

芪参益气滴丸调控 Sirt1 与 eNOS 互作促进糖尿病心肌缺血损伤修复再生

刘 鑫¹, 刘甜甜^{1*}, 姚魁武², 张彦丽¹, 巩 颖¹, 顾媛媛¹, 曹俊岭^{1,3*}

1. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078

2. 中国中医科学院眼科医院, 北京 100040

3. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700

摘 要: **目的** 探讨芪参益气滴丸对糖尿病心肌缺血损伤小鼠血管内皮功能及血管新生的作用机制。**方法** 102 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组、尼可地尔片 (4.55 mg/kg) 组及芪参益气滴丸低、高剂量 (227.5、455.0 mg/kg) 组和芪参益气滴丸 (227.5 mg/kg) + EX-527 (10 mg/kg) 组。第 2 周开始对照组以正常饲料饲养, 其余各组以高脂饲料饲养, 然后持续 7 d ip 链脲霉素 (50 mg/kg), 建立 2 型糖尿病模型, 对照组 ip 等体积生理盐水。第 4 周模型组和各给药组小鼠连续 5 d 颈背部 sc 异丙肾上腺素盐酸盐 (100 mg/kg), 对照组 sc 等体积生理盐水。第 5 周开始给予药物干预 14 d, 取血清测定心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI)、肌酸激酶 MB 同工酶 (creatinine kinase-MB, CK-MB)、一氧化氮 (nitric oxide, NO)、内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 和血管性血友病因子 (von willebrand factor, vWF) 含量; 病理染色检测心脏形态结构、胶原纤维比值、心肌凋亡数量和血管新生情况; Western blotting 检测心脏组织沉默信息调节因子 1 (silence information regulator 1, Sirt1)、内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、磷酸化苏氨酸 495 位点 eNOS (phosphorylation of Thr495-eNOS, pT495-eNOS)、磷酸化丝氨酸 1177 位点 eNOS (phosphorylation of Ser1177-eNOS, pS1177-eNOS) 蛋白表达。免疫荧光双标染色检测心脏 Sirt1 与 eNOS 共定位。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠血清 cTnI 水平及 CK-MB 活性均明显增加 ($P < 0.01$), ET-1、vWF 和 NO 水平均显著减少 ($P < 0.01$); 心肌细胞排列紊乱, 肌纤维缺失, 肌间隙增大, 心肌纤维化面积和心肌凋亡数目显著增加 ($P < 0.01$), 血小板-内皮细胞黏附分子 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31) 标记的新生血管数量明显减少 ($P < 0.01$), 心脏 Sirt1、eNOS 表达降低 ($P < 0.01$), pT495-eNOS 水平升高 ($P < 0.01$), Sirt1 和 eNOS 共定位减少。芪参益气滴丸干预后均有显著的保护效应, 加入 EX-527 能部分逆转芪参益气滴丸的作用。**结论** 芪参益气滴丸可通过上调 Sirt1 和 eNOS 水平, 增加 Sirt1 与 eNOS 相互作用, 提高 NO 生物利用度, 保护内皮功能, 改善血管新生, 抑制心肌纤维化和心肌凋亡, 从而促进糖尿病心肌缺血损伤修复。

关键词: 芪参益气滴丸; 糖尿病; 心肌缺血; 血管新生; 内皮功能; 沉默信息调节因子 1; 内皮型一氧化氮合酶

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2023)14-4564-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.14.017

Qishen Yiqi Droplet promotes repair and regeneration of diabetes myocardial ischemia injury by regulating interaction of Sirt1 and eNOS

LIU Xin¹, LIU Tian-tian¹, YAO Kui-wu², ZHANG Yan-li¹, GONG Ying¹, GU Yuan-yuan¹, CAO Jun-ling^{1,3}

1. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

2. Eye Hospital, Chinese Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China

3. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Qishen Yiqi Droplet (芪参益气滴丸) on vascular endothelial function and angiogenesis in diabetes mice with myocardial ischemia injury. **Methods** A total of 102 male C57BL/6J mice were randomly divided into control group, model group, Nicorandil Tablet (尼可地尔片, 4.55 mg/kg) group, Qishen Yiqi Droplet low-, high-dose (227.5, 455.0 mg/kg) groups and Qishen Yiqi Droplet (227.5 mg/kg) + EX-527 (10 mg/kg) group. In the second week, the control group was fed with normal diet, and the other groups were fed with high-fat diet. In the third week, streptozotocin (50 mg/kg) was intraperitoneally

收稿日期: 2023-02-28

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82104627); 中央高校基本科研业务费专项 (2022-JYB-XJSJJ-065)

作者简介: 刘 鑫, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药防治心血管病的作用机制。E-mail: 1428382783@qq.com

*通信作者: 刘甜甜 (1989—), 博士, 主管药师, 研究方向为中药防治心血管病的作用机制。E-mail: liutiantian008@126.com

曹俊岭 (1972—), 博士生导师, 主任药师, 研究方向为中药安全性及合理用药。E-mail: caojunling72@163.com

injected for 7 d to establish the model of type 2 diabetes. The control group was injected with equal dose of normal saline. At the fourth week, the model group and each administration group mice were subcutaneously injected with isoproterenol hydrochloride (100 mg/kg) on the nape of the neck for five consecutive days, while the control group mice were subcutaneously injected with the same volume of normal saline. After 14 d of drug intervention in the fifth week, serum was taken to measure cardiac troponin I (cTn I), creatine kinase MB isoenzyme (CK-MB), nitric oxide (NO), endothelin 1 (ET-1) and von willebrand factor (vWF) contents; Cardiac morphology, collagen fiber ratio, myocardial apoptosis and angiogenesis were detected by pathological staining; Western blotting was used to detect the expressions of silence information regulator 1 (Sirt1), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), phosphorylation of Thr495-eNOS (pT495-eNOS) and phosphorylation of Ser1177-eNOS (pS1177-eNOS) proteins in cardiac tissue. Immunofluorescence double staining was used to detect the co-localization of Sirt1 and eNOS in the heart. **Results** Compared with control group, cTnI level and CK-MB activity in serum of mice in model group were significantly increased ($P < 0.01$), while the levels of ET-1, vWF, and NO were significantly reduced ($P < 0.01$); Myocardial cells were disordered, muscle fibers were missing, muscle space was enlarged, myocardial fibrosis area and myocardial apoptosis number were significantly increased ($P < 0.01$), the number of new blood vessels labeled by platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) was significantly reduced ($P < 0.01$), the expressions of Sirt1 and eNOS in heart were reduced ($P < 0.01$), level of pT495-eNOS was increased ($P < 0.01$), the co-localization of Sirt1 and eNOS was reduced. After intervention, Qishen Yiqi Droplet showed significant protective effects, and the addition of EX-527 could partially reverse the effect of Qishen Yiqi Dropping Pills. **Conclusion** Qishen Yiqi Droplet can promote the repair of myocardial ischemia injury in diabetes by up-regulating the levels of Sirt1 and eNOS, increasing the interaction between Sirt1 and eNOS, improving the bioavailability of NO, protecting endothelial function, improving angiogenesis, inhibiting myocardial fibrosis and myocardial apoptosis.

