

周高峰,肖静,周佳,等. 鹿茸多肽介导 TGF- β /smads 对心梗后心肌缺血损伤大鼠保护作用及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 49-56.

Zhou GF, Xiao J, Zhou J, et al. Protective effect and mechanism of TGF- β /smads mediation by antler polyskin on post-infarction myocardial ischemic injury in rats [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 49-56.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.007

鹿茸多肽介导 TGF- β /smads 对心梗后心肌缺血损伤大鼠保护作用及机制研究

周高峰¹,肖静^{1,2},周佳¹,刘俊秀¹,律广富³,王雨辰¹,林贺^{1*},黄晓巍^{1*}

(1.长春中医药大学药学院,长春 130117;2.中国医学科学院药用植物研究所,北京 100094;
3.长春中医药大学吉林省人参科学研究院,长春 130117)

【摘要】 目的 观察鹿茸多肽(velvet antler peptide,VAP)对冠状动脉左前降肢结扎后心肌梗死缺血及纤维化损伤大鼠的保护作用,阐明 VAP 介导 TGF- β /smads 信号通路的作用机制。方法 60 只大鼠随机分为 6 组:假手术组(SHAM group)、模型组(MI group)、卡托普利阳性药对照组(KTPL group,30 mg/kg)、鹿茸多肽低、中、高剂量组(VAP group,100、200、300 mg/kg)。大鼠采用冠状动脉左前降肢结扎法复制大鼠心肌损伤模型,制备模型 3 d 后大鼠经口服(灌胃)给药,灌胃 1 mL/d,连续 28 d。末次给药 2 h 后,麻醉大鼠经腹主动脉无菌采血并离心取血清。心电图分析其心肌损伤程度。HE 染色法观察各组大鼠心脏切片病理形态学改变;ELISA 法检测各组大鼠血清中肌酸激酶同工酶(CK-MB)、心肌肌钙蛋白(cTn)水平;Western blot 法检测各组大鼠心肌组织 Collagen I、Collagen III、TGF- β 1、Smad7、Smad4、Smad2/3、p-Smad2/3 相关蛋白水平。结果 心电图分析表明,通过 ST 段抬高、T 波倒置、Q 波形成的变化提示心肌损伤。HE 染色发现,与 SHAM 组比较,MI 组大鼠心肌纤维排列紊乱、横向条纹消失,细胞肿胀破裂、坏死,细胞核变形移位;与 MI 组相比,KTPL 组和 VAP 组大鼠心肌病理学形态明显改善。ELISA 法检测,与 SHAM 组相比,MI 组大鼠的 CK-MB、cTnT 和 cTnI 含量被明显诱导($P<0.01$);与 MI 组相比,KTPL 组和 VAP 组大鼠心肌组织中 CK-MB、cTnT 和 cTnI 含量明显降低($P<0.01$)。Western blot 法检测,与 SHAM 组相比,MI 组大鼠通过上调 TGF- β 1、Smad7、Smad4、Smad2/3、p-Smad2/3、Collagen I、Collagen III 蛋白表达水平及下调 Smad7 表达水平导致心肌损伤($P<0.01$);与 MI 组比较,KTPL 组和 VAP 组大鼠显著下调 TGF- β 1、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad4、Collagen I、Collagen III 蛋白表达水平及升高 Smad7 蛋白表达量,改善纤维化($P<0.01$)。结论 心肌缺血梗死大鼠能激活 TGF- β /smads 信号转导,通过卡托普利及鹿茸多肽给药后可抑制 TGF- β 1、smads 蛋白改善心肌梗死后心肌纤维化。鹿茸多肽(VAP)可能通过调控 TGF- β /smad 信号通路保护心肌梗死后心肌缺血及纤维化损伤。

【关键词】 鹿茸多肽;TGF- β /smad 信号通路;心肌纤维化损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2022) 11-0049-08

Protective effect and mechanism of TGF- β /smads mediation by antler polyskin on post-infarction myocardial ischemic injury in rats

【基金项目】 2020 年度吉林省卫生与健康委员会技术创新项目(2020J068);2021 年度吉林省发展和改革委员会创新能力建设项目(2021C011)。

【作者简介】 周高峰(1995—),女,硕士研究生,研究方向:心血管及内分泌药理,E-mail:zgf951001@163.com

【通信作者】 黄晓巍(1972—),女,博士,主任药师,研究方向:心血管及内分泌药理。E-mail:15948000740@163.com

林贺(1982—),男,博士,副教授,研究方向:中药药理学。E-mail:linhe@ccucm.edu.cn

* 共同通信作者

ZHOU Gaofeng¹, XIAO Jing^{1,2}, ZHOU Jia¹, LIU Junxiu¹, LYU Guangfu³, WANG Yuchen¹, LIN He^{1*}, HUANG Xiaowei^{1*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China.

2. the Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100094.

3. Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117)

【Abstract】 Objective To observe the protective effects of velvet antler peptide (VAP) on myocardial infarction (MI) ischemia and fibrosis injury in rats after coronary artery ligation and the mechanism of TGF- β /Smad signaling pathway mediation by VAP. **Methods** 60 SPF male Wistar rats were randomly divided into six groups: Sham operation; MI; positive drug control (captopril, 30 mg/kg); low-, medium-, and high-dose (100, 200, and 300 mg/kg) VAP groups. The left anterior descending limb of the coronary artery was ligated to provide a model of myocardial injury in rats. Three days after the model was made, the rats were orally administered with 1 mL/d VAP for 28 days. Two hours after the last administration, we collected blood aseptically from the abdominal aorta of anesthetized rats and centrifuged the samples to obtain VAP serum. Electrocardiogram was used to analyze the degree of myocardial injury. HE staining was used to observe pathological changes in the myocardial tissue of rats. Serum creatine kinase isoenzyme (CK-MB) and cardiac troponin (cTn) levels were measured by enzyme linked immunosorbent assay ELISA. The levels of TGF- β 1, Smad2/3, p-Smad2/3, Smad4, Smad7, Collagen I and Collagen III proteins in myocardial tissue were detected by Western blot. **Results** HE staining in the MI group showed that myocardial fibers group were disordered; transverse stripes had disappeared; cells were swollen, cracked, and necrotic; and nuclei were deformed and displaced compared with the findings in the Sham group. The pathological morphology of myocardium in KTPL group and VAP group was significantly improved compared with that in the MI group. ELISA showed significantly higher CK-MB, cTnT (cardiac troponin T), and cTnI (cardiac troponin I) levels in the MI group compared with the findings in the Sham group ($P < 0.01$). There were significantly lower CK-MB, cTnT, and cTnI contents in the myocardial tissue of positive drug control group KTPL and VAP groups compared with the findings in the MI group ($P < 0.01$). The Western blot showed that myocardial injury was caused by the up-regulation of TGF- β 1, Smad2/3, p-Smad2/3, Smad4, Collagen I and Collagen III and down-regulation of Smad7 protein expression in the MI group ($P < 0.01$). Compared with the findings in the Sham group. The expression of TGF- β 1, Smad2/3, p-Smad2/3, Smad4, Collagen I and Collagen III were significantly down-regulated and Smad7 was up-regulated in the KTPL group and VAP group, which improved fibrosis ($P < 0.01$). **Conclusions** MI rats activate TGF- β /Smad signal transduction, and captopril and VAP inhibit TGF- β 1 and Smad proteins to improve myocardial fibrosis after MI. VAP may protect against myocardial ischemia and fibrosis after MI by regulating the TGF- β /Smad signaling pathway.

【Keywords】 velvet antler peptide; transforming growth factor- β 1 signaling pathway; myocardial fibrosis

心血管疾病已严重威胁全球患者的健康,患病人群数全球最高且治疗效果不佳导致的死亡人数在我国也达到最高^[1]。缺血性心脏病是以心肌组织、细胞缺血损伤为主要病理特点,临床上以胸闷心痛、心悸气短为主要症状,缺血严重时会导致急性心肌梗死;当心肌梗死发生时,人体心脏供血不足导致冠状动脉发生堵塞,心肌组织出现缺血、缺氧,直接导致细胞和组织炎性坏死,心肌代谢紊乱等病理生理反应^[2]。为了使缺血心肌组织重新获得血液供应,目前对于心肌缺血梗死最主要的治疗方法为溶栓和经皮冠状动脉介入,而这类治疗方法通常导致缺血再灌注损伤且预后不良,如导致心肌钙化、纤维化损伤。心肌纤维化会导致心脏的收缩舒张功能受到影响导致心室重构,最终演变为心力衰竭。减轻心肌纤维化损伤可一定程度地改善心

肌梗死后严重后果,已有研究对心肌梗死纤维化进入更深层次的剖析并探究进一步^[3]。

鹿茸为鹿科动物梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 或马鹿 *Cervus elaphus* Linnaeus 的雄鹿未骨化密生茸毛的幼角,药性甘、咸、温,归肾、肝经,是传统医学中经典的补阳益血药物,其显著特点为具有完全再生能力;生精补髓等功效常用于肾阳不足,精血亏虚等各类疾病导致的一切虚损^[4]。鹿茸多肽(velvet antler peptide, VAP)是从梅花鹿茸中提取的一种多肽物质。经本课题组前期研究,鹿茸酸提醇沉法提取,对梅花鹿二杠茸(购自吉林省鸿宇鹿业科技有限公司)进行提取分离,经双缩脲法及蛋白质分子量检测最终得到其分子量为 3.2×10^3 、含有 17 种必需及非必需氨基酸。鹿茸多肽对心肌缺血梗死损伤、心肌缺血再灌注、冠心病、心绞痛等具有改善及

保护作用^[5]。VAP 明显降低阿霉素诱导心肌损伤模型大鼠心肌组织中转化生长因子- β (TGF- β 1) 的蛋白表达水平,减少心肌细胞凋亡,保护心肌组织^[6]。在本研究中,我们将大鼠采用冠状动脉左前降肢结扎法诱导心肌缺血后心肌纤维化损伤,探究鹿茸多肽对心肌缺血损伤大鼠的保护作用及潜在机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠,60 只,均为雄性,体重(180 \pm 20)g,来源于长春亿斯实验动物技术有限公司[SCXK(吉)2020-0002]。本研究所有动物实验操作完全遵守实验动物伦理保护法及 3R 原则,并经长春中医药大学动物实验伦理委员会批准通过(2020039)。实验动物的饲养给药及制备模型和给药后的组织取材均于长春中医药大学实验动物中心实验设施内进行[SYXK(吉)2018-0014],动物饲养条件:大鼠自由进食、饮水,12 h/12 h 光明/黑暗循环、恒温(21 $^{\circ}$ C~24 $^{\circ}$ C)、恒湿(40%~60%),适应性饲养 3 d。

