

【药效学评价】

柚皮苷对糖尿病大鼠心肌纤维化及 STAT3 磷酸化水平的影响

张羽飞^{1,2}, 孟娜娜², 李厚忠³, 温以杰², 刘勇², 武艳², 杨永涛², 袁晓环², 金秀东^{1,2*}

1. 黑龙江中医药大学 基础医学院生理教研室, 黑龙江 哈尔滨 150040
2. 牡丹江医学院 黑龙江省抗纤维化生物治疗重点实验室, 黑龙江 牡丹江 157011
3. 牡丹江医学院 药学院, 黑龙江 牡丹江 157011

摘要: 目的 观察柚皮苷对糖尿病大鼠心肌纤维化及信号传导与转录激活因子3 (STAT3) 磷酸化水平的影响。方法 健康雄性 SD 大鼠 ip 链脲佐菌素 (STZ) 建立糖尿病模型, 将模型成功大鼠随机分为模型组和柚皮苷低、中、高 (25、50、100 mg/kg) 剂量组, 另设正常大鼠为对照组, 每天 ig 给药 1 次, 连续给药 8 周, 对照组和模型组给予等体积生理盐水。8 周后检测大鼠空腹血糖; 计算心脏指数; 采用 Masson 染色观察心肌纤维化程度; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测大鼠心肌组织 I 型胶原 (Collagen I) 和纤连蛋白 (FN) mRNA 表达; 免疫组化法检测大鼠心肌组织 Collagen I 和 FN 蛋白表达; 蛋白免疫印迹法 (Western blotting) 检测大鼠心肌组织 STAT3 及其磷酸化 STAT3 (p-STAT3) 的表达水平。结果 与对照组比较, 模型组大鼠空腹血糖、心脏指数、心肌纤维化程度以及 Collagen I、FN 和 p-STAT3 表达均明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 柚皮苷高、中剂量组心脏指数、心肌纤维化程度以及 Collagen I、FN 和 p-STAT3 表达均明显下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 柚皮苷通过下调糖尿病大鼠心肌组织 STAT3 通路, 减少心肌间质中 Collagen I 和 FN 合成及沉积, 从而改善糖尿病心肌病大鼠心肌纤维化。

关键词: 柚皮苷; 糖尿病性心脏病; 纤维化; 信号转导子和转录激活子 3; I 型胶原; 纤连蛋白

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)01-0048-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.01.008

Effects of naringin on myocardial fibrosis and STAT3 phosphorylation in diabetic rats

ZHANG Yufei^{1,2}, MENG Nana², LI Houzhong³, WEN Yijie², LIU Yong², WU Yan², YANG Yongtao², YUAN Xiaohuan², JIN Xiudong^{1,2}

1. Department of Physiology, School of Basic Medical Sciences, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China
2. Heilongjiang Key Laboratory of Anti-fibrosis Biotherapy, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China
3. Department of Pharmacy, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China

Abstract: Objective To observe the effects of naringin on interstitial fibrosis, signal transducer and activator of transcription (STAT3) phosphorylation in diabetic rats. **Methods** The male SD rats were administrated with streptozotocin (STZ) by ip to establish diabetic rat model, and then randomly divide into model group, naringin low, middle and high dose (25, 50, and 100 mg/kg) group. The normal rats injected with vehicle were designed as control group. Rats in each group were given the corresponding medicine by ig, once a day for eight weeks, while the normal group and the model group were orally administered with saline. At the end of the 8th week in treatment, fasting plasma glucose and heart mass index were measured. Masson staining was used to observe the myocardial fibrosis. qRT-PCR was used to detect the mRNA levels of collagen I and fibronectin (FN). Immunohistochemical

收稿日期: 2017-10-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573216), 牡丹江医学院研究生创新科研项目 (2016YJSCX-23MY、2017YJSCX-22MY), 黑龙江省大学生创新创业训练计划项目 (201710229023)

第一作者: 张羽飞 (1981-), 女, 在读博士, 讲师, 主要从事糖尿病并发症研究。Tel: (0453)6984647 E-mail: yufeizhang@foxmail.com

*通信作者: 金秀东 (1955-), 男, 硕士, 教授, 主要从事内分泌代谢疾病机制研究。Tel: (0453)6984647 E-mail: mdjinxiudong@126.com

method was performed to detect the depositions of collagen I and FN. Western blotting method was used to detect STAT3 and phosphorylation of STAT3. **Results** Compared with control group, fasting plasma glucose, heart mass index, the degree of myocardial fibrosis, and the expressions of collagen I and FN in left ventricular myocardial tissue of model group were significantly increased ($P < 0.05$ and 0.01). Compared with model group, fasting plasma glucose, heart mass index, the degree of myocardial fibrosis, and the expressions of collagen I and FN in left ventricular myocardial tissue of naringin middle and high dose group were significantly decreased. **Conclusion** Naringin retards the process of myocardial fibrosis in diabetic rats by downregulating the expression of STAT3, reducing the synthesis and depositions of collagen I and FN.

