

降糖消渴颗粒对实验性糖尿病大鼠心肌 MAPK 信号通路影响

赵丹丹¹ 吴 瑞² 于 娜¹ 左加成¹ 马 越¹ 田 甜¹ 莫芳芳¹ 张东伟¹ 高思华¹

(1 北京中医药大学中医学院, 北京, 100029; 2 中国中医科学院广安门医院南区, 北京, 102618)

摘要 目的: 观察降糖消渴颗粒对实验性糖尿病大鼠心肌病理形态及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路的影响, 研究其对糖尿病心肌病的作用及机制。方法: SD 大鼠高脂饲料喂养 4 周后结合腹腔注射链脲佐菌素(STZ) 30 mg/kg, 建立 2 型糖尿病大鼠模型, 将成模的大鼠按血糖随机分为模型组、阳性对照组(吡格列酮片 1.5 mg/kg BW)、降糖消渴颗粒组(9 g 生药/kg BW), 并设正常对照组。干预 4 周后, 检测各组大鼠心脏质量指数; 心肌组织切片并用 HE 染色, 观察药物对糖尿病大鼠心肌组织病理形态的影响; 应用 western-blot 法检测心肌 MEK1/2, p38 MAPK, p-p38 MAPK 的蛋白表达情况。结果: 降糖消渴颗粒组大鼠心脏质量指数明显低于模型组($P < 0.05$), 降糖消渴颗粒对实验性糖尿病大鼠心肌组织的病理改变有改善作用, 同时能下调糖尿病大鼠心肌组织 MEK1/2, p38 MAPK 总蛋白表达, 且能减少 p-p38 MAPK 蛋白量($P < 0.05$), 提示其对糖尿病大鼠心肌 MAPK 信号通路具有抑制作用。结论: 降糖消渴颗粒能够通过调节心肌组织 MAPK 信号通路, 改善心肌纤维化及心肌细胞凋亡, 从而实现延缓糖尿病心肌病进展的作用。

关键词 降糖消渴颗粒; 糖尿病心肌病; 病理; MAPK 信号通路

Effect of Jiangtang Xiaoke Granule on MAPK Signal Pathway in Myocardial Tissues of Experimental Diabetic Rats

Zhao Dandan¹, Wu Rui², Yu Na¹, Zuo Jiacheng¹, Ma Yue¹, Tian Tian¹, Mo Fangfang¹, Zhang Dongwei¹, Gao Sihua¹

(1 School of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2 Department of Endocrinology, South Area of Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 102618, China)

Abstract Objective: To explore the effect of Jiangtang Xiaoke granule (JTXKG) on pathological changes and MAPK signal pathway in myocardial tissues of experimental diabetic rats. **Methods:** Diabetic rats were induced by high-fat diet and low dose streptozotocin (30 mg/kg). JTXKG granule 9 g/kg (based on crude herb equivalent) and pioglitazone 5 mg/kg (as a positive control for comparison) were orally administrated to diabetic rats for 4 weeks. The ratio of heart weight to body weight and the pathological changes of myocardial tissues were measured. In addition, the protein expression levels of MEK1/2, p38 MAPK, phosphate-p38 MAPK in myocardial tissues were detected. **Results:** JTXKG reduced the ratio of heart weight to body weight. Results of HE-staining showed that JTXKG improved pathological changes of myocardial tissues. Moreover, JTXKG significantly down-regulated protein levels of MEK1/2, p38 MAPK, phosphate-p38 MAPK in myocardial tissues of the diabetic rats. **Conclusion:** JTXKG could protect the rats from diabetic cardiomyopathy by inhibiting the MAPK signal pathway in the myocardial tissues of diabetic rats.

