

# 人参-三七-川芎提取物对糖尿病小鼠心肌纤维化的保护作用

胡艳红<sup>1</sup>, 王雪<sup>1</sup>, 方靖漪<sup>2</sup>, 杨静<sup>1</sup>, 修成奎<sup>1</sup>, 王佳丽<sup>1</sup>, 刘奕清<sup>1</sup>, 雷燕<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院医学实验中心, 北京市中医药防治重大疾病基础研究重点实验室, 北京 100700;  
2. 广东药科大学中医药研究院, 广东省代谢性疾病中西医结合研究中心, 广州 510006)

**[摘要]** 目的: 从心肌纤维化程度及心肌组织中胶原蛋白 I 型(Collagen I), 胶原蛋白 III 型(Collagen III) 及转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 蛋白表达, 探讨人参-三七-川芎提取物(GNC)对糖尿病小鼠心肌纤维化的保护作用。方法: 建立链脲佐菌素(STZ)联合高脂饲料诱导糖尿病小鼠模型, 另设正常组, 糖尿病小鼠按照随机数字表法分为模型组, GNC 低、高剂量组(0.819, 1.638 g·kg<sup>-1</sup>)及二甲双胍组(150 mg·kg<sup>-1</sup>)。各组均灌胃给药, 正常组给与等剂量的去离子水, 1 次/d, 连续 9 周。胶原纤维染色(Masson 三色染色法)观察小鼠心肌间质纤维化程度, 并用 Image-pro plus 6.0 分析软件计算胶原密度比值; 免疫组化检测小鼠心肌组织 Collagen I, Collagen III 及 TGF- $\beta_1$  蛋白表达情况; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠心肌组织内 Collagen I, Collagen III 和 TGF- $\beta_1$  的蛋白表达电泳及灰度值水平。结果: Masson 实验结果显示, 与正常组比较, 模型组小鼠心肌细胞肥大、变形, 心肌间质尤其是在微血管周围, 有大量蓝染的胶原纤维沉积, 相互连接交织成网状( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, GNC 低、高剂量组和二甲双胍组小鼠心肌细胞排列紊乱明显改善, 心肌间质蓝染的胶原纤维也较模型组明显减少( $P < 0.05$ )。免疫组化和 Western blot 结果显示: 与正常组比较, 模型组小鼠心肌组织 Collagen I, Collagen III 和 TGF- $\beta_1$  阳性表达, 蛋白表达含量明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组蛋白阳性表达均降低, 蛋白表达含量趋于正常( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论: STZ 联合高脂饲料能够诱导糖尿病小鼠心肌纤维化, 诱导 Collagen I, Collagen III 和 TGF- $\beta_1$  蛋白高表达。人参-三七-川芎提取物可通过调节 Collagen I, Collagen III 和 TGF- $\beta_1$  蛋白表达, 改善糖尿病小鼠心肌纤维化。

**[关键词]** 糖尿病; 心肌纤维化; 链脲佐菌素; 人参-三七-川芎提取物; 胶原蛋白 I 型(Collagen I); 胶原蛋白 III 型(Collagen III); 转化生长因子- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)08-0030-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200703

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191218.1217.003.html>

**[网络出版时间]** 2019-12-18 15:22

## Protective Effect of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma Extracts on Myocardial Fibrosis in Diabetic Mice

HU Yan-hong<sup>1</sup>, WANG Xue<sup>1</sup>, FANG Jing-yi<sup>2</sup>, YANG Jing<sup>1</sup>, XIU Cheng-kui<sup>1</sup>,  
WANG Jia-li<sup>1</sup>, LIU Yi-qing<sup>1</sup>, LEI Yan<sup>1\*</sup>

(1. China Academy of Traditional Chinese Medicine (TCM) Medical Experimental Center, Beijing Key Laboratory of Basic Research on Prevention and Treatment of Major Diseases by TCM, Beijing 100700, China;  
2. Chinese Medicine Research Institute of Guangdong Pharmaceutical University, Guangdong Research Center for Integrative Medicine in Metabolic Diseases, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effect of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma (GNC) extracts on myocardial fibrosis in diabetic mice by observing the degree of myocardial fibrosis and collagen types I (Collagen I), collagen types III (Collagen III) and transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) protein expression in myocardial tissues. **Method:** A diabetic mice model

**[收稿日期]** 20191012(016)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81673822); 中国中医科学院自主选题项目(ZZ2018014, ZZ2017011)

