

芪蛭降糖片对链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠的心脏保护作用

闫桂溪, 李海云, 周琳, 王越华, 杜钢军(河南大学药学院药物研究所, 河南 开封 475004)

摘要: **目的** 观察芪蛭降糖片对链脲佐菌素(STZ)诱导糖尿病大鼠的心脏保护作用, 并探讨其可能的作用机制。**方法** 采用尾静脉注射链脲佐菌素(STZ, $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)法建立糖尿病大鼠模型。将 90 只 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组、芪蛭降糖片组($780 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、盐酸二甲双胍片组($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和格列本脲片组($1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); 灌胃体积为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每天灌胃给药 1 次, 连续 3 个月。检测大鼠的空腹血糖值、饮水量、进食量、尿量、体质量, 以及心电图、血压变化情况。采用网络药理学方法预测芪蛭降糖片对糖尿病性心脏病的作用机制; 苏木素-伊红(HE)染色法观察心脏组织病理学变化; 免疫组织化学法检测心脏组织转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、核转录因子 κB (NF- κB)及半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)的表达; Western Blot 法检测心脏组织 I 型胶原蛋白(Collagen I)与基质金属蛋白酶抑制因子 2(TIMP-2)的表达。**结果** ①网络药理学分析表明, 芪蛭降糖片主要通过黄芪异黄酮甙、西托糖苷、黄精皂苷、槲皮素、水蛭素、京尼平苷等主要成分, 作用于 ADRA1D、INSR、ADRA1A、PTGS2、EDNRA 等关键靶点, 主要调节胰岛素抵抗、环磷酸鸟苷-环磷酸鸟苷依赖蛋白激酶 G(cGMP-PKG)、NF- κB 等信号通路, 以及通过一氧化氮生物合成、G 蛋白偶联受体通路、血管收缩等过程阻止心脏损伤。②与正常组比较, 模型组大鼠在第 10、40、90 天的饮水量、进食量、尿量及空腹血糖值均明显升高($P < 0.01$), 体质量明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$); 第 40、90 天的血压明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 心电图表现出心律不齐, 主波异常现象, 第 90 天的左心室上升达最大速率所需时间明显延长($P < 0.01$); 心脏组织的 TGF- $\beta 1$ 、NF- κB 、Caspase-3、Collagen I 及 TIMP-2 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较, 芪蛭降糖片组在第 10、40、90 天的饮水量、进食量、尿量均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 体质量明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$); 第 40、90 天的空腹血糖值明显降低($P < 0.01$); 第 40、90 天的血压明显降低($P < 0.05$), 心电图在第 40 天未表现出心律不齐、主波异常现象, 且第 90 天的左心室上升达最大速率所需时间明显缩短($P < 0.05$); 大鼠心脏组织的 TGF- $\beta 1$ 、NF- κB 、Caspase-3、Collagen I 及 TIMP-2 表达水平均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 芪蛭降糖片可改善糖尿病造成的多饮、多食、多尿与消瘦现象, 并对糖尿病所致心脏损伤有保护作用, 可能与其抑制心脏组织 Collagen I、TIMP-2、TGF- $\beta 1$ 、NF- κB 、Caspase-3 蛋白表达, 从而抑制炎症、心肌纤维化有关。

关键词: 芪蛭降糖片; 链脲佐菌素; 糖尿病性心脏病; 网络药理学; 炎症; 心肌损伤; 核转录因子 κB ; 大鼠
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)01-0057-11

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.01.008

The Protective Mechanism of *Qi Zhi* Hypoglycemic Tablets on Streptozotocin-induced Diabetic Cardiopathy in Rats

YAN Guixi, LI Haiyun, ZHOU Lin, WANG Yuehua, DU Gangjun(Pharmaceutical College of Henan University, Kaifeng 475004 Henan, China)

Abstract: **Objective** To observe the protective action of *Qi Zhi* hypoglycemic tablets on streptozotocin (STZ)-induced diabetic cardiopathy in rats and explore its possible mechanism. **Methods** The rat model of diabetes was established by tail vein injection of STZ ($60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Ninety Wistar rats were randomly divided into normal group,

收稿日期: 2020-09-09

作者简介: 闫桂溪, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理学。Email: 17637616880@163.com。通信作者: 杜钢军, 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药药理学。Email: dgjlhh@163.com。

基金项目: 河南省自然科学基金项目(182300410310)。

model group, *Qi Zhi* hypoglycemic tablet group(780 mg·kg⁻¹), metformin hydrochloride tablet group(200 mg·kg⁻¹) and Glyburide tablet group(1.5 mg·kg⁻¹). The volume of intragastric administration was 10 mL·kg⁻¹, and the drugs were respectively administered by gavage once a day for 3 consecutive months. The changes of fasting blood glucose, water intake, food intake, urine volume, body mass, electrocardiogram and blood pressure in rats were measured. The network pharmacology method was used to predict the action mechanism of *Qi Zhi* hypoglycemic tablet on diabetic heart disease. The histopathological changes of heart were visualized by Hematoxylin-Eosin (HE) staining. The expression of transforming growth factor(TGF-β1), nuclear transcription factor kappa B(NF-κB) and cysteine protease-3(Caspase-3) in heart tissue were detected by immunohistochemistry. Western Blot was used to detect the expression of Collagen I and Matrix metalloproteinase tissue inhibitor-2 (TIMP-2) in cardiac tissue. **Results** ①Network pharmacology analyses revealed that the protective mechanisms by which *Qi Zhi* hypoglycemic tablet prevented heart injury were significantly associated with Insulin resistance, cGMP-PKG signaling pathway, NF-κB signaling pathway which regulate the “nitric oxide biosynthetic process” and “G-protein coupled receptor pathway” and “vasoconstriction”. And that is because the main components of *Qi Zhi* hypoglycemic tablet, such as Astraisoflavanin, Sitogluside, Sibiricoside, Quercetin, Hirudin and Geniposide can act on key targets such as ADRA1D, INSR, ADRA1A, PTGS2 and EDNRA. ②Compared with the normal group, the rats in the model group showed significant increases in blood glucose, water intake, food intake, urine volume($P < 0.01$) and body mass reduction($P < 0.05$, $P < 0.01$) on day 10, 40, 90. The blood pressure increased significantly at day 40 and 90($P < 0.05$, $P < 0.01$); the electrocardiogram showed arrhythmia, a major wave anomalies, and a significant increase in the time required for the left ventricle to rise to its maximum rate on day 90($P < 0.01$), and expressions of Collagen I, TIMP-2, TGF-β1, NF-κB, Caspase-3 were up-regulated in heart tissues($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the water intake, volume diet and urine volume of the *Qi Zhi* hypoglycemic tablet group were significantly reduced on day 10, 40 and 90($P < 0.05$, $P < 0.01$), the body mass increased significantly($P < 0.05$, $P < 0.01$); fasting glucose levels were significantly lower at day 40 and 90($P < 0.01$); significantly lowered blood pressure at day 40, 90($P < 0.05$); the electrocardiogram showed no arrhythmia, main wave abnormalities on day 40, and the time required for the left ventricle to rise to its maximum rate was significantly reduced on day 90($P < 0.05$); expression levels of TGF-β1, NF-κB, Caspase-3, Collagen I and TIMP-2 in rat heart tissues were significantly decreased($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** *Qi Zhi* hypoglycemic tablet improves polydipsia, polyphagia, polyuria and emaciation caused by diabetes, and has a therapeutic effect on heart damage caused by diabetes, which may be related to inhibiting Collagen I, TIMP-2, TGF-β1, NF-κB, Caspase-3 protein expression, and lead to the inhibition of inflammation and myocardial fibrosis.

