doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2020.17.008

抗纤益心方对扩张型心肌病大鼠 Smad3 及其相关 miRNAs 的影响

杨 曦,熊 剑,魏云杰△

(湖北省十堰市太和医院·湖北医药学院附属医院心血管内科,湖北 十堰 442000)

摘要:目的 探讨抗纤益心方对扩张型心肌病大鼠 Smad3,miR－23－3p,miR－145－5p 表达的影响。**方法** 将 90 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组(A 组)、模型组(B 组)、卡托普利组(C 组)、抗纤益心方低剂量组(D 组)、抗纤益心方中剂量组(E 组)和抗纤益心方高剂量组(F 组)。A 组大鼠常规饲养,其余各组大鼠制备扩张型心肌病大鼠模型;制模成功后,B 组每日灌胃卡托普利 10.125 mg/kg,D 组、E 组、F 组每日分别灌胃抗纤益心方 4.7,9.4,18.8 mg/kg。药物干预 8 周后,检测大鼠心功能,取腹腔主动脉血,荧光定量聚合酶链式反应(PCR)法测定 miR－23－3p 和 miR－145－5p 的表达水平;取心肌组织,采用蛋白质印迹(WB)法测定 Smad3 蛋白表达;酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测匀浆液转化生长因子 β(TGF－β)、基质金属酶－1(MMP－1)及基质金属酶－1 抑制剂(TIMP－1)蛋白水平。**结果** 与 A 组相比,B 组大鼠的左室收缩末压(LVESP)和左心室内压最大上升/下降速率(±dp/dt_{max})明显下降,左室舒张末压(LVEDP)明显上升;与 B 组相比,C 组、D 组、E 组、F 组大鼠的 LVESP 和 ±dP/dt_{max} 上升,LVEDP 下降;与 D 组相比,E 组和 F 组大鼠的 LVESP 和 ±dP/dt_{max} 上升,LVEDP 下降,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 A 组相比,B 组大鼠的心肌 Smad3 表达水平明显升高,循环 miR－23－3p,miR－145－5p 表达水平明显降低;与 B 组相比,C 组、D 组、E 组、F 组大鼠的心肌 Smad3 表达水平均明显降低,循环 miR－23－3p,miR－145－5p 表达水平均明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 D 组相比,E 组和 F 组大鼠的循环 miR－23－3p 和 miR－145－5p 表达依次升高,Smad3 表达依次降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),表明心肌 Smad3 表达水平与循环 miR－23－3p,miR－145－5p 表达水平呈负相关性($P<0.05$)。与 A 组相比,B 组大鼠的 TGF－β 和 MMP－1 表达水平明显升高,TIMP－1 表达水平明显降低($P<0.01$);与 B 组相比,C 组、D 组、E 组、F 组大鼠的 TGF－β 和 MMP－1 表达水平明显降低,TIMP－1 表达水平明显升高;与 D 组相比,E 组和 F 组大鼠的 TGF－β 和 MMP－1 水平均依次降低,TIMP－1 水平依次升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 抗纤益心方可上调扩张型心肌病大鼠 miR－23－3p,miR－145－5p 表达,下调 Smad3 表达,进而影响 TGF－β/Smad3 通路的功能,可能为其改善心室重构的作用机制之一。

关键词:抗纤益心方;扩张型心肌病;Smad3;微小 RNA;转化生长因子 β

中图分类号:R965;R972 **文献标识码:**A **文章编号:**1006－4931(2020)17－0029－06

Effect of Kangxianyixin Prescription on the Expression of Smad3 and Its Related miRNAs in Rats with Dilated Cardiomyopathy

YANG Xi, XIONG Jian, WEI Yunjie

(*Department of Cardiovascular Medicine, Taihe Hospital· Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei, China 442000*)

