

· 基础研究 ·

槲子苷抑制高糖诱导的乳鼠心脏成纤维细胞向肌成纤维细胞的表型转化

向家培, 雷玉华*

(恩施土家族苗族自治州中心医院心血管内科,恩施 445000)

【摘要】目的 探讨槲子苷(GE)对高糖诱导过程中体外培养的乳鼠心脏成纤维细胞(CF)表型转化及胶原合成的影响及机制。**方法** 提取新生大鼠原代CF,给予高糖刺激(葡萄糖浓度为33.3 mmol/L)和GE干预,24 h后,应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定CF细胞内I型胶原(Col I)、Col III及结缔组织生长因子(CTGF)的mRNA表达水平;试剂盒检测氧化应激相关指标,包括超氧化物歧化酶(SOD)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)活性及丙二醛(MDA)的产量;Western blot检测转化生长因子β(TGF-β)、乙酰化的Smad3(ac-Smad3)、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)及沉默信息调节因子1(SIRT1)蛋白质的表达水平。给予SIRT1抑制剂EX-527后,采用免疫荧光共染SIRT1及α-SMA。再次检测氧化应激及ac-Smad3信号通路相关蛋白的表达。采用SPSS 22.0统计软件进行统计学分析。**结果** 不同浓度的GE处理高糖刺激后的大鼠CF 24 h后,Col I、III及CTGF mRNA表达有所降低,且随GE浓度的增加,抑制作用增强,在1~100 μmol/L之间呈现浓度依赖性。GE可明显降低高糖诱导过程中NADPH的活性及MDA的含量,增强SOD活性。Western blot结果显示,高糖诱导下,TGF-β、ac-Smad3及α-SMA水平明显升高,而GE能明显抑制这3种蛋白的升高。同时,GE明显逆转了高糖条件下SIRT1的下调。免疫荧光结果显示,应用SIRT1抑制剂EX-527后,GE对高糖条件下α-SMA及氧化应激的抑制作用消失。**结论** GE能够抑制高糖诱导的大鼠CF表型转化及胶原合成,其机制可能与SIRT1介导的TGF-β/ac-Smad3信号通路及氧化应激有关。

【关键词】 槲子苷;高糖;心肌成纤维细胞;糖尿病心肌病

【中图分类号】 R541 **【文献标志码】** A **【DOI】** 10.11915/j.issn.1671-5403.2019.09.151

Geniposide suppresses phenotypic transformation of neonatal rat cardiac fibroblasts into myofibroblasts induced by high glucose

XIANG Jia-Pei, LEI Yu-Hua*

(Department of Cardiology, Central Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture, Enshi 445000, China)

【Abstract】Objective To investigate the effect of geniposide (GE) on phenotypic transformation of neonatal rat cardiac fibroblasts (CF) as well as on collagen synthesis under the induction of high glucose (HG), and explore the underlying mechanisms. **Methods** Primary CF were extracted from neonatal rats, and then treated in presence or absence of 33.3 mmol/L HG or GE for 24 h. The mRNA levels of collagen I (Col I), collagen III (Col III) and connective tissue growth factor (CTGF) were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The markers of oxidative stress, including superoxide dismutase (SOD), reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) and malondialdehyde (MDA) were measured by corresponding test kits. The protein levels of transforming growth factor-beta (TGF-β), acetylated-Smad3 (ac-Smad3), α-smooth muscle actin (SMA) and silent information regulator 1 (SIRT1) were detected using Western blotting. After SIRT1 inhibitor, EX-527 was added, the expression of SIRT1 and α-SMA, activities and production of oxidative stress markers, and protein levels of ac-Smad3 signal pathway related proteins were observed and measured to further explore the protective mechanisms of GE. SPSS 22.0 statistics was used to analyze the data. **Results** Treatment of GE at different concentrations (1~100 μmol/L) for 24 h resulted in decreased mRNA levels of Col I, Col III and CTGF in a dose-dependent manner. Meantime, GE significantly reduced the activity of NADPH, decreased the production of MDA and enhanced the activity of SOD in the process of HG induction. Western blotting indicated that HG treatment induced up-regulation of TGF-β, ac-Smad3 and α-SMA, while GE obviously inhibited the elevations and reversed the down-regulation of SIRT1 induced by HG. Immunofluorescence assay showed that the inhibitor EX-527 could block the inhibitory effect of GE on HG-induced α-SMA and oxidative stress. **Conclusion** GE exerts inhibitory effect on high HG-induced phenotypic transformation of CF as well as collagen synthesis, which may be associated with TGF-β/ac-Smad3 signal pathway and oxidative stress mediated by SIRT1.

