

黄芪散对 2 型糖尿病大鼠心肌 MG53/PPAR- α 通路的影响

高颖, 秦阳, 王春怡, 高英, 李卫民*

(广州中医药大学 中药学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**探索黄芪散对实验性 2 型糖尿病大鼠心肌病变的保护作用及作用机制。**方法:**36 只雄性 SD 大鼠随机分为 4 组,分别为正常组,模型组,黄芪散组(2.4 g·kg⁻¹)和氯沙坦组(0.1 g·kg⁻¹)。采用高脂饲料喂养和链脲佐菌素(streptozocin, STZ)腹腔注射的方法复制 2 型糖尿病大鼠心肌病变模型,连续灌胃给药 16 周,观察黄芪散对各组大鼠血清中空腹血糖(FBG),总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),心肌形态学、胶原纤维变化,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 Mitsugumin 53(MG53)及过氧化物酶体增殖物激活受体- α (peroxisome proliferator-activated receptor- α , PPAR- α) mRNA 表达的影响。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠 FBG, TC, TG, HDL-C, LDL-C 含量均显著升高($P < 0.01$),心肌组织排列紊乱,大小不均匀,肌纤维间可见明显的脂肪空泡沉积,肌纤维间隔明显增宽,肌细胞间质、血管周围可见胶原纤维堆积,且肌组织胶原相对含量明显增加($P < 0.01$),心肌 MG53, PPAR- α mRNA 表达有所升高;与模型组比较,黄芪散组可以明显降低血糖、血脂含量($P < 0.05$, $P < 0.01$),黄芪散组大鼠表现出肌纤维排列规则,纤维间未见脂肪沉积,也未见纤维溶解等,并可明显抑制心肌胶原纤维增生;黄芪散组可显著降低 MG53, PPAR- α mRNA 的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**黄芪散对实验性糖尿病心脏病心肌病变具有一定的防治作用,其作用机制是通过改善血糖、血脂水平,调控 MG53/PPAR- α 通路,抑制 MG53, PPAR- α mRNA 的表达。

[关键词] 黄芪散; 2 型糖尿病; 心肌病变; Mitsugumin 53 (MG53); 过氧化物酶体增殖物激活受体- α

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)09-0123-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017090123

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170215.0914.002.html>

[网络出版时间] 2017-02-15 9:14

Effect of Huangqi San on MG53/PPAR- α Pathway in Type 2 Diabetes Mellitus Cardiomyopathy Rats

GAO Ying, QIN Yang, WANG Chun-yi, GAO Ying, LI Wei-min*

(School of Chinese Material Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of Huangqisan (HQS) on cardiomyopathy of rats with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and its mechanism. **Method:** Thirty-six male SD rats were randomized into 4 groups, namely normal group, model group, HQS group (2.4 g·kg⁻¹), and Losartan treatment group (0.1 g·kg⁻¹), with 12 rats in each group. Rats received high fat diet and streptozocin (STZ) to reproduce the model of type 2 diabetic cardiomyopathy rats, and were orally administered with drugs for 16 consecutive weeks. Fasting blood glucose (FBG), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and histological features of myocardium were observed. Mitsugumin 53 (MG53) and peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α) mRNA expression were observed by Real-time PCR. **Result:** Compared with the normal group, the levels of FBG, TC, TG, HDL-C, LDL-C and MG53, PPAR- α mRNA expression in model groups were significantly elevated ($P < 0.01$). Besides,

[收稿日期] 20161219(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373775,81503375)

[第一作者] 高颖,在读硕士,从事中药新药的研究与开发, Tel:13631455175, E-mail:13631455175@139.com

[通讯作者] *李卫民,博士,教授,从事中药新药的研究与开发工作, Tel:020-39358290, E-mail:liweimin@gzucm.edu.cn

disordered arrangement and different sizes of myocardial tissues, obvious fat vacuole and widened interval between fibers were found in the model group. Compared with the model group, the levels of FBG, TC, TG, HDL-C and LDL-C in HQS group were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Both of HQS group showed regular myocardial tissue, without fat vacuole and fiber dissolution. But HQS group showed scanty fat vacuole in fiber interval. HQS group showed significant reduction in MG53, PPAR- α mRNA expressions ($P < 0.05$, $P < 0.01$).
Conclusion: HQS has a good therapeutic effect on diabetic cardiomyopathy rats. Its mechanism may be related to reduction in the level of blood glucose and blood lipids, regulation on MG53/PPAR- α signaling pathway and inhibition of MG53, PPAR- α mRNA expressions of myocardium.

