

文章编号:1007-4287(2022)12-1839-06

# 基于 TGF $\beta$ 1/Smad4 信号通路探究人参四逆汤对亚临床甲状腺功能减退症大鼠心功能的影响

高艳超,柳越,王岩,孙永艳

(朝阳市第二医院 内分泌科,辽宁 朝阳 122000)

**摘要:**目的 基于转化生长因子  $\beta$ 1(TGF $\beta$ 1)/Smad 同源物 4(Smad4)信号通路探究人参四逆汤对亚临床甲状腺功能减退症(SCH)大鼠心功能的影响。方法 随机数字表法将 60 只大鼠分为假手术组、SCH 组、L-T<sub>4</sub> 组、低剂量组、高剂量组、高剂量+LY2109761 组(TGF $\beta$ 1/Smad4 通路抑制剂 LY2109761),10 只/组;甲状腺全切术及术后皮下注射 L-T<sub>4</sub> 建造 SCH 模型大鼠,成功后各组分别灌胃相应剂量药物或生理盐水,为期 30 d,实验结束观察大鼠一般状况;检测大鼠心功能指标;ELISA 法检测血清中促甲状腺激素(TSH)、总甲状腺素(TT4)水平;HE 染色观察大鼠心肌组织病理学情况;Western blot 检测心肌组织肌浆网钙离子 ATP 酶 2a(serca2a)、Ryanodine 受体(Ryr2)及 TGF $\beta$ 1/Smad4 通路蛋白表达。**结果** 与假手术组相比,大鼠左心室收缩压(LVSP)、左室内压上升最大速率(LV+dp/dtmax)、心率(HR)、左室内压下降最大速率(LV-dp/dtmax)、serca2a、Ryr2 蛋白水平在 SCH 组显著降低,左心室舒张末压(LVEDP)、TSH 水平、心肌组织病理学程度、TGF $\beta$ 1/Smad4 蛋白水平在 SCH 组显著增加( $P<0.05$ );与 SCH 组相比,LVSP、LV+dp/dtmax、HR、LV-dp/dtmax、serca2a、Ryr2 蛋白水平在 L-T<sub>4</sub> 组、低剂量组、高剂量组及高剂量+LY2109761 组显著增加,LVEDP、TSH 水平、心肌组织病理学程度、TGF $\beta$ 1/Smad4 蛋白水平在 L-T<sub>4</sub> 组、低剂量组、高剂量组及高剂量+LY2109761 组显著降低( $P<0.05$ ),且低剂量组与高剂量组间比较差异有统计学意义( $P<0.05$ );与高剂量组相比,LVSP、+ dp/dtmax、HR、- dp/dtmax、serca2a、Ryr2 蛋白水平在高剂量+LY2109761 组显著增加,LVEDP、TSH 水平、心肌组织病理学程度、TGF $\beta$ 1/Smad4 蛋白水平在高剂量+LY2109761 组显著降低( $P<0.05$ )。**结论** 人参四逆汤通过抑制 TGF $\beta$ 1/Smad4 通路改善 SCH 大鼠心功能。

**关键词:**人参四逆汤;心功能;亚临床甲状腺功能减退症;转化生长因子  $\beta$ 1;Smad 同源物 4

**中图分类号:**R581.2

**文献标识码:**A

**Exploring the effect of Renshen Sini Decoction on the heart function of rats with subclinical hypothyroidism based on the TGF $\beta$ 1/Smad4 signaling pathway** GAO Yan-chao, LIU Yue, WANG Yan, et al. (Department of Endocrinology, Chaoyang Second Hospital, Chaoyang 122000, China)

