

·方药研究·

加味生脉补心丹对防治2型糖尿病大鼠心肌损害的影响

陈青扬,黄惠勇*,刘卜菡,曾光,潘继兴
(湖南中医药大学中医诊断,湖南长沙410208)

[摘要] **目的** 观察加味生脉补心丹对2型糖尿病大鼠模型血糖及心肌组织结构的影响,初步探讨加味生脉补心丹对糖尿病心肌纤维化和肥大的防治作用。**方法** 40只SD大鼠随机分为空白组7只,实验组33只,通过高糖高脂饲料+小剂量STZ构建2型糖尿病大鼠模型。将成模后的实验组大鼠随机分为模型组、补心丹(BXD)组和罗格列酮(RSG)组各11只,BXD组以浓缩后加味生脉补心丹汤剂灌胃;RSG组按照罗格列酮钠溶液灌胃。给药8周后测各组大鼠空腹血糖,并处死取材,光镜观察心肌组织变化,Masson染色观察纤维沉积情况,免疫组化法观察I、Ⅲ型胶原蛋白和沉默信息调节因子3(Sirt3)蛋白的表达。**结果** 成模时各实验组空腹血糖(FPG)均较空白组升高($P<0.05$),造模成功。治疗完成时,RSG组、BXD组FPG均较模型组下降($P<0.05$),RSG组FPG较BXD组更低($P<0.05$)。模型组心肌组织破坏严重,胶原纤维含量增多,RSG组和BXD组心肌组织破坏程度较轻,胶原纤维含量较少。模型组I、Ⅲ型胶原和Sirt3的表达明显高于其他组($P<0.05$)。BXD组Ⅲ型胶原的表达明显高于空白组($P<0.05$)。RSG组Sirt3的表达显著高于BXD组($P<0.05$)。**结论** 加味生脉补心丹能够明显降低2型糖尿病大鼠的血糖,并能够明显减轻心肌纤维化、肥大的程度,延缓糖尿病所致心肌病的进程。

[关键词] 加味生脉补心丹;2型糖尿病;I型胶原蛋白;Ⅲ型胶原蛋白;沉默信息调节因子3;心肌损害;太子参;黄芪
[中图分类号]R285.5;R587.1 **[文献标识码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.03.002

Therapeutic Effect of Modified Shengmai Buxin Pills on the Myocardial Damage in Type 2 Diabetes Rats

CHEN Qingyang, HUANG Huiyong*, LIU Bohan, ZENG Guang, PAN Jixing
(Institute of TCM Diagnosis, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of modified Shengmai Buxin pills on the FPG and myocardial structure in type 2 diabetes rats, and preliminary investigate the therapeutic effect on myocardial fibrosis and hypertrophy. **Methods** 40 SD rats were randomly distributed into the blank group with 7 rats and experimental group with 33 rats. The type 2 diabetes models were established by feeding the animals with high-fat and high-sucrose diet. The established model rats in experimental group were randomly divided into the model group, Buxindan group (BXD) and rosiglitazone group (RSG) group, 11 rats in each group. The BXD group was given concentrated modified Shengmai Buxindan decoction by gavage and the RSG group was with rosiglitazone sodium. After 8 weeks, FPG of rats was measured and excuted for heart sample. The changes of myocardial tissue were observed. The fibrous deposition was observed by masson method. The expression of collagen I/III and silent information regulator-3 (Sirt3) was determined by immunohistochemical method. **Results** The FPG of experimental group was higher than normal group ($P<0.05$). The FPG of RSG group and BXD group was higher than model group ($P<0.05$). The FPG of RSG group was lower than BXD group ($P<0.05$). The myocardial structure of model group was severely damaged and collagen fiber content increased obviously. The damage of the myocardial structure was slighter and the content of collagen was lower in RSG group and BXD group. Compared with the model group, the expression level of collagen I/III and SIRT3 were decreased significantly ($P<0.05$) in the other groups. Compared with the normal group, the expression level of collagen III was increased significantly ($P<0.05$) in the BXD group. The expression level of Sirt3 in RSG group was increased significantly than the RSG group ($P<0.05$). **Conclusion** The modified Shengmai Buxin pills can significantly decrease the level of blood sugar in type 2 diabetes rats. It can alleviate the degree of myocardial fibrosis and hypertrophy, and delay the progression of diabetic cardiomyopathy.

