

黄芪注射液与葛根素注射液联用对 2 型糖尿病小鼠心脏损害的干预作用

李奕萱¹ 王岩飞² 李姝玉¹ 刘朝霞³ 张 达¹ 赵福建¹ 张淑静¹ 高誉珊¹ 赵淑英¹ 王 谦¹

(1 北京中医药大学中医学院,北京,100029; 2 北京京北职业技术学院,北京,101400; 3 中国航天员科研训练中心,北京,100094)

摘要 目的:观察黄芪注射液与葛根素注射液合用对糖尿病心脏损害的干预作用。方法:选取 60 只 KKA^y 雄性小鼠,以高脂饲料饲养建立的 2 型糖尿病(T2DM)小鼠模型,将 30 只 C57BL/6J 雄性小鼠作为其正常对照组。用高脂饲料饲养 4 周后(即 12 周龄时)把随机血糖 ≥ 13.9 mmol/L 的小鼠随机分为观察组和模型组,分别注射黄芪注射液与葛根素注射液或等量生理盐水,给药 8 周、12 周及 16 周后分批次处理小鼠,观察小鼠一般体征,检测其血液生化指标,观察心肌组织形态并运用 TUNEL 法检测细胞凋亡水平。结果:黄芪注射液与葛根素注射液联用能够改善 2 型糖尿病小鼠精神不佳,尿量增多,毛发欠光泽,肥胖等各种情况,对给药 6 周和给药 12 周糖尿病小鼠能显著降低其空腹血糖及血脂($P < 0.05$),减少心肌细胞凋亡,改善心肌组织纤维化,但是给药 16 周效果不明显。结论:黄芪注射液与葛根素注射液联合使用能够使 2 型糖尿病小鼠的一般状态得到显著改善,对模型小鼠的高血糖和高血脂有降低作用,可抑制心肌细胞凋亡并减轻心脏纤维化。

关键词 黄芪注射液;葛根素注射液;糖尿病;心脏损害;KKA^y 小鼠

Effects of Astragalus Injection Conjunction with Puerarin Injection on Cardiac Injury in Mice with Type 2 Diabetes Mellitus

Li Yixuan¹, Wang Yanfei², Li Shuyu¹, Liu Zhaoxia³, Zhang Da¹, Zhao Fujian¹,
Zhang Shujing¹, Gao Yushan¹, Zhao Shuying¹, Wang Qian¹

(1 School of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2 Northern Beijing Vocational Education Institute, Beijing 101400, China; 3 China Astronaut Research and Training Center, Beijing 100094, China)

Abstract Objective: To observe the effects of astragalus injection combined with puerarin injection on diabetic heart damage, and to lay a foundation for further study of its mechanism. **Methods:** Male KKA^y mice ($n = 60$) were fed with high fat diet to establish type 2 diabetes mellitus. Male C57BL/6J mice ($n = 30$) with the same age were included into normal group. Mice with 12 weeks of age were randomly divided into treatment group and model group. The KKA^y mice were injected with astragalus injection and puerarin injection or the same amount of normal saline. After feeding at 8th, 12th and 16th weeks, the general signs of mice were observed to detect the levels of the fasting blood glucose (FBG), serum triglyceride (TG), and total cholesterol (TCHO). The morphological myocardial tissue was observed, and TUNEL method was used to detect the level of apoptosis. **Results:** Astragalus injection combined with puerarin injection could improve the symptoms of type 2 diabetes mellitus, slow activity, significant increase in urine output, lack of luster of body hair, body fat and other symptoms. After 6 weeks and 12 weeks treatment, it can significantly reduce FBG, TG and TCHO ($P < 0.05$), reduce myocardial cell apoptosis, improve myocardial fibrosis, but 16 weeks treatment was not significantly effective. **Conclusion:** The use of astragalus injection and puerarin injection can significantly improve the general state of type 2 diabetic mice, reduce FBG, TG and TCHO, inhibit myocardial cell apoptosis and reduce cardiac fibrosis.

