

灯盏花素通过激活线粒体自噬途径减轻糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤

杨楠楠, 崔智慧, 张冰, 毕健琨, 马青青, 汪桂青*

郑州大学附属郑州中心医院 老年科, 河南 郑州 450000

摘要:目的 探讨灯盏花素对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤(MIRI)及线粒体自噬途径的影响。方法 采用高糖高脂饮食联合链脲佐菌素制备糖尿病模型, 糖尿病模型成功后再制备 MIRI 模型, 具体分组为对照组(不做任何处理)、模型组(糖尿病+MIRI)、假手术组(糖尿病), 均 ip 等体积生理盐水; 灯盏花素低、高剂量组(糖尿病+MIRI), 分别 ip 100、200 mg/kg 灯盏花素, 每组各 10 只。连续给药 14 d 后, 全自动生化仪检测各组大鼠血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平变化, ELISA 法检测各组大鼠血清中炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)含量, 采用超声检测各组大鼠心脏功能变化, HE 染色观察各组大鼠心肌组织病理变化, Western blotting 检测各组大鼠心肌组织微管相关蛋白轻链 3(LC3)、Beclin1、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、磷酸肌醇 3-激酶(PI3K)、p-PI3K、蛋白激酶 B(Akt)和 p-Akt 蛋白表达情况。结果 与对照组相比, 假手术组、模型组大鼠心肌细胞破碎、坏死, 细胞排列不规则, 心肌纤维断裂, 伴有炎症细胞浸润, 大鼠 FBG、血清 TC、TG、LDL-C 水平、心率(HR)、左心室舒张末压(LVEDP), 心肌组织 LC3-II/LC3-I、Beclin1 蛋白表达及血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著升高($P<0.05$), 血清 HDL-C 水平、左心室收缩压(LVSP)、平均动脉压(MAP)和左室射血分数(LVEF)及心肌组织 mTOR、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达显著降低($P<0.05$); 与模型组相比, 灯盏花素低、高剂量组大鼠损伤心肌细胞减少, 细胞形态逐渐恢复正常, 血清 TC、TG、LDL-C 水平、HR、LVEDP 及心肌组织 LC3-II/LC3-I、Beclin1 蛋白表达及血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平依次降低($P<0.05$), 血清 HDL-C 水平、LVSP、MAP、LVEF 及心肌组织 mTOR、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达依次升高($P<0.05$)。结论 灯盏花素可保护糖尿病 MIRI 大鼠心肌组织, 减轻组织自噬及炎症水平, 可能是通过激活线粒体自噬 PI3K/Akt/mTOR 通路实现的。

关键词: 灯盏花素; 线粒体自噬; 糖尿病; 心肌缺血再灌注; 磷酸肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)02-0219-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.02.002

Reduction of breviscapine on myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic rats by activating mitochondrial autophagy

YANG Nan-nan, CUI Zhi-hui, ZHANG Bing, BI Jian-kun, MA Qing-qing, WANG Gui-qing

Department of Geriatrics, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of breviscapine on myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) and mitochondrial autophagy pathway in diabetic rats. **Methods** Diabetes model was established by high sugar and high fat diet combined with streptozotocin. MIRI model was established after the success of diabetes model. The rats were randomly divided into control group (without any treatment), model group (diabetes + MIRI) and sham operation group (diabetes), all of which were intraperitoneally injected with equal volume normal saline; low and high dose breviscapine groups (diabetes + MIRI) were intraperitoneally injected with 100 and 200 mg/kg breviscapine respectively, with 10 rats in each group. After 14 days of continuous administration, the changes of serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were detected by automatic blood biochemical instrument, the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in serum were detected by ELISA, the changes of cardiac function were detected by ultrasound, HE staining was used to observe the myocardial pathological changes, and Western blotting was used to detect the

收稿日期: 2020-08-27

基金项目: 河南省科技攻关项目(182102310089)

作者简介: 杨楠楠(1987—), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向为糖尿病及其相关并发症的研究。E-mail: nnwork87@163.com