【Key words】 geniposide; high glucose; cardiac fibroblast; diabetic cardiomyopathy

Corresponding author: LEI Yu-Hua, E-mail: huayulei_0319@126.com

糖尿病心肌病 (diabetic cardiomyopathy, DCM) 是独立于糖尿病的并发症之一,同时也是晚期造成糖尿病患者死亡的主要原因。心肌间质纤维化是 DCM 的主要病理表现之一^[1]。心肌纤维化能增加心室壁僵硬,降低心室顺应性,导致心脏舒缩功能障碍,最终导致心力衰竭^[2]。心脏成纤维细胞 (cardiac fibroblasts, CF) 是调节细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 合成和降解的主要细胞,在心肌纤维化的发生发展过程中发挥着至关重要的作用^[3]。研究表明,高糖刺激一方面能够促进 CF 增殖,加速胶原合成;另一方面,能够直接激活转化生长因子 β (transforming growth factor-beta, TGF- β)/Smads 信号通路,促进 CF 细胞中 I 型胶原 (collagen I, Col I)、Col III 及结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 的合成,最终增加心肌组织 ECM 的合成^[4]。沉默信息调节因子 (silent information regulator, SIRT) 1 是哺乳动物体内与酵母 SIRT2 同源性最高的同系物,与机体氧化应激、基因转录调控及细胞衰老等多种生命活动密切相关^[5]。在 DCM 中,SIRT1 能够通过抑制内质网应激减少心肌细胞凋亡,从而发挥保护作用^[6]。此外,SIRT1 还能够通过抑制乙酰化的 Smad3 (acetylated-Smad3, ac-Smad3) 信号通路减轻肾脏纤维化^[7]。

梔子苷 (geniposide, GE),又名京尼平苷,属于环烯醚萜苷类化合物^[8]。目前,GE 已被证实具有抗炎、抗肿瘤、抗凋亡及抗血管生成等多种药理作用^[9]。在心血管疾病中,GE 能够抑制胸主动脉缩窄 (thoracic aortic constriction, TAC) 诱导的心肌肥厚,其机制与 GE 对心肌细胞中腺苷酸活化蛋白激酶 α (adenosine monophosphate activated protein kinase α , AMPK α) 的抑制有关^[10]。而 GE 在 DCM 中的作用尚未见报到。本文将主要探讨 GE 对高糖诱导的大鼠 CF 的转化及胶原合成的作用,以及可能涉及的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

GE 购自上海融禾医药科技发展有限公司,纯度大于 98%。将 GE 溶解在磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 中配置成不同浓度的 GE 溶液待使用。出生 1~3 d 的 Sprague-Dawley 大鼠,雌雄不限,由湖北省疾病预防控制中心提供。氧化应激检测试剂盒包括超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide

adenine dinucleotide phosphate, NADPH), 购自碧云天生物技术有限公司;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;低糖 DMEM 培养基购自赛默飞世尔 (苏州) 仪器有限公司;甘露醇、葡萄糖、Trizol Reagen 购自美国 Invitrogen 公司;引物由武汉谷歌生物公司合成和纯化。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 CF 的分离和培养 无菌条件下剪取大鼠心脏前 1/3 的心室部分,用 0.25% 胰蛋白酶消化心肌组织,差速贴壁 1 h 去除未贴壁的心肌细胞。采用 DMEM + 10% 胎牛血清 + 双抗培养基传代培养大鼠 CF,选用第 2~3 代传代细胞,用 0.25% 的胰酶消化 CF。

1.2.2 实验分组 预实验确定 GE 的最佳保护浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。实验分为 4 组:(1) 正常对照 (normal control, NC) 组;(2) NC+GE 组;(3) 高糖 (葡萄糖,浓度为 33.3 mmol/L) 模型组;(4) 高糖 + GE 组。每组设置 5 个复孔,并接受相应处理。

