

运动对糖尿病心肌纤维化大鼠心肌 I、III 型胶原及血管紧张素 II / 转化生长因子 $\beta 1$ /Smad2 通路的影响<https://doi.org/10.12307/2022.820>刘亚^{1,2}, 刘霞¹, 邓鹏辉¹, 季威¹, 李建平¹

投稿日期: 2021-06-29

采用日期: 2021-09-18

修回日期: 2021-10-24

在线日期: 2021-11-27

中图分类号:

R459.9; R587.1; [R34]

文章编号:

2095-4344(2022)26-04173-07

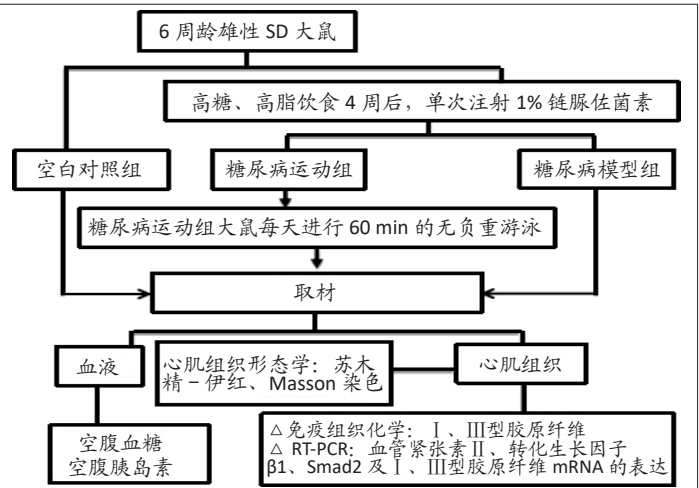
文献标识码: B

文章快速阅读:

文章特点一

△虽然转化生长因子 $\beta 1$ /Smad2 通路是心肌纤维化中的经典通路,但其作用在糖尿病心肌纤维化中的机制仍有待研究。

△血管紧张素 II 是心肌细胞纤维化发生的主要启动子,而转化生长因子 $\beta 1$ 是血管紧张素 II 发挥促纤维化作用的关键调节物,初步探讨血管紧张素 II 在转化生长因子 $\beta 1$ /Smad2 通路中是否有调控作用。



文题释义:

心肌纤维化: 是心血管系统疾病发展到一定阶段的共同病理性改变,也是心血管事件发生的重要病理基础。其按病因可分为弥漫和局限型,弥漫型常发生于非梗死性心肌疾病中(如糖尿病性心脏病及扩张型心肌病、高血压性心脏病),局限型常发生于梗死后心肌纤维瘢痕,该文主要是指弥漫性纤维化。

血管紧张素 II: 是肾素-血管紧张素-醛固酮系统的始动因子,主要通过上调转化生长因子 $\beta 1$ 及下游多种纤维化相关因子表达而发挥致纤维化效应,因此血管紧张素 II/转化生长因子 $\beta 1$ 通路也被认为是调控心肌纤维化的关键通路,同时也是抗纤维化治疗的关键靶点。

摘要

背景: 近年的研究发现运动能够改善2型糖尿病大鼠的心肌纤维化。

目的: 通过游泳运动干预糖尿病心肌纤维化动物模型,探讨血管紧张素 II/转化生长因子 $\beta 1$ /Smad2 信号通路及其下游因子在糖尿病心肌纤维化过程中的调控作用。

方法: 将40只雄性SD大鼠随机分为2组,其中10只正常饲养(空白对照组),另30只采用高糖高脂饲料+一次性注射1%链脲佐菌素方法建立糖尿病模型,建模成功后随机选取15只大鼠进行无负重游泳训练(每天1次,60 min/次,每周6 d)。训练8周后,检测大鼠空腹血糖与空腹胰岛素水平;取左心室心肌组织,苏木精-伊红观察心肌细胞形态学改变,Masson染色观察心肌间质胶原纤维沉积情况,免疫组化染色分析心肌组织内 I、III 型胶原纤维含量,RT-PCR分析血管紧张素 II、I 型胶原纤维、III 型胶原纤维、转化生长因子 $\beta 1$ 和 Smad2 mRNA 的表达。

结果与结论: ①与空白对照组相比,糖尿病模型组大鼠空腹血糖、胰岛素抵抗指数升高($P < 0.05$),与糖尿病模型组相比,糖尿病运动组大鼠空腹血糖、胰岛素抵抗指数降低($P < 0.05$);②苏木精-伊红染色与 Masson 染色显示,糖尿病模型组大鼠心肌细胞排列较紊乱,细胞间隙增宽,有炎性细胞浸润,心肌组织出现明显的纤维化;糖尿病运动组大鼠心肌细胞排列尚整齐,细胞间隙基本正常,心肌组织纤维化程度明显轻于糖尿病模型组;③与空白对照组相比,糖尿病模型组大鼠心肌组织 I 型胶原纤维含量增加($P < 0.05$);糖尿病模型组与糖尿病运动组大鼠心肌组织 I、III 型胶原纤维含量无明显差异($P > 0.05$);④与空白对照组相比,糖尿病模型组大鼠心肌组织 I 型胶原纤维和转化生长因子 $\beta 1$ mRNA 表达量增加($P < 0.05$);与糖尿病模型组相比,糖尿病运动组大鼠心肌组织 I、III 型胶原纤维和转化生长因子 $\beta 1$ mRNA 表达量减少($P < 0.01$);⑤结果表明,游泳运动可有效预防糖尿病心肌纤维化的发生和发展,其作用机制可能与血管紧张素 II/转化生长因子 $\beta 1$ /Smad2 通路的抑制有关。

关键词: 有氧运动;糖尿病;心肌纤维化;转化生长因子 $\beta 1$ /Smad2;血管紧张素 II

Exercise effects on myocardial type I, III collagen and angiotensin II/transforming growth factor beta1/Smad2 pathway in diabetic myocardial fibrosis rats

Liu Ya^{1,2}, Liu Xia¹, Deng Penghui¹, Ji Wei¹, Li Jianping¹

¹Hunan Provincial Key Laboratory of Physical Fitness and Sports Rehabilitation, School of Physical Education of Hunan Normal University, Changsha 410012, Hunan Province, China; ²Hunan International Economics University, Changsha 410205, Hunan Province, China

¹湖南师范大学体育学院体适能与运动康复湖南省重点实验室,湖南省长沙市 410012; ²湖南涉外经济学院,湖南省长沙市 410205

第一作者: 刘亚, 女, 1994年生, 湖南省株洲市人, 汉族, 硕士, 主要从事运动与健康促进研究。

通讯作者: 刘霞, 教授, 硕士生导师, 湖南师范大学体育学院体适能与运动康复湖南省重点实验室, 湖南省长沙市 410012

<https://orcid.org/0000-0002-6566-2131> (刘亚)

基金资助: 湖南省社科基金(19YBA238), 项目负责人: 刘霞; 湖南省教育厅重点项目(19A303), 项目负责人: 刘霞

引用本文: 刘亚, 刘霞, 邓鹏辉, 季威, 李建平. 运动对糖尿病心肌纤维化大鼠心肌 I、III 型胶原及血管紧张素 II / 转化生长因子 $\beta 1$ /Smad2 通路的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(26):4173-4179.