*通信作者: 汪桂青(1973—), 女, 河南郑州人, 本科, 主任医师, 研究方向为常见老年病及其并发症的治疗。E-mail: 964301668@qq.com

expressions of microtubule-associated protein light chain 3 (LC3), Beclin 1, mammalian target of rapamycin (mTOR), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), p-PI3K, protein kinase B (Akt) and p-Akt protein. **Results** Compared with the control group, the myocardial cells of sham operation group and model group were broken and necrotic, cell arrangement was irregular, myocardial fibers were broken accompanied by inflammatory cell infiltration, FBG, serum TC, TG, LDL-C levels, heart rate (HR), left ventricular end diastolic pressure (LVEDP), LC3-II/LC3-I, Beclin1 protein expression in myocardial tissue, and serum IL-1, IL-6, TNF- α level was significantly increased ($P < 0.05$), serum HDL-C level, left ventricular systolic pressure (LVSP), mean arterial pressure (MAP), left ventricular ejection fraction (LVEF) and mTOR, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt protein expression in myocardial tissue were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the number of injured cardiomyocytes in breviscapine low-dose and high-dose groups decreased, and the cell morphology gradually returned to normal. TC, TG, LDL-C levels in serum, HR, LVEDP, LC3-II/LC3-I, Beclin1 protein expression in myocardial tissue and levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in serum were decreased sequentially ($P < 0.05$), and the level of HDL-C in serum, LVSP, MAP, LVEF, and mTOR, p-PI3K/PI3K, and p-Akt/Akt protein expression in myocardial tissue were increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Breviscapine can protect the myocardial tissue of diabetic rats with MIRI, and reduce the levels of autophagy and inflammation, which may be achieved by activating the mitochondrial autophagy PI3K/Akt/mTOR pathway.

Key words: breviscapine; mitochondrial autophagy; diabetes mellitus; myocardial ischemia-reperfusion; phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin pathway

糖尿病是一种慢性代谢性疾病,其主要特征是机体血糖水平紊乱,发病率逐年上升,据统计,到 2025 年,全球将有约 3.6 亿糖尿病患者^[1]。糖尿病患者患心血管疾病的风险高于非糖尿病患者,在我国每年约有 300 万人死于心血管疾病,严重危害人们的生命健康^[2],缺血性心脏病是心血管疾病中常见病症,临床外科常用的治疗手段是及时恢复缺血区的血流供应即心肌缺血再灌注,但心肌缺血再灌注会使心肌造成更严重的损伤^[3],因此,探究心肌缺血再灌注损伤(MIRI)的发生机制,对找寻合适的药物预防和治疗缺血性心脏病具有重要意义。自噬在 MIRI 中发挥重要作用,研究显示通过调控磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路抑制 MIRI 的自噬作用,对心肌微血管内皮细胞有保护作用^[4]。灯盏花素是从中药中提取出来的,具有抗炎止痛、降糖、活血化瘀等药理作用^[5-7],研究表明灯盏花素对糖尿病肾病的治疗具有一定疗效^[8],但其在糖尿病 MIRI 中的作用尚不清楚。本研究通过制备糖尿病 MIRI 模型大鼠,给予灯盏花素进行治疗,观察其对糖尿病 MIRI 模型大鼠的心肌保护作用,为糖尿病 MIRI 临床治疗药物的开发提供一定的理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,6~8 周龄,体质量为 180~210 g,由北京维通利华实验动物技术有限

公司提供,动物许可证号:SYXK(京)2017-0033。

1.2 主要药品、试剂及仪器

灯盏花素购自上海瑞楚生物科技有限公司(质量分数 $\geq 98\%$,货号:R134928);柠檬酸钠、链脲佐菌素购自德国默克公司;白细胞介素 1 β (IL-1 β) ELISA 试剂盒、IL-6 ELISA 试剂盒、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司;兔源单克隆 PI3K、Akt、p-PI3K、Beclin1、微管相关蛋白轻链 3(LC3)、mTOR 抗体及兔源多克隆 p-Akt 抗体购自 CST 公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗购自北京博尔西科技有限公司;酶联免疫分析仪购自澳大利亚 Techan 公司;超低温冰箱购自美国 Thermo 公司;生物显微镜购自日本尼康公司;凝胶成像系统购自美国伯乐公司。OneTouch UltraVue 血糖仪及试纸购自美国强生公司;全自动生化分析仪 7180、HI VISION 900 彩色超声波诊断仪均购自日本日立公司。

