

牛欢,陈曼丽,杨波,等. 基于 TGF- β 1/Smad3 信号通路观察促血小板生成素对阿霉素致心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 63-70.

Niu H, Chen ML, Yang B, et al. Effects of thrombopoietin on adriamycin-induced cardiomyocyte apoptosis in rats with heart failure based on the TGF- β 1/ Smad3 signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(3): 63-70.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.03.011

基于 TGF- β 1/Smad3 信号通路观察促血小板生成素对阿霉素致心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响

牛欢^{1*}, 陈曼丽², 杨波³, 何智余³

(1.深圳大学总医院 心血管内科, 广东 深圳 518005; 2.深圳市宝安区妇幼保健院 内科, 广东 深圳 518000; 3.兰州大学第一医院 心血管内科, 兰州 730000)

【摘要】 **目的** 探讨促血小板生成素(TPO)对阿霉素致心力衰竭(CHF)大鼠抗心肌细胞凋亡的作用以及其对 TGF- β 1/Smad3 信号的调控机制。**方法** 将大鼠随机分为对照组、模型组、治疗组、抑制剂组;模型组、治疗组、抑制剂组采用腹腔注射阿霉素构建心衰模型,治疗组每日腹腔注射 5 μ g/kg TPO;抑制剂组每日腹腔注射 1.2 mg/kg SB431542、TUNEL 染色、免疫荧光、Western blot 检测大鼠心肌细胞的凋亡、Caspase-3、TGF- β 1 及 p-Smad3 的表达水平。**结果** 与对照组相比,模型组心肌细胞凋亡率、TGF- β 1、p-Smad3、Caspase-3 的表达明显升高,与模型组相比,治疗组、抑制剂组心肌细胞凋亡率、TGF- β 1、p-Smad3、Caspase-3 的表达明显降低,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** TPO 能够降低由阿霉素导致 CHF 大鼠的心肌细胞凋亡率,其机制可能与抑制 TGF- β 1/Smad3 信号有关。

【关键词】 促血小板生成素;心力衰竭;阿霉素;心肌细胞凋亡;TGF- β 1/Smad3 信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)03-0063-08

Effects of thrombopoietin on adriamycin-induced cardiomyocyte apoptosis in rats with heart failure based on the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway

NIU Huan^{1*}, CHEN Manli², YANG Bo³, HE Zhiyu³

(1. Department of cardiovascular medicine, general hospital of shenzhen university, Shenzhen 518005, China.

2. Department of internal medicine, Baoan Women's and Children's Hospital, Shenzhen 518000.

3. Department of cardiovascular medicine, the first hospital of lanzhou university, Lanzhou 730000)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of thrombopoietin on adriamycin-induced cardiomyocyte apoptosis in rats with heart failure based on the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway. **Methods** Rats were randomly divided into control, model, treatment, and inhibitor groups. Rats in the model, treatment, and inhibitor groups were injected with doxorubicin to establish a rat heart failure model. Rats in the treatment group were intraperitoneally injected with 5 μ g/kg thyroperoxidase (TPO) daily and rats in the inhibitor group were intraperitoneally injected with 1.2 mg daily/kg SB431542. TUNEL staining, immunofluorescence, and western blot were used to detect the cell apoptosis of cardiomyocytes, and the

expressions of caspase-3, TGF- β 1, and p-Smad3. **Results** Compared with the control group, the cell apoptosis rate of myocardial tissue cells in the model group was significantly increased and the expressions of TGF- β 1, p-Smad3 and caspase-3 were significantly increased. Compared with the model group, the apoptosis rate of myocardial tissue in the treatment and inhibitor groups and the expressions of TGF- β 1, p-Smad3, and caspase-3, were significantly decreased. The differences were statistically significant compared with the model group ($P < 0.05$). **Conclusions** TPO reduced the apoptosis rate of cardiomyocytes induced by doxorubicin in rats. The mechanism may be related to the inhibition of the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway.

【Keywords】 thrombopoietin; heart failure; doxorubicin; cardiomyocyte apoptosis; TGF- β 1/Smad3 signaling pathway

原发性以及继发性的心血管疾病的终末期主要表现为心室充盈或射血功能受损,被称为慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)^[1],至今尚无根治性治疗手段。据统计 CHF 的 5 年生存率不足 50%。目前 CHF 的发病机制已逐渐深入到分子生物学水平,为 CHF 的基因靶向治疗提供有力支撑^[2]。研究表明^[3]心肌纤维化导致的心室重构(ventricular remodeling, VR)进而造成心肌细胞的异常凋亡是 CHF 发生、发展过程中关键性的病理改变。Chang 等^[4]研究证实抑制心肌纤维化,能降低心肌细胞的凋亡率,减轻心力衰竭的程度。已有的实验研究表明^[5]转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)直接参与心肌纤维化的病理过程。研究显示 TGF- β 1 可促进成纤维细胞(cardiac fibroblast, CFs)转化。CFs 的增生刺激分泌细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)蛋白,引起心肌组织胶原纤维积聚,进而改变心肌的基础空间结构,造成心肌细胞异常凋亡、坏死数量增加,导致心脏功能障碍。Heger 等^[6]研究证实 TGF- β 1 能够促进大鼠心肌细胞的凋亡。促血小板生成素(thrombopoietin, TPO)是机体内调节血小板/巨核细胞系的最重要的造血蛋白生长因子,临床应用就是作为造血生长因子用于血小板减少症的治疗。近年来研究发现 TPO 对心脏具有保护作用^[7]。张东涛等^[8]体外研究 H9C2 细胞发现, TPO 通过抑制细胞凋亡实现对体外心肌细胞的保护作用,但 TPO 在 CHF 中作用的报道较少。本研究通过建立大鼠 CHF 模型,从 TGF- β 1/Smad3 的角度探讨 TPO 对 CHF 的保护作用,从而为临床上 TPO 的应用提供。

