

左归降糖舒心方对转基因 2 型糖尿病 MKR 鼠心肌损伤的保护作用

成细华¹, 喻嵘^{2*}, 吴勇军², 伍参荣¹, 吴慧¹

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

2. 湖南中医药大学 中西医结合临床重点学科, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 研究左归降糖舒心方对转基因 2 型糖尿病 MKR 鼠心肌损伤的保护作用。方法 以 MKR 鼠为研究对象, ig 左归降糖舒心方对其进行 30 d 治疗, 设野生 C57BL/6 鼠同期对照。用透射电镜观察小鼠心肌形态学改变; 比色法测定心肌中丙二醛 (MDA) 的量和超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性; 全自动生化分析仪检测心功能指标肌酸激酶同工酶 (CKMB) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 活性。结果 经左归降糖舒心方治疗后, MKR 鼠心肌组织形态学病变减轻, 心肌细胞线粒体嵴部分消失, 肌纤维排列较整齐; 心肌组织 MDA 量下降 ($P < 0.05$ 、 0.01), SOD 活性升高 ($P < 0.01$), 且呈剂量依赖性; 血清 CKMB 和 LDH 活性下降 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且呈剂量依赖性。结论 左归降糖舒心方可通过抗脂质过氧化, 对 MKR 转基因 2 型糖尿病 MKR 鼠心肌产生保护作用。

关键词: 左归降糖舒心方; 2 型糖尿病; MKR 鼠; 脂质过氧化; 心肌损伤

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)02-0343-03

Protective effect of Zuogui Jiangtang Shuxin Recipe on myocardial impairment in MKR mice

CHENG Xi-hua¹, YU Rong², WU Yong-jun², WU Cen-rong¹, WU Hui¹

1. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Key Discipline Integrated Traditional and Western Medicine, Changsha 410208, China

Key words: Zuogui Jiangtang Shuxin Recipe; type 2 diabetes; MKR mice; lipid peroxidation; myocardial impairment

糖尿病性心肌病变是糖尿病全身损害的重要组成部分, 它被认为是糖尿病心脏病死亡的首要因素。Brownlee^[1]提出的统一机制学说认为高糖引起线粒体中超氧阴离子生成过多, 导致组织细胞中发生氧化应激, 最终导致了糖尿病的各种并发症。中药及其复方对于治疗糖尿病及其并发症作用明显^[2-4], 以滋阴益气、活血解毒立法组成的左归降糖舒心方(由熟地、山茱萸、黄芪、菟丝子等 9 味药组成)具有降血糖和保护血管内皮细胞的作用^[5-6]。本实验采用透射电镜观察左归降糖舒心方对转基因 2 型糖尿病 MKR 鼠心肌病变的影响, 测定心肌组织内丙二醛 (MDA) 量、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性及血清心功能指标肌酸激酶同工酶 (CKMB)、乳酸脱氢酶 (LDH) 的量, 探讨左归降糖舒心方对 2 型糖尿病

小鼠心肌的保护作用及相关机制。

1 材料

1.1 动物

MKR 小鼠(采用组织特异性过度表达转基因技术产生)由美国国立卫生研究院(Dr. LeRoith)提供, 纯合子, 经自然交配后繁殖的子代用于实验观察。C57BL/6 野生鼠购自中南大学实验动物学部, SPF 级, 生产许可证号: SCXK(湘)2006-0002。

1.2 饲养条件及环境

实验用小鼠饲养在湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心。饲养笼具、垫料、饲料、饮水均按 SPF 级实验动物的要求进行制备与消毒。

1.3 药物

左归降糖舒心方中各药味购自湖南中医药大学

收稿日期: 2010-08-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973749); 湖南省自然科学基金杰出青年基金项目(08JJ1005); 湖南省中医药科研基金重点项目(2009003); 湖南省高校创新平台开放基金项目(09K059); 湖南省科技厅资助项目(2009SK3118); 中西医结合临床重点学科资助

