

益消方对自发糖尿病小鼠血清和心肌组织 IGF-1 表达的影响

吴淑馨 孙宏峰 龙泓竹 张 力 田文杨 白 颖 丛佳林 杨晓晖

(北京中医药大学东方医院内分泌科,北京,100078)

摘要 目的:观察益消方对 KKAY 糖尿病小鼠血清和心肌组织 IGF-1 表达的影响,探讨其对糖尿病心肌保护的可能机制。方法:选用 KKAY 小鼠及 C57BL/6J 小鼠,随机分为正常组、模型组和中药组,分别灌服蒸馏水及益消方中药,在实验的 4、8、12 周取材后,运用 ELISA 的方法检测血清中 IGF-1 的表达,运用实时定量 PCR 的方法检测心肌组织 IGF-1 mRNA 的表达。结果:在实验的不同阶段,与正常组相比, KKAY 糖尿病小鼠模型组的血清及心肌组织中 IGF-1 的表达明显降低 ($P < 0.01$),而与模型组相比,中药组的血清 IGF-1 在第 8 周和第 12 周表达明显升高 ($P < 0.05$)。心肌组织的 IGF-1 mRNA 在第 12 周表达有升高的趋势。结论:益消方可通过改善血清及心肌组织中 IGF-1 的表达,从而对自发糖尿病小鼠的心肌具有一定的保护作用。

关键词 糖尿病心肌病;益消方;KKAY;IGF-1

Effect of Yi Xiao Decoction on IGF-1 in Mice of Diabetic Myocardial Disease

Wu Shuxin, Sun Hongfeng, Long Hongzhu, Zhang Li, Tian Wenyang, Bai Ying, Cong Jialin, Yang Xiaohui

(Department of Endocrinology, Dongfang Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

Abstract Objective: To study the protective effect of "Yi Xiao Decoction" on serum and myocardial tissue of KKAY mice model, and discuss the possible mechanisms of its diabetic myocardial protection. **Methods:** The KKAY and C57BL/6J mice were randomly divided into the model group, normal group and the TCM group. The mice in different groups were administered distilled water and Yi Xiao Decoction, respectively by gavage. Specifically, the TCM group was fed with Yi Xiao Decoction, while the model group and the normal group were given distilled water. The expression of IGF-1 in serum was detected by ELISA, and expression of IGF-1 mRNA expressions in myocardia by RT-PCR after 4, 8, 12 weeks' treatment. **Results:** In the different stages of the experiment, compared with the normal group, the expression of IGF-1 in serum and tissues in diabetic KKAY mice decreased significantly in the model group ($P < 0.01$), and compared with the model group, the expression of serum IGF-1 in TCM group in 8th weeks and 12th weeks increased significantly ($P < 0.05$). The expression of mRNA IGF-1 in cardiac muscle tissue increased in 12th weeks. **Conclusion:** Yi Xiao Decoction can improve IGF-1 expression in serum and myocardial tissues and protect cardiac muscle tissue of the diabetic mice model.

Key Words Diabetic cardiomyopathy; Yi Xiao Decoction; KKAY; IGF-1

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.09.052

糖尿病心肌病(Diabetic Cardiomyopathy, DCM)是糖尿病的心血管并发症之一,是独立于高血压、心脏瓣膜疾病、冠心病及其他心脏病因素所导致的心脏结构和功能异常^[1]。大量研究表明糖尿病心肌病是影响糖尿病患者生活质量和危害生命的最重要并发症之一,已成为糖尿病患者的主要死亡原因之一^[2],因此,早期干预显得尤为重要。糖尿病心肌病在中医学属于“消渴病心病”范畴,其基本病理基础是无形之痰与瘀血相互胶结所致的心内微型癥结,

杨晓晖教授以“益气消癥散结”为治则,创制“益消方”,该方在临床上对改善糖尿病心肌病患者的症状有一定的作用。本研究试图通过观察该方对自发糖尿病小鼠血清及心肌组织 IGF-1 表达的影响,探讨其对糖尿病动物心肌保护的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 健康雄性 C57BL/6J 小鼠 40 只及 KKAY 小鼠 80 只,均为 10~12 周龄(许可证号:SCXK 京 2009-0007 及 SCXK 京 2009-0004),购自中

