

# 从 AMPK/mTOR 通路探讨人参-三七-川芎提取物对糖尿病小鼠心脏老化的保护作用机制

胡艳红<sup>1</sup>, 修成奎<sup>1</sup>, 杨静<sup>1</sup>, 王雪<sup>1</sup>, 方靖漪<sup>2</sup>, 王佳丽<sup>1</sup>, 刘奕清<sup>1</sup>, 刘逸南<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 AMP 激活的蛋白激酶 (AMPK) /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路的活化及心脏病理形态学变化、相关衰老蛋白的改变, 探讨人参-三七-川芎提取物 (GNC) 对糖尿病小鼠心脏老化的保护作用机制。方法: C57BL/6 雄性小鼠, SPF 级, 随机分为正常组和高糖组。高糖组腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 联合喂食高脂饲料, 造模成功后再次随机分为模型组, GNC 低剂量组 ( $0.819 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), GNC 高剂量组 ( $1.638 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 及二甲双胍组 ( $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。每天 1 次, 灌胃给药, 连续 9 周, 监测血糖变化。4 周龄雄性 C57BL/6 小鼠正常喂养 1 周, 为青年组。观察小鼠一般情况, 苏木素-伊红 (HE) 染色结合透射电镜 (TEM) 观察小鼠心脏病理形态学变化, 冯库萨 (Von Kossa) 染色判断小鼠心脏微血管钙盐沉积程度, 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测小鼠心脏组织中 AMPK/mTOR 信号通路活化状态, 以及衰老相关蛋白基质金属蛋白酶-2 (MMP-2), 抑癌基因 p53 (p53), 磷酸化抑癌基因 p53 (p-p53) 表达。结果: 与正常组比较, 模型组血糖显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组血糖明显下降 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。HE, TEM, Von Kossa 3 个病理形态学实验结果显示: 与正常组比较, 模型组小鼠心肌细胞肥大, 心肌纤维排列紊乱, 灶性溶解坏死, 线粒体肿胀、变性、嵴断裂、空泡变, 心脏微血管结构紊乱、染色不均匀、中内膜有大量钙盐沉积; 与模型组比较, 各给药组小鼠病理形态学变化均有不同程度的改善。与正常组比较, 模型组 MMP-2, p53 和 p-p53 蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), p-肝激酶 B1 (LKB1)/LKB1, p-AMPK/AMPK 蛋白明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), p-mTOR/mTOR, p-核糖体蛋白 S6 激酶 p70S6K/p70S6k 蛋白显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组 MMP-2, p53 和 p-p53 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), p-LKB1/LKB1, p-AMPK/AMPK 蛋白明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), p-mTOR/mTOR, p-p70S6k/p70S6k 蛋白明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。结论: STZ 联合高脂饲料能够诱导小鼠心脏老化, GNC 能够改善糖尿病小鼠心脏老化, 其作用机制可能与调控 AMPK/mTOR 通路相关蛋白表达有关。

**[关键词]** AMP 激活的蛋白激酶 (AMPK) /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路; 糖尿病; 人参-三七-川芎提取物; 高糖; 心脏老化; p53; 衰老

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)08-0038-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.20200704

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191219.0934.001.html>

**[网络出版时间]** 2019-12-19 11:32

## Explore Protective Mechanism of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma Extract on Cardiac Aging in Diabetic Mice Through AMPK/mTOR Pathway

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

**[收稿日期]** 20191024(027)

**[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

**[Abstract]** **Objective:** To explore the protective mechanism of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma (GNC) extracts on cardiac aging in diabetic mice by observing the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) /mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, changes of cardiac pathomorphological and related senescent proteins. **Method:** C57BL/6 male mice, SPF level, were randomly divided into normal control group and high-glucose group. The mice in high-glucose group were intraperitoneally injected with streptozotocin (STZ) and fed with high-fat diet. After successful modeling, they were randomly divided into model group, low-dose GNC group ( $0.819 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), high-dose GNC group ( $1.638 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and metformin group ( $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). The drug was administered by gavage once a day for a continuous period of 9 weeks. 4-week-old male C57BL/6 mice were normally fed for 1 week as a youth group. General conditions of mice were observed. Hematoxylin-eosin (HE) staining combined with transmission electron microscope (TEM) was used to observe the cardiac pathomorphology in mice. Von Kossa staining was used to determine the degree of calcium salt deposition in cardiac micro vessels. Western blot was used to detect the activation of signaling pathways in myocardial tissue of mice, as well as the expression levels of matrix metalloproteinases-2 (MMP-2), tumor suppressor p53 (p53), and phospho-tumor suppressor p53 (p-p53). **Result:** As compared with the normal group, the blood glucose in the model group increased ( $P < 0.01$ ), as compared with the model group, the blood glucose in each administration group decreased significantly ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The results of three pathological morphology experiments (HE, TEM, and Von Kossa) showed that as compared with the normal control group, the mice in model group showed cardiomyocytes hypertrophy, disordered arrangement of myocardial fibers, focal dissolving and necrosis, mitochondria swelling, degeneration, crest fracture, vacuolar alteration, disordered microvascular structure of the heart, uneven staining, and a large amount of calcium deposition in tunica media and intima. As compared with the model group, the pathomorphological changes of mice in each administration group were improved in varying degrees. Compared with the normal group, the expression levels of MMP-2, p53 and p-p53 protein in the model group were significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the protein ratios of p-liver kinase B2 (LKB1) /LKB1, p-AMPK/AMPK were significantly decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and the average gray level of p-mTOR/mTOR and p-p70S6 kinase (p70S6k) /p70S6k protein was significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), while the protein ratios of p-mTOR/mTOR, p-p70S6k/p70S6k were increased ( $P < 0.01$ ). As compared with the model group, the expression levels of MMP-2, p53 and p-p53 protein in each administration group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the protein ratios of p-LKB1/ LKB1, p-AMPK/AMPK were significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), while the protein ratios of p-mTOR/mTOR and p-p70S6k/p70S6k were decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** STZ combined with high-fat diet can induce cardiac aging in mice, and GNC can improve cardiac aging in diabetic mice, which may be related to the inhibition of AMPK/mTOR pathway related protein expression.

