

丹皮酚联合三七总皂苷对大鼠糖尿病心肌纤维化的影响

贾卓雅, 石凯行, 范彦芳, 李前宽, 周晓慧*
(承德医学院, 河北承德 067000)

[摘要] **目的:**探讨丹皮酚联合三七总皂苷对大鼠糖尿病心肌纤维化的影响,探讨其作用机制。**方法:**采用高脂高糖饲养联合腹腔注射链脲佐菌素诱导糖尿病心肌病模型。按照二因素五水平均匀设计法,以心肌组织马松(Masson)染色测定的心肌胶原容积分数为观测指标,采用多元回归分析确定丹皮酚联合三七总皂苷对糖尿病心肌病大鼠最佳组合剂量。运用 2×2 析因设计试验分析两者之间有无交互作用,设空白组,模型组,丹皮酚($80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,三七总皂苷($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,丹皮酚($80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) + 三七总皂苷($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,二甲双胍($157.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组。检测体质量,心重指数(HWI),血糖(FBG),乳酸脱氢酶(LDH),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),肌酸激酶同工酶MB(CK-MB)的含量,心肌组织中的丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD)活性变化,观察Masson染色心肌胶原分布。**结果:**发现丹皮酚($80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和三七总皂苷($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)联合抗糖尿病心肌病作用最佳并有协同作用。与正常组比较,模型组HWI,FBG,LDH,AST,CK-MB,MDA的含量升高,SOD活性降低,体质量显著下降($P < 0.05$),Masson染色显示心肌胶原纤维明显增高($P < 0.05$)。与模型组比较,丹皮酚组,三七总皂苷组,联合用药组的HWI,FBG,LDH,AST,CK-MB,MDA的含量下降,SOD活性升高,体质量显著增高($P < 0.05$),Masson染色显示心肌胶原纤维明显减少($P < 0.05$),而联合用药组与单味用药组比较有显著差异($P < 0.05$)。**结论:**丹皮酚联合三七总皂苷具有协同降低心肌纤维化作用,可能与抗氧化应激作用有关。

[关键词] 丹皮酚; 三七总皂苷; 糖尿病; 心肌纤维化

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R277.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)06-0133-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180699

Effect of Paeonol Combined with *Panax notoginseng* Saponins on Diabetic Myocardial Fibrosis in Rats

JIA Zhuo-ya, SHI Kai-hang, FAN Yan-fang, LI Qian-kuan, ZHOU Xiao-hui*
(Chengde Medical University, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of paeonol (Pae) combined with *Panax notoginseng* saponins (PNS) on myocardial fibrosis in rats with diabetes mellitus. **Method:** Diabetic cardiomyopathy model was induced by high fat and high glucose feeding combined with intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). According to the two factors and five levels uniform design method, the myocardial collagen volume fraction measured by Masson staining in myocardial tissue was used as the observation index, and the best combination dose of paeonol and PNS in diabetic cardiomyopathy rats was determined by multiple regression analysis. The 2×2 factorial design test was used to analyze the interaction between Pae and PNS. The blank group, model group, Pae group ($80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), PNS group ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Pae ($80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) + PNS ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, and metformin ($157.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group were established in this study. Then their body weight, heart weight index (HWI), blood glucose (FBG), lactate dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) activity in myocardial tissues were detected, and the distribution of myocardial collagen was observed by Masson staining.

[收稿日期] 20170923(001)

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(C2011406009);河北省教育厅重点项目(ZD2016011)

[第一作者] 贾卓雅, 硕士, 从事心血管药理学研究, Tel: 18131471917, E-mail: 821780479@qq.com

[通信作者] *周晓慧, 硕士, 教授, 从事心血管药理学研究, Tel: 0314-2290632, E-mail: zhx5055@sina.com

Result: It was found that the combination of Pae (80 mg·kg⁻¹) and PNS (100 mg·kg⁻¹) had the best effect and synergistic effect on diabetic cardiomyopathy. As compared with the normal group, the contents of HWI, FBG, LDH, AST, CK-MB and MDA in the model group were increased, the activity of SOD and body weight were decreased significantly ($P < 0.05$), while the myocardial collagen fiber was significantly increased in Masson staining ($P < 0.05$). As compared with the model group, the contents of HWI, FBG, LDH, AST, CK-MB and MDA in the model group were decreased. The activity of SOD increased and body weight increased significantly ($P < 0.05$), and the myocardial collagen fiber was significantly decreased in Masson staining ($P < 0.05$). There was significant difference between combined group and single herb group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The combination of Pae and PNS has the effect of anti-myocardial fibrosis, and has a certain improvement in diabetic cardiomyopathy, which may be related to the inhibition of oxidative stress.