[Keywords] modified Shengmai Buxin pills; type 2 diabetes; collagen I; collagen III; silent information regulator-3; myocardial damage; Radix Pseudostellariae; *Astragalus membranaceus*

[收稿日期]2015-12-17

[基金项目]国家自然科学基金(81373551);教育部博士点博士导师基金(2013432311001);湖南省科技厅重点项目(S2014S2032);中医诊断国家重点学科开放基金(2013ZYD04,2013ZYD27,2014ZYD05,2014ZYD28)

[作者简介]陈青扬,男,在读硕士研究生,研究方向:心血管疾病的中医辨治。

[通讯作者]黄惠勇,男,教授,博士研究生导师,E-mail:tony27000@aliyun.com。

2型糖尿病是一种以胰岛素抵抗为主的有多种并发症的代谢性疾病,其中糖尿病心肌病是其重要并发症之一,临床表现以左室舒张(或)收缩功能障碍为主。心肌纤维化是糖尿病心肌病的重要特征性病理改变,随着病情的进展会导致心功能减退、心脏扩大和各种心律失常。研究认为,胶原纤维的大量沉积是糖尿病心肌病心肌纤维化的重要致病因素^[1]。胶原纤维在心肌细胞外基质的大量沉积将增加心室壁的僵硬程度,减低心室的顺应性从而导致心室的收缩与舒张功能不全。沉默信息调节因子3(Sirt3)能够保护心肌细胞减少由于氧化应激导致的损伤,从而延缓心肌肥厚导致的心功能恶化的进程^[2-3]。本文通过建立2型糖尿病大鼠模型,观察大鼠心肌组织的病理改变、Masson染色改变以及I、III型胶原与Sirt3蛋白表达水平的改变,探讨加味生脉补心丹在早期治疗2型糖尿病的同时,对心肌组织的保护作用 and 预防作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康雄性SPF级SD大鼠,5周龄,40只,体质量(150±20)g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号:SCKX(湘)2011-0003。

1.1.2 饲料配方 普通饲料:由湖南中医药大学实验动物中心提供。供给空白组。高糖高脂饲料配方如下:蔗糖15%,胆固醇4%,胆酸钠0.3%,猪油10%,蛋黄粉10%,基础膳食60.7%,混合、搅拌均匀,加水适量,塑形,烤箱烘干,由湖南中医药大学实验动物中心加工。供给除空白组外的其他组。

1.1.3 药物 加味生脉补心丹:方剂来源于《内外伤辨惑论》卷中方和《摄生秘剖》卷一方加减:太子参10g,丹参15g,生地黄15g,天花粉12g,黄芪20g,茯苓8g,炙甘草6g。饮片均购自湖南中医药大学第一附属医院,加水煎煮2次,合并煎液,分别离心过滤,浓缩至含生药2g/mL,灭菌后于4℃冰箱保存备用。罗格列酮钠片,规格4mg/片,太极集团重庆涪陵制药厂有限公司。取罗格列酮研碎成粉末,溶于双蒸水中。

1.1.4 主要试剂 二步法试剂盒(中山金桥有限公司),DAB试剂盒(中山金桥有限公司),Collagen I一抗(CST公司,货号:14695-AP),Collagen III一抗(Proteintech公司,货号:135548-1-AP),Sirt3一抗(Abcam公司,货号:10099-1-AP)。

1.1.5 主要仪器 三诺安准血糖仪(长沙三诺生物

传感技术有限公司,批号:20131215),安准血糖试纸(长沙三诺生物传感技术有限公司,批号:3313EE),Forma900超低温冰箱(赛默飞世尔科技有限公司),Y3002型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),Image-Pro Plus图像分析软件。

1.2 方法

1.2.1 造模 根据国内外常用2型糖尿病大鼠制备方法,即高糖高脂饲料+小剂量STZ诱导法改良的高糖高脂饲料+小剂量STZ体质量联合体表面积法构建2型糖尿病大鼠模型^[4]。将40只SD大鼠随机分为7只空白组,33只实验组,空白组给予普通饲料,实验组予以高糖高脂饲料。所有大鼠均饲养于在自由饮食、分笼饲养,自由饮水饮食,温度(20±3)℃、背景噪音为(40±10)db、光/暗周期为12h/12h的条件下。喂养4周后,从第5周开始实验组以mg/(kg+m²)法计算出的剂量腹腔注射STZ:体质量≤200g的部分:按25mg/kg计算STZ量;体质量>200g部分:按162.45mg/m²[体表面积=大鼠体型系数(0.09)×体质量^{2/3}]计算,二者相加即为1次STZ的注射剂量。间隔2d后,再予以同样的方法注射STZ。空白组则给予2次腹腔注射等容积的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。最后一次注射STZ后的第6d,禁食12h尾端测空腹血糖,以2次空腹血糖>11.1mmol/L为2型糖尿病大鼠成模标准。