**Abstract:** **Objective** Based on the transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1)/mothers against DPP homolog 4 (Smad4) signaling pathway, to explore the effect of Renshen Sini Decoction on the heart function of subclinical hypothyroidism(SCH) rats. **Methods** Sixty rats were divided into sham operation group, SCH group, L-T4 group, low dose group, high dose group, high dose+LY2109761 group(TGF $\beta$ 1/Smad4 pathway inhibitor LY2109761) by random number table method, with 10 rats/group; total thyroidectomy and postoperative subcutaneous injection of L-T4 were performed to build SCH model rats, and after success, each group was given corresponding doses of drugs or normal saline for 30 days. After the experiment, the general conditions of the rats were observed; the indicators of rat heart function were detected; the levels of serum thyroid-stimulating hormone(TSH) and total thyroxine(TT4) were detected with ELISA method; the pathology of rat myocardial tissue was observed with HE staining; the expression of myocardial tissue sarcoplasmic reticulum calcium ATPase 2a(serca2a), Ryanodine receptor(Ryr2) and TGF $\beta$ 1/Smad4 pathway proteins was detected with Western blot. **Results** Compared with the sham operation group, the left ventricular systolic pressure(LVSP), the maximum rate of left ventricular pressure increase(LV+dp/dtmax), heart rate(HR), and the maximum rate of left ventricular pressure decrease(LV-dp/dtmax), serca2a and Ryr2 protein levels were significantly reduced in the SCH group, the left ventricular end diastolic pressure(LVEDP), TSH level, myocardial histopathology, TGF $\beta$ 1 and Smad4 protein levels were significantly increased in the SCH group( $P<0.05$ ); compared with the SCH group, the LVSP, LV+dp/dtmax, HR, LV-dp/dtmax, serca2a, and Ryr2 protein levels were significantly increased in the L-T4 group, low-dose group, high-dose group, and high-dose+LY2109761 group, the LVEDP, TSH level, myocardial histopathology, TGF $\beta$ 1 and Smad4 protein levels were significantly reduced in the L-T4 group, low-dose group,

high-dose group, and high-dose + LY2109761 group ( $P < 0.05$ ), and the difference between the low-dose group and the high-dose group was statistically significant ( $P < 0.05$ ); compared with the high-dose group, the LVSP,  $+dp/dt_{max}$ , HR,  $-dp/dt_{max}$ , serca2a, and Ryr2 protein levels were significantly increased in the high-dose + LY2109761 group, the LVEDP, TSH level, myocardial histopathology, TGF $\beta$ 1 and Smad4 protein levels were significantly reduced in the high-dose + LY2109761 group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Renshen Sini Decoction can improve the heart function of SCH rats by inhibiting the TGF $\beta$ 1/Smad4 pathway.

**Key words:** Renshen Sini Decoction; heart function; subclinical hypothyroidism; transforming growth factor  $\beta$ 1; mothers against DPP homolog 4

(Chin J Lab Diagn, 2022, 26: 1839)

亚临床甲状腺功能减退症(subclinical hypothyroidism, SCH)被定义为血清促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)水平升高,而游离甲状腺素(Free thyroxine index, FT4)及游离三碘甲腺原氨酸(Free triiodothyronine, FT3)水平正常的一种甲状腺疾病,慢性自身免疫性甲状腺炎是其发生的主要原因之一,该疾病影响全球高达10%的成年人口<sup>[1]</sup>。大量研究发现,SCH可能与心力衰竭、冠心病等心脏疾病的发生风险增加及患者死亡有关<sup>[1-2]</sup>。因此有必要对SCH患者心脏损伤的治疗机制进行探究。人参四逆汤由人参、干姜、附子及甘草构成,在临床中具有治疗冠心病、心源性休克、心力衰竭等心脏疾病的作用,但其在SCH引发的心脏疾病中的治疗机制还未见报道<sup>[3]</sup>。TGF $\beta$ 通路在垂体发育、分化和功能的多个过程中十分活跃,有研究表明,转化生长因子 $\beta$ 1(transforming growth factor  $\beta$ 1, TGF $\beta$ 1)/Smad同源物4(mothers against DPP homolog 4, Smad4)信号通路不仅参与SCH的发生,还与心血管疾病的发生具有密切联系,其激活会致使心肌损伤<sup>[4-5]</sup>。因此,有必要探讨人参四逆汤是否可通过影响TGF $\beta$ 1/Smad4通路来对SCH患者心功能起到保护作用,本研究通过对其探究,以期为人参四逆汤在SCH中的治疗机制研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

上海吉辉实验动物饲养有限公司购得的7周龄60只雄性大鼠(SPF级,Wistar)(205±30)g,适应性分笼喂养1周(自由采食饮水,通风,光暗循环12 h,温度23~25℃,湿度55%),许可证:SCXK(沪)2017-0012。本研究获得医院动物伦理委员会的批准(批准文号:2020-0013),符合3R原则。