**[第一作者]** 胡艳红, 在读博士, 从事中西医结合心血管病研究, Tel:010-64089525, E-mail:huyanhong3737@163.com

**[通信作者]** \*雷燕, 博士, 首席研究员, 从事中西医结合心血管病研究, Tel:010-84076318, E-mail:13651217893@163.com

was induced by streptozotocin (STZ) and high-fat diet. A normal control group was established. According to random number table method, diabetic mice were divided into model group, GNC low-dose and high-dose groups ( $0.819, 1.638 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), and metformin group ( $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Intra-gastrical administration was given in all groups, and the mice in normal control group received an equal dose of deionized water once a day for 9 weeks. The myocardial interstitial fibrosis in mice was observed by Masson trichromatic staining. Image-pro plus 6.0 analysis software was used to calculate the ratio of collagen area to total area. Immunohistochemistry was used to detect Collagen I, Collagen III and TGF- $\beta_1$  protein expression in myocardial tissues. The protein expression electrophoresis and gray value levels of Collagen I, Collagen III and TGF- $\beta_1$  in the myocardial tissues were detected by Western blot. **Result:** The results of Masson staining showed that as compared with the normal control group, the myocardial cells of diabetic mice were hypertrophic and disordered, and the myocardial stroma, especially the blue-stained collagenous fibers around the blood vessels, were heavily deposited and connected to each other in a network ( $P < 0.01$ ). As compared with the model group, the arrangement of myocardial cells was significantly improved in GNC low-dose and high-dose groups and metformin group, and the collagenous fibers in the myocardial stroma were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Immunohistochemistry and Western blot results showed positive expression of Collagen I, Collagen III and TGF- $\beta_1$  in myocardial tissues, with significantly increased content of protein expression in diabetic mice ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). As compared with the model group, the positive protein expression decreased and the protein content tended to be normal in each administration group ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). **Conclusion:** High-fat diet combined with STZ can induce myocardial fibrosis in diabetic mice, and increase Collagen I, Collagen III and TGF- $\beta_1$  protein expression. Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma extracts can improve myocardial fibrosis in diabetic mice by regulating the expression of Collagen I, Collagen III and TGF- $\beta_1$  protein.

[**Key words**] diabetes; myocardial fibrosis; streptozotocin (STZ); Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma (GNC) extracts; collagen types I (Collagen I); collagen types III (Collagen III); transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )

国际糖尿病联盟公布数据显示,2017 年全球糖尿病患者(18 ~ 99 岁)约 4.51 亿人,预计到 2045 年,将增加到 6.93 亿人<sup>[1]</sup>。当前,糖尿病心肌纤维化是糖尿病患者常见的心血管并发症,是糖尿病心肌病(DCM)的特征性病理表现<sup>[2]</sup>,逐渐成为糖尿病患者高死亡率、高致残率的主要因素之一,因此寻求积极有效的防治方法是全球医疗尤其是中低收入发展中国家面临的挑战性工作。胶原蛋白 I 型(Collagen I)和胶原蛋白 III 型(Collagen III)分别占总胶原蛋白含量的 85%,11%。研究发现糖尿病心肌纤维化与 Collagen I 和 Collagen III 的累积有关,涉及左室和右室,并在 1 型和 2 型糖尿病中都有所发现<sup>[3-4]</sup>,可降低心肌顺应性,加速心力衰竭,并引发心律失常等心血管事件。许多研究表明,转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )是心肌成纤维细胞的转录因子,是一种促纤维化细胞因子。在糖尿病中,高血糖会引起 TGF- $\beta_1$  基因,TGF- $\beta_1$  蛋白及其受体的表达变化;活化的 TGF- $\beta_1$  会进一步导致细胞外基质沉积,加重心脏纤维化<sup>[5]</sup>。中药人参、三七粉、川芎分属于

益气活血药,糖尿病心脑血管疾病诊治使用广泛。本课题组前期研究发现益气活血中药人参-三七-川芎提取物(GNC)可改善缺血心肌病变和自然衰老大鼠心肌纤维化<sup>[6-8]</sup>。因此本实验建立链脲佐菌素(STZ)联合高脂饲料诱导的糖尿病小鼠模型,通过观察小鼠心肌纤维化,检测小鼠心肌组织中 Collagen I, Collagen III 和 TGF- $\beta_1$  蛋白表达情况,探讨 Collagen I, Collagen III 和 TGF- $\beta_1$  与糖尿病心肌纤维化之间的关系以及 GNC 对 STZ 联合高脂饲料诱导的小鼠心肌纤维化的干预作用,为进一步研究心血管疾病提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 4 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2016-0011,在 SPF 级动物中心分笼饲养,实验动物伦理委员会批号 2017-066,实验前动物适应性饲养 7 d。

**1.2 药物与试剂** 人参、三七粉、川芎均为道地药材,购自中国北京同仁堂(集团)有限责任公司。

经中国中医科学院中药研究所何希荣主管药师鉴定,3 味中药符合 2015 年版《中国药典》的规定和标准。GNC 按 2:3:4 比例破碎成粗粉后,用乙醇回收提取,最后浓缩、减压、干燥、粉碎成干膏粉,4 ℃ 避光保存备用(北京因科瑞斯医药科技公司制备,1 g 干膏粉等于 4.286 g 生药的含药量);STZ,二甲双胍(美国 Sigma 公司,批号分别为 WXBC3087V,BCBT7573)。4% 组织细胞固定液, Mayer 苏木素染色液, DAB 显色试剂盒, 马松(Masson)三色染色试剂盒, 高效 RIPA 裂解液(组织/细胞), BCA 试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 P1110-500 mL, G1080, ZLI-9019, G1340, R0010-20 mL, PC0020); Marker, Collagen I, Collagen III, TGF- $\beta_1$  兔多克隆抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab115832, ab34710, ab7778, ab92486); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国 Proteintech 公司,批号 10494-1-AP); 山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 ZB-2301); 超敏发光试剂盒(德国 Millipore 公司,批号 WBKLS0100)。