1.2.3 逆转录聚合酶链反应检测胶原 mRNA 的表达 (1) Trizol 法提取 CF 中 RNA,利用紫外分光光度计检测 RNA 的浓度及纯度, $A_{260}/A_{280} = 1.8 \sim 2.0$ 方可使用;(2) 通过逆转录,将 mRNA 合成 cDNA,并放入 -80℃ 冰箱保存;(3) 逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 体系包括:10 $\times$ Buffer 2.5 μl 、cDNA 2 μl 、正向引物 (20 $\mu\text{mol/L}$) 0.25 μl 、反向引物 (20 $\mu\text{mol/L}$) 0.25 μl 、去氧核苷酸 (deoxynucleotide polymerases, dNTPs; 10 mmol/L) 0.5 μl 、Taq 酶 (2 $\times 10^6$ U/L) 0.5 μl 和双蒸水 19 μl 。引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 中各指标引物序列
Table 1 Primer sequences of various indicators using in RT-PCR

Target gene	Primer sequence	Size (bp)
<i>GAPDH</i>		145
Forward	5'-GACATGCCGCTGGAGAAAC-3'	
Reverse	5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'	
<i>Collagen I</i>		127
Forward	5'-TGCTGCCTTTTCTGTCCTT-3'	
Reverse	5'-AAGGTGCTGGGTAGGGAAGT-3'	
<i>Collagen III</i>		179
Forward	5'-GTCCACGAGGTGACAAAGGT-3'	
Reverse	5'-CATCTTTTCCAGGAGGTCCA-3'	
<i>CTGF</i>		105
Forward	5'-CTAAGACCTGTGGAATGGGC-3'	
Reverse	5'-CTCAAAGATGTCATTGCCCC-3'	

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; CTGF: connective tissue growth factor.

1.2.4 Western blot 检测 在直径为 100 mm 的细胞培养皿中接种 6 ml CF 悬液,细胞密度约 10^7 /皿。CF 长至 70% 汇合时,饥饿处理 12 h,使其同步化生长。随后按照分组给予高糖和 GE 刺激,24 h 后提取细胞中总蛋白。具体过程如下:(1)首先弃去培养基中的培养液,PBS 洗 3 次;(2)每皿加入 1 000 μ l 裂解液,充分震荡 20 min;(3)用毛刷将皿底的细胞充分刮下,放入准备好的 EP 管中;(4)将收集的细胞,用超声裂解仪裂解 15 s 左右;(5)静置 15 min 后,离心 0.5 h (12 000 转/min);(6)取上清分装至 EP 管,采用紫外分光光度法测量蛋白浓度后,将所有样本的蛋白定容至等浓度;(7)分装后放入 -80℃ 冰箱。CF 总蛋白提取后,进行 SDS-PAGE 电泳,电泳后将凝胶中的蛋白转入 PVDF 膜中,一抗 4℃ 孵育过夜,随后于羊抗兔二抗中避光孵育 1 h,利用 Odyssey 扫膜仪对蛋白条带扫描并定量,GAPDH 校正待测蛋白水平。

1.2.5 免疫荧光染色 (1)4% 多聚甲醛固定;(2)0.2% 的 Triton 破膜;(3)8% 山羊血清封闭 1 h;(4)一抗[包括抗 SIRT1 抗体和抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体]封闭过夜;(5)羊抗鼠和羊抗兔二抗共同孵育 1 h;(6)DAPI 染色;(7)荧光显微镜观察。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析。计量资料用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2 组之间的比较采用 *t* 检验,多组之间的比较用 One-way ANOVA 分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 CF 的鉴定

原代分离及纯化后的大鼠 CF 经培养 12 h 后,基本贴壁。倒置显微镜下可见 CF 呈梭形,多角型。CF 细胞在培养基中呈放射状、网状及漩涡状分布。CF 细胞核为圆形,胞浆透明(图 1A)。波形蛋白免疫荧光显示,阳性染色细胞占比超过全视野所有细胞的 95%(图 1B)。

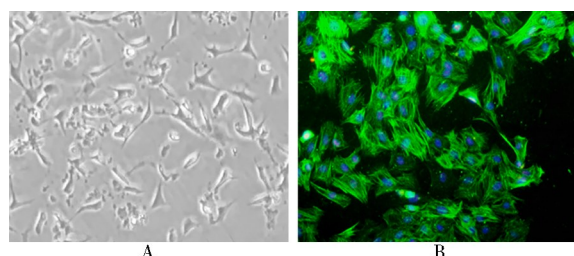


图 1 大鼠左室心脏成纤维细胞鉴定

Figure 1 Identification of rat left ventricular cardiac fibroblast A: light microscope ($\times 40$); B: immunofluorescent staining of vimentin ($\times 100$)