2 方法

2.1 大鼠模型制备、分组和给药

参考文献方法^[9]制备糖尿病大鼠模型,将 50 只 SD 雄性大鼠随机分为对照组 10 只,喂养普通饲料;高脂高糖组 40 只,喂养高脂高糖饲料。喂养 30 d 后,高脂高糖组小鼠 ip 链脲佐菌素 30 mg/(kg·d),对照组小鼠 ip 等体积柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,连续注射 5 d 后,经尾静脉采血,测大鼠空腹血糖(FBG),FBG ≥ 16.7 mmol/L 则糖尿病大鼠模型制备成功。参考文献方法^[10]制备 MIRI 大鼠模型,将 40

只糖尿病模型大鼠随机分为假手术组、模型组和灯盏花素低、高剂量(100、200 mg/kg)组,每组各10只,用3%戊巴比妥钠进行麻醉,插管通过麻醉监测仪观察大鼠血压、心律稳定后,打开胸腔,除假手术组外各组大鼠在冠状动脉左前降支下结扎,当结扎部位以下心肌颜色变暗且心电图ST段升高,则表明心肌缺血成功,结扎30 min后剪开结扎线,使血流恢复再灌注2 h,心脏颜色变红,抬高的ST段降低1/2以上则再灌注成功。糖尿病MIRI大鼠模型构建成功后,灯盏花素低、高剂量组小鼠分别ip 100、200 mg/kg灯盏花素溶液(溶剂为生理盐水);对照组、假手术组、模型组小鼠均ip等体积生理盐水,连续给药14 d。

2.2 标本采集

末次给药后,尾静脉采血,测大鼠FBG后,采集尾静脉血5 mL,1 800 r/min(离心半径10 cm)离心10 min取血清,储存于-20℃冰箱保存。处死各组大鼠,取其心肌组织,剪取约0.5 g用于提取组织蛋白,储存在-80℃冰箱中备用,剩余心肌组织,用4%多聚甲醛溶液固定,做常规石蜡切片,备用。

2.3 各组大鼠血脂水平检测

取血清,用全自动血生化仪检测各组大鼠血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平。

2.4 各组大鼠心脏功能检测

末次给药后,ip 10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉大鼠,采用多普勒彩色超声检测仪,选取二维模式测定左心长轴切面,检测心率(HR)、左心室收缩压(LVSP)、左心室舒张末压(LVEDP)、平均动脉压(MAP)和左室射血分数(LVEF),连续3个完

整心动周期,取平均值。

2.5 各组大鼠血清中炎症因子水平检测

取血清,用ELISA试剂盒分别检测IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平,具体操作步骤参考其说明书。

2.6 各组大鼠心肌组织病理变化观察

将“2.2”项中心肌组织切片烘烤后、脱蜡至水化,苏木素染色、伊红染液复染,脱水,透明,封片,镜下观察心肌组织病理形态学变化。

2.7 各组大鼠心肌组织LC3、Beclin1、mTOR、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt蛋白表达水平检测

提取心肌组织蛋白,BCA法检测蛋白质量浓度,调整上样蛋白至50 μ g,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,转膜,加一抗(LC3、Beclin1、mTOR、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、 β -actin,1:1 000),4℃孵育过夜,次日,加二抗(1:5 000)室温孵育2 h,洗膜,加ECL发光液,用Bio-Rad成像系统检测蛋白灰度信号,以 β -actin为内参照,Image J软件定量分析蛋白表达情况。

2.8 统计学处理

采用SPSS 22.0统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 灯盏花素对糖尿病MIRI大鼠血糖、血脂水平的影响

与对照组相比,假手术组、模型组大鼠FBG及血清TC、TG、LDL-C水平显著升高($P < 0.05$),HDL-C水平显著降低($P < 0.05$);与模型组相比,灯盏花素低、高剂量组大鼠血清TC、TG、LDL-C水平依次降低($P < 0.05$),HDL-C水平依次升高($P < 0.05$)。见表1。