**1.3 仪器** TES-Valida 型高效石蜡包埋机, STP120 型组织脱水机(德国 Medite 公司); RM 2265 型全自动轮转式切片机, HI 1220 型烘片机(德国 Leica 公司); KMF 240 型恒温恒湿箱(德国 Binder 公司); BX61VS 型全自动生物荧光显微镜(日本 Olympus 公司); TGL-16G 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂); ALB-H 型 4 加热金属浴(韩国 Fineper 公司); 165-8001 型小型垂直电泳槽, PowerPac U 型电泳仪电源, 170-3940 型半干转印槽(美国 Bio-Rad 公司); SK-0180-E 型脱色摇床[大龙兴创实验仪器(北京)有限公司]; Amersham Imager 680 型超灵敏多功能成像仪(美国 GE 公司); OlyVIA 2.9 (Build 13735) 型奥林巴斯图像分析系统(日本 Olympus 公司); Image-Pro Plus 6.0 (IPP) 图像处理分析软件(美国 Media Cybernetics 公司); Image J Launcher (1.4.3.67) 图像处理分析软件(美国 National Institutes of Health 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组、模型复制及给药** 将 130 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为正常组, 模型组, GNC 低、高剂量组和二甲双胍组。除正常组外, 其余组高脂饲料持续性喂养 30 d 后, 腹腔注射 STZ (130 mg·kg<sup>-1</sup>) 诱导 2 型糖尿病小鼠模型, 正常组注射同剂量的无菌柠檬酸盐缓冲液<sup>[9]</sup>。造模 3 d 后取

小鼠尾静脉血检测随机血糖, 血糖值 > 16.7 mmol·L<sup>-1</sup> 视为糖尿病小鼠模型造模成功, 低于此浓度的 5 d 后再次补注 STZ 溶液 (80 mg·kg<sup>-1</sup>)<sup>[10]</sup>。模型复制成功 7 个月后分别灌胃给药: GNC 低剂量 (0.819 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), GNC 高剂量 (1.638 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) (其相当于临床有效剂量及两倍量) 和二甲双胍 (150 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 连续药物干预 9 周后结束实验。

**2.2 取材与标本制定** 小鼠药物干预完成后, 禁食 8 h, 称质量、麻醉、固定、备皮, 迅速打开胸腔取出心脏, 无菌生理盐水冲洗心腔内残余血液。分离左心室, 取部分心肌组织 4% 多聚甲醛固定, 以备后期形态学观察; 部分心肌液氮急速冷冻后 -80 ℃ 冰箱储存以备后期蛋白检测。

### 2.3 指标检测

**2.3.1 Masson 三色染色法检测小鼠心肌间质纤维化** 心肌组织用 4% 多聚甲醛固定后, 常规石蜡包埋切片; 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇脱水, 苏木素染色液, Masson 丽春红酸性复红液染色, 1% 磷钼酸水溶液 1~2 min 后立即给与苯胺蓝 1~2 min, 1% 冰醋酸水溶液分化, 最后依次梯度乙醇脱水、二甲苯透明、风干、中性树脂封片。全自动生物荧光显微镜下观察心肌间质纤维化并拍照, 图像分析系统 (Image-Pro Plus 6.0) 测量心肌间质胶原含量相对值。

**2.3.2 免疫组化观察小鼠心肌组织 Collagen I, Collagen III 和 TGF- $\beta_1$  蛋白表达和分布** 4% 多聚甲醛固定心肌组织后进行石蜡包埋、切片、脱蜡、脱水后置枸橼酸缓冲液盒进行微波修复; 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 30 min; 5% 山羊血清封闭 30 min; 抗原修复后, 加入一抗 Collagen I (1:5 000), Collagen III (1:5 000) 和 TGF- $\beta_1$  (1:3 000) 工作液, 同时用磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗设立阴性对照, 将切片放入湿盒中, 4 ℃ 恒温恒湿过夜孵育; 滴加山羊抗兔的二抗工作液 (1:1 000), 室温孵育 30 min; 滴加 ABC 工作液, 37 ℃ 孵育 60 min; DAB 显色; 苏木素复染; 二甲苯透明, 脱水, 封片。细胞呈现棕黄色为阳性判定依据。在高倍镜下, 每组切片均随机选取 6 个不重叠视野, 应用美国 Image-Pro Plus 6.0 全自动图像分析系统对阳性染色的积分吸光度 IA 进行定量分析, 以其中一个具有代表意义的阳性结果视野里的棕黄色颗粒为标准, 自动检测所有视野的阳性结果。

