

# 青蒿琥酯基于 TGF- $\beta$ /Smad 通路减轻 2 型糖尿病大鼠脾脏纤维化的机制研究

杨敏洁<sup>1,2</sup>, 张思琴<sup>1,2</sup>, 詹育香<sup>1,2</sup>, 农晓琳<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>广西医科大学口腔医学院附属口腔医院; <sup>2</sup>广西口腔颌面修复与重建研究自治区级重点实验室, 南宁 530021

**摘要:**探讨青蒿琥酯(artemisinin, ART)对 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)大鼠脾脏纤维化的防治作用,并明确其相关分子机制,为 T2DM 脾脏损伤防治提供实验依据。50 只 SD 实验大鼠分为正常组和模型组,模型组高糖高脂喂养 8 周后,注射链脲佐菌素构建 T2DM 模型,再随机分为糖尿病组、二甲双胍治疗组、青蒿琥酯治疗组、联合治疗组,连续用药干预 4 周后取大鼠脾脏,称脾脏重量;HE、Masson 染色观察脾脏病理变化;免疫组织化学法和 Western blot 检测脾脏组织中转化生长因子 $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ 1)、重组人蛋白 2(smad family member 2, Smad2)、重组人蛋白 7(smad family member 7, Smad7)、I 型胶原(Collagen I)表达;qRT-PCR 检测脾脏组织中 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad7、Collagen I 的 mRNA 表达量。与正常组比较,糖尿病组大鼠脾脏指数下降,脾脏细胞排列紊乱,大量纤维化增生。与糖尿病组比较,各用药干预组的脾脏损伤和纤维化减轻,脾脏组织中 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Collagen I 蛋白和 mRNA 含量显著降低,Smad7 明显上升。以上结果说明 ART 能够减轻 T2DM 大鼠脾脏损伤,抑制脾脏纤维化增生,其机制可能与抑制 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路有关。

**关键词:**2 型糖尿病;青蒿琥酯;脾脏纤维化;转化生长因子 $\beta$ ;胶原纤维 I

中图分类号:R285.5;R587.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)4-0584-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.4.004

## Mechanism of artesunate attenuating spleen fibrosis in type 2 diabetic rats based on TGF- $\beta$ /Smad pathway

YANG Min-jie<sup>1,2</sup>, ZHANG Si-qin<sup>1,2</sup>, ZHAN Yu-xiang<sup>1,2</sup>, NONG Xiao-lin<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>College & Hospital of Stomatology, Guangxi Medical University;

<sup>2</sup>Guangxi Key Laboratory of Oral and Maxillofacial Repair and Reconstruction, Nanning 530021, China

**Abstract:** To investigate the preventive and therapeutic effects of artesunate (ART) on splenic fibrosis in type 2 diabetes mellitus (T2DM) rats, and to reveal its related molecular mechanisms, providing an experimental basis for the prevention and treatment of splenic injury in T2DM. Fifty SD rats were randomly divided into control group and model group. After eight-week high glucose and high fat feeding in the model group, streptozotocin was injected to make a T2DM model, and then they were randomly divided into diabetes group, metformin intervention group, artesunate intervention group, metformin and artesunate intervention group. After four-week treatment, the spleen tissues of rats were harvested. The spleen was weighed; HE, Masson staining were used to observe the pathological changes of the spleen; Immunohistochemistry, Western blot were used to detect the expression of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), SMAD family member 2 (Smad2), SMAD family member 7 (Smad7), and type I collagen in the spleen tissues; And qRT-PCR was used to detect the mRNA levels of TGF- $\beta$ 1, Smad2, Smad7, and collagen I in the spleen tissues. The spleen index decreased. The structure of spleen was damaged and disorganized. Compared with control group, there were fibrosis and hyperplasia in spleen observed in diabetes group. Compared with the diabetes group, the spleen injury and fibrosis were attenuated in drug intervention group. The expression and mRNA contents of TGF- $\beta$ 1, Smad2, and collagen I in the spleen tissues significantly decreased. The expression and mRNA content of

Smad7 significantly increased. ART ameliorated splenic injury and inhibited splenic fibrosis in T2DM rats, and the mechanism of action may be related to the inhibition of TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway.

**Key words:** type 2 diabetes mellitus; artesunate; splenic fibrosis; transforming growth factor- $\beta$ ; Collagen I

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是一种慢性代谢性疾病,随着 T2DM 的发病率持续上升,已成为全球排名第三威胁人类健康的慢性疾病,并且,青年发病率与患病率在世界范围内呈现上升趋势<sup>[1]</sup>,若不及时治疗会并发一系列严重的疾患和靶器官的损伤,从而导致糖尿病患者寿命缩短<sup>[2]</sup>。当 T2DM 患者高血糖引起的氧化应激和炎症因子水平升高时,会导致脾细胞凋亡和免疫功能障碍,最终致使脾脏损伤<sup>[3]</sup>,同时过度的炎症反应会造成脾脏的纤维化<sup>[4]</sup>,增生的胶原纤维会进一步使得脾脏血供受限,造成患者不可逆的损伤,但目前针对 T2DM 患者脾脏损伤和纤维化的防治未见有效方法。而转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 及其主要通路 TGF- $\beta$ /Smad 与纤维化进展息息相关<sup>[5]</sup>,已研究表明 TGF- $\beta$ /Smad 在肺纤维化<sup>[6]</sup>、肾纤维化<sup>[7]</sup>、肝脏纤维化<sup>[8]</sup>、胰腺纤维化<sup>[9]</sup>等多种器官的纤维化过程中发挥重要的调控作用,但其是否与脾脏纤维化相关,国内外鲜少报道。

