造模方法,将灭活的A组- β 型溶血性链球菌(group A β -hemolytic streptococcus,GSA)悬液(1×10^{11} CFU/mL)与弗氏完全佐剂按1:1的体积比例充分混合,然后用超声细胞破碎仪乳化制成抗原。RHD组、曲美他嗪组及真武汤组大鼠第1周在后足垫皮下注射抗原,0.2 mL/次,1次/周;第2~4周腹部皮下注射抗原,0.5 mL/次,1次/周;第5周腹部皮下注射GSA悬液,0.5 mL/次,1次/周,持续5周。正常组大鼠使用同等体积的生理盐水按相同方式注射。造模结束后大鼠出现多处关节红肿,每组随机选取2只大鼠取心脏组织,HE染色显示出明显细胞间质水肿、黏液变性及淋巴细胞、浆细胞浸润,作为模型制备成功的标准。造模成功后,正常组和RHD组大鼠予生理盐水灌胃,10 mL/(kg $\cdot$ d)。根据人与不同种实验动物间用药量换算^[12],曲美他嗪组大鼠予曲美他嗪溶液灌胃,7.69 mg/(kg $\cdot$ d);真武汤组大鼠予真武汤生药溶液灌胃,25.20 g/(kg $\cdot$ d),持续6周。

1.6 观察指标

1.6.1 心率 末次灌胃结束后的次日,使用异氟烷麻醉大鼠,剃除胸前皮毛,使用小动物超声仪连续测定5~10个心动周期以检测心率。每只大鼠连续检测3次求得平均值作为最终心率。

1.6.2 心脏组织病理形态 测得心率并腹主动脉采血后,立即暴露胸腔,用生理盐水行心脏灌注术,待口唇变白后取心脏,一部分液氮速冻后存入-80℃冰箱保存备用。一部分放入4%多聚甲醛中固定,脱水,石蜡包埋,切片,HE染色,镜下观察心脏组织形态。

1.6.3 心肌纤维化情况 将大鼠心脏组织石蜡切片常规脱蜡至水,入苦味酸饱和溶液同步化1 min,然后入0.4%苦味酸-天狼猩红染液染色1 min,随后蒸馏水快速洗涤2次,再用95%酒精分化2级共1 min,最后无水酒精脱水,二甲苯透明,树脂封片。采用Image-Pro Plus 6.0软件进行胶原纤维化面积分析。心脏组织相对纤维化面积占比=(纤维化面积/总面积)×100%。

1.6.4 外周血心肌损伤标志物和炎症细胞因子水平 行心脏灌注前,腹主动脉取血,室温静置2 h,4℃条件下离心(离心半径10 cm)10 min,3 500 r/min,取上清。然后严格按照BNP、CK-MB、LDH试剂盒说明书中的步骤进行标准品制备、加样、孵育等操作,加入终止液后用酶标仪在450 nm波长检测每孔OD值,通过标准曲线计算每个样品浓度。采用ELISA试剂盒检测血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10水平。

1.6.5 心脏组织中TGF- β 1、Smad3、 α -SMA、vimentin阳性表达 心脏组织切片抗原修复,10%BSA封闭30 min,一抗(1:100)4℃孵育24 h后,加HRP标记的二抗(1:400),孵育50 min。滴加TSA,避光孵育10 min,EDTA抗原修复,微波炉加热去掉已结合的一抗,二抗后再次滴加新的一抗(1:100),4℃孵育24 h后加对应的二抗(1:400),避光孵育50 min。DAPI复染细胞核,避光室温孵育10 min,然后置于自发荧光淬灭剂5 min,封片。倒置荧光数码显微镜暗室下观察。