Key words: naringin; diabetic cardiomyopathy; fibrosis; STAT3; collagen I; fibronectin

糖尿病性心肌病 (diabetic cardiomyopathy, DCM) 是糖尿病性心脏病的特异性病变, 是导致糖尿病患者发生心力衰竭和死亡的重要原因, 严重影响患者的生活质量。DCM 病因复杂, 临床研究和治疗具有一定困难, 早期干预治疗有着重要的意义^[1]。近年来, 现代医学对 DCM 病理及作用机制研究越来越多, 且取得一定成绩。无论是中医药复方还是单体都进行了对 DCM 的治疗研究, 已经初步证实具有一定疗效。

柚皮苷是一种天然的双氢黄酮类化合物, 是我国特有的珍贵药材化橘红的主要活性成分, 也是骨碎补、枳实、枳壳的主要有效成分, 具有广泛的药理活性。柚皮苷有多种天然植物来源, 主要存在于芸香科柑橘属植物柚、葡萄柚和酸橙及其变种的果皮及果实中, 主要作为天然药物及饮食补充引起广泛关注。研究发现, 柚皮苷具有调血脂、抗糖尿病、内皮细胞保护、抗炎等生物学活性^[2-5]。其在心血管疾病中发挥重要的保护作用, 目前研究主要集中在抗氧化、抗损伤等方面^[6-7], 关于柚皮苷对糖尿病大鼠心肌间质纤维化的影响尚不十分清楚。

本实验采用一次性 ip 链脲佐菌素 (STZ) 建立糖尿病大鼠模型, 采用柚皮苷进行干预, 观察其对糖尿病大鼠心肌纤维化及信号传导与转录激活因子 3 (STAT3) 蛋白表达的影响, 探讨其对 DCM 间质纤维化的治疗作用及可能机制, 为进一步研发糖尿病治疗药物提供参考。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

柚皮苷 (质量分数 >98%)、STZ (美国 Sigma 公司); RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、SYBR Green 试剂盒 (美国 Promega 公司); PCR 引物 (上海生物工程有限公司); 抗 I 型胶原 (Collagen I)、抗纤连蛋白 (FN)、抗 STAT3、抗 p-STAT3 和肌动蛋白 β -actin (β -actin) 抗体兔多克隆抗体 (美国

Abcam 公司); BCA 蛋白定量试剂盒、细胞裂解液 (碧云天生物技术公司); Masson 染色液 (南京凯基生物科技发展有限公司), 其他试剂均为分析级。

1.2 动物

雄性 SPF 级 SD 大鼠, 体质量 230~280 g, 由牡丹江医学院医药研究中心实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号 SYXK (黑) 2015-007, 本动物实验方法符合牡丹江医学院动物福利和伦理管理委员会要求。

1.3 主要仪器

微量移液器 (德国 Eppendorf 公司); One touch II 血糖仪 (美国强生公司); 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); 光学显微镜 (德国 leica 公司); 台式低温高速离心机 (德国 Sigma 公司); 超微量核酸蛋白测定仪 (美国 Thermo Fisher 公司)。

2 方法

2.1 模型制备

40 只健康雄性 SD 大鼠, 留取 8 只作为对照组, 取另 32 只禁食不禁水 12 h 后, 按单次剂量 60 mg/kg ip STZ 溶液 (STZ 溶于 0.1 mol/L pH 4.2~4.5 枸橼酸缓冲液中, 配制成 1% 的 STZ 溶液) 建立糖尿病大鼠模型, 另设对照组, 注射等体积的枸橼酸缓冲液, STZ 注射 72 h 后尾静脉采血测定空腹血糖, 第 7 天复查血糖, 血糖浓度 ≥ 16.7 mmol/L 作为模型成功标准。

2.2 动物分组及给药

将造模成功 32 只大鼠随机分为 4 组: 模型组, 柚皮苷低、中、高剂量 (25、50、100 mg/kg) 组。ig 给药, 每天给药 1 次, 连续给药 8 周。对照和模型组给予等体积生理盐水。