[Key words] paeonol; *Panax notoginseng* saponins; diabetic; myocardial fibrosis

糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)是糖尿病主要并发症之一,心肌纤维化是 DCM 的重要病理特征之一,同时糖尿病心肌纤维化是引起心力衰竭的发病率和死亡率的主要因素^[1]之一。DCM 病理机制较多,如微血管改变、氧化应激、炎症因子和纤维化^[2-3],其中氧化应激是关键因素^[4]。目前,尚无确切药物用于治疗 DCM,可能与单味药物作用靶点单一有关,而传统中药具有作用靶点多的优势。丹皮酚(paeonol, Pae)又名牡丹酚^[5-6],是毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* 的根皮和萝藦科植物徐长卿 *Pycnanostelma paniculatum* 干燥根或全草的主要有效成分,具有抗炎抗氧化,抗肿瘤,同时具有降血糖,降低 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的作用^[7-8]。三七总皂苷(*Ppanax notoginseng* saponins, PNS)是五加科人参属三七的主要有效成分,多用来防治心脑血管疾病,其药理作用广泛包括抗癌、神经保护、降血糖并预防糖尿病并发症^[9]。本课题组前期研究发现^[10-11]Pae 和 PNS 组方可抑制心脏成纤维细胞 I 型, III 型胶原蛋白的基因表达,亦可逆转大鼠梗死后心室重构引起的心肌纤维化。但两者联用是否有抗糖尿病心肌纤维化的作用,相关研究尚未见报道。本实验拟从药理学角度探讨丹皮酚与三七总皂苷联合应用对糖尿病心肌纤维化的影响。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 165 只,体质量(200 ± 10)g,购买于北京维通利华有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001。实验符合承德医学院医学伦理委员会标准(编号 CDMULAC-2017-001)。

1.2 药品与试剂 丹皮酚、三七总皂苷(西安小草植物科技有限责任公司;纯度分别为 99%, 80%;批号分别为 xc20160617, xc20151102);二甲双胍(上海信谊药厂有限公司,国药准字 H31020246);

链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司,批号 B37917);血糖试纸(北京怡成生物电子技术股份有限公司,批号 20160720A4);马松(Masson)三色染色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司,批号 1604298003);羧甲基纤维素钠(天津市佳兴化工玻璃仪器工贸有限公司,批号 20090324);天门冬氨酸氨基转移酶(AST),乳酸脱氢酶(LDH),肌酸激酶同工酶 MB(CK-MB)酶联免疫吸附(ELISA)检测试剂盒(上海瑞朔生物科技有限公司,批号均为 201703);丙二醛(MDA)以及超氧化物歧化酶(SOD)活性测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20170406, 20170402)。

1.3 仪器 Shandon Excelsior ES 型全自动组织脱水机(芬兰 Thermo 公司),EMUC6 型超薄石蜡切片机(德国 Leica 公司),TK-218 型恒温摊片烤片机(湖北泰维医疗科技有限公司),MiVnt 型图像分析系统(山东易创电子有限公司),BH-2 型显微镜(日本 Olympus 公司),721W 型微机型分光光度计(上海光学仪器五厂)。

2 方法

2.1 DCM 模型建立 大鼠适应 1 周后,随机选取 10 只为空白组,喂以普通饲料。造模大鼠喂以高脂高糖饲料(成分为基础饲料 60.4%,蔗糖 20%,猪油 10%,胆固醇 1.5%,蛋黄粉 8%,胆酸钠 0.1%)。6 周后,禁食 16 h,连续 2 d 腹腔注射 STZ 25 mg·kg⁻¹(溶于 0.1% 柠檬酸缓冲液, pH 4.3)。空白组注射等体积的柠檬酸缓冲液。注射 STZ 后第 3, 7 天,尾部静脉采血测大鼠空腹血糖,2 d 血糖均 ≥ 16.7 mmol·L⁻¹ 视为 2 型糖尿病模型成功,分组继续喂养 8 周后,每组各取 1 只大鼠行病理组织学检测,出现心肌纤维化、心肌胶原形成的改变说明 DCM 模型成功^[12-13]。