青蒿琥酯 (artesunate, ART), 是一种提取自中草药青蒿素的天然倍半萜内酯化合物,是抗疟剂的一线治疗药物<sup>[10]</sup>,近年来研究发现还具有抗肿瘤、免疫调节、抗病毒、抗纤维化等疗效<sup>[11]</sup>,课题组前期研究发现 ART 不仅能够降低糖尿病大鼠的血糖,对肾脏、肺部纤维化和氧化应激也有防治作用<sup>[12]</sup>,但 ART 是否对 T2DM 的脾脏组织及其纤维化产生影响未见有研究,其相关机制也未揭示,因此本实验通过建立 T2DM 大鼠模型,观察 ART 对于 T2DM 大鼠脾脏结构和纤维化的作用,并探讨其是否可能与 TGF- $\beta$ /Smad 通路相关。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

采用 5~6 周的雄性 SD 大鼠 50 只,体重 180~220 g, 购买于广西医科大学实验动物中心,生产许可证编号 SCXK 桂 2020-0003,符合广西医科大学动物伦理委员会要求,编号:202006013,每笼 5 只饲养于温度 23~25 °C,相对湿度 50%~65% 的 SPF 级动物房内,自由饮食饮水,12 h 光照及 12 h 黑暗循环。

#### 1.1.2 药物与试剂

青蒿琥酯 (桂林南药股份有限公司,国药准字 H10930195); 链脲佐菌素 (STZ, 美国 Sigma, 批号 WVZ32572); Masson 三色染色液 (北京索莱宝科技有限公司,批号 20201011); 免疫组化试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 2110C0113); qRT-PCR 试剂盒 (宝日医生物技术北京有限公司,批号 ALE1710A); 羊抗兔 IgG 二抗 (美国 Affinity, 批号 S0001); 山羊血清 (北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 221260623); 蛋白裂解液 (美国 Thermo Fisher, 批号 89901); ECL 发光液 (中国 Biosharp 生物技术有限公司,批号 22187830); 兔抗 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad7 (武汉 Proteintech 生物技术有限公司,批号 21898-1-AP、12570-1-AP、25840-1-AP); Collagen I (北京 Bioass 生物技术有限公司,批号 bs-10423R)。

#### 1.1.3 实验仪器

尼康正置显微镜 (日本 Nikon, 型号 941346); 高速冷冻多用途离心机 (德国 Eppendorf, 型号 5424R); 石蜡切片机 (中国大连达健医疗器械有限公司,型号 RM2255); -80 °C 超低温冰箱 (美国 Thermo Fisher, 型号 8930086V); 紫外可见分光光度仪 (美国 Thermo, 型号 NanoDrop one); Step-one plus 型 PCR 扩增仪 (美国 Thermo Fisher, 型号 A28134); WB 全能成像系统 (美国 Bio-Rad 公司,型号 ChemiDoc MP)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 模型建立, 分组及给药

将 50 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,设正常组 (control group, CON) 10 只,其余 40 只模型组给予高糖高脂 8 周后,腹腔注射链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 35 mg/kg, 72 h 后大鼠空腹血糖  $\geq 11.7$  mmol/L 为造模成功,模型制备成功后再随机分四组即糖尿病组 (diabetes group, DM), 青蒿琥酯治疗组 (artesunate intervention group, ART)、二甲双胍治疗组 (metformin intervention group, MET)、联合治疗组 (metformin and artesunate intervention group, MET + ART)。采取灌胃的方式给药,每日一次, MET 组给予 150 mg/kg, ART 组给予 50 mg/kg, MET + ART 组

给予青蒿琥酯 50 mg/kg 和二甲双胍 150 mg/kg, CON 组和 DM 组则注射同体积生理盐水,共连续干预 4 周。

### 1.2.2 标本的采集

采大鼠尾静脉血液检测终末空腹血糖,称量大鼠重量后麻醉处死大鼠,分离并测量大鼠脾脏重量,并计算脾脏指数:脾脏指数 = 大鼠脾脏重量(mg)/大鼠重量(g),将脾脏组织一分为二,4%的多聚甲醛中固定制作石蜡切片,剩余脾脏组织放于-80℃冰箱中用于后续实验检测指标。

### 1.2.3 脾脏组织病理观察

固定好的大鼠脾脏组织,梯度酒精依次脱水,二甲苯透明,石蜡包埋后制成切片,厚度 5 μm,切片烤干后,行 HE、Masson 染色,镜下观察脾脏组织的病理变化,Masson 染色结果用 Image-J 软件每组随机选取 5 张视野,统计分析纤维化面积。