### 1.2 主要试剂

左甲状腺素钠片(L-T<sub>4</sub>)(50 μg,国药准字H20041676)<sup>万方数据</sup>江药业集团四川海蓉药业有限公

司);L-T<sub>4</sub>针剂(批号:1365065,Sigma USA,生理盐水配置为0.95 μg/mL);LY2109761(货号:HY-12075,MedChemExpress LLC);BCA蛋白检测试剂盒(货号:FT-D24505,上海梵态生物科技有限公司);苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(货号:ZY7070-100 ml,上海泽叶生物科技有限公司);TSH、总甲状腺素(Total Thyroxine, TT4)酶联免疫吸附实验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(货号:HL20061、HL20058,上海哈灵生物科技有限公司);兔抗TGF $\beta$ 1、GAPDH、Smad4、Ryanodine受体(ryanodine receptor 2, Ryr2)抗体、Goat Anti-Rabbit IgG H&L(HRP)抗体(货号:21898-1-AP、10494-1-AP、10231-1-AP、19765-1-AP、SA00001-2, Protein-tech);肌浆网钙离子ATP酶2a(sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, serca2a)(货号:PA5-78837, Invitrogen Antibodies)。

E-Gel Imager凝胶成像仪(上海宾智生物科技有限公司);FLUOstar Omega全自动多功能酶标仪(香港伯齐科技有限公司)。

### 1.3 分组及SCH模型构建

人参四逆汤中所用药材配置(人参6 g、附子10 g、干姜6 g、甘草5 g,按照1:5加水煎煮2次,50 min/次,合并煎液后过滤、浓缩至1 g/mL)<sup>[6]</sup>;随机数字表法将60只大鼠分为假手术组、SCH组(模型组)、L-T<sub>4</sub>组(5 μg/kg L-T<sub>4</sub>)<sup>[7]</sup>、低剂量组(3 g/kg人参四逆汤)、高剂量组(12 g/kg人参四逆汤)<sup>[8]</sup>、高剂量+LY2109761组(12 g/kg人参四逆汤+1 μg TGF $\beta$ 1/Smad4通路抑制剂LY2109761)<sup>[9]</sup>,10只/组;甲状腺全切术及术后皮下注射L-T<sub>4</sub>建造SCH模型大鼠:水合氯醛腹腔麻醉后暴露并剪断双侧甲状腺,摘除两侧甲状腺后缝合,术后给予基础饲料及含有0.1% Ca<sup>2+</sup>高钙水,假手术组仅暴露甲状腺,给予基础饲料喂养;术后均进行3 d 5万单位青霉素注射,术后2周后进行颈部皮下注射L-T<sub>4</sub>

(0.95  $\mu\text{g}/100 \text{ g/d}$ ), 假手术组注射等剂量生理盐水, 为期 16 d<sup>[10]</sup>, 于第 17 d 尾部取血, 检测 SCH 组大鼠 TSH 及 TT4 水平, 若高于假手术组 TSH 均值的 90%CI: 0.014~0.02  $\mu\text{IU}/\text{mL}$ 、TT4 均值的 90%CI: 46.57~63.27  $\text{ng}/\text{mL}$ , 即造模成功<sup>[7]</sup>; 造模成功后按照临床 70 kg 患者所服剂量, 根据人与动物体表面积换算, L-T<sub>4</sub> 组、低剂量组、高剂量组、高剂量+LY2109761 组大鼠分别给予相应剂量 L-T<sub>4</sub> 或人参四逆汤, 假手术组、SCH 组灌胃等剂量生理盐水, 为期 30 d, 实验结束观察大鼠一般状况。

#### 1.4 大鼠心脏血流动力学指标检测

于灌胃结束后使用 4% 戊巴比妥钠腹腔麻醉大鼠, 切开大鼠颈部皮肤, 待右侧颈总动脉充分暴露后置入 20G 的血管鞘, 使其从主动脉瓣进入左心室记录左室内压上升最大速率(maximal rate of the increase of left ventricular pressure, LV + dp/dt<sub>max</sub>)、左室内压下降最大速率(maximal rate of the decrease of left ventricular pressure, LV-dp/dt<sub>max</sub>)、心率(heart rate, HR)、左心室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)以及左心室舒张末压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP), 共记录 5 个心动周期取平均值( $n=5$ )。

#### 1.5 ELISA 法检测血清中 TSH、TT4 水平

所有大鼠血流动力学指标检测结束后, 取大鼠腹主动脉血 3 ml, 静置(30 min)后 3 000 r/min 进行离心(15 min)吸取上清, 严格根据 TSH、TT4 放免试剂盒说明书步骤操作检测二者血清水平( $n=10$ )。

#### 1.6 HE 染色

随机选取大鼠(5 只)处死并取出心脏组织浸于多聚甲醛(10%)磷酸缓冲液中固定 1 d, 经二甲苯、乙醇梯度处理后包埋, 制作常规石蜡切片(5  $\mu\text{m}$ ), 依次进行脱蜡、水化, 用苏木精和伊红染色后脱水, 透明、中性树脂封片、光学显微镜下进行观察拍照( $n=5$ )。