Liu Ya, Master, Hunan Provincial Key Laboratory of Physical Fitness and Sports Rehabilitation, School of Physical Education of Hunan Normal University, Changsha 410012, Hunan Province, China; Hunan International Economics University, Changsha 410205, Hunan Province, China

Corresponding author: Liu Xia, Professor, Master's supervisor, Hunan Provincial Key Laboratory of Physical Fitness and Sports Rehabilitation, School of Physical Education of Hunan Normal University, Changsha 410012, Hunan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Recent studies have found that exercise can improve myocardial fibrosis in type II diabetic rats.

OBJECTIVE: To investigate the regulatory role of angiotensin II/transforming growth factor β 1/Smad2 signaling pathway and its downstream factors in the process of diabetic myocardial fibrosis through swimming exercises in an animal model of diabetic myocardial fibrosis.

METHODS: Forty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups: a blank control group ($n=10$) and a diabetes model group ($n=30$). Rats in the blank control group were raised under a normal diet, and rats in the diabetes model group were fed with high-sugar and high-fat diet and treated with a single injection of 1% streptozotocin to establish a diabetic model. After successful modeling, 15 rats were randomly selected from the diabetes model group as a diabetes exercise group. Rats in the diabetes exercise group were subjected to non-weight bearing swimming, 60 minutes per day, 6 days per week. After training for 8 weeks, the fasting blood glucose and fasting insulin levels of rats were tested. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the morphological changes of myocardial cells. Masson staining was used to observe the deposition of collagen fibers in the myocardial interstitium. Immunohistochemical staining was used to analyze the content of type I and III collagen fibers in myocardial tissue. Reverse transcription PCR was used to detect the mRNA expression of angiotensin II, type I collagen fiber, type III collagen fiber, transforming growth factor β 1, and Smad2.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the blank control group, the fasting blood glucose level and insulin resistance index were increased in the diabetes model group ($P < 0.01$). Compared with the diabetes model group, the fasting blood glucose and insulin resistance index were decreased in the diabetes exercise group ($P < 0.05$). Results of hematoxylin-eosin staining and Masson staining showed that disordered arrangement of myocardial cells, widened intercellular space, inflammatory cell infiltration, and obvious myocardial fibrosis in the diabetic model group. Whereas the arrangement of myocardial cells was still in order, the intercellular space was basically normal, and myocardial fibrosis was significantly relieved in the diabetic exercise group compared with the diabetic model group. The content of type I collagen fibers in rat myocardial tissue was increased in the diabetic model group compared with the blank control group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the content of type I and III collagen fibers in rat myocardial tissue between the diabetic model group and the diabetic exercise group ($P > 0.05$). Compared with the blank control group, the mRNA expression of type I collagen fibers and transforming growth factor β 1 in rat myocardial tissue was increased in the diabetic model group ($P < 0.05$). Compared with the diabetic model group, the mRNA expression of type I and III collagen fibers and transforming growth factor β 1 in rat myocardial tissue was decreased in the diabetic exercise group ($P < 0.01$). To conclude, swimming can effectively prevent the occurrence and development of diabetic myocardial fibrosis, which may be related to the inhibition of the angiotensin II/transforming growth factor β 1/Smad2 pathway.

Key words: aerobic exercise; diabetes; myocardial fibrosis; transforming growth factor β 1/Smad2; angiotensin II

Funding: Hunan Provincial Social Science Foundation, No. 19YBA238 (to LX); Hunan Provincial Department of Education Key Project, No. 19A303 (LX)

How to cite this article: LIU Y, LIU X, DENG PH, JI W, LI JP. Exercise effects on myocardial type I, III collagen and angiotensin II/transforming growth factor β 1/Smad2 pathway in diabetic myocardial fibrosis rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(26):4173-4179.

0 引言 Introduction

世界糖尿病联盟预计 2045 年糖尿病人口将猛增到 6.93 亿^[1], 65% 的患者死于心血管疾病并发症, 目前中国已成为糖尿病患病率增长速度最快的国家之一^[2]。糖尿病有多方面的诱因, 以胰岛素分泌不足或胰岛素抵抗而引起的高血糖为主要特征, 能够引起微血管和大血管并发症。糖尿病心肌纤维化主要发生在糖尿病心肌病的晚期, 是最常见的糖尿病心血管并发症^[3], 心肌纤维化是指心脏成纤维细胞活性增加导致心肌成纤维细胞表型变化, 转化为肌成纤维细胞, 从而大量分泌细胞外基质蛋白(例如 I 型和 III 型胶原蛋白), 导致细胞外基质过多在心肌中积累的病理过程, 这也是糖尿病及并发症致残致死的主要元凶^[4]。因此抑制心肌成纤维细胞过度增殖及细胞外基质的异常沉积、恢复胶原的合成与降解平衡是预防心肌纤维化的重要手段^[5]。

目前认为多种细胞因子异常表达与糖尿病心肌纤维化的发生有关, 主要包括肾素-血管紧张素-醛固酮系统、内皮素、结缔组织生长因子、基质金属蛋白酶、金属蛋白抑制剂等^[6-7]。在肾素-血管紧张素-醛固酮系统中, 血管紧张素 II、醛固酮都对心肌纤维化有重要的影响, 血管紧张素 II 不仅可促进血管收缩、激活醛固酮, 还能调节致纤维化因子转化生长因子 β 1 和内皮素、细胞外基质的表达, 促进心肌肥厚和纤维化^[8-9]。转化生长因子 β 1 是目前已知哺乳动物体内最强的致心肌纤维化因子, 由转化生长因子 β 、转化生长因子 β 受体和其下游 Smads 家族构成的转化生长因子 β /Smads 信号通路, 调节心肌间质胶原代谢的平衡和病理状态下的紊乱, 也是参