1.6.6 心脏组织中TGF- β 1、p-Smad3、Smad7、COL-1、TIMP-1、MMP1、NLRP3、iNOS、COX-2蛋白相对表达量 于冰上用无菌眼科剪将大鼠心脏剪切成适当大小,-80℃保存备用。取适量心脏组织于冰上裂解30 min(裂解液含蛋白酶抑制剂),于4℃条件下离心(离心半径10 cm)10 min,12 000 r/min,收集上清,BCA法蛋白定量;然后取适量蛋白样品进行电泳分离,5%浓缩胶60 V,10%分离胶90 V;电流300 mA湿转1.5 h,5%脱脂牛奶封闭1 h,加一抗(1:1 000),4℃孵育24 h。最后,TBST漂洗3次,二抗(1:5 000)室温孵育1 h,添加ECL发光液暗室曝光。用ImageJ v1.8.0软件分析各条带灰度值,统计各组与GAPDH灰度值的比值。

1.7 统计学方法 采用SPSS 19.0统计软件进行分析。计量资料符合正态分布,以“均数±标准差”(x $\pm$ s)表示,组间数据比较采用单因素方差分析,若方差齐用LSD法,方差不齐用Dunnett's T3进行组间多重比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠心脏组织形态学 正常组大鼠心肌细胞排列整齐,

肌纤维纹路清晰,胞核大小形态正常;RHD组大鼠心肌细胞排列紊乱且松散,可见大量肌纤维断裂,胞浆染色不均;曲美他嗪组、真武汤组大鼠心肌细胞排列稍显紊乱,肌纤维纹路趋于整齐,断裂较少。表明真武汤可一定程度上减轻RHD大鼠心肌损伤。(见图1)

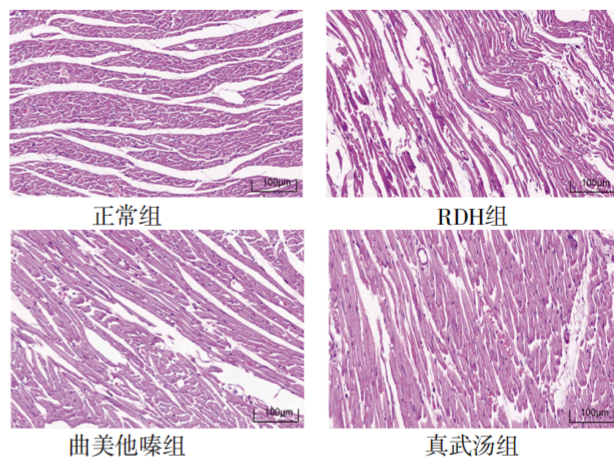
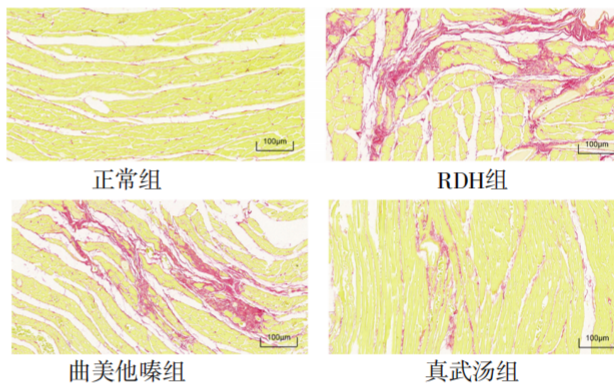


图1 各组大鼠心肌组织病理改变情况 (HE,×200)

2.2 各组大鼠心脏组织纤维化比较 RHD组大鼠心脏组织相对纤维化面积占比高于正常组($P<0.05$);曲美他嗪组、真武汤组大鼠心脏组织纤维化面积占比均低于RHD组($P<0.05$);真武汤组大鼠心脏组织相对纤维化面积占比低于曲美他嗪组($P<0.05$)。表明真武汤可一定程度上抑制RHD大鼠心肌纤维化。(见图2、表1)



注:胶原纤维沉积呈红色,心肌细胞呈黄色。

图2 各组大鼠心脏组织纤维化情况 (天狼猩红染色,×200)