1 材料和方法

1.1 实验动物

48 只 8-10 周 SPF 级 SD 雄性大鼠,体重 220~250 g, [SCXK(甘)2018-0002], [SYXK(甘)2018-

12], 由深圳大学总医院实验动物中心提供;室温下标准饲料、自由饮水、分笼(4 笼)适应性饲养一周后用于实验。实验动物的使用及操作均遵守 3R 原则,在过程中给与与动物人道的关怀,实验基本操作参照深圳大学总医院动物管理委员会关于基础实验动物的规定进行,并经本院实验动物管理伦理委员会批准(JG-2019-0047)。

1.2 主要试剂与仪器

促血小板生成素注射液(thrombopoietin, TPO, 沈阳三生制药有限公司,批准文号:国药准字:S20050048);阿霉素(注射用盐酸多柔比星,山西普德药业股份有限公司,批准文号:国药准字 H14023879);TGF- β 1 特异性抑制剂 SB431542(生产批号:1014-JA)采购自美国 Selleck 公司,异氟烷(生产批号:521 L -A)、戊巴比妥钠(生产批号:2560-01)、链脲佐霉素(生产批号:AS-7802)、多聚甲醛(生产批号:WQ-2F)采购自 Sigma 公司;HE 试剂盒(生产批号:KT-2018H567)、Masson 染色试剂盒(生产批号:KT-2018M902)购自上海碧云天生物技术公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(生产批号:GW-147)、化学发光试剂盒(生产批号:GW-1857)购自广东锐博生物科技技术股份有限公司;TGF- β 1(生产批号:AY-T201)、p-Smad3 抗体(生产批号:AY-S269)、兔抗大鼠 Caspase-3(生产批号:AY-C5TH)、兔抗 GAPDH(生产批号:AY-GT34)以及山羊抗兔 IgG(生产批号:AY-IJ70)采购自美国 abcam 公司,TUNEL 试剂盒(生产批号:RN-S069)、Western blot 试剂盒(生产批号:RN-WR672)购自德国 Rebstock 公司。

荧光显微镜(US-2018, 尼康公司,日本), Bio-rad 凝胶成像系统(8845-S 型, Bio-rad 公司,美国), -80 $^{\circ}$ C 深冷冰箱(WF-150 V, 维根斯公司,德国), 电镜(KW-06, 三菱公司,日本), 组织切片机(Leica RM2135, Leica 公司,德国)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型构建和分组处理

实验前使用标准医用生理盐水将注射用阿霉素配成 2 mg/L 溶液,将 48 只大鼠随机分为 4 组,每组 12 只,分别为对照组、模型组、TPO 干预组(治疗组)、TGF- β 1 特异性抑制剂 SB431542 干预组(抑制剂组);据文献方法^[9],将阿霉素溶液分别以 7 mg/kg 腹腔注射到模型组、治疗组、抑制剂组大鼠体内,每周 1 次,持续 8 周,构建心力衰竭大鼠模型;对照组大鼠腹腔注射等体积的医用生理盐水。8 周后采用心脏彩超记录鼠心功能指数。同时开始进行药物干预治疗,治疗组大鼠每日腹腔注射给药 5 μ g/kg TPO;抑制剂组大鼠每日腹腔注射给药 1.2 mg/kg SB431542;对照组、模型组大鼠给予等体积的生理盐水,持续给药 28 d。

1.3.2 心脏超声检查心脏功能

持续给药 28 d 后,异氟烷腹腔注射麻醉大鼠,固定于手术台,心脏彩超检查心脏功能。记录左室射血分数(LVEF)、左室收缩期内径(LVDS)、舒张期内径(LVDd)、短轴缩短率(FS)等数据。

1.3.3 各组大鼠心肌组织病理学改变

检查心脏彩超之后,戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,腹主动脉放血处死。在无菌操作台上,开胸取出心脏,用无菌滤纸吸干水分,处理后将心脏组织封存在液氮中,置于-80℃深冷冰箱中备用。取出 20% 心肌组织,分别用 HE 染色和 Masson 染色,制成切片,光镜下观察各组大鼠心肌组织病理改变。