与多种脏器纤维化的共同途径^[10]。转化生长因子 β 1 可以通过调节下游 Smad 蛋白促进纤维化因子表达, 并诱导纤维化。大量研究表明, 运动有改善糖尿病患者糖脂代谢、增加胰岛素敏感性、抑制细胞凋亡发展等作用^[11]。另外, 近年发现运动可以降低间歇性低氧诱发的心肌纤维化程度^[12]。侯改霞等^[13]研究发现运动能够改善 2 型糖尿病大鼠心肌纤维化, 其机制可能与晚期糖基化终末产物/氧化应激/核因子 κ B 有关。所以目前对糖尿病心肌纤维化具体的机制仍不清楚, 尤其关于运动是否可以通过调节转化生长因子 β 1/Smad2 信号通路来调节糖尿病心肌纤维化的研究更少。此次实验旨在建立糖尿病心肌纤维化动物模型, 通过游泳运动干预初步探讨血管紧张素 II / 转化生长因子 β 1/Smad2 信号通路对 I、III 型胶原纤维的影响以及在糖尿病心肌纤维化中的调控作用, 为游泳运动干预糖尿病心肌纤维化提供相应的实验数据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验, 计量资料比较采用 t 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2018 年 5-12 月在湖南师范大学体育学院实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 以 6 周龄雄性 SD 大鼠为对象, 体质量 150-190 g, 购于长沙市天勤生物技术有限公司, 许可证号: SCXK (湘)2014-0011。分笼饲养, 每笼五六只, 室温为 (23±2) °C, 空气湿度为 45%-55%, 自然光, 每天定时更换垫料。适应喂养 3 d 后随机分为空白对照组 ($n=10$) 与糖尿病模型组 ($n=30$)。

实验方案经湖南师范大学医学伦理委员会批准(2018134)。

1.3.2 主要试剂 葡萄糖 GLU 试剂盒、蛋白定量测定试剂盒(南京建成生物工程研究所); Evo M-MLV RT Premix for qPCR、SYBR® Green Premix Pro Taq HS qPCR kit 试剂盒(艾科瑞有限公司); EDTA(pH=8.0, 9.0) 抗原修复液、柠檬酸(pH=6.0) 抗原修复液、正常兔血清、I 型胶原纤维、III型胶原纤维(Servicebio)。

1.3.3 主要仪器 TGL-20M 台式高速冷冻离心机(湖南凯达科学仪器有限公司); T100 梯度 PCR 仪(Bio-Rad 公司); Biosafe-9702 梯度 PCR 仪[赛飞(中国)有限公司]; OptiMair™ 垂直流超净工作台(新加坡艺思高科技有限公司); AG-9245A 立式精密电热恒温鼓风干燥箱(上海柏欣仪器设备有限公司); SMA2000 Thermo 超微量紫外可见分光光度计(赛默飞世尔科技中国有限公司); 弗鲁克 R30A 电动搅拌器(广州市深化生物技术有限公司); JA1003N-5003N 系列千分之一电子精密天平(青岛聚创环保设备有限公司); Esco Lexicon® -86 °C 立式超低温冰箱(新加坡艺思高科技有限公司); 移液枪(北京卓信伟业科技有限公司); 临床倒置显微镜(上海福莱光学科技有限公司); 病理切片机(上海徠卡仪器有限公司); 组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 分组及造模方法 糖尿病模型组大鼠高脂高糖膳食饲养(购自南通特洛菲饲料科技有限公司, 按照 65.5% 常规饲料、10% 猪油、2.5% 胆固醇、1% 猪胆酸盐、20% 蔗糖配制), 自由进食; 喂养 4 周后禁食禁水 12 h, 按 40 mg/kg 剂量单次注射 1% 链脲佐菌素, 1 周后测大鼠尾静脉空腹血糖浓度超过 7.8 mmol/L 说明建模成功, 建模成功后恢复正常饮食^[14]。建模成功后随机选取 15 只大鼠进行无负重游泳训练, 作为糖尿病运动组。

组织工程实验动物造模过程的相关问题

造模目的	复制糖尿病心肌纤维化模型
选择动物的条件	6 周龄雄性 SD 大鼠, 无特定病原体
模型与所研究疾病的关系	糖尿病心肌纤维化模型是研究糖尿病心肌纤维化的经典模型
动物来源及品系	购于长沙市天勤生物技术有限公司, 雄性 SD 大鼠
造模技术描述	采用高脂膳食饲养, 自由进食, 高脂喂养 4 周后禁食、禁水 12 h, 按 40 mg/kg 剂量单次注射 1% 链脲佐菌素
动物数量及分组方法	将 40 只 SD 大鼠随机分为空白对照组 (n=10)、糖尿病模型组 (n=15)、糖尿病运动组 (n=15)
造模成功评价指标	注射 1% 链脲佐菌素 1 周后, 大鼠尾静脉空腹血糖浓度超过 7.8 mmol/L
造模后观察指标	空腹血糖, 苏木精-伊红和 Masson 染色、I、III型胶原纤维的免疫组化及 mRNA 表达量
造模后动物处理	采集血清, 麻醉处死大鼠, 取大鼠心肌组织
伦理委员会批准文件	该实验经湖南师范大学伦理委员会批准(2018134)

1.4.2 运动方案 糖尿病运动组大鼠每天进行 60 min 的无负重游泳, 每周 6 d, 共 8 周。前一周是适应周, 一周内过渡

到 60 min^[15]。训练期间, 游泳池为 120 cm×80 cm×70 cm 长方体塑料水桶, 水深 50 cm, 水温 (31±2) °C, 随时观察大鼠状态, 防止溺水, 及时清除大鼠粪便, 保持水面卫生。运动后迅速用毛巾吸干水分, 并吹干放回笼中。

1.4.3 实验取材 取材在最后一次训练后 12 h 进行, 禁食、禁水。以 0.5 mL/kg 剂量腹腔注射 20% 乌拉坦麻醉, 随后胸主动脉取血, 放入血清促凝管中, 静置半小时, 4 °C 下 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清 -20 °C 冰箱保存待测。取大鼠左心室心肌组织, 生理盐水冲洗, 部分用 40 g/L 多聚甲醛溶液固定, 制备石蜡切片进行苏木精-伊红与 Masson 染色, 观察心肌组织病变程度; 另一部分放入冻存管内迅速投入液氮, 后放于 -80 °C 冰箱冷冻待测。

1.5 主要观察指标

1.5.1 血清空腹血糖、空腹胰岛素水平测定 采用葡萄糖氧化酶法检测空腹血糖, 严格按照试剂盒说明书操作。采用酶联免疫法测定血清空腹胰岛素水平, 严格按照试剂盒说明书操作。胰岛素抵抗指数 = 空腹胰岛素 × 空腹血糖 / 22.5, 胰岛素抵抗指数 ≥ 2.69 说明伴胰岛素抵抗。

1.5.2 心肌组织形态学观察 从多聚甲醛溶液中取出心肌组织, 制备石蜡切片, 进行苏木精-伊红染色和 Masson 染色。

苏木精-伊红染色: 石蜡切片融蜡, 切片放入苏木精染液染 3-5 min, 自来水洗, 分化液分化, 自来水洗, 返蓝液返蓝, 流水冲洗。其次, 切片脱水后, 用伊红染液染色 5 min。切片透明后, 用中性树胶进行封固, 镜下观察。

Masson 染色: 石蜡切片融蜡, 切片用重铬酸钾浸泡切片过夜, 次日, 自来水洗。后浸泡在铁苏木精中 3 min, 自来水洗, 盐酸乙醇溶液分化, 自来水洗。再用丽春红酸性品红浸染切片 (5-10 min), 自来水洗。磷钼酸水溶液浸染 1-3 min。直接用苯胺蓝染液染 (3-6 min), 勿水洗。用 1% 冰醋酸分化切片, 无水乙醇脱水。切片透明后, 用中性树胶封固, 镜下观察。