2.2 高糖和 GE 对 CF 纤维化标志物 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示,高糖刺激下,大鼠 CF 的 Col I、Ⅲ及 CTGF mRNA 表达显著升高,证明高糖能够诱导大鼠 CF 细胞胶原增多;不同浓度的 GE 处理高糖刺激后的大鼠 CF 24 h 后,Col I、Ⅲ及 CTGF mRNA 表达有所降低,且随 GE 浓度的增加,抑制作用增强,在 1~100 μ mol/L 之间呈现浓度依赖性(均 $P<0.05$;图 2)。

2.3 各组氧化应激标志物水平比较

使用氧化应激试剂盒对 CF 中氧化应激标志物进行检测,结果显示,与 NC 组相比,高糖模型组的 SOD 活性显著降低,NADPH 活性和 MDA 产量均显著增高;而 GE 能够显著抑制高糖诱导的氧化应激(均 $P<0.05$;图 3)。

2.4 各组心肌纤维化信号通路相关蛋白检测

高糖刺激后,非经典的促纤维化信号通路 TGF- β /ac-Smad3 和 α -SMA 蛋白的表达水平均明显升高($P<0.05$);使用 GE 干预后,上述促纤维化信号通路相关蛋白的表达水平明显受到抑制($P<0.05$)。同时,我们检测了 CF 中 SIRT1 蛋白水平的表达,结果显示,高糖刺激后,SIRT1 表达水平明显受抑制;而 GE 干预后,SIRT1 表达水平显著上升(均 $P<0.05$;图 4)。

2.5 EX-527 对 GE 药理作用的影响

EX-527 为 SIRT1 抑制剂,我们用免疫荧光共染了 CF 中的 SIRT1 及 α -SMA,结果表明,CF 中 SIRT1 被 GE 或 EX-527 激活后, α -SMA 表达水平明显下降(图 5A)。同时利用氧化应激试剂盒再次检测了 CF 氧化应激水平,结果表明,在加入 EX-527 后,GE 对高糖刺激下 CF 表型转化的抑制作用消失;且 EX-527 也可以使 GE 对高糖刺激下氧化应激及 ac-Smad3 信号通路的抑制作用消失(图 5B-H)。证明了 GE 对高糖刺激下 CF 转化及胶原合成的抑制作用依赖于 SIRT1。

3 讨论

心肌纤维化是 DCM 主要的病理改变,极大地增加了糖尿病患者心力衰竭的发病风险^[1]。CF 作为心脏中主要的细胞类型之一,一旦被各组刺激因素(高糖、异丙肾上腺素、TGF- β 等)激活便可合成并分泌胶原,导致心肌中 ECM 的沉积。此外,CF 转化为表达 α -SMA 的肌成纤维细胞也是合成 ECM 的一个重要来源^[2]。研究发现,高糖可通过促进心脏间质胶原沉积诱发心肌纤维化。一方面,高糖可以抑

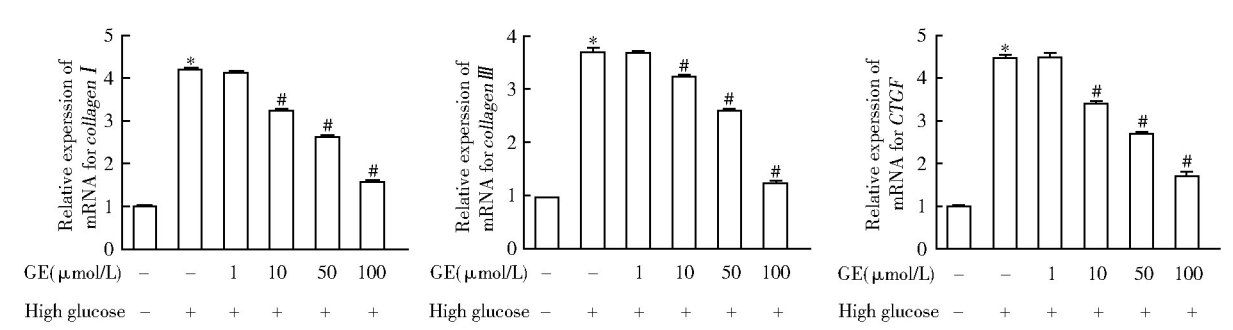


图2 不同浓度GE对高糖刺激下纤维化标志物mRNA表达的影响

Figure 2 Effect of different concentrations of GE on mRNA expression of fibrosis markers under high glucose stimulation ($n=5$)
GE: geniposide; CTGF: connective tissue growth factor. Compared with GE (-) and high glucose (-), * $P<0.05$; compared with GE (-) and high glucose (+), # $P<0.05$.