Key words: Qishen Yiqi Droplet; diabetes; myocardial ischemia; angiogenesis; endothelial function; Sirt1; eNOS

预计到 2045 年,全球糖尿病人数将达 7.84 亿^[1],庞大的糖尿病人口加剧经济负担,另外,糖尿病迁延不愈易导致各种心脑血管并发症。研究表明,糖尿病患者的动脉粥样硬化血管病变发生率增加,心肌梗死和脑梗死发病率是非糖尿病患者的 4~5 倍,且预后较差^[2]。关于糖尿病心肌梗死的病理机制并不明确,研究认为高血糖可能通过其代谢途径增加炎症和活性氧产生,导致血管结构和功能改变,造成心肌受损及心功能障碍^[3]。近年来对糖尿病心肌梗死有效治疗途径的需求日益增加,临床治疗既要控制血糖水平,改善心绞痛症状,还需预防心脑血管病进展引起的致死致残,改善生活质量。为此,探寻糖尿病心肌梗死的潜在靶标及治疗药物具有重要意义和潜在应用价值。

沉默信息调节因子 1 (silence information regulator 1, Sirt1) 调控哺乳动物细胞多个重要病理生理过程^[4-5]。研究表明,敲除 *Sirt1* 基因导致小鼠心肌缺血/再灌注损伤加重,高表达 Sirt1 则下调凋亡蛋白和上调抗氧化分子改善心肌缺血^[6-8]。Sirt1 能活化内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS), 提高内皮源性一氧化氮 (nitric oxide, NO) 水平,抑制血管老化,抗动脉粥样硬化,改善脑动脉和胸主动脉舒张功能,介导缺血区域血运重建^[9]。此外,研究发现抑制 eNOS 活性及 NO 水平显著降低 Sirt1 的表达,引起血管内稳态失衡,说

明 eNOS 也正向调控 Sirt1 表达^[10]。可见,增加 Sirt1 与 eNOS 相互作用对维持血管内皮功能、促进缺血区域血管再生发挥一定的作用。

糖尿病心肌梗死属中医消渴并发胸痹、心痛等范畴^[11]。患者临床症状及中医证候,多以心气不足、心血失于推动,血脉滞涩为发病原因。基本病机主要是本虚标实、气虚血瘀,故益气活血化瘀、标本同治为其重要治则。芪参益气滴丸是益气活血法的代表方药,研究显示,芪参益气滴丸增加 2 型糖尿病合并冠心病老年患者的左室射血分数和舒张功能^[12-13],减轻高糖诱导的心肌细胞氧化损伤、抑制心肌细胞凋亡^[14],但具体作用机制不详。本研究采用高脂饮食联合链脲霉素及颈背部 sc 异丙肾上腺素构建糖尿病心肌缺血模型,探讨芪参益气滴丸对糖尿病心肌缺血损伤小鼠血管内皮功能和心肌修复再生的机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 102 只,6~8 周龄,体质量 17~20 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物生产许可证号 SCXK (京) 2021-0006,质量合格证号 110011221108055625,使用许可证号 SYXK (京) 2019-0013。动物实验由北京中医药大学东方医院实验动物使用与管理委员会批准 (批准号 DFYY202225M)。

1.2 药品与试剂

60% 脂肪供能高脂饲料 (H10060, 批号 20220801) 购自北京华阜康生物科技股份有限公司; NO 试剂盒 (批号 20221014)、肌酸激酶 MB 同工酶 (creatin kinase-MB, CK-MB) 试剂盒 (批号 20221014) 购自南京建成生物工程研究所; 链脲霉素 (批号 WXBD1402V)、异丙肾上腺素盐酸盐 (批号 WXBD0774V) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 芪参益气滴丸 (批号 220313) 购自天士力制药集团股份有限公司; 尼可地尔片 (批号 220209249) 购自天方药业有限公司; 选择性 SIRT1 抑制剂 EX-527 (批号 A1527018) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 血小板-内皮细胞黏附分子 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31) 抗体 (批号 C76821022003) 购自武汉塞维尔生物科技有限公司; GAPDH (批号 20210615) 购自天德悦 (北京) 生物科技有限责任公司; 山羊抗兔二抗 (批号 158319)、山羊抗小鼠二抗 (批号 139283) 购自美国 Jackson 公司; 磷酸化丝氨酸 1177 位点-eNOS (phosphorylation of Ser1177-eNOS, pS1177-eNOS) 抗体 (批号 ab215717) 购自英国 Abcam 公司; Sirt1 抗体 (批号 sc74465)、eNOS 抗体 (批号 sc376751)、磷酸化苏氨酸 495 位点-eNOS (phosphorylation of Thr495-eNOS, pT495-eNOS) 抗体 (批号 sc136519) 购自美国 Santa 公司; 小鼠心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI) ELISA 试剂盒 (批号 W17025589)、小鼠内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) ELISA 试剂盒 (批号 W18025590)、小鼠血管性血友病因子 (von willebrand factor, vWF) ELISA 试剂盒 (批号 W19025591) 均购自武汉华美生物工程有限公司; 血糖试纸 (批号 26054442) 购自德国 Roche 公司。

1.3 仪器

活力型血糖仪 (德国 Roche 公司); Synergy H1 型多功能微孔板检测仪 (美国 Bio-Tek 公司); Forma™ 900 系列-80 °C 超低温冰箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 5424R 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); BX51 型正置显微镜 (日本 Olympus 公司); P250 FLASH 型全载玻片数字病理扫描仪和 Caseviewer 切片扫描分析软件 (匈牙利 3DHISTECH 有限公司)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药