1.2 主要试剂与仪器

鹿茸多肽(velvet antler polypeptide, VAP):生药鹿茸每 28.9 g 可制备 1 g 鹿茸多肽,批号:20201120,制备于长春中医药大学药学院;卡托普利(上海普康药业有限公司,批号:201201);CK-MB、cTnT、cTnI ELISA 试剂盒(江苏酶免生物科技有限公司,批号:MM-0625R1、MM-0795R1、MM-61550R1);HE 染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:C0105S);TGF- β 1、Smad3、Smad4、Smad7、Smad2、Collagen I、Collagen III 一抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:21898-1-AP、25494-1-AP、10231-1-AP、12570-1-AP、25840-1-AP、14695-1-AP、22734-1-AP);p-Smad2+3 抗体(北京索莱宝科技有限公司,批号:K009346P)。

HX-300S 小动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司);Multiskan FC 酶联免疫检测仪(美国赛默飞世尔科技公司);ML22 心电图仪(埃德仪器国际贸易有限公司);Centrifuge 5810R 4 $^{\circ}$ C 台式低温离心机(德国艾本德股份公司);DM250 生物显微镜(德国 LEICA 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型制备及分组

采用随机平行对照法将 60 只大鼠分为 6 组:假

手术组(SHAM group)、模型组(MI group)、卡托普利阳性药对照组(KTPL group,30 mg/kg)、鹿茸多肽低、中、高剂量组(VAP group,100、200、300 mg/kg)。健康雄性大鼠禁食 12 h,1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)进行麻醉。麻醉固定大鼠,剪去颈部毛发,在气管处切一小口后插入导管再与小动物呼吸机相连接,进行辅助呼吸,待呼吸平稳后,左侧第 3、4 肋间用手术钳开胸固定,用手术钳挤出心脏后,等待 30 s 恢复心跳搏动正常,使用蚕丝不可降解的手术丝线穿过心脏左心耳下的冠状动脉左前降肢(LAD),用止血钳夹紧穿过丝线进行左前降肢的结扎,结扎后快速将心脏放回原位置,观察心电图情况,待自主呼吸平稳后为防止气胸将胸腔内气体排空后用 0 号线进行缝合胸口及气管伤口,并严密观察生命迹象^[7]。术后 3 d 腹腔注射 10 万单位青霉素防感染。3 d 后进行心电图检测,观察到心电图 ST 段抬高 0.1 mV 以上或有病理性 Q 波迹象,表明心肌梗死缺血损伤大鼠模型制备成功。各组均口服灌胃给药,每日 1 次,连续给药 28 d,所有动物均自由饮食。

1.3.2 大鼠一般状态观察及体重检测

给药后观察各组大鼠的体毛光泽度、精神状态、饮食饮水量等情况;并记录大鼠体重进行分析。

1.3.3 心电图检测

造模和造模后 3 d,连接心电图仪观察 ST 段、T 波和病理性 Q 波等情况,比较各组大鼠心电图 ST 段等变化情况,观察有无缓解心肌损伤程度。

1.3.4 ELISA 法检测各组大鼠心肌肌钙蛋白(cTnT、cTnI)、肌酸激酶同工酶 CK-MB 水平

按江苏酶免 ELISA 试剂盒说明书检测大鼠血清中 cTnT、cTnI 和 CK-MB 表达水平,按说明书方法进行检验并用 Curve Expert 软件进行数据整理。

1.3.5 HE 染色观察大鼠心肌组织病理变化

大鼠处死后,剥离大鼠的心肌组织,使用 4%多聚甲醛进行固定,24 h 之后将心脏进行脱水和石蜡包埋,切片后将心肌组织样本分别依次浸泡于二甲苯和乙醇,脱蜡脱水,染色后,在生物显微镜下察看各组心脏切片病理形态学改变。

1.3.6 Western blot 检测大鼠心肌组织 TGF- β 1、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad4、Smad7、Collagen I 和 Collagen III 的表达水平

-80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱取出并解冻大鼠心肌组织,蛋白定量后配置好电泳液、转膜液后,进行制胶,每孔上样 20 μ L 蛋白进行凝胶电泳,90 min 后湿转至

PVDF 膜上,转膜 60 min,5%脱脂奶粉封闭液封闭 1 h, TBST 洗膜后加入兔抗 GAPDH、TGF- β 1、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad4 和 Smad7、Collagen I 和 Collagen III 一抗,孵育过夜,加二抗,后用发光显色液进行显色分析,以 GAPDH 为内参,进行灰度值分析,每个条带检测 3 次灰度值后取平均值。目的蛋白表达量为目的蛋白条带和 GAPDH 的比值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计学分析。所有实验数据均采用平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验。以 $P<0.05$ 被认为差异显著,具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况观察