### 1.2.4 免疫组化法检测 TGF-β1、Smad2、Smad7、Collagen I 的蛋白表达

检测脾脏组织中 TGF-β1、Smad2、Smad7、Collagen I 的蛋白含量,将石蜡切片脱蜡,高压柠檬酸修

复 10 min 后冷却,3% 过氧化氢溶液浸泡 15 min, PBS 清洗三次,免疫组化笔画圈后血清封闭 10 min,甩干后直接滴加稀释的一抗 TGF-β1 (1:2 000)、Smad2 (1:500)、Smad7 (1:200)、Collagen I (1:1 000),4℃ 冰箱过夜,次日拿出切片 PBS 清洗后加入二抗静置 10 min, PBS 清洗三次,辣根素孵育 3 min,苏木素复染,脱水并封片。棕黄色为阳性,染色切片在 ×200 镜下每组随机选取视野 5 个,并采用 Image-J 软件计算各指标阳性表达的光密度值(mean optical density, MOD),MOD 越大,阳性表达越高。

### 1.2.5 qRT-PCR 检测脾脏中 TGF-β1、Smad2、Smad7、Collagen I 的 mRNA 表达情况

从 RNA keep 液中取出脾脏组织,研磨后放入管中, RNAiso 试剂提取总 RNA,测总 RNA 浓度后逆转录成 cDNA,上机试剂反应体系 20 μL,扩增程序:①预变性 95℃ 30 s,1 个循环。②变性 95℃ 5 s,40 个循环。③退火 60℃ 34 s,40 个循环。④降温 95℃ 5 s,60℃ 1 min,1 个循环。GAPDH 为内参,得到 CT 值,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因的相对 mRNA 表达量,引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 The primer sequences for qRT-PCR

基因名称 Gene name	上游 Forward	下游 Reverse
GAPDH	AGATCCCTCCAAAATCAAGTGG	GGCAGAGATGATGACCCTTTT
TGF-β1	CGCAACAACGCAATCTATGA	CCAAGGTAACGCCAGGAAT
Smad2	CAGCCCTCACTACTGTAGACG	CGCACTATCACTTAGGCACTCG
Smad7	GACTCCAGGACGCTGTGTGGT	GTTTGAACGGTGGCCTGCTC
Collagen I	GCACGCTTGTGGATGCC	GATTGGGATGGAGGGAGTTTA

### 1.2.6 Western blot 检测脾脏组织中 TGF-β1、Smad2、Smad7、Collagen I 的蛋白含量

取部分脾组织研磨后,加入蛋白裂解液在冰上裂解 30 min (每 5 min 震荡一次,共 6 次),12 000 rpm/min,4℃ 离心 15 min 后取上清液,测浓度后按比例加入蛋白上样缓冲液,10% SDS-PAGE 胶电泳,转膜后,快速封闭液封闭 20 min, TBST 清洗三次,每次 10 min,放入稀释的一抗 TGF-β1 (1:5 000)、Smad2 (1:1 000)、Smad7 (1:500)、Collagen I (1:2 000) 和内参 GAPDH (1:10 000) 中 4℃ 冰箱孵育过夜,二抗孵育 1.5 h 后 TBST 清洗,加入显影液进行扫描,显影图片使用 Image J 计算灰度值并做定量分

析。

### 1.2.7 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,计量资料经分析符合正态分布且方差齐性,实验数据均以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间采用单因素方差分析, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠血糖及体重比较

建模后模型组体重明显减轻,体型变小,血糖显著升高,多饮、多食、多尿。各用药组干预后大鼠体重均有不同程度上升,血糖明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) (见表 2)。

表 2 大鼠体重和血糖水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 2 Body weight and blood glucose level of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	剂量 Doses (mg/kg)	大鼠体重 Body weight (g)	大鼠血糖 Blood glucose (mmol/L)
正常组 CON	-	405.40 $\pm$ 19.88	4.82 $\pm$ 0.20
糖尿病组 DM	-	290.50 $\pm$ 18.51 <sup>##</sup>	21.32 $\pm$ 1.01 <sup>##</sup>
二甲双胍治疗组 MET	150	330.90 $\pm$ 18.92 <sup>**</sup>	10.77 $\pm$ 0.77 <sup>**<math>\Delta</math></sup>
青蒿琥酯治疗组 ART	50	321.20 $\pm$ 18.04 <sup>*</sup>	11.56 $\pm$ 0.80 <sup>**</sup>
联合治疗组 MET + ART	150 + 50	383.20 $\pm$ 19.39 <sup>**<math>\Delta\Delta</math></sup>	7.81 $\pm$ 0.41 <sup>**<math>\Delta\Delta</math></sup>

注:与 CON 组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与 DM 组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ;与 ART 组比较, <sup>$\Delta$</sup>  $P < 0.05$ , <sup>$\Delta\Delta$</sup>  $P < 0.01$ ,下同。

Note: Compared with CON, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; Compared with DM, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ; Compared with ART,  <sup>$\Delta$</sup>  $P < 0.05$ ,  <sup>$\Delta\Delta$</sup>  $P < 0.01$ , the same below.