C57BL/6J 小鼠适应性饲养 1 周, 采用随机数字

表法选取 12 只为对照组, 其余分为模型组、尼可地尔片 (4.55 mg/kg, 相当于临床等效剂量) 组及芪参益气滴丸低、高剂量 (227.5、455.0 mg/kg, 分别为 1、2 倍临床剂量) 组和芪参益气滴丸 (227.5 mg/kg) + EX-527 (10 mg/kg) 组, 每组 18 只。第 2 周开始除对照组继续喂养正常饲料外, 其余小鼠均喂养高脂饲料至实验结束, 然后 ip 链脲霉素 (50 mg/kg), 连续注射 7 d, 对照组 ip 等体积生理盐水。注射链脲霉素后第 8、10、11 天测定各组小鼠空腹血糖。第 4 周开始模型组和各给药组小鼠连续 5 d 颈背部 sc 异丙肾上腺素盐酸盐 (100 mg/kg), 建立心肌缺血模型, 对照组颈背部 sc 等体积生理盐水。第 5 周开始各给药组分别 ig 尼可地尔片、芪参益气滴丸或 ip EX-527。对照组和模型组 ig 等体积纯水, 给药干预 2 周后取材。

2.2 血清 cTnI、CK-MB、ET-1、vWF、NO 检测

实验结束后摘眼球取血, 收集血液静置后, 4 °C、3500 r/min 离心 15 min, 取上清, 按照试剂盒说明书测定各组小鼠血清中 cTn-I、CK-MB、ET-1、vWF、NO 含量。

2.3 心脏病理染色

实验结束后, 迅速摘取心脏, 将心脏置于 4% 中性多聚甲醛溶液中固定 48 h。然后进行组织脱水、石蜡包埋、切片。每组小鼠心脏进行苏木素-伊红 (HE) 染色、Masson 染色, 切片扫描仪观察各组心脏病理变化及胶原纤维沉积情况。采用 Image-Pro Plus 软件半定量分析心脏纤维化面积比值。

2.4 心脏 TUNEL 染色

每组选取 6 个小鼠心脏组织进行 TUNEL 染色, 观察各组小鼠心肌细胞凋亡情况。将制备好的石蜡切片脱蜡、水化后, 与蛋白酶 K 孵育 20 min, PBS 清洗 3 次。将切片与荧光标记液和 TdT 酶置于 37 °C 避光孵育 1 h, PBS 清洗 3 次, 苏木素复染核。于切片扫描仪下随机选取 8 个视野, 采用 Image-Pro Plus 软件统计绿色荧光细胞核的面积比。

2.5 心脏免疫组化染色

每组选取 6 个小鼠切片进行 CD31 免疫组化染色, 观察心脏血管表达变化。于切片扫描仪下随机选取 8 个视野, 采用 Image-Pro Plus 软件统计棕褐色阳性血管面积占比。

2.6 Western blotting 检测心脏 eNOS、pT495-eNOS、pS1177-eNOS 和 Sirt1 蛋白表达

提取心脏组织蛋白, BCA 测试盒定量蛋白浓

度。蛋白样品在 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 上分离并转膜。采用 5% 脱脂牛奶或 5% 牛血清白蛋白溶液室温封闭 1 h, 4 °C 孵育 eNOS、pS1177-eNOS、pT495-eNOS、Sirt1、GAPDH 抗体过夜, 次日 TBST 洗膜, 室温孵育二抗 1 h。化学发光成像系统检测蛋白条带, 采用 Quantity One 软件统计相对蛋白灰度值。

2.7 心脏免疫荧光共染

每组选取 3 个小鼠心脏切片进行 Sirt1 和 eNOS 免疫荧光共染, 观察心脏 Sirt1 和 eNOS 的定位和相互作用。在切片扫描仪下随机选取 10 个视野, 采用 Image-Pro Plus 软件统计 Sirt1 和 eNOS 互作的橙黄色面积占比。

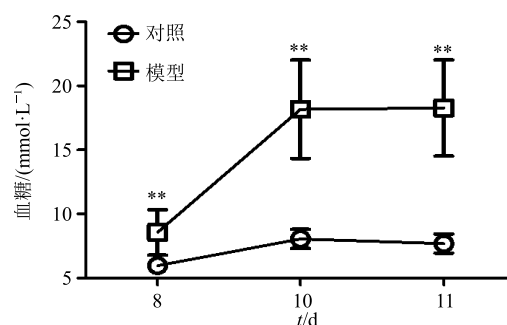
2.8 统计学分析

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 不服从正态分布采用非参检验。采用 SPSS 20.0 软件分析所有数据。

3 结果

3.1 芪参益气滴丸对糖尿病心肌缺血损伤小鼠心功能的影响

如图 1 所示, 小鼠注射链脲霉素后第 8、10、11 天检测的空腹血糖值均显著大于对照组 ($P < 0.01$), 并且第 10、11 天小鼠空腹血糖均 > 11.1



与对照组比较: ** $P < 0.01$, 下同

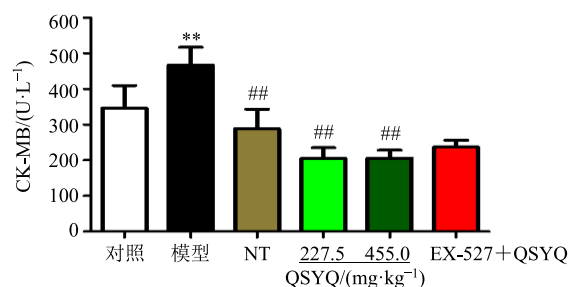
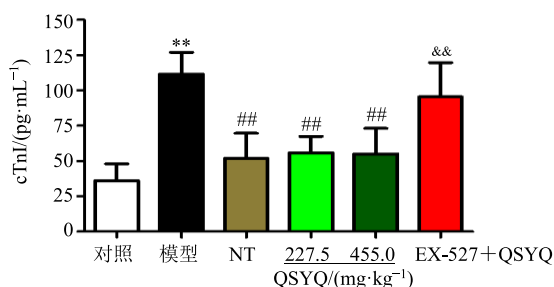
** $P < 0.01$ vs control group, same as below figures