表1 各组大鼠心脏组织相对纤维化面积占比比较 (x $\pm$ s)

组别	n	给药剂量	相对纤维化面积占比/%
正常组	13		4.74±2.02
RHD组	13		40.14±7.24 ^a
曲美他嗪组	13	7.69 mg/(kg·d)	27.39±5.67 ^b
真武汤组	13	25.20 g/(kg·d)	11.48±3.03 ^{bc}
F			58.865
P			0.000

注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与RHD组比较,^b $P<0.05$;与曲美他嗪组比较,^c $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠心率及血清BNP、CK-MB、LDH水平比较 RHD组大鼠心率低于正常组,血清BNP、LDH、CK-MB水平均高于正常组($P<0.05$);曲美他嗪组、真武汤组大鼠心率均高于RHD组,

血清BNP、LDH、CK-MB水平均低于RHD组($P<0.05$);真武汤组大鼠血清LDH、CK-MB水平低于曲美他嗪组($P<0.05$)。(见表2)

表 2 各组大鼠心率及血清 BNP、CK-MB、LDH 水平比较
($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	给药剂量	心率/(次/min)	BNP/(pg/mL)	LDH/(mU/mL)	CK-MB/(ng/mL)
正常组	13		367.00±29.00	755.30±43.02	51.27±7.40	0.98±0.13
RHD组	13		245.00±41.00 ^a	1 779.76±119.25 ^a	123.46±12.35 ^a	4.53±0.39 ^a
曲美他嗪组	13	7.69 mg/(kg·d)	301.00±37.00 ^b	1 258.23±81.53 ^b	95.79±8.65 ^b	2.93±0.32 ^b
真武汤组	13	25.20 g/(kg·d)	322.00±35.00 ^b	1 192.61±72.40 ^b	68.57±4.46 ^b	1.38±0.21 ^b
<i>F</i>			68.291	45.357	44.417	84.607
<i>P</i>			0.000	0.000	0.000	0.000

注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与RHD组比较,^b $P<0.05$ 。

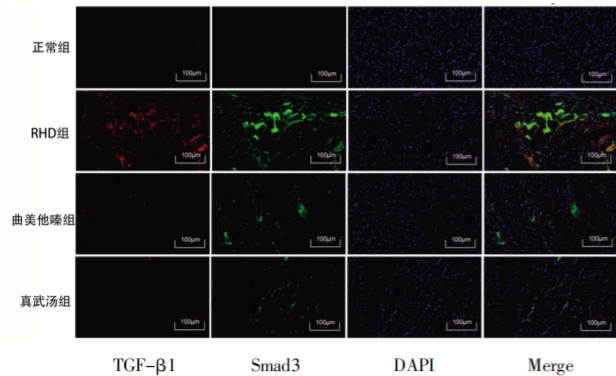
2.4 各组大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10水平比较 RHD组大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平高于正常组,IL-10水平低于正常组($P<0.05$);真武汤组大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平低于RHD组,IL-10水平高于RHD组($P<0.05$)。表明真武汤对于RHD大鼠血清中炎症因子具有调控作用。(见表3)

表 3 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 水平比较
($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	给药剂量	TNF- α /(pg/mL)	IL-1 β /(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	IL-10/(pg/mL)
正常组	13		320.76±34.92	25.97±7.04	15.98±3.24	45.90±8.13
RHD组	13		581.54±80.44 ^a	130.58±29.53 ^a	32.53±9.50 ^a	14.64±3.92 ^a
曲美他嗪组	13	7.69 mg/(kg·d)	551.25±68.73	119.61±18.78	29.93±8.43	26.04±11.20 ^b
真武汤组	13	25.20 g/(kg·d)	429.39±53.12 ^b	75.11±14.57 ^b	21.38±5.01 ^b	32.49±9.12 ^b
<i>F</i>			204.462	138.496	81.742	53.620
<i>P</i>			0.000	0.000	0.000	0.000