1.5.3 心肌组织 I、III型胶原纤维免疫组织化学观察 石蜡切片融蜡, 切片放入抗原修复缓冲液 (pH=6.0) 中 (切忌干片)。室温冷却后, 用 PBS 在摇床上洗涤玻片 3 次 (pH=7.4), 5 min/ 次。放入体积分数 3% 双氧水溶液中, 室温避光孵育 25 min, 用 PBS 洗涤 (pH=7.4) 3 次, 5 min/ 次。3%BSA 室温封闭 30 min。加一抗: 轻甩封闭液, 把 PBS 滴在切片上, 按比例配好一抗 (I 型胶原, 1 : 500; III型胶原, 1 : 400), 4 °C 孵育过夜。加二抗: 用 PBS 在摇床上洗涤 (pH=7.4) 3 次, 5 min/ 次; 微微干时, 滴加二抗 (稀释 1 : 200)HRP 标记, 室温孵育 50 min。DAB 显色, 苏木精复染 3 min 左右, 苏木精返蓝液返蓝, 每次染完需立即用自来水冲洗。切片透明后, 用中性树胶进行封固。镜检, 图像采集用 Image pro plus 软件分析, 结果判读: 苏木精染色的细胞核呈蓝色, DAB 阳性表达为棕黄色。

1.5.4 心肌组织相关基因表达量测定 提取心肌组织总 RNA, 用紫外分光光度计检测其浓度及纯度, 反转录得到

cDNA, 置于 -20 °C 保存备用。采用实时荧光定量 PCR 检测血管紧张素 II、转化生长因子 β 1、Smad2、I、III 型胶原纤维 mRNA 表达水平。反应体系 (50 μ L): 2 \times SYBR Green Pro Taq HS Premix 25 μ L, Template 5 μ L, 上下引物各 1 μ L, ddH₂O up to 50 μ L。反应条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s; 60 °C 退火 34 s; 重复 40 个循环。程序运行结束后, 将目的基因的 Ct 值与内参 GAPDH 进行标准化, 计算出目的基因的相对表达量。PCR 引物序列来自上海生物工程有限公司设计并合成, 引物序列见表 1。

表 1 | RT-PCR 特异性引物序列表

Table 1 | Primer sequences of reverse transcription PCR

基因	引物序列 5'-3'
血管紧张素 II	正义链 AGC CAG TCT CCC TTC CAG ATC AC
	反义链 GGA CAG GCA AGC CAT TCT CAC AG
转化生长因子 β 1	正义链 ACC GCA ACA ACG CCA TCT ATG AG
	反义链 GGC ACT GCT TCC CGA ATG TCT G
Smad2	正义链 TGT CGT CCA TCT TGC CAT TCA CTC
	反义链 TGT TCT CCA CCA CCT GCT CCT C
I 型胶原纤维	正义链 GAC AGG CGA ACA AGG TGA CAG AG
	反义链 CAG GAG AAC CAG GAG AAC CAG GAG
III 型胶原纤维	正义链 CAA TTC CTG GCG TTA CCT TG
	反义链 AGC CCT GTA TTC CGT CTC CT
GAPDH	正义链 AAT GAC CCC TTC ATT GAC CTC
	反义链 TGC TGA CAA TCT TGA GGG AGT

1.6 统计学分析 所有数据均用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析处理, 结果采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 进行独立样本 *T* 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 建模和游泳过程中死亡大鼠 16 只, 尸体已按要求处理, 最后进入结果分析 24 只, 其中空白对照组 10 只、糖尿病模型组 7 只、糖尿病运动组 7 只。

2.2 各组大鼠血清空腹血糖与空腹胰岛素检测结果 与空白对照组相比, 糖尿病模型组大鼠血清空腹血糖、胰岛素抵抗指数增加 ($P < 0.01$); 与糖尿病模型组相比, 糖尿病运动组大鼠血清空腹血糖、胰岛素抵抗指数减少 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 | 各组大鼠血清空腹血糖、空腹胰岛素与胰岛素抵抗指数的变化 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 | Fasting blood glucose, fasting insulin and insulin resistance index in rat serum

组别	<i>n</i>	空腹血糖 (mmol/L)	空腹胰岛素 (mU/L)	胰岛素抵抗指数
空白对照组	10	4.55 \pm 0.98	3.19 \pm 0.35	0.62 \pm 0.14
糖尿病模型组	7	25.09 \pm 4.33 ^a	3.11 \pm 0.50	3.45 \pm 1.10 ^a
糖尿病运动组	7	14.16 \pm 6.44 ^b	2.91 \pm 0.26	1.83 \pm 0.86 ^b

表注: 与空白对照组比, ^a $P < 0.01$; 与糖尿病模型组比, ^b $P < 0.05$

2.3 各组大鼠心肌组织病理观察结果 见图 1。

苏木精-伊红染色: 空白对照组大鼠心肌细胞排列整齐, 细胞形态、大小、间隙正常, 细胞核均匀分布; 糖尿病模型组大鼠心肌细胞排列较紊乱, 细胞形态、大小异常, 细胞间隙增宽, 有炎性细胞浸润; 糖尿病运动组大鼠心肌细胞排列

尚整齐, 细胞形态、大小异常, 细胞间隙基本正常。

Masson 染色: 空白对照组间质蓝染面积小, 纤维化不明显; 糖尿病模型组间质蓝染面积明显增加, 有明显的纤维化; 糖尿病运动组间质蓝染面积减少, 有少许纤维化改变。Masson 染色半定量结果显示, 与空白对照组相比, 糖尿病模型组大鼠心肌纤维胶原容积分数增加 ($P < 0.01$); 与糖尿病模型组相比, 糖尿病运动组大鼠心肌纤维胶原容积分数减少 ($P < 0.01$)。

2.4 各组大鼠心肌组织 I、III 型胶原纤维免疫组化染色结果 见图 2。

大鼠心肌组织 I、III 型胶原纤维阳性染色区域主要位于细胞间质, 与空白对照组相比, 糖尿病模型组大鼠心肌组织 I 型胶原纤维增加 ($P < 0.05$), III 型胶原纤维无明显变化 ($P > 0.05$); 与糖尿病模型组相比, 糖尿病运动组大鼠心肌组织的 I、III 型胶原纤维无明显变化 ($P > 0.05$)。