1.3.4 免疫组化法检测心肌组织 I、III 型胶原蛋白表达

取出 20% 心肌组织,固定包埋并切片,脱蜡后,柠檬酸盐缓冲液修复,3% 的双氧水室温下封闭,分别加入一抗,4℃ 过夜孵育,次日,PBS 冲洗 3 次后,分别加入二抗,清洗。加适量二氨基联苯氨(diaminobenzidin, DAB)显色,苏木素复染,乙醇梯度脱水,二甲苯浸泡,中性树胶封片,镜检观察并记录实验结果;每个样本独立重复测量 3 次。

1.3.5 TUNEL 染色检测各组大鼠心肌细胞凋亡

取 10% 心肌组织,常规方法固定,冰冻切片,二甲苯浸洗两次,梯度酒精浸洗 5 min,风干后 3% 双氧水-甲醇浸泡 10 min, PBS 漂洗 3 次,每次 3 min,然后 4℃ 预冷乙醇上进行如下操作:0.1% TRitonX-

100、0.1% 缓冲液处理 2 min, PBS 漂洗 3 次,每次 3 min,加入 TUNNEL 反应混合液,加封口膜在暗湿盒中反应 1 h,温度 37℃, PBS 漂洗,脱水后二甲苯透明,封片,US-2018 荧光显微镜进行观察。

1.3.6 免疫荧光检测各组大鼠心肌组织中 Caspase-3 的表达情况

从冰箱中取出 10% 大鼠心肌组织,常规方法固定,冰冻切片,按照免疫荧光的试剂盒要求进行操作观察 Caspase-3 的表达情况。

1.3.7 Western blot 检测各组大鼠脑组织中 Caspase-3 以及信号通路相关蛋白 TGF- β 1、p-Smad3 的表达水平

从冰箱中取出 10% 大鼠心肌组织,组织裂解匀浆器,冰浴 5 min 后离心,留取上清,测定蛋白浓度后,电泳转移膜,封闭加入一抗稀释液(均为 1:1000),保持 4℃ 过夜,次日清洗后,加入二抗稀释液(均为 1:10000),室温下孵育 2 h,显色后 Bio-rad 凝胶成像仪下读取各条带的灰度值,目的蛋白相对表达水平以 GAPDH 作为参照。

1.4 统计学方法

本研究实验数据统计采用 SPSS 16.0 软件,作图工具采用 Graphpad5.01,采用平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示符合正态分布的计量资料,采用单因素方差分析进行多组间比较,采用独立 *t* 检验进行两两间比较,当 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 心脏彩超检测大鼠心功能的变化

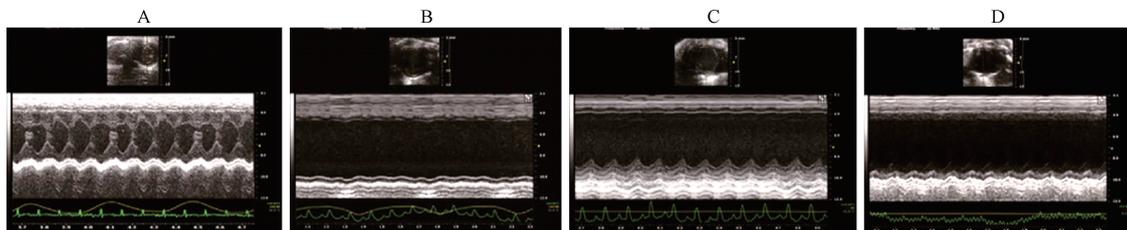
各组大鼠心脏彩超检测各组大鼠心功能后结果如图 1,表 1 所示,与对照组相比,模型组大鼠的 LVDS、LVDd 明显出现升高($P < 0.05$),LVEF、FS 明显出现下降($P < 0.05$),与模型组相比,治疗组、抑制剂组的 LVDS、LVDd 明显下降($P < 0.05$),LVEF、FS 明显升高($P < 0.05$),差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。治疗组、抑制剂组在大鼠心脏心功能指数差异不具有统计意义($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠心肌组织病理学

HE 染色结果如图 2 所示,对照组大鼠心肌细胞结构完整,清晰可辨,细胞整齐排列,细胞间质无水肿情况,心肌横纹清晰且规则,细胞连接紧密。模型组大鼠心肌细胞肥大且不规则、细胞排列紊乱,心肌浊肿明显,细胞间质水肿明显及细胞

外基质增多,可见大量炎性细胞浸润,纤维增生明显,心肌细胞间质充血严重,心肌横纹消失;与模型组相比,治疗组、抑制剂组大鼠心肌细胞较模型

组排列更规则,心肌纤维变性较轻,纤维组织增生明显减少,基本无出血点,心肌细胞损伤症状明显减轻。



注:A:对照组;B:模型组;C:治疗组;D:抑制剂组。

图 1 各组大鼠心脏超声结果

Note. A, control group. B, model group. C, treatment group. D, inhibitor group.