Abstract:Objective To investigate the effect of Kangxianyixin Prescription on the expression of Smad3, miR－23－3p and miR－145－5p in rats with dilated cardiomyopathy. **Methods** A total of 90 Wistar rats were randomly divided into normal control group(group A), model group(group B), captopril group(group C), low dose of Kangxianyixin Prescription group(group D), medium dose group of Kangxianyixin Prescription(group E) and high dose of Kangxianyixin Prescription group(group F). Group A was raised routinely, and the other groups were used to prepare dilated cardiomyopathy rat models. After the successful preparation of the model, group C was given a daily gavage of 10.125 mg/kg. Groups D, E, F were given a daily gavage of 4.7, 9.4, and 18.8 mg/kg respectively. Eight weeks after the drug intervention, the cardiac function of the rats was detected, and abdominal aortic blood was taken. The expression levels of miR－23－3p and miR－145－5p were determined by fluorescence quantitative PCR. Myocardial tissue was taken and the protein expression of Smad3 was determined by Western blot. The enzyme－linked immunosorbent assay(ELISA) method was used to detect the protein levels of transforming growth factor β(TGF－β), matrix metalloenzyme－1(MMP－1) and matrix metalloenzyme inhibitor(TIMP－1) in the homogenate. **Results** Compared with group A, the left ventricular end systolic pressure(LVESP) and maximum increase/decrease rate of left ventricular pressure(±dP/dt_{max}) in group B descended evidently and their left ventricular end diastolic pressure(LVEDP) increased obviously. Compared with group B, the LVESP and ±dP/dt_{max} in groups C, D, E, D, F increased obviously, and their LVEDP descended evidently. Compared with group D, the LVESP and ±dP/dt_{max} in groups E, F increased, and their LVEDP descended, and the difference were statistically significant($P<0.05$). Compared with group A, the expression level of Smad3 in group B increased obviously, and their expression level of circulating miR－23－3p and miR－145－5p descended evidently. Compared with group B, the expression level of Smad3 in groups C, D, E, D, F descended evidently, and their expression level of circulating miR－23－3p and miR－145－5p increased obviously. Compared with group D, the miR－23－3p and miR－145－5p in groups E, F increased successively, and

第一作者:杨曦,男,硕士研究生,住院医师,主要从事心血管方面的基础及临床研究工作,(电子信箱)850611782@qq.com。

△**通信作者:**魏云杰,男,硕士研究生,主治医师,主要从事心血管方面的基础及临床研究工作,(电子信箱)weiyunjie200@163.com。

their Smad3 descended successively, and the difference were statistically significant ($P < 0.05$). Upon examination, the expression level of myocardial Smads was negatively correlated with the expression level of circulating miR－23－3p and miR－145－5p ($P < 0.05$). The results of ELISA showed that compared with group A, the expression level of TGF－β and MMP－1 in group B increased obviously, and its expression of TIMP－1 decreased ($P < 0.05$). Compared with the group B, the expression level of TGF－β and MMP－1 in groups C, D, E, D, F descended evidently, and their expression level of TIMP－1 increased obviously. Compared with group D, the TGF－β and MMP－1 in groups E, F descended successively, and their TIMP－1 increased successively, and the difference were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Kangxianyixin Prescription could up－regulate the expression of circulating miR－23－3p and miR－145－5p, while down－regulate the expression of Smad3, thus influence TGF－β/Smad3 pathway in rats with dilated cardiomyopathy, which may be one of the mechanisms to improve ventricular remodeling.

Key words: Kangxianyixin Prescription; dilated cardiomyopathy; Smad3; miRNAs; TGF－β

扩张型心肌病（DCM）指以心室心腔扩大和收缩功能障碍为特征的复合型心肌病，会引起心力衰竭（简称心衰）、心律失常和猝死[1]。该病的发病群体以 50 岁以上中年人居多，起病缓慢，早期诊出率较低[1]，且病因不明，致死率较高，无特效治疗手段，预后极差[2]。中医根据 DCM 的症状及病理特点，将其归于“心衰病”“水肿”“心水”等范畴，病机在于心之阳气不足，无力推动血行，瘀血积聚，或水饮不化，痰湿停留，继而使心体胀大[3]，因此益气、活血、利水为治疗该病的基本原则。西医常规治疗以对症治疗、控制心律失常和心衰、纠正心室重构为主，但其远期疗效有限；中医可明显缓解其临床症状，毒副作用较西药少，在改善心肌异常、逆转心肌纤维化，降低病死率，提高生活质量，改善预后方面均有明显优势[3-4]。抗纤益心方具有益气升陷、活血化瘀功效，能改善临床症状，减小左室舒张末内径、左房内径，改善心功能[5-6]。王振涛等[7]的研究结果显示，抗纤益心方可下调 DCM 模型大鼠基质金属蛋白酶－1（MMP－1）和上调基质金属蛋白酶－1 抑制剂（TIMP－1）蛋白水平，减轻心肌组织纤维化，抑制心室重构。张会超等[8]也观察到抗纤益心方对 DCM 大鼠心肌纤维化有一定的抑制作用，并能改善心功能，其作用机制与转化生长因子 β（TGF－β）/Smads 信号系统密切相关。微小 RNA（miRNAs 或 miRs）是一系列长约 22 nt 的非编码 RNA，能通过海绵作用吸附其靶向 mRNA，调控了有机体超过 70% 的基因活动，是近几年病理机制研究的热点，为诸多疾病的临床诊治提供了新靶点和新方向。心肌纤维化增生导致的心室重构是扩张型心肌病发生与发展的中心环节[9]。本研究中选取 Smad3，对可能调控其 mRNA 表达的 miR－23－3p 和 miR－145－5p 进行了分析，观察了抗纤益心方对各指标的影响，以及各指标间的关系，探讨抗纤益心方治疗 DCM 的作用机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试药与动物