**[Key words]** AMP-activated protein kinase (AMPK) /mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway; diabetes; Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma (GNC) extract; high glucose; heart aging; p53; senescence

随着现代医学的发展,临床和基础研究发现衰老是一种伴随机体功能逐渐衰退涉及多器官、多因素、多系统的不可逆的正常生理过程,是心血管病、糖尿病等多种慢性疾病发生和发展的独立危险因素。糖尿病是一种全球范围的合并多种并发症的慢性代谢性疾病,以慢性高血糖为主要特征。近几十年来,糖尿病患病率呈直线上升趋势,研究发现,长期高血糖状态会加速细胞衰老,诱导血管老化,降低

心脏对应激的承受力,加速心脏老化,最终可导致心血管疾病在老年人群中患病率高发,缩短老年人寿命<sup>[1-2]</sup>。目前明显延缓高糖诱导心脏老化进程的有效药物还比较缺乏,因此,探讨糖尿病与心脏老化的机制,筛选延缓糖尿病心脏老化的药物具有重要的意义。

AMP 激活的蛋白激酶 (AMPK) /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路是影响衰老的主要信号通

路<sup>[3-6]</sup>,其通路激活可促进自噬通量、改善氧化应激,减轻心肌纤维化,发挥心脏保护作用<sup>[7-9]</sup>。现研究发现 AMPK 是所有真核细胞的能量感受器,在心脏组织中高度表达,与心脏老化关系密切<sup>[10-12]</sup>。mTOR 是 AMPK 下游的一种重要靶蛋白,也是能量代谢中的重要信号分子,与衰老关系密切<sup>[13]</sup>。作者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<sup>[14-15]</sup>和自然衰老大鼠心肌纤维化<sup>[16]</sup>,通过 AMPK/mTOR 通路还可改善糖尿病小鼠胸主动脉衰老<sup>[17]</sup>,但是否从 AMPK/mTOR 通路发挥保护糖尿病小鼠心脏老化的作用机制还不是特别明确。因此本次实验作者选取 AMPK/mTOR 信号通路,从多角度、多方位、多层次、多靶点证实 GNC 对糖尿病心脏老化的干预作用。故本次研究以链脲佐菌素(STZ)联合高脂饲料诱导的糖尿病小鼠心脏老化为模型,以 GNC 为研究对象,通过观察小鼠心脏病理形态学变化,检测小鼠心脏组织中衰老蛋白基质金属蛋白酶-2(MMP-2), p-p53 和 p53 及 AMPK/mTOR 信号通路表达情况,探讨益气活血药 GNC 对糖尿病小鼠心脏老化与 AMPK/mTOR 通路之间的关系,为进一步研究心血管疾病和衰老提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,体质量(18±20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2016-0011。实验动物伦理委员会批号 2017-066,在中国中医科学院中医基础理论研究所 SPF 级动物中心分笼饲养。动物房室温恒定 25℃,光照 12 h 更替,湿度适宜,循环通风换气,实验前动物适应性饲养 7 d。

**1.2 药物与试剂** STZ,二甲双胍(美国 Sigma 公司,批号分别为 WXBC3087V,BCBT7573);人参、三七粉、川芎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符合 2015 年版《中国药典》的规定和标准,其提取物由北京因科瑞斯医药科技公司制备。GNC 制备:人参-三七-川芎按 2:3:4 比例先破碎成粗粉,再用乙醇回收提取成分,最后浓缩、减压、干燥、粉碎成干膏粉<sup>[17]</sup>(1 g 干膏粉=4.286 g 生药),4℃避光保存备用;4% 组织细胞固定液,苏木素-伊红(HE)染色试剂盒,高效 RIPA 裂解液(组织/细胞),BCA 蛋白定量试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 P1110-500 mL, G1120, R0010-20 mL, PC0020);Von Kossa 染色试剂盒(武汉赛维尔生物

科技有限公司,批号 GP1054);2.5% Glu 固定液(电镜专用)(北京酷来搏科技有限公司,批号 SL1770-500 mL);光谱彩虹预染蛋白 Marker, p53, p-p53 兔多克隆抗体, AMPK, mTOR 兔单克隆抗体(英国 Abcam 公司,批号 ab115832, ab131442, ab1431, ab32047, ab32028);MMP-2 兔多克隆抗体,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国 Proteintech 公司,批号 10373-2-AP, 10494-1-AP);p-AMPK, p-mTOR, LKB1, p-LKB1 兔单克隆抗体, p70S6k, p-p70S6k 兔多克隆抗体(美国 Cell Signaling 公司,批号分别为 2535, 5536, 3047, 3482, 2708, 9208);辣根过氧化物酶(HRP)标记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);化学发光 HRP 底物(德国 Millipore 公司,批号 WBKLS0100)。

**1.3 仪器** RM 2265 型全自动轮转式切片机, HI 1220 型烘片机(德国 Leica 公司);STP120 型组织脱水机, TES-Valida 型高效石蜡包埋机(德国 Medite 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);H 7650 型透射电子显微镜(日本日立公司);TGL-16G 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂);ALB-H4 型加热金属浴(韩国 Finepcr 公司);Powerpac U 型垂直电泳系统(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)。