2.2 分组及给药 运用二因素五水平均匀设计方法,丹皮酚和三七总皂苷各设 5 个剂量。根据 2015 年版《中国药典》常规给药量,丹皮酚和三七总皂苷每天每人给药量分别为 0.36 g 和 0.30 g,分别换算成大鼠给药量约为每天 37.8 mg·kg⁻¹ 和 31.5 mg·kg⁻¹,丹皮酚 5 水平选取 5 个剂量分别为 0,20,40,60,80 mg·kg⁻¹。三七总皂苷 5 水平选取 5 个剂量分别为 0,25,50,75,100 mg·kg⁻¹。两药组合见表 1。筛选出最佳组合剂量,运用 2×2 析因设计方法,分为空白组、丹皮酚组、三七总皂苷组、丹皮酚+三七总皂苷组、模型组、二甲双胍组。药物剂量见表 2。第 9 周开始给药干预,丹皮酚,三七总皂苷和二甲双胍分别溶于羧甲基纤维素钠(1%)灌胃,空白组和模型组灌等体积羧甲基纤维素钠。

表 1 均匀设计试验中药物组合对大鼠糖尿病心肌胶原容积分数的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of drug combination on myocardial collagen volume fraction of diabetic rats in uniform design test($\bar{x} \pm s$)

组别	n	丹皮酚 /mg·kg ⁻¹	三七总皂苷 /mg·kg ⁻¹	胶原容积分数 /%
组合 1	8	0	25	19.45 ± 4.19 ²⁾
组合 2	9	20	50	17.23 ± 2.83 ^{2,4)}
组合 3	8	40	0	19.69 ± 3.78 ²⁾
组合 4	9	60	75	17.03 ± 3.20 ^{2,4)}
组合 5	10	80	100	10.98 ± 3.43 ^{2,4)}
模型	8	-	-	22.48 ± 3.85 ²⁾
空白	10	-	-	6.48 ± 3.94

注:与空白组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01;与模型组比较³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01(表 2~5 同)。

2.3 血糖及心重指数的测定 实验末期,禁食 12 h,称体质量并用血糖仪测空腹血糖。

2.4 取材 给药 6 周后,4% 水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉取血用于检测血液生化指标,用电子天平称量心脏,计算心脏质量指数(HMI)(mg·g⁻¹) = 脏器质量/体质量。取 1/2 心肌组织置 4% 中性甲醛固定液用于组织病理学检测,余心肌组织存于 -80 ℃ 冰箱用于组织中氧化指标检测。

2.5 血液生化指标检测 用双抗体夹心法酶联免疫吸附试验(ELISA)测定乳酸脱氢酶(LDH),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),肌酸激酶同工酶 MB(CK-MB)的含量。

2.6 Masson 染色及心肌胶原容积分数测定 常

规脱水,石蜡包埋,切片,按照 Masson 复合染液说明书进行染色,透明,封固。光学显微镜下可见胶原纤维呈蓝色,肌肉呈红色,细胞核成蓝褐色。每张切片随机选取 10 个视野拍照(×200)后采用 Image-ProPlus 6.0 图像分析软件测定心肌胶原容积分数(CVF)。

2.7 心肌组织 MDA 和 SOD 活力测定 用 WST-1 法和 TBA 法分别测定心肌匀浆组织中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性变化。

2.8 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析。用单因素方差分析进行多组间比较,用 LSD 检验进行组间比较。线性关系采用多元回归分析,交互作用采用 2×2 析因设计方差分析。以 P < 0.05 认为有统计学意义。

3 结果

3.1 均匀设计试验结果 将表 1 数据进行多元方程回归,得方程 $Y = 21.883 - 0.050X_1 - 0.060X_2$, X_1 是 Pae, X_2 是 PNS, Y 是心肌胶原容积分数(CVF)。方程经方差分析 P < 0.05,表明方程可信。由方程可知,随两药剂量增大,CVF 减小,故于此实验前提下,理论上当 Pae 与 PNS 以 80,100 mg·kg⁻¹ 组合,CVF 最小,此时, Y (CVF) 的 95% 的可信区间为 [8.52,13.43],本实验测得的实际数值为 10.98, 2×2 析因设计试验结果为 9.09,都在此区间内,说明得出的最佳的试验条件是可信的。