1.2.2 分组 将造模成功的33只实验组大鼠随机分为:模型对照组(简称模型组)11只,罗格列酮钠组(简称RSG组)11只,加味生脉补心丹组(简称BXD组)11只。

1.2.3 动物给药 造模成功后第2天,BXD组以浓缩后加味生脉补心丹汤剂10mL/(kg·d)灌胃,相当于20g/(kg·d)生药;RSG组按照罗格列酮钠溶液10mL/(kg·d)予以灌胃。空白组和模型组每天以相同体积的生理盐水灌胃。每天灌胃给药1次,时间为9:00~11:00a.m,持续给药8周。

1.3 标本收集与指标检测

1.3.1 外观表征 实验期间观察并记录造模中各组大鼠体质量、进食量、尿量、毛发情况、活动及精神状态、垫料、大便等一般指标。

1.3.2 空腹血糖检测 最后一次注射STZ后的第6d,各组大鼠禁食12h后,在非麻醉情况下剪尾取血测空腹血糖值,观察药物对大鼠空腹血糖的影响。

1.3.3 心肌组织光镜观察 各组大鼠,隔夜禁食12h后称重,分别进行断尾采血,即时测定空腹血

糖并予以记录。随后各组大鼠被腹腔注射 10%水合氯醛(3 mL/kg)以麻醉。麻醉成功后,快速打开胸腔切除心脏,去除包膜,剪取心肌组织置于 4%多聚甲醛溶液中固定 48 h,经过脱水、包埋,制成切片,分别进行 HE 和 Masson 染色处理。封片后于光镜下观察心肌组织病理形态学改变及胶原沉积情况。

1.3.4 检测胶原蛋白 I、III 与 Sirt3 的表达 将心肌组织切片通过免疫组化法分别作 I、III 型胶原以及 Sirt3 染色。经 Image-Pro Plus 图像分析软件随机取 3 个视野分析光密度,判定 I、III 型胶原蛋白和 Sirt3 的表达。

1.4 统计学方法

数据用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间两两比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义, $P<0.01$ 为差异具有显著统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般生存状况

注射 STZ 后,与空白组相比,实验组大鼠活动明显减少,日平均消耗饲料量、饮水量、尿量增加,垫料气味甜腻,毛发发黄、易脱落,精神萎靡,尾部潮湿。随治疗的进行,RSG 组和 BXD 组大鼠一般状况逐渐改善。实验过程中,因灌胃损伤、炎症等因素,模型组死亡 1 只,RSG 组死亡 1 只。最后各组大鼠数目为:空白组 7 只,模型组 10 只,RSG 组 10 只,BXD 组 11 只。

2.2 大鼠空腹血糖变化情况

各组大鼠 FPG 检测结果:实验前各组大鼠血糖正常,各组间差异无统计学意义($P>0.05$)。成模时,各实验组 FPG 均升高($P<0.05$),达到糖尿病诊断标准。各实验组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。治疗完成时,各实验组均较空白组升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。RSG 组、BXD 组均较模型组下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。RSG 组 FPG 较 BXD 组更低,差异有统计学意义($P<0.05$)。说明罗格列酮和加味生脉补心丹均具有较好的降糖效果,其中加味生脉补心丹降糖效果略逊于罗格列酮。结果见表 1。