作者简介: 成细华(1974—), 女, 湖南湘乡人, 博士, 副教授, 从事中医药防治糖尿病的机制研究。

Tel: 13787418152 E-mail: chengxihua0309@yahoo.com.cn

*通讯作者 喻嵘 Tel: (0731)88458072 E-mail: yurong@21cn.com

杏林药号，由湖南中医药大学附属第一医院王宇红教授鉴定。经水煎两次，合并煎液，滤过，浓缩至含生药 1 g/mL，4 °C 冰箱贮存备用。文迪雅，葛兰素史克（天津）有限公司，批号为 08030009。

1.4 试剂与仪器

考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒及 MDA、SOD 测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。JEOL—1230 透射电镜；Ultrospec 4300 紫外-可见分光光度计，瑞士安法玛西亚公司；日立 7150 全自动生化分析仪。

2 方法

2.1 左归降糖舒心方对 MKR 小鼠的干预作用

50 只经遗传鉴定的 MKR 小鼠在出生第 8 周时剪尾采血进行血糖检测。根据性别、体质量分组，随机分为 MKR 模型组，左归降糖舒心方高、中、低（49.92、24.96、12.48 g/kg）剂量组，文迪雅（0.52 g/kg）对照组，均 ig 给药。MKR 模型组和 C57BL/6 野生鼠对照组（10 只）ig 等体积蒸馏水，给药容量为 0.2 mL/10 g。每日定时 ig 1 次，连续给药 30 d，末次给药后 0.5 h，心脏取血，分离血清，-20 °C 冰箱保存备用。同时取心尖，4% 戊二醛溶液固定，用透射电镜观察心脏的超微结构。

2.2 指标检测

全自动生化仪检测心功能指标 CKMB 和 LDH。末次给药后 0.5 h，心脏取血后，分离各小鼠心脏，

与预冷的 PBS 缓冲液（1：9）冰上电动匀浆器匀浆，4 °C 离心，分离上清液，-20 °C 冰箱保存备用。上清液蛋白质定量、MDA 量及 SOD 活性测定严格按试剂盒说明书进行操作。

2.3 统计学处理

多组计量资料数据处理，采用 SPSS13.0 统计软件 One-way ANOVA 进行处理分析。

3 结果

3.1 透射电镜观察

透射电镜下可见正常 C57BL/6 野生鼠心肌纤维排列整齐，线粒体浓密；MKR 模型组小鼠心肌细胞周围水肿，部分肌节断裂消失，z 线模糊或消失，心肌细胞线粒体部分嵴部分膜断裂或消失；左归降糖舒心方各剂量组和文迪雅对照组心肌组织形态学病变明显减轻，心肌细胞线粒体嵴部分消失，肌纤维排列较整齐（图 1）。

3.2 左归降糖舒心方对 MKR 小鼠心肌 MDA 量和 SOD 活性的影响

模型组心肌 MDA 量显著高于 C57BL/6 野生鼠（ $P < 0.01$ ），而 SOD 活性显著低于 C57BL/6 野生鼠（ $P < 0.01$ ）。不同剂量左归降糖舒心方和文迪雅治疗后，均能使 MKR 鼠心肌 MDA 量显著降低（ $P < 0.05$ 、 0.01 ），SOD 活性显著增强（ $P < 0.01$ ），且呈剂量依赖性，结果见表 1。