## 2.2 脾脏重量和脾脏指数

与 CON 组相比,DM 组大鼠脾脏重量与脾脏指数均降低显著( $P < 0.01$ ),与 DM 组相比,各用药组的脾脏重量和脾脏指数均有所增加,差异有统计学

意义( $P < 0.01$ ),其中单独用药组两者无统计学差异( $P > 0.05$ ),MET + ART 组的脾脏重量和脾脏指数增加明显,均优于单独用药组( $P < 0.01$ )(见表 3)。

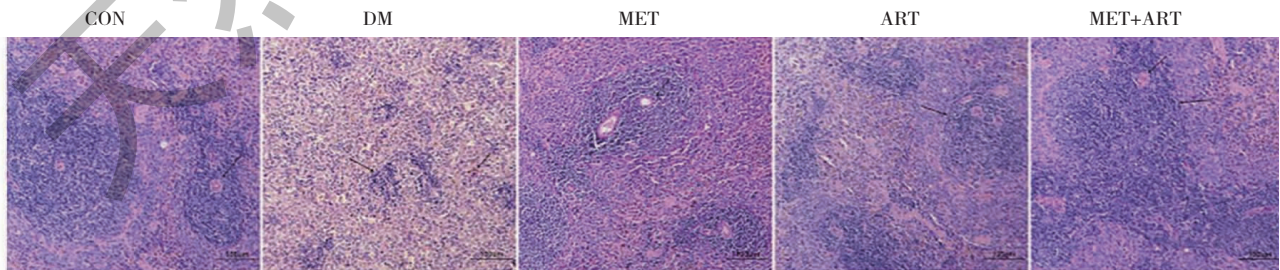
表 3 大鼠脾脏重量和脾脏指数 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 3 Spleen weight and spleen coefficient of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	剂量 Doses (mg/kg)	脾脏重量 Spleen weight (g)	脾脏指数 Spleen coefficient (mg/g)
正常组 CON	-	0.720 $\pm$ 0.10	1.772 $\pm$ 0.17
糖尿病组 DM	-	0.217 $\pm$ 0.03 <sup>##</sup>	0.751 $\pm$ 0.11 <sup>##</sup>
二甲双胍治疗组 MET	150	0.365 $\pm$ 0.04 <sup>**</sup>	1.103 $\pm$ 0.11 <sup>**</sup>
青蒿琥酯治疗组 ART	50	0.359 $\pm$ 0.04 <sup>**</sup>	1.117 $\pm$ 0.10 <sup>**</sup>
联合治疗组 MET + ART	150 + 50	0.529 $\pm$ 0.07 <sup>**<math>\Delta\Delta</math></sup>	1.384 $\pm$ 0.20 <sup>**<math>\Delta\Delta</math></sup>

## 2.3 脾脏组织的病理学变化

HE 染色显示,CON 组大鼠脾脏组织结构清晰,淋巴滤泡的排列紧密,数目大小正常,红白髓界限清楚,白髓范围较大,动脉周围淋巴鞘的厚度和脾小结的结构正常。与 CON 组相比,DM 组的脾脏组织中可见白髓结构模糊,范围变小,与红髓之间界限不清,脾小结数量广泛变少,淤积的红细胞变多,含铁

血黄素大量沉积,淋巴细胞排列稀疏并变少,脾索变窄。与 DM 组相比,各用药组白髓和脾小结数量增多,体积增大。MET + ART 组中白髓结构较单独用药组更加清晰,范围变大,红白髓界限更加明显,红髓数量减少,动静脉周围淋巴鞘厚度增加,脾索脾窦变粗,脾小结较单独用药组增加(见图 1)。

图 1 各组大鼠脾脏组织 HE 染色 ( $\times 200$ )Fig. 1 HE staining of spleen tissue of rats in each group ( $\times 200$ )