Key Words Astragalus injection; Puerarin injection; Diabetic cardiac injury; Diabetic heart injury; KKA^y mice

中图分类号:R289.5;R287.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.04.037

糖尿病患者持续的高血糖状态会引起非常严重的心血管、眼、肾及神经系统病变。其中糖尿病心血管病变是糖尿病最常见的致死和致残原因。糖尿病心脏病(Diabetic Cardiopathy, DC)主要包括心绞痛、

心肌梗死、卒中、周围动脉疾病和充血性心力衰竭^[1]。研究表明,糖尿病早期便出现心肌纤维肥大。同时心肌纤维间发生过碘酸希夫反应(PAS)阳性物质沉积,心肌纤维局灶性片状坏死,心脏毛细血管基

基金项目:北京高等学校青年英才计划(YETP0794);北京中医药大学创新团队项目(2011-CXD-04)

作者简介:李奕萱(1992.12—),女,在读硕士研究生,研究方向:中医药治疗糖尿病合并症的机理研究, E-mail:liyixuan@bucm.edu.cn

通信作者:王谦(1970.02—),女,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:中医药治疗糖尿病合并症的机理研究, E-mail:wangqian@bucm.edu.cn

膜增厚。而冠状动脉的病变的出现晚于心脏微血管病变^[2]。因此,关注糖尿病心肌纤维化对于防治糖尿病心血管并发症有着尤为重要的意义。

黄芪以及葛根是治疗糖尿病及其并发症的常用药物,被广泛应用于临床。中医认为黄芪补气活血,葛根生津升阳。两药相合,相辅相成,共奏益气活血、养阴生津之功,多应用于证属气阴两虚之糖尿病。本研究通过观察黄芪注射液与葛根素注射液联用对 KKA^y 不同周龄糖尿病小鼠一般情况、心肌组织形态学的影响及心肌细胞的凋亡水平,研究其对糖尿病心脏损害的干预作用,为临床提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 C57BL/6J 小鼠 30 只,KKA^y 小鼠 60 只,均为 SPF 级,许可证编号均为 SCXK(京)2013-0002,雄性,8 周龄,实验小鼠的体重均为 22~25 g,购于中国医学科学院实验动物研究所。

实验过程中,动物自由饮水,KKA^y 小鼠给予高脂饲料(其成分为 0.5% 胆酸钠 + 20% 蔗糖 + 2.5% 胆固醇 + 67% 基础饲料 + 10% 猪油),C57BL/6J 小鼠给予普通饲料。实验动物均饲养于中日友好医院实验动物中心屏障系统。

1.1.2 药物 黄芪注射液于成都地奥九泓制药厂订购(批号 1404163)。葛根素注射液于湖南五洲通药业有限责任公司订购(批号 1009056)。4% 多聚甲醛于北京普博欣生物科技有限公司订购,分析纯二甲苯、分析纯无水乙醇均于北京化学工业集团有限公司订购,PBS 于中杉金桥生物技术有限公司(北京)订购,Masson 试剂盒(批号:20150602)、TUNEL 凋亡试剂盒(批号:20150815)购自凯基生物技术股份有限公司(江苏)。

1.1.3 试剂与仪器 拜耳拜安捷 2 血糖测量仪(1455)及其配套血糖试纸(1481)产自德国拜尔,全自动生化分析仪(美国贝克曼公司,型号:AU5421),莱卡包埋机(EG1140H)、莱卡切片机(RM2135),光学显微镜(IMT-2)购自日本 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 本研究分为正常组(30 只)、模型组(30 只)以及观察组(30 只)。将购进的 8 周鼠龄的小鼠用不同的饲料饲喂。其中,正常组为普通饲料喂养的 C57BL/6J 小鼠。KKA^y 小鼠用高脂饲料喂养至 12 周龄,测定其随机血糖,将血糖 ≥ 13.9 mmol/L 的小鼠随机分为模型组和观察组。

观察组和模型组小鼠在实验过程中一直给予高脂饲料。

1.2.2 给药方法 正常组及模型组的小鼠每日均给予腹腔注射生理盐水 4.3 mL/kg。观察组小鼠先后注射黄芪注射液以及葛根素注射液(分别为 3 mL/kg、1.3 mL/kg)。以上各组小鼠均单独饲养,自由饮水、饮食,每日更换垫料,分别于给药 8、12、16 周后分批处理动物,检测其指标。在其被处死前,每周均检测空腹血糖,监测小鼠是否一直处于高血糖的水平。