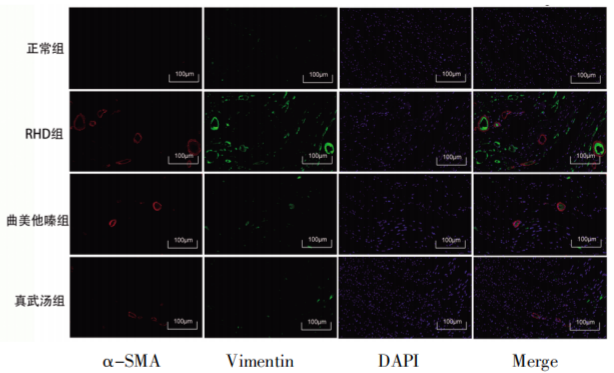
注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与RHD组比较,^b $P<0.05$ 。

2.5 各组大鼠心脏组织TGF- β 1、Smad3、 α -SMA、Vimentin阳性表达水平比较 RHD组大鼠心脏组织TGF- β 1、Smad3、 α -SMA、Vimentin阳性表达水平高于正常组($P<0.05$);曲美他嗪组、真武汤组大鼠心脏组织TGF- β 1、Smad3、 α -SMA、Vimentin阳性表达水平均低于RHD组($P<0.05$);真武汤组大鼠心脏组织Smad3阳性表达水平低于曲美他嗪组($P<0.05$)。表明真武汤可通过抑制TGF- β 1、Smad3表达,减少肌成纤维细胞(α -SMA/Vimentin双染)的形成数量。(见图3~4、表4)



注:TGF- β 1阳性表达呈红色,Smad3阳性表达呈绿色,DAPI核染呈蓝色。

图 3 各组大鼠心脏组织 TGF- β 1、Smad3 阳性表达情况
(免疫荧光,×200)



注: α -SMA阳性表达呈红色,Vimentin阳性表达呈绿色,DAPI核染呈蓝色。 α -SMA/vimentin双染可检测肌成纤维细胞。

图 4 各组大鼠心脏组织 α -SMA、Vimentin 阳性表达情况
(免疫荧光,×200)

表 4 各组大鼠心脏组织 TGF- β 1、Smad3、 α -SMA、Vimentin 平均荧光强度比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	给药剂量	TGF- β 1	Smad3	α -SMA	Vimentin
正常组	13		31.34±1.27	38.18±5.60	22.18±4.21	16.75±2.71
RHD组	13		173.40±6.29 ^a	195.20±14.17 ^a	115.20±15.03 ^a	120.10±9.85 ^a
曲美他嗪组	13	7.69 mg/(kg·d)	67.66±10.21 ^b	126.80±5.25 ^b	86.14±13.79 ^b	49.99±7.58 ^b
真武汤组	13	25.20 g/(kg·d)	60.90±4.50 ^b	105.60±9.02 ^c	65.61±11.97 ^b	40.03±6.31 ^b
<i>F</i>			279.414	147.396	31.953	117.816
<i>P</i>			0.000	0.000	0.000	0.000

注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与RHD组比较,^b $P<0.05$;与曲美他嗪组比较,^c $P<0.05$ 。

2.6 各组大鼠心脏组织TGF- β 1、p-Smad3、Smad7、COL- I、MMP-1、TIMP-1蛋白相对表达量比较 RHD组大鼠心脏组织TGF- β 1、p-Smad3、COL- I、MMP-1蛋白相对表达量高于正常组($P<0.05$),Smad7、TIMP-1蛋白相对表达量低于正常组($P<0.05$);曲美他嗪组大鼠心脏组织MMP-1蛋白相对表达量低于RHD组($P<0.05$),Smad7、TIMP-1蛋白相对表达量高于RHD组($P<0.05$);真武汤组大鼠心脏组织TGF- β 1、p-Smad3、COL- I、MMP-1蛋白相对表达量低于RHD组($P<0.05$),Smad7、TIMP-1蛋白相对表达量高于RHD组($P<0.05$);真武汤组大鼠心脏组织TGF- β 1、p-Smad3、COL- I蛋白相对表达量低于曲美他嗪组($P<0.05$)。(见图5、表5)