Figure 1 Cardiac ultrasound results of rats in each group

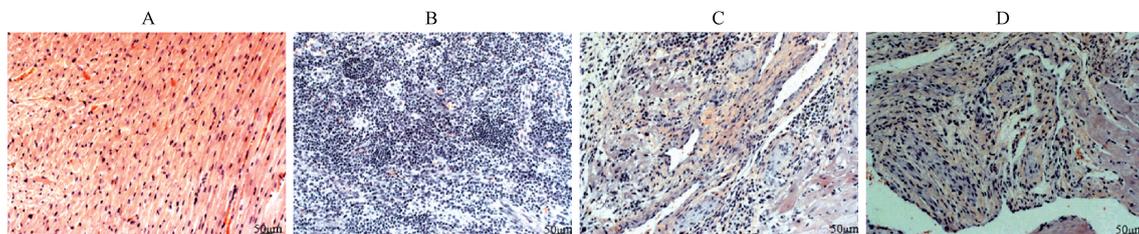
表 1 各组大鼠心功能指数比较

Table 1 Comparison of the heart function index of rats in each group

分组 Groups	左室收缩期内径(mm) LVDS	舒张期内径(mm) LVd	左室射血分数(%) LVEF	短轴缩短率(%) FS
对照组 control group	5.01±0.35	3.47±0.16	84.14±1.52	55.25±0.38
模型组 model group	7.65±0.27*	5.85±0.18*	62.15±2.15*	28.49±0.63*
治疗组 treatment group	6.21±0.13 [#]	4.35±0.11 [#]	75.05±3.26 [#]	38.35±0.87 [#]
抑制剂组 inhibitor group	6.18±0.15 [#]	4.33±0.13 [#]	75.15±3.14 [#]	37.18±1.28 [#]

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group. * $P<0.05$. Compared with the model group. [#] $P<0.05$.

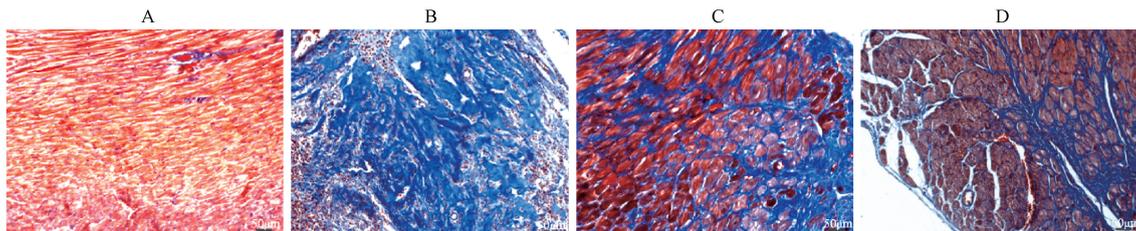


注:A:对照组;B:模型组;C:治疗组;D:抑制剂组。

图 2 HE 染色结果

Note. A, control group. B, model group. C, treatment group. D, inhibitor group.

Figure 2 HE staining



注:A:对照组;B:模型组;C:治疗组;D:抑制剂组。

图 3 Masson 染色结果

Note. A, control group. B, model group. C, treatment group. D, inhibitor group.

Figure 3 Masson staining

光镜下观察大鼠心肌细胞 Masson 染色,心肌细胞呈现红色,胶原纤维呈现蓝色,本研究中 Masson 染色结果如图 3 所示,对照组只是少量的胶原纤维散在细胞间隙中;模型组心肌细胞及血管周围均可见大片蓝色的心肌胶原纤维分布;与模型组相比,治疗组、抑制剂组心肌细胞及血管周围的胶原纤维明显减少。

2.3 免疫组化法检测心肌组织 I、III 型胶原蛋白表达

免疫组化结果如图 4 所示:与对照组相比,模型组、治疗组、抑制剂组 I、III 型胶原蛋白的表达均出现明显的升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比,在进行药物干预后,治疗组、抑制剂组 I、III 型胶原蛋白的表达出现明显的下降 ($P < 0.05$),治疗组、抑制剂组在大鼠心脏 I、III 型胶原蛋白的表达差异不具有统计意义 ($P > 0.05$)。推断促血小板生成素和抑制剂 SB431542 均可抑制心衰大鼠心脏 I、III 型胶原蛋白