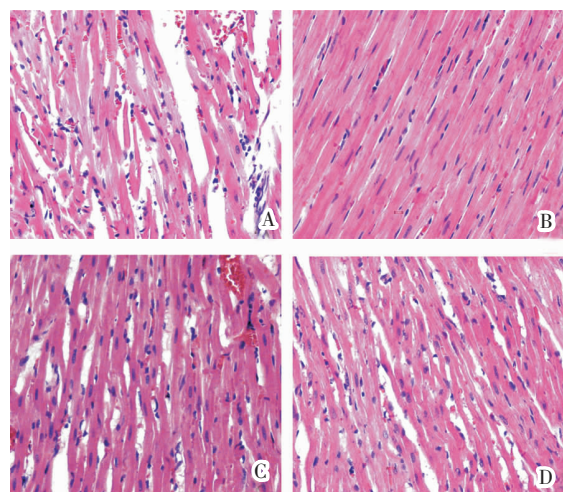
2.3 心肌组织病理学改变与胶原沉积情况

大鼠心肌 HE 染色切片显示,空白组心肌细胞排列整齐、核染色清晰。模型组心肌细胞肥大变性,排列紊乱,虽无明显坏死灶,但部分细胞染色加深,横纹消失,纤维肿胀。BXD 组和 RSG 组心肌细胞亦不紧密,稍紊乱,核染色基本清晰,部分细胞染色不均匀,纤维肿胀,与模型组相比程度较轻。结果见图 1。

表 1 各组各时期空腹血糖的比较 ($\bar{x}\pm s$, mmol/L)

组别	n	实验前	成模时	治疗完成时
空白组	7	3.87±0.33	4.08±0.56	3.86±0.39
模型组	10	3.90±2.78	16.61±2.05*	11.61±0.85*
BXD 组	10	3.76±0.21	17.68±2.53*	7.15±0.69*#
RSG 组	11	3.29±0.23	16.85±2.73*	5.24±1.15*#△
F		0.254	49.349	77.824
P		0.858	0.00	0.00

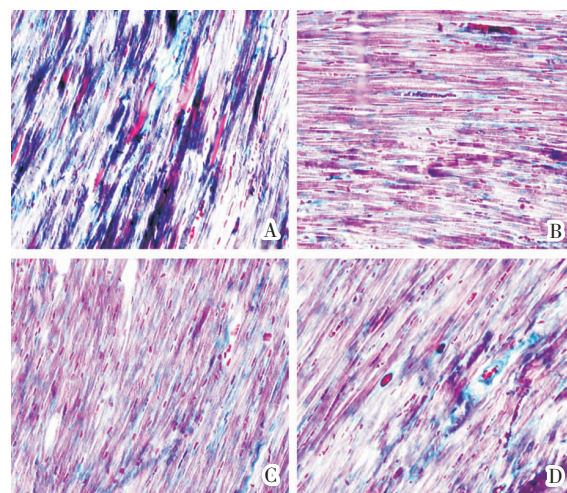
注:与空白组比较 * $P<0.05$,与模型组比较 # $P<0.05$,与 BXD 组比较 △ $P<0.05$ 。



A.模型组;B.空白组;C.RSG组;D.BXD组

图 1 各组大鼠心肌组织光镜观察图(HE 染色,×400)

Masson 染色切片结果显示,空白组胶原纤维网规则,胶原纤维含量少。模型组细胞间质纤维变粗、增加,围绕心肌细胞的胶原纤维网断裂、排列紊乱,间质纤维化明显。BXD 组和 RSG 组胶原组织排列较模型组规整,亦有不同程度纤维化,与模型组相比较轻。结果见图 2。



A.模型组;B.空白组;C.RSG组;D.BXD组

图 2 各组大鼠心肌组织光镜观察图(Masson 染色,×400)

2.4 I、Ⅲ型胶原蛋白和 Sirt3 蛋白平均光密度结果

I 型胶原模型组明显高于其他组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。RSG 组、空白组、BXD 组之间, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Ⅲ型胶原模型组与其他组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。RSG 组与 BXD 组、空白组, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Sirt3 模型组与其他组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。空白组与 RSG 组、BXD 组, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。RSG 组与 BXD 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

表 2 各组大鼠心肌 I、Ⅲ型胶原蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s, g$)

组别	n	I 型胶原	Ⅲ型胶原	Sirt3
空白组	7	0.0074±0.0043	0.0088±0.0017	0.0125±0.0033
模型组	10	0.0611±0.0047*	0.0300±0.0054*	0.0236±0.0049*
BXD 组	10	0.0112±0.0032#	0.0142±0.0038#	0.0101±0.0027#
RSG 组	11	0.0125±0.0033#	0.0137±0.0037#	0.0165±0.0030# [△]
F	/	4.229	11.511	5.501
P	/	0.013	0.00	0.04