2.3 血糖、体质量测定

8 周后, 大鼠经尾静脉采血测定空腹血糖, 并称量体质量。处死大鼠, 迅速取出心脏, 磷酸缓冲液 (PBS) 冲洗, 并用滤纸吸干, 称量心脏质量, 计算心脏指数。

心脏指数 (mg/g) = 心脏质量 (mg) / 体质量 (g)

2.4 大鼠心肌组织 Masson 染色

取大鼠左心室心肌组织, 4%多聚甲醛固定标本, 行常规石蜡包埋、切片 (厚度 5 μm), 进行 Masson 染色, 光镜下观察心肌细胞呈红色, 胶原纤维呈蓝色。

2.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测心肌组织中 Collagen I 和 FN mRNA 表达

取左心室心肌组织 20~50 mg, 按照试剂盒说

明书操作提取心肌组织总 RNA, 再根据逆转录试剂盒, 将 100 ng RNA 逆转录为 cDNA (反应体系为 20 μL), 5 倍稀释后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。每一标本取 2 μL 进行 PCR 反应, 反应体系为 20 μL , 检测基因上下游引物各 1 μL , PCR master mix 10 μL , 去离子水 6 μL 。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 40 个循环。经 Rps16 内参校正, 采用标准曲线法进行分析求得目的基因的相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1 基因及其特异引物

Table 1 Genes and its specific primers

基因	引物序列 (5'-3')	产物大小/bp
Collagen I	正向引物 ACAGGCGAACAAGGTGACAGAG	159
	反向引物 GCCAGGAGAACCAGCAGAGC	
FN	正向引物 GCCTGAACCAGCCTACGGAT	137
	反向引物 ATGACCACTGCCAAAGCCCAAG	
Rps16	正向引物 AAGTCTTCGGACGCAAGAAA	147
	反向引物 TGCCCAGAAGCAGAACAG	

2.6 免疫组化检测心肌组织 Collagen I 和 FN 蛋白表达

取心肌组织石蜡切片、脱蜡、脱水、3% H_2O_2 室温封闭、置于煮沸柠檬酸钠中修复抗原, 30%山羊血清封闭; 滴加稀释的一抗 (Collagen I 和 FN 分别 1:1 000), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBS 冲洗 3 次; 滴加生物素标记的二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、20 min。DAB 显色至镜下观察至出现棕黄色阳性信号后蒸馏水冲洗终止反应、苏木素复染、透明、封片、镜检。将切片置于 200 \times 光学显微镜下观察并随机选取 3 个视野拍照, 用 Image pro-plus 6.0 图像处理系统测量目的蛋白的平均光密度 (AOD) 值, 将 AOD 作为待测蛋白表达的定量标准。

2.7 Western blotting 法检测心肌组织 STAT3 蛋白的表达水平

取心肌组织样品, 裂解提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度进行定量。每个样品的蛋白取 50 μg , 经 SDS-PAGE 电泳, 转膜至 PVDF 上, 以 5% BSA 室温摇动封闭 2 h, 按说明书的比例分别加入兔抗 STAT3 (稀释比 1:1 000) 兔抗 p-STAT3 (稀释比 1:1 000) 和 β -actin (1:2 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下孵育过夜, TBST 洗膜后加入, 用 HRP 标记的羊抗兔二抗室温摇动孵育 2 h, 显色剂显影后, 成像系统照相, 并用 Image J 图像分析软件进行条带的灰度值分析, 计算 p-STAT3/STAT3, 以表示 p-STAT3 蛋白表达水平。

2.8 统计学分析

采用 Graphpad Prism 5.0 统计学软件对数据进行分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用单因素方差 (One-way ANOVA) 分析。

3 结果

3.1 各组大鼠空腹血糖、心脏指数测定

与对照组比较, 模型组大鼠空腹血糖、心脏指数明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 柚皮苷组空腹血糖、心脏指数均呈下降趋势, 高剂量组心脏指数显著下降 ($P < 0.05$)。表明糖尿病大鼠心肌已出现肥厚现象, 柚皮苷干预可减轻糖尿病所致的心肌肥厚。见表 2。