[**Key words**] Huangqisan; type 2 diabetes mellitus; cardiomyopathy; Mitsugumin 53 (MG53); peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α)

糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)是一种独立于高血压、冠心病的疾病,也是糖尿病常见的慢性并发症之一;随着糖尿病发病率的逐年增高和病程延长,继发于糖尿病的糖尿病心肌病已成为晚期患者死亡的主要原因,主要表现为心肌细胞局灶性肥大、坏死,细胞外基质堆积、纤维化,心肌间质重构,心肌血管壁增厚等^[1-2]。最新研究表明心肌 Mitsugumin 53(MG53)的异常表达通过参与过氧化物酶体增殖物激活受体- α (PPAR- α)的上调和受损的胰岛素信号转导的双重机制来诱发糖尿病心肌病,认为该信号通路参与了心肌肥厚和纤维化的病理过程^[3]。黄芪散出自《圣济总录》,由黄芪、葛根和桑白皮按 1:2:1 比例配伍而成,具有益气健脾,滋阴清热,生津止渴的功效^[4]。前期研究发现黄芪散能够提高 2 型糖尿病小鼠的胰岛素敏感性,改善糖耐量,降低血糖、血脂含量,从而改善糖、脂代谢紊乱,同时对糖尿病大鼠的心肌起到保护作用^[5-6];临床使用也证实黄芪散能够在一定程度上改善糖尿病心肌病的症状^[7]。本实验通过对 2 型糖尿病大鼠心肌形态学及 MG53/PPAR- α 通路的研究,从分子水平探讨黄芪散对糖尿病心肌病变的保护作用及机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性健康 SD 大鼠 36 只,体重(200 \pm 20) g,购于广东省医学实验动物中心,合格证号 SCXK(粤)2013-0002。饲养于广东药科大学实验动物中心 SPF 级动物实验室,许可证号 SYXK(粤)2012-0125。本研究所涉及的动物相关操作均在广东药科大学动物伦理委员会的批准下进行(批准号 gdpulac2016033)。

1.2 药物及试剂 黄芪、葛根、桑白皮药材,均购自广州中医药大学大药房有限公司,经广州中医药大学新药中心高英教授鉴定,黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的干燥

根;葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* 的干燥根;桑白皮为桑科植物桑 *Morus alba* 的干燥根皮。阿拉伯树胶粉(天津市大茂化学试剂厂,批号 20160512),氯沙坦钾片(科素亚)(杭州默沙东制药有限公司,批号 L035748),链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司,批号 B0013K030100);葡萄糖(Glu)试剂盒,甘油三酯(TG)试剂盒,总胆固醇(TC)试剂盒,低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂盒和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒(上海荣盛生物药业有限公司,批号分别为 20160402147,20160301121,20160402121,20160201124,20160202123);丽春红 R(广州市威佳有限公司,批号 3476B074),酸性品红(天津天新精细化工开发中心,批号 20131108),磷钼酸(天津市化学试剂四厂,批号 20151102),总 RNA Trizol 提取试剂盒、逆转录试剂盒、扩增试剂盒(日本 TaKaRa 公司,批号分别为 AKA4501,AK3902,AK8104)。大鼠 MG53,PPAR- α 和 GAPDH 的引物自行设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 仪器 1-15k 型冷冻离心机(美国 Sigma 公司),RT-2100C 型自动酶标仪(德国上海创奕科教设备有限公司),BMJ-A 型病理组织包埋冷冻台(常州市中威电子仪器有限公司),BX51 型光学显微镜(日本 Olympus 公司),CFX96TM 型实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)仪(美国伯乐公司)。