**2.3.3 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测小鼠心肌组织 Collagen I, Collagen III 和 TGF- $\beta_1$  蛋白表达**

水平 取冻存的心肌组织,在冰上用 PBS 冲洗干净后移至 5 mL 离心管中称质量、剪碎,然后按照每组织 20 mg 加入裂解液 200  $\mu$ L 的比例加入裂解液,进行电动匀浆(具体匀浆次数和频率根据组织裂解难易程度定),直至组织完全被打碎,肉眼看不见明显组织块。低温高速离心(4  $^{\circ}$ C, 12 000  $r \cdot \text{min}^{-1}$ , 5 min),收集上清液至新的离心管中。样品蛋白总浓度用 BCA 法测定,之后加入 5  $\times$  Loading buffer 混匀,100  $^{\circ}$ C 煮沸 7 min。按蛋白定量 25  $\mu$ g/孔上样,进行电泳及半干转,之后用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 以上,加一抗(1:5 000, 1:5 000, 1:3 000)4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。二抗(1:3 000)室温孵育 1.5 h 后,洗膜,滴加超敏发光显影液,进行自动曝光及扫描。

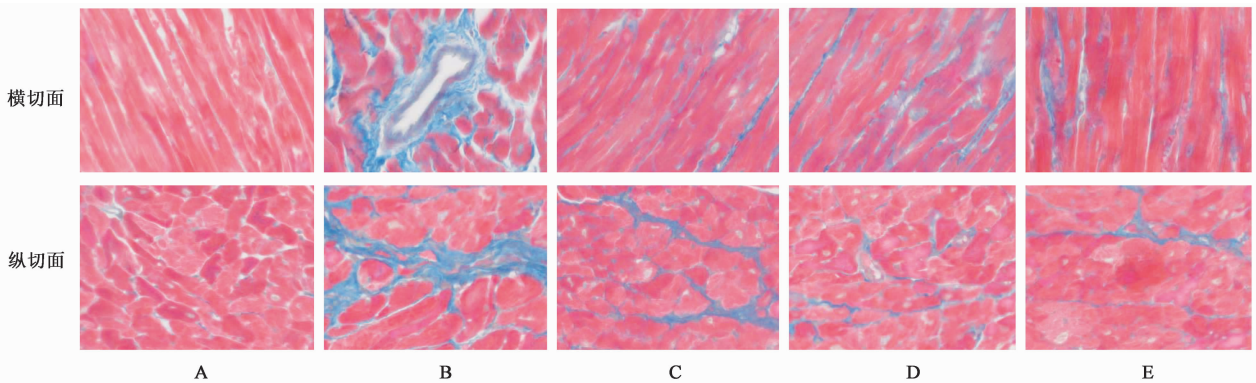
**2.4 统计学分析** 采用 SPSS 20.0 软件对文中具体数据进行统计学分析,实验数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 小鼠一般状态** 实验结束时,正常组小鼠精神状态良好,行动敏捷活泼,皮毛黑亮有光泽,尾巴

完整;与正常组比较,模型组小鼠精神欠佳,倦怠萎靡,烂尾,毛发较脏发黄发白,皮肤松弛,形体偏瘦并出现多饮、多尿、多食等现象;与模型组比较,GNC 低、高剂量组和二甲双胍组小鼠精神状态和皮毛色泽有明显好转。

**3.2 对糖尿病小鼠心肌间质纤维化的影响** Masson 三色染色显示,正常组小鼠心肌间质几乎无胶原纤维分布,心肌细胞结构形态正常,排列整齐,细胞核、胶原纤维呈蓝色,细胞浆、肌纤维呈红色,仅在心肌间质及血管周围见少量胶原纤维分布;与正常组比较,模型组小鼠心肌细胞肥大、排列紊乱,部分细胞肿胀变形、溶解。心肌间质尤其血管周围蓝染的胶原纤维大量沉积,相互连接成网状,排列紊乱,分布不均匀,甚者断裂、融合呈波浪状改变,可见纤维瘢痕形成;与模型组比较,各给药组小鼠心肌细胞排列紊乱明显改善,心肌间质蓝染的胶原纤维也较模型组明显减少,心肌纤维损伤均得到有效改善。与正常组比较,模型组小鼠心肌胶原纤维沉积较正常组胶原显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组小鼠心肌胶原明显降低( $P < 0.05$ )。见图 1,表 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. GNC 低剂量组;D. GNC 高剂量组;E. 二甲双胍组(图 2~5 同)

图 1 GNC 对糖尿病小鼠心肌间质纤维化的影响(Masson,  $\times 200$ )

Fig. 1 Effect of GNC on myocardial interstitial fibrosis in diabetes mice(Masson,  $\times 200$ )

表 1 GNC 对糖尿病小鼠心肌组织胶原相对面积的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Table 1 Effect of GNC on collagen relative area in myocardial tissues of diabetes mice( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	胶原
正常	-	0.024 $\pm$ 0.013
模型	-	0.093 $\pm$ 0.051 <sup>1)</sup>
GNC	0.819	0.065 $\pm$ 0.034 <sup>2)</sup>
	1.638	0.067 $\pm$ 0.370 <sup>2)</sup>
二甲双胍	0.15	0.060 $\pm$ 0.033 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