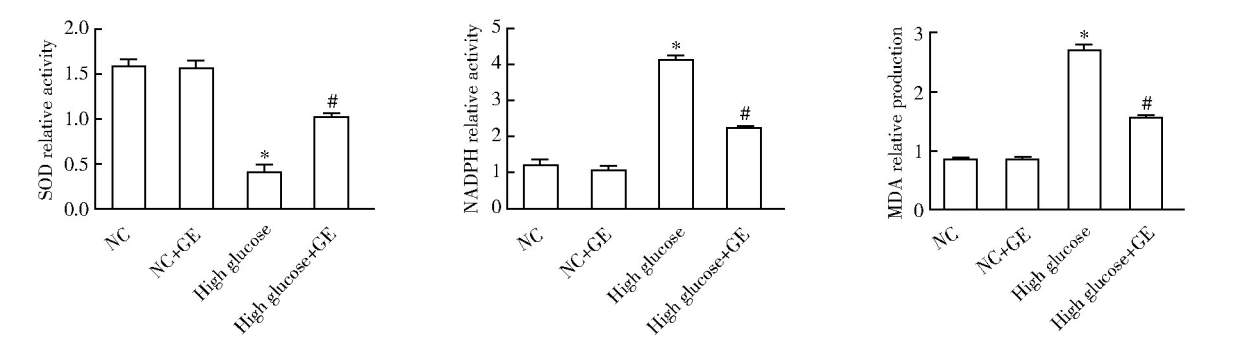


图3 各组氧化应激标志物水平比较

Figure 3 Comparison of oxidative stress markers among groups ($n=5$)

NC: normal control; GE: geniposide; SOD: superoxide dismutase; MDA: malonaldehyde; NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. Compared with NC group, * $P<0.05$; compared with high glucose group, # $P<0.05$.

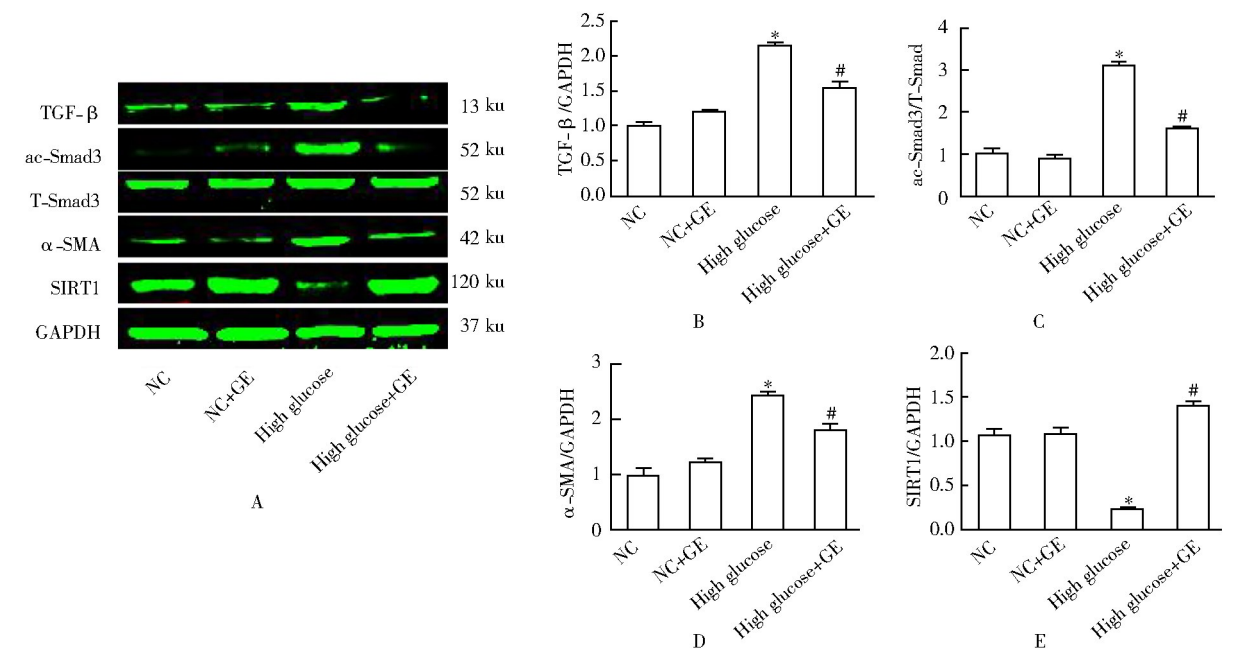


图4 GE对高糖刺激下CF中TGF-β/ac-Smad3信号通路及SIRT1蛋白表达的影响

Figure 4 Effects of GE on TGF-β/ac-smad3 signaling pathway and SIRT1 protein expression in CF under high glucose stimulation ($n=5$)