Key Words Jiangtang Xiaoke Granule; Diabetic cardiomyopathy; Pathology; MAPK signal pathway

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2017.11.043

糖尿病心肌病(Diabetic Cardiomyopathy, DCM)是糖尿病的重要并发症之一,亦是导致糖尿病患者死亡的主要原因^[1]。其主要病理改变包括微血管病变、心肌纤维化、心肌肥厚等^[2],以上病理改变与糖尿病时长期高血糖、高血脂状态导致氧化应激,线粒体功能障碍导致的炎症反应、纤维化及局灶性细胞死亡密切相关^[3]。丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated Protein Kinase, MAPK)是一组能被不同的

细胞外刺激,如细胞因子、神经递质、激素、应激等激活的促分裂原活化蛋白激酶,对细胞应激调节、炎症反应等多种生命过程发挥着调节作用。MAPK 通路参与了氧化应激和炎症反应等 DCM 最重要的病理过程^[4],故抑制心肌组织 MAPK 通路对于 DCM 的早期防治具有非常重要的意义。

降糖消渴颗粒是在肝脾肾三脏同调法治疗 T2DM 脏腑辨证新模式^[5]的指导下创制的治疗 2 型

基金项目: 国家重大新药创制子课题(2012ZX09103201-005); 国家自然科学基金项目(NSFC81503540 & NSFC 81274041); 北京市共建项目(0101216-14 & 0101216-2013)

作者简介: 赵丹丹(1985.07—),女,博士,助理研究员,研究方向: 中医药防治糖尿病的基础与临床研究, E-mail: bucmzhaodandan@163.com

通信作者: 高思华(1957.07—),男,博士,教授,中心主任,研究方向: 脏腑相关理论与中医药防治糖尿病的基础与临床研究, Tel: (010) 64286929, E-mail: gaosihua1216@163.com

糖尿病最常用的方剂之一^[6]。前期研究显示该方具有较好的抗糖尿病及抗氧化作用^[7],然而该复方对 DCM 的作用尚不清楚。本研究拟用降糖消渴颗粒干预实验性糖尿病大鼠,通过观察其对心肌 MAPK 信号通路的影响探讨其治疗的 DCM 机制,亦为寻找 DCM 的有效治疗药物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性 SD 大鼠,体重 180~200 g,购自北京维通利华实验动物中心,合格证号 SCXK(京)2012-0001。饲养于北京中医药大学屏障环境动物实验室,合格证号 SCXK(京)2011-0024,室温 20℃,相对湿度 45% 左右,光暗周期(12 h/12 h),实验期间,动物自由进食水。普通饲料及高脂饲料(20%蔗糖、2.5%胆固醇、10%猪油、1%胆酸钠、66.5%基础饲料),购于北京科澳协力饲料有限公司,合格证号 SCXK(京)2009-0012。

1.1.2 药物 降糖消渴颗粒及制备方法同前期文献报道^[7]。吡格列酮片由北京太洋药业有限公司生产。

1.1.3 试剂与仪器 链脲佐菌素(STZ, SIGMA 公司,美国,以 0.1 mol/L, pH4.5 柠檬酸缓冲液溶解,新鲜配制而成),MEK1/2(MAPK 激酶)、p38MAPK、phospho-p38MAPK、GAPDH 一抗(均购自于 CST 公司,美国);辣根过氧化物酶标记二抗(GBI 公司,美国)。光学显微镜为日本奥林帕斯产品。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 雄性 SD 大鼠 45 只,适应性饲养 1 周,随机抽取 10 只作为正常组,普通饲料喂养;其余 35 只大鼠采用高脂饲料喂养 4 周后,高脂饲料喂养组禁食 12 h,链脲佐菌素(STZ)按 30 mg/kg 腹腔注射大鼠。普通饲料喂养组同期注射同体积的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。3 d 后检测禁食 16 h 后血糖,以空腹血糖 >16.7 mmol/L 为糖尿病造模成功标准^[8]。将符合要求的大鼠 30 只,按血糖、性别随机分组,糖尿病模型组 10 只,吡格列酮组 10 只,降糖消渴颗粒组 10 只。