与 SHAM 组比较,MI 组大鼠精神欠佳、毛发松软,体重增长较慢,进食及饮水量减少明显;与 MI 组比较,KTPL 组、鹿茸多肽高、中、低剂量组大鼠精神尚可,体重增长较好,进食饮水量缓慢增加。各组大鼠体重显示:与 SHAM 组比较,MI 组大鼠体重明显降低($P<0.01$);与 MI 组比较,KTPL 组、鹿茸多肽各组大鼠体重明显升高($P<0.01$)。见图 1。

2.2 各组大鼠心电图水平

与 SHAM 组比较,MI 组大鼠心电图 ST 段明显升高,具有病理性 Q 波,结果表明心肌缺血损伤大鼠模型复制成功。见图 2。

2.3 各组大鼠血清 cTnT、cTnI 和 CK-MB 水平

与 SHAM 组比较,MI 组大鼠血清中 cTnT、cTnI 和 CK-MB 水平升高显著($P<0.01$);与 MI 组比较,KTPL 组、鹿茸多肽各组大鼠血清中 cTnT、cTnI 和 CK-MB 水平显著降低,具有统计学意义($P<0.01$)。结果表明,VAP 能改善心肌缺血梗死后大鼠的心肌功能。见图 3。

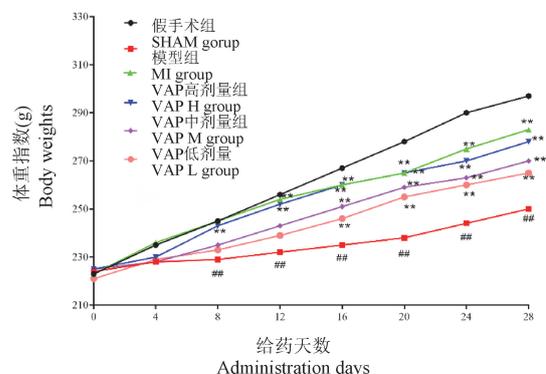
2.4 各组大鼠心肌组织 HE 染色

SHAM 组大鼠心肌组织结构正常,肌束完整且均匀,未见炎性细胞浸润、弥漫性水肿等病理现象发生。SHAM 组比较,MI 组大鼠心肌组织排列不均匀、多处肿胀破裂、坏死,炎性细胞浸润,横向条纹消失,细胞核变形移位。与 MI 组比较,TKPL 组、鹿茸多肽治疗组给药后的大鼠心肌组织肌束排列较均匀,未见明显细胞肿胀破裂坏死等病理情况。结

果表明,VAP 能改善大鼠梗死缺血心肌组织的病理损伤。见图 4。

2.5 各组大鼠心肌组织 TGF- β 1、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad4、Smad7、Collagen I 和 Collagen III 的表达水平

与 SHAM 组相比,MI 组大鼠心肌组织 TGF- β 1、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad4、Collagen I 和 Collagen III 蛋白表达水平升高($P<0.01$),Smad7 表达水平降低($P<0.01$);与 MI 组比较,KTPL 组和鹿茸多肽组大鼠 TGF- β 1、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad4、Collagen I 和 Collagen III 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$),Smad7 表达水平升高($P<0.01$)。结果表明,VAP 能缓解大鼠心肌纤维化损伤。见图 5。

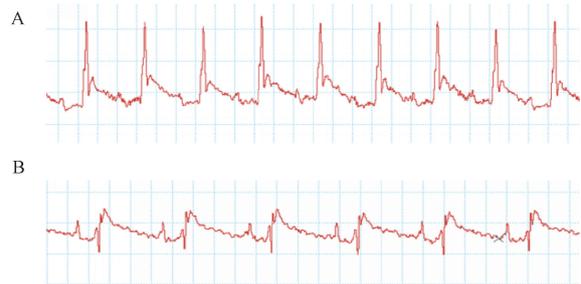


注:与模型组相比, ** $P<0.01$;与假手术组相比, ### $P<0.01$ 。

图 1 各组大鼠的体重指数变化($n=6$)

Note. Compared with MI group, ** $P<0.01$. Compared with Sham group, ### $P<0.01$.

Figure 1 Changes in body mass index of ischemic rats in each group

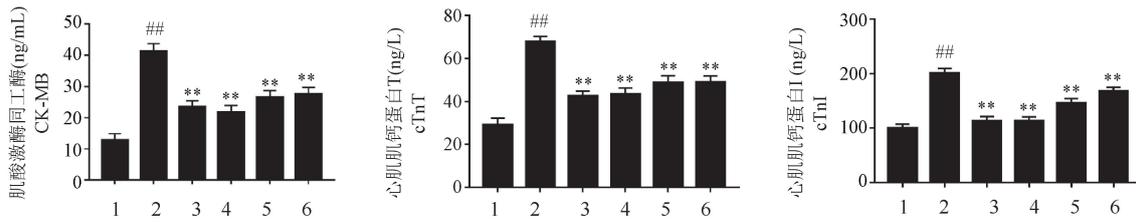


注:A:假手术组 SHAM 组大鼠的心电图(ECG)改变;B:模型组大鼠的心电图(ECG)改变。

图 2 冠脉结扎后大鼠心电图水平

Note. A, ECG changes of sham group of rats. B, ECG changes of rats in model group.