表1 灯盏花素对糖尿病MIRI大鼠血糖、血脂水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effect of breviscapine on blood glucose and blood lipid level of diabetic rats with MIRI ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	FBG/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	5.42 $\pm$ 0.37	1.49 $\pm$ 0.09	0.84 $\pm$ 0.08	1.03 $\pm$ 0.07	0.74 $\pm$ 0.03
假手术	—	18.05 $\pm$ 1.53*	6.12 $\pm$ 0.37*	2.74 $\pm$ 0.21*	0.52 $\pm$ 0.03*	1.42 $\pm$ 0.09*
模型	—	17.82 $\pm$ 1.61*	6.15 $\pm$ 0.42*	2.76 $\pm$ 0.19*	0.54 $\pm$ 0.04*	1.45 $\pm$ 0.08*
灯盏花素	100	17.30 $\pm$ 1.89*	5.53 $\pm$ 0.35* [#] Δ	1.82 $\pm$ 0.12* [#] Δ	0.72 $\pm$ 0.02* [#] Δ	1.03 $\pm$ 0.04* [#] Δ
	200	16.95 $\pm$ 1.75*	4.02 $\pm$ 0.41* [#] Δ [▲]	1.35 $\pm$ 0.13* [#] Δ [▲]	0.83 $\pm$ 0.05* [#] Δ [▲]	0.86 $\pm$ 0.05* [#] Δ [▲]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与假手术组比较: # $P < 0.05$; 与模型组比较: $\Delta P < 0.05$; 与灯盏花素低剂量组比较: $\Delta P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs sham operation group; $\Delta P < 0.05$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs low-dose of breviscapine group

3.2 灯盏花素对糖尿病 MIRI 大鼠血清炎症因子的影响

与对照组相比, 假手术组、模型组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与

假手术组比较, 模型组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 灯盏花素低、高剂量组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平依次降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 灯盏花素对糖尿病 MIRI 大鼠血清炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of breviscapine on levels inflammatory factors in serum of diabetic rats with MIRI ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-1 β /(μ g·L ⁻¹)	IL-6/(μ g·L ⁻¹)	TNF- α /(μ g·L ⁻¹)
对照	—	76.32 $\pm$ 12.04	207.48 $\pm$ 47.82	113.14 $\pm$ 22.17
假手术	—	123.25 $\pm$ 12.12*	460.14 $\pm$ 46.63*	236.25 $\pm$ 22.23*
模型	—	287.24 $\pm$ 30.16*#	776.23 $\pm$ 78.12*#	507.81 $\pm$ 42.04*#
灯盏花素	100	245.12 $\pm$ 25.31*# Δ	681.28 $\pm$ 67.34*# Δ	436.27 $\pm$ 42.35*# Δ
	200	212.37 $\pm$ 22.04*# Δ $\blacktriangle$	576.37 $\pm$ 58.52*# Δ $\blacktriangle$	327.38 $\pm$ 33.56*# Δ $\blacktriangle$

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与假手术组比较: # $P < 0.05$; 与模型组比较: $\Delta P < 0.05$; 与灯盏花素低剂量组比较: $\blacktriangle P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs sham operation group; $\Delta P < 0.05$ vs model group; $\blacktriangle P < 0.05$ vs low-dose of breviscapine group

3.3 灯盏花素对糖尿病 MIRI 大鼠心脏功能的影响

与对照组比较, 假手术组、模型组大鼠 HR、LVEDP 显著升高 ($P < 0.05$), LVSP、MAP、LVEF 显著降低 ($P < 0.05$); 与假手术组比较, 模型组大鼠 HR、LVEDP 显著升高 ($P < 0.05$), LVSP、MAP、LVEF 显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 灯盏花素低、高剂量组大鼠 HR、LVEDP 依次降低 ($P < 0.05$), LVSP、MAP、LVEF 依次升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.4 灯盏花素对糖尿病 MIRI 大鼠心肌组织病理变化的影响

对照组大鼠心肌细胞形态结构完整, 细胞排列紧密, 纤维结构排列规则; 与对照组相比, 假手术组细胞排列不规则, 纤维结构排列较紊乱; 与假手术组相比, 模型组大鼠心肌细胞破碎、坏死, 细胞排列不规则, 心肌纤维断裂, 伴有炎性细胞浸润; 与模型组相比, 灯盏花素低、高剂量组大鼠破碎、坏死的心肌细胞减少, 细胞形态逐渐恢复正常, 见图 1。