仪器：ABI 7500 型实时荧光定量聚合酶链式反应（PCR）扩增仪（美国应用生物系统公司）；Nanodrop 分光光度计（天根生化科技＜北京＞有限公司）；Mini－PROTEAN® Tetra 小垂直板电泳槽（伯乐生命医学产品＜上海＞有限公司）；Trans－Blot 小型转印槽（伯乐生命医学产品＜上海＞有限公司）；Image－Pro Plus 6.0 图像处理分析系统（美国 Media Cybemetics 公司）；1－14k 型台式高速冷冻离心机（德国 Sigma 公司）；Vevo 770™ 型小动物彩色多普勒超声仪［加拿大 VisualSonics Inc. 公司，电压为（220 ± 22）V，频率为（50 ± 1）Hz，主机采集频率≥1 000 Hz，大鼠实验探头频率为 15～22 MHz］。

试药：抗纤益心方为干浸膏，由党参、黄芪、云苓、白术、丹参、川芎、红花、赤芍、泽兰和益母草组方，由医院制剂室提供，每 1 g 浸膏相当于生药 4 g；呋喃唑酮片（山西云鹏制药有限公司，批号为 I－14023937）；卡托普利片（常州制药厂有限公司，批号为 I－B2023731）；戊巴比妥钠（中国医药＜集团＞上海化学试剂公司，批号为 F20021216）；Smad3 多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的二抗（中国 Abcam 官网，批号分别为 GR160516－2，GR160311－1）；miR－23－3p、miR－145－5p 扩增引物（生工生物工程＜上海＞股份有限公司，批号分别为 20160211，20160218）；实时荧光定量 PCR 试剂盒（上海罗氏公司，批号为 75117）；TGF－β、MMP－1 及 TIMP－1 酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒（生工生物工程＜上海＞股份有限公司，批号分别为 D730443，D730566，D730582）。

动物：健康清洁级 Wistar 大鼠 90 只，雌雄各半，6～8 月龄，体质量（220 ± 20）g，购自山东鲁抗动物中心［合格证号为 SCXK（鲁）2016－0003］。所有大鼠常规饲养，自由进食进水，温度 22～25 ℃，相对湿度 40%～60%。本研究经湖北医药学院动物伦理委员会审批，动物饲养、干预及处死等操作均遵循有关实验动物管理和使用规定。

1.2 试验方法

动物分组与模型制备：所有大鼠适应性饲养 1 周后称定体质量，根据体质量进行随机区组化分组，分为对照组（A 组）、模型组（B 组）、卡托普利组（C 组）、抗纤益

心方低剂量组(D 组)、抗纤益心方中剂量组(E 组)和抗纤益心方高剂量组(F 组),各 15 只。A 组正常饲养;其余 5 组均参照文献[10]的方法制备 DCM 大鼠模型,将存活大鼠行超声心动图检查,与 A 组大鼠比较,左心室腔扩大,室壁变薄,左心室射血分数低于 40% 为造模成功[7]。造模成功后予以药物干预,根据 LD_{50} 实验[11]确定动物的有效给药剂量,以此设置抗纤益心方高、中、低 3 个剂量。C 组大鼠每日灌胃卡托普利 10.125 mg/kg;D 组、E 组、F 组大鼠每日分别灌胃抗纤益心方 4.7,9.4,18.8 mg/kg;A 组与 B 组大鼠予等量无菌蒸馏水灌胃刺激。共灌胃 8 周,给药期间,B 组有 2 只大鼠死亡,D 组有 1 只死亡,其余大鼠均进行后续实验,并纳入最终的试验结果中,最终 A 组、B 组、C 组、D 组、E 组和 F 组的大鼠样本量分别为 15,13,15,14,15,15 只。

超声心动图测定心功能:各组大鼠最后 1 次给药 24 h 后,给予 50 mg/kg 1% 戊巴比妥钠麻醉,采用超声心动图检测大鼠心功能指标:左室收缩末压(LVESP)、左室舒张末压(LVEDP)及左心室内压最大上升/下降速率($\pm dp/dt_{max}$)。