**3.3 对糖尿病小鼠心肌组织中 Collagen I, Collagen III 和 TGF- $\beta_1$  表达的影响** 免疫组化结果显示, Collagen I, Collagen III 和 TGF- $\beta_1$  蛋白在正常组小鼠心肌组织中微量存在,呈弱阳性表达;在高糖诱导的小鼠心肌组织中广泛存在,均呈强阳性表达,可见组织间有大量棕黄色物质沉积。与正常组比较,模型组大鼠心肌组织中 Collagen I, Collagen III 和 TGF- $\beta_1$  蛋白表达显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,GNC 低、高剂量组和二甲双胍组大鼠心肌组织中 Collagen I, Collagen III 和 TGF- $\beta_1$  蛋白表达明显减少( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图 2~4,表 2。

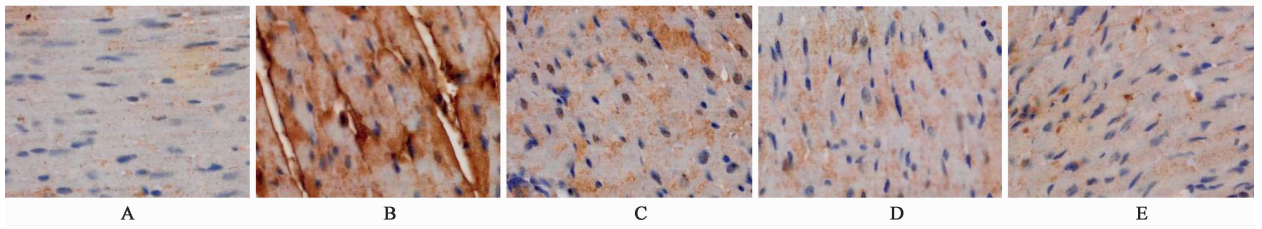


图 2 GNC 对糖尿病小鼠心肌组织中 Collagen I 蛋白表达的影响(免疫组化, ×300)

Fig.2 Effect of GNC on expression of Collagen I protein in myocardial tissue of each group of diabetes mice(IHC, ×300)

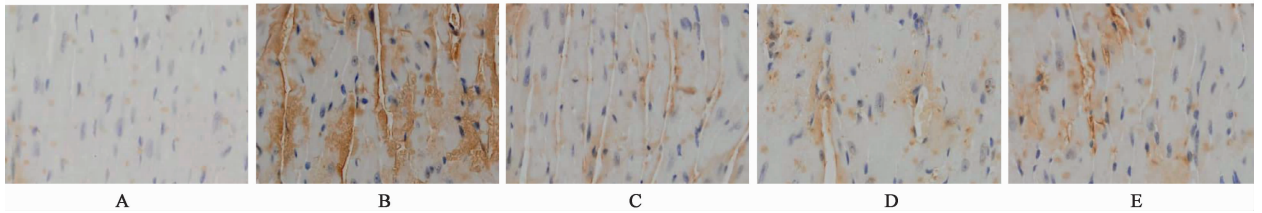


图 3 GNC 对糖尿病小鼠心肌组织中 Collagen III 蛋白表达的影响(免疫组化, ×300)

Fig.3 Effect of GNC on expression of Collagen III protein in myocardial tissue of each group of diabetes mice(IHC, ×300)

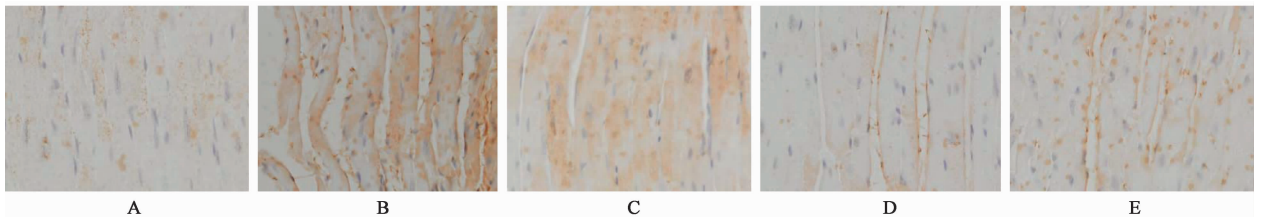


图 4 GNC 对糖尿病小鼠心肌组织中 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白表达的影响(免疫组化, ×300)

Fig.4 Effect of GNC on expression of TGF-β<sub>1</sub> protein in myocardial tissue of each group of diabetes mice(IHC, ×300)