2 方法

2.1 黄芪散提取物的制备 其提取方法见文献[8]。本实验参照前期研究基础^[4],给药剂量设定为 2.4 g·kg⁻¹。

2.2 分组、模型复制^[6]及给药 SD 大鼠基础饲料适应性喂养 3 d 后,禁食不禁水 12 ~ 14 h,按照 37 mg·kg⁻¹的剂量一次性腹腔注射 STZ 柠檬酸缓冲液(留取 6 只作为正常组大鼠,腹腔注射等体积

的柠檬酸缓冲液)。3 周后待大鼠血糖稳定,取血测空腹血糖(FBG)和糖耐量,选择糖耐量异常(2 hBG \geq 7.8 mmol·L⁻¹)的成模大鼠纳入实验并随机分成 4 组,分别为正常组、模型组、黄芪散组和氯沙坦组。除正常组大鼠喂养基础饲料外,其余大鼠均喂养高脂饲料(质量分数配比:蔗糖 20%,猪油 15%,胆固醇 1.2%,胆酸钠 0.2%,酪蛋白 10%,磷酸氢钙 0.6%,石粉 0.4%,预混料 0.4%,基础饲料 52.2%),7 周后黄芪散组和氯沙坦组开始给药,各组给药时间均为 16 周,分别按体重灌胃,每日 1 次,其中正常组与模型组灌服 0.5% 阿拉伯树胶溶液(溶媒),实验结束处死动物取材。

2.3 样本采集与指标检测 末次给药后禁食不禁水 12~14 h,经腹主动脉取血 4~5 mL,分离血清,放置于 -80 °C 冰箱中保存,待测血清中 FBG,TC, TG, HDL-C, LDL-C。处死动物迅速取出心脏,剪除包膜、血管,剪取心室肌约 100 mg,装入无 RNA 酶冻存管保存备用,按试剂说明提取心肌组织总 RNA,另取部分心室肌用 10% 福尔马林溶液固定,进行常规石蜡包埋,分别供苏木素-伊红(HE)染色和马松(Masson)染色使用。

2.4 Real-time PCR 检测 MG53 和 PPAR- α mRNA 表达 用 Trizol 提取心肌组织总 RNA,用微量紫外分光光度计测定其浓度及纯度,然后逆转录成 cDNA。以 GADPH 为内参,上游 5'-TGATTCTA

CCCACGGCAAGT-3', 下游 5'-AGCATCACCCCA TTTGATGT-3',其扩增产物长度 92 bp;MG53 上游 5'-GTCCCTGTTGTCAGGCATCT-3',下游 5'-TCGCA GTAGATGCTCAGTGG-3',其扩增产物长度 136 bp; PPAR- α 上游 5'-TGGCGTACGACAAGTGTGAT-3',下游 5'-AAACGGATTGCATTGTGTGA-3',其扩增产物长度 118 bp。MG53 反应体系为 cDNA 2 μ L,上下游引物各 1 μ L,SYBR[®] Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 12.5 μ L,无 RNase 水 8.5 μ L;反应步骤为 95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,进行 39 次循环,最后 72 °C 10 min 终止反应。PPAR- α 反应体系及反应步骤同 MG53,结果用 C_t 值表示,采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法对目的基因进行相对定量分析。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件进行分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,若方差齐,两组间比较用 LSD-t Test 法;若方差不齐,两组间比较用 Bonferroni's T3 Test 法,以 P < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 2 型糖尿病大鼠血糖、血脂的影响 与正常组比较,模型组大鼠 FBG,TC, TG, LDL-C 含量均明显升高(P < 0.05, P < 0.01);与模型组比较,黄芪散组可以明显降低 FBG, TG, TC, HDL-C, LDL-C 含量(P < 0.05, P < 0.01),氯沙坦组可降低 FBG, TG, HDL-C, LDL-C 含量,但对 TC 含量基本无影响。见表 1。