蛋白质印迹(WB)法检测心肌 Smad3 蛋白表达:将大鼠麻醉后,先开腹,取腹腔主动脉血 2 mL,用于荧光定量 PCR 试验,再开胸腔取心脏,吸干水分,并称定质量。从心尖位置沿冠状面切取心肌组织 2 份,-80 ℃存储。取待测心肌 100 mg,置 2 mL 离心管中,剪碎,加入 400 μL 裂解液(RIPA∶PMSF = 100∶1),电动匀浆器匀浆,充分裂解后离心,12 000 r/min 离心 5 min,将上清液转移至新的 EP 管中,-20 ℃存储,当天使用。首先,采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,应用 buffer 缓冲液配置质量浓度为 1.0 μg/μL 的混悬液,以备 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。使用 5 % 浓缩胶和 10 % 分离胶进行蛋白电泳;上样前先将蛋白质样本煮沸 10 min 使其变性,上样时调整上样量,保证一致;先 80 V 电泳 30 min,再 120 V 至电泳完成;80 V 恒压转膜 1 h;室温条件用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h;加入用 Tween-20 Tris 盐酸稀释的 Smad3 多克隆抗体(1∶1 000)4 ℃孵育过夜,TBST 液清洗 3 次,每次 10 min;加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶1 000)室温孵育 2 h,TBST 液清洗 3 次,每次 10 min;ECL 显色液 A 液和 B 液混合均匀 1 min 后,将膜蛋白面与 ECL 底物充分接触 1 min,放入 X 光片夹中;置暗室中曝光、显影、定影。显影后扫描蛋白质印迹显影图,用 ImageJ 图像分析软件分析条带灰度值,以目标蛋白质条带灰度值与内参蛋白(β-actin)条带灰度值的比值(Smad3/β-actin)代表目标蛋白质的相对表达量。

双荧光素酶试验测定 Smad3 和 miRNAs 间的靶向性:试验细胞为大鼠心肌成纤维细胞,培养至对数生长期,接种至 96 孔板,设为 pmir-GLO 组、Smad3-WT 组、Smad3-MUT 组,每组 6 个复孔。分别将 pmir-GLO 质粒、Smad3-WT 质粒和 Smad3-MUT 质粒转染至相应的细胞,培养 6 h,更换培养基再培养 48 h。将转染后的细胞进一步分为 2 个亚组,分别采用 miRNA mimics(miR-145-5p,miR-129-3p,miR-23-3p)及其对照 NC mimics 干预,加入相应 miRNA mimics 和 NC mimics,更换培养基培养 24 h 后行双荧光素酶报告基因实验。按双荧光素酶报告试剂盒说明书要求裂解细胞,配置发光液,先将 20 μL 样品置入测量管,再加入 100 μL 发光液,轻轻敲击管壁,使其混匀。记录萤火虫荧光素酶的相对荧光活性。

实时荧光定量 PCR 法检测 miR-23-3p 及 miR-145-5p 的表达水平:采用 Trizol 法提取全血总 RNA,用 nanodrop 分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度,质量合格的样本置-80 ℃保存,用于后续试验。采用 PrimeScript™ Ⅱ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 进行 RNA 反转录,严格按试剂盒步骤操作。反转录完成后置-80 ℃保存备用。采用 GoTaq® qPCR Master Mix 试剂盒和 ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 扩增仪检测 miR-23-3p 和 miR-145-5p 的表达水平。反应体系:GoTaq® qPCR Master Mix 25 μL, upstream primer 1.0 μL, downstream primer 1.0 μL,模板 cDNA 1.0 μL。反应条件:95 ℃ 1 min,95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共扩增 40 个循环;溶解曲线 95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,95 ℃ 1 s。每个样本做 3 个重复,最终的 Ct 值取 3 个重复的平均值。选择 U6 作为内参基因,miR-23-3p 和 miR-145-5p 的相对表达量以公式 $n = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来计算。

ELISA 法检测 TGF-β、MMP-1 及 TIMP-1 蛋白水平:取适量心肌组织,剪碎,匀浆,严格按 TGF-β,MMP-1 及 TIMP-1 ELISA 试剂盒的操作说明检测心肌组织研浆液的 TGF-β,MMP-1 及 TIMP-1 蛋白水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件分析。数据均为连续性变量,采用 $\bar{X} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析;如有统计学差异则采用 LSD-t 检验。

2 结果

2.1 大鼠心功能指标

与 A 组相比,B 组大鼠的 LVESP 和 $\pm dP/dt_{max}$ 明显下降,LVEDP 明显上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 B 组相比,C 组、D 组、E 组、F 组大鼠的 LVESP 和 $\pm dP/dt_{max}$ 显著升高,LVEDP 显著下降,差异有统计学意

义（$P<0.05$）。与D组相比，E组和F组大鼠的LVESP和±dP/dt$_{max}$显著升高，LVEDP显著下降，差异有统计学意义（$P<0.05$）。详见表1。