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金博导类(编号:20110013110004);北京中医药大学自主选题项目中青年教师类(编号:2015-JYB-JSMS126)

作者简介:吴淑馨(1984.10—),女,主治医师,研究方向:中医药防治糖尿病及并发症, E-mail:15120039753@163.com

通信作者:杨晓晖(1968.02—),男,博士,教授、主任医师,博士研究生导师,研究方向:中医药防治糖尿病及并发症, E-mail:yxh0616@126.com

国医学科学院实验动物研究所。饲养环境为室温(21±1)℃、相对湿度30%~40%，通风自然，自由饮水，适应性饲养1周后，测血糖，80只KKAy小鼠测随机血糖均≥13.9 mmol/L，符合糖尿病的诊断标准。

将80只KKAy小鼠随机分为模型组和中药组，C57BL/6J小鼠为正常对照组，各组小鼠均为40只。

1.2 给药方法 分组后给药，灌胃量根据人与小鼠间的体表面积折算系数计算，经计算，小鼠给药剂量为20.2 g/kg体重，即中药组予20.2 g/kg体重灌服“益消方”中药，模型组及正常组予20.2 g/kg体重的剂量灌服蒸馏水，每组分别在4、8、12周末取材10只小鼠。留取血清做ELISA，留取心肌组织做RT-PCR。

1.3 药物及试剂 益消方处方由黄芪等中药组成，方中药材购自东方医院中药房。IGF-1 ELISA检测试剂盒(美国abcam公司，批号ab100695)；RT-PCR试剂盒(Promega公司，批号M6101)

1.4 血清中IGF-1的测定 采用酶联免疫吸附法(ELISA法)，分别设空白孔、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液40 μL，然后再加待测样品10 μL，经过温育、洗涤、加酶、再次温育、洗涤、显色，450 nm波长依序测量各孔的吸光度(OD值)。

1.5 心肌组织IGF-1的测定 采用实时定量PCR方法检测心肌组织IGF-1 mRNA的表达。取约50 mg心肌组织使用Trizol法提取心肌组织总RNA，测定总RNA的浓度和纯度。引物设计后由上海生工生物公司合成引物。见表1。RT总体积：20 μL，反

应条件：70℃预变性5 min，25℃退火5 min，42℃延伸60 min，70℃失活5 min，PCR总体积：20 μL，反应条件：95℃预变性2 min；95℃变性15 s，60℃退火1 min，延伸72℃ 30 s共40个循环；72℃终延伸5 min。计算IGF-1与β-actin mRNA比值。

表1 IGF-1与β-actin引物序列

Primer	序列(5, to3,)	碱基数
IGF-1	上游:TCTCTTCTACCTGGCGCTCT	20
	下游:ACTGAAGAGCATCCACCAGC	20
β-actin	上游:AGGCCAACCGTGAAAAGATG	20
	下游:TGGCGTGAGGGAGACATAG	20

1.6 统计学方法 对实验数据均采用SPSS 16.0统计软件分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示，多组样本间差异的比较用单因素方差分析的方法，组间比较采用LSD法， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况的观察 实验期间，与正常组小鼠相比，KKAy小鼠的体型较大，体重增加明显，饮水饮食较多，呈腹型肥胖，慵懒迟钝，对抓取反抗不明显，多次尾尖测血糖法测定血糖均 > 13.9 mmol/L，在12周的实验期内，血糖水平持续高于13.9 mmol/L，符合2型糖尿病的特征及血糖标准。

2.2 各组小鼠血清中IGF-1的检测结果 如表2所示，与正常组比较，从第4周开始，模型组及中药组小鼠血清IGF-1水平已明显降低，在实验的各个阶段(第4、8、12周)差异均有统计学意义($P < 0.01$)，在第8周和第12周时，中药组与模型组IGF-1的差异有统计学意义($P < 0.05$)；在第4周时，2组相比无统计学意义($P > 0.05$)。