Figure 2 Electrocardiogram levels in rats after coronary artery ligation

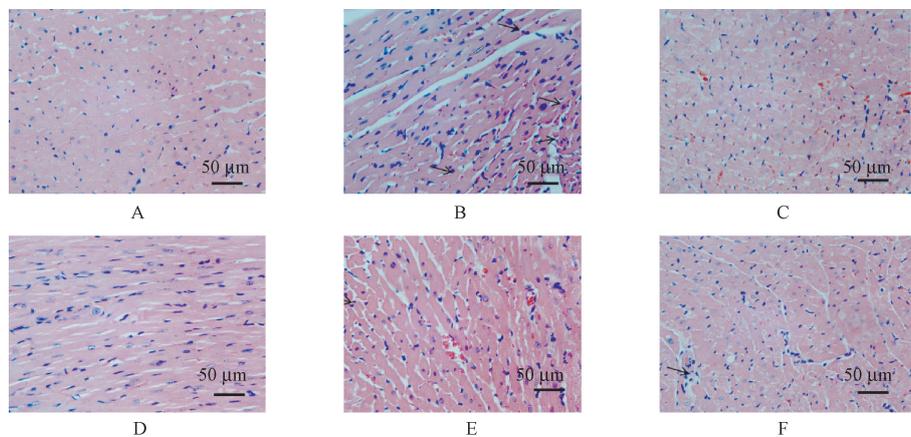


注:与模型组相比, ** $P < 0.01$;与假手术组相比, ^{##} $P < 0.01$ 。1:假手术组;2:模型组;3:卡托普利阳性药对照组;4:鹿茸多肽高剂量组;5:鹿茸多肽中剂量组;6:鹿茸多肽低剂量组。

图3 各组大鼠血清中 CK-MB, cTnT 和 cTnI 水平 (n=6)

Note. Compared with MI group, ** $P < 0.01$. Compared with Sham group, ^{##} $P < 0.01$. 1, Sham group. 2, MI group. 3, KTPL group. 4, VAP H group. 5, VAP M group. 6, VAP L group.

Figure 3 CK-MB, cTnT and cTnI levels in serum of rats in each group



注:A:假手术组;B:模型组;C:卡托普利阳性药对照组;D:鹿茸多肽高剂量组;E:鹿茸多肽中剂量组;F:鹿茸多肽低剂量组。黑色箭头向上表示细胞肿胀坏死,黑色箭头向下表示炎性细胞浸润。

图4 各组大鼠心肌组织的 HE 染色

Note. A, Sham group. B, MI group. C, KTPL group. D, VAP H group. E VAP M group. F, VAP L group. The black arrow upward indicates cell swelling and necrosis, and the black arrow downward indicates inflammatory cell infiltration.

Figure 4 HE staining of heart tissue of rats in each group

3 讨论

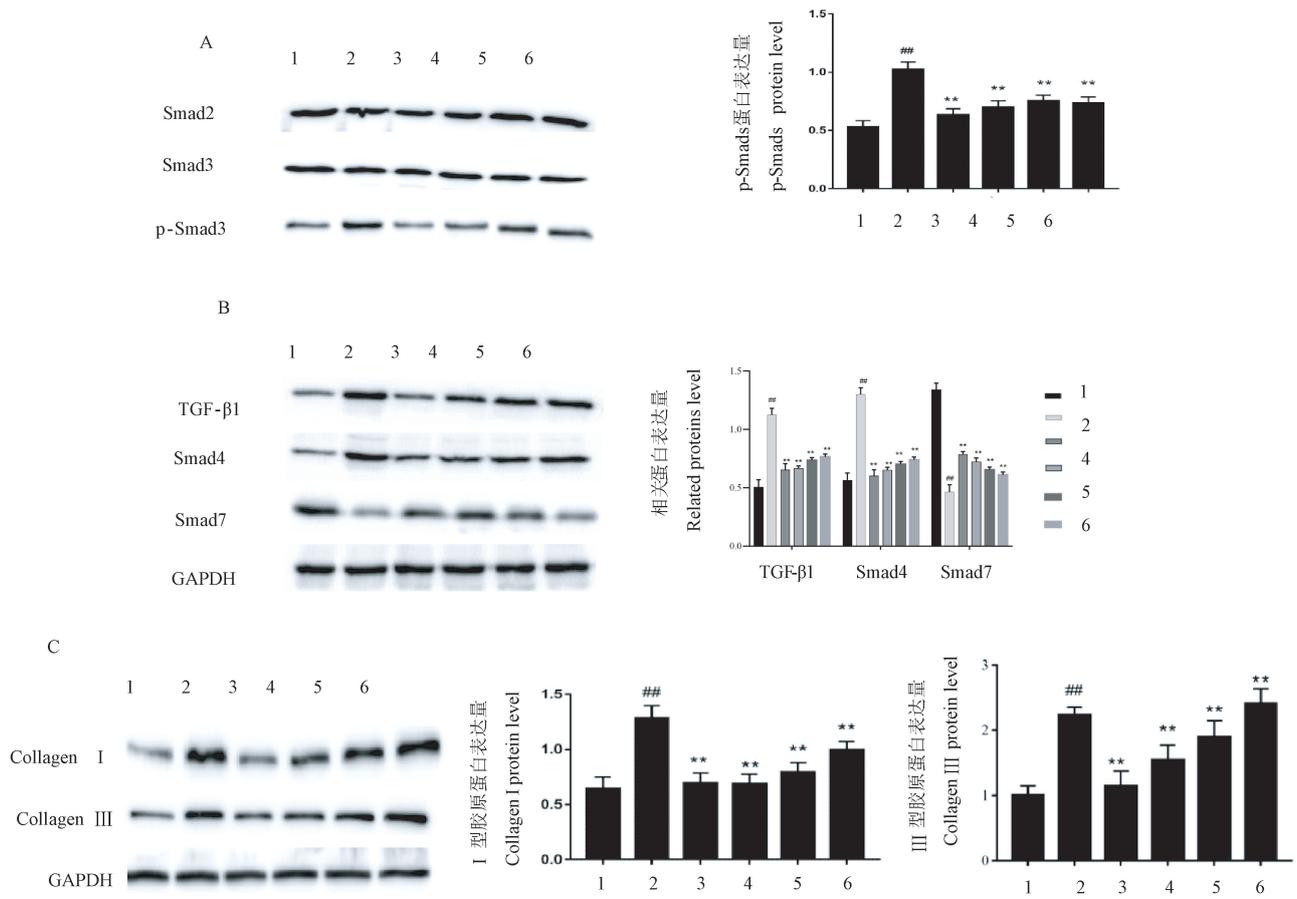
为观察鹿茸多肽对心肌缺血梗死损伤的影响,本研究采用结扎大鼠冠状动脉左前降支模拟心肌梗死病理过程,此法为心肌缺血损伤常用动物造模方法。经观察大鼠心电图改变,将模型制备成功大鼠分组后给药不同剂量鹿茸多肽,后检测相关生化指标,比较大鼠心肌组织病理形态学变化等,评价鹿茸多肽对 MI 引起的大鼠心肌损伤的保护作用。