## 2 方法

**2.1 模型的建立及分组给药** 130 只雄性 C57BL/6 小鼠持续喂养高脂饲料 30 d 后,模型组腹腔注射 STZ(130 mg·kg<sup>-1</sup>),正常组注射同体积的无菌柠檬酸盐缓冲液。3 d 后小鼠随机血糖值 > 16.7 mmol·L<sup>-1</sup> 为糖尿病小鼠模型制备成功,血糖值低于此浓度的小鼠 5 d 后再次补注 STZ(80 mg·kg<sup>-1</sup>)<sup>[17]</sup>。模型复制成功 7 个月后,根据血糖和体质量,将糖尿病小鼠随机分为模型组, GNC 低剂量(0.819 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)组, GNC 高剂量(1.638 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)组和二甲双胍(150 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)组, 17 只/组。GNC 低、高剂量组和二甲双胍组根据小鼠与成人体质量等效剂量换算进行灌胃给药,非药物组灌胃相同体积的纯净水, 1 次/d,连续 9 周。给药结束前 7 d,购进一批 4 周龄雄性小鼠正常喂养,作为青年组。

**2.2 取材与标本制定** 小鼠药物干预完成后,禁食

8 h, 然后称质量、麻醉、固定、备皮, 迅速打开胸腔取出心脏, 用无菌生理盐水冲洗心腔内残余血液, 留取心脏组织标本。部分心肌组织用 4% 多聚甲醛固定以备后期形态学观察, 部分泡于 2.5% Glu 固定液 4 °C 存放以备电镜形态学观察, 部分放于液氮急速冷冻后 -80 °C 冰箱储存以备后期蛋白检测。

### 2.3 指标检测

**2.3.1 血糖检测** 造模及给药期间, 每 3 周测量 1 次小鼠随机血糖值。

**2.3.2 HE 染色** 观察小鼠心脏组织病理形态学变化 将固定后的心脏组织常规石蜡包埋切片后依次放入二甲苯、不同浓度乙醇、去离子水中脱蜡脱水, 之后分别用 Harris 苏木素和伊红染液染色。最后再用乙醇脱水, 二甲苯透明, 切片风干后中性树脂封片, 在光学显微镜下观察小鼠心脏组织病理形态学变化。

**2.3.3 透射电镜(TEM)** 观察小鼠心脏组织超微结构改变 2.5% 戊二醛固定, 磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗后再用 1% 锇酸固定。之后用丙酮脱水, 环氧树脂包埋。修块后, 切成 60 nm 大小的薄片。柠檬酸铅染色 10 min, 去 CO<sub>2</sub> 的双蒸水润洗 3 次, 再用醋酸双氧铀染色 30 min, 去 CO<sub>2</sub> 的双蒸水润洗 3 次, 切片干燥后, 在透射电子显微镜下观察小鼠心脏组织超微结构改变并拍照。

**2.3.4 Von Kossa 染色** 观察小鼠心脏组织微血管钙盐沉积程度 组织固定后, 采用石蜡包埋法制作蜡块, 然后常规脱蜡脱水; 之后在紫外灯下用 2% 硝酸银浸染 20 ~ 60 min; 随后蒸馏水洗 5 min; 然后用 5% 的硫代硫酸钠水溶液处理 2 min; 之后用去离子水洗 5 min; 再用 0.1% 核固红染液复染 2 ~ 3 min;

之后蒸馏水洗 5 ~ 10 s; 最后无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 切片风干后中性树脂胶封片, 在显微镜下观察心脏微血管钙盐沉积程度并拍照。

**2.3.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)** 检测小鼠心脏内衰老蛋白 MMP-2, p53, p-p53 表达及 AMPK/mTOR 信号通路活化状态 取冻存的心肌组织, 在冰上用裂解液裂解、匀浆后低温高速离心(4 °C, 12 000 r·min<sup>-1</sup>, 5 min), 收集上清液至新的离心管中。用 BCA 法测定样品蛋白总浓度, 之后加入 5 × Loading buffer 混匀, 100 °C 煮沸 7 min。SDS-PAGE 电泳及半干转后, 用 5% 脱脂奶粉或 5% BSA 室温封闭 2 h, 加一抗 4 °C 过夜。TBST 洗涤 3 次, 加二抗, 室温孵育 1.5 h, TBST 洗涤 3 次, 10 min/次。滴加化学发光 HRP 底物, 进行曝光、扫描, Image J 软件进行图像分析, 计算蛋白相对灰度值的表达。

**2.4 统计学分析** 采用 SPSS 20.0 软件对实验数据进行统计分析, 实验数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 One-way ANOVA 或 LSD 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对糖尿病小鼠血糖的影响** 与青年组比较, 正常组小鼠血糖无显著变化。药物干预前, 与正常组比较, 模型组、各给药组的血糖均显著升高( $P < 0.01$ ); 药物干预过程中, 正常组和模型组小鼠血糖值基本稳定, 各给药组的血糖值缓慢降低; 药物干预 9 周后, 与正常组比较, 模型组血糖显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较, GNC 低、高剂量组和二甲双胍组血糖明显下降( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 GNC 对糖尿病小鼠血糖的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effect of GNC on glucose of diabetes mice( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