图 1 对照组和模型组小鼠血糖变化 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 1 Blood glucose changes of mice in control and model group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

mmol/L, 同时观察到注射链脲霉素后小鼠出现多饮、多尿、多食、体质量减轻的“三多一少”典型症状, 说明 2 型糖尿病模型成功。

如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清 cTnI 水平和 CK-MB 活性均明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 尼可地尔片组和芪参益气滴丸低、高剂量组 cTnI 水平和 CK-MB 活性显著降低 ($P < 0.01$); 与芪参益气滴丸低剂量组比较, 芪参益气滴丸 + EX-527 组血清中 cTnI 水平明显升高 ($P < 0.01$), CK-MB 活性无显著差异。结果表明, 芪参益气滴丸能抑制糖尿病心肌缺血小鼠心功能损伤。



NT-尼可地尔片 QSYQ-芪参益气滴丸 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与芪参益气滴丸低剂量组比较: && $P < 0.01$, 下同

NT-Nicorandil Tablet QSYQ-Qishen Yiqi Droplet * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; && $P < 0.01$ vs Qishen Yiqi Droplet low-dose group, same as below figures

图 2 芪参益气滴丸对糖尿病心肌缺血损伤小鼠心功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effect of Qishen Yiqi Droplet on cardiac function of mice with myocardial ischemia injury in diabetes ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.2 芪参益气滴丸对糖尿病心肌缺血损伤小鼠心脏病理变化的影响

各组小鼠心脏形态拍照和 HE、Masson 染色结果见图 3, 对照组小鼠心脏形态饱满, 充血发红, 心肌纤维结构完整, 排列整齐, 蓝色胶原纤维沉积极少。模型组小鼠心脏表面可见明显凹陷, 心肌缺血发白, 心肌纤维排列紊乱, 肌纤维缺失明显, 肌

间隙增大, 存在大量蓝色胶原纤维积聚。与模型组比较, 尼可地尔片组和芪参益气滴丸低、高剂量组小鼠心脏均有不同程度的改善。与芪参益气滴丸低剂量组比较, 芪参益气滴丸 + EX-527 组心脏缺血发白, 肌纤维排列稍显紊乱, 肌间隙加大, 心肌纤维部分缺失, 胶原纤维含量有所提升。表明芪参益气滴丸可以有效逆转糖尿病小鼠缺血心脏病变。

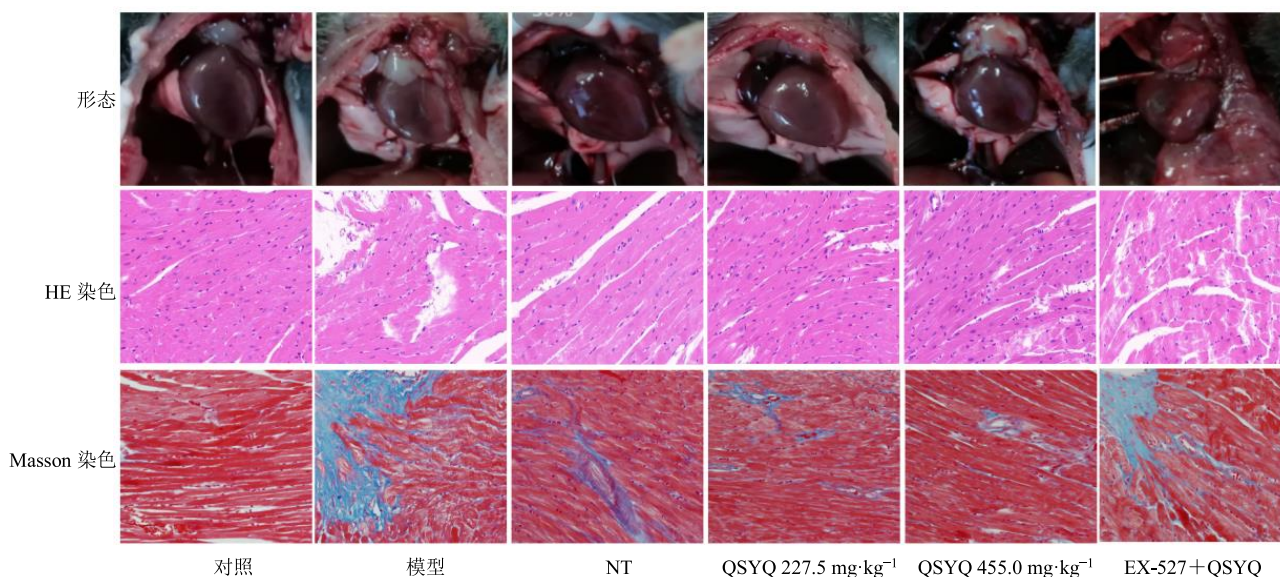


图 3 芪参益气滴丸对糖尿病心肌缺血损伤小鼠心脏结构的影响 (×400)

Fig. 3 Effect of Qishen Yiqi Droplet on cardiac structure of mice with myocardial ischemia injury in diabetes (×400)

3.3 芪参益气滴丸对糖尿病心肌缺血损伤小鼠心肌细胞凋亡的影响

TUNEL 荧光染色结果见图 4, 绿色荧光细胞核为凋亡的心肌细胞。与对照组比较, 模型组小鼠心肌细胞凋亡数量明显增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 尼可地尔片组和芪参益气滴丸低、高剂量组小鼠心肌凋亡数量明显减少 ($P<0.01$); 与芪参益气滴丸低剂量组比较, 芪参益气滴丸+EX-527 组心肌细胞凋亡数目显著增加 ($P<0.01$)。说明芪参益气滴丸具有抑制糖尿病心肌缺血损伤小鼠心肌凋亡的作用。

3.4 芪参益气滴丸对糖尿病心肌缺血损伤小鼠血管新生和内皮功能的影响

免疫组化染色和内皮功能相关因子 ELISA 测定结果见图 5, 与对照组比较, 模型组心脏 CD31 及血清 ET-1、vWF、NO 水平均显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 尼可地尔片组和芪参益气滴丸低、高剂量组心脏 CD31 及血清 ET-1、NO 水平均明显增加 ($P<0.01$), 芪参益气滴丸低剂量组 vWF 水平明显增加 ($P<0.01$), 芪参益气滴丸高剂量组 vWF 水平明显降低 ($P<0.05$); 与芪参益气滴丸低剂量组比较, 芪参益气滴丸+EX-527 组相关因子水平均显著下调 ($P<0.01$)。