3.2 联合用药对大鼠血糖和体质量及心重指数的影响 除去死于糖尿病并发症的大鼠,实验结束后,模型组大鼠死亡 2 只,丹皮酚组和三七总皂苷组各死亡 1 只。空白组大鼠毛发有光泽,反应灵敏;模型组大鼠毛色黄暗,反应迟钝,多饮多食多尿且体质量下降。与 NC 组比较,DCM 组大鼠体质量明显降低(P < 0.01),FBG,HWI 均明显升高(P < 0.01);与 DCM 组比较,各用药组大鼠体质量明显增加,FBG,HWI 也均有降低(P < 0.01),其中,Pae + PNS 组相对于 Pae 组和 PNS 组对体质量,FBG,HWI 的影响均有差异(P < 0.05)。见表 2。

3.3 联合用药对 DCM 大鼠血清中 LDH,AST,CK-MB 水平的影响 与 NC 组比较,DCM 组血清中的 LDH,AST,CK-MB 水平明显升高(P < 0.01);与 DCM 组比较,Pae 组,PNS 组,Pae + PNS 组的 LDH,AST,CK-MB 水平明显降低(P < 0.01)。其中,Pae + PNS 组与 Pae 组,PNS 组比较有显著有差异(P < 0.05),与二甲双胍组有差异(P < 0.05)。见表 3。

表 2 Pae 联合 PNS 对 DCM 大鼠血糖和体质量及心重指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Pae combined with PNS on FBG, body weight, HWI in DCM rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	n	体质量/g	HWI/mg·g ⁻¹	FBG/mmol·L ⁻¹
空白	-	10	554.6 ± 31.13	2.63 ± 0.04	4.01 ± 0.54
模型	-	8	254.38 ± 27.11 ²⁾	4.21 ± 0.10 ²⁾	28.56 ± 1.56 ²⁾
Pae	80	9	364.00 ± 30.48 ^{2,4)}	3.49 ± 0.06 ^{2,4)}	13.3 ± 1.89 ^{2,4)}
PNS	100	9	368.78 ± 34.73 ^{2,4)}	3.52 ± 0.06 ^{2,4)}	12.91 ± 2.18 ^{2,4)}
Pae + PNS	80 + 100	10	466.90 ± 36.94 ^{2,4)}	3.21 ± 0.05 ^{2,4)}	10.96 ± 1.72 ^{2,4)}
二甲双胍	157.5	10	452.40 ± 26.02 ^{2,4)}	3.20 ± 0.05 ^{2,4)}	9.93 ± 2.01 ^{2,4)}

表 3 Pae 联合 PNS 对 DCM 大鼠血清中 LDH, AST, CK-MB 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Pae combined with PNS on LDH, AST, CK-MB in DCM rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	n	LDH/U·mL ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	CK-MB/U·L ⁻¹
空白	-	10	1.58 ± 0.24	140.09 ± 23.77	17.22 ± 3.27
模型	-	8	6.68 ± 1.16 ²⁾	380.28 ± 54.84 ²⁾	79.00 ± 13.42 ²⁾
Pae	80	9	4.36 ± 1.26 ^{2,4)}	263.87 ± 70.58 ^{2,4)}	55.64 ± 10.99 ^{2,4)}
PNS	100	9	5.02 ± 1.06 ^{2,4)}	261.52 ± 73.94 ^{2,4)}	53.17 ± 16.65 ^{2,4)}
Pae + PNS	80 + 100	10	2.30 ± 0.80	195.60 ± 26.24 ^{1,4)}	35.20 ± 3.57 ^{2,4)}
二甲双胍	157.5	10	3.58 ± 0.95 ^{2,4)}	342.40 ± 75.91 ²⁾	41.65 ± 5.03 ^{2,4)}