mmol·L<sup>-1</sup>

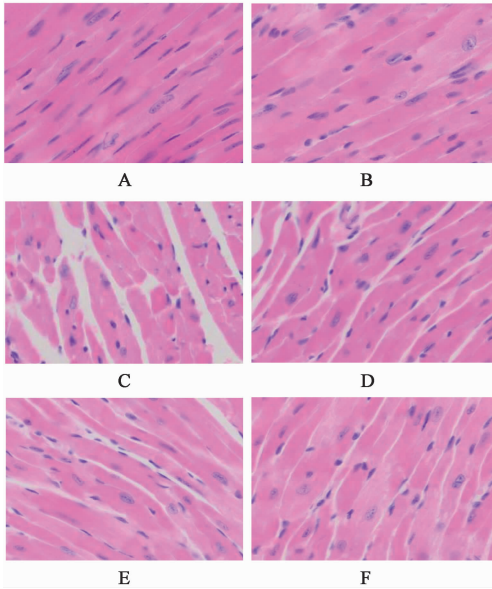
组别	剂量/ g·kg <sup>-1</sup>	干预前	干预 3 周后	干预 6 周后	干预 9 周后	取材前
青年	-	-	-	-	-	5.82 ± 1.03
正常	-	5.79 ± 0.93	6.19 ± 1.06	6.35 ± 1.71	6.18 ± 1.36	6.18 ± 1.36
模型	-	25.43 ± 4.17 <sup>1)</sup>	25.79 ± 6.13	26.14 ± 6.47	25.19 ± 7.58 <sup>1)</sup>	25.19 ± 7.58 <sup>1)</sup>
GNC	0.819	25.29 ± 5.05 <sup>1)</sup>	21.41 ± 6.13	21.56 ± 7.29	19.32 ± 9.86 <sup>2)</sup>	19.32 ± 9.86 <sup>2)</sup>
	1.638	26.70 ± 4.81 <sup>1)</sup>	20.21 ± 5.84	20.28 ± 7.01	18.87 ± 7.20 <sup>2)</sup>	18.87 ± 7.20 <sup>2)</sup>
二甲双胍	0.15	26.34 ± 4.09 <sup>1)</sup>	19.32 ± 6.92	19.06 ± 5.06	10.41 ± 2.52 <sup>3)</sup>	10.41 ± 2.52 <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>  $P < 0.01$ 。

**3.2 对糖尿病小鼠心脏组织病理形态学变化的影响** 青年组小鼠心肌细胞排列致密、有规则、核呈杆状, 细胞间质少, 无炎细胞浸润。心肌纤维分布较

均匀, 排列规则, 染色均匀。与青年组比较, 正常组小鼠心脏组织病理形态学变化不明显。与正常组比较, 模型组小鼠心脏组织中心肌细胞排列明显紊乱,

细胞间隙增宽,数量减少,细胞肥大,间质纤维化程度严重,间质血管充血,多量炎细胞浸润,心肌细胞广泛变性,并可见灶性坏死;与模型组比较,GNC低、高剂量组心肌细胞排列紊乱减轻,间质少量炎细胞浸润,细胞肥大、心肌增厚、心肌纤维断裂均有不同程度的改善。二甲双胍组心肌细胞排列紊乱、变形改善程度也较为明显。见图 1。



A. 青年组;B. 正常组;C. 模型组;D. GNC 低剂量组;E. GNC 高剂量组;F. 二甲双胍组(图 2~6 同)

图 1 GNC 对糖尿病小鼠心脏组织病理形态学的影响(HE, ×300)  
Fig.1 Effect of GNC on pathomorphology of cardiac tissue in diabetic mice(HE, ×300)

### 3.3 对糖尿病小鼠心脏组织超微结构改变的影响

青年组和正常组小鼠心脏组织内可见大量肌丝排列整齐,肌小节 Z 线清晰排列整齐,肌节呈明显周期性。细胞核无皱缩、破裂。间质基本无水肿,心肌纤维间存在大量糖原颗粒和线粒体,线粒体多呈圆形或椭圆形,形状规则结构完整,位于胞核旁与肌纤维束间。线粒体嵴丰富呈平行排列、完整无断裂,无空泡化现象;与正常组比较,模型组小鼠心脏组织内心肌纤维水肿、排列紊乱、灶性溶解坏死。肌小节失去正常结构,肌小节 Z 线发生紊乱粗细不等,甚至断裂或消失。细胞核皱缩,线粒体肿胀、变性、嵴空泡化、断裂。心肌组织的自噬泡明显增多,多呈新月形或半环形;与模型组比较,各给药组心脏病变均有不同程度的改善。见图 2,3。

3.4 对糖尿病小鼠心脏微血管钙盐沉积程度的影响 青年组和正常组小鼠心脏组织内微血管结构染色均匀,呈粉红色,为阴性,均未见明显钙盐沉积;与

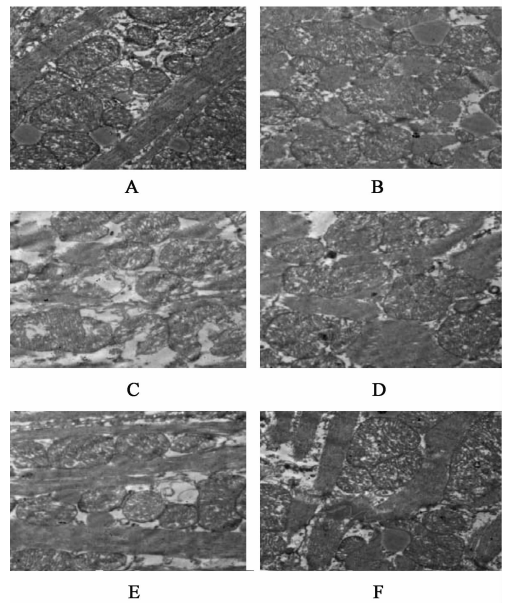


图 2 GNC 对糖尿病小鼠心肌细胞超微结构改变的影响(TEM, ×25 000)

Fig.2 Effect of GNC on ultrastructure changes of cardiomyocytes in diabetic mice(TEM, ×25 000)

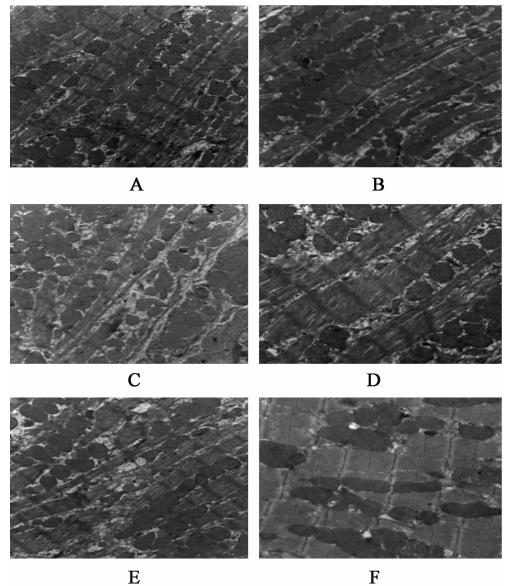


图 3 GNC 对糖尿病小鼠心肌纤维超微结构改变的影响(TEM, ×15 000)