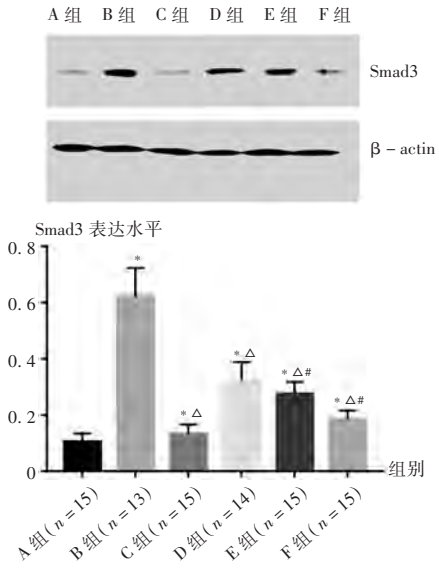
表1　各组大鼠心功能指标比较（$\bar{X}\pm s$）

组别	LVESP	LVEDP	+dp/dt$_{max}$	-dp/dt$_{max}$
A组（$n=15$）	135.2±11.3	5.6±1.3	3 897±699	3 753±272
B组（$n=13$）	75.9±10.1*	10.9±1.8*	3 021±330*	3 029±243*
C组（$n=15$）	116.9±10.4$^{\triangle}$	6.5±1.4$^{\triangle}$	3 469±219$^{\triangle}$	3 489±236$^{\triangle}$
D组（$n=14$）	97.4±9.6$^{\triangle}$	8.3±1.9$^{\triangle}$	3 199±411$^{\triangle}$	3 099±254$^{\triangle}$
E组（$n=15$）	129.2±9.3$^{\triangle\#}$	5.2±1.7$^{\triangle\#}$	3 701±503$^{\triangle\#}$	3 600±259$^{\triangle\#}$
F组（$n=15$）	130.8±8.9$^{\triangle\#}$	5.4±1.5$^{\triangle\#}$	3 821±415$^{\triangle\#}$	3 697±356$^{\triangle\#}$

注：与A组相比，$^{*}P<0.05$；与B组相比，$^{\triangle}P<0.05$；与D组相比，$^{\#}P<0.05$。

2.2　对DCM大鼠Smad3表达水平的影响

与A组相比，B组大鼠的心肌Smad3蛋白表达明显升高；与B组相比，C组、D组、E组、F组大鼠的心肌Smad3蛋白表达水平显著降低；与D组相比，E组和F组大鼠的心肌Smad3蛋白表达水平降低，且F组低于E组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。详见图1。

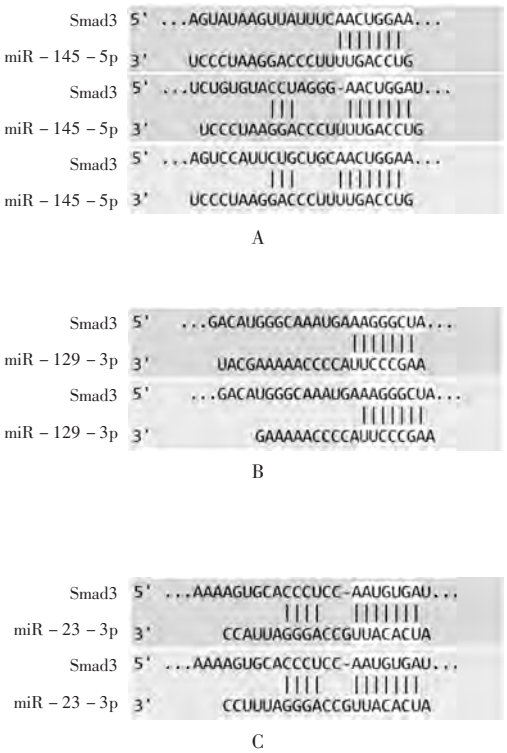


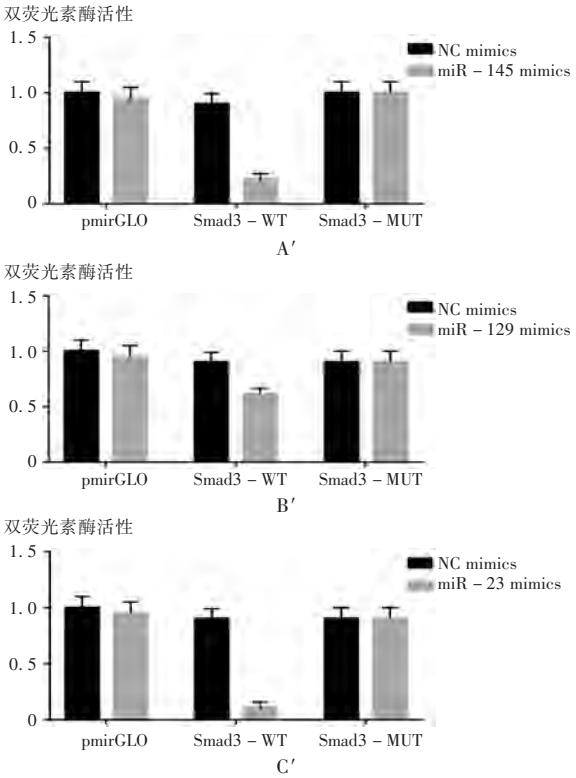
注：与A组相比，$^{*}P<0.05$；与B组相比，$^{\triangle}P<0.05$；与D组相比，$^{\#}P<0.05$。