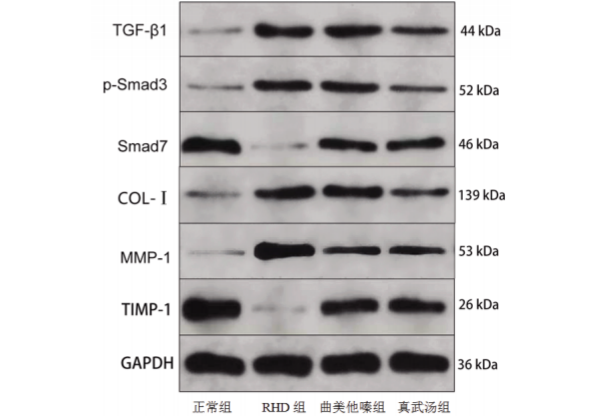


图 5 大鼠心脏组织 TGF- β 1、p-Smad3、Smad7、COL- I、MMP-1、TIMP-1 蛋白表达 Western blotting 图

表 5 各组大鼠心脏组织 TGF- β 1、p-Smad3、Smad7、COL- I、MMP-1、TIMP-1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药剂量	TGF- β 1/GAPDH	p-Smad3/GAPDH	Smad7/GAPDH	COL- I /GAPDH	MMP-1/GAPDH	TIMP-1/GAPDH
正常组	13		0.17 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.01	0.72 $\pm$ 0.05	0.18 $\pm$ 0.04	0.10 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.04
RHD组	13		0.60 $\pm$ 0.03 ^a	0.55 $\pm$ 0.02 ^a	0.14 $\pm$ 0.02 ^a	0.59 $\pm$ 0.10 ^a	0.81 $\pm$ 0.05 ^a	0.18 $\pm$ 0.01 ^a
曲美他嗪组	13	7.69 mg/(kg·d)	0.52 $\pm$ 0.05	0.49 $\pm$ 0.02	0.51 $\pm$ 0.11 ^b	0.55 $\pm$ 0.06	0.36 $\pm$ 0.05 ^b	0.67 $\pm$ 0.03 ^b
真武汤组	13	25.20 g/(kg·d)	0.34 $\pm$ 0.02 ^{b,c}	0.27 $\pm$ 0.03 ^{b,c}	0.47 $\pm$ 0.03 ^b	0.36 $\pm$ 0.02 ^{b,c}	0.29 $\pm$ 0.04 ^b	0.66 $\pm$ 0.02 ^b
F			125.451	179.501	288.695	149.355	158.007	419.171
P			0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与RHD组比较,^b $P < 0.05$;与曲美他嗪组比较,^c $P < 0.05$ 。

2.7 各组大鼠心脏组织 NLRP3、iNOS、COX-2 蛋白相对表达量比较 RHD组大鼠心脏组织 NLRP3、iNOS、COX-2 蛋白相对表达量高于正常组 ($P < 0.05$);曲美他嗪组大鼠心脏组织 NLRP3 蛋白相对表达量低于 RHD 组 ($P < 0.05$);真武汤组大鼠心脏组织 NLRP3、iNOS、COX-2 蛋白相对表达量低于 RHD 组 ($P < 0.05$);真武汤组大鼠心脏组织 iNOS、COX-2 蛋白相对表达量低于曲美他嗪组 ($P < 0.05$)。(见图6、表6)