Masson 染色可见 CON 组大鼠脾脏中无粗大胶原纤维束与增生,脾索结构清晰。DM 组中脾脏大

量的蓝染胶原纤维增生,动静脉血管周围纤维扩张明显,并且增生的纤维排列紊乱,相互交织成网。各

用药组的脾脏纤维化减少明显,镜下只见散在细小的蓝染纤维,脾索分布正常,其中联合用药组效果优

于两者单独用药,血管周围无纤维化现象(见图2)。

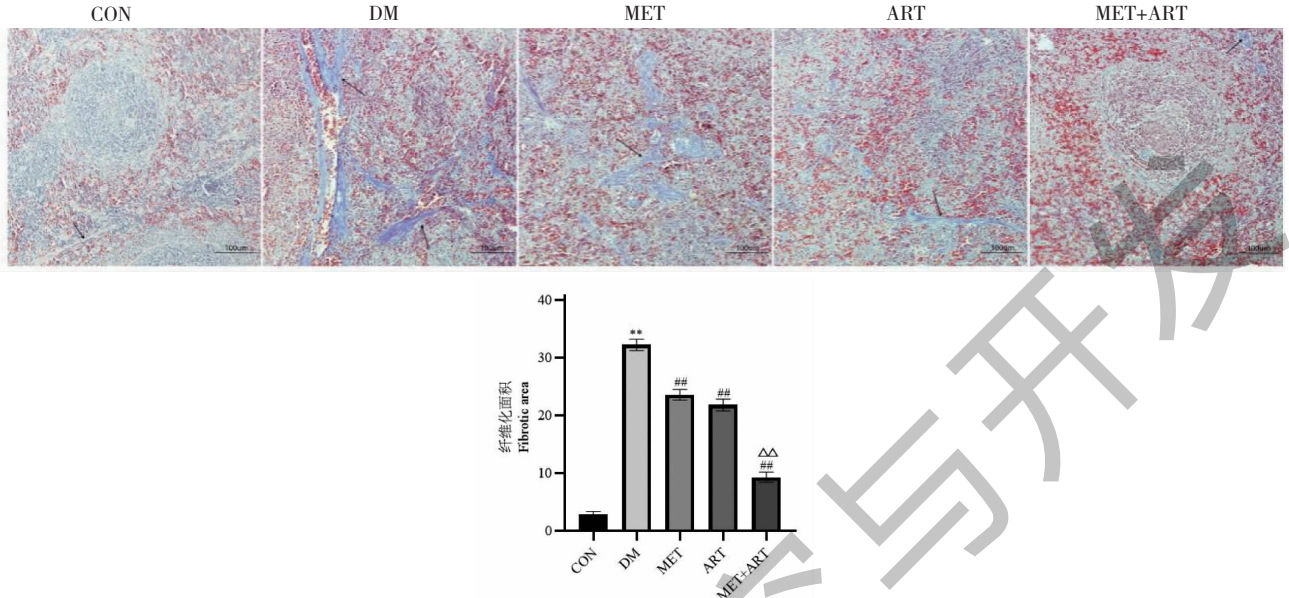


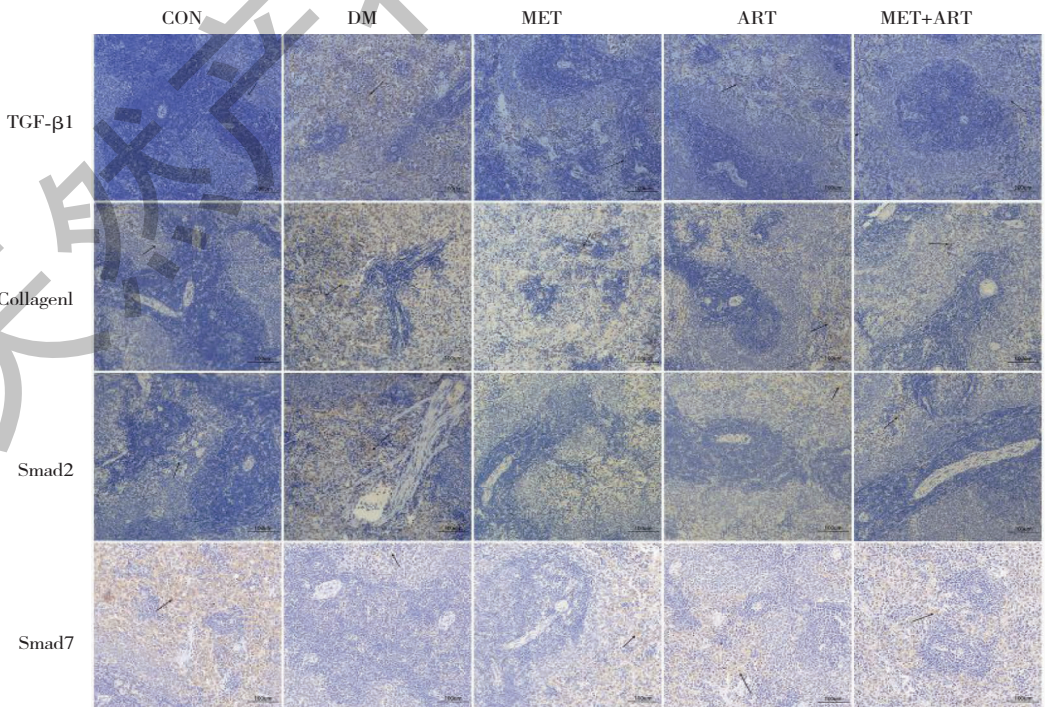
图2 各组大鼠脾脏组织 Masson 染色 (×200) 及纤维化面积 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig.2 Masson staining (×200) and fibrosis area in spleen tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

### 2.4 免疫组织化学法中 TGF-β1、Smad2、Smad7、Collagen I 的蛋白表达量

脾脏组织切片经免疫组织化学法染可见 TGF-β1、Smad2、Smad7、Collagen I 在脾脏组织中均表达在胞浆内;与 CON 组相比,DM 组的 TGF-β1、

Smad2、Collagen I 表达呈强阳性的黄色颗粒,数量增多,Smad7 阳性颗粒表达显著下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );与 DM 组比较,各用药组中 TGF-β1、Smad2、Collagen I 的表达下降,Smad7 表达上升,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ) (见图3)。