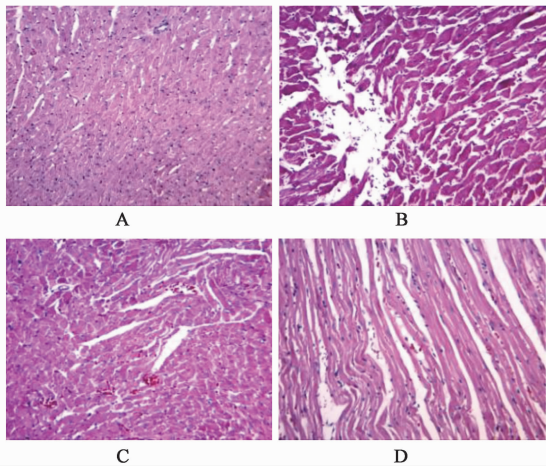
表 1 黄芪散对 2 型糖尿病大鼠 FBG, TC, TG, HDL-C 和 LDL-C 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	FBG	TC	TG	HDL-C	LDL-C
正常	-	6	5.77 \pm 0.71	1.77 \pm 0.97	0.71 \pm 0.03	0.72 \pm 0.03	1.31 \pm 0.06
模型	-	6	9.35 \pm 0.65 ²⁾	2.95 \pm 0.15 ²⁾	0.88 \pm 0.06 ¹⁾	0.82 \pm 0.09	2.04 \pm 0.07 ²⁾
黄芪散	2.4	12	5.94 \pm 0.22 ⁴⁾	1.79 \pm 0.11 ⁴⁾	0.76 \pm 0.05 ³⁾	0.63 \pm 0.10 ⁴⁾	1.08 \pm 0.08 ⁴⁾
氯沙坦	0.1	12	6.95 \pm 0.45 ⁴⁾	2.75 \pm 0.11	0.75 \pm 0.05 ³⁾	0.66 \pm 0.87 ⁴⁾	1.60 \pm 0.17 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01;与模型组比较³⁾P < 0.05, ⁴⁾P < 0.01(表 2,3 同)。

3.2 HE 染色观察心肌组织形态改变 光镜下观察正常组大鼠心肌组织排列整齐、均匀,肌细胞大小规则,模型组大鼠表现出心肌组织排列紊乱,肌细胞大小不均匀,肌纤维间可见明显的脂肪空泡沉积,肌纤维间隔明显增宽,纤维明显变细,部分肌纤维已发生溶解等病理改变;黄芪散组大鼠肌纤维排列规则,纤维间未见脂肪沉积,也未见纤维溶解等,大鼠肌纤维间偶尔可见极少的脂肪空泡;氯沙坦组大鼠心肌组织排列基本整齐但仍能看到较多的脂肪空泡。见图 1。

3.3 Masson 染色观察心肌胶原纤维改变 正常组大鼠心肌细胞染成红色,胶原纤维染成蓝色,心肌胶原纤维分布均匀、整齐。模型组大鼠心肌细胞间质、血管周围可见胶原纤维集聚,排列紊乱,分布不均匀,相互连接成网状。黄芪散组和氯沙坦组心肌胶原纤维分布较均匀,含量较少。见图 2。采用 Image ProPlus 图像分析系统进行心肌组织胶原相对含量测定见表 2,结果表明,与正常组比较,模型组大鼠心肌组织胶原相对含量显著增加(P < 0.01),与模型组比较,黄芪散组和氯沙坦组能不同程度减少



A. 正常组; B. 模型组; C. 黄芪散组; D. 氯沙坦组(图 2 同)

图 1 黄芪散对 2 型糖尿病大鼠心肌组织形态的影响(HE, ×100)

Fig. 1 Effect of HQS on histological features of myocardium in T2DM rats(HE, ×100)