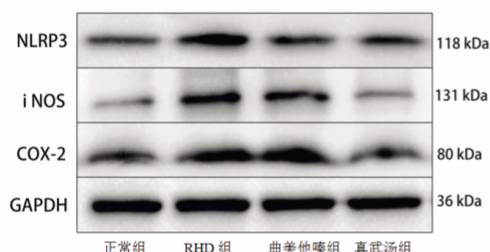


图 6 大鼠心脏组织 NLRP3、iNOS、COX-2 蛋白表达 Western blotting 图

表 6 各组大鼠心脏组织 NLRP3、iNOS、COX-2 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药剂量	NLRP3/GAPDH	iNOS/GAPDH	COX-2/GAPDH
正常组	13		0.34 $\pm$ 0.04	0.16 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.06
RHD组	13		0.80 $\pm$ 0.07 ^a	0.57 $\pm$ 0.06 ^a	0.95 $\pm$ 0.19 ^a
曲美他嗪组	13	7.69 mg/(kg·d)	0.46 $\pm$ 0.04 ^b	0.57 $\pm$ 0.02	0.90 $\pm$ 0.11
真武汤组	13	25.20 g/(kg·d)	0.41 $\pm$ 0.06 ^b	0.20 $\pm$ 0.03 ^{b,c}	0.32 $\pm$ 0.08 ^{b,c}
F			42.939	189.498	69.085
P			0.000	0.000	0.000

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与RHD组比较,^b $P < 0.05$;与曲美他嗪组比较,^c $P < 0.05$ 。

3 讨 论

RHD是一种可预防的心脏疾病,近几十年来全球RHD负担有所减轻,但在中低收入国家或地区其患病率和相关死亡率仍居高不下。研究^[13]显示,我国约有2 500万例瓣膜性心脏病患者,其中55.1%为风湿性瓣膜病变,因此RHD在我国仍造成极大的经济和社会负担。目前RHD的临床治疗仍以缓解临床症状或控制并发症为主^[14],具有相当大的局限性,仍有可能发生广泛的心肌重构,导致心功能降低或恶性心律失常^[15]。中医学认为本病属“水肿”“喘证”“胸痹”等范畴。素体正气不足,卫表不固则外感湿毒寒邪,迁延日久则由表入里,久宿于心,阻遏心阳。气血运行不畅则为痹痛。肾阳不足,气不能化则水道不通,溢而为肿,阳虚水泛^[16]。因此本病以心肾阳虚为

主,治宜补益心肾,温阳利水。真武汤是温阳利水的代表方剂。方中附子大辛大热,专补命门之火,使水有所主;生姜温中以散水邪;白术健脾燥湿;茯苓淡渗利湿;芍药酸甘敛阴。全方温热利水不伤阴,柔肝敛阴不助邪^[17]。现代研究表明,真武汤具有调节心脏神经体液、抗氧化应激、抗炎、改善心肌重塑及调节心肌细胞能量代谢等生物学作用^[18,19],被广泛应用于治疗心力衰竭、扩张型心肌病、肺心病等心血管疾病^[19]。本研究结果表明,真武汤可有效改善RHD大鼠心肌病理损伤,降低血清BNP、LDH、CK-MB水平,并在一定程度上抑制心肌纤维化,改善RHD大鼠心肌重塑和心功能。这与真武汤在扩张型心肌病及心力衰竭动物模型中的研究结果基本一致^[9,20]。