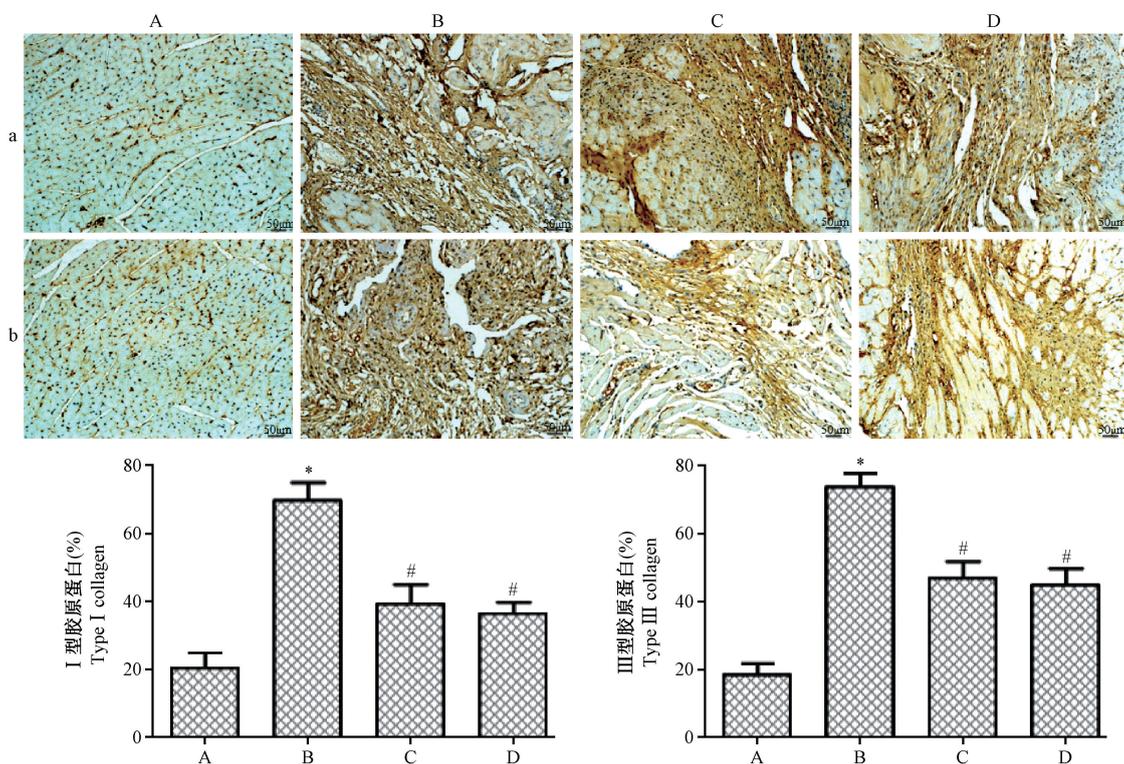
的表达。

2.4 TUNEL 染色检测各组大鼠心肌组织中的细胞凋亡

TUNEL 染色结果如图 5 所示,与对照组相比,模型组大鼠的细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$),与模型组相比,治疗组、抑制剂组大鼠的细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.05$),治疗组和抑制剂组相比,细胞凋亡率的差异 ($P > 0.05$),不具有统计学意义。

2.5 免疫荧光检测各组大鼠心肌组织中 Caspase-3 的表达情况

Caspase-3 作为细胞程序性凋亡的最终执行分子。本研究中免疫组化和 Western blot 结果如图 6 所示,与对照组相比,模型组 Caspase-3 的表达明显升高 ($P < 0.05$);与模型组相比,治疗组、抑制剂组 Caspase-3 的表达明显降低 ($P < 0.05$);治疗组和抑制剂组相比,大鼠心肌组织 Caspase-3 表达差异 ($P > 0.05$),不具有统计学意义。

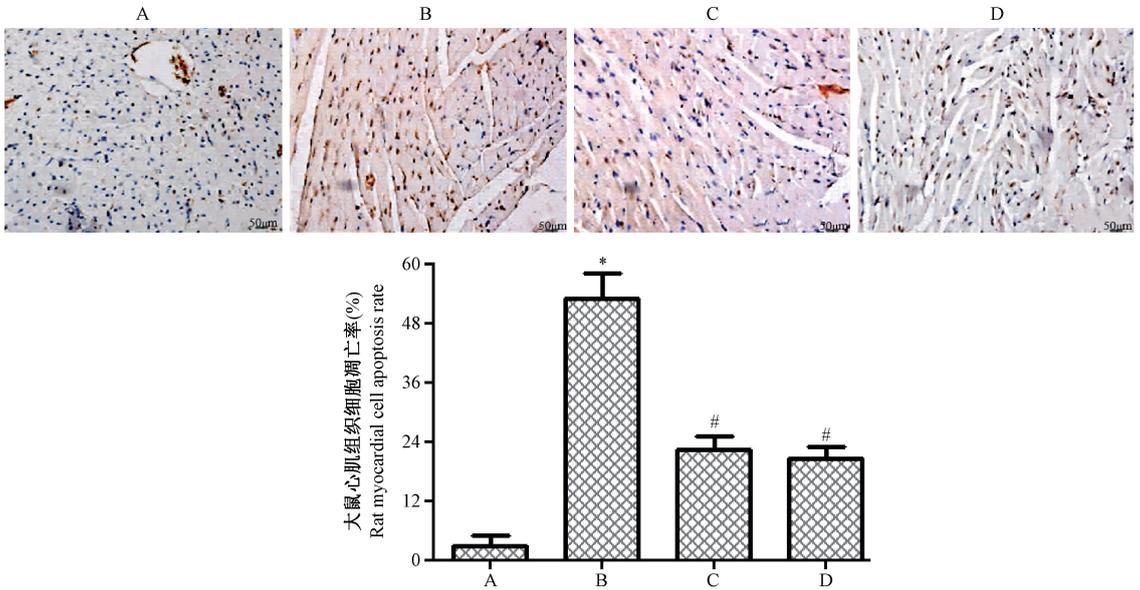


注: A: 对照组; B: 模型组; C: 治疗组; D: 抑制剂组。a: I 型胶原蛋白; b: III 型胶原蛋白。与对照组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 4 免疫组化检测 I、III 型胶原蛋白表达结果

Note. A, control group. B, model group. C, treatment group. D, inhibitor group. a, type I collagen. b, type III collagen. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$.