Fig.3 Effect of GNC on ultrastructure changes of myocardial fibers in diabetes(TEM, ×15 000)

正常组比较,模型组小鼠心脏组织内微血管结构染色不均匀,内膜及中外膜弹性纤维间有大量棕色钙盐颗粒沉积,血管成棕褐色,正常血管结构被破坏。与模型组比较,各给药组小鼠心脏微血管内棕色颗粒沉着明显减少,证实其对微血管钙化具有保护作用。见图 4。

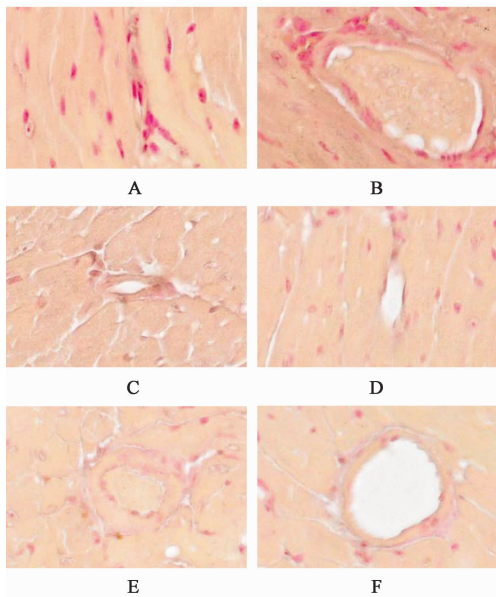


图 4 GNC 对糖尿病小鼠心脏微血管钙盐沉积程度的影响 (Von Kossa,  $\times 500$ )

Fig. 4 Effect of GNC on deposition of cardiac microvascular calcium salt in diabetes mice (Von Kossa,  $\times 500$ )

**3.5 对糖尿病小鼠心脏组织内衰老蛋白 MMP-2, p53, p-p53 表达的影响** 与青年组比较, 正常组小鼠心脏组织中 MMP-2, p53, p-p53 蛋白表达差异无明显统计学意义; 与正常组比较, 模型组 MMP-2, p-p53/p53, p53 蛋白表达均明显升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与模型组比较, GNC 低、高剂量组和二甲双胍组心脏组织中 MMP-2, p-p53/p53, p53 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图 5, 表 2。

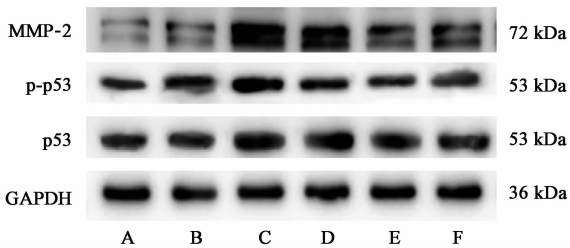


图 5 小鼠心脏组织中 MMP-2, p53 和 p-p53 蛋白表达电泳  
Fig. 5 Electrophoresis of MMP-2, p53 and p-p53 in cardiac tissue of mice

**3.6 对糖尿病小鼠心脏组织内 AMPK/mTOR 信号通路活化的影响** 与青年组比较, 正常组小鼠心脏组织中各蛋白表达相差不大, 差异无统计学意义; 与正常组比较, 模型组小鼠心脏组织中 p-LKB1, p-AMPK 蛋白表达明显降低, p-LKB1/LKB1, p-AMPK/AMPK 值明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。p-mTOR, p-p70S6k 蛋白表达显著升高, p-mTOR/

表 2 GNC 对糖尿病小鼠心脏组织内 MMP-2, p53 和 p-p53 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

Table 2 Effect of GNC on protein expressions of MMP-2, p53 and p-p53 in cardiac tissue of diabetes mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	MMP-2 /GAPDH	p-p53 /p53	p53 /GAPDH
青年	-	0.12 ± 0.09	0.52 ± 0.16	0.92 ± 0.39
正常	-	0.22 ± 0.10	0.59 ± 0.13	0.98 ± 0.26
模型	-	2.08 ± 0.67 <sup>1)</sup>	1.05 ± 0.33 <sup>2)</sup>	1.38 ± 0.44 <sup>2)</sup>
GNC	0.819	1.67 ± 0.31 <sup>3)</sup>	0.56 ± 0.15 <sup>4)</sup>	1.26 ± 0.24
	1.638	1.07 ± 0.32 <sup>4)</sup>	0.63 ± 0.23 <sup>3)</sup>	1.03 ± 0.25 <sup>3)</sup>
二甲双胍	0.15	1.13 ± 0.21 <sup>4)</sup>	0.69 ± 0.19 <sup>3)</sup>	1.04 ± 0.19 <sup>3)</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>  $P < 0.01$  (表 3 同)。

mTOR, p-p70S6k/p70S6k 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 p-LKB1/LKB1, p-AMPK/AMPK 蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), p-mTOR, p-p70S6k/p70S6k 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图 6, 表 3。

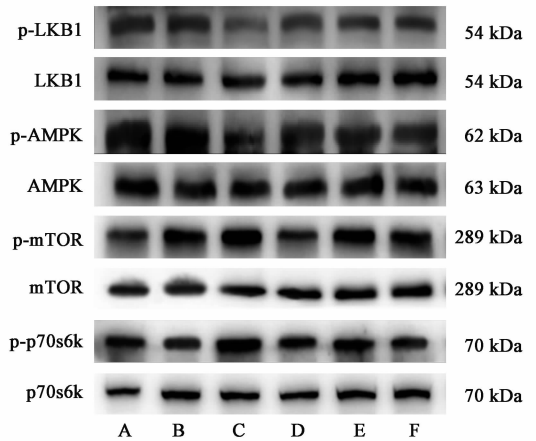


图 6 小鼠心脏组织内 AMPK/mTOR 信号通路蛋白表达电泳  
Fig. 6 Electrophoresis of AMPK/mTOR signaling pathway protein in cardiac tissues of mice