2.5 各组大鼠心肌组织相关基因表达量检测结果 见图 3。

与空白对照组相比, 糖尿病模型组大鼠心肌组织 III 型胶原纤维和转化生长因子 β 1 mRNA 表达量增加, ($P < 0.05$), 心肌组织 I 型胶原纤维、血管紧张素 II、Smad2 mRNA 表达量无明显变化 ($P > 0.05$); 与糖尿病模型组相比, 糖尿病运动组大鼠心肌组织 I、III 型胶原纤维和转化生长因子 β 1 mRNA 表达量均减少 ($P < 0.01$), 血管紧张素 II、Smad2 mRNA 表达量无明显变化 ($P > 0.05$)。

3 讨论 Discussion

一般来说, 心肌细胞占心脏细胞总数的 1/3、心肌结构的 2/3, 其中 90% 以上是成纤维细胞, 成纤维细胞能够合成胶原等细胞外基质成分和胶原酶。临床研究显示, 心肌纤维化是指心肌成纤维细胞过度增殖、过量沉积, 以各型胶原比例失调及排列紊乱为主要特征, 细胞外基质的合成与降解失衡的一种疾病。其中, I 型和 III 型胶原纤维是心肌胶原网络的主要成分 (分别为 80% 和 11%), 胶原纤维数量和排列的变化都可使纤维化瘢痕形成, 促使心肌纤维化的发生、发展, 这也常被用于评估各器官组织纤维化程度^[16-17]。

此次实验苏木精-伊红、Masson 染色结果显示, 空白对照组大鼠心肌细胞排列整齐, 细胞形态、大小、间隙正常, 细胞核均匀分布; 糖尿病模型组大鼠心肌细胞排列较紊乱, 细胞形态、大小异常, 细胞间隙增宽, 有大量的炎性细胞浸润, 间质蓝染面积明显增加, 心肌细胞出现非常明显的纤维化; 糖尿病运动组大鼠心肌细胞排列尚整齐, 细胞形态、大小、间隙基本正常, 间质蓝染面积减少, 有少许纤维化改变, 说明糖尿病模型组和糖尿病运动组大鼠心肌均出现了不同程度的纤维化。目前为止, 糖尿病引起的心肌纤维化机制仍不清楚, 但有研究表明 I、III 型胶原纤维合成的比例是心脏成纤维细胞激活的重要指标^[18]。胶原纤维含量的改变可直接反映纤维化, 胶原蛋白的沉积可加速心肌纤维化的形成, 因此减少胶原蛋白的合成, 可能会被用来防治心肌纤维化。

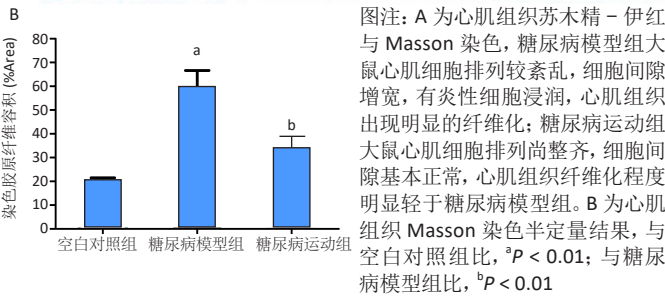
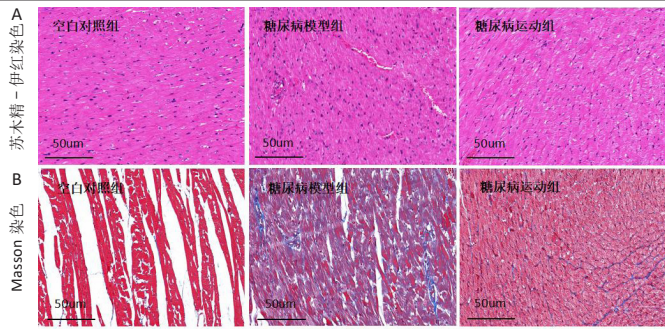


图1 | 各组大鼠心肌组织苏木精-伊红与 Masson 染色结果
Figure 1 | Hematoxylin-eosin and Masson staining of rat myocardial tissue

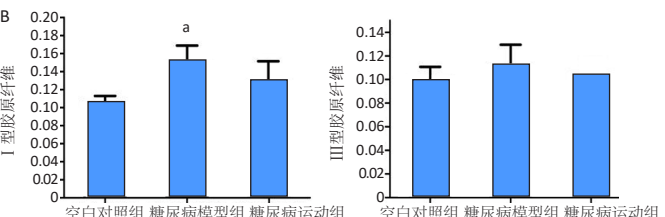
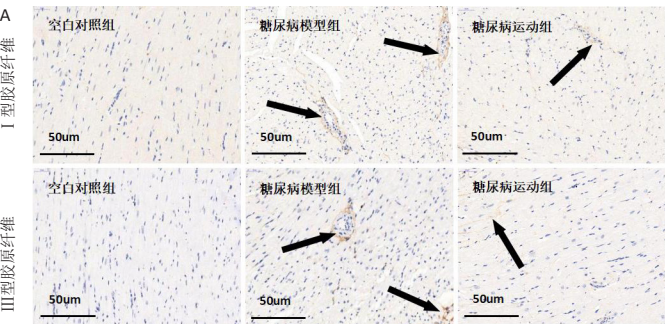


图2 | 各组大鼠心肌组织 I、III 型胶原纤维免疫组织化学结果
Figure 2 | Immunohistochemical staining of type I and III collagen fibers in rat myocardial tissue

此次实验 I、III 型胶原纤维免疫组织化学染色显示，糖尿病模型组大鼠心肌间质 I、III 型胶原纤维间有大量棕黄色物质沉积，说明其存在心肌纤维化；且该组大鼠心肌组织中 I、III 型胶原纤维 mRNA 水平显著升高，I、III 型胶原纤维是心肌纤维化的标志重要指标，这也进一步表明糖尿病大鼠心肌中发生了纤维化。经过 8 周游泳后，糖尿病运动组大鼠心肌纤维排列稍紊乱，有少量胶原沉积，但其纤维化程度轻于糖尿病模型组；且糖尿病运动组大鼠心肌组织中 I、III 型胶原纤维 mRNA 表达量显著低于糖尿病模型组，提示游泳运动有利于缓解糖尿病心肌纤维化。DA SILVA 等^[19]在链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠模型中发现，游泳能减少心肌中肿瘤坏死因子 α 含量、减轻机体炎症反应、缓解糖尿病心肌纤维化。

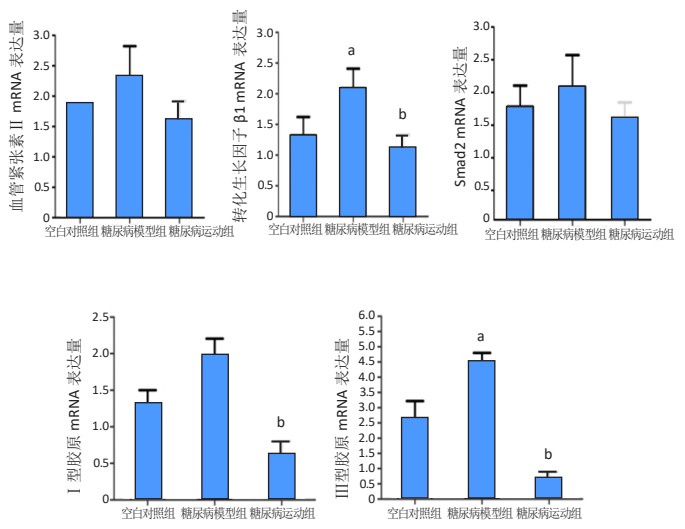


图3 | 各组大鼠心肌组织相关基因表达量
Figure 3 | Expression of related genes in rat myocardial tissue