1.2.2 给药方法 降糖消渴颗粒以生药量计为 9 g/kg(为人用日剂量的 10 倍),阳性药物组予吡格列酮片,给药量为 5 mg/kg(相当于临床人用量 10 倍),模型组及正常组等量纯净水灌胃。实验期间继续原喂养方式,共给药 4 周。该实验方案经北京中医药大学动物伦理委员会审核通过。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 心脏重量指数检测 末次给药后,大鼠禁食 12 h,称量大鼠体重。戊巴比妥钠(40 mg/kg 体重)麻醉,下腔静脉取血处死,冰上分离整个心脏,称重,计算心脏重量指数=心脏重量/体重。

1.2.3.2 病理学观察 剪取心脏左心室的小块组织,10%中性甲醛固定,石蜡包埋,切片厚度 4 μm,进行苏木素-伊红(HE)染色,光镜观察其病理学改变,摄片并进行图像分析。

1.2.3.3 Western-Blot 方法检测 MEK1/2、p38 MAPK、p-p38 MAPK 蛋白的表达 剪取心肌组织块,加入预冷的含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液低温裂解心肌组织,离心,提取总蛋白,按 BCA 试剂盒说明操作,进行蛋白含量测定,配制 SDS-PAGE 分离胶、浓缩胶,进行电泳、转膜、封闭,分别将 PVDF 膜用稀释好的 MEK1/2、p38 MAPK、p-p38 MAPK(1:1 000, 5%脱脂奶粉稀释)进行孵育,4℃摇荡过夜,再用荧光二抗(1:5 000 稀释)室温孵育 1.5 h。ECL 发光显色,凝胶成像仪曝光成像。Image J 软件分析条带灰度,并进行半定量分析处理。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行数据处理分析,所有计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,进而采用 LSD 或 Duncan's 法进行两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心脏质量指数的比较 与正常大鼠比较,糖尿病大鼠心脏质量指数显著升高($P < 0.05$),提示该实验性糖尿病大鼠存在糖尿病导致的心肌病变。与模型组大鼠比较,降糖消渴颗粒组与吡格列酮组大鼠心脏质量指数明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明降糖消渴颗粒可能具有改善 DCM 的作用。见图 1。

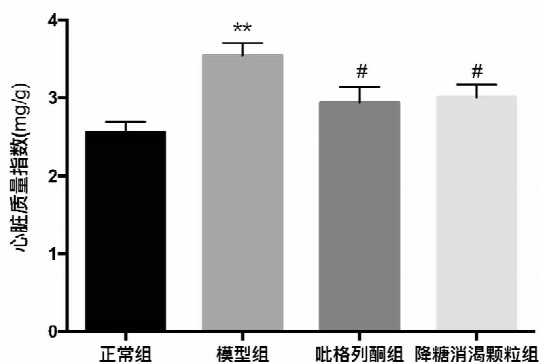


图 1 各组大鼠心脏质量指数的比较

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

2.2 各组大鼠心肌病理形态学的比较 正常组心

肌细胞排列有序,血管周围无炎性细胞浸润。模型组心肌细胞体积增大,心肌间隙增宽,并可见部分心肌轻度变性并断裂及少量坏死的心肌细胞;心肌细胞动脉血管周围少量慢炎性细胞浸润,并可见散在少量纤维结缔组织。与模型组比较降糖消渴颗粒组与吡格列酮组的心肌组织病理改变有所改善,具体表现为脂肪变性减少,心肌间隙变窄,炎性细胞浸润减轻,心肌轻度变性缓解。见图 2。