#### 4 讨论

衰老是身体各个器官组织结构和功能退行性改变的过程, 心脏作为人体最重要的器官之一, 随着年龄的增长, 心脏的结构、功能、节律逐渐衰退和恶化, 在糖尿病、高血压、高胆固醇血症等心血管风险因子的刺激下<sup>[18-20]</sup>, 心脏老化更能导致心脏对内源性和外源性应激源的易感性增加, 加速心血管疾病的发生, 继而引发多脏器供血障碍, 最终导致老年人患病率和死亡率增高。目前糖尿病已成为全球重大的公共卫生问题, 心肌细胞是无法分裂的永久性细胞, 致

表 3 GNC 对糖尿病小鼠心脏组织内 AMPK/mTOR 信号通路蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Effect of GNC on protein expression of AMPK/mTOR signaling pathway in cardiac tissues of diabetes mice( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p-LKB1/LKB1	p-AMPK/AMPK	p-mTOR/mTOR	p-p70S6k/p70S6k
青年	-	1.18 ± 0.67	1.52 ± 0.34	1.02 ± 0.27	1.32 ± 0.29
正常	-	1.12 ± 0.53	1.49 ± 0.23	1.12 ± 0.26	1.20 ± 0.17
模型	-	0.48 ± 0.07 <sup>1)</sup>	0.85 ± 0.33 <sup>2)</sup>	1.98 ± 0.54 <sup>2)</sup>	2.18 ± 0.64 <sup>2)</sup>
GNC	0.819	0.67 ± 0.19 <sup>4)</sup>	1.26 ± 0.41 <sup>4)</sup>	1.16 ± 0.14 <sup>4)</sup>	1.36 ± 0.24 <sup>4)</sup>
	1.638	0.79 ± 0.22 <sup>4)</sup>	1.17 ± 0.23 <sup>3)</sup>	1.43 ± 0.31 <sup>3)</sup>	1.53 ± 0.38 <sup>3)</sup>
二甲双胍	0.15	0.72 ± 0.18 <sup>4)</sup>	1.29 ± 0.35 <sup>4)</sup>	1.24 ± 0.29 <sup>4)</sup>	1.34 ± 0.19 <sup>4)</sup>

使心脏再生能力十分有限,因此研究糖尿病心脏老化的发病机制和干预措施,对如何延缓心脏老化、减少心脏老化引发相关疾病的发病率极为重要。目前主要有自发的糖尿病心脏老化模型和药物诱导的糖尿病心脏老化模型。STZ 是从链霉菌中提取的一种有效的 DNA 甲基化物质和胰腺细胞的一氧化氮供体,作为一种抗生素,抗肿瘤作用明显,但也具有明显的胰岛素毒性<sup>[21]</sup>。STZ 通过葡萄糖运载蛋白 2 (GLUT2)转运体进入胰岛的  $\beta$  细胞,可促使胰岛  $\beta$  细胞坏死及 DNA 断裂,增加脂质过氧化水平,抑制胰岛素释放,最终导致高血糖<sup>[22]</sup>。STZ 价格低廉、血糖稳定、制备模型周期较短,对心脏、肝脏等毒性较低,成功率高且易推广,是最常用于诱导糖尿病的药物,已被国内外学者广泛应用,且多数研究者认为 STZ 联合高脂饲料效果更好,是制备 2 型糖尿病动物模型较为理想的方案<sup>[23-24]</sup>。因此本实验采用 STZ 腹腔注射联合高脂饲料喂养进行糖尿病小鼠心脏老化模型制备。

大量研究证明心脏老化的特征主要为心肌肥大、细胞间质纤维化、细胞内钙离子处理异常、心肌细胞收缩功能受损和收缩/舒张时限延长、心脏形态和功能(射血分数和心输出量)逐步受损<sup>[25-26]</sup>。随着年龄的增长,心肌间质纤维化(即胶原蛋白的积聚)可导致心肌僵硬增加、心室舒张功能减退、冠状动脉血流储备下降、严重室性心律失常等<sup>[27]</sup>。本实验通过用 HE 染色,TEM 结合 Von Kossa 染色观察糖尿病小鼠心脏组织病理形态学变化,结果发现青年组和正常组小鼠心肌细胞排列致密、有规则,细胞间质少,心肌纤维分布较均匀,线粒体嵴丰富呈平行排列、完整无断裂、无空泡化现象,心脏微血管染色均匀,无钙盐沉积,两组之间差异不大,提示长时间造模没有造成正常组小鼠自身性衰老,引起实验误差,可作为模型的对照组;造模成功后的心肌细胞肥大,心肌纤维排列紊乱,灶性溶解坏死,线粒体肿

胀、变性、嵴断裂、空泡变,心脏微血管结构紊乱、染色不均匀、中内膜有大量钙盐沉积,以上从病理学改变提示糖尿病小鼠心脏老化模型制备成功;GNC 低、高剂量组和二甲双胍组一样,心肌细胞肥大、心肌增厚、心肌纤维断裂,线粒体嵴空泡化、断裂,心脏微血管钙盐沉积均有不同程度地改善,提示 GNC 可干预糖尿病小鼠心脏老化,进而发挥心脏保护作用。