1.2.3 检测指标与方法 1) 血液生化指标检测:小鼠分别在给药 8、12、16 周后,于空腹状态下摘眼球取血 1 mL,离心取血清,检测空腹血糖(FBG)、总胆固醇(TC)以及三酰甘油(TG)。2) HE 染色与 Masson 染色形态学观察:动物处死后取材,剪下心脏组织,石蜡包埋后分别进行 HE 染色以及 Masson 染色,在光学显微镜下观察。3) TUNEL 法检测心肌细胞凋亡:将处理好的石蜡切片按照 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行实验操作,光学显微镜下观察。

1.3 统计学方法 实验数据以 SPSS 20.0 统计软件采用单因素方差分析进行处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示。对各组数据进行正态性检验,各组均呈正态且方差齐时,用单因素方差分析(F 检验),同时做 LSD 两两比较;任意一组数据非正态或方差不齐时做 Kruskal-Wallis H 检验(H 检验),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组一般情况比较 与正常组比较,模型组与观察组均出现精神不佳的表现,其行动缓慢,肥胖体型,体毛欠光泽,尿量变多,且随着周龄的增加而加重。观察组与模型组比较,发现以上各种情况均得到一定程度的改善。

2.2 3 组血液生化指标比较 在小鼠给药 8、12、16 周后,模型组的 FBG、TG 及 TC 均高于正常组,且差异有统计学意义($P < 0.05$);同时观察组与模型组比较,给药 8、12 周时指标明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。给药 16 周差异不明显。见表 1~3。

表 1 3 组给药 8 周后 FBG、TC 和 TG 比较($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	FBG	TC	TG
正常组($n=8$)	4.60 $\pm$ 0.82	0.41 $\pm$ 0.05	1.89 $\pm$ 0.20
模型组($n=6$)	34.87 $\pm$ 3.81 *	4.97 $\pm$ 0.57 *	3.41 $\pm$ 0.30 *
观察组($n=6$)	17.28 $\pm$ 11.00 * Δ	3.44 $\pm$ 0.52 * Δ	1.54 $\pm$ 1.06 Δ

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

表2 3组给药12周后FBG、TC和TG比较($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	FBG	TC	TG
正常组(n=8)	4.00 ± 1.22	0.55 ± 0.11	1.86 ± 0.17
模型组(n=9)	27.88 ± 9.15 *	2.79 ± 0.95 *	3.18 ± 0.80 *
观察组(n=9)	14.30 ± 5.52 *△	1.39 ± 1.15 △	1.99 ± 1.01

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

表3 3组给药16周后FBG、TC和TG比较($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	FBG	TC	TG
正常组(n=8)	3.50 ± 1.23	0.40 ± 0.20	1.83 ± 0.13
模型组(n=9)	16.89 ± 8.59 *	1.32 ± 0.48 *	3.02 ± 0.61 *
观察组(n=9)	14.73 ± 3.02 *	0.98 ± 0.45	2.73 ± 0.84 *

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

2.3 心肌形态变化的观察 HE 染色, 正常组小鼠的心肌细胞结构正常。模型组的心肌细胞出现轻度萎缩、少许细胞有胞质溶解, 甚至出现坏死。观察组的心肌细胞较模型组有一定程度的改善。给药12周后其心肌组织 HE 染色见图1。

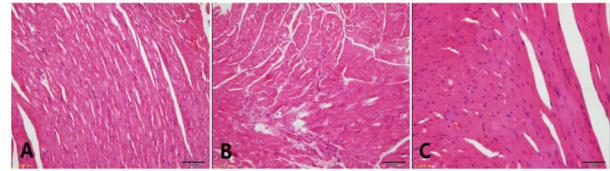


图1 3组给药12周后其心肌组织(HE染色, ×40)

注:A:正常组,B:模型组,C:观察组

Masson 染色, 正常组小鼠的心肌细胞间出现少许胶原。模型组小鼠的心肌细胞间基质却产生较多的胶原堆积。观察组的胶原堆积与模型组比较明显减少。给药12周后其心肌组织见图2。