表 2 GNC 对糖尿病小鼠心肌组织 Collagen I, Collagen III, TGF-β<sub>1</sub> 积分吸光度的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 2 Effect of GNC on optical density values of Collagen I, Collagen III and TGF-β<sub>1</sub> immunohistochemical staining in common carotid artery of diabetes mice( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Collagen I	Collagen III	TGF-β <sub>1</sub>
正常	-	0.101 ± 0.083	0.022 ± 0.018	0.026 ± 0.010
模型	-	0.266 ± 0.152 <sup>1)</sup>	0.159 ± 0.101 <sup>1)</sup>	0.105 ± 0.062 <sup>1)</sup>
GNC	0.819	0.152 ± 0.111 <sup>3)</sup>	0.083 ± 0.042 <sup>3)</sup>	0.072 ± 0.052 <sup>2)</sup>
	1.638	0.163 ± 0.090 <sup>2)</sup>	0.091 ± 0.054 <sup>3)</sup>	0.063 ± 0.041 <sup>3)</sup>
二甲双胍	0.15	0.151 ± 0.100 <sup>3)</sup>	0.083 ± 0.048 <sup>3)</sup>	0.065 ± 0.054 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> P < 0.01;与模型组比较<sup>2)</sup> P < 0.05, <sup>3)</sup> P < 0.01。

3.4 对糖尿病小鼠心肌组织内 Collagen I, Collagen III 和 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白表达的影响 与正常组相比较,模型组小鼠心肌组织中 Collagen I, Collagen III 和 TGF-β<sub>1</sub> 的蛋白含量明显升高(P <

0.05, P < 0.01);与模型组比较,GNC 低、高剂量组和二甲双胍组心肌组织中 Collagen I, Collagen III 和 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白含量明显降低(P < 0.05, P < 0.01)。见表 3,图 5。

表 3 GNC 对糖尿病小鼠心肌组织中 Collagen I, Collagen III 和 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白表达的影响(  $\bar{x} \pm s, n = 4$  )

Table 3 Effect of GNC on protein expressions of Collagen I, Collagen III and TGF-β<sub>1</sub> in myocardial tissue of diabetes mice(  $\bar{x} \pm s, n = 4$  )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Collagen I /GAPDH	Collagen III /GAPDH	TGF-β <sub>1</sub> /GAPDH
正常	-	1.02 ± 0.10	0.79 ± 0.13	0.80 ± 0.16
模型	-	1.58 ± 0.07 <sup>2)</sup>	1.15 ± 0.13 <sup>1)</sup>	1.38 ± 0.14 <sup>2)</sup>
GNC	0.819	1.17 ± 0.10 <sup>4)</sup>	0.96 ± 0.17 <sup>3)</sup>	0.96 ± 0.14 <sup>4)</sup>
	1.638	1.09 ± 0.12 <sup>4)</sup>	0.97 ± 0.23 <sup>3)</sup>	1.03 ± 0.11 <sup>3)</sup>
二甲双胍	0.15	1.12 ± 0.11 <sup>4)</sup>	0.99 ± 0.15 <sup>3)</sup>	0.94 ± 0.09 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

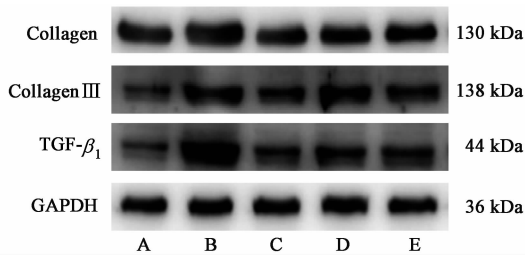


图 5 小鼠心肌组织中 Collagen I, Collagen III 和 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of protein expressions of Collagen I, Collagen III and TGF-β<sub>1</sub> in myocardial tissue of diabetes mice

#### 4 讨论

糖尿病是危害人类健康最常见的慢性疾病之一,可导致包括心脏在内的全身多脏器的结构及功能损伤。DCM 作为是糖尿病重要并发症之一,与糖尿病心血管疾病的高发生率、高死亡率密切相关<sup>[11]</sup>。心肌纤维化是心肌组织中胶原纤维过量沉积,浓度显著升高或胶原成分发生改变,以致排列紊乱,是心脏疾病发展到一定阶段的共同病理改变,是 DCM 最突出的病理组织学变化之一,是一种连续变化的过程。随着糖尿病的发展,心肌纤维化程度逐渐加重<sup>[12-14]</sup>。胶原纤维作为含量最多的一种纤维,广泛分布于各脏器内。因 HE 染色无法将胶原纤维和肌纤维用不同颜色显示,而胶原纤维定性特染可作到,故在心脏疾病的病理诊断和研究中胶原纤维染色具有实用价值。Masson 染色法作为经典的胶原纤维染色方法,可描述胶原的分布、排列以及纤维化面积,表达胶原总体的变化,因此本实验选做 Masson 染色检测心肌组织。本实验在饲养动物初期设计受试药 GNC 为 3 个剂量,STZ 诱导糖尿病模型成功后喂食高脂饲料的过程中,定期检测小鼠血糖和体质量,发现部分小鼠血糖降低。为保证药物