Keywords: *Qi Zhi* hypoglycemic tablet; streptozotocin; diabetic heart disease; network pharmacology; inflammation; myocardial damage; NF-κB; rats

糖尿病性心脏病(Diabetic cardiopathy, DCM)是糖尿病并发症之一,患者表现为心肌结构改变和心室舒缩功能异常,最终可诱发心力衰竭,导致糖尿病晚期死亡^[1]。DCM是多种复杂因素引起的病理生理学过程,目前对其细胞和分子机制尚不十分清楚^[2]。临床常用的糖尿病治疗药物如胰岛素、双胍类、磺脲类及胰岛素增敏剂等,虽然降糖作用肯定,但难以阻止糖尿病并发症的发生^[3-5]。随着全球糖尿病患者发病率逐年增高,DCM发病人数也在逐年增

加^[6-7]。中医药在糖尿病及其并发症防治方面具有独特优势^[8-10],现代中医提出的“气阴两虚兼挟血瘀证”的糖尿病发病理论为其防治提供了方向^[11-12]。

芪蛭降糖片是遵循祛瘀益气养阴法拟定而成的纯中药复方制剂,是由黄芪、水蛭、地黄和黄精组成的防治糖尿病血管并发症的上市药物^[13]。临床研究^[14]表明,芪蛭降糖胶囊治疗糖尿病合并冠心病心绞痛疗效明显,患者动态心电图ST-T缺血改变阵次和持续时间均得到显著改善。研究^[15]还发现,芪蛭降糖胶

囊能通过减轻细胞外基质在肾脏中的积聚,从而改善大鼠肾组织和血管结构的病理损害。本研究拟通过建立链脉佐菌素(STZ)诱导糖尿病大鼠模型,观察芪蛭降糖片对糖尿病性心脏病的保护作用,并结合网络药理学方法探讨其可能的作用机制,以期为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物 Wistar 大鼠 150 只, SPF 级, 雌雄各半, 体质量(150±20)g, 由河南省医学实验动物中心提供, 动物质量合格证号: 41000100002406, 动物生产许可证号: SCXK(豫)2015-0002, 动物实验伦理批号: HUSAM 2016-288。

1.2 药物及试剂 芪蛭降糖片(批号: 180102), 广东合威制药有限公司; 盐酸二甲双胍片(批号: AAU4623), 中美上海施贵宝制药有限公司; 格列本脲片(批号: 1712065), 新乡市常乐制药有限公司。链脉佐菌素(STZ, 批号: 615K0319), 北京索莱宝科技有限公司; 转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$, 批号: 21898-1-AP)、核转录因子 κB (NF- κB , 批号: 10745-1-AP)、基质金属蛋白酶抑制因子 2(TIMP-2, 批号: 17353-1-AP)、半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3, 批号: 19677-1-AP)、肌动蛋白(β -actin, 批号: 20536-1-AP)一抗, 武汉三鹰生物科技有限公司; I 型胶原蛋白(Collagen-1, 批号: bs-10423R)一抗, 武汉博士德生物科技有限公司; 血糖试纸, 欧姆龙健康医疗有限公司; 标准啮齿动物饲料, 购自河南省医学实验动物中心, 许可证号: SCXK(YU)2015-0005, 合格证号: 41000100003159。

1.3 主要仪器 HEA-STP30 型血糖仪, 上海欧姆龙健康医疗有限公司; Multiskan™ FC 酶标仪, 美国 Thermo Fisher 公司; LGR16-W 型高速冷冻离心机, 北京京立离心机有限公司; BX43 型显微镜, 日本奥林巴斯公司; YP6001N 型电子天平, 上海精密科学仪器有限公司; 85-2 型恒温磁力搅拌器, 北京国华公司; DZKW-4 型电子恒温水浴锅, 北京中兴伟业仪器有限公司; HZQ-F160 型全温振荡培养箱, 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司; 泰盟全自动无创血压测量系统 BP-100A, 成都泰盟软件有限公司; Biopac 多导生理记录仪, 北京普升达科贸有限公司; RM2235 型切片机, 德国徕卡公司; DYY-7C 型电泳仪, 北京六一仪器厂; G: BOX 多功能凝胶成像系统, 美国 Syngene 公司。

1.4 模型复制 大鼠适应性喂养 1 周后, 于第 7 天晚

上 8:00 开始禁食不禁水, 第 8 天上午 8:00 尾静脉注射以枸橼酸缓冲液(0.05 mmol·L⁻¹, pH=4.5)配制的 STZ 60 mg·kg⁻¹[16], 72 h 后尾静脉采血测定空腹血糖, 以血糖值 ≥ 13.0 mmol·L⁻¹ 者入选实验[17]; 血糖未达标者于第 13 天再次尾静脉注射 STZ 60 mg·kg⁻¹, 第 16 天空腹血糖值 ≥ 13.0 mmol·L⁻¹ 者入选实验。实验第 22 天, 再次检测造模大鼠的血糖值, 剔除空腹血糖值 < 13.0 mmol·L⁻¹ 者。

1.5 分组及给药 将造模成功的糖尿病大鼠按血糖值随机分为模型组(0.5% CMC-Na, 10 mL·kg⁻¹)、芪蛭降糖片组(780 mg·kg⁻¹)、盐酸二甲双胍片组(200 mg·kg⁻¹)、格列本脲片组(1.5 mg·kg⁻¹), 每组 18 只, 雌雄各半。另选正常大鼠雌雄各 9 只, 作为正常组(0.5% CMC-Na)。分组当日开始给药, 灌胃 0.5% CMC-Na 溶液混悬药物, 每日 1 次, 连续给药 3 个月。

1.6 体质量、饮水量、饮食量及尿量测定 每周检测大鼠体质量, 以减质量法测量饮水量、饮食量和尿量变化, 根据体质量调整用药剂量, 通过饮水量、饮食量和尿量变化观察造模进展。

1.7 血糖测定 药物治疗后的第 10、40、90 天晚上禁食不禁水 10 h, 于次日早上尾静脉采血测定大鼠空腹血糖值。

1.8 心电图及血压测定 药物治疗后的第 40、90 天, 每组取雌、雄大鼠各 5 只, 以水合氯醛麻醉后用生理记录仪二导联模式记录大鼠心电图, 并用全自动无创血压测量系统记录大鼠血压。

1.9 网络药理学分析 利用中药系统药理学分析平台数据库(TCMSP, <http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>)检索芪蛭降糖片中黄芪、黄精和地黄的主要化学成分, 选择口服生物利用度(OB) $\geq 10\%$ 和类药性(DL) ≥ 0.10 的化合物作为潜在活性化合物, 水蛭中的化学成分通过文献检索获得[18]。

通过 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取具有化学结构(*.SMILES)的相关成分, 将相关化学成分结构的 Mol2 格式文件上传至 Swiss Target Prediction(<http://www.swisstargetprediction.ch>)和 STITCH(<http://stitch.embl.de>)数据库进行靶点预测, 预测所得全部靶点作为备选靶点。采用 UniProt 数据库(<http://www.uniprot.org>)将备选靶点名称规范化为官方名称(Official Symbol)和 Uniprot ID。通过 Therapeutic Target Database(TTD, <https://db.idrblab.org/ttd/>)数据库, 以“Diabetes”“Heart”为关键词收

集与糖尿病性心脏病相关的靶点,并与预测到的化学成分靶点进行对比,筛选出与芪蛭降糖片防治糖尿病性心脏病作用直接相关的治疗靶点。

利用 STRING(<https://string-db.org>)平台构建治疗靶点蛋白互作(PPI)网络,并将其导入 Cytoscape 软件,利用 Cytoscape 中的 Network Analyzer 功能分析网络中的重要靶点。通过生物学信息注释数据库(DAVID, <https://david.ncifcrf.gov>)对所获取的作用靶点进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,并用 FDR 错误控制法($FDR < 0.05$)对 P 值作检验校正。最终设定阈值 $P < 0.05$,筛选出与芪蛭降糖片防治糖尿病性心脏病作用相关的生物过程和信号通路;进一步通过 Omicshare 在线平台将 GO 和 KEGG 富集分析结果进行可视化处理,分析与防治糖尿病性心脏病相关通路密切相关的化合物。