#### 1.7 Western blot 检测心肌组织 serca2a、Ryr2 及 TGF $\beta$ 1/Smad4 通路蛋白表达

将剩余大鼠心脏组织置于 RIPA 缓冲液中裂解, 使用匀浆器制作组织匀浆, 离心收集上清, BCA 法定量蛋白质浓度, 制作分离胶(10%), 以 50  $\mu\text{g}/\text{孔}$ 蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离并转至偏氟乙烯膜, 牛血清白蛋白封闭(2 h), 4℃孵育一抗(兔抗 serca2a、Ryr2、GAPDH、TGF $\beta$ 1、Smad4 抗体)(1:1 000), 过夜后将膜在二抗(HRP 标记的 IgG)(1:万倍数据)中孵育(2 h), ECL-Plus 蛋白印迹

检测试剂对蛋白条带进行可视化, 使用蛋白凝胶成像仪观察条带, Quantity One 软件分析条带灰度, 计算 serca2a、Ryr2、TGF $\beta$ 1、Smad4 水平( $n=5$ )。

#### 1.8 统计学分析

应用 SPSS 22.0 进行数据分析, 符合正态分布时数据用均数±标准差(  $\bar{x} \pm s$  )描述, 单因素方差分析(ANOVA)进行多组样本比较, SNK-q 检验进行多重比较,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 2 结果

#### 2.1 大鼠一般情况观察

假手术组大鼠皮毛有光泽、运动灵敏、大便成形; SCH 组大鼠皮毛枯黄、脱落稀疏、大便不成型、反应迟缓、弓背; 与 SCH 组相比, L-T<sub>4</sub> 组、低剂量组、高剂量组大鼠皮毛脱落减轻、大便成形、反应较为敏捷; 与高剂量组相比, 高剂量+LY2109761 组大鼠上述症状进一步得到改善。

#### 2.2 人参四逆汤对大鼠血清中 TSH、TT4 水平的影响

与假手术组相比, 大鼠血清中 TSH 水平在 SCH 组显著增加( $P < 0.05$ ); 与 SCH 组相比, TSH 水平在 L-T<sub>4</sub> 组、低剂量组、高剂量组及高剂量+LY2109761 组显著降低( $P < 0.05$ ); 与低剂量组相比, TSH 水平在高剂量组、高剂量+LY2109761 组显著降低( $P < 0.05$ ); 与高剂量组相比, TSH 水平在高剂量+LY2109761 组显著降低( $P < 0.05$ ); 各组间 TT4 水平无显著性变化, 见表 1。

表 1 人参四逆汤对大鼠血清中 TSH、TT4 水平的影响( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	TSH( $\mu\text{IU}/\text{mL}$ )	TT4( $\text{ng}/\text{mL}$ )
假手术组	0.013±0.005	48.25±15.76
SCH 组	0.108±0.020 <sup>a</sup>	47.83±14.40
L-T <sub>4</sub> 组	0.014±0.003 <sup>b</sup>	50.77±18.65
低剂量组	0.081±0.008 <sup>abc</sup>	49.27±19.34
高剂量组	0.047±0.007 <sup>abcd</sup>	51.13±17.20
高剂量+LY2109761 组	0.016±0.004 <sup>bde</sup>	52.83±18.08

注: 与假手术组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 SCH 组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 L-T<sub>4</sub> 组相比,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与低剂量组相比,<sup>d</sup> $P < 0.05$ ; 与高剂量组相比,<sup>e</sup> $P < 0.05$ 。

#### 2.3 人参四逆汤对大鼠心功能的影响

与假手术组相比, 大鼠 LVSP、+dp/dt<sub>max</sub>、HR、-dp/dt<sub>max</sub> 在 SCH 组显著降低, LVEDP 在 SCH 组显著增加( $P < 0.05$ ); 与 SCH 组相比, LVSP、+dp/dt<sub>max</sub>、HR、-dp/dt<sub>max</sub> 在 L-T<sub>4</sub> 组、低剂量组、高剂量组及高剂量+LY2109761 组显著增加, LVEDP 在 L-T<sub>4</sub> 组、低剂量组、高剂量组及高