NOVOA 等^[20]发现运动对心脏重塑有积极影响，表现为肌细胞肥大减少、胶原沉积减少、心肌纤维化的改善。SACRE 等^[21]的研究显示，为期 6 个月的运动不仅减轻了糖尿病前期患者的心肌纤维化程度，还提高了患者心脏功能。SILVA 等^[22]最新研究发现 4 周跑台运动降低了 I、III 型胶原 mRNA 的表达，I / III 型胶原比值下降，提示运动抑制了链脲佐菌素诱导的糖尿病心肌纤维化。目前多数研究证实适宜的运动能降低血糖，改善心肌纤维化，促进糖尿病大鼠心肌逆重塑，提高心脏功能^[23-24]。

转化生长因子 β1 是转化生长因子超家族中的一员，参与多种器官纤维化的调控，是目前公认的诱导纤维化能力最强的生长因子^[25]，主要表现在与心肌成纤维细胞表面的转化生长因子 β1 受体结合后，转化生长因子 β1 刺激下游 Smads 蛋白（主要是 Smad2/3）磷酸化并易位入核，诱导心肌成纤维细胞增殖、表型转化和胶原合成，并最终促进细胞外基质形成和心肌纤维化^[26]。Smad2/3 磷酸化是激活转化生长因子 β1/Smads 信号通路的重要步骤。在正常生理状态下，心脏中的转化生长因子 β1、I、III 型胶原含量很低，但在高血糖、氧化应激、炎症等各种因素的刺激下，体内转化生长因子 β1 含量及其受体的表达发生改变，诱导心肌成纤维细胞向肌成纤维细胞分化，刺激胶原、纤维连接蛋白、蛋白多糖等的合成，活化的转化生长因子 β1 会进一步导致细胞外基质沉积，加重心脏纤维化^[27]。沈豪等^[28]的研究发现，通过靶向转化生长因子 β/Smads 信号通路的治疗可以抑制糖尿病模型大鼠心肌纤维化进程。研究发现，糖尿病大鼠心肌转化生长因子 β1 表达增加 Smad2/3 磷酸化，转化生长因子 β1/Smad 信号通路也被激活^[29]，提示转化生长因子 β1/Smad 信号通路在糖尿病心肌病中会被激活。GUAN 等^[30]发现糖尿病大鼠心肌胶原含量与转化生长因子 β1 含量有关，转化生长因子 β1 可能参与了纤维化的过程。王秋岩等^[31]发现糖尿病模型组小猪心肌中转化生长因子 β1 表达显著增加，由此认

为在高糖状态下转化生长因子 $\beta 1$ 表达增加, 并通过多个途径引起细胞外基质的异常积累, 心肌细胞出现纤维化, 严重损害心脏功能。其中血管紧张素 II / 转化生长因子 $\beta 1$ 信号轴被认为是心肌纤维化最重要的调节途径^[32], 血管紧张素 II 通过促进细胞外基质沉积来诱导纤维化, 也是心肌细胞纤维化发生的主要启动子^[33-35]。通常认为血管紧张素 II 通过激活转化生长因子 $\beta 1$ 、2 上调结缔组织生长因子, 引起细胞外基质改变, 从而促进胶原蛋白和纤连蛋白的沉积增加, 导致纤维化^[36-37]。ROSIN 等^[38] 研究证明, 血管紧张素 II 可以激活转化生长因子 $\beta 1$ 合成、分泌和下游 Smad2 信号通路, 从而产生依赖 Smad2 的结缔组织生长因子, 这反过来又导致心肌细胞中的成纤维细胞的增殖, 并促进纤维细胞分化成肌纤维细胞, 最终导致细胞外基质的沉积。转化生长因子 $\beta 1$ 也是血管紧张素 II 发挥促纤维化作用的关键调节物, 有研究显示, 下调转化生长因子 $\beta 1$ /Smad2 信号通路相关蛋白的表达可减轻血管紧张素 II 诱导的心肌肥大^[39], 可见转化生长因子 $\beta 1$ /Smad2 信号通路在心脏重塑中有着重要的作用。此次实验结果也表明, 糖尿病模型组转化生长因子 $\beta 1$ 、Smad2 mRNA 表达量皆高于空白对照组, 推测一方面可能是糖尿病能通过某种途径诱导了转化生长因子 $\beta 1$ 的增加, 从而激活转化生长因子 $\beta 1$ /Smad 信号通路, 促进了下游 Smad2 蛋白的合成; 另一方面, 转化生长因子 $\beta 1$ 通过结合下游的 Smad2 蛋白促使胶原蛋白的合成, 进一步说明了糖尿病可通过激活转化生长因子 $\beta 1$ /Smad2 信号通路, 促进 I、III 型纤维蛋白的生成的假设。

除此之外, 血管紧张素 II 可以在体外和体内调节转化生长因子 $\beta 1$ 和胶原蛋白表达, 血管紧张素 II 通过对转化生长因子 $\beta 1$ 的调节在心肌纤维化中发挥重要作用^[40-41]。血管紧张素 II 诱导的高血压心肌纤维化, 因转化生长因子 $\beta 1$ 的参与可以诱导成纤维细胞增殖、分化和胶原合成^[42-43]。叶春芳等^[44] 研究显示, 转化生长因子 $\beta 1$ 与血管紧张素 I、血管紧张素 II 存在显著的正相关, 血管紧张素 II 和转化生长因子 $\beta 1$ 可互相调节共同作用于肾脏, 从而产生肾小球硬化和肾间质纤维化。此次实验结果与其一致: 与空白对照组相比, 糖尿病模型组大鼠心肌组织中血管紧张素 II、转化生长因子 $\beta 1$ 、I、III 型胶原纤维 mRNA 的表达量增加。GLENN 等^[45] 研究结果显示, 心脏脂肪大量堆积加强了血管紧张素 II 诱导的活性氧和转化生长因子 $\beta 1$ 的表达, 增加 Smad3 蛋白磷酸化, 促进心肌纤维化的进一步发展; 最新的研究也进一步证实, 血管紧张素 II 引起的心肌纤维化部分归因于转化生长因子 $\beta 1$ /Smad2/3 通路^[46]。已有大量的研究表明, 有氧运动对因高血压、糖尿病和衰老等多种病理因素诱导的心肌纤维化有积极的改善作用^[47], 有氧运动能改善糖尿病大鼠心肌纤维化、增强心肌功能^[48]。国内外的研究表明, 糖尿病心肌病中心肌血管紧张素 II 含量显著增加^[49], 而运动能降低血管紧张素 II 和多种氧化酶的表达。MOUSA 等^[50] 研究发现, 一方面, 运动能降低心力衰竭模型家兔髓头端血管紧张素 II 和血管