1.10 取材及处理 药物治疗后第 92 天,在眼眶静脉丛采血后用颈椎脱臼法处死大鼠,剖取心脏,于中间切开,取 1/2 组织固定于 3.8%多聚甲醛溶液中,取另 1/2 组织于 -80°C 冰箱低温冻存。

1.11 心脏组织病理学观察 取 3.8%多聚甲醛固定的心脏组织,常规取材、脱水、石蜡包埋、切片,进行苏木素-伊红(HE)染色,在光学显微镜下观察组织病理学形态,评价心脏组织损伤程度。

1.12 免疫组织化学法检测心脏组织 TGF- β 1、NF- κ B 及 Caspase-3 蛋白表达 取 3.8%多聚甲醛固定的心脏组织,常规取材、石蜡包埋、切片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇复水;3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶;0.1%胰酶修复抗原。滴加 5% BSA 封闭液(正常山羊血清封闭液),分别滴加合适浓度一抗[抗 TGF- β 1、NF- κ B、Caspase-3, 1:500],覆盖心脏组织,置 4°C 冰箱过夜。第 2 天,补加一抗于 37°C 孵育 1 h;PBS 冲洗,滴加二抗于 37°C 孵育 30 min;PBS 冲洗,滴加 SABC,置 37°C 温箱 20 min;PBS 冲洗,加 DAB 显色后置水中终止染色,苏木素复染核;梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,晾干。显微镜下进行 $\times 400$ 的显微照相。阳性着色细胞计数方法:每个样本随机选取 3 个不重叠视野,采用 ImageJ 图像处理软件分析,分别测量阳性着色度(胞质及突起内充满棕黄色阳性反应颗粒)并计算相对灰度值,取平均值,进行统计学分析。

1.13 Western Blot 法检测心脏组织 Collagen I 及 TIMP-2 蛋白表达 取 -80°C 冰箱冻存的各组大鼠心

脏组织 0.2 g,加入预冷的 1 mL PBS,冰上研磨;移入 1.5 mL EP 管,以 $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清;沉淀加入 50 μL 含有 PMSF 的 RIPA 蛋白裂解液(PMSF:RIPA=1:100),混匀,置冰上裂解 60 min,每隔 15 min 混悬 1 次。然后以 $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清,采用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。配制 12%分离胶,5%浓缩胶;蛋白上样量为 100 μg ,加入 5 μL 蛋白 Marker,于恒压 80~120 V 条件下进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,各条带充分展开时终止电泳。PVDF 膜经甲醇活化 15 min 后于低温条件下调直流 200 mA 转膜 2 h。转膜完成后 PVDF 膜放入 TBS 配制的 5%脱脂奶粉中封闭 2 h,封闭完成后 TBS 清洗,置于一抗(1:1 000)中 4°C 孵育过夜。次日以 TBST 充分洗涤(每次 7 min,共 7 次),置于二抗(1:1 000)中 37°C 恒温摇床孵育 2 h,TBST 洗涤(每次 7 min,共 7 次)。ECL 发光液 A 液:B 液按 1:1 比例混合均匀,依次在膜上加 200 μL 发光液;于凝胶成像仪中发光、显影。以 β -actin 为内参,采用 ImageJ 图像处理软件进行半定量分析。

1.14 统计学处理方法 采用 Graphpad prism 5.0 统计软件进行数据分析;计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两组间比较用 t 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对糖尿病大鼠体质量、饮水量、饮食量及尿量的影响 结果见表 1、表 2。与正常组比较,模型组大鼠在第 10、40、90 天的饮水量、饮食量和尿量明显升高($P < 0.01$),体质量明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较,芪蛭降糖片组、盐酸二甲双胍片组在第 10、40、90 天的饮水量、饮食量、尿量明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),体质量明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$);格列本脲片组在第 40 天的饮食量与尿量降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),在第 10、40 天的体质量明显增加($P < 0.01$)。结果表明,芪蛭降糖片能改善糖尿病引起的多饮、多食、多尿与消瘦症状,改善大鼠生存质量。

2.2 对糖尿病大鼠空腹血糖的影响 结果见表 3。与正常组比较,模型组大鼠在第 10、40、90 天的空腹血糖值明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,芪蛭降糖片组与格列本脲片组在第 40、90 天的空腹血糖值明显降低($P < 0.01$);盐酸二甲双胍片组在第 10、

表 1 芪蛭降糖片对糖尿病大鼠饮水量、饮食量的影响($\bar{x} \pm s, n=18$)

Table 1 Effect of *Qi Zhi* hypoglycemic tablet on water and food intake in diabetic rats($\bar{x} \pm s, n=18$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	饮水量/mL			饮食量/g		
		第 10 天	第 40 天	第 90 天	第 10 天	第 40 天	第 90 天
正常组	-	32.00 ± 2.87	33.25 ± 5.56	29.44 ± 7.04	15.00 ± 2.83	16.59 ± 3.56	18.52 ± 3.38
模型组	-	128.65 ± 9.71 ^{##}	125.27 ± 10.20 ^{##}	145.20 ± 10.93 ^{##}	30.65 ± 3.10 ^{##}	34.59 ± 3.23 ^{##}	35.64 ± 8.00 ^{##}
芪蛭降糖片组	780	113.35 ± 7.27 [*]	109.61 ± 9.26 ^{**}	113.23 ± 8.65 ^{**}	25.53 ± 1.39 ^{**}	28.23 ± 4.26 ^{**}	30.31 ± 5.74 [*]
盐酸二甲双胍片组	200	108.71 ± 9.29 ^{**}	95.58 ± 8.68 ^{**}	99.58 ± 7.38 ^{**}	25.98 ± 1.92 [*]	25.55 ± 3.13 ^{**}	27.06 ± 1.48 ^{**}
格列本脲片组	1.5	122.57 ± 7.29	127.71 ± 5.46	142.31 ± 9.61	29.02 ± 2.55	29.50 ± 4.14 [*]	33.34 ± 6.42

注: 与正常组比较, ^{##}*P* < 0.01; 与模型组比较, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01

表 2 芪蛭降糖片对糖尿病大鼠尿量、体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=18$)

Table 2 Effect of *Qi Zhi* hypoglycemic tablet on urine volume and body mass of diabetic rats($\bar{x} \pm s, n=18$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	尿量/g			体质量/g		
		第 10 天	第 40 天	第 90 天	第 10 天	第 40 天	第 90 天
正常组	-	14.33 ± 4.84	16.80 ± 1.16	15.17 ± 4.20	226.44 ± 8.15	268.00 ± 10.25	301.25 ± 9.87
模型组	-	111.55 ± 5.44 ^{##}	125.41 ± 4.11 ^{##}	124.88 ± 2.67 ^{##}	178.92 ± 8.88 ^{##}	208.84 ± 7.27 [#]	220.70 ± 5.65 ^{##}
芪蛭降糖片组	780	98.59 ± 6.22 ^{**}	96.63 ± 3.70 ^{**}	80.65 ± 3.96 ^{**}	192.25 ± 9.16 [*]	227.11 ± 7.35 ^{**}	232.77 ± 3.87 ^{**}
盐酸二甲双胍片组	200	85.56 ± 5.66 ^{**}	78.97 ± 5.44 ^{**}	79.64 ± 5.08 ^{**}	197.20 ± 9.72 ^{**}	223.73 ± 10.74 ^{**}	262.28 ± 3.12 ^{**}
格列本脲片组	1.5	112.50 ± 4.32	111.33 ± 5.03 ^{**}	121.61 ± 5.19	198.45 ± 5.32 ^{**}	222.62 ± 7.72 ^{**}	224.25 ± 9.66