3.4 Pae 联合 PNS 对 DCM 大鼠心肌纤维化的影响

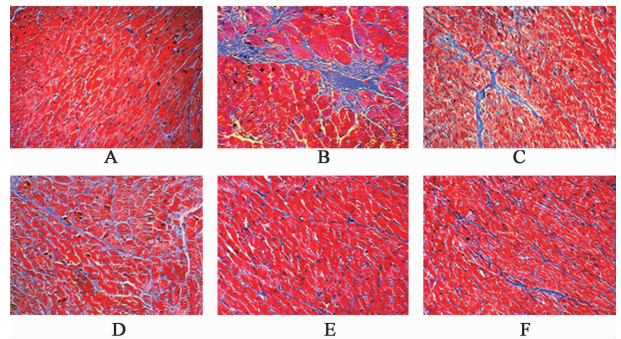
与正常组比较,模型组胶原纤维增生网状,排列紊乱,大量纤维瘢痕形成,CVF 值明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,Pae 组,PNS 组,Pae + PNS 组,二甲双胍组的胶原纤维增生均有不同程度的改善,CVF 值不同程度的降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。Pae + PNS 组和二甲双胍组改善明显 ($P < 0.05$)。见图 1 和表 4。

3.5 联合用药对大鼠糖尿病心肌胶原容积分数的影响

与 DCM 组比较,Pae 组,PNS 组,Pae + PNS 组对 CVF 的作用有差异 ($P < 0.05$),但组间比较 Pae 组和 PNS 组没有显著性差异,而 Pae + PNS 组与模型组,Pae 组,PNS 组比较有差异 ($P < 0.05$),且见有交互作用 ($P < 0.05$),表明 Pae 联合 PNS 对大鼠糖尿病心肌纤维化具有协同作用。见表 4。

3.6 联合用药对 DCM 大鼠心肌组织中 MDA 含量和 SOD 活力的影响

与 NC 组比较,DCM 组心肌组织中 MDA 水平明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),SOD 活力明显降低 ($P < 0.01$);与 DCM 组比较,Pae 组,PNS 组,Pae + PNS 组,二甲双胍组中的 MDA 水平明显降低 ($P < 0.01$),SOD 活力明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。其中,Pae + PNS 组与 Pae 组,PNS 组比较有显著有差异 ($P < 0.05$)。见表 5。



A. NC 组; B. DCM 组; C. Pae 组; D. PNS 组; E. Pae + PNS 组; F. 二甲双胍组

图 1 Pae 联合 PNS 对 DCM 大鼠心肌纤维化的影响 (Masson, × 200)

Fig. 1 Effect of Pae combined with PNS on myocardial fibrosis in DCM rats (Masson, × 200)

4 讨论

目前,对 DCM 的治疗主要依赖生物化学类降糖剂如胰岛素、甲苯磺丁脲等,这些药物通常伴随着相当大的副作用,如低血糖、耐药性、水肿和体质量增加,效果不尽如人意^[14-16]。缺乏针对 DCM 有效的治疗方法。根据 Perera 等^[17]研究,用传统中药来替代化学药物具有很大的吸引力,因此迫切需要开发新的、更好的、安全的传统中药来控制和治疗 DCM。

DCM 在中医学中属消渴病、心痛、胸痹等范畴,是消渴病进一步发展的结果。因消渴病长期不愈,失治、误治、耗气又伤阴,气血瘀滞,阴损伤及阳,终

表 4 2 × 2 析因设计试验中 Pae 联合 PNS 对大鼠糖尿病心肌胶原容积分数的影响及方差分析

Table 4 Effect of Pae combined with PNS on myocardial collagen volume fraction in diabetic rats and analysis of variance in 2 × 2 factorial design

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	CVF($\bar{x} \pm s$)/%	变异来源	f	SS	MS	F	P
空白	-	10	5.19 ± 3.05	总变异	35	1 119.821			
模型	-	8	21.45 ± 3.00 ²⁾	处理组间	3	777.449			
丹皮酚	80	9	17.69 ± 3.37 ^{2,3)}	丹皮酚	1	362.3	362.3	33.863	<0.05
三七总皂苷	100	9	18.06 ± 3.71 ^{2,3)}	三七总皂苷	1	321.584	321.584	30.057	<0.05
Pae + PNS	80 + 100	10	9.09 ± 2.95 ^{2,4)}	Pae + PNS	1	60.9	60.9	5.692	<0.05
二甲双胍组	157.5	10	11.59 ± 2.76 ^{2,4)}	误差	32	342.372	10.699		