表 3 灯盏花素对糖尿病 MIRI 大鼠心脏功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of breviscapine on cardiac function of diabetic rats with MIRI ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	HR/(次·min ⁻¹)	LVSP/mm Hg	LVEDP/mm Hg	MAP/mm Hg	LVEF/%
对照	—	410.18 $\pm$ 27.14	148.23 $\pm$ 8.12	6.34 $\pm$ 0.33	135.54 $\pm$ 5.43	89.34 $\pm$ 3.24
假手术	—	448.27 $\pm$ 27.21*	137.16 $\pm$ 8.16*	7.16 $\pm$ 0.47*	127.61 $\pm$ 5.34*	80.13 $\pm$ 3.31*
模型	—	598.13 $\pm$ 29.63*#	102.56 $\pm$ 7.21*#	13.54 $\pm$ 0.64*#	83.27 $\pm$ 4.11*#	59.21 $\pm$ 3.01*#
灯盏花素	100	536.37 $\pm$ 29.10*# Δ	115.31 $\pm$ 7.32*# Δ	10.03 $\pm$ 0.83*# Δ	102.15 $\pm$ 6.28*# Δ	65.58 $\pm$ 3.65*# Δ
	200	487.16 $\pm$ 28.26*# Δ $\blacktriangle$	127.19 $\pm$ 8.02*# Δ $\blacktriangle$	8.76 $\pm$ 0.75*# Δ $\blacktriangle$	114.56 $\pm$ 6.79*# Δ $\blacktriangle$	75.32 $\pm$ 3.42*# Δ $\blacktriangle$

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与假手术组比较: # $P < 0.05$; 与模型组比较: $\Delta P < 0.05$; 与灯盏花素低剂量组比较: $\blacktriangle P < 0.05$ (1 mm Hg = 133 Pa)

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs sham operation group; $\Delta P < 0.05$ vs model group; $\blacktriangle P < 0.05$ vs low-dose of breviscapine group (1 mm Hg = 133 Pa)

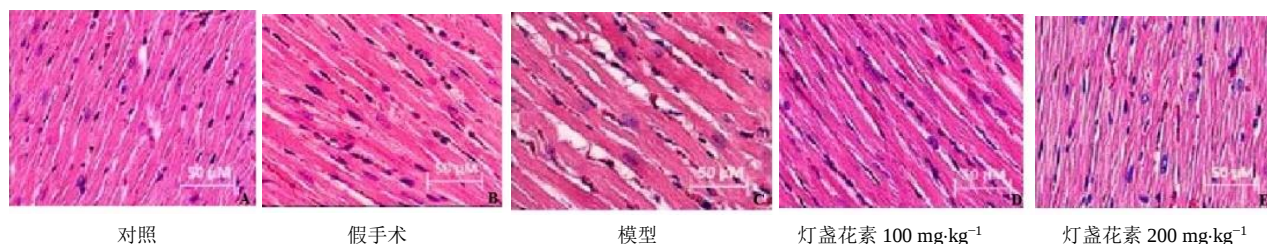


图 1 各组大鼠心肌组织病理形态学 HE 染色结果

Fig. 1 HE staining of myocardial histopathology of rats in each group

3.5 灯盏花素对糖尿病MIRI大鼠心肌组织自噬相关因子LC3-I、LC3-II、Beclin1蛋白表达的影响

与对照组相比,假手术组、模型组大鼠心肌组织LC3-II/LC3-I、Beclin1蛋白表达显著升高($P < 0.05$);与假手术组相比,模型组大鼠心肌组织LC3-II/LC3-I、Beclin1蛋白表达显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,灯盏花素低、高剂量组大鼠心肌组织LC3-II/LC3-I、Beclin1蛋白表达依次降低($P < 0.05$)。见图2和表4。

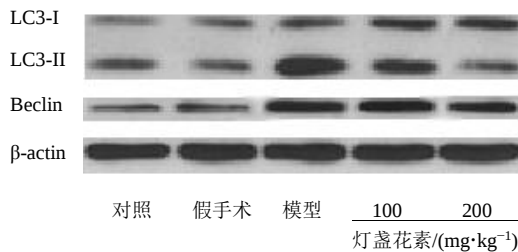


图2 各组大鼠心肌组织LC3-I、LC3-II、Beclin1蛋白表达(Western blotting)