表 2 各组大鼠空腹血糖、心脏指数 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Fasting glucose and heart mass index of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	空腹血糖/ ($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	心脏指数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
对照	—	5.47 \pm 0.12	2.86 \pm 0.14
模型	—	28.80 \pm 1.01**	4.45 \pm 0.12*
柚皮苷	25	27.53 \pm 1.97	4.28 \pm 0.42
	50	26.00 \pm 0.72	4.37 \pm 0.54
	100	25.19 \pm 1.39	3.90 \pm 0.32 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

3.2 大鼠心肌组织 Masson 染色结果

如图 1 所示, 模型组大鼠左心室心肌纤维排列

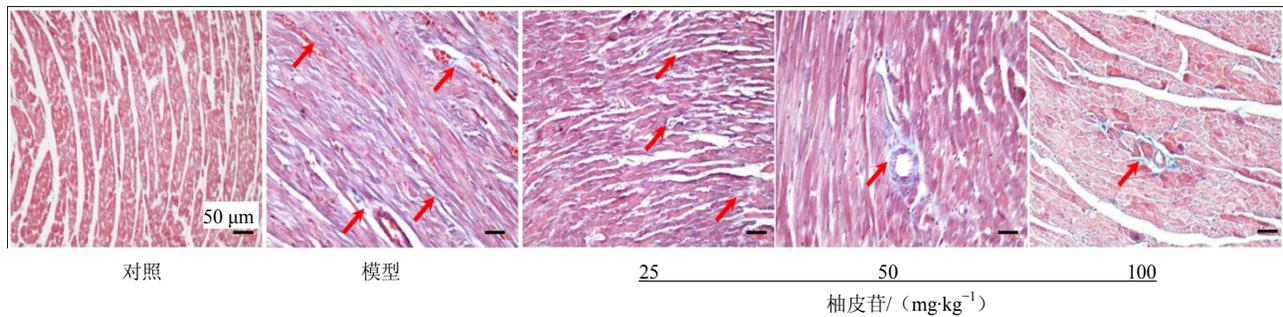


图1 各组大鼠心肌组织 Masson 染色

Fig. 1 Masson staining in myocardium tissues of rats in each group

整齐、规则，细胞间可见少许胶原纤维沉积；模型组大鼠的心肌纤维排列紊乱，蓝染的胶原纤维沉积明显，说明糖尿病大鼠心肌已存在心肌纤维化；而柚皮苷组心肌排列紊乱得到改善，胶原沉积有所减轻，大鼠心肌纤维化较模型组有所改善。

3.3 心肌组织实时荧光定量 (qRT-PCR) 结果

与对照组比较，模型组大鼠心肌组织 Collagen I

和 FN mRNA 表达均明显升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，柚皮苷组大鼠心肌组织中 Collagen I 和 FN mRNA 表达均有下降趋势，其中中、高剂量变化显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。见图 2。

3.4 免疫组化法检测 Collagen I 和 FN 蛋白表达

如图 3 所示，对照组大鼠左心室心肌组织 Collagen I 和 FN 低表达，阳性颗粒散在，染色较浅；

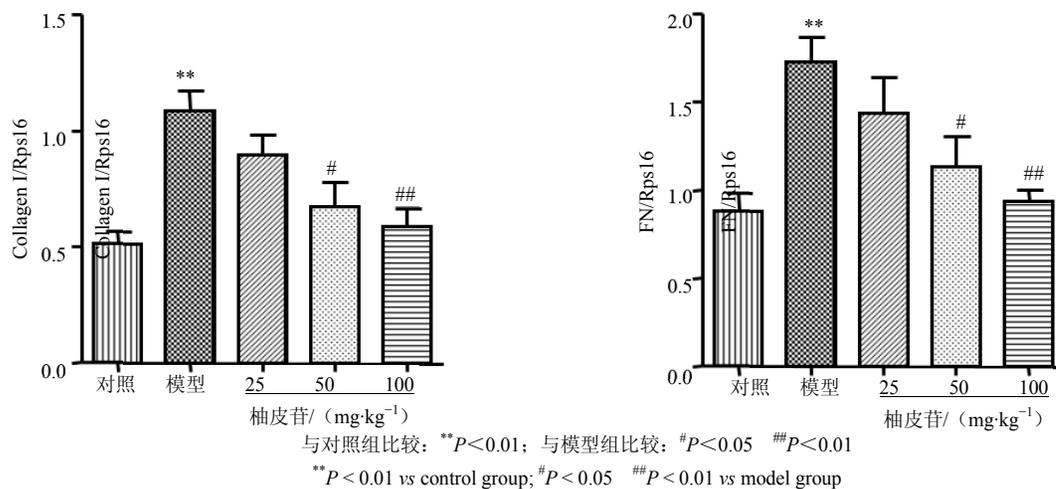


图2 各组大鼠心肌组织 Collagen I 和 FN mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Relative expression of Collagen I and FN mRNA in myocardium tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