心肌组织胶原相对含量($P < 0.01$),提示黄芪散和氯沙坦均可以明显抑制胶原纤维增生。

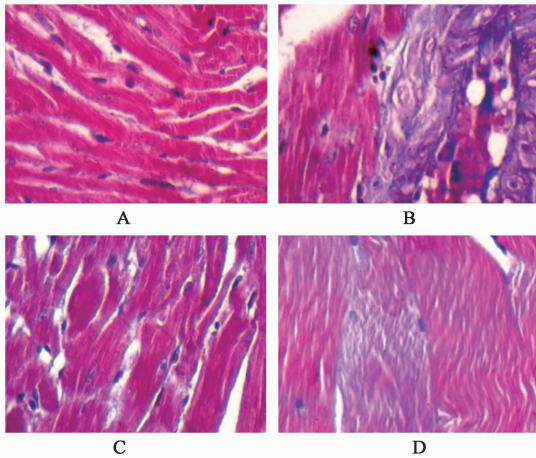


图 2 黄芪散对 2 型糖尿病大鼠心肌组织胶原纤维改变(Masson, ×100)

Fig. 2 Effect of HQS on collagen fibers change of myocardium in T2DM rats(Masson, ×100)

表 2 黄芪散对 2 型糖尿病大鼠心肌组织胶原相对含量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of HQS on collagen content of myocardium in T2DM rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	胶原相对含量
正常	-	6	0.13 ± 0.01
模型	-	6	0.33 ± 0.02 ²⁾
黄芪散	2.4	12	0.16 ± 0.01 ⁴⁾
氯沙坦	0.1	12	0.17 ± 0.06 ⁴⁾

3.4 对糖尿病大鼠心肌 MG53 和 PPAR-α mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠 MG53 和 PPAR-α mRNA 表达均有所上调。黄芪散给药后对

MG53, PPAR-α mRNA 表达均明显下调($P < 0.05$, $P < 0.01$);氯沙坦组大鼠对 MG53, PPAR-α mRNA 表达下调影响不明显。见表 3。

表 3 黄芪散对 2 型糖尿病大鼠心肌 MG53 和 PPAR-α mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of HQS on expression of MG53 and PPAR-α mRNA of myocardium in T2DM rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	MG53/GAPDH	PPAR-α/GAPDH
正常	-	6	0.74 ± 0.15	0.89 ± 0.11
模型	-	6	0.95 ± 0.07	1.04 ± 0.11
黄芪散	2.4	12	0.72 ± 0.07 ³⁾	0.77 ± 0.08 ⁴⁾
氯沙坦	0.1	12	0.97 ± 0.02	0.88 ± 0.13

4 讨论

DCM 作为糖尿病并发的心血管疾病于 1974 年首次被提出^[9]。作为糖尿病的主要并发症,一旦发生心力衰竭,病死率显著增加^[10-11],但由于其发病机制复杂,临床上对其认识不够,给临床确诊和治疗带来一定的困难,因此随着医学技术的飞快发展,有必要应用现代医学技术对 DCM 发病机制进行深入研究,为早期干预和治疗提供一定的理论依据^[12]。

MG53 是一种近来发现在细胞膜修复方面具有显著作用的蛋白,主要存在于人类、鼠类及其他哺乳动物心脏和骨骼肌^[13],其余组织表达较少或没有表达。最新研究表明在胰岛素抵抗和代谢紊乱的动物模型中, MG53 的过度表达通过 E3 泛素连接酶作用于胰岛素受体(insulin receptor, IR)和胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate1, IRS-1)^[14],在蛋白酶体的作用下 IR 和 IRS-1 发生降解,使胰岛素信号通路受损,导致全身胰岛素抵抗和代谢性疾病的发生和发展^[15-16]。另一方面 PPAR-α 是心肌细胞脂肪酸吸收和利用的重要调节物,在糖尿病状态下心肌细胞中 PPAR-α 的激活会导致葡萄糖吸收和利用的抑制,打乱心肌脂质的稳态^[3],引起心肌能量机制紊乱,最终导致 DCM^[12]。研究表明心肌 MG53 的异常表达通过参与上调的 PPAR-α 和受损的胰岛素信号转导的双重机制来诱发糖尿病心肌病^[3]。这些结果不仅揭示了 MG53 在心肌 PPAR-α 表达及脂质代谢调节的新型功能,也强调了 MG53 作为糖尿病与心肌病关联的一个重要的治疗靶点。

本实验研究结果表明,黄芪散可以明显降低血糖、血脂水平,这一结果也再次验证了本课题组的前期研究结论^[5-6]。同时还可明显改善模型组大鼠心肌病理状态,造模后大鼠心肌组织排列紊乱,心肌细