Fig. 2 Protein expression of LC3-I, LC3-II and Beclin1 in myocardium of rats in each group (Western blotting)

表4 灯盏花素对糖尿病MIRI大鼠心肌组织LC3-I、LC3-II、Beclin1蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of breviscapine on the expression of LC3-I, LC3-II and Beclin1 protein in myocardium of diabetic rats with MIRI ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	LC3-II/LC3-I	Beclin1/β-actin
对照	—	0.45 ± 0.02	0.52 ± 0.03
假手术	—	0.50 ± 0.03*	0.60 ± 0.05*
模型	—	0.75 ± 0.05*#	0.79 ± 0.06*#
灯盏花素	100	0.64 ± 0.04*#△	0.72 ± 0.04*#△
	200	0.55 ± 0.02*#△▲	0.66 ± 0.03*#△▲

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与假手术组比较: # $P < 0.05$; 与模型组比较: △ $P < 0.05$; 与灯盏花素低剂量组比较: ▲ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs sham operation group; △ $P < 0.05$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ vs low-dose of breviscapine group

表5 灯盏花素对糖尿病MIRI大鼠心肌组织mTOR、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of breviscapine on the expression of mTOR, PI3K, p-PI3K, Akt and p-Akt in myocardium of diabetic rats with MIRI ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	mTOR/β-actin	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
对照	—	0.80 ± 0.06	0.75 ± 0.05	0.78 ± 0.04
假手术	—	0.75 ± 0.05*	0.69 ± 0.06*	0.72 ± 0.05*
模型	—	0.54 ± 0.03*#	0.49 ± 0.03*#	0.50 ± 0.04*#
灯盏花素	100	0.63 ± 0.04*#△	0.54 ± 0.02*#△	0.59 ± 0.03*#△
	200	0.70 ± 0.05*#△▲	0.64 ± 0.03*#△▲	0.67 ± 0.02*#△▲

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与假手术组比较: # $P < 0.05$; 与模型组比较: △ $P < 0.05$; 与灯盏花素低剂量组比较: ▲ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs sham operation group; △ $P < 0.05$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ vs low-dose of breviscapine group

3.6 灯盏花素对糖尿病MIRI大鼠心肌组织mTOR、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt蛋白表达的影响

与对照组相比,假手术组、模型组大鼠心肌组织mTOR、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt蛋白表达显著降低($P < 0.05$);与假手术组相比,模型组大鼠mTOR、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt蛋白表达显著降低($P < 0.05$);与模型组相比,灯盏花素低、高剂量组大鼠心肌组织mTOR、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt蛋白表达依次升高($P < 0.05$)。见图3和表5。

4 讨论

心肌缺血再灌注是治疗缺血性心脏病最佳治疗策略,同时会导致心脏损害^[11]。糖尿病是缺血性心脏病的独立危险因素,会加重MIRI,是患者死亡的主要原因^[12],但其具体机制尚不完全清楚。寻找能够有效减轻糖尿病MIRI,且有较好临床应用前景的药物是目前人们研究的重点之一。本研究发现,

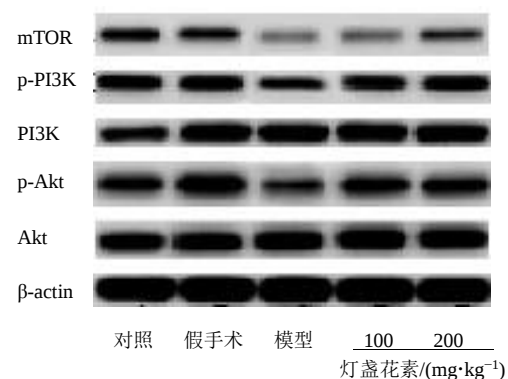


图3 各组大鼠心肌组织mTOR、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt蛋白表达(Western blotting)

Fig. 3 Expression of mTOR, PI3K, p-PI3K, Akt and p-Akt protein in myocardium of rats in each group (Western blotting)