剂量+LY2109761组显著降低( $P<0.05$ )；与低剂量组相比, LVSP、 $+dp/dt_{max}$ 、HR、 $-dp/dt_{max}$ 在高剂量组、高剂量+LY2109761组显著增加,LVEDP在高剂量组、高剂量+LY2109761组显著降低

( $P<0.05$ )；与高剂量组相比,LVSP、 $+dp/dt_{max}$ 、HR、 $-dp/dt_{max}$ 在高剂量+LY2109761组显著增加,LVEDP在高剂量+LY2109761组显著降低( $P<0.05$ ),见表2。

表2 人参四逆汤对大鼠心功能的影响( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	LVSP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	$+dp/dt_{max}$ (mmHg/s)	$-dp/dt_{max}$ (mmHg/s)	HR (Beats/min)
假手术组	120.08±14.21	2.46±0.43	2 540.16±201.34	2 990.42±200.75	410.46±20.62
SCH组	71.30±5.43 <sup>a</sup>	10.80±0.41 <sup>a</sup>	1 251.08±141.22 <sup>a</sup>	1 375.10±138.06 <sup>a</sup>	284.36±15.11 <sup>a</sup>
L-T <sub>4</sub> 组	115.75±14.08 <sup>b</sup>	2.67±0.24 <sup>b</sup>	2 480.43±198.64 <sup>b</sup>	2 870.67±186.75 <sup>b</sup>	402.79±19.36 <sup>b</sup>
低剂量组	89.10±6.78 <sup>abc</sup>	8.54±0.35 <sup>abc</sup>	1 648.17±150.45 <sup>abc</sup>	1 795.37±140.14 <sup>abc</sup>	326.11±14.95 <sup>abc</sup>
高剂量组	100.27±5.23 <sup>abcd</sup>	5.10±0.41 <sup>abcd</sup>	2 097.40±186.70 <sup>abcd</sup>	2 309.40±157.22 <sup>abcd</sup>	369.20±14.38 <sup>abcd</sup>
高剂量+LY2109761组	114.74±7.80 <sup>bde</sup>	2.80±0.40 <sup>bde</sup>	2 410.65±225.76 <sup>bde</sup>	2 858.27±159.31 <sup>bde</sup>	400.16±15.07 <sup>bde</sup>

注:与假手术组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与SCH组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与L-T<sub>4</sub>组相比,<sup>c</sup> $P<0.05$ ;与低剂量组相比,<sup>d</sup> $P<0.05$ ;与高剂量组相比,<sup>e</sup> $P<0.05$ 。

## 2.4 大鼠心肌组织病理学观察

假手术组大鼠心肌细胞结构清晰完整、整齐排列、未见出现炎性细胞浸润；与假手术组相比,SCH组大鼠心肌细胞排列紊乱松散、肿胀、断裂坏死、炎性细胞浸润、充血现象明显；与SCH组相比,L-T<sub>4</sub>

组、低剂量组、高剂量组大鼠心肌细胞排列较为有序、肿胀坏死、炎性浸润、充血现象减轻；与高剂量组相比,高剂量+LY2109761组大鼠上述症状得到进一步减轻,见图1。