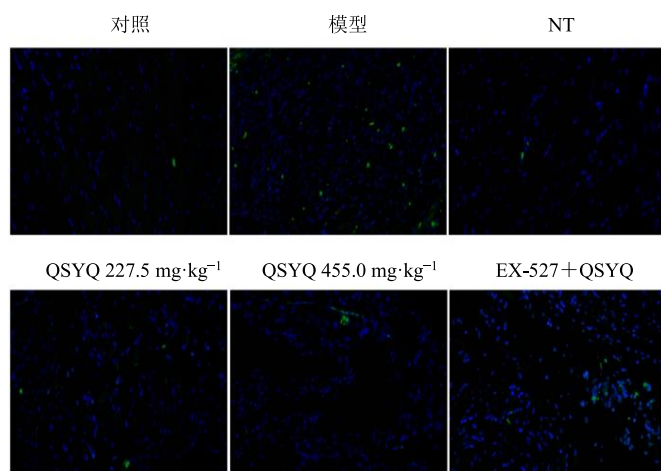
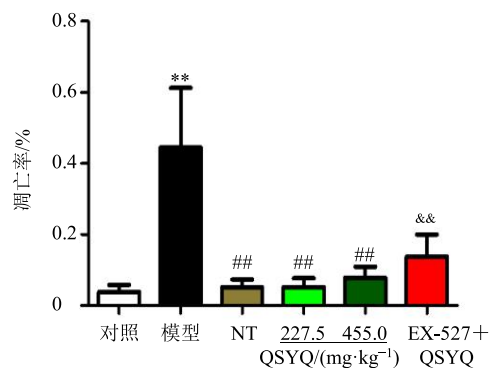


图 4 芪参益气滴丸对糖尿病心肌缺血损伤小鼠心肌凋亡的影响 (×400; $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 4 Effect of Qishen Yiqi Droplet on myocardial apoptosis in mice with diabetes myocardial ischemia injury (×400; $\bar{x} \pm s$, $n=6$)



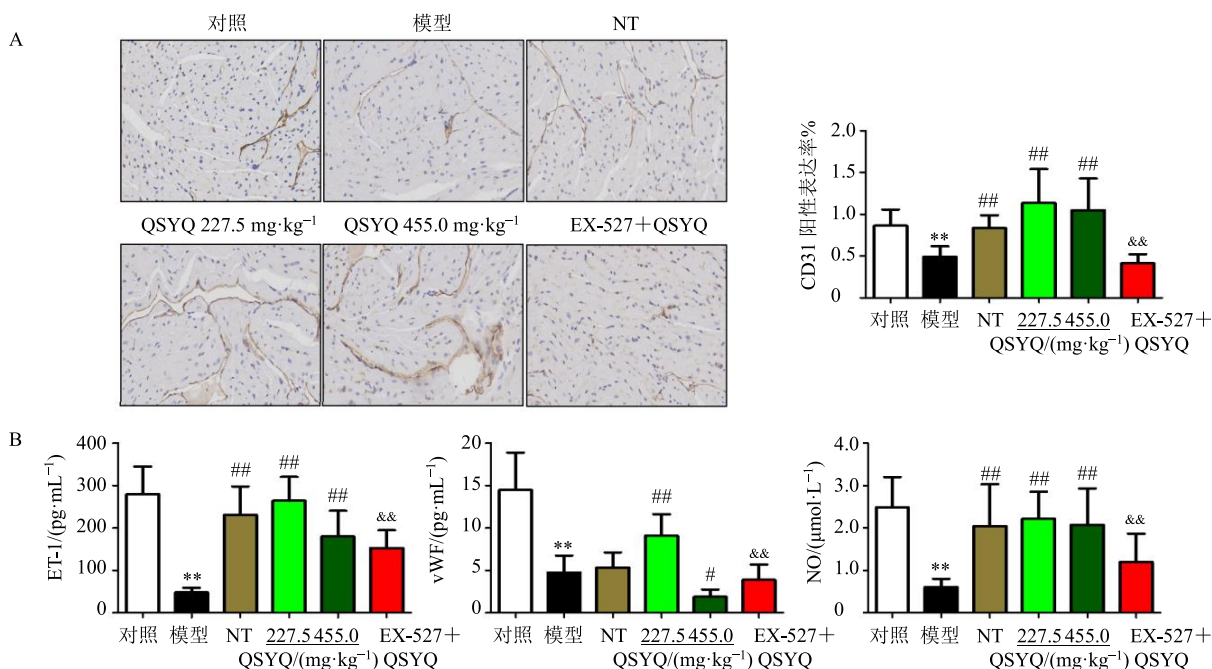


图 5 芪参益气滴丸对糖尿病心肌缺血损伤小鼠心脏血管新生 (A) 和内皮功能 (B) 的影响 ($\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 5 Effect of Qishen Yiqi Droplet on cardiac angiogenesis (A) and endothelial function (B) in mice with diabetes myocardial ischemia injury ($\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.5 芪参益气滴丸对糖尿病心肌缺血损伤小鼠心脏 Sirt1 和 eNOS 蛋白表达的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠心脏 Sirt1、eNOS 表达明显降低 ($P < 0.01$), pT495-eNOS 水平明显升高 ($P < 0.01$), pS1177-eNOS 水平无显著性差异。与模型组比较, 尼可地尔片组心脏 Sirt1 表达显著增加 ($P < 0.01$), pT495-eNOS 和 eNOS 表

达明显降低 ($P < 0.01$); 芪参益气滴丸低、高剂量组心脏 Sirt1、eNOS 表达均显著升高 ($P < 0.01$), pT495-eNOS 水平显著降低 ($P < 0.01$); 芪参益气滴丸高剂量组心脏 pS1177-eNOS 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与芪参益气滴丸低剂量组比较, 芪参益气滴丸+EX-527 组小鼠心脏的 Sirt1 和 eNOS 表达均显著降低 ($P < 0.01$)。