表2 各组小鼠血清IGF-1的比较

分组	鼠数	4周	鼠数	8周	鼠数	12周
正常组	8	30.68 ± 3.86	9	30.32 ± 0.92	9	30.16 ± 1.22
模型组	10	18.76 ± 0.83**	8	15.35 ± 0.83**	9	15.87 ± 0.74**
中药组	6	20.00 ± 0.83**	6	23.97 ± 0.49**△	7	25.91 ± 0.64**△

注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，与模型组比较，△ $P < 0.05$ ，△△ $P < 0.01$ 。

表3 各组小鼠心肌组织IGF-1与β-actin mRNA比值的比较

分组	鼠数	12周
正常组	6	1.35 ± 1.04
模型组	7	0.95 ± 0.82
中药组	7	1.08 ± 0.98

2.3 实验末(第12周)各组小鼠心肌组织中IGF-1 mRNA的检测结果 由表3中可看出，在实验的第12周，各组相比，心肌组织的IGF-1无统计学意义($P > 0.05$)，但从均数可看出，中药组与模型组相

比，有一定的上升趋势。

3 讨论

糖尿病心肌病的发生和发展是多因素所致，以舒张功能不全为主要表现，由于舒张功能障碍和心肌硬度增加最终可导致心力衰竭^[3]，其主要病理特点是心肌间质及血管周围纤维化。心肌间质纤维化是指心肌成纤维细胞过度增生从而导致细胞外基质(Extracellular Matrix, ECM)大量沉积而形成的病理演变。胰岛素样生长因子-1(IGF-1)是胰岛素家族

的分子量大约为 7500kDa 的一类多肽,在心、肾、脑、肺等都可合成并分泌,主要由肝脏合成,其主要作用是促进组织生长发育和参与机体代谢活动,IGF-1 在心脏等多个器官中有表达,对于心脏生长、发育和舒缩功能的调节都有重要作用,还参与了新生心肌纤维的增殖,在成熟心肌细胞中也具有加强心肌纤维生长、促进发育的功能^[4]。IGF-1 还可以通过多种信号转导通路影响血管张力,特别是交感神经系统和 RAS 系统的相互作用^[5]。IGF-1 通过减弱 P53 功能,可以减少 AngII 产生及其受体 AT1 的激活,阻止心肌细胞死亡^[6],给予外源性 IGF-1 治疗可以改善糖尿病动物的心肌细胞收缩障碍,IGF-1 在糖尿病心肌病的心肌纤维化和发展中起着重要的作用^[7],糖尿病小鼠在造模成功后的第 30 天就可以有心肌细胞的凋亡,IGF-1 是降低的^[8],可以说 IGF-1 是心血管的一个保护因子。IGF-1 具有抑制细胞凋亡、促进心肌细胞增殖、增加心肌细胞数目、抗心肌纤维化从而起到对心脏的保护作用^[9],还可能影响到心肌细胞膜上钙离子通道,改变细胞内钙的浓度而改善心脏收缩功能^[10]。血糖控制和 IGF-1 之间亦存在密切关系,血糖控制越差,IGF-1 水平越低^[7]。

中医药防治 DCM 具有优势,并有显著的疗效,中医认为本病属于“消渴心病”范畴。在古代文献、临床观察和现代实验研究的基础上,杨晓晖教授提出了“心络微型癥瘕”理论,认为糖尿病心脏并发症是在气血阴阳失调基础上,出现心气、心阴、心血、心阳不足和虚衰,导致气滞、血瘀、痰浊、寒凝等痹阻心脉,瘀、痰、浊日久化热,形成痰郁热瘀,并相互胶结,阻于心之络脉,初聚在气,为聚散无常之“瘕”,久积在血,积而不散,瘀结于络脉,为有形可征之“癥”,形成心络微型癥瘕。其基本病机是气阴两虚、痰瘀互结、心脉痹阻。无形之痰与瘀血相互胶结于心之络脉是心内微型癥结的病理基础,针对“心络微型癥瘕”这一关键病机,以“益气消癥散结”为治则,创制“益消方”,益消方在治疗 DCM 有明显疗效,前期实验研究发现,早期使用“益消方”可降低血糖、纠正脂肪代谢紊乱、改善微循环,减轻糖尿病动物的心肌坏死程度,缩小坏死范围,减轻心肌纤维间 RAS 阳性物质的沉积,减轻心肌细胞超微结构的损伤^[11]。