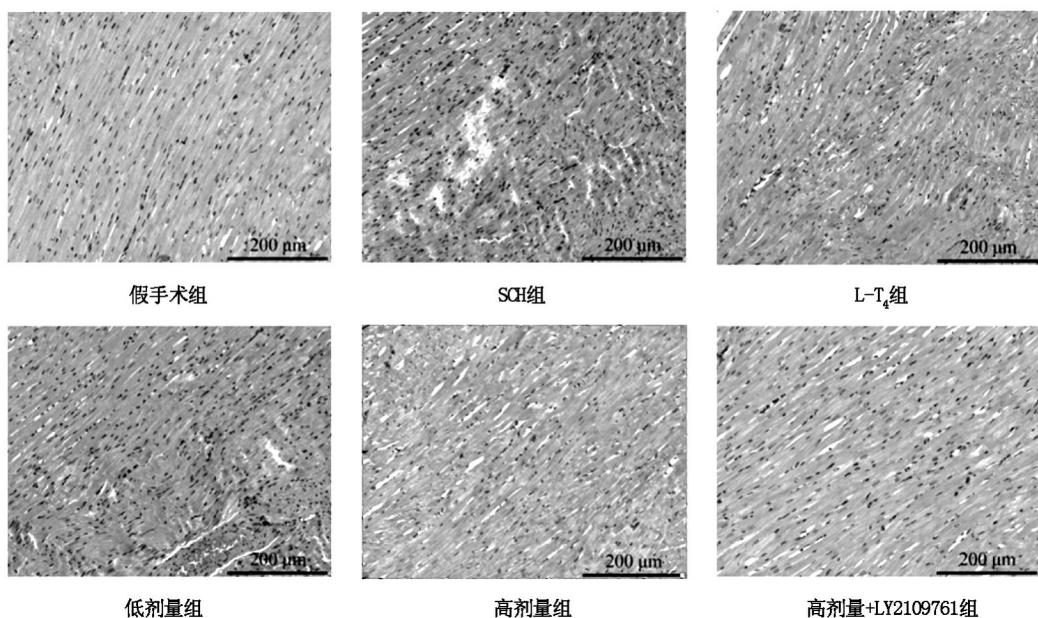


图1 大鼠心肌组织病理学观察(HE, 200 μm)

## 2.5 人参四逆汤对大鼠心肌组织serca2a、Ryr2蛋白表达的影响

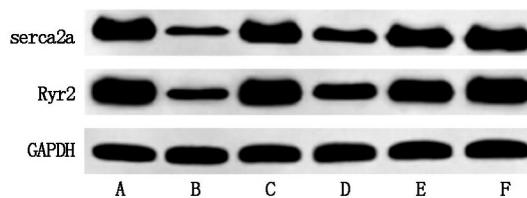
与假手术组相比,大鼠心肌组织中serca2a、Ryr2蛋白水平在SCH组显著降低( $P<0.05$ )；与SCH组相比,serca2a、Ryr2蛋白水平在L-T<sub>4</sub>组、低剂量组、高剂量及高剂量+LY2109761组显著增

加( $P<0.05$ )；与低剂量组相比,serca2a、Ryr2蛋白水平在高剂量组、高剂量+LY2109761组显著增加( $P<0.05$ )；与高剂量组相比,serca2a、Ryr2蛋白水平在高剂量+LY2109761组显著增加( $P<0.05$ ),见表3、图2。

**表 3 人参四逆汤对大鼠心肌组织 serca2a、Ryr2 蛋白表达的影响( $n=10$ , $\bar{x}\pm s$ )**

组别	serca2a/GAPDH	Ryr2/GAPDH
假手术组	1.39±0.23	1.55±0.26
SCH 组	0.48±0.08 <sup>a</sup>	0.55±0.04 <sup>a</sup>
L-T <sub>4</sub> 组	1.34±0.20 <sup>b</sup>	1.52±0.25 <sup>b</sup>
低剂量组	0.79±0.10 <sup>abc</sup>	0.88±0.12 <sup>abc</sup>
高剂量组	1.11±0.17 <sup>abcd</sup>	1.21±0.20 <sup>abcd</sup>
高剂量+LY2109761 组	1.33±0.21 <sup>bde</sup>	1.50±0.22 <sup>bde</sup>

注:与假手术组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与 SCH 组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与 L-T<sub>4</sub> 组相比,<sup>c</sup> $P<0.05$ ;与低剂量组相比,<sup>d</sup> $P<0.05$ ;与高剂量组相比,<sup>e</sup> $P<0.05$ 。



**图 2 人参四逆汤对大鼠心肌组织 serca2a、Ryr2 蛋白表达的影响**

注:A:假手术组;B:SCH 组;C:L-T<sub>4</sub> 组;D:低剂量组;E:高剂量组;F:高剂量+LY2109761 组

## 2.6 人参四逆汤对大鼠心肌组织 TGFβ1/Smad4 通路蛋白表达的影响

与假手术组相比,大鼠心肌组织 TGFβ1、Smad4 蛋白水平在 SCH 组显著增加( $P<0.05$ );与 SCH 组相比,TGFβ1、Smad4 蛋白水平在 L-T<sub>4</sub> 组、低剂量组、高剂量组及高剂量+LY2109761 组显著降低( $P<0.05$ );与低剂量组相比,TGFβ1、Smad4 蛋白水平在高剂量组、高剂量+LY2109761 组显著降低( $P<0.05$ );与高剂量组相比,TGFβ1、Smad4 蛋白水平在高剂量+LY2109761 组显著降低( $P<0.05$ ),见表 4、图 3。

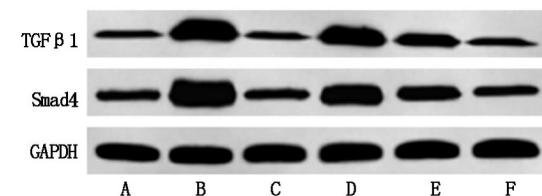
**表 4 人参四逆汤对大鼠心肌组织 TGFβ1/Smad4 通路蛋白表达的影响( $n=10$ , $\bar{x}\pm s$ )**