Figure 4 Immunohistochemical staining of type I and III collagen

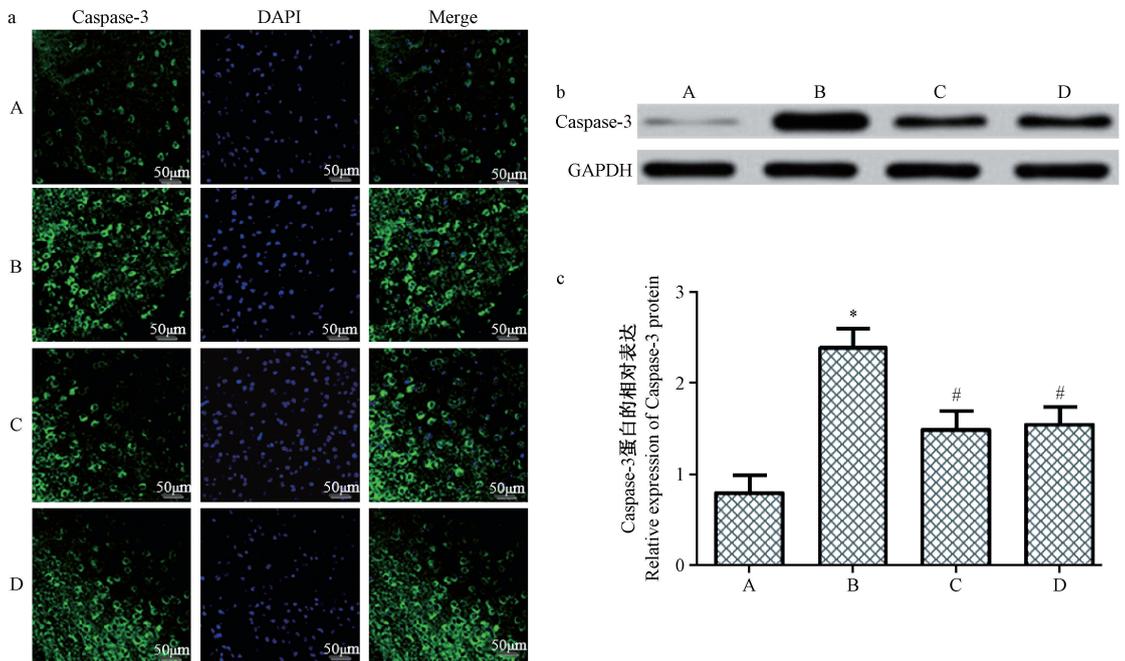


注:A:对照组;B:模型组;C:治疗组;D:抑制剂组。与对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图5 TUNEL染色检测心肌组织中的细胞凋亡

Note. A, control group. B, model group. C, treatment group. D, inhibitor group. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$.

Figure 5 TUNEL staining for the detection of cell apoptosis in myocardial tissue



注:A:对照组;B:模型组;C:治疗组;D:抑制剂组。a:免疫组化检测各组大鼠心肌组织 Caspase-3 的表达;b:Western blot 检测各组大鼠心肌组织 Caspase-3 的表达;c:各组大鼠心肌组织中 Caspase-3 的表达差异。与对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图6 各组大鼠心肌组织中的 Caspase-3 的表达

Note. A, control group. B, model group. C, treatment group. D, inhibitor group. a, Immunofluorescence detection of the expression caspase-3. b, Western blot detection of the expression of caspase-3. c, Difference in the expression of caspase-3. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$.

Figure 6 Expression of Caspase-3 in myocardial tissue of rats in each group

2.6 Western blot 检测 TGF- β 1、p-Smad3 蛋白的表达

本研究采用 Western blot 检测各组大鼠心脏组织 TGF- β 1、p-Smad3 蛋白的表达,结果如图 7 所示,与对照组相比,模型组大鼠心肌细胞的 TGF- β 1、p-Smad3 的表达明显升高($P<0.05$);与模型组相比,治疗组、抑制剂组大鼠心肌细胞的 TGF- β 1、p-Smad3 的表达明显降低($P<0.05$)。治疗组、抑制剂组在大鼠心脏心肌细胞 TGF- β 1、p-Smad3 表达差异不具有统计意义($P>0.05$)。

3 讨论

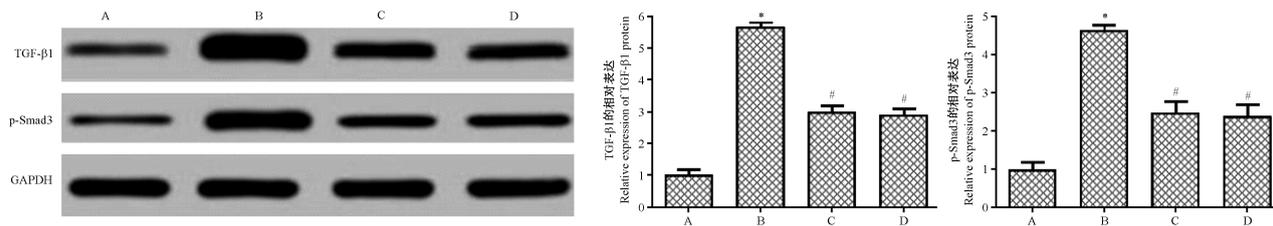
慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是以心脏收缩或舒张功能障碍为标志的器质性心血管系统的综合症^[10],死亡率高,预后不佳。近年来,随着研究的深入,许多学者从形态学、分子生物学等角度研究证实心肌细胞凋亡是 CHF 发生、发展中的重要生理病变过程。