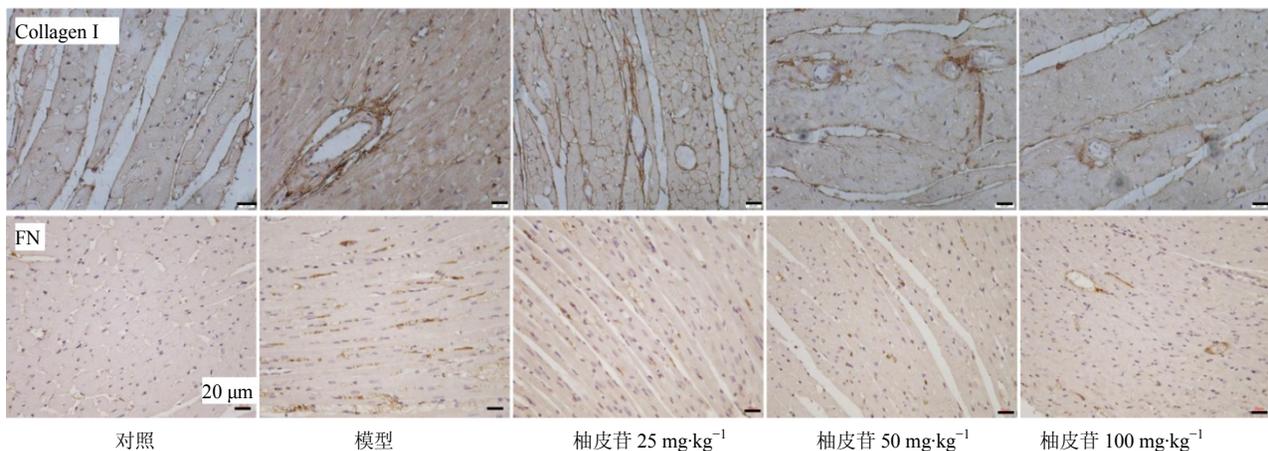


图3 各组大鼠心肌组织 Collagen I 和 FN 免疫组化结果

Fig. 3 Immunohistochemical results of Collagen I and FN in myocardium tissues of rats in each group

模型组高表达, 棕黄色信号强, 融合成片, 柚皮苷组表达明显降低。用 Image pro-plus 6.0 图像处理系统分别测量每张切片 Collagen I 和 FN 的平均光密度值, 结果如下: 与对照组比较, Collagen I 和 FN 的表达在模型组中明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 柚皮苷处理组的 Collagen I 和 FN 表达均有下降趋势, 中、高剂量变化显著 ($P < 0.05$ 、

0.01)。结果见图 4。

3.5 Western blotting 检测 STAT3 磷酸化水平

与对照组比较, 模型组大鼠心肌组织 p-STAT3/STAT3 表达水平明显上调, 差异显著 ($P < 0.01$), 柚皮苷组大鼠心肌组织 p-STAT3/STAT3 均较模型组下调, 中、高剂量组差异显著 ($P < 0.01$ 、0.05)。结果见图 5。

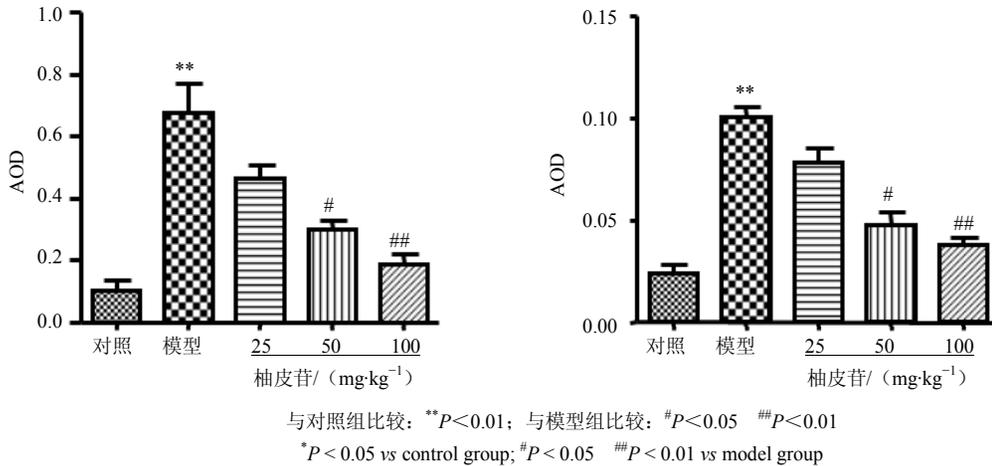


图 4 各组大鼠心肌组织 Collagen I 和 FN 的 AOD ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 AOD of Collagen I and FN in myocardium tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