A: Western blotting; B, C, D, E: statistical analysis of indicated proteins. NC: normal control; GE: geniposide; TGF-β: transforming growth factor-beta; ac-Smad3: acetylated-Smad3; α-SMA: α-smooth muscle actin; SIRT: silent information regulator. Compared with NC group, * $P<0.05$; compared with high glucose group, # $P<0.05$.

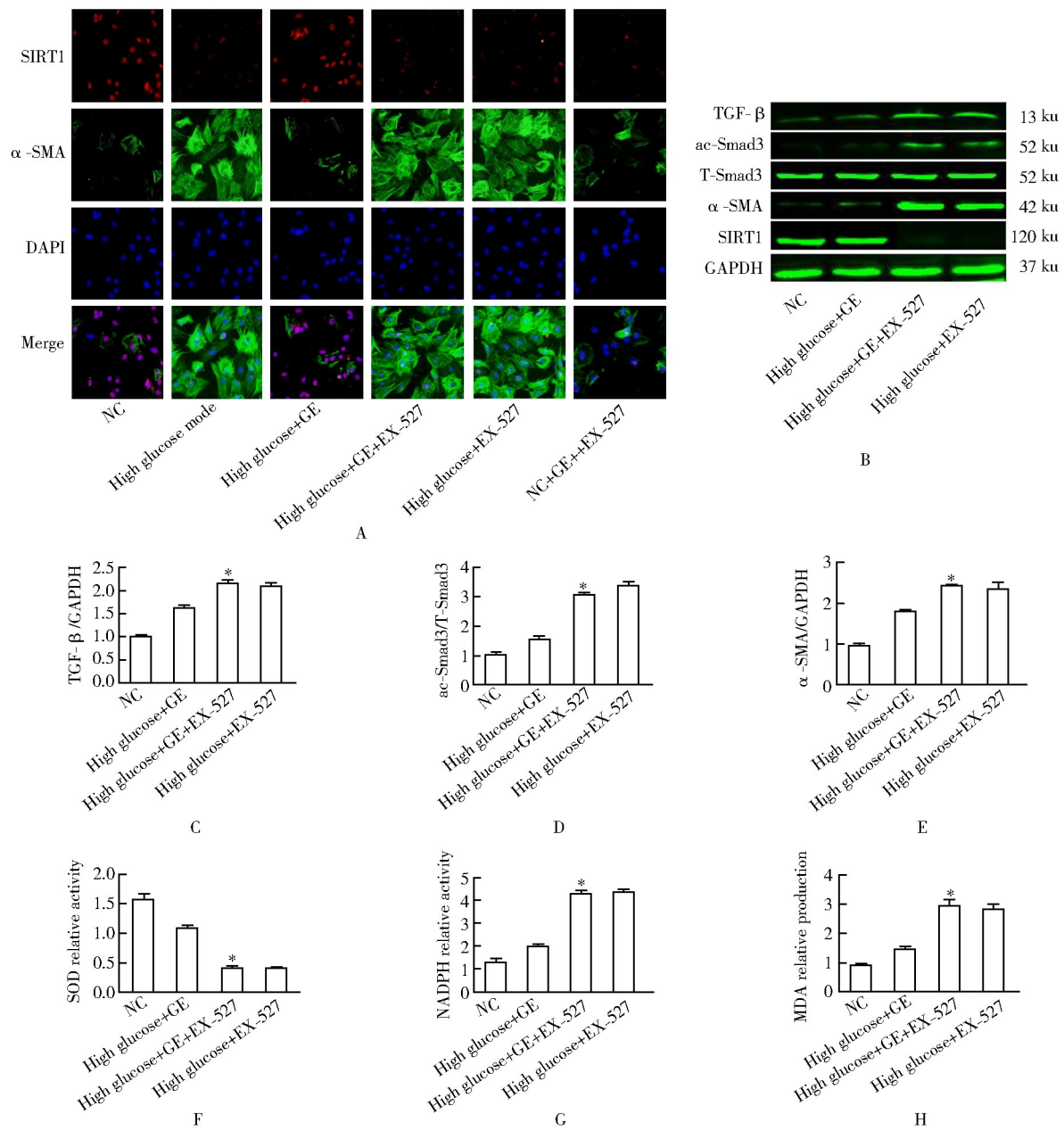


图 5 EX-527 对 GE 药理作用的影响

Figure 5 Effect of EX-527 on the pharmacological action of GE (n=5)