紧张素 AT1 受体的表达, 提高压力反射功能; 另一方面, 由高血压诱发的病理性心肌肥大中, 有氧运动能显著减少大鼠血浆和心肌组织血管紧张素 II 含量、提高心功能指标^[51]。贺慧杰^[52] 在对不同病程糖尿病纤维化的实验中发现, 与同期对照组相比, 随着时间的增长, 糖尿病大鼠心肌组织血管紧张素 II 和转化生长因子 $\beta 1$ 含量均显著升高, 进一步确认血管紧张素 II 和转化生长因子 $\beta 1$ 是糖尿病心肌病过程中的重要指标; 8 周有氧运动后, 糖尿病大鼠心肌组织中血管紧张素 II、转化生长因子 $\beta 1$ 含量明显降低。此次实验结果也发现, 糖尿病模型组大鼠心肌组织血管紧张素 II、转化生长因子 $\beta 1$ 、Smad2 及 I、III 型胶原纤维 mRNA 的表达量增加; 经 8 周游泳训练后, 糖尿病运动组大鼠心肌组织血管紧张素 II、转化生长因子 $\beta 1$ 、Smad2 及 I、III 型胶原纤维 mRNA 均减少, 所以作者推测糖尿病可以上调血管紧张素 II 的表达、促进转化生长因子 $\beta 1$ /Smad2 通路的激活, 促进心肌纤维化的发生发展; 游泳运动可以降低血管紧张素 II 表达, 有效阻止转化生长因子 $\beta 1$ /Smad2 通路的激活, 从而减少心肌组织中 I、III 型胶原蛋白的产生, 维持和恢复胶原纤维的动态平衡, 改善糖尿病心肌纤维化。

结论: 游泳运动可有效预防糖尿病心肌纤维化的发生和发展, 其作用机制可能与血管紧张素 II / 转化生长因子 $\beta 1$ /Smad2 通路的抑制有关。

作者贡献: 第一作者设计实验, 全体作者实施。

经费支持: 该文章接受了“湖南省社科基金(19YBA238)及湖南省教育厅重点项目(19A303)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经湖南师范大学医学伦理委员会批准(2018134)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过湖南师范大学体育学院经济管理学院专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] CHO NH, SHAW JE, KARURANGA S, et al. IDF diabetes at las: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018;138(4):271.
- [2] XU Y, WANG L, HE J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults. *JAM A.* 2013;310(9):948-959.
- [3] SAMUEL CS, HEWITSON TD, ZHANG Y, et al. Relaxin ameliorates fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Endocrinology.* 2008;149(7):3286-3293.
- [4] RUSSO I, FRANGOGIANNIS NG. Diabetes-associated cardiac fibrosis: Cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;90:84-93.