续图 3(Continued Fig.3)

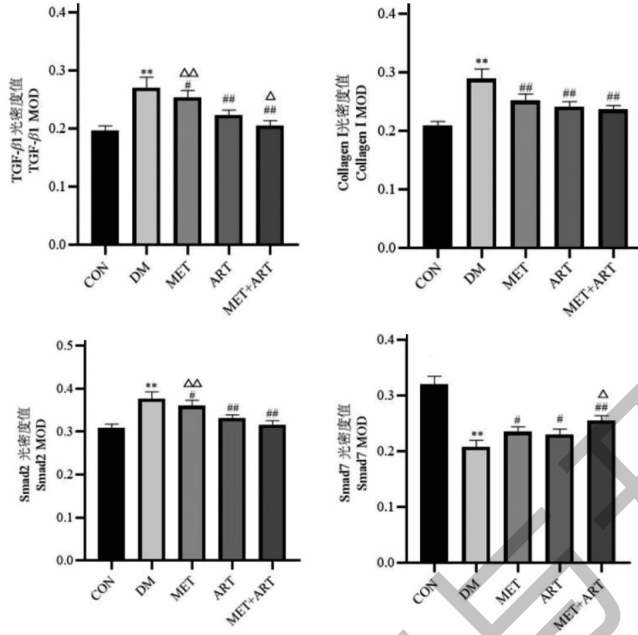


图 3 各组大鼠脾脏组织免疫组织化学染色 (×200) 及分析 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 3 Immunohistochemical staining (×200) and analysis of spleen tissues of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

### 2.5 脾脏组织中 TGF-β1、Smad2、Smad7、Collagen I 的 mRNA 表达

与 CON 组相比,DM 组脾脏中 TGF-β1、Smad2、Collagen I 的 mRNA 含量显著增加 ( $P < 0.01$ ),而 Smad7 含量降低 ( $P < 0.01$ ),各用药组与 DM 组相

比较,脾脏组织中 TGF-β1、Smad2、Collagen I 的 mRNA 表达量有不同程度减少,Smad7 表达量上升,联合用药组效果更加显著,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ) (见图 4)。

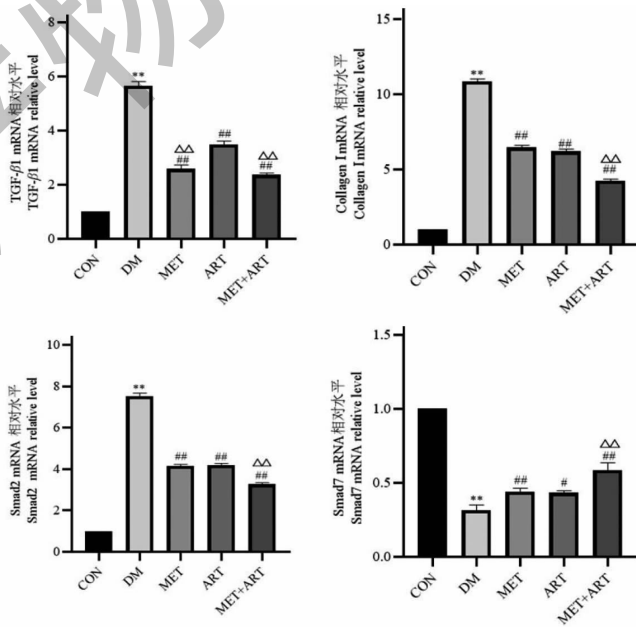


图 4 各组大鼠脾脏组织中 TGF-β/Smad 通路相关 mRNA 含量表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 4 Expression of TGF-β/Smad pathway-related mRNA in spleen tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

## 2.6 Western blot 检测脾脏组织中 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad7、Collagen I 表达

DM 组脾脏组织中 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Collagen I 的蛋白含量较 CON 组表达显著升高 ( $P < 0.01$ ),

Smad7 蛋白含量显著降低 ( $P < 0.01$ )。而各用药组的 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Collagen I 蛋白量与 DM 组比较, 均有不同的降低趋势, Smad7 蛋白含量增加 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ) (见图 5)。