模型组较对照组大鼠心肌细胞破碎、坏死, 细胞排列紊乱, 伴有炎性细胞浸润, 血清 TC、TG、LDL-C 水平、心脏 HR、LVEDP 显著升高, 血清 HDL-C 水平、LVSP、MAP、LVEF 显著降低, 与张卫强等^[13]研究结果一致, 提示大鼠心脏功能降低, 血脂水平紊乱, 糖尿病 MIRI 模型大鼠构建成功。灯盏花属于菊科植物, 灯盏花素是其主要活性成分, 在冠心病、心绞痛等心血管疾病中发挥重要作用^[14-15]。支英杰等^[16]研究发现, 灯盏花素可以改善不稳定型心绞痛患者血脂水平。Wang 等^[17]研究显示, 灯盏花素可以改善慢性完全阻塞患者血运重建后存活心肌的恢复, 减少不良心脏事件的发生。本研究发现, 与模型组相比, 灯盏花素低、高剂量组大鼠心肌组织病变症状减轻, 血清 TC、TG、LDL-C 水平依次降低, HDL-C 水平依次升高, 大鼠破碎、坏死的心肌细胞减少, 细胞形态逐渐恢复正常, 心脏 HR、LVEDP 依次降低, LVSP、MAP、LVEF 依次升高, 提示灯盏花素对机体血脂水平有调节作用, 增强心脏功能, 对糖尿病 MIRI 模型大鼠心肌组织有保护作用。

心肌缺血再灌注会引起广泛的微血管功能障碍, 从而加剧器官损害。MIRI 与先天免疫系统、炎症有关, 糖尿病会引起机体内血小板过度活跃, 加重 MIRI, 增加器官损害和死亡风险^[18]。本研究发现, 模型组较对照组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著升高, 与雷艺等^[19]研究结果一致, 提示糖尿病 MIRI 的发生伴随炎症反应。周莹等^[20]研究显示, 灯盏花素可以抑制炎症反应, 减轻感染性休克患者的心肌损伤程度。本研究发现, 与模型组相比, 灯盏花素低、高剂量组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平依次降低, 提示灯盏花素可以降低炎症因子分泌, 减轻糖尿病 MIRI 大鼠体内炎症反应。

线粒体功能障碍是导致糖尿病患者缺血性心脏病预后不良的重要原因, 线粒体自噬是调节线粒体内稳态并及时消除受损线粒体的关键过程^[21]。LC3 是自噬的标记物, mTOR 和 Beclin1 是 2 个重要的自噬相关分子在 MIRI 中起重要作用^[22]。本研究发现, 模型组较对照组大鼠心肌组织 LC3-II/LC3-I、Beclin1 显著蛋白表达升高、mTOR 蛋白表达显著降低, 提示糖尿病 MIRI 的发生引起机体自噬机制紊乱。Shi 等^[23]研究发现 mTOR 通过 AMPK/mTOR 和 PI3K/Akt/mTOR 途径在 MIRI 不同阶段发挥作用。Li 等^[24]研究显示, 激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路

对 MIRI 中过度自噬有抑制作用。本研究发现, 与模型组相比, 灯盏花素低、高剂量组大鼠心肌组织 LC3-II/LC3-I、Beclin1 蛋白表达依次降低, mTOR、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达依次升高, 提示灯盏花素可以通过促进 PI3K、Akt 发生磷酸化以激活 PI3K/Akt/mTOR 通路, 调节自噬相关蛋白表达, 进而抑制自噬水平。