A; immunofluorescent staining; B; Western blotting; C, D, E; statistical analysisi of indicated proteins; F, G, H; statistical analysis of indicated oxidative stress markers. NC; normal control; GE; geniposide; TGF-β; transforming growth factor-beta; ac-Smad3; acetylated-Smad3; α-SMA; α-smooth muscle actin; SIRT1; silent information regulator; SOD; superoxide dismutase; MDA; malonaldehyde; NADPH; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. Compared with NC group, * P<0.05.

制间质内胶原的降解;另一方面,高糖又可促进胶原蛋白的糖基化,增加心脏间质中胶原的合成。因此,阻断 CF 的表型转化及胶原合成对干预 DCM 具有重要意义^[11]。本研究发现,GE 可以通过抑制 SIRT1 的表达进而阻断高糖诱导的 CF 表型转化及胶原合成。

传统观点认为,TGF-β/磷酸化的 Smad3 (phosphorylated-Smad3,P-Smad3) 信号通路是经典的促心

肌纤维化信号通路,在心肌纤维化的发生发展中有起着至关重要的作用。此信号通路激活的基本过程如下:TGF-β 与 TGF-β 受体 II 结合后,可激活 TGF-β 受体 I。随后,活化的 TGF-β 受体 I 可磷酸化 Smad3。磷酸化的 Smad3 再与 Smad4 结合后入核,直接或间接地激活促纤维化相关基因^[12]。最近研究发现,TGF-β 刺激能够激活细胞内乙酰化酶 p300 的催化活性,将乙酰辅酶 A 的乙酰基转移到 Smad3

的赖氨酸氨基残端,进而对 Smad3 进行乙酰化修饰,调节 Smad3 的 DNA 连接酶活性或转录活性^[13,14]。因此,抑制 Smad3 的乙酰化也是治疗心肌纤维化的关键策略之一。

在糖尿病状态下,心肌胶原代谢氧化失衡,氧化应激通过促进 TGF- β 的表达增加 CF 向肌成纤维细胞的表型转化,从而加强胶原合成、促进 DCM 患者心脏纤维化。因此,抑制 CF 氧化应激是治疗 DCM 的重要靶点之一^[1]。Gu 等^[15]研究发现,上调 CF 中乙醛脱氢酶 2 (acetaldehyde dehydrogenase 2, ALDH2) 的表达能明显抑制高糖诱导的 CF 胶原产生,其机制可能与 CF 中氧化应激的降低有关。

近年来,组蛋白去乙酰化酶 SIRT1 在纤维化疾病中的作用日益受到关注。据报道,SIRT1 可通过激活 TGF- β /ac-Smad3 信号通路和抑制氧化应激,改善肾间质纤维化^[7]。此外,SIRT1 还能够降低 ac-Smad4 和 β -catenin 蛋白的表达,抑制内皮间质转化,最终抑制肿瘤转移及器官纤维化^[16]。体外实验证明,虾青素可以通过激活 SIRT1 进而抑制 Smad3 的乙酰化,最终减轻压力负荷过载所致的心肌纤维化和心功能不全^[2]。SIRT1 在抗氧化应激中也发挥着至关重要的作用,例如 SIRT1 可以通过将 P53 的第 382 位的赖氨酸残基去乙酰化,抑制 P53 的生理活性,最终抑制细胞氧化应激所致的病理损伤^[5]。这些研究结果提示,SIRT1 对纤维化的发生发展及细胞的氧化应激发挥着重要的调控作用。在本研究中,我们利用高糖在体外对乳鼠 CF 细胞进行刺激,同时利用 GE 进行干预,结果发现,GE 能够明显降低高糖环境中 CF 的氧化应激水平及各种胶原的合成,抑制 Smad3 的乙酰化,同时 GE 能够激活 CF 细胞中 SIRT1 蛋白的表达。SIRT1 一旦被抑制,GE 的抑纤维化作用消失,表明 GE 的抑纤维化作用依赖于 CF 细胞中 SIRT1 的激活。

总之,我们的研究首次证实 GE 能够降低高糖诱导的大鼠心肌成纤维细胞表型转化及胶原合成,这种保护作用可能与 GE 对 CF 中氧化应激及 Smad3 乙酰化的抑制有关,且这种抑制作用依赖于 SIRT1 的激活。

【参考文献】

[1] Jia G, Demarco VG, Sowers JR. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12(3): 144-153. DOI: 10.1038/nrendo.2015.216.