MMP-2 在心肌中作用底物最为广泛,属明胶酶亚类,是早期心肌纤维化细胞外基质的主要分解酶。大量研究表明,MMP-2 过表达可破坏心脏组织中正常的胶原蛋白网络,促使缺乏连接结构的胶原逐步取代原本正常的间质结构,加重心肌纤维化,诱导心脏老化<sup>[28-29]</sup>;可致梗死后早期心脏破裂和晚期心脏重构。p53 是一个重要的肿瘤抑制基因,其介导的信号转导通路在细胞衰老的分子机制中扮演重要角色,可通过抑制细胞周期依赖性激酶诱导细胞 DNA 损伤,促使细胞周期停留在 G<sub>1</sub> 期,加速细胞衰老和凋亡<sup>[30]</sup>。p53 磷酸化通过控制下游靶基因的表达来阻滞细胞周期和促进凋亡,当细胞发生应激时,增加 p53 蛋白的稳定性<sup>[31-32]</sup>,因此,p53,p-p53 可以作为体内衰老的特征标志。在本研究中,小鼠造模后发现衰老标志物 MMP-2,p53,p-p53 蛋白表达明显提高,从蛋白含量说明 STZ 联合高脂饲料能够诱导小鼠心脏老化。GNC 组和二甲双胍组中 MMP-2,p53,p-p53 的蛋白表达较模型组均有显著性下调,提示 GNC 对糖尿病小鼠心脏老化具有一定的保护作用。

人们对心脏老化的临床特征已有深入了解,但是其具体的分子机制探究的还不是很清楚。现已发现,氧化应激、炎症、自噬障碍、钙平衡调节障碍等多个分子机制参与心脏老化的过程。AMPK/mTOR 是衰老机制中的一条重要信号通路,可以保护心功能对抗衰老和营养过剩引起的心功能损伤<sup>[33]</sup>;可调控血管平滑肌细胞表型转化以减少细胞衰老,参与血

管老化<sup>[34]</sup>;可拮抗高糖介导的氧化应激水平升高,调节能量代谢,延长线虫和小鼠的寿命<sup>[35]</sup>,因此探究 AMPK/mTOR 通路是否参与糖尿病小鼠心脏老化的这一过程意义重大。AMPK 是一种在系统发育上较保守的丝氨酸/苏氨酸,是一种公认的真核细胞的能量感受器,是维持心肌细胞内能量稳态的关键性调控分子,对 AMP/ATP 值变化敏感,可调节线粒体 ATP 的生成,满足机体对能量的需求<sup>[36]</sup>。AMPK 为异源三聚体蛋白酶,由 12 种催化  $\alpha$  亚基和调节  $\beta, \gamma$  亚基组成,在心肌细胞中以 AMPK $\alpha_2$ - $\beta_2$ - $\gamma_2$  表达为主,可预防氧化应激对细胞的损害,延缓机体衰老<sup>[37]</sup>。LKB1 作为 AMPK 主要的上游蛋白激酶,磷酸化后通过作用于 AMPK 的第 172 位点上的苏氨酸 (Thr172),可促使 AMPK 磷酸化从而被激活,使其在细胞生长、新陈代谢中发挥重要作用<sup>[38]</sup>。mTOR 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,即哺乳动物雷帕霉素靶蛋白,在外界刺激与细胞生长的调节起到关键作用,受活性氧的调控,是 AMPK 下游的一种重要靶蛋白。研究发现 AMPK 对 mTOR 有负向调节作用,AMPK 激活后通过增加 mTOR 的磷酸化能够抑制 mTOR 的活性,进而磷酸化 p70S6K 等下游靶蛋白,可延长寿命,保护衰老引起的心功能减退<sup>[39]</sup>。本研究从蛋白表达电泳和灰度值结果来看,青年组和正常组各蛋白表达无差异;STZ 联合高脂饲料诱导后小鼠心脏组织中各蛋白表达较正常组比较有显著性差异,由此可印证 AMPK/mTOR 通路活化在糖尿病小鼠心脏老化中的作用;GNC 干预后,各蛋白表达趋于正常,提示 GNC 通过干预糖尿病小鼠心脏老化过程中 AMPK/mTOR 通路的表达,可发挥心脏保护作用。

综上所述,本研究发现 STZ 联合高脂饲料能够诱导糖尿病小鼠模型心脏老化,而中药 GNC 通过 AMPK/mTOR 通路及其上下游的共同作用,能够有效改善糖尿病小鼠心脏老化,进而发挥其延缓衰老的作用。

#### [参考文献]

[1] GUO S, DENG W, XING C, et al. Effects of aging, hypertension and diabetes on the mouse brain and heart vasculomes[J]. *Neurobiol Dis*, 2019, 126: 117-123.

[2] ZHANG X, LIU C, LIU C, et al. Trimetazidine and l-carnitine prevent heart aging and cardiac metabolic impairment in rats via regulating cardiac metabolic substrates[J]. *Exp Gerontol*, 2019, 119: 120-127.

[3] SU Y, WANG T, WU N, et al. Alpha-ketoglutarate

extends *Drosophila* lifespan by inhibiting mTOR and activating AMPK [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11 (12): 4183.

[4] LI J, ZHAO R, ZHAO H, et al. Reduction of aging-induced oxidative stress and activation of autophagy by bilberry anthocyanin supplementation via the AMPK-mTOR signaling pathway in aged female rats [J]. *J Agr Food Chem*, 2019, 67(28): 7832-7843.

[5] ZHANG L, ZHOU F, YU X, et al. C/EBP $\alpha$  deficiency in podocytes aggravates podocyte senescence and kidney injury in aging mice [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(10): 1-15.

[6] YAN J, YAN J Y, WANG Y X, et al. Spermidine-enhanced autophagic flux improves cardiac dysfunction following myocardial infarction by targeting the AMPK/mTOR signalling pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176 (17): 3126-3142.

[7] ZHANG X, WANG Q, WANG X, et al. Tanshinone IIA protects against heart failure post-myocardial infarction via AMPKs/mTOR-dependent autophagy pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, doi: 10. 1016/j. biopha. 2019. 108599.

[8] LIU W, WANG Z, XIA Y, et al. The balance of apoptosis and autophagy via regulation of the AMPK signal pathway in aging rat striatum during regular aerobic exercise [J]. *Exp Gerontol*, 2019, doi: 10. 1016/j. exger. 2019. 110647.