3.3 左归降糖舒心方对 MKR 小鼠心功能指标的影响

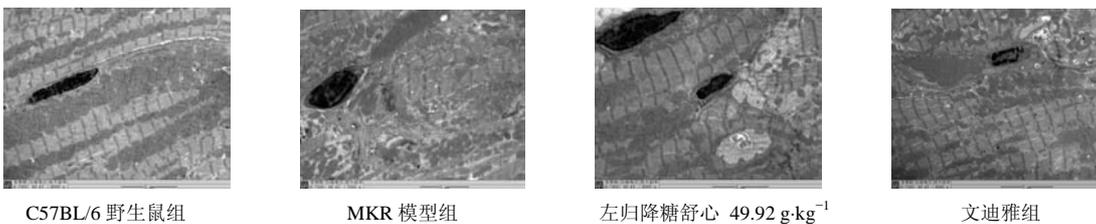


图 1 心肌透射电镜图

Fig.1 Transmission electron micrography of myocardia in mice

表 1 左归降糖舒心方对 MKR 小鼠心肌 MDA 量和 SOD 活性及血清 CKMB、LDH 活性的影响（ $\bar{x} \pm s, n = 10$ ）

Table 1 Effect of Zuogui Jiangtang Shuxin Recipe on MDA content and SOD activities in myocardia tissue and activities of CKMB and LDH in serum of MKR mice（ $\bar{x} \pm s, n = 10$ ）

组别	剂量	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	CKMB/(U·L ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)
C57BL/6野生鼠	—	5.02±0.50*	119.18±11.65**	130.1±19.0**	435±45**
MKR模型	—	5.85±0.63	72.52±10.55	226.3±38.8	1 309±119
左归降糖舒心方	12.48	4.22±0.84*	109.47±14.23**	188.6±18.3*	925±68*
	24.96	3.65±0.61**	110.53±14.54**	185.2±21.3*	823±57**
	49.92	3.12±0.81**	117.21±12.33**	176.3±11.4**	752±44**
文迪雅组	0.52	4.50±0.79*	116.94± 6.77**	153.4±11.4**	706±29**

与模型组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ，表 2 同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, Table 2 is same

MKR 模型鼠心功能指标血清 CKMB 和 LDH 活性均高于 C57BL/6 野生鼠 ($P < 0.01$)。不同剂量左归降糖舒心方和文迪雅治疗后, 均能使 MKR 鼠血清 CKMB 和 LDH 活性下降 ($P < 0.05, 0.01$), 且呈剂量依赖性, 结果见表 1。

4 讨论

糖尿病性心肌病是糖尿病致死的主要原因之一^[7-9]。在糖尿病的发生、发展过程中, 葡萄糖自身强氧化作用可产生大量的活性氧 (ROS) 自由基, 且葡萄糖和蛋白质发生的非酶糖化反应, 也能促进 ROS 形成。另外, 高血糖可致抗氧化酶 (SOD、CAT) 等的糖基化, 使抗氧化酶活性降低, 导致氧化与抗氧化系统失衡, 清除自由基的能力降低^[8]。自由基对机体组织损伤的程度主要与 MDA 量及 SOD 活性变化相关^[9]。自由基引起心肌组织损伤, 致使一些重要的心肌酶 CKMB 及 LDH 外漏, 使得其在血清中的活性升高。

随着 2 型糖尿病及其血管并发症炎症反应、氧化应激发病学说的发展, 2 型糖尿病及其慢性并发症通常具有的“虚、瘀、毒”的中医病机, 与炎症反应、氧化应激发病学说之间有相当的认同性, 2 型糖尿病及其并发症的“虚”, 主要是肝肾阴虚, 脾气亏虚, 是机体产生炎症反应、氧化应激损伤的基本条件, 而“瘀、毒”等病理产物的形成与聚积又标志着炎症因子的聚集、高凝状态、活性氧和活性氮的产生、以及炎症反应、氧化应激损伤的发生发展。同时, 中医又有“脾肾为先后天之本”、“脾主四肢肌肉”的认识, 本研究中所采用的 MKR 小鼠, 因其骨骼肌特异性胰岛素样生长因子-1 受体和胰岛素受体功能缺失而出现的糖代谢异常、胰岛 β 细胞分泌障碍、胰岛素抵抗及慢性炎症状态 (如 FFA、血液及肝脏中甘油三酯水平异常) 等, 似与“虚、瘀、毒”的病机认识更有一致性^[10-13]。本实验中转基因 2 型糖尿病 MKR 鼠心肌组织 MDA 量升高, 而 SOD 活性降低, 血清 CKMB 及 LDH 活性升高, 心肌细胞超微结构异常, 说明 MKR 鼠心肌细胞受到氧化应激损伤, 使得细胞内的 CKMB 和 LDH 外漏入血, 导致血中 CKMB 和 LDH 活性升高。本课题组在前期临床研究与临床文献调研中认为 2 型糖尿病主要病理机制为气阴两虚, 夹瘀血热毒 (虚、瘀、毒), 并据此以滋阴益气、活血解毒立法组成的左归复方, 分别用于 2 型糖尿病及其合并症的防治, 已取得较好疗效^[5-6, 11-12]。本研究以左归降