干预时,模型的一致性和成功率,把此部分小鼠剔除。考虑小鼠只数的减少,本实验只设计 GNC 低剂量组和 GNC 高剂量组。药物干预后,为确保 GNC 的药效,除定期检测小鼠血糖、体质量,还定期随机每组选取 1 只小鼠,做病理形态学观察和蛋白表达检测,综合各个指标的结果,选取药物干预为 9 周。9 周后检测发现,糖尿病小鼠心肌细胞肥大、排列紊乱,部分细胞肿胀变形、溶解。心肌间质尤其血管周围蓝染的胶原纤维大量沉积,相互连接成网状,排列紊乱,分布不均匀,甚者断裂、融合呈波浪状改变,纤维瘢痕形成。由此可看出,模型组小鼠心肌明显纤维化且损伤显著,高糖诱导小鼠心肌纤维化模型成功。

成纤维细胞主要合成与分泌细胞间质,是细胞外基质产生的主要来源,是心肌间质纤维化的主要效应细胞,在心肌纤维化中起到重要作用。心肌成纤维细胞合成与分泌的主要纤维为胶原纤维,其化学成分主要为 Collagen I, Collagen III, Collagen IV, Collagen V,其中以 I 和 III 型为主。I 型胶原含量占 80%,胶原纤维粗,弹性较差,有很强的抗牵拉特性可保持心肌的弹性及僵硬程度;III 型胶原占 11%,胶原纤维较细,伸展性强、弹性好。正常生理情况下,心肌中的胶原蛋白处于一种不断合成与降解的平衡状态,可以维持心脏结构和功能的完整性与协调性。但当任何一种胶原蛋白的浓度、成分及排列发生改变,均可导致心肌纤维化,是心肌纤维化发生的物质基础<sup>[15]</sup>。研究发现,糖尿病心肌纤维化过程中<sup>[16]</sup>,在各种信号因子如 TGF-β<sub>1</sub> 等的刺激下,纤维细胞转化为成纤维细胞,分泌大量的胶原纤维(Collagen I, Collagen III)和基质,可形成瘢痕组织防止心脏破裂;同时,由于过度分泌纤维和基质,造成细胞外基质沉积、胶原浓度升高及各型胶原比例失调,可使病变心室壁的顺应性下降,弹性减弱,心

功能受阻,最终导致心肌纤维化。TGF- $\beta_1$  广泛参与对炎症、细胞外基质沉积、细胞增殖分化生长的调节是与组织纤维化关系最为密切的细胞因子<sup>[17]</sup>。近年来许多研究表明,在糖尿病心肌组织中 TGF- $\beta_1$  及其受体蛋白表达显著增加,TGF- $\beta_1$  激活后引起心肌纤维化,并通过独立途径或激活下游 Smad 诱导 DCM<sup>[18-20]</sup>。因此本实验为进一步证实高糖诱导小鼠心肌纤维化,又采用免疫组化和 Western blot 观察 Collagen I, Collagen III, TGF- $\beta_1$  蛋白在心肌上的表达。实验结果显示, Collagen I, Collagen III, TGF- $\beta_1$  蛋白在正常组小鼠的心肌组织中呈弱阳性表达,在高糖诱导的小鼠心肌组织中均呈强阳性表达,可见心肌间质有大量棕黄色物质沉积,进一步证实模型成功。

糖尿病在中医学归属“消渴”范畴,首见于《黄帝内经·素问·奇病论》,阴虚津少,不能载血循经畅行,燥热内灼,煎熬阴血,可使血液干枯而成瘀滞,故以阴虚为本,燥热为标,治以滋补阴阳,益气活血。心为君主之官,主血脉,主藏神,为人体生命活动之本,各脏腑活动均受其支配而起作用。《黄帝内经·素问·平人气象论》曰“心藏血脉之气”,《黄帝内经·素问·脉要精微论》曰:“夫脉者,血之府也…细则气少,涩则心痛”,说明了心气为推动血液运行的动力,血气衰少会导致心痛的发作,心与气血的关系密切。中药人参、三七粉、川芎均属于益气活血中药,分别在糖尿病心血管疾病方面取得重要成就<sup>[21-23]</sup>,因此本实验将 3 味中药联合应用,以其观察配伍后对糖尿病小鼠心肌纤维化的保护作用。采用 GNC 干预高糖诱导的小鼠心肌纤维化后,本实验发现小鼠 GNC 低、高剂量组心肌细胞排列紊乱明显改善,心肌间质蓝染的胶原纤维也较模型组明显减少,改善 Collagen I, Collagen III, TGF- $\beta_1$  蛋白在小鼠心肌组织的表达,与阳性药二甲双胍药效一致,心肌纤维损伤均得到有效改善,提示 GNC 对 STZ 联合高脂饲料诱导的小鼠心肌纤维化有保护作用。

综上所述,本研究发 现 STZ 联合高脂饲料能通过改变小鼠心肌组织中 Collagen I, Collagen III, TGF- $\beta_1$  蛋白表达,诱导小鼠心肌纤维化,而 GNC 能够改善由 STZ 联合高脂饲料引起的小鼠心肌纤维化,调节 Collagen I, Collagen III, TGF- $\beta_1$  蛋白表达,进一步证实 GNC 对糖尿病小鼠心肌纤维化有保护作用。

【参考文献】

[1] CHO N H, SHAW J E, KARURANGA S, et al. IDF

Diabetes Atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pr*, 2018, 138:271-281.