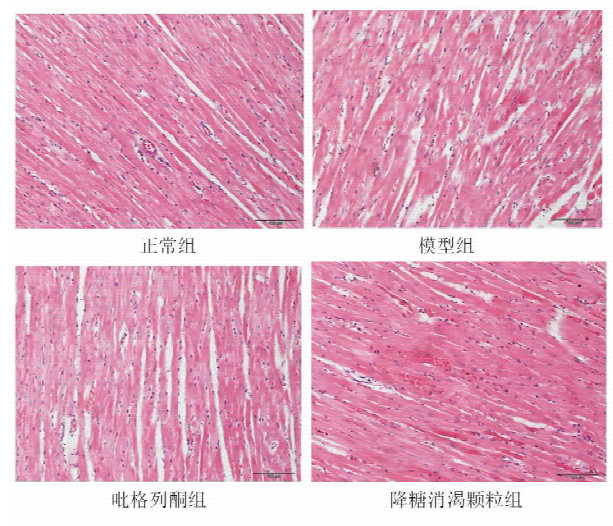


图 2 各组大鼠左室心肌组织 HE 染色

2.3 各组大鼠心肌 MEK1/2 的比较 与正常组比较,模型组大鼠心肌组织 MEK1/2 蛋白表达量明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),吡格列酮与降糖消渴颗粒给药 4 周后能够降低 MEK1/2 蛋白表达量,但与模型组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3。

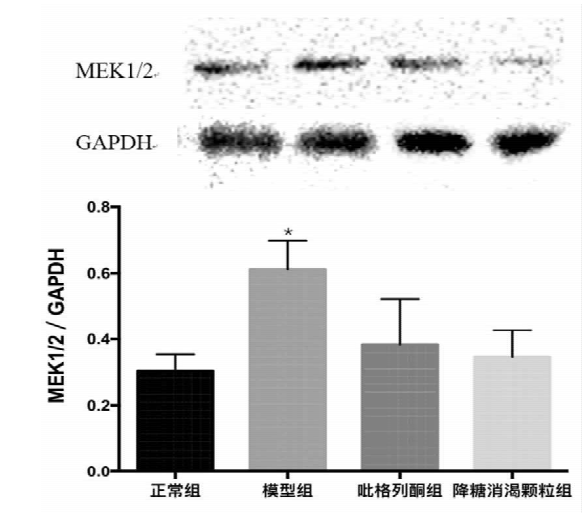


图 3 各组大鼠心肌 MEK2/MEK1 蛋白的表达情况

注:与正常组比较,* $P < 0.05$

2.4 各组大鼠心肌 p38 MAPK,p-p38 MAPK 蛋白的比较 与正常组比较,模型组大鼠心肌 p38 MAPK,

p-p38 MAPK 蛋白表达量明显升高,组间差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,吡格列酮组与降糖消渴颗粒组大鼠心肌 p38 MAPK,p-p38 MAPK 蛋白表达量均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。p-p38 MAPK/p38 MAPK 结果显示,糖尿病大鼠心肌组织内 p38 MAPK 磷酸化程度明显升高,说明糖尿病心肌组织 p38 MAPK 激活,诱导心肌细胞凋亡,降糖消渴颗粒能够减少 p38 MAPK 的磷酸化水平,抑制 p38 MAPK 活性,从而对糖尿病心肌损伤起到保护作用。见图 4。