图1　各组扩张型心肌病大鼠Smad3表达水平

2.3　Smad3相关miRNAs的验证

生物信息学分析结果显示，在与Smad3基因存在结合位点的鼠源miRNAs中，miR-145-5p，miR-129-3p，miR-23-3p有较高的研究价值。采用双荧光素酶报告试验检测了以上3种miRNAs与Smad3的结合能力。结果见图2。可见，miR-145-5p与Smad3，miR-129-3p与Smad3均有较高的靶向结合能力。





A. 鼠源Smad3基因与miR-145-5p可能存在的结合位点　A′. 鼠源Smad3基因与miR-145-5p双荧光素酶报告分析结果
B. 鼠源Smad3基因与miR-129-3p可能存在的结合位点　B′. 鼠源Smad3基因与miR-129-3p的双荧光素酶报告分析结果
C. 鼠源Smad3基因与miR-23-3p可能存在的结合位点　C′. 鼠源Smad3基因与miR-23-3p的双荧光素酶报告分析结果

图2　Smad3基因相关的miRNAs生物信息学及双荧光素酶分析结果

2.4 对 DCM 大鼠 miR－23－3p 和 miR－145－5p 表达水平的影响

与 A 组相比，B 组大鼠的循环 miR－23－3p 和 miR－145－5p 表达水平明显降低（$P<0.05$）；与 B 组相比，C 组、D 组、E 组、F 组大鼠的循环 miR－23－3p 和 miR－145－5p 表达水平明显增高，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与 D 组相比，E 组和 F 组大鼠的循环 miR－23－3p 和 miR－145－5p 表达升高，且 F 组高于 E 组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。详见表 2。

表 2 6 组扩张型心肌病大鼠 miR－23－3p 和 miR－145－5p 表达水平比较（$\overline{X}\pm s$）

组别	miR－23－3p	miR－145－5p
A 组（$n=15$）	4.235±0.161	4.282±0.104
B 组（$n=13$）	2.789±0.187*	2.309±0.175*
C 组（$n=15$）	4.089±0.192△	4.197±0.140△
D 组（$n=14$）	3.358±0.137△	3.324±0.131△
E 组（$n=15$）	4.007±0.155△#	4.173±0.128△#
F 组（$n=15$）	4.169±0.163△#□	4.201±0.143△#□

注：与 A 组相比，* $P<0.05$；与 B 组相比，△ $P<0.05$；与 D 组相比，# $P<0.05$；与 E 组比较，□ $P<0.05$。下表同。

2.5 心肌组织 Smad3 表达与循环 miR－23－3p 和 miR－145－5p 水平的相关性

Pearson 检验结果显示，大鼠心肌组织 Smad3 表达与循环 miR－145－5p 水平呈负相关性（$R=-0.848$，$P<0.05$）；与循环 miR－23－3p 水平也呈负相关性（$R=-0.813$，$P<0.05$），其相关直线见图 3。

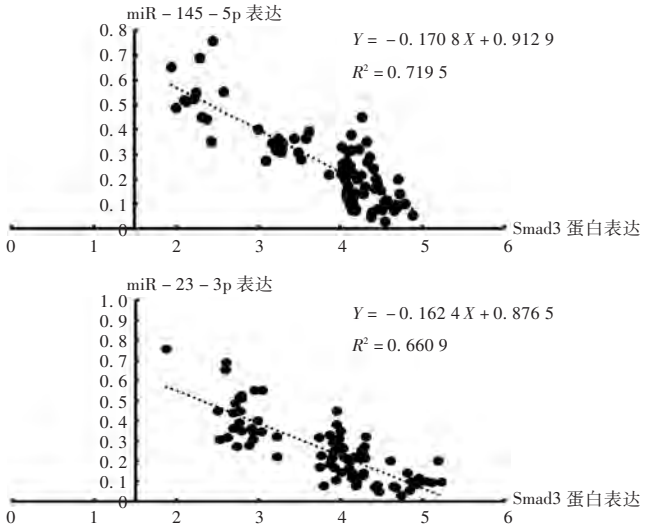


图 3 心肌组织 Smad3 表达与循环 miR－145－5p，miR－23－3p 水平的相关直线

2.6 对 DCM 大鼠 TGF－β，MMP－1 及 TIMP－1 水平的影响

与 A 组相比，B 组大鼠的 TGF－β 和 MMP－1 表达水平明显升高（$P<0.05$），TIMP－1 的表达水平明显降低；与 B 组相比，C 组、E 组、E 组、F 组大鼠的 TGF－β 和 MMP－1 表达水平明显降低，TIMP－1 表达水平明显升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与 D 组相比，E 组和 F 组大鼠的 TGF－β 和 MMP－1 水平降低，且 F 组低于 E 组；E 组和 F 组大鼠的 TIMP－1 水平升高，且 F 组高于 E 组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。详见表 3。