注: 与正常组比较, [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01; 与模型组比较, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01

表 3 芪蛭降糖片对糖尿病大鼠空腹血糖的影响($\bar{x} \pm s, n=18$)

Table 3 Effect of *Qi Zhi* hypoglycemic tablet on blood glucose in diabetic rats($\bar{x} \pm s, n=18$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	空腹血糖/(mmol·L ⁻¹)		
		第 10 天	第 40 天	第 90 天
正常组	-	5.41 ± 0.59	5.51 ± 0.56	5.12 ± 0.59
模型组	-	24.04 ± 4.44 ^{##}	23.98 ± 4.98 ^{##}	25.17 ± 5.40 ^{##}
芪蛭降糖片组	780	22.44 ± 4.39	18.73 ± 5.87 ^{**}	16.82 ± 5.60 ^{**}
盐酸二甲双胍片组	200	16.96 ± 4.40 ^{**}	13.62 ± 4.79 ^{**}	10.71 ± 5.73 ^{**}
格列本脲片组	1.5	20.92 ± 5.91	18.01 ± 5.09 ^{**}	14.83 ± 6.57 ^{**}

注: 与正常组比较, [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01; 与模型组比较, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01

40、90 天的空腹血糖值明显降低(*P* < 0.01)。

2.3 对糖尿病大鼠心电图及血压的影响 结果见表 4、图 1。与正常组比较, 模型组大鼠在第 40、90 天的血压明显升高(*P* < 0.05, *P* < 0.01); 心电图在第 40、90 天表现出心律不齐, 主波异常现象^[9]; 第 90 天的左心室上升达最大速率所需时间明显延长(*P* < 0.01)。与模型组比较, 芪蛭降糖片组在第 40、90 天的血压明显降低(*P* < 0.05), 心电图在第 40 天未表现出心律不齐、主波异常现象, 且第 90 天的左心室上升达最大速率所需时间明显缩短(*P* < 0.05);

盐酸二甲双胍片组在第 90 天的血压明显降低(*P* < 0.05), 心电图在第 40 天未表现出心律不齐、主波异常现象, 而第 90 天的左心室上升达最大速率所需时间明显缩短(*P* < 0.05); 格列本脲片组未表现出明显的降血压作用, 心电图在第 40 天表现出 T 波降低现象, 第 90 天未表现出心律不齐、主波异常现象, 在第 90 天的左心室上升达最大速率所需时间明显缩短(*P* < 0.01)。结果表明, 芪蛭降糖片在发挥降糖作用的同时能改善糖尿病大鼠血压升高及心功能异常现象。

2.4 对糖尿病大鼠心脏保护作用机制的网络药理学预测 结果见图 2、图 3。共检索出 201 个化学成分, 包括黄芪 87 个、黄精 38 个、地黄 76 个、水蛭 33 个。结果筛选出主要活性成分 19 个, 分别对应糖尿病性心脏病靶点 38 个。结果表明, 芪蛭降糖片通过黄芪异黄酮甙(Astraisoflavanin)、西托糖苷(Sitoglucoside)、黄精皂苷(Sibiricoside)、槲皮素(Quercetin)、水蛭素(Hirudin)、京尼平苷(Geniposide)等主要活性成分, 作用于 ADRA1D、INSR、ADRA1A、PTGS2 和 EDNRA 等关键靶点, 主要调节胰岛素抵抗、环磷酸鸟苷-环磷酸鸟苷依赖蛋白激酶 G(cGMP-PKG)、NF-κB 等信号通路, 以及

表 4 芪蛭降糖片对糖尿病大鼠血压及左心室上升达最大速率所需时间(t-dp/dt)的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of *Qi Zhi* hypoglycemic tablet on blood pressure and time required for the maximum rate of left ventricle rise in diabetic rats($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	第 40 天		第 90 天		第 40 天	第 90 天
		收缩压/mmHg	舒张压/mmHg	收缩压/mmHg	舒张压/mmHg	(t-dp/dt)/s	(t-dp/dt)/s
正常组	-	109.38 ± 4.21	79.68 ± 14.63	102.64 ± 28.34	75.26 ± 2.39	16.25 ± 3.77	15.25 ± 1.92
模型组	-	135.32 ± 11.14 ^{##}	87.42 ± 26.30 [#]	145.80 ± 22.62 ^{##}	89.74 ± 7.54 ^{##}	24.25 ± 1.75	29.25 ± 3.03 ^{##}
芪蛭降糖片组	780	122.20 ± 24.96 [*]	72.20 ± 18.60 [*]	120.08 ± 31.46 [*]	62.85 ± 11.48 [*]	18.25 ± 2.63	15.75 ± 4.02 [*]
盐酸二甲双胍片组	200	124.04 ± 14.05	77.24 ± 12.42	124.38 ± 24.88 [*]	68.42 ± 12.19 [*]	17.25 ± 4.03	17.50 ± 5.02 [*]
格列本脲片组	1.5	133.46 ± 33.70	79.68 ± 19.96	134.53 ± 23.00	82.52 ± 31.34	19.50 ± 3.42	18.25 ± 3.63 ^{**}

注: 与正常组比较, [#]P < 0.05, ^{##}P < 0.01; 与模型组比较, ^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01