组别	TGFβ1/GAPDH	Smad4/GAPDH
假手术组	0.42±0.06	0.60±0.07
SCH 组	1.50±0.27 <sup>a</sup>	1.62±0.24 <sup>a</sup>
L-T <sub>4</sub> 组	0.45±0.05 <sup>b</sup>	0.64±0.06 <sup>b</sup>
低剂量组	1.22±0.13 <sup>abc</sup>	1.33±0.15 <sup>abc</sup>
高剂量组	0.78±0.11 <sup>abcd</sup>	0.98±0.10 <sup>abcd</sup>
高剂量+LY2109761 组	0.48±0.06 <sup>bde</sup>	0.66±0.08 <sup>bde</sup>

注:与假手术组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与 SCH 组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与 L-T<sub>4</sub> 组相比,<sup>c</sup> $P<0.05$ ;与低剂量组相比,<sup>d</sup> $P<0.05$ ;与高剂量组相比,<sup>e</sup> $P<0.05$ 。

## 3 讨论

SCH 是一种在成年人中患病率相对较高的一



**图 3 人参四逆汤对大鼠心肌组织 TGFβ1/Smad4 通路蛋白表达的影响**

注:A:假手术组;B:SCH 组;C:L-T<sub>4</sub> 组;D:低剂量组;E:高剂量组;F:高剂量+LY2109761 组

种甲状腺疾病<sup>[11]</sup>。心血管系统中含有大量甲状腺受体,对 TSH 水平变化敏感性较强<sup>[4]</sup>。TSH 水平异常增加会导致氧化应激、内皮功能异常,心力衰竭等心脏疾病的发生风险增大<sup>[4]</sup>。因此有效治疗 SCH 造成的心脏损伤对患者的生命健康十分重要<sup>[11]</sup>。

人参四逆汤是治疗冠心病等心脏疾病的常用药<sup>[12-13]</sup>,有研究发现,人参四逆汤可有效增强心衰模型细胞抗氧化及细胞存活能力<sup>[3]</sup>。甲状腺激素可通过直接作用于心肌细胞膜中钠、钙、钾离子通道来调节心脏中基因的表达,除此之外,还可通过影响外周循环来间接影响心血管系统<sup>[14]</sup>。Ryr2 蛋白水平在心肌收缩中具有十分重要的作用,而 serca2a 则会通过将  $\text{Ca}^{2+}$  泵入内质网来完成心肌舒张期,还有研究发现在 TSH 外源性刺激心肌细胞后二者表达水平显著降低<sup>[15-16]</sup>。本研究发现,人参四逆汤可有效增加 SCH 大鼠 LVSP、LV + dp/dtmax、HR、LV-dp/dtmax、serca2a、Ryr2 蛋白水平,降低 LVEDP、TSH 水平、心肌组织病理学程度,该结果表明人参四逆汤能够有效改善 SCH 大鼠心功能及心肌损伤,因此可能具有治疗 SCH 造成的心肌损伤的良好作用。

TGFβ1 是转录因子家族成员之一,参与细胞生长、分化、免疫炎症反应等细胞生理病理过程,Smad4 是其下游靶基因,可将上游信号从细胞表面受体传至细胞核中<sup>[5]</sup>。研究发现,TGFβ1 参与自身免疫性疾病,在慢性自身免疫性甲状腺炎所造成的甲减患者血清中表达显著增加<sup>[17-18]</sup>。心风胶囊通过抑制 TGF-β1/Smads 通路中 TGF-β1 及 Smad4 蛋白表达来改善佐剂性关节炎大鼠的心功能和心肌损伤<sup>[19]</sup>。本研究发现,TGFβ1、Smad4 在 SCH 大鼠心肌组织中表达显著增加,人参四逆汤则可显著降低二者表达水平;与前人研究结果相似<sup>[18-19]</sup>。该结果表明 TGF-β1/Smad4 通路参与 SCH 造成的大鼠心肌损伤的发生。除此之外,本研究还发现,TGF-β1/

Smad4 通路抑制剂 LY2109761 能够进一步增强人参四逆汤对 SCH 大鼠心肌损伤的改善作用。该结果表明,人参四逆汤对 SCH 大鼠心功能的改善作用可能与其抑制 TGF $\beta$ 1/Smad4 通路有关。