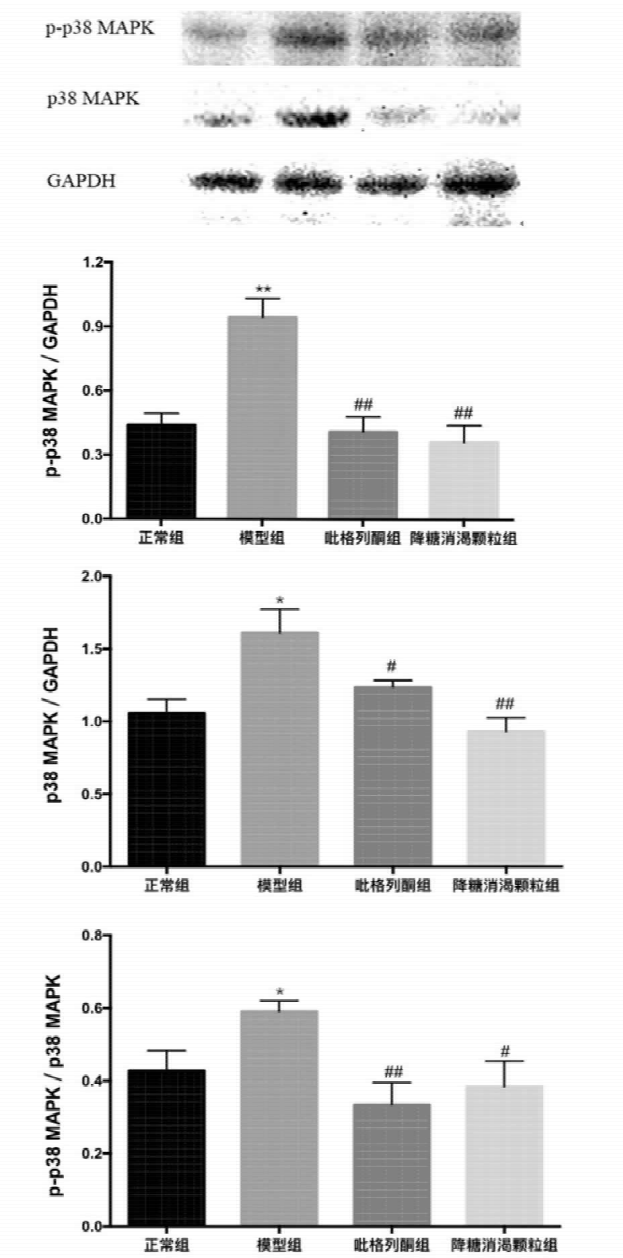


图 4 各组大鼠心肌 p38 MAPK,p-p38 MAPK 蛋白的表达情况

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

3 讨论

DCM 是作为独立于冠心病、高血压等的一类特异性心脏病,与糖尿病时高血糖及胰岛素抵抗状态密切相关^[9],其发病机制复杂,包括氧化应激和炎症反应的异常造成的心肌细胞凋亡或心肌间质纤维化等心脏结构的损伤;微血管病变等心肌组织微循环的改变;心肌细胞物质和能量代谢障碍等^[10]。临床上早期以左心室舒张功能障碍,晚期以收缩功能障碍为主,可诱发心力衰竭、心源性休克和猝死^[11]。DCM 病理改变及临床特点的特异性决定了能够降血糖,改善胰岛素抵抗的药物具有潜在的治疗 DCM 的作用。我们前期研究发现,基于肝脾肾同调治疗糖尿病的复方降糖消渴颗粒显示了良好的抗糖尿病的作用,为其在干预和治疗 DCM 方面奠定了良好的基础。本研究应用高脂饮食联合 STZ 诱导实验性糖尿病大鼠模型,结果证实降糖消渴颗粒具有减轻大鼠心脏重量指数,改善局灶性心肌细胞凋亡坏死,并减轻慢性炎细胞浸润,减轻心肌间质纤维化的作用,与文献报道类似^[12]。

MAPK 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其激活途径为三级酶促级联反应。其中 p38MAPK 是 MAPK 通路中重要的信号转导分子,广泛参与多种细胞功能的调控,是细胞信号传递的交汇点。与上述 DCM 的主要病理机制中的氧化应激、炎症反应及心肌细胞凋亡有着密不可分的关系^[13-14]。有文献报道糖尿病时诸多因素如高血糖、胰岛素抵抗、高胰岛素血症、氧化应激、炎症反应和细胞因子等都可以诱导 p38MAPK 的活化,激活的 p38MAPK 通路启动线粒体凋亡途径造成糖尿病心肌损伤^[15]。有研究显示在千金藤素导致的凋亡的心肌细胞中,p38 MAPK 磷酸化水平增强。此外,p38MAPK 亦可通过影响单核-巨噬细胞、血管内皮细胞和血管平滑肌细胞等参与 DCM 微血管病变^[10],从而导致心肌纤维化、左心室肥大、左心室收缩及舒张功能减退。