胞大小不一,肌纤维间可见明显的脂肪空泡沉积,肌纤维间隔明显增宽,纤维明显变细,部分肌纤维发生溶解等,同时心肌细胞间质、血管周围可见胶原纤维集聚,排列紊乱,分布不均匀,相互连接成网状,给药后以上病理变化基本都得到明显改善并且可以明显减轻心肌纤维化病变,另外也可以明显抑制 MG53, PPAR- α mRNA 表达,从而预防或延缓糖尿病大鼠心肌病变的发生。氯沙坦是一种常用于治疗心力衰竭等心血管疾病的抗血管紧张素 II 受体^[17],本研究证实,该药可明显改善心肌组织形态学的病理改变、抑制胶原纤维增生,但在改善糖脂代谢长效方面可能略显不足,其具体的治病机制还需要在进一步的实验中逐步完成。

在众多 DCM 的发病机制中, MG53/PPAR- α 通路是否与其他机制相关联以及该通路更为详实的分子生物学检测,还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 肖俊华,洪纓. 三种中药化学成分抗糖尿病心肌病变的作用初探[D]. 北京:北京中医药大学,2009.

[2] 储全根,刘新萍,张凯,等. 抵当汤及其拆方对糖尿病大鼠心肌 TGF- β_1 , TGF- βR II 及 Smad7 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(1):93-97.

[3] LIU F H, SONG R S, FENG Y Q, et al. Upregulation of MG53 induces diabetic cardiomyopathy through transcriptional activation of peroxisome proliferation-activated receptor- α [J]. Circulation, 2015, 131(9):795-804.

[4] 王春怡. 黄芪散干预 2 型糖尿病胰岛素抵抗机制及制剂基础研究[D]. 广州:广州中医药大学,2009.

[5] 陈艳芬,王春怡,李卫民,等. 古方黄芪散降糖作用的实验研究[J]. 广东药学院报,2010,26(1):73-76.

[6] 陈艳芬. 黄芪散对糖尿病心肌病变的干预作用及其机制研究[D]. 广州:广州中医药大学,2009.

[7] 徐慕娟,王玲,常晓,等. 黄芪散治疗糖尿病心肌病的临床观察[J]. 中国实用医药,2015,10(18):169-170.

[8] 罗娇艳,王芳,张娟,等. 黄芪散对糖脂代谢和骨生物学指标影响的实验研究[J]. 广东药学院学报,2015,31(1):75-79.

[9] Hamby R I, Zoneraich S, Sherman L, et al. Diabetic cardiomyopathy [J]. JAMA,1974,229(13):1749-1754.

[10] 赵榕,赵利,刘光辉. 加味补阳还五汤对糖尿病心肌病患者 BNP, CRP, HbA1c 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(11):311-313.

[11] 李维斯,方芳,覃斐章,等. 杨桃根总提取物对糖尿病心肌病大鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(7):128-132.

[12] 赵航,冯景辉,吴秀萍. 糖尿病心肌病发病机制的研究进展[J]. 国际心血管病杂志,2016,43(1):16-18.

[13] SONG R S, PENG W, ZHANG Y, et al. Central role of E3 ubiquitin ligase MG53 in insulin resistance and metabolic disorders[J]. Nature,2013,18(4):375-379.

[14] Levy J R, Campbell K P, Glass D J, et al. MG53's new identity[J]. Skeletal Muscle,2013, 3(1):118-204.

[15] CAO C M, ZHANG Y, Weisleder N, et al. MG53 constitutes a primary determinant of cardiac ischemic preconditioning [J]. Circulation, 2010, 121(23):2565-2574.

[16] ZHANG Y, LV F, JIN L, et al. MG53 participates in ischaemic postconditioning through the RISK signalling pathway[J]. Cardiovasc Res,2011,91(1):108-115.

[17] 宋金梅. 美托洛尔联合氯沙坦治疗心力衰竭的临床效果观察[J]. 河南医学研究,2016,25(2):335-336.

[责任编辑 周冰冰]