[2] Zhang J, Wang QZ, Zhao SH, *et al*. Astaxanthin attenuated pressure overload-induced cardiac dysfunction and myocardial fibrosis; partially by activating SIRT1[J]. *Biochim Biophys Acta Gen*

Subj, 2017, 1861(7): 1715-1728. DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.03.007.

[3] Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis[J]. *J Cell Physiol*, 2010, 225(3): 631-637. DOI: 10.1002/jcp.22322.

[4] Bugyei-Twum A, Advani A, Advani SL, *et al*. High glucose induces Smad activation *via* the transcriptional coregulator p300 and contributes to cardiac fibrosis and hypertrophy[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2014, 13(1): 89. DOI: 10.1186/1475-2840-13-89.

[5] Vaziri H, Dessain SK, Ng EE, *et al*. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase[J]. *Cell*, 2001, 107(2): 149-159.

[6] Rong G, Liu W, Liu B, *et al*. SIRT1 suppresses cardiomyocyte apoptosis in diabetic cardiomyopathy; an insight into endoplasmic reticulum stress response mechanism[J]. *Int J Cardiol*, 2015, 191: 36-45. DOI: 10.1016/j.ijcard.2015.04.245.

[7] Huang XZ, Wen D, Zhang M, *et al*. Sirt1 activation ameliorates renal fibrosis by inhibiting the TGF- β /Smad3 pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(5): 996-1005. DOI: 10.1002/jcb.24748.

[8] Liu J, Yin F, Zheng X, *et al*. Geniposide, a novel agonist for GLP-1 receptor, prevents PC12 cells from oxidative damage *via* MAP kinase pathway[J]. *Neurochem Int*, 2007, 51(6): 361-369. DOI: 10.1016/j.neuint.2007.04.021.

[9] Shan M, Yu S, Yan H, *et al*. A review on the phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and toxicology of geniposide, a natural product[J]. *Molecules*, 2017, 22(10): 1689. DOI: 10.1016/j.neuint.2007.04.021.

[10] Ma ZG, Dai J, Zhang WB, *et al*. Protection against cardiac hypertrophy by geniposide involves the GLP-1 receptor/AMPK α signalling pathway[J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(9): 1502-1516. DOI: 10.1111/bph.13449.

[11] Russo I, Frangogiannis NG. Diabetes-associated cardiac fibrosis: cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 90: 84-93. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.12.011.

[12] 李宁, 吴海明, 耿荣鑫, 等. 基于生物信息学的糖尿病心脏病生物标志物及关键通路的筛选[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2019, 18(5): 321-326. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2019.05.066.

Li N, Wu HM, Geng RX, *et al*. Screening of biomarkers and key pathways in diabetic cardiomyopathy based on bioinformatics analysis[J]. *Chin J Mult Organ Dis Elderly*, 2019, 18(5): 321-326. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2019.05.066.

[13] Huang XR, Chung AC, Yang F, *et al*. Smad3 mediates cardiac inflammation and fibrosis in angiotensin II-induced hypertensive cardiac remodeling[J]. *Hypertension*, 2010, 55(5): 1165-1171. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.147611.

[14] Li J, Qu X, Ricardo SD, *et al*. Resveratrol inhibits renal fibrosis in the obstructed kidney; potential role in deacetylation of Smad3[J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(3): 1065-1071. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090923.

[15] Gu XY, Fang TT, Kang PF, *et al*. Effect of ALDH2 on high glucose-induced cardiac fibroblast oxidative stress, apoptosis, and fibrosis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 9257967. DOI: 10.1155/2017/9257967.

[16] Simic P, Williams EO, Bell EL, *et al*. SIRT1 suppresses the epithelial-to-mesenchymal transition in cancer metastasis and organ fibrosis[J]. *Cell Rep*, 2013, 3(4): 1175-1186. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.03.019.