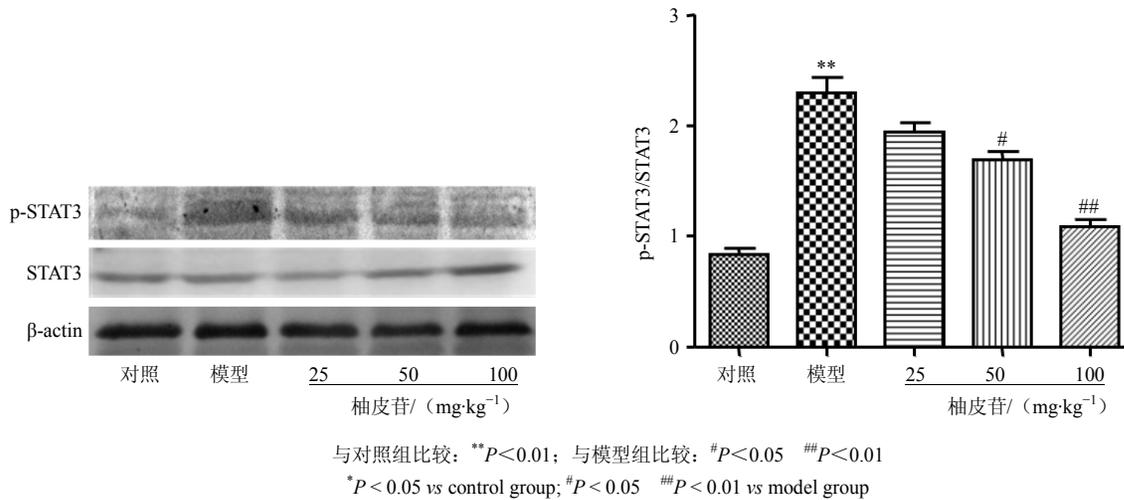


图 5 各组大鼠心肌组织 p-STAT3 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Expression of p-STAT3 in myocardium tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

DCM 是糖尿病重要的慢性并发症之一, 是糖尿病引起的心脏微血管病变和心肌代谢紊乱所致的心肌广泛性坏死, 最终进展为心力衰竭、心率失常及心源性休克, 已成为引起糖尿病病人死亡的主要原因之一。由于 DCM 发病机制复杂, 早期发病隐袭, 症状不明显, 所以早期诊断困难, 临床上容易被漏

诊或误诊, 诊断明确时病情比较严重且不可逆转, 因此, 如果能在早期采取有效的干预措施, 延缓 DCM 的进展, 对降低 DCM 的致死率将有积极的影响。

柚皮苷是一种天然的双氢黄酮类化合物, 近年研究发现, 柚皮苷可有效改善糖尿病时的糖代谢, 能够保护心肌, 改善心功能^[6, 8]。在本实验中, 模型成功 8 周后, 糖尿病模型组大鼠心脏指数、血糖明

显高于对照组,连续每天 ig 给药 1 次低、中、高剂量柚皮苷 8 周后,心脏指数高剂量组显著下降 ($P < 0.05$); 血糖水平有下降趋势,但不显著,与前期报道,柚皮苷在 2 型糖尿病中发挥降糖能力,而在 1 型糖尿病中降糖能力较弱相一致^[9]。提示柚皮苷对 DCM 的保护作用可能是独立于降糖途径之外的。为了验证柚皮苷是否对糖尿病引起的心肌纤维化有改善作用,主要采用 Masson 染色、免疫组织化学法和 Western blotting 法检测了糖尿病大鼠心肌组织中胶原的生成情况和信号通路中蛋白的表达情况。