注: $F_{0.05(2,2)} = 19$ 。

表 5 Pae 联合 PNS 对 DCM 大鼠心肌组织中 MDA 和 SOD 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of Pae combined with PNS on MDA and SOD in DCM rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	MDA /mol·g ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹
空白	-	10	1.28 ± 0.18	37.16 ± 6.81
模型	-	8	3.44 ± 0.23 ²⁾	9.92 ± 2.02 ²⁾
丹皮酚	80	9	2.40 ± 0.30 ^{2,4)}	15.31 ± 3.10 ^{2,4)}
三七总皂苷	100	9	2.55 ± 0.24 ^{2,4)}	14.85 ± 2.82 ^{2,3)}
Pae + PNS	80 + 100	10	1.54 ± 0.33 ^{1,4)}	28.68 ± 2.45 ^{2,4)}
二甲双胍	157.5	10	1.68 ± 0.26 ^{2,4)}	25.69 ± 3.54 ^{2,4)}

致阴阳俱虚,痰、湿、瘀、毒等病理物质互结,致恶性循环,损伤脏腑经络。施今墨学术流派传人祝堪予先生,创造性的提出消渴病“血瘀证”理论^[18-19],治疗过程中贯穿活血化瘀法,“疏其气血,令其条达”是也。《得配本草》记载:“丹皮性辛苦微寒,入手足少阴、厥阴经血分,泻心胞伏火,清膻中正气,除血中内热。”三七又名山漆,性甘温微苦,活血化瘀,可用于胸腹刺痛,破积血,积瘀不去,新血则不生,丹皮和三七联合活血补血。丹皮酚和三七总皂苷均为传统中药的主要有效成分,都具有降糖^[7-9]作用,而 LI 等^[20]发现丹皮酚联合丹参素通过提高抗氧化作用对心肌梗死大鼠的心肌有保护作用。三七总皂苷通过上调微小 RNA(miR-29c),下调 TGF-β₁,对 C57BL/6J 小鼠的心肌纤维化有改善作用^[21]。孙红丹等^[10-11]研究发现 Pae 和 PNS 联合应用可抗心肌梗死后心肌纤维化,本研究中通过高脂高糖联合小剂量 STZ 造糖尿病心肌病变模型是目前比较接近临床表现的模型^[13]。据资料显示,糖尿病大鼠 2 周后即有心肌超微结构的改变^[22]。本实验终止时,除

空白组外,余各组大鼠心重指数均增加,血清中 LDH,CK-MB,AST 明显增高,提示心肌出现损伤,Masson 染色观察到心肌间质纤维化显著增多,呈现不规则的网状增生。而 Pae 组,PNS 组,Pae + PNS 组大鼠血糖,心重指数,血清中 AST,CK-MB,LDH 均显著降低,其中 Pae + PNS 组相较于单味用药组下降更明显,提示 Pae 联合 PNS 比单味用药组对抗大鼠糖尿病心肌纤维化的作用更强。

心肌间质胶原过度沉积和心肌纤维化是 DCM 的一个重要特征,而氧化应激是 DCM 发生发展的关键因素^[4],糖尿病时,长期高血糖状态下,诱发氧化应激反应,产生过量的自由基,导致心肌细胞坏死,心肌间质增生,由于机体代谢改变及大量蓄积毒性产物,使心肌细胞溶解和坏死,而增生的纤维组织会逐渐取代坏死的心肌细胞,进而使心肌纤维化进一步加剧。SOD 为人体重要的抗氧化酶,可及时阻断并修复自由基对心肌细胞的损伤,从而抑制心肌纤维化的发生发展。心肌组织中 MDA 反应机体被自由基攻击的严重程度,SOD 可反映机体清除氧自由基的能力。本研究结果显示,药物干预各组心肌组织中 MDA 的含量明显降低,而 SOD 的活力明显提高。其中 Pae + PNS 组相对于单味用药组下降更显著,提示 Pae 联合 PNS 可能是通过抗氧化作用对糖尿病心肌纤维化有一定的改善作用。