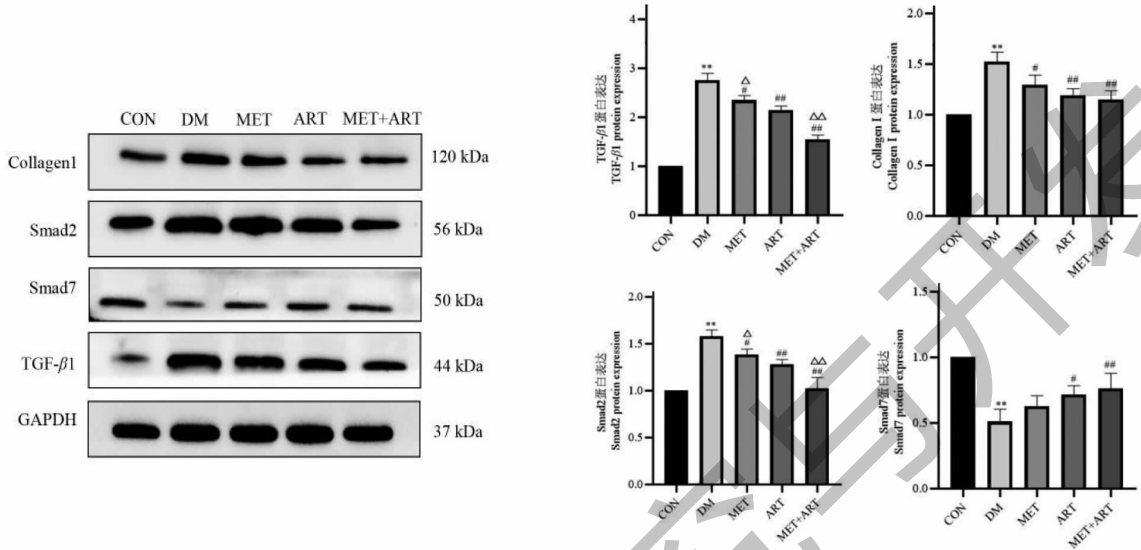


图 5 各组大鼠脾脏组织中 TGF- $\beta$ /Smad 通路相关蛋白含量 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 5 Content of TGF- $\beta$ /Smad pathway-related protein in spleen tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

## 3 讨论与结论

脾脏是人体最大的免疫器官,其功能主要包括血液过滤、红细胞、抗原和异物的老化以及免疫反应<sup>[13]</sup>。T2DM 是一组代谢性疾病,长期的高血糖会引起多器官的氧化应激和损伤,其中脾脏组织在氧化应激的条件下而产生异常的细胞因子,使得脾脏肿大并发生纤维化造成患者脾脏损伤<sup>[14]</sup>。当脾脏组织发生纤维化时,中央动脉内膜增厚,周围胶原纤维增生,使得脾脏血窦扩张受限从而储血功能下降,导致血流不足,其原有的生理功能也将受损<sup>[15]</sup>。课题组前期研究发现 T2DM 大鼠在 ART 浓度为 50 mg/kg 时既能有效发挥药物作用,也不会造成肝脏毒性,因此确定为实验最终浓度,本实验通过建立 SD 大鼠模型,采取目前临床常用治疗 T2DM 的药物二甲双胍作为阳性对照,HE 染色见 T2DM 大鼠脾脏中央动脉增生被膜增厚,脾索边窄,用药后脾脏结构改善,Masson 染色显示 DM 组的中央动静脉周围胶原纤维比 CON 组增多,而各用药组的蓝色纤维沉积变少,差异有统计学意义,一定程度上提示了 ART 对于脾脏结构和纤维化有保护作用。

纤维化的原理是由于炎症导致器官实质细胞发生坏死,组织内细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 异常增加及过度沉积的病理过程,也是 T2DM

常见的症状,包括肾纤维化、肺纤维化、肝纤维化等,组织内的纤维结缔组织越多,细胞越容易坏死,最终导致器官的功能衰竭<sup>[16]</sup>。而纤维化的机制主要与 TGF- $\beta$ /Smad 通路相关,TGF- $\beta$  是纤维化的重要因子,调控细胞的生长与凋亡,包括三种亚型,其中 TGF- $\beta$ 1 活性最强,TGF- $\beta$ 1 在纤维化过程中扮演着重要角色<sup>[10]</sup>,一方面是通过自身的信号通路促进 ECM 的产生并诱导纤维化。另一方面,可以抑制基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 的产生并促进胶原的增多而加重纤维化<sup>[17]</sup>。重组人蛋白家族 (smad family member) 是 TGF- $\beta$  的下游关键受体蛋白家族,包括激活型: Smad2、Smad3、Smad5 等,抑制型主要为 smad7<sup>[18]</sup>。Smad7 作为 TGF- $\beta$  信号传导的关键负调控因子,可通过阻断受体活性、诱导受体降解或干扰 Smad2/3-DNA 结合,发挥其抑制纤维化的作用<sup>[19]</sup>。当糖尿病患者组织发生纤维化时,TGF- $\beta$ 1 表达量增多,与 Smad2、Smad3 特异性结合,Smad7 被抑制,使得细胞膜至细胞核的信号传导增加,从而激活下游的靶基因促进纤维化<sup>[18]</sup>,研究发现 TGF- $\beta$ /Smad 通路激活时,下游靶基因 I 型胶原 (Collagen I) 在组织中沉积也会增多,从而使得组织纤维化程度加重<sup>[20]</sup>。

Zhang 等<sup>[21]</sup>发现,高剂量的锌能够防治脾脏纤

纤维化,其机制可能是通过降低脾脏组织中 TGF- $\beta$ 、Collagen I、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)含量从而增加的 ECM 降解来实现。也有学者研究发现,TGF- $\beta$ /Smad 信号通路参与了糖尿病靶器官纤维化的过程,用药后通过降低 Collagen I、TGF- $\beta$ 、Smad2、Smad3 的表达,从而改善糖尿病靶器官的纤维化<sup>[22]</sup>。而本实验中,通过免疫组化化学法、Western blot 和 qRT-PCR 实验发现,DM 组大鼠脾脏组织 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Collagen I 含量较 CON 组显著升高,Smad7 表达下降,各用药组可见 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Collagen I 的蛋白和 mRNA 表达量降低明显,Smad7 含量显著上升,差异有统计学差异,与上述结果一致。