临床数据和动物实验表明,DCM 为进展性慢性疾病,包括很多不同病理的机制:微血管改变、氧化损伤、心肌炎症和纤维化^[1]。目前研究认为心肌质纤维化是糖尿病心肌病的组织学标志之一,间质的纤维化是心肌成纤维细胞异常增殖,其分泌的胶原(主要为 Collagen I、Collagen III 胶原蛋白)增加并蓄积^[10],最终导致心肌结构重塑、器官纤维化。其中心脏功能的障碍与心肌组织中 Collagen I 含量的变化密切相关,其含量的增多可使心肌细胞肥大、心室壁顺应性降低,僵硬程度增加、舒张期充盈受限。以 Collagen I 为主的纤维网络包裹在每个心肌细胞周围,妨碍呈长度依赖性的心肌细胞力的产生^[11]。因此, Collagen I 常作为观察心肌纤维化程度的一个指标。

FN 是构成间质的主要糖蛋白,它存在于心肌细胞外基质(ECM)中,心肌中的 FN 主要由间质的心肌成纤维细胞合成并分泌,血管内皮细胞也可分泌。病理过程中它可以促使成纤维细胞增生并产生更多的 ECM,而增多的 FN 又在各种生长因子的作用下,引起心肌细胞肥大和纤维细胞增生,这个过程持续发展造成 ECM 过度积聚,胶原含量累积,最终导致心肌纤维化^[12]。因此, FN 的异常表达也是观察心肌纤维化程度的指标之一。

间质纤维化的检测可以通过组织病理学 Masson 染色和 ECM 成分基因和蛋白表达量测定来进行^[13]。本研究结果显示,在 Masson 染色中,与对照组比较,8 周后模型组心肌间质及血管周围的蓝染胶原纤维明显增多且排列紊乱,胶原沉积现象明显。同时发现,心肌组织内 Collagen I 和 FN mRNA 和蛋白表达显著增加,结合心脏指数,提示 8 周糖尿病大鼠已存在心肌纤维化情况。而给予柚皮苷 8 周后,与模型组比较,血管周和间质的蓝染沉积明显减轻,糖尿病大鼠心肌纤维化程度有所改善,心

肌组织中 Collagen I 和 FN mRNA 和蛋白在中、高剂量组表达亦明显减少,提示柚皮苷具有减轻 DCM 大鼠纤维化的作用。

既往研究表明, STAT 家族是一类广泛存在于生物体细胞和组织内的重要蛋白,其中 STAT3 属于 Janus 激酶(JAK)-STAT 信号通路的一个成员,具有广泛的生物功能。它的活化是一系列细胞信号级联传导途径的关键环节,既介导了多种细胞信息之间的传递,又参与了调节基因的表达与功能,越来越多的报道显示,其在器官纤维化的发生发展中起着重要作用^[14-16]。近年来, STAT3 通路在 DCM 中的作用也日益受到重视。有研究报道,高糖可通过磷酸化作用激活 STAT3 信号转导通路,进而上调 Collagen I 聚积^[16],抑制 STAT3 信号通路可以延缓心肌纤维化^[18-20]。刘付贞等^[21]证实,在离体环境中,柚皮苷可抑制高糖引起的心肌细胞 p-STAT3 表达上调,提示柚皮苷可抑制心肌细胞 STAT3 通路,进而起到心肌保护作用。在体情况下,柚皮苷是否能通过 STAT3 通路发挥作用未见文献报道。因此,本实验将 STAT3 的表达情况作为一个重要指标来检测,进一步探讨 STAT3 通路在 DCM 发生发展中的作用。本实验结果表明,模型组大鼠心肌组织 STAT3 的表达均显著高于对照组,结合模型组心肌组织纤维化表现,提示高糖状态时, STAT3 信号通路的激活可能介导了 DCM 心肌纤维化的信号转导;给予柚皮苷后,大鼠心肌组织中 p-STAT3 蛋白的表达较模型组明显减少,结合 Collagen I、FN 蛋白和 mRNA 表达减少、间质纤维化程度下降,表明柚皮苷改善心肌纤维化的作用可能是通过抑制 STAT3 信号转导通路的激活实现的。

糖尿病 8 周大鼠心肌已经发生纤维化;中、高剂量的柚皮苷均可减轻糖尿病大鼠心肌纤维化程度,并减少心肌间质中 Collagen I、FN 合成及沉积,证明其可改善 DCM 大鼠早期的心肌纤维化,进而延缓 DCM 心肌纤维化的进展;其相关机制可能与阻断 STAT 信号转导通路的过度激活有关,但其具体机制还待于进一步研究。以上结果为 DCM 机制探讨、糖尿病心肌纤维化防治药物研制提供了新的思路。

参考文献

- [1] Ward M L, Crossman D J. Mechanisms underlying the impaired contractility of diabetic cardiomyopathy [J]. World J Cardiol, 2014, 6(7): 577-584.