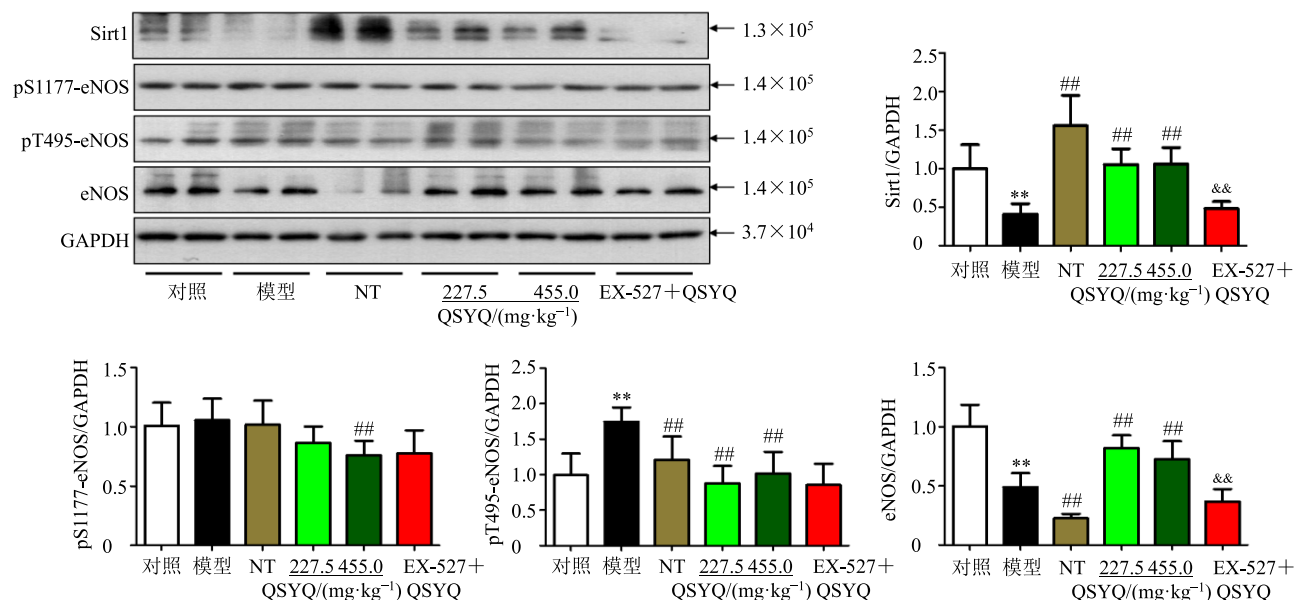


图 6 芪参益气滴丸对糖尿病心肌缺血损伤小鼠心脏 Sirt1 和 eNOS 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 6 Effect of Qishen Yiqi Droplet on expressions of Sirt1 and eNOS in heart of mice with myocardial ischemia injury in diabetes ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.6 芪参益气滴丸对糖尿病心肌缺血损伤小鼠心脏 Sirt1 与 eNOS 共定位的影响

免疫荧光共染结果见图 7, 红色荧光标记 Sirt1, 绿色荧光标记 eNOS, 蓝色荧光标记细胞核。对照组小鼠心脏组织中可见 Sirt1 大量表达于细胞质中, eNOS 大部分表达在细胞质的血管内皮中, 胞质中

存在大量橙色荧光, 说明 Sirt1 与 eNOS 共定位增多。与对照组比较, 模型组小鼠心脏组织中 Sirt1 和 eNOS 共定位减少。与模型组比较, 芪参益气滴丸低剂量组心脏组织中 Sirt1 和 eNOS 共定位增加, 而 EX-527 能够逆转芪参益气滴丸对 Sirt1 和 eNOS 的共定位。

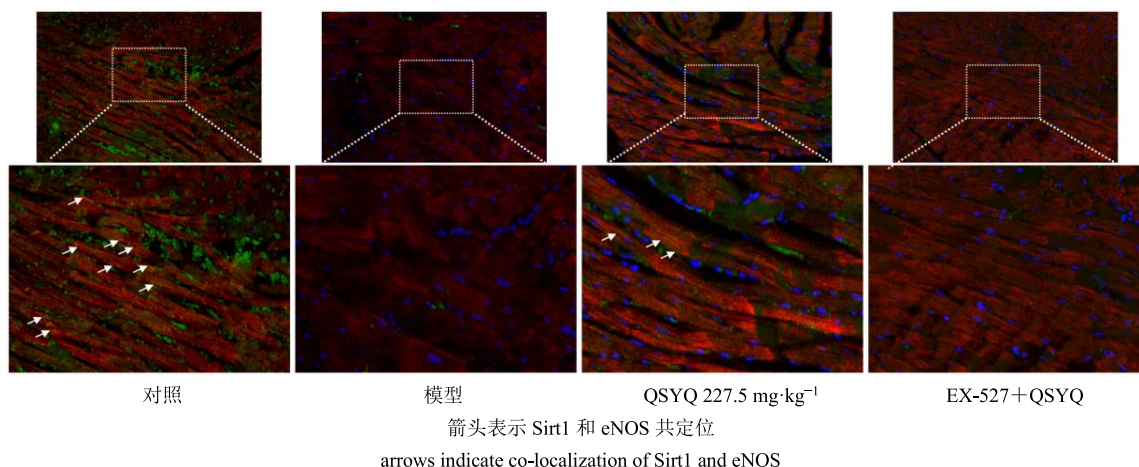


图 7 芪参益气滴丸对糖尿病心肌缺血损伤小鼠心脏 Sirt1 与 eNOS 共定位的影响 (×400)

Fig. 7 Effect of Qishen Yiqi Droplet on co-localization of Sirt1 and eNOS in heart of mice with diabetes myocardial ischemia injury (×400)