表 3 6 组扩张型心肌病大鼠 TGF－β，MMP－1 及 TIMP－1 水平比较（$\overline{X}\pm s$）

组别	TGF－β（μg/g）	MMP－1（ng/g）	TIMP－1（ng/g）
A 组（$n=15$）	46.2±3.7	244.2±32.1	696.2±75.2
B 组（$n=13$）	68.3±7.9*	455.2±41.3*	463.7±55.5*
C 组（$n=15$）	49.2±5.4△	293.8±35.1△	655.3±58.3△
D 组（$n=14$）	59.5±6.5△	370.2±40.4△	477.8±51.9△
E 组（$n=15$）	52.3±5.8△#	300.1±27.4△#	544.7±60.8△#
F 组（$n=15$）	47.2±5.2△#□	275.6±21.7△#□	602.8±60.6△#□

3 讨论

中医认为，DCM 多因先天不足，或因后天失养，导致心气虚，调治不当，发展为心阳虚、心之气阴两虚，形成瘀血、痰湿、水饮等病理产物，病位在心，与肺、肝、脾、肾密切相关[3,12]。王晓景等[13]的研究结果显示，DCM 为本虚标实、虚实夹杂之症，本虚以阳虚、气虚为主，标实以血瘀、水停为主。DCM 心气虚是基础，心气亏虚，鼓动无力，血脉不畅必致血瘀，血瘀是中心环节，气虚血瘀存在于病变发展过程中的各个环节，故采用抗纤益心方治疗该病疗效可靠[5－8]。

心室重构是扩张型心肌病发生与发展的中心环节，心肌组织纤维化增生是参与心室重构的关键[14]。抗纤益心方对改善 DCM 的临床症状和心室形态有积极作用，但其药理机制尚不明确。TGF－β_1 信号是参与纤维化增生的主要信号之一，在各种原因导致的心室重构中均介导重要机制[15]。Smads 家族蛋白是将 TGF－β_1 信号从胞膜和胞质传递至胞核的重要转运蛋白，TGF－β 的直接作用底物，为 TGF－β 信号通路中的关键传导分子[16]。目前，已知的 Smads 家族蛋白主要为 Smad1～Smad9，其中参与 TGF－β_1 信号转导的主要为 Smad2 和 Smad3，由于 Smad3 是介导心肌纤维化增生和心室重构的关键物质，故选择 Smad3[17]。TGF－β_1/Smad3 信号通路在多种原因导致的心室重构中起介导作用，体外细胞学试验证实，其作用机制可能与诱导纤维细胞向肌成纤维细胞转化，增强胶原蛋白的分泌等有关[18]。机体在正常状态下，对心室重构起决定作用的心肌细胞外基质处于产生和降解的动态平衡，MMPs 是体内参与心肌细胞外基质降解的最主要酶系，TIMP－1 是 MMP－1 的特异性抑制剂，故两者间的平衡对维持心脏正常的代谢具有重要意义[19]。TGF－β 是一种心肌细胞外基质的有效调节因

子，能促进胶原的合成，并调节多种编码MMP的基因表达。研究显示，抗纤益心方能抑制DCM大鼠TGF－β_1的表达，这可能是抗纤益心方干预DCM大鼠动物模型心室重构的机制之一[8,20]。本研究结果显示，抗纤益心方DCM大鼠心肌组织中Smad3的表达有抑制作用，也就抑制了TGF－β/Smad3信号通路的激活，减轻心肌组织的纤维化，因此对于改善其心肌功能有明显效果。

本研究中在分析Smad3与miRNAs相关性前，首先采用生物信息学分析和双荧光素酶试验验证了Smad3与各个miRNAs的结合能力，从中筛选了miR－23－3p和miR－145－5p这2项指标。SUN等[21]的研究已证实，miRNAs主要通过与靶向mRNA的非编码区、开放阅读框、启动子或RNA结合蛋白结合，从而导致靶向mRNA降解或翻译抑制。有研究显示，miR－23－3p和miR－145－5p对Smad3的表达有负调控作用，当miR－23－3p和miR－145－5p的表达水平较高时，Smad3的表达水平降低[22]。本研究结果显示，DCM大鼠的Smad3表达水平升高，miR－23－3p和miR－145－5p表达水平降低，其变化趋势相反，Pearson检验也证实Smad3和miR－23－3p、Smad3和miR－145－5p间呈负相关，从临床角度证实了在DCM中各个指标存在相互作用。ELISA结果显示，抗纤益心方能明显改善DCM大鼠的TGF－β，MMP－1，TIMP－1蛋白表达水平，尤其是高剂量抗纤益心方基本与西药卡托普利的药效相当。本研究结果显示，应用抗纤益心方后，大鼠的循环miR－23－3p，miR－145－5p，TIMP－1水平升高，心肌组织Smad3和TGF－β，MMP－1表达水平降低；另外，各指标的变化趋势受抗纤益心方剂量的影响，呈剂量依赖性，其最佳剂量尚有待验证。