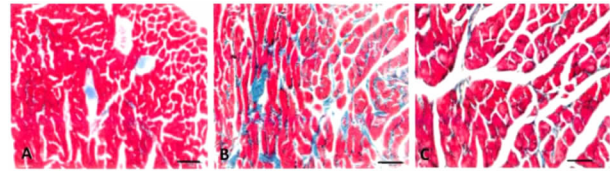


图2 3组给药12周后其心肌组织(Masson染色, ×40)

注:A:正常组,B:模型组,C:观察组

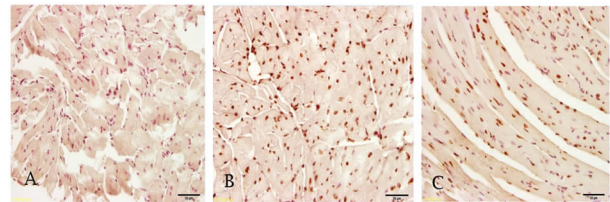


图3 给药12周后其心肌组织细胞凋亡水平(TUNEL, ×40)

注:A:正常组,B:模型组,C:观察组

2.4 细胞凋亡水平的检测 以 TUNEL 法来测细胞凋亡水平, 表明正常组的心肌细胞有少量细胞凋亡, 相比之下模型组小鼠的心肌细胞凋亡明显增强。观

察组与模型组比较凋亡有所减轻。给药12周后其心肌组织细胞凋亡水平见图3。

3 讨论

糖尿病心脏损伤在中医上无专属病名, 可归属为“消渴”引发的“心悸”“胸痹”等症。由于糖尿病日久及心, 阴虚燥热而耗伤津液, 气血阴阳亏虚致使心神失养, 心脉痹阻, 发为本病, 病性为本虚标实, 同时可能伴随虚实夹杂的情况。中医辨证分型中主要有气虚、阴虚内热、瘀血闭阻等证型, 其中气阴两虚最为常见^[3]。

《神农本草经》中曾论述到:“药有阴阳配合, 子母兄弟”。“七情”理论亦强调药物之间各种相互关系能够对组方产生深远的影响。其中, 黄芪与葛根作为治疗气阴两虚型糖尿病的常用药物被广泛应用^[3-4]。黄芪其味甘, 性微温, 可补脾肺元气而升清阳。药理研究证明, 黄芪能够扩张血管、降低血压, 对抗肾上腺素作用, 同时具有利尿作用; 葛根其味甘而辛, 性平, 可升清阳, 鼓舞胃气上行并生津。药理研究发现, 葛根对脑及冠状动脉血流量的流通具有积极的作用, 对由心肌缺血(主要为垂体后叶素所引发)具有一定的治疗作用。黄芪与葛根相合, 相辅相成, 从而能够共奏补气活血、养阴生津之效^[5]。

我们从临床疗效观察及动物基础实验中均已证实, 心肌功能的损伤在糖尿病早期阶段已经出现^[6-7]。Baynes 和 Murray^[8] 也认为糖尿病心肌病早期阶段便发生了左心室肥大, 心肌纤维化, 从而导致心脏收缩和舒张功能的增加, 心肌顺应性降低, 心律不齐等, 最终可诱发心力衰竭。Heaberlin 等^[9] 研究表明, KKA^y 小鼠诱发糖尿病后通过改善心脏功能能够显著降低死亡率。而更为重要的是, 糖尿病心肌损害的关键始动因素之一即为高血糖。持续高水平的血糖与心肌纤维化的严重程度成正相关, 其通过心脏成纤维细胞刺激转化生长因子的过表达导致纤维组织沉积以及细胞外基质的合成增多。同时我们发现, 心肌纤维化的发生亦与心肌细胞凋亡的关系密切。在内质网应激条件下, 心肌细胞凋亡相关的多条通路被激活, 从而促使心肌重构, 心肌纤维化形成^[10]。因此, 本研究通过对比观察中药作用后不同组别的血清生化指标、心肌组织形态学变化以及心肌细胞凋亡水平的差别, 探讨这两药对糖尿病心脏损害的干预作用。