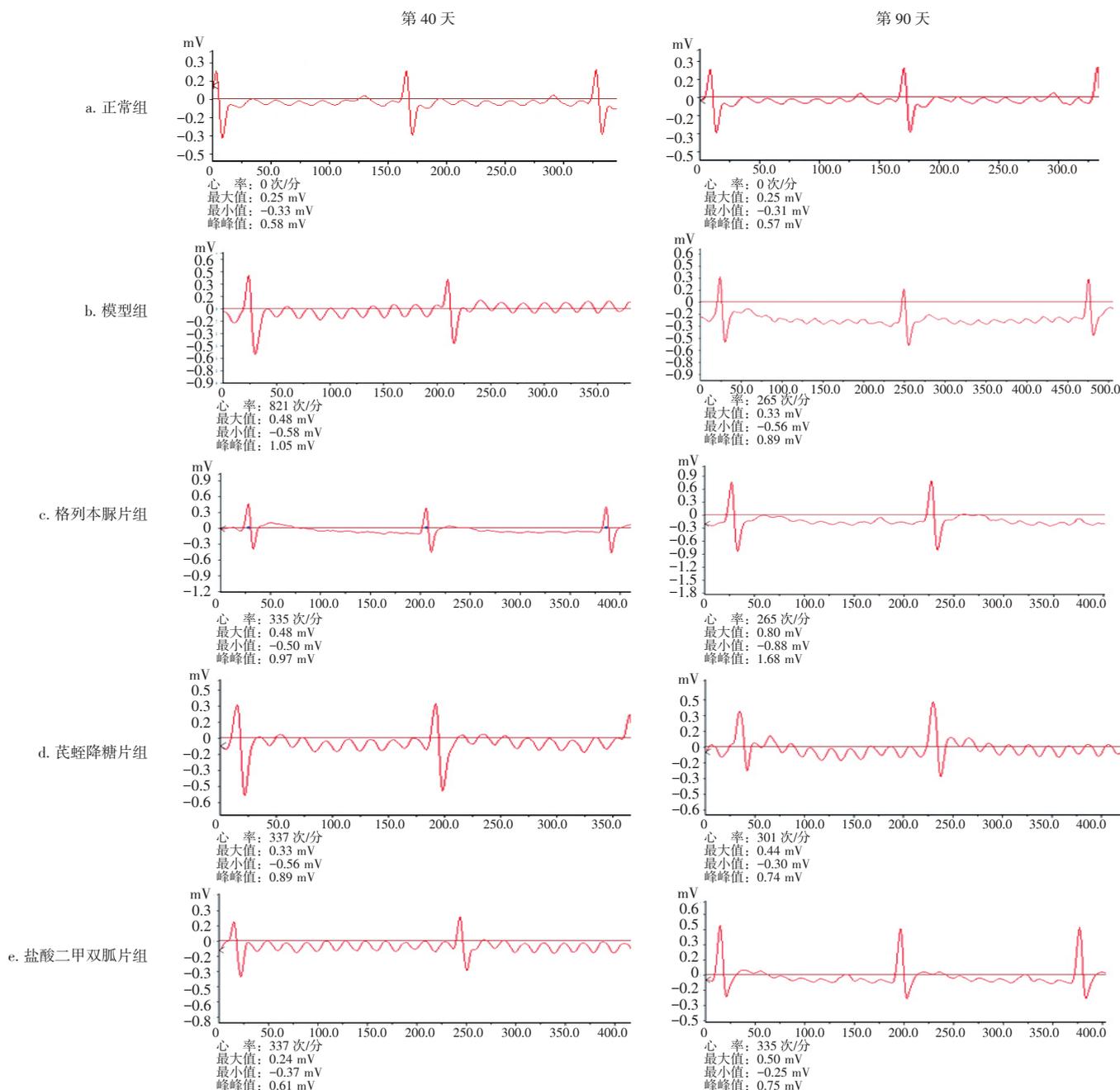


图 1 芪蛭降糖片对糖尿病大鼠心电图的影响

Figure 1 Effect of *Qi Zhi* hypoglycemic tablet on electrocardiograms of diabetic rats

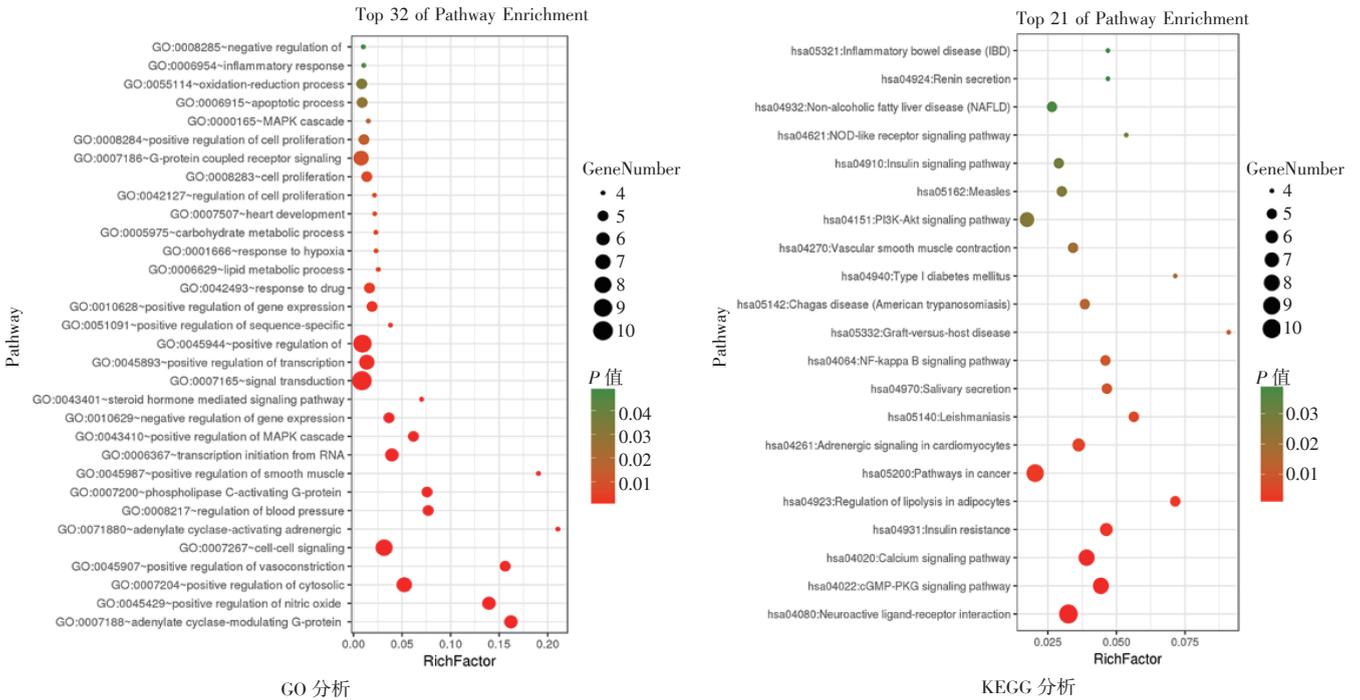
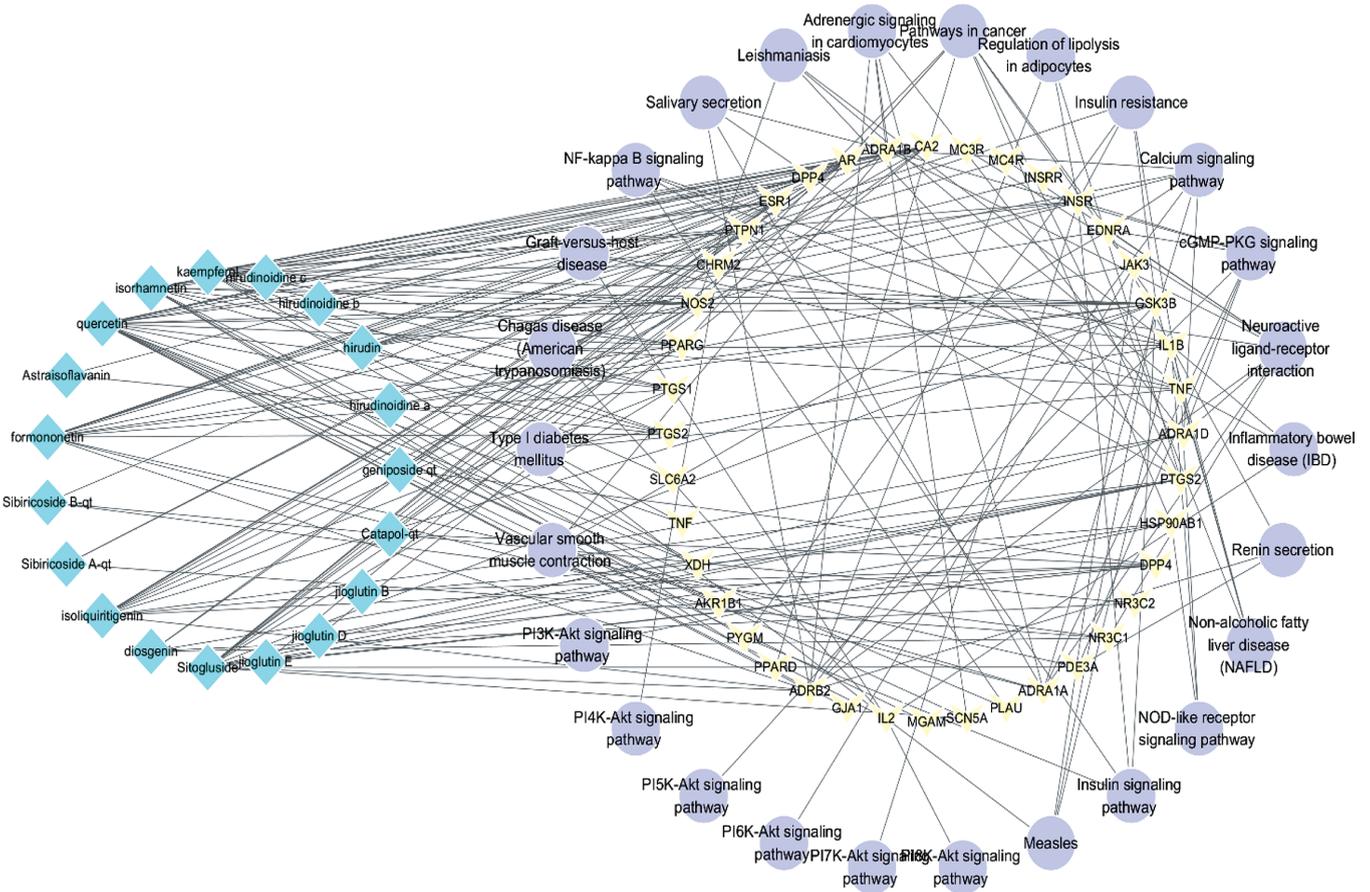