综上所述，抗纤益心方可上调DCM大鼠的miR－23－3p和miR－145－5p的表达，下调Smad3的表达，进而影响TGF－β/Smad3通路，从而改善DCM大鼠的心功能，其最佳有效剂量和用药时间还有待进一步研究。

参考文献：

[1] 中华医学会心血管病学分会，中国心肌炎心肌病协作组．中国扩张型心肌病诊断和治疗指南[J]．临床心血管病杂志，2018，34(5)：421－434.
[2] 赵 蕾，杨新春．扩张型心肌病致病基因及其筛查进展[J]．中华心血管病杂志，2018，46(6)：499－501.
[3] 杨 阳，金明磊，宋灵燕，等．芪苈强心胶囊治疗扩张型心肌病的抗心室重构作用分析[J]．中国实验方剂学杂志，2019，25(13)：242－248.
[4] 樊 华，居励之，王佑华．扩张型心肌病的中医药治疗进展[J]．中西医结合心脑血管病杂志，2017，15(9)：1051－1054.
[5] 曾垂义，王振涛，陈 磊．抗纤益心方治疗扩张型心肌病患者疗效观察[J]．中国实验方剂学杂志，2013，19(23)：321－323.
[6] 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.
[7] 王振涛，韩丽华，柴松波，等．抗纤益心方对扩张型心肌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.
[8] 张会超，聂 恒，芮浩淼，等．抗纤益心方通过TGF－β/Smads信号通路改善糖尿病心肌病大鼠心肌纤维化和心功能的研究[J]．东南大学学报(医学版)，2018，37(3)：415－419.
[9] MITRUT R，STEPAN AE，PIRICI D. Histopathological Aspects of the Myocardium in Dilated Cardiomyopathy[J]. Curr Health Sci J，2018，44(3)：243－249.
[10] 黄荣杰，刘唐威，伍伟锋，等．呋喃唑酮制备大鼠扩张型心肌病模型[J]．中国病理生理杂志，2005，21(11)：2147－2150.
[11] 徐叔云．药理研究方法学[M]．北京：人民卫生出版社，2001：133.
[12] 周亚男，徐 燕，严世芸．中医药治疗扩张型心肌病的研究进展[J]．世界科学技术－中医药现代化，2013，15(8)：1783－1786.
[13] 王晓景，吕仕超，张军平，等．以心肌纤维化为病理基础的高血压病伴左心室肥厚与扩张型心肌病证候学研究[J]．中医杂志，2016，57(15)：1317－1321.
[14] TSIKITIS M，GALATA Z，MAVROIDIS M，et al. Intermediate filaments in cardiomyopathy[J]. Biophys Rev，2018，10(4)：1007－1031.
[15] BERNASCONI P，CARBONI N，RICCI G，et al. Elevated TGF β_2 serum levels in Emery－Dreifuss Muscular Dystrophy：Implications for myocyte and tenocyte differentiation and fibrogenic processes[J]. Nucleus，2018，9(1)：292－304.
[16] AZIBANI F，SLIWA K. Peripartum Cardiomyopathy：an Update[J]. Curr Heart Fail Rep，2018，15(5)：297－306.
[17] 叶 斌，买鹏宇，陆智华，等．中医药干预TGF－β_1/Smads信号通路对组织器官细胞纤维化调控作用的研究进展[J]．中华中医药学刊，2019，37(3)：611－614.
[18] ZHAO J，LV T，QUAN J，et al. Identification of target genes in cardiomyopathy with fibrosis and cardiac remodeling[J]. J Biomed Sci，2018，25(1)：63.
[19] PHATHARAJAREE，W，PHROMMINTEKUL A，CHATTIPAKORN N. Matrix metalloproteinases and myocardial infarction[J]. Can J Cardiol，2007，23(9)：727－733.
[20] 王振涛，常红波，吴 鸿．抗纤益心浓缩丸对扩张型心肌病大鼠心功能及心室重构的影响[J]．中国中医急症，2017，26(3)：394－396.
[21] SUN T，LI MY，LI PF，et al. MicroRNAs in Cardiac Autophagy：Small Molecules and Big Role[J]. Cells，2018，7(8)：104.
[22] 张 炜，黄林洁，陈 茗．miR－23b通过Smad3信号通路抑制TGF－β1诱导的气道平滑肌细胞增殖的研究[J]．广东医学，2019，40(1)：1－7.

(收稿日期：2020－02－11)