黄芪注射液, 为黄芪提取物处理的水溶液(生药量为 0.5 mL/g), 其成分包含氨基酸、皂苷、多糖、黄酮以及微量元素等。葛根素注射液, 为葛根提取物

处理的水溶液(生药量为 0.02 mL/mg),其化学成分主要是葛根黄酮。实验研究证明,黄芪注射液与葛根素注射液联用对慢性心力衰竭及心肌炎具有显著的治疗作用,能够降低血糖并有利于心肌重构^[11]。而本课题组前期实验结果中得知,单独运用黄芪注射液或葛根素注射液或两药联用,均对 KKA^y 糖尿病小鼠的肾脏、肝脏及脑血管具有保护作用^[12-14]。同时我们已研究发现,单用葛根素便可使 KKA^y 糖尿病小鼠心肌细胞凋亡得到抑制^[15]。为了进一步明确两药联用是否对心脏具有保护作用并进行机制探索,我们进行了一系列生化指标的检测以及组织形态学检测。

研究发现,糖尿病小鼠给药 8 周和给药 12 周时,2 药联用能够显著改善空腹血糖、血脂和胆固醇水平,但在给药 16 周时效果不明显,其原因还需继续深入探讨。通过组织形态学研究发现,模型组心肌细胞外基质中有大量胶原纤维堆积,细胞发生萎缩、坏死,而观察组胶原纤维与模型组比较有明显减少,细胞凋亡减少。因此可以得出结论,两药联用能够降低血糖,改善心肌纤维化,减少细胞凋亡,对心脏具有保护作用。其进一步的作用机制可能与内质网应激等有关,需要进一步深入探讨。

参考文献

- [1] Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2017, 128: 40-50.
- [2] 杨晓晖. 中医药防治糖尿病心脏并发症的体会与展望[J]. 北京中医药, 2010, 29(12): 912-913.
- [3] 王超玲, 文颖娟. 糖尿病心肌病中医药研究进展[J]. 现代中医药, 2016, 38(1): 95-98.
- [4] 倪青, 汪升惹, 黄静. 益气活血中药对糖尿病心肌病大鼠心肌细胞

凋亡的影响[J]. 北京中医药, 2016, 35(6): 560-563.

- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015 年版一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 302.
- [6] Aydemir M, Ozturk N, Dogan S, et al. Sodium tungstate administration ameliorated diabetes-induced electrical and contractile remodeling of rat heart without normalization of hyperglycemia[J]. Biol Trace Elem Res, 2012, 148(2): 216-223.
- [7] Cavender MA, Steg PG, Smith SC, et al. Impact of Diabetes Mellitus on Hospitalization for Heart Failure, Cardiovascular Events, and Death: Outcomes at 4 Years From the Reduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry[J]. Circulation, 2015, 132(10): 923-31.
- [8] Baynes J, Murray DB. Cardiac and renal function are progressively impaired with aging in Zucker diabetic fatty type II diabetic rats[J]. Oxid Med Cell Longev, 2009, 2(5): 328-334.
- [9] Heaberlin JR, Ma Y, Zhang J, et al. Obese and diabetic KKA^y mice show increased mortality but improved cardiac function following myocardial infarction[J]. Cardiovasc Pathol, 2013, 22(6): 481-487.
- [10] 杨琼, 吴永全. 内质网应激与糖尿病心肌纤维化[J]. 心脏杂志, 2014, 26(1): 91-93.
- [11] 祁佳, 唐跃年, 张宇锋, 等. 葛根素注射液联合黄芪注射液治疗病毒性心肌炎随机对照临床研究 Meta 分析[J]. 中医药导报, 2016, 22(5): 107-109, 113.
- [12] 张达, 李姝玉, 王岩飞, 等. 黄芪与葛根素联用对 KKA^y 小鼠肾脏内质网应激相关 PERK 通路的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(1): 166-169, 173.
- [13] 崔蕾, 李姝玉, 柴新楼, 等. 黄芪和葛根素对 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠肝损害干预的实验研究[J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(3): 189-193, 218.
- [14] 王岩飞, 李姝玉, 张达, 等. 黄芪注射液对 KKA^y 小鼠肾小管上皮细胞转分化的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(10): 694-697.
- [15] 娄金丽, 王谦, 郝然, 等. KKA^y 糖尿病鼠心肌损伤及葛根素的干预作用[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(1): 59-63.

(2017-07-17 收稿 责任编辑: 杨觉雄)