心电图检测是反应人体心脏生理病理变化的重要检查方法之一,当人体发生心肌梗死、急性心绞痛等病理反应后,心电图特点为 ST 段会呈弓背样抬高, T 波倒置,病理性 Q 波出现等。因此通常采用心电图判断造模的成功与否。实验结果表明,结扎大鼠冠状动脉左前降支后大鼠心电图, ST 段立即

抬高, T 波倒置、Q 波形成,表明造模成功^[7]。

心肌缺血梗死大鼠的心脏组织会发生心肌纤维排列不均匀;心肌纤维大量断裂;出现较多炎性细胞浸润;细胞核移位等^[8]。因此,本研究对术后的的心脏组织切片进行 HE 染色,观察心肌纤维化及炎性浸润情况。结果显示, MI 组大鼠心肌组织出现明显的病理形态学改变,而 KTPL 组、鹿茸多肽给药组均可减少 MI 组大鼠细胞的肌纤维断裂、炎性细胞浸润减少,提示鹿茸多肽能够改善心肌组织缺血损伤的病理学改变。

为进一步明确鹿茸多肽对 MI 大鼠心肌组织的保护作用,本研究检测了鹿茸多肽对 MI 大鼠血清中肌酸激酶同工酶(creatine kinase-MB, CK-MB),心肌肌钙蛋白 T (troponin T, cTnT) 和心肌肌钙蛋白 I (troponin I, cTnI) 的影响。cTnT 和 cTnI 在心肌组织



注:A:鹿茸多肽对 Smad2/3 蛋白表达量的影响;B:鹿茸多肽对 TGF-β, Smad4, Smad7 蛋白表达的影响;C:鹿茸多肽对 Collagen I、Collagen III 蛋白表达的影响。1:假手术组;2:模型组;3:卡托普利阳性药对照组;4:鹿茸多肽高剂量组;5:鹿茸多肽中剂量组;6:鹿茸多肽低剂量组。与模型组相比, ** $P < 0.01$;与假手术组相比, ^{##} $P < 0.01$ 。

图 5 VAP 对 Smad2/3、Smad4、Smad7 蛋白表达量的影响 ($n = 3$)

Note. A, Effect of VAP on Smad2/3 protein expression. B, Effect of VAP on TGF-β1, Smad4, Smad7 protein expression. C, Effect of VAP on Collagen I and Collagen III proteins. 1, Sham group. 2, MI group. 3, KTPL group. 4, VAP H group. 5, VAP M group. 6, VAP L group. Compared with MI group, ** $P < 0.01$. Compared with Sham group, ^{##} $P < 0.01$.