综上所述,ART 不仅可降低 T2DM 大鼠的血糖水平,对 T2DM 大鼠脾脏指数,脾脏重量和脾脏结构的改变可能具有很大前途,也揭示了 ART 在 T2DM 大鼠脾脏纤维化防治中有一定作用,并且联合用药组的效果似乎更加显著,其机制也可能与抑制 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路相关,这为 2 型糖尿病脾脏损伤和纤维化的药物治疗研究提供了理论基础。

#### 参考文献

- 1 Zeidler P, Chou HS, Copeland KC, et al. Clinical trials in youth-onset type 2 diabetes: needs, barriers, and options[J]. *Curr Diab Rep*, 2015, 15:28.
- 2 Purnamasari D, Tetraswi EN, Kartiko GJ, et al. Sarcopenia and Chronic complications of type 2 diabetes mellitus[J]. *Rev Diabet Stud*, 2022, 18:157-165.
- 3 Rashid K, Chowdhury S, Ghosh S, et al. Curcumin attenuates oxidative stress induced NF $\kappa$ B mediated inflammation and endoplasmic reticulum dependent apoptosis of splenocytes in diabetes[J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 143:140-155.
- 4 Wu Y, Jia G, Wang B, et al. Fibroblast growth factor 1 ameliorates diabetes-induced splenomegaly via suppressing inflammation and oxidative stress[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 528:249-255.
- 5 Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis[J]. *N Engl J Med*, 1994, 331:1286-1292.
- 6 Lucarini L, Durante M, Lanzi C, et al. HYDAMTIQ, a selective PARP-1 inhibitor, improves bleomycin-induced lung fibrosis by dampening the TGF- $\beta$ /SMAD signalling pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21:324-335.
- 7 Tao PY, Zhang Y. Liuwei Dihuang Pills alleviating renal inflammation and fibrosis of diabetic nephropathy through regulating and controlling NF- $\kappa$ B and TGF- $\beta$ /Smad double signaling pathways[J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med(广州中医药大学学报)*, 2019, 36:245-250.

- 8 Mi K, Huang R. Mechanism of mangiferin on liver fibrosis in rats based on tGF- $\beta$ /Smad signaling pathway[J]. *Sichuan Med J(四川医学)*, 2020, 41:142-146.
- 9 Liu P, Zhu L, Zou G, et al. Matrine suppresses pancreatic fibrosis by regulating TGF- $\beta$ /Smad signaling in rats[J]. *Yonsei Med J*, 2019, 60:79-87.
- 10 Lee JH, Massagué J. TGF- $\beta$  in developmental and fibrogenic EMTs[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 86:136-145.
- 11 Efferth T. From ancient herb to modern drug: Artemisia annua and artemisinin for cancer therapy[J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 46:65-83.
- 12 Liang C, Li W, Chen Y, et al. Protective effect and mechanism of artesunate on kidneys in diabetic rats[J]. *Shandong Med J(山东医药)*, 2020, 60:9-12.
- 13 Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen[J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5:606-616.
- 14 Thorvaldson L, Holstad M, Sandler S. Cytokine release by murine spleen cells following multiple low dose streptozotocin-induced diabetes and treatment with a TNF $\alpha$  transcriptional inhibitor[J]. *Int Immunopharmacol*, 2003, 3:1609-1617.
- 15 Li T, Ni JY, Qi YW, et al. Splenic vasculopathy in portal hypertension patients[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12:2737-2741.
- 16 Yang P, Niu Y. TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway in tissue fibrosis: research advances[J]. *Int J Pharm Res(国际药理学研究杂志)*, 2019, 46:738-744.
- 17 Ding Y, Choi ME. Regulation of autophagy by TGF- $\beta$ : emerging role in kidney fibrosis[J]. *Semin Nephrol*, 2014, 34:62-71.
- 18 Heldin CH, Moustakas A. Signaling receptors for TGF- $\beta$  family members[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8:a022053.
- 19 Yan X, Liao H, Cheng M, et al. Smad7 protein interacts with receptor-regulated Smads (R-Smads) to inhibit transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )/Smad signaling[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291:382-392.
- 20 Han YY, Shen P, Chang WX. Involvement of epithelial-to-mesenchymal transition and associated transforming growth factor- $\beta$ /Smad signaling in paraquat-induced pulmonary fibrosis[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12:7979-7984.
- 21 Zhang Q, Zhang HX, Chen Y, et al. Zinc deficiency induces oxidative damage and causes spleen fibrosis[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2020, 194:203-209.
- 22 Shen H, Guo S, Liu X-F, et al. Curcumin ameliorates myocardial fibrosis via TGF- $\beta$ /Smads signaling pathway in diabetic rats[J]. *Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报)*, 2018, 34:522-527.