本研究使用 ELISA 法检测了糖尿病小鼠血清中 IGF-1 的表达,从实验结果可看出,在不同时间点(实验的第 4 周、8 周和 12 周),模型组和中药组的

IGF-1 水平与正常组相比均具有统计学意义($P < 0.01$),从整体趋势看,IGF-1 水平均有随着时间而增长的趋势,但模型组增幅更加明显,在第 8 周和 12 周,模型组和中药组的 IGF-1 水平相比较差异有统计学意义($P < 0.05$),均较模型组有明显下降。使用实时定量 PCR 的方法检测了糖尿病小鼠心肌组织中 IGF-1mRNA 的表达,在实验的第 12 周,各组相比,心肌组织的 IGF-1 无统计学意义($P > 0.05$),但从均数可看出,中药组与模型组相比,有一定的上升趋势。通过该研究我们发现,益消方可通过改善血清及心肌组织中 IGF-1 的表达,对自发糖尿病小鼠的心脏具有一定的保护作用,为临床使用该方干预糖尿病心肌病提供了实验依据。

参考文献

- [1] Regan TJ, Lyons MM, Ahmed SS, et al. Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus[J]. J Clin Invest, 1977, 60(4): 884-899.
- [2] Pan Y, Wang Y, Zhao Y, et al. Inhibition of JNK phosphorylation by a novel curcumin analog prevents high glucose-induced inflammation and apoptosis in cardiomyocytes and the development of diabetic cardiomyopathy[J]. Diabetes, 2014, 63(10): 3497-3511.
- [3] Y. Zhao, L. Zhang, Y. Qiao, et al. Heme oxygenase-1 prevents cardiac dysfunction in streptozotocin-diabetic mice by reducing inflammation, oxidative stress, apoptosis and enhancing autophagy[J]. PLoS One, 2013, 8(9): 75927.
- [4] Feng B, Chen S, Chiu J, et al. Regulation of cardiomyocyte hypertrophy in diabetes at the transcriptional level[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008, 294: 1119-1126.
- [5] Cao N, Lau S, Nguyen TT, et al. Characterization of the acute cardiovascular effects of intravenously administered insulin-like growth factor-1 in conscious Sprague-Dawley rats[J]. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2006, 33: 1190-1195.
- [6] Fiordaliso F, Leri A, Cesselli D, et al. Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated genes leading to myocyte cell death[J]. Diabetes, 2001, 50(10): 2363-2375.
- [7] Garay-Sevilla ME, Nava LE, Malacara JM, et al. Advanced glycosylation end products (AGEs), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-binding protein-3 (IGFBP-3) in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2000, 16(2): 106-113.
- [8] Kajstura J, Fiordaliso F, Andreoli AM, et al. IGF-1 overexpression inhibits the development of diabetic cardiomyopathy and angiotensin II-mediated oxidative stress[J]. Diabetes, 2001, 50(6): 1414-1424.
- [9] Kaplan RC, Strickler HD, Rohan TE, et al. Insulin-like growth factors and coronary heart disease[J]. Cardiol Rev, 2005, 13(1): 35-39.
- [10] Von Lewinski D, Voss K, Hulsmann S, et al. Insulin-like growth factor-1 exerts Ca^{2+} -dependent positive inotropic effects in failing human myocardium[J]. Circ Res, 2003, 92(2): 169-176.
- [11] 杨晓晖, 吴淑馨, 张力, 等. 糖尿病大鼠心肌组织 AngII 变化及益气养阴散结中药复方对其影响的实验研究[J]. 中国药物警戒, 2013, 4(10): 196-199.