Figure 5 Effect of VAP on the expression level of Smad2/3, Smad4 and Smad7

中的含量丰富,可作为心肌缺血或梗死损伤的标志物。研究表明,大鼠发生心肌缺血缺氧后诱导心肌细胞凋亡,引起血液中 cTnT 和 cTnI 含量升高,导致心肌功能不全,VAP 能降低 cTn 在血液中的含量,改善心肌功能^[9-10]。肌酸激酶同工酶 (creatin kinase-MB, CK-MB) 是存在于心肌组织中高灵敏度的生化标志物,属凋亡指标,一旦有心肌损伤发生可释放到血液中,表明心肌细胞凋亡损伤^[11]。卢迎宏等^[12]发现,在缺血再灌注造模大鼠的心肌组织中,CK-MB 和 cTnI 水平显著升高,TGF-β 蛋白表达量水平明显上调。实验研究结果表明,与 MI 组比较,KTPL 组、鹿茸多肽各组大鼠血清中 cTnT、cTnI 和 CK-MB 水平显著降低,示鹿茸多肽减轻心肌梗死导致的心肌损伤。

心肌纤维化是由于心肌缺血梗死,冠状动脉粥样硬化等原因导致,各种病因所引起的心肌纤维化损伤其发病机制不同^[13]。心肌纤维化的发生发展涉及多种信号通路,心肌梗死缺血、钙化纤维化、心衰等导致如 TGF-β/Smad 信号通路等多种信号通路激活或抑制^[14]。TGF-β/Smads 是经典的纤维化通路,信号转导异常会导致肿瘤、组织纤维化,心血管疾病等,在心肌梗死、纤维化损伤后心肌组织中高表达^[15]。心肌缺血梗死纤维化损伤能激活 TGF-β1,使活化的 TGF-β1 与 Smad2/3、Smad4 相互作用,激活 Smad2、Smad3 和 Smad4 转录因子蛋白表达,构成异源三聚体,进而在细胞核内发生纤维化及炎症反应^[16]。研究表明,对于阿霉素损伤大鼠模型,鹿茸多肽可降低 TGF-β1 的蛋白表达水平,保护心肌

组织^[17]。

TGF- β 信号通路有较强的促纤维化作用,使纤维细胞明显上调 I (Collagen I)、III (Collagen III) 型胶原蛋白表达量,导致心肌纤维结缔组织产生缺损,程度严重可导致器官硬化进而衰竭;而敲除 Smad3 基因后能有效缓解心肌纤维化,缓解心室重塑导致心衰等不良后果,修复心功能^[18]。心肌细胞外基质 (extracellular matrix) 大致由 Collagen I 和 Collagen III 组成,两种类型蛋白的比例保持相对平衡。心肌成纤维细胞分泌 Collagen I、Collagen III,其蛋白含量升高会导致引起导致心肌纤维化损伤^[19]。心肌缺血损伤发生后 TGF- β 1 过表达并进一步升高 Collagen I 和 Collagen III 蛋白的表达,导致心肌胶原沉积,表明心肌梗死后进一步发展为心肌纤维化损伤,影响心脏的泵血机能,使心输血量 and 动脉血压异常,不能满足机体所需,进而引起急慢性心衰^[20]。

该项实验结果也与上述研究相呼应,Western blot 结果显示,与 MI 组比较,KTPL 组和 VAP 给药组降低心肌组织中 TGF- β 1、Smad2/3、Smad4 蛋白表达水平,并进一步降低 Collagen I 和 Collagen III 的蛋白表达水平,示鹿茸多肽可通过 TGF- β /smads 信号转导通路降低心肌胶原蛋白表达水平达到保护心肌细胞。

阳性药卡托普利为血管紧张素 I 转化酶抑制剂药,主要治疗高血压及心力衰竭,可通过降低 TGF- β 1、CTGF 的表达,改善心肌纤维化作用,抗心肌细胞凋亡,达到逆转心室重塑、改善心功能;对心肌缺血损伤,卡托普利可作为阳性药物观察药物干预效果^[21];而鹿茸多肽作为保护心脏微血管的内皮细胞,可提高内皮祖细胞活力,进而修复其微血管损伤,还可直接保护心肌细胞,减少心肌细胞凋亡,减少心肌纤维化^[22]。卡托普利使血液中血管紧张素水平下降并降低血管壁张力,以降低血压及治疗心脏衰竭,其主要应用于血压升高及心肌衰竭,鹿茸多肽则保护心肌细胞,避免心肌细胞进一步损伤及改善心肌组织纤维化损伤^[23-24]。

综上所述,鹿茸多肽可以改善冠状动脉左前降肢结扎诱导的大鼠心肌梗死缺血后纤维化损伤。VAP 降低血清中 cTnT、cTnI 和 CK-MB 水平,达到增强心肌组织抗凋亡作用,调控 TGF- β /samds 表达水平,降低心脏胶原蛋白 I、III 的表达以达到抗纤维化作用,改善心肌组织病理状态,缓解心肌组织损伤。

参考文献:

[1] 任良强,侯晓晓,乔平,等. 脐血单个核细胞对急性心肌梗

死大鼠血管新生的促进作用及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(5): 72-77.