综上所述, 灯盏花素可以通过调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路, 减少心肌损伤和细胞自噬、降低炎症因子表达, 改善糖尿病 MIRI 大鼠心脏功能。但灯盏花素药理活性较多, 其具体的其他作用分子机制仍需进一步探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li J J, Zhao Y, Zhou N, et al. Dexmedetomidine attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetes mellitus by inhibiting endoplasmic Reticulum stress [J]. *J Diabetes Res*, 2019, 2019: 7869318.
- [2] Petak S, Sardhu A. The intersection of diabetes and cardiovascular disease [J]. *Methodist Debaque Cardiovasc J*, 2018, 14(4): 249-250.
- [3] Chen W R, Liu H B, Chen Y D, et al. Melatonin attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting autophagy via an AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(5): 2067-2076.
- [4] Varadaraj G, Chowdhary G S, Ananthakrishnan R, et al. Diagnostic accuracy of stress myocardial perfusion imaging in diagnosing stable ischemic heart disease [J]. *J Assoc Physicians India*, 2018, 66(8): 40-44.
- [5] 齐睿娟, 孙桂波, 侯 睿, 等. 注射用灯盏花素对脂多糖致巨噬细胞炎症损伤的抑制作用 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2018, 32(10): 782-789.
- [6] Liu Y, Wen P H, Zhang X X, et al. Breviscapine ameliorates CCl₄-induced liver injury in mice through inhibiting inflammatory apoptotic response and ROS generation [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(2): 755-768.
- [7] 叶 立, 李建宇, 李月鹏, 等. 灯盏花素对大鼠脑微血管内皮细胞损伤的保护作用 [J]. *中草药*, 2011, 42(5): 955-957.
- [8] 赵 君, 支英杰, 赵 晖, 等. 灯盏花素注射剂治疗糖尿病性肾病的有效性和安全性: 随机对照试验的系统评价和 Meta 分析 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(4): 833-844.
- [9] Yu L M, Gong B, Duan W X, et al. Melatonin ameliorates

- myocardial ischemia/reperfusion injury in type 1 diabetic rats by preserving mitochondrial function: Role of AMPK-PGC-1 α -SIRT3 signaling [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41337.
- [10] 曹军涛, 王秀岩, 郭宜姣, 等. 异丙酚对2型糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制 [J]. 新乡医学院学报, 2019, 36(10): 917-921.
- [11] Namani R, Lee L C, Lanir Y, *et al.* Effects of myocardial function and systemic circulation on regional coronary perfusion [J]. *J Appl Physiol* (1985), 2020, 128(5): 1106-1122.
- [12] Russo I, Penna C, Musso T, *et al.* Platelets, diabetes and myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2017, 16(1): 71.
- [13] 张卫强, 王涛, 张志明, 等. 大鼠心肌缺血再灌注损伤模型的改进与评判 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(3), 26: 311-316.
- [14] 李响明, 孙胜斌, 姜国志. 灯盏花素注射剂质量控制研究进展 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(6): 971-978.
- [15] 巩晓英, 胥冰, 王继恒. 灯盏花素注射液联合阿司匹林治疗急性缺血性脑梗死患者临床观察 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(3): 429-432.
- [16] 支英杰, 赵君, 赵晖, 等. 灯盏花素注射剂治疗不稳定型心绞痛的有效性和安全性: 随机对照试验的系统评价和Meta分析 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(19): 3940-3955.
- [17] Wang M, Zhang W B, Song J L, *et al.* Effect of breviscapine on recovery of viable myocardium and left ventricular remodeling in chronic total occlusion patients after revascularization: Rationale and design for a randomized controlled trial [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 4602-4609.
- [18] Maiocchi S, Alwis I, Wu M C L, *et al.* Thrombo-inflammatory functions of platelets in ischemia-reperfusion injury and its dysregulation in diabetes [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2018, 44(2): 102-113.
- [19] 雷艺, 杨军, 李华, 等. 冬凌草甲素对大鼠糖尿病心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制 [J]. 免疫学杂志, 2019, 35(10): 838-845.
- [20] 周莹, 贾文旋, 马琴琴, 等. 灯盏花素对感染性休克患者心肌损伤的保护作用 [J]. 中国急救医学, 2018, 38(3): 229-232.
- [21] Anzell A R, Maizy R, Przyklenk K, *et al.* Mitochondrial quality control and disease: Insights into ischemia-reperfusion injury [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(3): 2547-2564.
- [22] 孙超, 薛富善, 李慧娴, 等. 自噬与糖尿病心肌缺血/再灌注损伤 [J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2019, 40(1): 72-75.
- [23] Shi B, Ma M, Zheng Y, *et al.* mTOR and Beclin1: Two key autophagy-related molecules and their roles in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 12562-12568.
- [24] Li X F, Hu X R, Wang J C, *et al.* Inhibition of autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR pathway contributes to the protection of hesperidin against myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Int J Mol Med*, 2018, doi: 10.3892/ijmm.2018.3794.

[责任编辑 刘东博]