细胞异常凋亡致使心肌细胞数量骤减,心室充盈失常、心房排血量减少,最终导致心室壁变薄,心腔扩大,心肌肥大等心肌重构(Ventricular remodeling, VR)发展成 CHF^[11]。促血小板生成素(thrombopoietin, TPO)具有介导血小板生成和调节巨核细胞增殖、分化的功能^[12]。近年来研究发现 TPO 还能在其他系统发挥作用^[13]。王晓东等^[14]研究发现 TPO 能促进小鼠神经细胞的增殖,稳定线粒体膜电位,发挥抗凋亡的作用。Besbes 等^[15]研究发现 TPO 能够影响卵巢细胞的增殖和凋亡。而 TPO 对心血管系统的保护作用引起关注^[16]。Wang 等^[17] TPO 能保护 H9C2 细胞免受多柔比星诱导的细胞自噬,发挥心肌细胞保护的作用。Chan 等^[18]采用 TPO 治疗心梗大鼠发现 TPO 能明显改善其左

心室功能,促进血管新生,减小心梗面积。但是 TPO 在 CHF 中的作用未见有研究报道。

阿霉素(adriamycin)是一线抗肿瘤化疗药物,但是由于其心脏毒性,限制了在临床上的应用^[19]。本研究中在给与阿霉素 8 周后,大鼠心脏 LVDS、LVdD 明显升高,LVEF、FS 明显降低,与人 CHF 症状相似。CHF 大鼠模型建立成功。阿霉素造成 CHF 的机制上不明确,有研究报道^[20]证实大鼠在注射阿霉素后,导致心肌细胞凋亡,致使心肌细胞数量骤减,心脏结构发生改变,心室功能降低。本研究中模型组大鼠心脏 LVDS、LVdD 明显升高($P<0.05$),LVEF、FS 明显降低($P<0.05$),心肌细胞及血管周围均可见心肌胶原纤维沉积,心肌 CHF 损伤症状明显;细胞凋亡率明显升高($P<0.05$)。细胞凋亡是有许多分子共同调控的结果,Caspase-3 是凋亡过程中的最重要的效应蛋白^[21]。模型组大鼠心肌细胞 Caspase-3 的表达明显升高。在经过 TPO 治疗后,治疗组大鼠心脏功能明显改善,心肌细胞凋亡率明显降低($P<0.05$);治疗组大鼠心肌细胞及血管周围的胶原纤维明显减少,心肌细胞 CHF 损伤症状明显减轻。由此可推断促血小板生成素能够抑制有阿霉素导致的心肌凋亡,改善心脏功能。

TGF- β 1 主要在成纤维细胞、上皮细胞和平滑肌细胞中表达,TGF- β 1 是激活成纤维细胞的关键因子,可刺激胶原纤维的合成^[22]。研究表明^[23] TGF- β 1/Smad3 信号通路在心脏重塑和 CHF 的过程中发挥关键性的作用。研究证实^[24]抑制 TGF- β 1 的作用能够有效的抑制由糖尿病等导致的 CHF 中的心室重构;动物实验研究证实^[25]在心肌梗死早期抑制 TGF- β 1 信号通路,能够明显改善心功能。本研究中免疫组化结果显示,模型大鼠 I、III 型胶原蛋白的表达均明显升高,在使用 TPO 和 TGF- β 1 抑制



注:A:对照组;B:模型组;C:治疗组;D:抑制剂组。与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

图 7 Western blot 检测各组大鼠心脏组织 TGF- β 1、p-Smad3 蛋白的表达

Note. A, control group. B, model group. C, treatment group. D, inhibitor group. Compared with the control group,* $P<0.05$. Compared with the model group,# $P<0.05$.

Figure 7 Western blot detection of the expression of TGF- β 1 and p-Smad3 proteins

剂干预后,治疗组、抑制剂组大鼠心肌胶原纤维表达明显下降,两组大鼠 CHF 病理指标改善差异不明显,初步推断 TPO 可能通过抑制说 TGF- β 1 的表达来改善大鼠 CHF 症状。进一步研究发现,与对照组相比,模型组大鼠心肌细胞的 TGF- β 1、p-Smad3 的表达明显升高;与模型组相比,治疗组、抑制剂组大鼠心肌细胞的 TGF- β 1、p-Smad3 的表达明显降低,推断 TPO 能抑制说 TGF- β 1 的表达。