糖舒心方对 MKR 鼠进行干预治疗, 结果表明其能降低 MKR 鼠心肌 MDA 量, 升高 SOD 活性, 减轻自由基对心肌的损伤, 并维持心肌细胞正常超微结构, 减少了心肌酶 CKMB 及 LDH 外漏。左归降糖舒心方可能是通过降低 2 型糖尿病 MKR 鼠血糖水平, 抑制 2 型糖尿病 MKR 鼠心肌组织的氧化应激损伤, 从而减轻高血糖所致的心肌损伤, 保护 MKR 鼠心肌免受 ROS 损伤。

参考文献

- [1] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications [J]. *Nature*, 2001, 414: 813-820.
- [2] 吴家胜, 陆雄, 马越鸣, 等. 泻心汤对糖尿病大鼠早期肾病的影响 [J]. *中草药*, 2010, 41(1): 73-77.
- [3] 马正东, 陈磊, 宋洪涛, 等. 白背三七水提物对 2 型糖尿病大鼠的降血糖作用及其机制 [J]. *中草药*, 2010, 41(4): 623-626.
- [4] 岳南, 只德广, 赵益桂, 等. 糖复康胶囊治疗糖尿病肾病的主要药效学研究 [J]. *现代药物与临床*, 2009, 24(1): 43-48.
- [5] 喻嵘, 陈大舜. 左归丸加减方对实验性糖尿病大鼠降糖作用的实验研究 [J]. *中国中医药科技*, 2000, 7(3): 157-159.
- [6] 喻嵘, 陈大舜, 梅志刚, 等. 左归双降方对葡萄糖、胰岛素、低密度脂蛋白诱导损伤的血管内皮细胞 ICAM-1、tPA、PAI 的影响 [J]. *中医药学刊*, 2005, 23(1): 61-63.
- [7] 许琪, 夏晓英, 陈慎仁. 益母草防治实验性糖尿病心肌损伤的研究 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2007, 15(6): 370-371.
- [8] Maritim A C, Sanders R A, Watkins J B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2003, 17(1): 24-38.
- [9] 刘朝巍, 石如玲, 齐锦生, 等. 氨基胍对糖尿病大鼠心肌损伤的拮抗作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(3): 505-508.
- [10] Kim H, Pennisi P, Zhao H, et al. MKR mice are resistant to the metabolic actions of both insulin and adiponectin: discordance between insulin resistance and adiponectin responsiveness [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 291(2): 298-305.
- [11] 吴勇军, 喻嵘, 胡伟, 等. 滋阴益气活血解毒组方对 MKR 转基因 2 型糖尿病小鼠糖代谢的影响 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2007, 27(2): 20-23.
- [12] 成细华, 喻嵘, 吴勇军, 等. 左归复方对 MKR 转基因 2 型糖尿病鼠 PPAR γ 表达的影响 [J]. *中药新药与临床研究*, 2009, 20(5): 111-115.
- [13] 吴刚强, 喻嵘. 滋阴益气活血解毒法与 2 型糖尿病及其血管并发症 [J]. *中医药导报*, 2007, 13(5): 111-112.