注:与空白组比较 * $P < 0.05$,与模型组比较 # $P < 0.05$,与 BXD 组比较 $\Delta P < 0.05$ 。

3 讨论

糖尿病在中医学属消渴病,最早记载于《黄帝内经》,是一种以多饮、多食、多尿、身体消瘦为主要临床症状的慢性病。防治或延缓并发症的发生是糖尿病的主要治疗目标之一,与中医“治未病”的理念相契合。加味生脉补心丹,由《内外伤辨惑论》卷中方生脉散和《摄生秘剖》卷一方补心丹两方化裁而来,是湖南中医药大学第一附属医院应用十余年的经验方^[9]。本方心肾同治,阴阳兼顾,共奏滋阴清热、补脾益气、活血化瘀、升清降糖之功效。将此方应用于早期 2 型糖尿病及其心血管并发症的防治也是中医“治未病”思想的体现^[6]。

本研究旨在探索加味生脉补心丹对 2 型糖尿病及其并发的早期心肌纤维化的影响。2 型糖尿病的发病原因十分复杂,采用高糖高脂饲料喂养与腹腔注射 STZ 复合因素造模可以较好地模拟其病理机制。大剂量 STZ 可引起胰岛细胞的广泛破坏而造成 1 型糖尿病,而小剂量 STZ 破坏一部分胰岛细胞的功能,配合高糖高脂饮食喂养下的依赖高胰岛素水平状态,造成外周组织对胰岛素不敏感,从而引起糖尿病^[7]。此方法与 2 型糖尿病发病机制相似,且接近人类 2 型糖尿病的生理和病理特点^[8]。由实验结果可见,加味生脉补心丹对糖尿病多饮、多食等症状均

能起缓解作用,且有一定降糖效果,但不如罗格列酮。从光镜下的 HE、MASSON 染色切片中可见本方对心肌有明显的保护作用,纤维化程度明显得到缓解。由 I、Ⅲ型胶原蛋白的表达结果可知本方与罗格列酮均有的防心肌纤维化作用。其中罗格列酮主要是通过控制血糖来实现,而本方的降糖作用不如前者,却有着与其相当的护心作用,有理由认为本方还有其他途径达到这一效果。有研究认为心肌细胞肥大、运动与压力的超负荷可造成 Sirt3 表达的代偿性增高^[9-10]。根据 Sirt3 蛋白表达结果,我们可以推测本方还可以通过改善心肌代谢达到护心、防纤维化的作用。

综上所述,加味生脉补心丹对 2 型糖尿病大鼠有良好的降糖、护心作用。有可能是在降糖与改善心肌代谢的协同作用下实现延缓心肌纤维化效果。本实验明确了加味生脉补心丹的疗效,并为后续研究其作用机制开拓了思路。

参考文献:

- [1] Weber KT. The lonely failing heart: a case for ECM genes[J]. Cardiovascular Research, 1995, 30(6):835.
- [2] Peterson JT, Li H, Dillon L, et al. Evolution of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat [J]. Cardiovasc Res, 2000, 46:307-315.
- [3] Someya S, Yu W, Hallows WC, et al. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction[J]. Cell, 2010, 143(5):802-812.
- [4] 林心君,王麒又,辛金钟,等.高成模率和高稳定性的糖尿病大鼠模型制备—高脂高糖膳食+STZ 体质量联合体表面积法构建糖尿病大鼠模型[J].中国老年学杂志,2013,33(5):2 051-2 054.
- [5] 黄惠勇,吴华堂,李路丹,等.生脉补心丹治疗冠心病的临床研究[J].中国中医药科技,1997,4(6):329-331.
- [6] 何军峰,黄惠勇.肥胖症从肾论治的理论探讨[J].湖南中医药大学学报,2013,33(1):67-68.
- [7] 董世芬,洪 纓,樊江波,等.实验性 2 型糖尿病心肌病大鼠模型的建立和评价[J].中国实验动物学报,2009,17(4):245-251.
- [8] 赵蒙蒙,谢梦洲,李路丹,等.鬼箭羽对 2 型糖尿病胰岛 β 细胞形态学的影响[J].湖南中医药大学学报,2010,30(3):14-16.
- [9] 王 莉,巩会平,杜贻萌,等.沉默信息调节因子 3 在自发性高血压大鼠心肌高表达与左心室肥厚相关[J].中华高血压杂志,2012,20(5):457-463.
- [10] Sundaresan NR, Samant SA, Pillai VB, et al. sirtuin3 is a stressresponsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(20):6 384-6 401.

(本文编辑 杨 瑛)