- [2] Alam M A, Subhan N, Rahman M M, et al. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action [J]. *Adv Nutr*, 2014, 5(4): 404-417.
- [3] Bharti S, Rani N, Krishnamurthy B, et al. Preclinical evidence for the pharmacological actions of naringin: a review [J]. *Planta Med*, 2014, 80(6): 437-451.
- [4] 孟娜娜, 白里雪, 李鑫鑫, 等. 柚皮苷对糖尿病及其并发症作用机制的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(4): 560-565.
- [5] 马信龙, 孙晓雷, 杜育任, 等. 微应变环境下柚皮苷对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响 [J]. *中草药*, 2013, 44(22): 3200-3205.
- [6] 游琼, 吴铿, 涂焰明, 等. 柚皮苷调控心肌核因子NF- κ B 炎症信号通路对糖尿病心肌病大鼠防治作用 [J]. *中国免疫学杂志*, 2013, 29(2): 121-124.
- [7] Chen J, Mo H, Guo R, et al. Inhibition of the leptin-induced activation of the p38 MAPK pathway contributes to the protective effects of naringin against high glucose-induced injury in H9c2 cardiac cells [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(3): 605-612.
- [8] 吴铿, 游琼, 黄瑞娜, 等. 柚皮苷调控心肌PPAR- γ 表达对实验性2型糖尿病心肌病大鼠模型心肌损伤的防治作用 [J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(4): 526-530.
- [9] Adebisi O A, Adebisi O O, Owira P M. Naringin reduces hyperglycemia-induced cardiac fibrosis by relieving oxidative stress [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0149890.
- [10] Fowlkes V, Clark J, Fix C, et al. Type II diabetes promotes a myofibroblast phenotype in cardiac fibroblasts [J]. *Life Sci*, 2013, 92(11): 669-676.
- [11] 王玲, 潘小凤, 储全根. 糖尿病心肌病发病机制的研究进展 [J]. *山西中医学院学报*, 2016, 17(5): 74-77.
- [12] Zhang N, Yang Z, Xiang S Z, et al. Nobiletin attenuates cardiac dysfunction, oxidative stress, and inflammatory in streptozotocin: induced diabetic cardiomyopathy [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 417(1/2): 87-96.
- [13] Law B, Fowlkes V, Goldsmith J G, et al. Diabetes-induced alterations in the extracellular matrix and their impact on myocardial function [J]. *Microsc Microanal*, 2012, 18(1): 22-34.
- [14] Liu J, Zhong Y, Liu G, et al. Role of Stat3 signaling in control of EMT of tubular epithelial cells during renal fibrosis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(6): 2552-2558.
- [15] Chang S H, Yeh Y H, Lee J L, et al. Transforming growth factor- β -mediated CD44/STAT3 signaling contributes to the development of atrial fibrosis and fibrillation [J]. *Basic Res Cardiol*, 2017, 112(5): 58.
- [16] Obana M, Maeda M, Takeda K, et al. Therapeutic activation of signal transducer and activator of transcription 3 by interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2010, 121(5): 684-691.
- [17] Fiaschi T, Magherini F, Gamberi T, et al. Hyperglycemia and angiotensin II, cooperate to enhance collagen I deposition by cardiac fibroblasts through a ROS-STAT3-dependent mechanism [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(11): 2603-2610.
- [18] Bai R, Yin X, Feng X, et al. *Corydalis hendersonii* Hemsl. protects against myocardial injury by attenuating inflammation and fibrosis via NF- κ B and JAK2-STAT3 signaling pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 207: 174-183.
- [19] Lo S H, Hsu C T, Niu H S, et al. Cryptotanshinone inhibits STAT3 signaling to alleviate cardiac fibrosis in Type 1-like diabetic rats [J]. *Phytother Res*, 2017, 31(4): 638-646.
- [20] Wang L, Li J, Li D. Losartan reduces myocardial interstitial fibrosis in diabetic cardiomyopathy rats by inhibiting JAK/STAT signaling pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(1): 466-73.
- [21] 刘付贞, 潘德茂, 陈景福, 等. 柚皮苷抗高糖诱导的心肌细胞损伤作用与抑制STAT3通路有关 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(4): 345-350.