综上所述,TPO 能够改善由阿霉素导致 CHF 大鼠的心脏功能,降低心肌细胞凋亡率,其机制可能与抑制 TGF- β 1/Smad3 信号通路有关。虽然 TPO 对心脏的保护作用在动物实验中效果令人欣慰,但是就 TPO 在临床上治疗心力衰竭的安全性、用药的最佳时间、以及最佳剂量等问题还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Nougué H, Pezel T, Picard F, et al. Effects of sacubitril/valsartan on neprilysin targets and the metabolism of natriuretic peptides in chronic heart failure: a mechanistic clinical study [J]. *Eur J Heart Fail*, 2019, 21(5): 598-605.
- [2] Broughton KM, Wang BJ, Firouzi F, et al. Mechanisms of cardiac repair and regeneration [J]. *Circ Res*, 2018, 122(8): 1151-1163.
- [3] Federico M, Portiansky EL, Sommese L, et al. Calcium - calmodulin - dependent protein kinase mediates the intracellular signalling pathways of cardiac apoptosis in mice with impaired glucose tolerance [J]. *J Physiol*, 2017, 595(12): 4089-4108.
- [4] Chang H, Li C, Wang Q, et al. QSKL protects against myocardial apoptosis on heart failure via PI3K/Akt-p53 signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16986.
- [5] Frangogiannis NG. The role of transforming growth factor (TGF)- β in the infarcted myocardium [J]. *J Thorac Dis*, 2017, 9 (Suppl 1): S52-S63.
- [6] Heger J, Warga B, Meyering B, et al. TGF- β receptor activation enhances cardiac apoptosis via SMAD activation and concomitant NO release [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(10): 2683-2690.
- [7] Baker JE, Su J, Koprowski S, et al. Thrombopoietin receptor agonists protect human cardiac myocytes from injury by activation of cell survival pathways [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2015, 352 (3): 429-437.
- [8] 张东涛, 黄伟哲, 陈喜珊. 促血小板生成素的体外心肌细胞保护作用研究 [J]. *岭南心血管病杂志*, 2013, 19(6): 726-729.
- [9] Ahmad S, Panda B P, Kohli K, et al. Folic acid ameliorates celecoxib cardiotoxicity in a doxorubicin heart failure rat model [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 1295-1303.
- [10] Ellis R, Holland AE, Dodd K, et al. Reliability of one-repetition maximum performance in people with chronic heart failure [J]. *Disabil Rehabil*, 2019, 41(14): 1706-1710.
- [11] Boehm M, Komajda M, Borer JS, et al. Duration of chronic heart failure affects outcomes with preserved effects of heart rate reduction with ivabradine: findings from SHIFT [J]. *Eur J Heart Fail*, 2018, 20(2): 373-381.
- [12] Grozovsky R, Begonja A J, Liu K, et al. The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling [J]. *Nat Med*, 2015, 21(1): 47-54.
- [13] Cuccurullo A, Greco E, Lupia E, et al. Blockade of thrombopoietin reduces organ damage in experimental endotoxemia and polymicrobial sepsis [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (3): e0151088.
- [14] 王晓东, 陈美苑, 曾志, 等. 促血小板生成素对化学性缺氧诱导的 P C12 细胞凋亡的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(3): 409-414.
- [15] Besbes S, Shah S, Al-Dybiat I, et al. Thrombopoietin secretion by human ovarian cancer cells [J]. *Int J Cell Biol*, 2017: 1873834.
- [16] Larsen SB, Grove EL, Neergaard-Petersen S, et al. Thrombopoietin and platelet aggregation in patients with stable coronary artery disease [J]. *Platelets*, 2017, 28(8): 822-824.
- [17] Wang H, Wang H, Liang EY, et al. Thrombopoietin protects H9C2 cells from excessive autophagy and apoptosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15 (1): 839-848.
- [18] Chan KY, Zhou L, Xiang P, et al. Thrombopoietin improved ventricular function and regulated remodeling genes in a rat model of myocardial infarction [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 167(6): 2546-2554.
- [19] Jung MH. A Case of reversible but highly vulnerable adriamycin-induced cardiomyopathy: a multi-modality imaging approach [J]. *J Cardiovasc Imaging*, 2019, 27(2): 156-157.
- [20] Li S, Guo K, Wu J, et al. Altered expression of c-kit and nanog in a rat model of Adriamycin-induced chronic heart failure [J]. *Am J Cardiovasc Dis*, 2017, 7(2): 57-63.
- [21] Rogers C, Fernandes-Alnemri T, Mayes L, et al. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14128.
- [22] Wei Y, Kim TJ, Peng DH, et al. Fibroblast-specific inhibition of TGF- β 1 signaling attenuates lung and tumor fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(10): 3675-3688.
- [23] Salvarani N, Maguy A, De S AS, et al. TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1) Plays a Pivotal Role in Cardiac Myofibroblast Arrhythmogenicity [J]. *Circ-Arrhythmia Elec*, 2017, 10 (5): e004567.
- [24] 刘茂, 陈剑, 姚婕榕, 等. 雷公藤内酯上调 PTEN 信号通路减轻异丙肾上腺素诱导的慢性心力衰竭大鼠心室重构 [J]. *中山大学学报医学科学版*, 2017, 38(1): 29-35.
- [25] 韩安邦, 张健, 路迎冬, 等. 芪蒴强心胶囊对心肌梗死大鼠心肌纤维化及 TGF- β 1/Smad3 信号通路的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2017, 40(1): 41-47.