图 2 芪蛭降糖片对糖尿病大鼠心脏保护作用潜在靶点的 GO 及 KEGG 通路富集分析

Figure 2 Enrichment analysis of GO and KEGG pathways as potential targets of *Qi Zhi* hypoglycemic tablet in diabetic rats



注：黄色表示潜在作用靶点；青色表示活性成分；紫色表示信号通路

图 3 芪蛭降糖片对糖尿病大鼠心脏保护作用的成分-靶点-通路网络

Figure 3 Prediction of component-target-pathway network on effect of *Qi Zhi* hypoglycemic tablet on diabetic rats

一氧化氮生物合成、G 蛋白偶联受体通路、血管收缩等过程阻止心脏损伤。

2.5 对糖尿病大鼠心脏组织病理学变化的影响 结果见图 4。与正常组比较，模型组大鼠的心脏组织损伤明显，表现为心肌纤维排列紊乱，出现心肌纤维断裂现象，心肌细胞肿胀，细胞核散列，心肌间隙增宽^[20-22]。与模型组比较，芪蛭降糖片组、盐酸二甲双胍片组及格列本脲片组的心肌纤维排列紊乱，

心肌细胞肿胀和心肌间隙增宽等现象有不同程度改善。

2.6 对糖尿病大鼠心脏组织 TGF-β1、NF-κB 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 结果见图 5、图 6、图 7。与正常组比较，模型组大鼠心脏组织的 TGF-β1、NF-κB 及 Caspase-3 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较，盐酸二甲双胍片组大鼠心脏组织的 TGF-β1、NF-κB 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$,

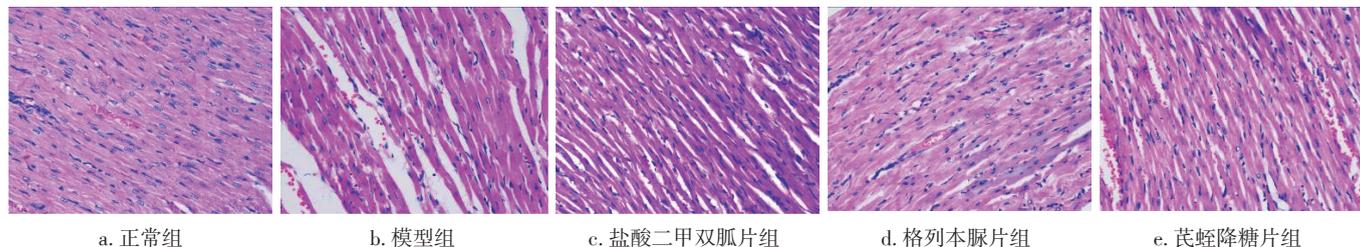
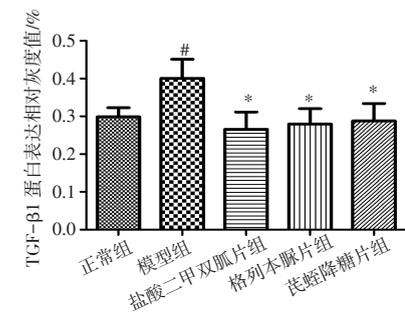
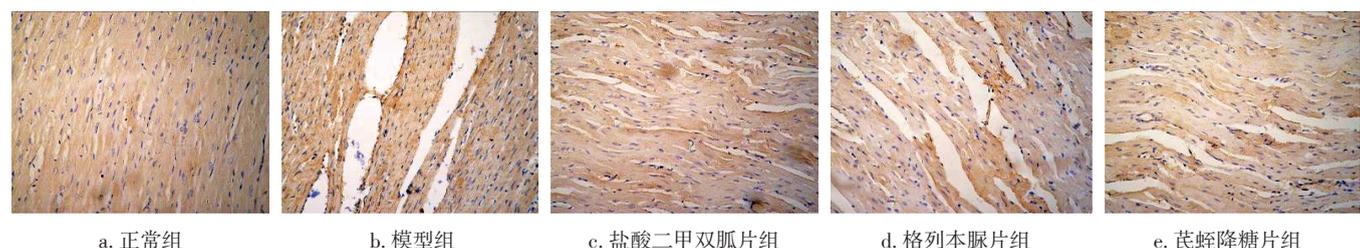


图 4 芪蛭降糖片对糖尿病大鼠心脏组织病理学变化的影响(HE 染色, ×400)

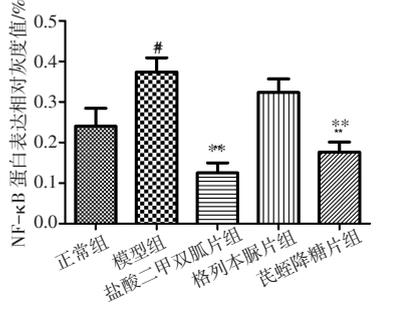
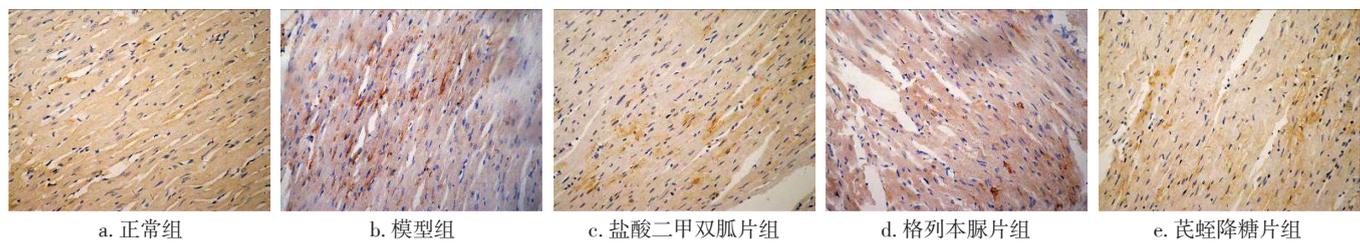
Figure 4 Effect of *Qi Zhi* hypoglycemic tablet on heart histopathological changes in diabetic rats(HE staining, ×400)



注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$

图 5 芪蛭降糖片对糖尿病大鼠心脏组织 TGF-β1 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400; $\bar{x} \pm s, n=6$)

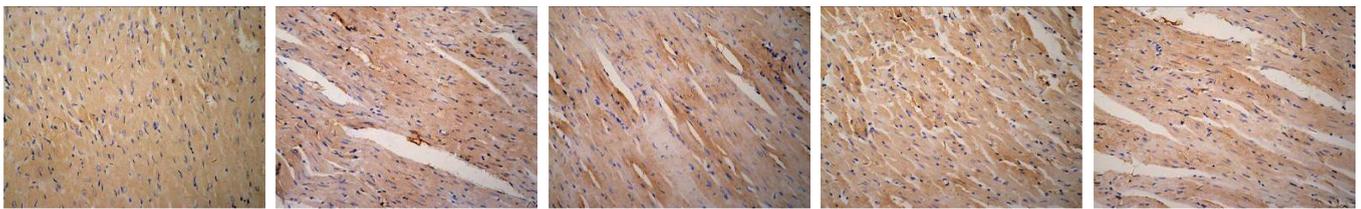
Figure 5 Effect of *Qi Zhi* hypoglycemic tablet on TGF-β1 protein expression of heart tissue in diabetic rats(IHC, ×400; $\bar{x} \pm s, n=6$)