TGF- β 1对炎症、细胞外基质沉积、细胞增殖、细胞分化等具有重要调节作用^[21]。TGF- β 1可诱导Smad2/3磷酸化,与Smad4形成复合体,诱导肌成纤维细胞活化和基质沉积,导致心肌病变及间充质转化^[22]。Smad7被认为是TGF- β /Smad信号通路中最重要的负性调节因子之一,可阻止Smad2/3的磷酸化^[23]。本研究发现,真武汤可有效抑制RHD大鼠心脏组织TGF- β 1、Smad3、p-Smad3、 α -SMA蛋白表达,上调Smad7蛋白表达,表明真武汤可能通过抑制TGF- β 1/Smad3信号通路传导以减少心肌胶原异常沉积,抑制心肌间充质转化,从而改善心肌重塑。MMPs是ECM的主要降解蛋白酶,可促使胶原蛋白降解,而TIMPs可以抑制上述降解过程^[24]。正常情况下,MMPs和TIMPs处于动态平衡之中以维持ECM稳态。本研究发现,真武汤能抑制RHD大鼠心脏组织MMP-1蛋白表达,上调TIMP-1蛋白表达,表明真武汤可通过调节MMP-1/TIMP-1平衡,抑制心肌ECM合成,延缓RHD心肌纤维化的病理进展。

免疫功能紊乱是导致RHD的首要原因^[25]。IL-1 β 是自身免疫性疾病中的关键细胞因子,可参与风湿性疾病的急性发作^[26]。此外,IL-1 β 还可诱导MMPs的释放、常驻成纤维细胞的募集和增殖以及TGF- β 和IL-6的分泌,促进纤维化的发展^[27]。IL-10被认为是一种炎症与免疫抑制因子。NLRP3蛋白是NLRP3炎症小体的核心组成成分,可诱导促炎性细胞因子IL-1 β 和IL-18的分泌,是风湿性疾病的重要发病因素^[28]。COX-2和iNOS是机体免疫炎症反应的重要参与者,可能通过调控巨噬细胞M1/M2转化从而影响RHD疾病进展^[29]。本研究发现,真武汤可显著下调RHD大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平,上调IL-10水平,抑制RHD大鼠心脏组织中NLRP3、iNOS、COX-2表达,表明真武汤能抑制RHD大鼠机体炎症反应,发挥免疫调节作用。

综上所述,真武汤能改善RHD大鼠心肌纤维化,减轻心肌病理损伤,其机制可能与负反馈调节TGF- β 1/Smad3信号通路及抑制免疫炎症反应有关。本研究为真武汤临床治疗RHD提供了一定的参考价值,但中医药治疗疾病具有多途径、多靶点的特点,未来还需进一步深入研究以更加全面地揭示其防治RHD的作用机理。

参考文献

- [1] WOLDU B, BLOOMFIELD G S. Rheumatic heart disease in the twenty-first century[J]. Curr Cardiol Rep, 2016, 18 (10):96.
- [2] SIMPSON M T, KACHEL M, NEELY R C, et al. Rheumatic heart disease in the developing world [J]. Struct Heart, 2023, 7(6):100219.
- [3] PUTRA T M H, RODRIGUEZ-FERNANDEZ R, WIDODO W A, et al. Myocardial fibrosis in rheumatic heart disease: Emerging concepts and clinical implications [J]. Front Cardiovasc Med, 2023, 10:1230894.
- [4] SUN Y, HUANG Z Y, WANG Z H, et al. TGF- β 1 and TIMP-4 regulate atrial fibrosis in atrial fibrillation secondary to rheumatic heart disease[J]. Mol Cell Biochem, 2015, 406(1/2):131-138.
- [5] CHEN Z J, ZHENG L Y, CHEN G. 2-arachidonoyl-glycerol attenuates myocardial fibrosis in diabetic mice via the TGF- β 1/smad pathway[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2023, 37(4):647-654.
- [6] ELEID M F, NKOMO V T, PISLARU S V, et al. Valvular heart disease: New concepts in pathophysiology and therapeutic approaches[J]. Annu Rev Med, 2023, 74:155-170.
- [7] 王付.学用真武汤方证的思考与实践[J].中医药通报, 2014, 13(2):9-11.
- [8] 唐晓,李宏一,康雪莹,等.真武汤治疗慢性心力衰竭研究进展[J].广西中医药, 2023, 46(6):58-62.
- [9] 隋吉峰,原艺,李铮,等.真武汤通过AMPK/mTOR通路改善转基因扩张型心肌病小鼠心功能的作用机制[J].中华中医药学刊, 2023, 41(10):41-47, 266.
- [10] 毛妍,梁慧慧,朱俊平,等.真武汤的方证解析与现代研究概况[J].中国实验方剂学杂志, 2020, 26(1):217-225.
- [11] 谢旭晶,黄建林,冯智英,等.灭活链球菌诱导的实验性慢性风湿性心瓣膜炎[J].中山大学学报(医学科学版), 2010, 31(5):692-696.
- [12] 赵伟,孙国志.不同种实验动物间用量换算[J].畜牧兽医科技信息, 2010(5):52-53.
- [13] 胡盛寿,王增武.《中国心血管健康与疾病报告2022》概述[J].中国心血管病研究, 2023, 21(7):577-600.
- [14] 闫洁,袁森.比索洛尔、依那普利、螺内酯联合治疗风湿性心脏病心力衰竭患者疗效观察[J].实用临床医药杂志,