综上所述,人参四逆汤可能通过抑制 TGF $\beta$ 1/Smad4 通路改善 SCH 大鼠心功能,以此达到治疗 SCH 患者心肌损伤的作用。本研究结果不仅为人参四逆汤在 SCH 心肌损伤治疗机制的研究提供数据支持,还对其发生机制的研究具有重要意义。但本研究仅对人参四逆汤影响 TGF $\beta$ 1/Smad4 通路的机制进行了探究,但对其下游机制缺乏深入研究,因此,这将成为后续研究重点。

**作者简介:**高艳超(1984-),女,硕士,副主任医师,研究方向:内分泌与代谢性疾病。

#### 参考文献:

- [1]Biondi B, Cappola AR, Cooper DS. Subclinical Hypothyroidism: A Review[J]. JAMA, 2019, 322(2):153.
- [2]Delitala AP, Scuteri A, Maioli M, et al. Subclinical hypothyroidism and cardiovascular risk factors[J]. Minerva Med, 2019, 110(6):530.
- [3]李硕,苏萍,张广平,等.人参四逆汤及其有效成分对戊巴比妥钠所致心肌细胞损伤模型的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(1):90.
- [4]Xue D, Sun JL, Yang J. Early L-T4 intervention improves fetal heart development in pregnant rats with subclinical hypothyroidism rats by activating BMP4/Smad4 signaling pathway[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2020, 20(1):369.
- [5]任学娇,祁轶斐,娄利霞,等.扶正化瘀胶囊对心肌梗死大鼠心肌纤维化及 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2018,16(9):1185.
- [6]李影雄,蔡海荣,蔡惠铃,等.加味人参四逆汤对急性心肌梗死后心力衰竭大鼠心功能的保护机制研究[J].广州中医药大学学报,2021,38(6):1236.
- [7]陈巍,杨潇,高天舒,等.健脾化瘀活血方对亚临床甲减大鼠甲状腺激素水平及脑单羧酸转运蛋白 8 的影响[J].中华中医药学刊,2019,37(2):285.
- [8]韩晴晴,沈晓旭,赵静,等.四逆汤对心肌梗死后慢性心衰大鼠心功能和氧化应激反应的作用研究[J].环球中医药,2019,12(6):819.
- [9]罗湘蓝,张望,苏华龙.黄芪甲苷 IV 对 TGF- $\beta$ 1/Smad2 介导的癫痫合并抑郁小鼠的保护作用[J].实用药物与临床,2021,24(4):301.
- [10]杨瑞霞,陈如泉.温肾方对亚临床甲状腺功能减退模型大鼠心肌组织 T3 及甲状腺激素受体的影响[J].中医学报,2013,28(7):989.
- [11]Quan X, Ji Y, Zhang C, et al. Circulating MiR-146a May be a Potential Biomarker of Coronary Heart Disease in Patients with Subclinical Hypothyroidism[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45(1):226.
- [12]李硕.人参四逆汤抗心力衰竭的作用及机理研究[D].辽宁师范大学,2019.
- [13]彭兰,张序晴,王志琪,等.附子-甘草对离体大鼠衰竭心脏的影响及其指纹图谱研究[J].中南药学,2019,17(3):65.
- [14]Sue LY, Leung AM. Levothyroxine for the Treatment of Subclinical Hypothyroidism and Cardiovascular Disease[J]. Front Endocrinol(Lausanne), 2020, 11(1):59158.
- [15]陈雪迪.亚临床甲减对心功能影响的研究[D].宁夏医科大学,2018.
- [16]胡冬冬,刘韬,石少波,等.丹曲林对慢性心力衰竭大鼠心室细胞钙运转及心功能的影响[J].中国医药导报,2020,17(17):4.
- [17]Stanilova SA, Gerenova JB, Miteva LD, et al. The Role of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Gene Polymorphism and Its Serum Levels in Hashimoto's Thyroiditis[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2018, 19(7):581.
- [18]Höfeling DB, Chavantes MC, Acencio MM, et al. Effects of low-level laser therapy on the serum TGF- $\beta$ 1 concentrations in individuals with autoimmune thyroiditis[J]. Photomed Laser Surg, 2014, 32(8):444.
- [19]Huang C, Wan L, Liu J. Effect of Xinfeng capsule on nuclear factor Kappa B/tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta 1/Smads pathways in rats with cardiac injuries induced by adjuvant arthritis[J]. J Tradit Chin Med, 2016, 36(1):92.

(收稿日期:2022-05-17)