- [5] 郑海清, 应苗法, 顾胜龙, 等. 心肌纤维化的信号转导机制及新型抑制剂的研究进展 [J]. 中国细胞生物学学报, 2019,41(2):268-274.
- [6] 王禹川. 不同因子致心肌纤维化分子学机制 [J]. 医学综述, 2012, 18(17):2736-2740.
- [7] LEASK A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGF- β , angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ Res.* 2010;106(11):1675-1680.
- [8] 魏峰涛, 方宁远, 杨巍维, 等. 体外模拟局部肾素血管紧张素系统对心肌纤维化的影 [J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2007,27(9): 1115-1118.
- [9] COPAJA SOTO M, VALENZUELA R, SALDANA A, et al. Early expression of monocyte chemoattractant Protein-1 correlates with the onset of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in rats with distinct Angiotensin-converting enzyme polymorphism. *J Renin Angiotensin Aldosterone Sys.* 2008;9(3):154-162.
- [10] MENG XM, TANG PM, LI J, et al. TGF- β /Smad signaling in re-nal fibrosis. *Front Physiol.* 2015;6:82.
- [11] MEJIAS-PENA Y, ESTEBANEZ B, RODRIGUEZ-MIGUELEZ P, et al. Impact of resistance training on the autophagy inflammation apoptosis crosstalk in elderly subjects. *Aging (Albany NY).* 2017;9(2):408-418.
- [12] CHEN TI, TU WC. Exercise attenuates intermittent hypoxia-induced cardiac fibrosis associated with sodium-hydrogen exchanger-1 in rats. *Front Physiol.* 2016;7:462.
- [13] 侯改霞, 肖国强. 运动训练对糖尿病大鼠心肌纤维化的改善作用及其可能机制 [J]. 体育学刊, 2013(2):130-134.
- [14] 黄昶签, 肖谦, 赵柯湘, 等. 2 型糖尿病心脏病变模型建立方法的实验研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2007,32(1):15-17.
- [15] 孙昌亮. TGF- β /Smad 及其相关 miRNA 在运动干预糖尿病心肌纤维化形成中的调节作用 [D]. 扬州: 扬州大学, 2018.
- [16] 杨四宝, 高永建. 转化生长因子 β 与 microRNAs 的串话效应在心肌纤维化中的研究进展 [J]. 中国循环杂志, 2013,28(7):552-554.
- [17] 孙帅锋, 刘巍. 心肌纤维化病理机制及诊疗策略进展 [J]. 国际心血管病杂志, 2020,47(5):264-267.
- [18] LIU JC, ZHOU L, WANG F, et al. Osteon decreases collagen I /III contents and their ratio in TGF- β 1-overexpressed mouse cardiac fibroblasts through regulating the TGF- β /Smad signaling pathway. *Chin J Nat Med.* 2018;16:321-329.
- [19] DA SILVA E, NATALI A, DA SILVA MF, et al. Swimming training attenuates the morphological reorganization of the myocardium and local inflammation in the left ventricle of growing rats with untreated experimental diabetes. *Pathol Res Pract.* 2016;212(4):325-334.
- [20] NOVOA U, ARAUNA D, MORAN M, et al. High-intensity exercise reduces cardiac fibrosis and hypertrophy but does not restore the nitroso-redox imbalance in diabetic cardiomyopathy. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:7921363.
- [21] SACRE JW, JELLIS CL, JENKINS C, et al. A six-month exercise intervention in subclinical diabetic heart disease: effects on exercise capacity, autonomic and myocardial function. *Metabolism.* 2014;63(9):1104-1114.
- [22] SILVA FS, BORTOLIN RH, ARAUJO DN, et al. Exercise training ameliorates matrix metalloproteinases 2 and 9 messenger RNA expression and mitigates adverse left ventricular remodeling in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovasc Pathol.* 2017;29:37-44.
- [23] VEERANKI S, GIVVIMANI S, KUNDU S, et al. Moderate intensity exercise prevents diabetic cardiomyopathy associated contractile dysfunction through restoration of mitochondrial function and connexin 43 levels in db/db mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;92:163-173.
- [24] SILVA E, NATALI AJ, SILVA MF, et al. Ventricular remodeling in growing rats with experimental diabetes: The impact of swimming training. *Pathol Res Pract.* 2013;209(10):618.
- [25] LI S, LIU J, TAN J, et al. Inhibition of raf1 ameliorates bleomycin induced pulmonary fibrosis through attenuation of TGF β 1 signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2018;315(2):241-247.
- [26] MA ZG, YUAN YP, WU HM, et al. Cardiac fibrosis: new insights into the pathogenesis. *Int J Biol Sci.* 2018;14(12):1645-1657.
- [27] WANG SQ, LI D, YUAN Y. Long-term moderate intensity exercise alleviates myocardial fibrosis in type 2 diabetic rats via inhibitions of oxidative stress and TGF- β 1/Smad pathway. *J Physiol Sci.* 2019;69(6): 861-873.
- [28] 沈豪, 郭霜, 刘秀芬, 等. TGF- β 1/Smad 信号通路对糖尿病大鼠心肌纤维化中的作用 [J]. 中国药理学通报, 2018,34(4):522-527.
- [29] YUE Y, MENG K, PU Y, et al. Transforming growth factor beta (TGF- β) mediates cardiac fibrosis and induces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;133:124-130.
- [30] GUAN J, LIU WQ, XING MQ, et al. Elevated expression of periostin in diabetic cardiomyopathy and the effect of valsartan. *BMC Cardiovasc Disord.* 2015;15:90.
- [31] 王秋岩, 田鹤, 穆长征. TGF- β 1 在猪糖尿病心肌组织的表达及通心络的干预作用 [J]. 中国体视学与图像分析, 2014,19(2):204-209.
- [32] EL-RAHMAN SA, FAYED HM. Targeting AngII/AT1R signaling pathway by Perindopril inhibits ongoing liver fibrosis in rat. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019;13(12):2131-2141.
- [33] PAN XC, LIU Y, CEN YY, et al. Dual Role of Triptolide in Interrupting the NLRP3 Inflammation Pathway to Attenuate Cardiac Fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(2):360.
- [34] DING J, TANG Q, LUO B, et al. Klotho inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy, fibrosis, and dysfunction in mice through suppression of transforming growth factor- β 1 signaling pathway. *Eur J Pharmacol.* 2019;859:172549.
- [35] SILVA RB, MESQUITA FF, ANDREO M, et al. Effect of gestational protein restriction on left ventricle hypertrophy and heart angiotensin II signaling pathway in adult offspring rats. *Health.* 2013;5:78-84.
- [36] TSUTSUI H, MATSUSHIMA S, KINUGAWA S, et al. Angiotensin II type 1 receptor blocker attenuates myocardial remodeling and preserves diastolic function in diabetic heart. *Hypertens Res.* 2007;30(5):439-449.
- [37] LIU X, XU Q, WANG X, et al. Irbesartan ameliorates diabetic cardiomyopathy by regulating protein kinase D and ER stress activation in a type 2 diabetes rat model. *Pharmacol Res.* 2015;93:43-51.
- [38] ROSIN NL, FALKENHAM A, SOPEL MJ, et al. Regulation and role of connective tissue growth factor in AngII-induced myocardial fibrosis. *Am J Pathol.* 2013;182(3):714-726.
- [39] HE JG, CHEN SL, HUANG YY, et al. The nonpeptide AVE0991 attenuates myocardial hypertrophy as induced by angiotensin II through downregulation of transforming growth factor-beta1/Smad2 expression. *Heart Vessels.* 2010;25(5):438-443.
- [40] LIU Y, LV H, TAN R, et al. Platelets Promote Ang II (Angiotensin II)-Induced Atrial Fibrillation by Releasing TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1) and Interacting With Fibroblasts. *Hypertension.* 2020;76(6): 1856-1867.
- [41] LI J, WANG S, ZHANG YL, et al. Immunoproteasome Subunit β 5i Promotes Ang II (Angiotensin II)-Induced Atrial Fibrillation by Targeting ATRAP (Ang II Type I Receptor-Associated Protein) Degradation in Mice. *Hypertension.* 2019;73(1):92-101.
- [42] ZHANG Y, SHAO L, MA A, et al. Telmisartan delays myocardial fibrosis in rats with hypertensive left ventricular hypertrophy by TGF- β 1/Smad signal pathwa. *Hypertens Res.* 2013;37:43-49.
- [43] GONZÁLEZ-RAMOS M, CALLEROS L, LÓPEZ-ONGIL S, et al. HSP70 increases extracellular matrix production by human vascular smooth muscle through TGF- β 1 up-regulation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013; 45(2):232-242.
- [44] 叶春芳, 李树民, 王晓丽, 等. 糖尿病肾病合并高血压患者血清转化生长因子及相关指标的变化 [J]. 江苏医药, 2010,36(9):1035-1037.
- [45] GLENN DJ, CARDEMA MC, NI W, et al. Cardiac steatosis potentiates angiotensin II effects in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;30(4):H339-350.
- [46] CHEN RR, FAN XH, CHEN G, et al. Irisin attenuates angiotensin II-induced cardiac fibrosis via Nrf2 mediated inhibition of ROS/ TGF β 1/ Smad2/3 signaling axis. *Chem Biol Interact.* 2019;302:11-21.
- [47] MA N, LIU HM, XIA T, et al. Chronic aerobic exercise training alleviates myocardial fibrosis in aged rats through restoring bioavailability of hydrogen sulfide. *Can J Physiol Pharmacol.* 2018;96(9):902-908.
- [48] HAFSTAD AD, BOARDMAN NT, AASUM E. How Exercise May Amend Metabolic Disturbances in Diabetic Cardiomyopathy. *Antioxid Redox Signal.* 2015;22:1587-1605.
- [49] ZHANG Y, ZHANG Y. Toll-like receptor-6 (TLR6) deficient mice are protected from myocardial fibrosis induced by high fructose feeding through anti-oxidant and inflammatory signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;473(2):388-395.
- [50] MOUSA TM, LIU D, CORNISH KG, et al. Exercise training enhances baroreflex sensitivity by an angiotensin II-dependent mechanism in chronic heart failure. *J Appl Physiol.* 2008;104(3):616-624.
- [51] GU Q, WANG B, ZHANG XF, et al. Contribution of renin-angiotensin system to exercise-induced attenuation of aortic remodeling and improvement of endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Pathol.* 2014;23(5):298-305.
- [52] 贺慧杰. 糖尿病心脏病大鼠 NO、Ang II 和 TGF- β 1 的表达水平及心肌细胞凋亡的实验研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2005.

(责任编辑: GW, ZN, ZJP)