综上所述,本实验第一步通过均匀设计的方法以反映心肌的损伤程度的 CVF 为观测指标筛选出最佳组合剂量。第二步通过析因设计分析来判断组合的交互关系,发现 Pae 联合 PNS 通过抗氧化作用降低大鼠糖尿病心肌纤维化,并具有协同作用,可能与清除自由基有关,但具体分子机制,尚不明确,有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Trachanas K, Sideris S, Aggeli C, et al. Diabetic cardiomyopathy: from pathophysiology to treatment[J]. *Hellenic J Cardiol*, 2014, 55(5):411-421.
- [2] Falcão-Pires I, Leite-Moreira A F. Diabetic cardiomyopathy: understanding the molecular and cellular basis to progress in diagnosis and treatment[J]. *Heart Failure Rev*, 2012, 17(3):325-344.
- [3] Stratmann B, Tschöepe D. The diabetic heart: sweet, fatty and stressed [J]. *Expert Rev Cardiovas Ther*, 2011, 9(9):1093-1096.
- [4] Khullar M, Al-Shudiefat A A, Ludke A, et al. Oxidative stress: a key contributor to diabetic cardiomyopathy[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(3):233-240.
- [5] SUN G P, WANG H, XU S P, et al. Anti-tumor effects of paeonol in a HepA-hepatoma bearing mouse model *via* induction of tumor cell apoptosis and stimulation of IL-2 and TNF- α production[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 584(2/3):246-252.
- [6] JIN X, WANG J, XIA Z M, et al. Anti-inflammatory and anti-oxidative activities of paeonol and its metabolites through blocking MAPK/ERK/p38 signaling pathway[J]. *Inflammation*, 2016, 39(1):434-446.
- [7] 欧叶涛. 牡丹皮有效成分丹皮酚的提取及其药理作用的研究[D]. 秦皇岛:燕山大学, 2015.
- [8] LIU J, WANG S, FENG L, et al. Hypoglycemic and antioxidant activities of paeonol and its beneficial effect on diabetic encephalopathy in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *J Med Food*, 2013, 16(7):577-586.
- [9] Uzayisenga R, Ayeka P A, WANG Y. Anti-diabetic potential of *Panax notoginseng* saponins (PNS): a review[J]. *Phytother Res*, 2014, 28(4):510-516.
- [10] 孙红丹, 聂丹, 龚明玉, 等. 丹皮酚与三七总皂苷配伍应用对血管紧张素 II 诱导增殖的心脏成纤维细胞 I 型和 III 型胶原蛋白表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(9):122-126.
- [11] 聂丹, 孙红丹, 时召平, 等. 丹皮酚、三七总皂苷组方对急性心肌梗死大鼠心脏内 I、III 型胶原表达的影响[J]. *天津医药*, 2016, 44(8):955-958, 1059.
- [12] 刘群. 实验性 2 型糖尿病心肌病大鼠模型建立的方法[J]. *临床心血管病杂志*, 2014(3):254-257.
- [13] Mansor L S, Gonzalez E R, Cole M A, et al. Cardiac metabolism in a new rat model of type 2 diabetes using high-fat diet with low dose streptozotocin [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2013, 12(1):1-10.
- [14] Tahrani A A, Piya M K, Kennedy A, et al. Glycaemic control in type 2 diabetes: targets and new therapies [J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 125(2):328-361.
- [15] Coman C, Rugina O D, Socaciu C. Plants and natural compounds with antidiabetic action [J]. *Not Bot Horti Agrobo*, 2012, 40(1):314-325.
- [16] LI W L, ZHENG H C, Bukuru J, et al. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 92(1):1-21.
- [17] Perera P K, LI Y. Mushrooms as a functional food mediator in preventing and ameliorating diabetes [J]. *J Funct Foods*, 2011, 1(4):161-171.
- [18] 庞博施. 今墨学派名老中医诊治糖尿病学术思想与经验传承研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2012.
- [19] 祝谌予, 郭赛珊, 梁晓春. 对糖尿病中医辨证指标及施治方药的探讨 [J]. *上海中医药杂志*, 1982(6):5-6.
- [20] LI H, XIE Y H, YANG Q, et al. Cardioprotective effect of paeonol and Danshensu combination on isoproterenol-induced myocardial injury in rats [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11):e48872.
- [21] LIU L, NING B, CUI J, et al. miR-29c is implicated in the cardioprotective activity of *Panax notoginseng* saponins against isoproterenol-induced myocardial fibrogenesis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 198(23):1-4.
- [22] Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy [J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(5):1589-1596.

[责任编辑 邹晓翠]