- 2020, 24(6):105-108, 112.
- [15] 张婉莹,车艳,沈春健,等.二尖瓣成形术与二尖瓣置换术治疗风湿性心脏病患者疗效的Meta分析[J].沈阳医学院学报, 2023, 25(6):571-576.
- [16] 陈秋涵,周亚滨,杨建飞,等.中医药治疗风湿性心脏病的研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志, 2022, 20(17):3155-3158.
- [17] 王东升,赵鸣芳.也谈真武汤中芍药的意义[J].中华中医药杂志, 2018, 33(1):53-55.
- [18] 吴文俊,张赤道,李雪,等.真武汤调控神经体液系统对心力衰竭作用机制的研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21(22):4153-4156.
- [19] 徐昕,刘文军.真武汤治疗心血管病进展[J].河南中医, 2016, 36(12):2068-2070.
- [20] 刘中勇,李林,方家.真武汤对心力衰竭模型大鼠心室重构及心肌细胞凋亡、纤维化的影响[J].中医杂志, 2017, 58 (14):1218-1223.
- [21] MASSAGUÉ J, SHEPPARD D. TGF- β signaling in health and disease[J]. Cell, 2023, 186(19):4007-4037.
- [22] WENG L, YE J J, YANG F H, et al. TGF- β 1/SMAD3 regulates programmed cell death 5 that suppresses cardiac fibrosis post-myocardial infarction by inhibiting HDAC3[J]. Circ Res, 2023, 133(3):237-251.
- [23] LAUDISI F, STOLFI C, MONTELEONE I, et al. TGF- β 1 signaling and Smad7 control T-cell responses in health and immune-mediated disorders [J]. Eur J Immunol, 2023, 53(11):e2350460.
- [24] 郭依宁,刘青,王俊岩,等.心阴片通过MLK3调控巨噬细胞M1极化对慢性心力衰竭心肌纤维化的机制研究[J].中华中医药杂志, 2022, 37(10):5899-5903.
- [25] PASSOS L S A, NUNES M C P, AIKAWA E. Rheumatic heart valve disease pathophysiology and underlying mechanisms[J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 7:612716.
- [26] DINARELLO C A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases[J]. Blood, 2011, 117(14):3720-3732.
- [27] GASSE P, RITEAU N, VACHER R, et al. IL-1 and IL-23 mediate early IL-17A production in pulmonary inflammation leading to late fibrosis[J]. PLoS One, 2011, 6(8):e23185.
- [28] YI Y S. Role of inflammasomes in inflammatory autoimmune rheumatic diseases[J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2018, 22(1):1-15.
- [29] 马微.风湿性心脏瓣膜钙化的二尖瓣组织中巨噬细胞和炎性因子表达分析[J].北华大学学报(自然科学版), 2017, 18(4):466-469.

(收稿日期:2024-05-20 编辑:蒋凯彪)