[2] ZHAO T, CHEN H, XU F, et al. Liraglutide alleviates cardiac fibrosis through inhibiting P4 $\alpha$ -1 expression in STZ-induced diabetic cardiomyopathy [J]. *Acta Bioch Bioph Sin*, 2019, 51(3):293-300.

[3] SHIMIZU M, UMEDA K, SUGIHARA N, et al. Collagen remodelling in myocardia of patients with diabetes [J]. *J Clin Pathol*, 1993, 46(1):32-36.

[4] LI C, ZHANG J, XUE M, et al. SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2019, 18(1):15.

[5] WANG S Q, LI D, YUAN Y. Long-term moderate intensity exercise alleviates myocardial fibrosis in type 2 diabetic rats via inhibitions of oxidative stress and TGF- $\beta_1$ /Smad pathway [J]. *J Physiol Sci*, 2019, doi: 10.1007/12576-019-00696-3.

[6] 杜雪君,雷燕. 人参三七组方对大鼠缺血心肌 Ras 信号通路的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(2):214-218.

[7] 杜雪君,雷燕,杨静. 人参三七组方对急性心肌梗死大鼠缺血心肌血管内皮生长因子受体 2 和缺氧诱导因子 1 $\alpha$  表达的影响 [J]. *中西医结合学报*, 2018, 8(6):548-553.

[8] 景晓杨. 衰老大鼠血管和心肌细胞骨架的改变及人参三七川芎提取物的干预作用 [D]. 北京:中国中医科学院, 2016.

[9] 张吟,黄丹丹,张淑芬,等. C57BL/6J 糖尿病小鼠模型的优化研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(6):655-660.

[10] 方靖漪,王雪,雷燕,等. 人参-三七-川芎提取物延缓高糖诱导的小鼠血管衰老的机制探讨 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(4):81-86.

[11] ZAMORA M, VILLENA J A. Contribution of impaired insulin signaling to the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11):2833.

[12] PARIM B, UDDANDRAO V V S, SARAVANAN G. Diabetic cardiomyopathy: molecular mechanisms, detrimental effects of conventional treatment, and beneficial effects of natural therapy [J]. *Heart Fail Rev*, 2019, 24(2):279-299.

[13] HU X, BAI T, XU Z, et al. Pathophysiological fundamentals of diabetic cardiomyopathy [J]. *Compr Physiol*, 2011, 7(2):693-711.

[14] JIA G, WHALEY-CONNELL A, SOWERS J R.

- Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia-and insulin-resistance-induced heart disease [ J ]. *Diabetologia*, 2018, 61(1):21-28.
- [ 15 ] LU J, YAO Y, DAI Q, et al. Erythropoietin attenuates cardiac dysfunction by increasing myocardial angiogenesis and inhibiting interstitial fibrosis in diabetic rats[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2012, 11(1): 105.
- [ 16 ] GUO S, MENG X, YANG X, et al. Curcumin administration suppresses collagen synthesis in the hearts of rats with experimental diabetes [ J ]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(2):195.
- [ 17 ] 李庆敏, 瞿武林, 陈伯钧. 铁皮石斛对缺血再灌注后心衰心气虚型大鼠心肌纤维化的抑制作用 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(15):83-88.
- [ 18 ] MENG S, YANG F, WANG Y, et al. Silymarin ameliorates diabetic cardiomyopathy via inhibiting TGF- $\beta_1$ /Smad signaling [ J ]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(1): 65-72.
- [ 19 ] LI C, ZHANG J, XUE M, et al. SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart [ J ]. *Cardiovasc Diabetol*, 2019, 18(1):15.
- [ 20 ] WANG J, SHEN W, ZHANG J Y, et al. Stevioside attenuates isoproterenol-induced mouse myocardial fibrosis through inhibition of the myocardial NF- $\kappa$ B/TGF- $\beta_1$ /Smad signaling pathway [ J ]. *Food Funct*, 2019, 10(2):1179-1190.
- [ 21 ] XIE Z, TRUONG T L, ZHANG P, et al. Dan-Qi prescription ameliorates insulin resistance through overall corrective regulation of glucose and fat metabolism [ J ]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 172:70-79.
- [ 22 ] FAN X, ZHANG C, NIU S, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates hepatic insulin resistance induced by high-fat and high-sugar by inhibiting inflammation [ J ]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 854:247-255.
- [ 23 ] RAI U, KOSURU R, PRAKASH S, et al. Tetramethylpyrazine prevents diabetes by activating PI3K/Akt/GLUT-4 signalling in animal model of type-2 diabetes [ J ]. *Life Sci*, 2019, 236:116836.

[责任编辑 周冰冰]