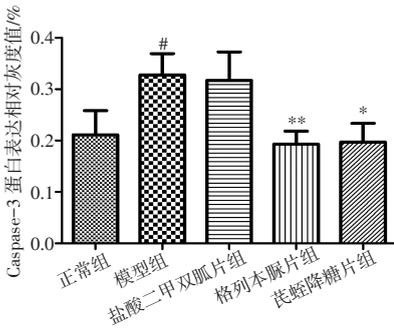
注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，** $P < 0.01$

图 6 芪蛭降糖片对糖尿病大鼠心脏组织 NF-κB 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400; $\bar{x} \pm s, n=6$)

Figure 6 Effect of *Qi Zhi* hypoglycemic tablet on NF-κB protein expression of heart tissue in diabetic rats(IHC, ×400; $\bar{x} \pm s, n=6$)



a. 正常组 b. 模型组 c. 盐酸二甲双胍片组 d. 格列本脲片组 e. 芪蛭降糖片组



注：与正常组比较，[#] $P < 0.05$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$

图 7 芪蛭降糖片对糖尿病大鼠心脏组织 Caspase-3 蛋白表达的影响(免疫组化, $\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

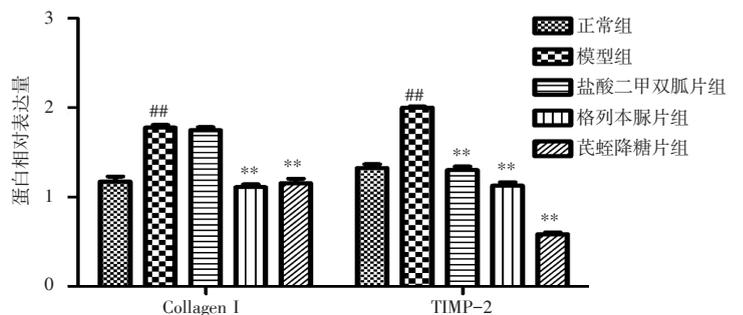
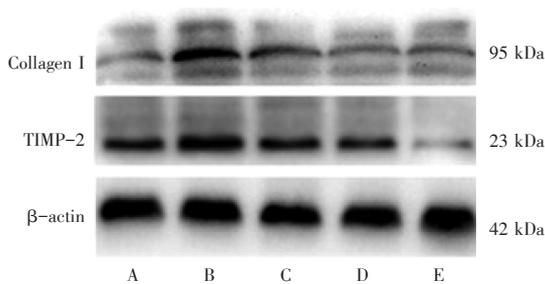
Figure 7 Effect of *Qi Zhi* hypoglycemic tablet on Caspase-3 protein expression of heart tissue in diabetic rats(IHC, $\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

$P < 0.01$); 格列本脲片组大鼠心脏组织的 TGF- $\beta 1$ 、Caspase-3 蛋白表达水平明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$); 芪蛭降糖片组大鼠心脏组织的 TGF- $\beta 1$ 、NF- κB 及 Caspase-3 表达水平均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.7 对糖尿病大鼠心脏组织 Collagen I 及 TIMP-2 蛋白表达的影响

结果见图 8。与正常组比较，模型

组大鼠心脏组织的 Collagen I 及 TIMP-2 蛋白表达水平平均明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较，盐酸二甲双胍片组大鼠心脏组织的 TIMP-2 蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$); 格列本脲片组及芪蛭降糖片组大鼠心脏组织的 Collagen I、TIMP-2 蛋白表达水平均明显降低($P < 0.01$)。结果表明，芪蛭降糖片能明显改善心肌基质沉积，改善糖尿病大鼠的心脏损伤。



注：A. 正常组；B. 模型组；C. 盐酸二甲双胍片组；D. 格列本脲片组；E. 芪蛭降糖片组。与正常组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$

图 8 芪蛭降糖片对糖尿病大鼠心脏组织 Collagen I 及 TIMP-2 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Figure 8 Effects of *Qi Zhi* hypoglycemic tablet on the protein expression of Collagen I and TIMP-2 in heart tissue of diabetic rats($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3 讨论

糖尿病是由于胰岛素分泌缺陷或胰岛 β 细胞生物功能受损而引起的以高血糖为特征的代谢性疾病，病程长且会引起诸多并发症^[23]，其并发症为糖尿病患者致残和死亡的主要原因。糖尿病性心脏病(DCM)发病机制复杂，持续高血糖可导致心脏微血管病变、慢性炎症、心肌纤维化和心肌细胞凋亡^[24-26]，心肌结构受损可导致心室舒张和收缩功能损

伤^[27-28]，严重者可引起心力衰竭^[29]。糖尿病属于中医的“消渴”范畴，主要表现为多饮、多食、多尿与消瘦。中医辨证论治认为糖尿病的发病机理主要为阴虚，无论是肺阴虚型、肾阴虚型或是阴阳两虚型皆如此；糖尿病性心脏病的发生是由于消渴久治不愈而导致的气虚血瘀引起，以心气虚、心阴虚为本。芪蛭降糖片的主要功效为益气养阴、活血化瘀，适用于气阴两虚兼血瘀所致消渴病。

本研究结果表明,模型组大鼠心脏组织病理切片显示其出现心肌纤维排列紊乱,组织松散,心肌细胞肿胀,间隙增宽等受损现象;同时,TGF- β 1、NF- κ B、Caspase-3、Collagen I及TIMP-2蛋白表达明显上调,提示DCM诱发了心肌纤维化、炎症和细胞凋亡,造成心肌肥厚,基底膜增厚等心脏组织异常病变。通过网络药理学分析对芪蛭降糖片的降糖机制进行预测,发现其主要通过黄芪异黄酮、西托糖苷、黄精皂苷、槲皮素、水蛭素、京尼平苷等主要活性成分,作用于ADRA1D、INSR、ADRA1A、PTGS2、EDNRA等关键靶点,起到调节胰岛素抵抗、环磷酸鸟苷-环磷酸鸟苷依赖蛋白激酶G(cGMP-PKG)、NF- κ B等信号通路,以及一氧化氮生物合成、G蛋白偶联受体通路、血管收缩等过程阻止心脏损伤的作用。NF- κ B的过表达会升高体内一氧化氮导致机体抗氧化能力降低,促进炎症的发展,造成机体损伤。芪蛭降糖片可降低心脏组织NF- κ B水平,起到抑制NF- κ B信号通路激活的作用,减少炎症对心脏组织的损害,改善高糖所致的心肌损伤。TGF- β 是重要的致纤维化因子,芪蛭降糖片组的心肌纤维化程度较模型组低可能与黄芪中的有效成分黄芪异黄酮等抑制TGF- β 1表达从而抑制纤维化途径有关。

综合来看,常用口服降糖药盐酸二甲双胍片和格列本脲片的降糖作用出现较快(第10天),但对血压升高、心电图异常和心肌肥厚的改善作用不如芪蛭降糖片明显。芪蛭降糖片降糖作用出现较慢(第40天),但能明显改善血压、心电图和心肌肥厚等症状。提示芪蛭降糖片多成分、多靶点、多通路的降糖机制与盐酸二甲双胍片和格列本脲片有差异。格列本脲片虽然降糖和减轻多饮、多食、多尿等作用明显,但对心脏功能及心脏组织损伤指标的影响不够明显,提示糖尿病引起的心脏损伤不仅仅与高血糖有关,单方面着重于降低血糖并不能完全阻止心脏损害。芪蛭降糖片虽然降糖作用出现较晚,但能明显改善心脏组织损伤,减少心脏组织TGF- β 1、NF- κ B及Caspase-3表达,具有阻止心肌细胞纤维化、改善炎症和减少心肌细胞凋亡的作用。