4 讨论

糖尿病是心血管病的独立危险因素, 由血糖升高所致血管病变引起的冠心病、心绞痛、心肌梗死、缺血性脑血管病是糖尿病致残致死的首要病因^[15-16]。芪参益气滴丸是治疗气虚血瘀型冠心病心绞痛的中成药^[17], 由黄芪、丹参、三七、降香油制成, 具有益气通脉、活血止痛之功^[18]。研究发现, 激活 Sirt1 信号能通过抗炎抗氧化、抑制心肌凋亡, 改善大鼠心肌缺血损伤^[19]。eNOS 是血管内皮特异蛋白, 对维持血管内稳态至关重要, 目前有关 Sirt1 与 eNOS 表达改变及二者互作对糖尿病合并心肌梗死的调控机制尚不清楚。本研究证实芪参益气滴丸抑制糖尿病缺血心脏病变、减少心肌凋亡、促进血管再生, 保护血管内皮功能, 改善缺血心功能, 而芪参益气滴丸介导的治疗作用可能与促进内皮功能因子及 NO 释放, 增加 Sirt1 与 eNOS 相互作用有关。

cTn-I 和 CK-MB 是评估心肌受损的标记物, 二者活性变化常提示心脏功能异常^[20]。cTn-I 主要表达在心肌组织, 抑制肌球蛋白与肌动蛋白结合, 在心肌收缩和舒张过程中发挥重要作用, 当心肌细胞受损时血清中 cTn-I 含量显著升高, 是诊断心肌受损的高灵敏性和特异性指标^[21]。CK-MB 是心肌特

有的肌酸激酶, 参与细胞内能量转运、肌肉收缩、提供心肌产生三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP)^[22], 当血液 CK-MB 活性剧烈上升, 预示有发生心肌梗死、心肌损伤、心包炎等疾病的风险。本研究结果提示糖尿病心肌缺血小鼠血清中 cTn-I 水平和 CK-MB 活性显著提升, 说明心肌细胞受损严重, 给予芪参益气滴丸明显降低糖尿病心肌缺血模型小鼠血清中 cTn-I 水平和 CK-MB 活力, 表明芪参益气滴丸能有效改善心肌缺血损伤。

ET-1 是长效血管收缩调节因子, 对维持血管张力与心血管系统稳态起重要作用, ET-1 已成为冠状动脉疾病、心肌梗死和心力衰竭的预测因子和预后标志物^[23]。vWF 是一种糖蛋白, 在血管损伤期间介导血小板黏附到内皮下层, 稳定凝血因子发挥止血作用, vWF 在血管系统中还介导血管炎症、渗透和血管新生作用^[24]。因此, ET-1、vWF 变化是反映血管内皮功能的关键指标。本研究结果说明, 糖尿病心肌缺血损伤小鼠血液中 ET-1 和 vWF 水平均显著减少, 芪参益气滴丸能提升 ET-1、vWF 水平, 保护血管内皮功能。此外, EX-527 逆转芪参益气滴丸的作用, 说明芪参益气滴丸保护糖尿病血管内皮损伤可能与 Sirt1 有关。

内源性 NO 是调节血管功能的重要因子, 由 eNOS 催化 L-精氨酸和多种辅因子产生^[25]。在血管壁, 内皮细胞的 eNOS 合成 NO 调控血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 舒张, 介导血管新生, 抑制 VSMC 增殖, NO 扩散至血管腔能抑制血小板聚集及血栓形成。NO 生物利用度降低会引起内皮功能障碍, 触发一系列心血管事件, 如脑卒中、心肌梗死、冠状动脉血运重建和不稳定型心绞痛^[26]。eNOS 是钙调蛋白依赖性二聚体酶, eNOS 的丝氨酸 1177 (Ser1177)、Ser116、Ser635 和 Ser613 位点磷酸化调控 eNOS 激活, 而苏氨酸 495 (Thr495) 和酪氨酸 657 (Tyr657) 位点磷酸化则抑制 eNOS 功能^[27]。生理条件下, eNOS 可预防病理性血管重塑、高血压、动脉粥样硬化和心脏并发症^[28]。糖尿病和缺血性心脏病患者中发现 eNOS 活性和 NO 含量降低, 引发内皮功能、外周和冠状动脉血管新生障碍^[29]。本研究结果显示糖尿病心肌缺血小鼠中 eNOS 和 NO 水平降低, eNOS 的 Thr495 磷酸化位点提升, 缺血心脏血管新生功能降低, 反映糖尿病血管内皮功能障碍, 与文献报道一致^[30-31]。

研究发现, Sirt1 可促进 NO 产生, 减轻炎症, 降低氧化应激, 诱导自噬, 延缓衰老, 抑制血管老化和动脉粥样硬化进程。内皮细胞的 Sirt1 通过去乙酰化在转录和转录后水平调节 eNOS, 产生 NO 以保护血管, 而 NO 反过来也能正向调控 Sirt1^[32]。说明 Sirt1 与 eNOS 之间存在动态调节, 这对维持内皮功能和血管重塑十分重要。另外, Sirt1 抑制内皮 Notch 信号和调节 FoxO1 活性, 激活 eNOS 诱导内皮依赖性舒张, 促进血管生成和缺血后新生血管形成。糖尿病心肌缺血损伤减弱 eNOS 活性和 NO 生成, 而上调 Sirt1 能提高 eNOS 活性和 NO 生物利用度, 降低糖尿病心肌损伤^[33-34]。因此, 通过促进 Sirt1 与 eNOS 相互作用, 激活 eNOS 磷酸化及 NO 释放, 保护血管内皮功能是糖尿病缺血性心脏病的重要治疗策略。本研究证实, 芪参益气滴丸提高 Sirt1 和 eNOS 表达, 增加 Sirt1 与 eNOS 共定位, 提示芪参益气滴丸可能通过调控 Sirt1 与 eNOS 互作, 促进糖尿病心肌缺血损伤修复再生。

本文初步探究了芪参益气滴丸对糖尿病心肌缺血小鼠心脏中 Sirt1 与 eNOS 相互作用关系, eNOS 活性和 NO 生成, 以及血管内皮、心脏功能的影响。结果证实, 芪参益气滴丸可能通过上调 Sirt1、eNOS 水平, 增加 Sirt1 与 eNOS 互作, 提高 NO 生物利用

度, 从而稳定内皮功能, 促进血管新生, 抑制心肌纤维化和凋亡, 改善心脏功能, 使气虚自复、瘀祛络通, 揭示芪参益气滴丸改善糖尿病心肌缺血损伤、血管内皮功能障碍及血管新生的机制, 为中药复方干预治疗糖尿病心病气虚血瘀证提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