许多药物可通过下调 p38MAPK 抑制心肌细胞凋亡及心室重塑^[16-17]。本研究显示高血糖状态下,p38MAPK 总蛋白表达升高,磷酸化 p38MAPK 蛋白增加,提示糖尿病时 p38MAPK 信号通路激活,p38MAPK 上游蛋白 MEK1/2 亦有增加的趋势,降糖消渴颗粒能够减少 p38MAPK 总蛋白的表达,同时降低了 p38MAPK 磷酸化程度,抑制 p38MAPK 的激活,阻断了 p38MAPK 信号途径,从而发挥了对心肌细胞的保护作用。总之,降糖消渴颗粒对糖尿病大鼠的心脏具有一定的保护作用,这可能与抑制心肌组织

p38MAPK 信号通路有关,该实验结果为研发早期防治 DCM 的药物提供了实验依据。

参考文献

- [1] Chavali V, Tyagi SC, Mishra PK. Predictors and prevention of diabetic cardiomyopathy[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2013, 6: 151-160.
- [2] Varga ZV, Gircic Z, Liaudet L, et al. Interplay of oxidative, nitrosative/nitrative stress, inflammation, cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(2): 232-242.
- [3] Westermeier F, Riquelme JA, Pavez M, et al. New Molecular Insights of Insulin in Diabetic Cardiomyopathy[J]. *Front Physiol*, 2016, 7: 125.
- [4] Wang S, Ding L, Ji H, et al. The Role of p38 MAPK in the Development of Diabetic Cardiomyopathy[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7): 1037.
- [5] 赵丹丹, 高思华, 穆倩倩, 等. 肝脾肾同调辨治 2 型糖尿病的理论依据与特色[J]. *中医杂志*, 2014, 55(3): 205-208.
- [6] 高思华, 龚燕冰, 倪青, 等. 肝脾肾同治法辨证治疗 2 型糖尿病的临床研究[J]. *中华中医药杂志*, 2009, 24(8): 1007-1010.
- [7] Zhao DD, Yu N, Li XK, et al. Antidiabetic and antioxidative effect of jiang tang xiao ke granule in high-fat diet and low-dose streptozotocin induced diabetic rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 475192.
- [8] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版, 2006: 605.
- [9] Felicio JS, Koury CC, Carvalho CT, et al. Present Insights on Cardiomyopathy in Diabetic Patients[J]. *Curr Diabetes Rev*, 2016, 12(4): 384-395.
- [10] Bugger H, Abel ED. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy[J]. *Diabetologia*, 2014, 57(4): 660-671.
- [11] Dhalla NS, Takeda N, Rodriguez-Leyva D, et al. Mechanisms of subcellular remodeling in heart failure due to diabetes[J]. *Heart Fail Rev*, 2014, 19(1): 87-99.
- [12] 王小梅, 穆长征, 赵田田, 等. 通心络对糖尿病大鼠心脏功能及心肌超微结构的影响[J]. *中成药*, 2010, 32(12): 2167-2170.
- [13] Oh CC, Nguy MQ, Schwenke DC, et al. p38 α mitogen-activated kinase mediates cardiomyocyte apoptosis induced by palmitate[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(1): 628-33.
- [14] Ruiz M, Coderre L, Lachance D, et al. MK2 Deletion in Mice Prevents Diabetes-Induced Perturbations in Lipid Metabolism and Cardiac Dysfunction[J]. *Diabetes*, 2016, 65(2): 381-92.
- [15] 徐天娇, 刘勇, 邓雅婷, 等. 胰岛素联合硒抑制糖尿病心肌病大鼠 p38MAPK/CBP 通路减少心肌细胞凋亡[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32(7): 926-930, 935.
- [16] Li J, Peng L, Du H, et al. The Protective Effect of Beraprost Sodium on Diabetic Cardiomyopathy through the Inhibition of the p38 MAPK Signaling Pathway in High-Fat-Induced SD Rats[J]. *Int J Endocrinol*, 2014, 2014: 901437.
- [17] 杨翼鹰, 陈伟燕, 孙秀亭, 等. 麝香保心丸通过抑制 p38MAPK 和 NF- κ B 信号传导通路表达对抗高糖诱导的心肌细胞损伤[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2016, 34(5): 517-522.