- [2] 梁杏梅,刘喜华,黄建春,等. 玉朗伞查尔酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠 NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 35-41.
- [3] 陈慧洋,娄利霞,赵一舟,等. 芪丹利心丸对心肌梗死大鼠左心室心肌组织 miR-133a/TGF- β 1/CTGF 信号通路的影响 [J]. 中医杂志, 2018, 59(20): 1771-1776.
- [4] 李琳,叶彤,陈文凤,等. 鹿茸多肽功能的研究进展 [J]. 吉林医药学院学报, 2020, 41(1): 54-56.
- [5] 肖响. 鹿茸蛋白修复缺血缺氧诱导的心肌细胞及心脏微血管损伤的机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [6] Xu Y, Qu X, Zhou J, et al. Pilose antler peptide-3.2KD ameliorates adriamycin-induced myocardial injury through TGF- β /Smad signaling pathway [J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 659643.
- [7] 吕童,宫丽鸿,肖福龙,等. 搜风祛痰中药对大鼠心肌缺血再灌注损伤冠脉微循环内皮功能的保护作用 [J]. 中国中医急症, 2019, 28(12): 2091-2094.
- [8] 黄汕梅,李畅,马梓珊,等. 含服硝石雄黄散保护小鼠缺血心肌的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 19-26.
- [9] Wang Q, An Y, Wang H, et al. The clinical significance of changes in cTnT, CRP and NT-proBNP levels in patients with heart failure [J]. Am J Transl Res, 2021, 13(4): 2947-2954.
- [10] 李鑫,律广富,韩冬,等. 鹿茸多肽对阿霉素诱导 H9c2 细胞损伤保护作用的研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(10): 1089-1093.
- [11] 菲尔达吾斯·萨依然. 芪蒴强心胶囊联合曲美他嗪对冠心病心力衰竭患者左心室重构及血清 NT-proBNP、CK-MB、cTnI 水平的影响 [J]. 新疆医学, 2021, 51(10): 1145-1148.
- [12] 卢迎宏,王丹,井海云,等. 胰激肽原酶缓解心肌缺血再灌注损伤大鼠氧化应激和纤维化 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 23-30.
- [13] Nie L, Liu M, Chen J, et al. Hydrogen sulfide ameliorates doxorubicin-induced myocardial fibrosis in rats via the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Mol Med Rep, 2021, 23(4): 299.
- [14] 张丹,惠菊,郭家娟. 解毒通络方通过 TGF- β 1/Smad 和 ROCK 通路对大鼠心肌纤维化的改善作用 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2021, 47(4): 826-833.
- [7] 任建勋,史雅红,杨斌,等. 大鼠急性心肌缺血损伤后心脏结构和功能改变的超声心动图评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(7): 17-23.
- [15] 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.
- [16] 马博,李建刚,王俊,等. miR-106b 靶向调控 TGF- β /Smad 通路对结肠癌细胞侵袭和迁移的促进作用 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2021, 47(3): 630-636.
- [17] 徐岩. 鹿茸多肽介导 TGF- β /Smads/ERK 信号通路对阿霉素诱导心肌损伤的保护作用及机制研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2020.
- [18] 代天,刘敏,杨萍,等. 乌梅有机酸基于 TGF- β /Smad 信号

- 通路对高糖诱导心肌纤维化的保护作用 [J]. 山西医科大学学报, 2021, 52(11): 1430-1435.
- [19] Zhang N, Sun Y. LncRNA ROR facilitates myocardial fibrosis in rats with viral myocarditis through regulating C-Myc expression [J]. *Eur Rev Med Pharmacol*, 2019, 23(24): 10982-10988.
- [20] 王璇. 曲古菌素 A 调控树突状细胞介导心肌梗死后成纤维细胞胶原表达的机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- [21] 陈慧洋. 益气活血药对心肌梗死大鼠 miR-133a 表达和左室重构的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [22] 张国荣, 孙振山. 鹿茸多肽的药理作用研究进展 [J]. *吉林中医药*, 2021, 41(9): 1252-1255.
- [23] 许云红. 卡托普利的药理作用与临床应用 [J]. *中国医学创新*, 2010, 7(16): 189-190.
- [24] 胡艳红, 颜鑫, 雷燕, 等. 鹿茸的化学成分、药理作用与临床应用研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2021, 23(9): 47-52.

〔收稿日期〕2022-04-29

(上接第 42 页)

- [18] Tanideh N, Keshavarzi F, Hemat Zadeh A, et al. Healing effects of human amniotic membrane and burned wool on the second-degree burn in rats [J]. *Galen Med J*, 2020, 9(1): e1759-e1767.
- [19] Wang B, Zhang A, Wang H, et al. MiR-26a limits muscle wasting and cardiac fibrosis through exosome-mediated microRNA transfer in chronic kidney disease [J]. *Theranostics*, 2019, 9(7): 1864-1877.
- [20] Moraes FC, Pichon C, Letourneur D, et al. MiRNA delivery by nanosystems: state of the art and perspectives [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(11): 1901-1920.
- [21] Chen H, Wang L, Zeng X, et al. Exosomes, a new star for targeted delivery [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9(1): 751079-751098.
- [22] Wang Z, Yan K, Ge G, et al. Exosomes derived from miR-155-5p-overexpressing synovial mesenchymal stem cells prevent osteoarthritis via enhancing proliferation and migration, attenuating apoptosis, and modulating extracellular matrix secretion in chondrocytes [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2021, 37(1): 85-96.
- [23] 宋晓婉, 梁璐. 间充质干细胞来源的外泌体对肺损伤的治疗作用及其潜在机制 [J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(11): 2107-2112.
- [24] 晏子友, 魏志鑫, 罗富里, 等. 尿毒症毒素通过刺激巨噬细胞外泌体分泌 miR-22 促进心肌细胞自噬 [J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(6): 1014-1019.
- [25] Farooqi AA, Desai NN, Qureshi MZ, et al. Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds [J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(1): 328-334.

〔收稿日期〕2022-03-22