[9] REN J, ZHANG Y. Targeting autophagy in aging and aging-related cardiovascular diseases [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2018, 39(12): 1064-1076.

[10] WANG S, KANDADI M R, REN J. Double knockout of Akt2 and AMPK predisposes cardiac aging without affecting lifespan: role of autophagy and mitophagy [J]. *BBA-Mol Basis Dis*, 2019, 1865(7): 1865-1875.

[11] WANG L, YUAN D, ZHENG J, et al. Chikusetsu saponin IVa attenuates isoprenaline-induced myocardial fibrosis in mice through activation autophagy mediated by AMPK/mTOR/ULK1 signaling [J]. *Phytomedicine*, 2019, doi: 10. 1016/j. phymed. 2018. 11. 024.

[12] LI S, ZHU Z, XUE M, et al. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and dysfunction via SIRT1 [J]. *BBA-Mol Basis Dis*, 2019, 1865(6): 1241-1252.

[13] LIU D, XU L, ZHANG X, et al. Snapshot: implications for mTOR in aging-related ischemia/reperfusion injury [J]. *Aging Dis*, 2019, 10(1): 116.

[14] 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.

- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] LAITEERAPONG N, HAM S A, GAO Y, et al. The legacy effect in type 2 diabetes: impact of early glycemic control on future complications (the Diabetes & Aging Study)[J]. *Diabetes Care*, 2019, 42(3):416-426.
- [19] SIMSEK B, YANAR K, KANSU A D, et al. Caloric restriction improves the redox homeostasis in the aging male rat heart even when started in middle-adulthood and when the body weight is stable[J]. *Biogerontology*, 2019, 20(1):127-140.
- [20] MIYAMOTO S. Autophagy and cardiac aging[J]. *Cell Death Differ*, 2019, 1(26):680-689.
- [21] YING Y, JIANG C, ZHANG M, et al. Phloretin protects against cardiac damage and remodeling via restoring SIRT1 and anti-inflammatory effects in the streptozotocin-induced diabetic mouse model[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(9):2822.
- [22] GRANGE C, TRITTA S, TAPPARO M, et al. Stem cell-derived extracellular vesicles inhibit and revert fibrosis progression in a mouse model of diabetic nephropathy[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):4468.
- [23] CHENG Y, YU X, ZHANG J, et al. Pancreatic kallikrein protects against diabetic retinopathy in KK Cg-A y/J and high-fat diet/streptozotocin-induced mouse models of type 2 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2019, 62(6):1074-1086.
- [24] WANG Q, WU X, SHI F, et al. Comparison of antidiabetic effects of saponins and polysaccharides from *Momordica charantia* L. in STZ-induced type 2 diabetic mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109:744-750.
- [25] KWAK H B. Aging, exercise, and extracellular matrix in the heart[J]. *J Exercise Rehabil*, 2013, 9(3):338.
- [26] YANG Z, JIANG S, SHANG J, et al. LncRNA: shedding light on mechanisms and opportunities in fibrosis and aging[J]. *Ageing Res Rev*, 2019, 52:17-31.
- [27] KWAK H B, KIM J, JOSHI K, et al. Exercise training reduces fibrosis and matrix metalloproteinase dysregulation in the aging rat heart [J]. *FASEB J*, 2011, 25(3):1106-1117.
- [28] AZMAN K F, ZAKARIA R. D-galactose-induced accelerated aging model: an overview [J]. *Biogerontology*, 2019, doi: 10. 1007/s10522-019-09837-y.
- [29] CHANG Y M, TAMILSELVI S, LIN H J, et al. *Alpinia oxyphylla* Miq extract ameliorates cardiac fibrosis associated with D-galactose induced aging in rats[J]. *Environ Toxicol*, 2019, 34(2):172-178.
- [30] 张宝霞,张金生,许二平,等. 补肾化瘀生新法协同静脉注射骨髓间充质干细胞对延缓大鼠衰老作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(24):116-121.
- [31] CHANG Y M, ASOKAN SHIBU M, Tsai C T, et al. Alpinate oxyphyllae extracts enhance the longevity and homing of mesenchymal stem cells and augment their protection against senescence in H9c2 cells[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7):12042-12050.
- [32] BARABUTIS N, UDDIN M A, CATRAVAS J D. Hsp90 inhibitors suppress p53 phosphorylation in LPS-induced endothelial inflammation [J]. *Cytokine*, 2019, 113:427-432.
- [33] ZHAN J K, WANG Y J, WANG Y, et al. Adiponectin attenuates the osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells through the AMPK/mTOR pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2014, 323(2):352-358.
- [34] LIN S, WANG Y, ZHANG X, et al. HSP27 alleviates cardiac aging in mice via a mechanism involving antioxidation and mitophagy activation [J]. *Oxid Med Cell Longevity*, doi:10. 1155/2016/2586706.
- [35] 任单单,李晶,常柏,等. 抵挡汤早期干预对糖尿病大鼠腺苷酸活化蛋白激酶信号通路的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(10):72-77.
- [36] 于永慧,张佩,刘剑刚,等. 气血并治方有效组分干预H/R损伤心肌细胞AMPK相关糖脂代谢通路的分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(6):89-95.
- [37] KWON S M, HONG S M, LEE Y K, et al. Metabolic features and regulation in cell senescence [J]. *BMB Rep*, 2019, 52(1):5.
- [38] 黄雅楠,董健健,徐陈陈,等. 肝豆汤对Wilson病模型高铜诱导的SH-SY5Y细胞自噬效应的影响及其作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(7):61-67.
- [39] HUA Y, ZHANG Y, CEYLAN-ISIK A F, et al. Chronic Akt activation accentuates aging-induced cardiac hypertrophy and myocardial contractile dysfunction: role of autophagy [J]. *Basic Res Cardiol*, 2011, 106(6):1173-1191.

[责任编辑 周冰冰]