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 Pract*, 2018, 138: 271-281.
- [2] Kuusisto J, Laakso M. Update on type 2 diabetes as a cardiovascular disease risk equivalent [J]. *Curr Cardiol Rep*, 2013, 15(2): 331.
- [3] Varga Z V, Giricz Z, Liaudet L, *et al.* Interplay of oxidative, nitrosative/nitrative stress, inflammation, cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(2): 232-242.
- [4] Du L, Chen L, Luo B, *et al.* Silent information regulator 1 mediates H₂S-inhibited chronic restraint stress-induced depressive-like behaviors by regulating hippocampal autophagy [J]. *Neuroreport*, 2023, 34(3): 128-136.
- [5] Lu C X, Zhao H D, Liu Y Q, *et al.* Novel role of the SIRT1 in endocrine and metabolic diseases [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(2): 484-501.
- [6] Qiu Z, Ming H, Zhang Y, *et al.* The protective role of Bmal1-regulated autophagy mediated by HDAC3/SIRT1 pathway in myocardial ischemia/reperfusion injury of diabetic rats [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2022, 36(2): 229-243.
- [7] Yang Y, Duan W X, Li Y, *et al.* Novel role of silent information regulator 1 in myocardial ischemia [J]. *Circulation*, 2013, 128(20): 2232-2240.
- [8] Hsu C P, Zhai P Y, Yamamoto T, *et al.* Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion [J]. *Circulation*, 2010, 122(21): 2170-2182.
- [9] D'Onofrio N, Vitiello M, Casale R, *et al.* Sirtuins in vascular diseases: Emerging roles and therapeutic potential [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(7): 1311-1322.
- [10] Ota H, Eto M, Kano M R, *et al.* Induction of endothelial nitric oxide synthase, SIRT1, and catalase by statins inhibits endothelial senescence through the Akt pathway [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(11): 2205-2211.
- [11] Kibel A, Selthofer-Relatic K, Drenjancevic I, *et al.* Coronary microvascular dysfunction in diabetes mellitus [J]. *J Int Med Res*, 2017, 45(6): 1901-1929.

- [12] 包秋红, 张勇, 贾海玉, 等. 芪参益气滴丸联合利拉鲁肽对老年 2 型糖尿病合并冠心病患者血糖、心功能及 T 细胞亚群的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(20): 3897-3901.
- [13] 王慧, 曹月娟, 赵振营. 芪参益气滴丸治疗慢性心力衰竭及其作用机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(5): 1254-1259.
- [14] Zhang S Y, Wang H, Li L X, *et al.* Qishen Yiqi Drop Pill, a novel compound Chinese traditional medicine protects against high glucose-induced injury in cardiomyocytes [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(9): 6393-6402.
- [15] Yin J M, Kong A P S, Chan J C N. Prevention and care programs addressing the growing prevalence of diabetes in China [J]. *Curr Diab Rep*, 2016, 16(12): 130.
- [16] Skyler J S, Bakris G L, Bonifacio E, *et al.* Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis [J]. *Diabetes*, 2017, 66(2): 241-255.
- [17] 李晓强, 徐砚通, 胡翠敏, 等. 芪参益气滴丸和复方丹参滴丸治疗冠心病应用及作用机制异同的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(23): 7373-7378.
- [18] 马莉, 刘志超, 高晟玮, 等. 芪参益气滴丸治疗心血管疾病药理作用与临床应用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(4): 780-787.
- [19] 刘甜甜, 王擎擎, 姚魁武. 活血温通方对心肌缺血模型大鼠心肌组织 Sirt1 信号通路的影响 [J]. 中医杂志, 2020, 61(9): 804-809.
- [20] Zhang Z Y, Yan B F, Li Y G, *et al.* Propofol inhibits oxidative stress injury through the glycogen synthase kinase 3 beta/nuclear factor erythroid 2-related factor 2/heme oxygenase-1 signaling pathway [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1): 1612-1625.
- [21] Yuan Z P, Wang L, Chen J, *et al.* Electrochemical strategies for the detection of cTnI [J]. *Analyst*, 2021, 146(18): 5474-5495.
- [22] Ben-Yehuda O, Ozan M O, Chen S, *et al.* TCT-788 relationship between total CK, CK-MB, SCAI, and universal definition in determining peri-PCI myocardial infarction: Analysis from the randomized BIONICS trial [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 72(13): 314.
- [23] Jankowich M, Choudhary G. Endothelin-1 levels and cardiovascular events [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2020, 30(1): 1-8.
- [24] Randi A M, Smith K E, Castaman G. Von willebrand factor regulation of blood vessel formation [J]. *Blood*, 2018, 132(2): 132-140.
- [25] Liao F F, Lin G, Chen X Y, *et al.* Endothelial nitric oxide synthase-deficient mice: A model of spontaneous cerebral small-vessel disease [J]. *Am J Pathol*, 2021, 191(11): 1932-1945.
- [26] Sarmah N, Nauli A M, Ally A, *et al.* Interactions among endothelial nitric oxide synthase, cardiovascular system, and nociception during physiological and pathophysiological states [J]. *Molecules*, 2022, 27(9): 2835.
- [27] Zemankova L, Varejckova M, Dolezalova E, *et al.* Atorvastatin-induced endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells is mediated by endoglin [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2015, 66(3): 403-413.
- [28] Kolluru G K, Siamwala J H, Chatterjee S. eNOS phosphorylation in health and disease [J]. *Biochimie*, 2010, 92(9): 1186-1198.
- [29] Viigimaa M, Sachinidis A, Toumpourleka M, *et al.* Macrovascular complications of type 2 diabetes mellitus [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2020, 18(2): 110-116.
- [30] Shi Y, Vanhoutte P M. Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes [J]. *J Diabetes*, 2017, 9(5): 434-449.
- [31] Knapp M, Tu X, Wu R. Vascular endothelial dysfunction, a major mediator in diabetic cardiomyopathy [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40(1): 1-8.
- [32] Kitada M, Ogura Y, Koya D. The protective role of Sirt1 in vascular tissue: Its relationship to vascular aging and atherosclerosis [J]. *Aging*, 2016, 8(10): 2290-2307.
- [33] Fourny N, Lan C, Séré E, *et al.* Protective effect of resveratrol against ischemia-reperfusion injury via enhanced high energy compounds and eNOS-SIRT1 expression in type 2 diabetic female rat heart [J]. *Nutrients*, 2019, 11(1): 105.
- [34] Donnarumma E, Ali M J, Rushing A M, *et al.* Zofenopril protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by increasing nitric oxide and hydrogen sulfide bioavailability [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(7): 1-17.

[责任编辑 李亚楠]