TGF- β 1途径通过抑制细胞增殖,促进细胞外基质合成,抑制纤溶系统激活和促进成纤维细胞分泌胶原、蛋白多糖等发挥强大的致纤维化作用^[30-31]。NF- κ B信号通过上调炎症细胞因子和促进细胞凋亡能够参与心室重构等心脏损伤过程,并且其可通过

促进氧化应激过程加重损伤^[32-33]。高糖环境会通过MAPK、NF- κ B等信号通路活化NF- κ B、TGF- β 1,促进TNF- α 、Collagen I、TIMP-2和炎症因子释放,最终导致细胞损伤、心肌纤维化,进而诱导心肌细胞凋亡或坏死。本研究结果表明,芪蛭降糖片可能调节并降低心脏组织TGF- β 1、Collagen I和TIMP-2表达,促进NF- κ B的磷酸化,减少促炎因子释放,改善心肌细胞生存环境,减轻高糖环境造成的心肌损伤。

综上所述,芪蛭降糖片可改善糖尿病造成的多饮、多食、多尿与消瘦现象,并对糖尿病所致心脏损伤有治疗作用,可能与其抑制心脏组织Collagen I、TIMP-2、TGF- β 1、NF- κ B、Caspase-3蛋白表达,从而抑制炎症、心肌纤维化有关。

参考文献:

- [1] SAI M, JING F, RAN Z, et al. SIRT1 activation by resveratrol alleviates cardiac dysfunction via mitochondrial regulation in diabetic cardiomyopathy mice[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 2017: 1-15.
- [2] 刘祥娟. 蛋白激酶D在糖尿病心脏病中的作用及分子机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2015.
- [3] 刘秀, 可成友. 药物治疗糖尿病的研究进展[J]. *当代医药论丛*, 2017, 15(10): 38-39.
- [4] 张红霞. 口服降糖药物不良反应研究进展[J]. *天津药学*, 2017, 29(2): 75-78.
- [5] XU Y, PILLA S J, ALEXANDER G C, et al. Use of non-insulin diabetes medicines after insulin initiation: a retrospective cohort study[J]. *PLoS One*, 2019, 14(2): e0211820.
- [6] 曾菊绒, 胥晓丽, 徐天娇. 糖尿病心肌重构的研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(1): 263-265.
- [7] 田静, 吕嵘, 郭炜. 线粒体障碍在糖尿病性心脏病中的作用及中医药研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(1): 8-14.
- [8] 聂绪强, 张丹丹, 张涵. 炎症、胰岛素抵抗与糖尿病的中药治疗[J]. *中国药理学杂志*, 2017, 52(1): 1-7.
- [9] 郭东臣, 张惠敏, 梁淑新, 等. 中成药治疗2型糖尿病证治-方药的调查分析[J]. *中成药*, 2015, 37(2): 442-456.
- [10] 郑彬丽, 倪青, 李绍旦, 等. 中药治疗糖尿病心脏病的实验研究进展[J]. *解放军医学院学报*, 2013, 34(4): 421-422.
- [11] 颜洁. 2型糖尿病常见中医证型气阴两虚血瘀证代谢特征分析[J]. *现代妇女(医学前沿)*, 2014(10): 95-95.
- [12] 王国盛, 韩洁. 益气养阴活血汤联合西药治疗气阴两虚兼血瘀型糖尿病肾病疗效观察[J]. *新中医*, 2017, 49(7): 61-63.
- [13] 郭兆安, 孟凡辰, 于春江. 芪蛭降糖胶囊对糖尿病肾病大鼠肾脏结构和功能的影响[J]. *中国医药科学*, 2015, 5(1): 31-36.
- [14] 倪青, 闫秀峰, 林兰. 芪蛭降糖胶囊治疗2型糖尿病合并冠心病心绞痛128例临床观察[J]. *中国中医药信息杂志*, 2010, 17(10): 9-11.

- [15] 孟凡辰, 郭兆安, 于春江, 等. 芪蛭降糖胶囊对糖尿病肾病大鼠肾组织血管内皮细胞生长因子及细胞外基质的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2014, 15(8): 676-681.
- [16] 曹琼丹. 黄芪甲苷对 I 型糖尿病大鼠心肌细胞能量代谢与凋亡的作用研究[D]. 锦州: 锦州医科大学, 2016.
- [17] 彭俊. 双丹明目胶囊对糖尿病视网膜病变大鼠模型视网膜 VEGF-a、VEGF-b、VEGF-c 及其受体 Flk-1 表达的影响[D]. 湖南: 湖南中医药大学, 2017.
- [18] 欧阳罗丹, 胡小松, 牛明, 等. 基于网络药理学的水蛭活血化痰的作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(9): 1901-1906.
- [19] 陈金堂, 张静, 周昆, 等. 六种全身麻醉药对豚鼠心电图的影响[J]. 实验动物科学, 2010, 27(6): 23-25, 54.
- [20] ZHANG J, QIU H, HUANG J, et al. Establishment of a diabetic myocardial hypertrophy model in *Mus musculus castaneus* mouse[J]. *Int J Exp Pathol*, 2018, 99(6): 295-303.
- [21] 陶小平. 一次大负荷跑台运动后大鼠心脏力-电变化和组织病理学观察[J]. 中国运动医学杂志, 2012, 31(4): 325-330.
- [22] 刘文旗, 戴红艳, 邢明青, 等. 糖尿病心肌病动物模型的建立[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(27): 4265-4270.
- [23] 闫菊花, 白君霞. 中医护理干预在糖尿病患者护理中的效果观察及血糖控制情况影响分析[J]. 中国社区医师, 2020, 36(23): 149-150.
- [24] 王玲, 潘小凤, 储全根. 糖尿病心肌病发病机制的研究进展[J]. 山西中医学院学报, 2016, 17(5): 74-77.
- [25] 张军, 谷翔, 黄问银, 等. 自噬在糖尿病心肌病中的作用机制研究[J]. 中国心血管病研究, 2016, 14(5): 402-406.
- [26] LEE H W, LEE S J, LEE M Y, et al. Enhanced cardiac expression of two isoforms of matrix metalloproteinase-2 in experimental diabetes mellitus[J]. *PLoS One*, 2019, 14(8): e0221798.
- [27] DASARE A P, GONDALIYA P, SRIVASTAVA A, et al. A therapeutic approach towards microRNA29 family in vascular diabetic complications: a boon or curse[J]. *J Diabetes Metab Disord*, 2019, 18(1): 243-254.
- [28] EVANGELISTA I, NUTI R, PICCHIONI T, et al. Molecular dysfunction and phenotypic derangement in diabetic cardiomyopathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13): e3264.
- [29] DELGADILLO-SILVA L F, TSAKMAKI A, AKHTAR N, et al. Modelling pancreatic β -cell inflammation in zebrafish identifies the natural product wedelolactone for human islet protection[J]. *Dis Model Mech*, 2019, 12(1): e036004.
- [30] 潘皓. HMGB1 对高糖诱导的小鼠心脏成纤维细胞 TGF- β 1、COLLAGEN I 表达的影响[D]. 镇江: 江苏大学, 2013.
- [31] SCHAFFER S, VISWANATHAN S, WIDJAJA A A, et al. IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis[J]. *Nature*, 2017, 552(7683): 110-115.
- [32] ZHANG R, XU L, ZHANG D, et al. Cardioprotection of ginkgolide B on myocardial ischemia/reperfusion-induced inflammatory injury via regulation of A20-NF- κ B pathway[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: e2844.
- [33] JIANG X, KONG B, SHUAI W, et al. Loss of MD1 exacerbates myocardial ischemia/reperfusion injury and susceptibility to ventricular arrhythmia[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 844: 79-86.

(编辑: 邹元平)