

养心定悸胶囊对糖尿病心肌病模型金黄地鼠的心肌保护作用[△]

钟 意^{1*}, 刘 刚², 马国平², 丁宝珠¹, 李晓霞¹, 刘皓莹¹, 梁文杰^{1,3#}(1.河北中医学院中西医结合学院, 石家庄 050200; 2.河北医科大学第一医院心内一科, 石家庄 050000; 3.河北省高校中药组方制剂应用技术研发中心, 石家庄 050200)

中图分类号 R965;R541.9 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)13-1573-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.13.07



摘要 目的 探讨养心定悸胶囊对糖尿病心肌病(DCM)模型金黄地鼠心肌细胞的保护作用机制。方法 将金黄地鼠分为对照组(10只,不造模、不给药)、模型组(9只,造模、不给药)、中药高剂量组[8只,造模、养心定悸胶囊给药2 g/(kg·d)]、中药低剂量组[8只,造模、养心定悸胶囊给药1 g/(kg·d)]、恩格列净组[9只,阳性对照,造模、给药10 mg/(kg·d)],所有金黄地鼠连续灌胃水或相应药物8周。实验期间观察金黄地鼠的一般情况,检测其血糖、总胆固醇(TC)、肌酸激酶同工酶MB(CK-MB)、左室射血分数(EF)、短轴缩短率(FS)和血清白细胞介素1 β (IL-1 β)、转化生长因子 β 1(TGF- β 1)水平;观察金黄地鼠的心肌病理组织形态变化;检测并观察金黄地鼠心肌组织中核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶1(caspase-1)、消皮素D(GSDMD)、核转录因子 κ B(NF- κ B)、IL-1 β 的mRNA及蛋白表达;检测心肌细胞DNA损伤情况。结果 与对照组比较,模型组金黄地鼠血糖、TC、CK-MB水平,血清中IL-1 β 、TGF- β 1水平,心肌组织中NLRP3、caspase-1、GSDMD、NF- κ B、IL-1 β mRNA表达水平、蛋白阳性表达及GSDMD蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);EF、FS显著降低($P<0.01$);心肌细胞结构不清,纤维排列紊乱,心肌间蓝染的胶原纤维增多;心肌组织DNA损伤阳性细胞显著增加。与模型组比较,各给药组以上指标均有不同程度逆转;心肌细胞间隙清晰,纤维排列紊乱得到改善;心肌组织DNA损伤阳性细胞均有不同程度减少。结论 养心定悸胶囊可通过调控NLRP3/caspase-1/GSDMD信号通路抑制DCM模型金黄地鼠心肌细胞焦亡,减轻DCM炎症损伤,从而保护心肌细胞。

关键词 养心定悸胶囊;糖尿病心肌病;NLRP3/caspase-1/GSDMD信号通路;心肌细胞

Myocardial protective effect of Yangxin dingji capsule on diabetic cardiomyopathy model golden hamsters

ZHONG Yi¹, LIU Gang², MA Guoping³, DING Baozhu¹, LI Xiaoxia¹, LIU Haoying¹, LIANG Wenjie^{1,3}(1. College of Integrated Chinese and Western Medicine, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China; 2. First Dept. of Cardiology Medicine, the First Hospital Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 3. Hebei Higher Education Institute Applied Technology Research Center on TCM Formula Preparation, Shijiazhuang 050200, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the protective mechanism of Yangxin dingji capsules on the cardiomyocytes of diabetic cardiomyopathy (DCM) model golden hamsters. **METHODS** In this study, golden hamsters were divided into control group ($n=10$, no modeling, no drug administration), model group ($n=9$, modeling, no drug administration), TCM high-dose group [$n=8$, modeling, Yangxin dingji capsules 2 g/(kg·d)], TCM low-dose group [$n=8$, modeling, Yangxin dingji capsules 1 g/(kg·d)] and empagliflozin group [$n=9$, positive control, modeling, 10 mg/(kg·d)]. All the golden hamsters were gavaged continuously for 8 weeks. The general conditions of golden hamsters were observed during the experiment. Blood glucose, total cholesterol (TC) and creatine kinase MB (CK-MB), ejection fraction (EF), fractional shortening (FS), interleukin 1 β (IL-1 β) and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) were detected; the histopathological changes of myocardium were observed. mRNA and protein expression of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3), caspase-1, aspirin D (GSDMD), nuclear factor κ B (NF- κ B) and IL-1 β were detected and observed; DNA damage in myocardial was detected. **RESULTS** Compared with control group, the blood glucose, TC, CK-MB, serum IL-1 β , TGF- β 1 levels, the mRNA expressions and positive protein expression of NLRP3, caspase-1, GSDMD, NF- κ B and IL-1 β and protein expression of GSDMD in golden hamsters were significantly increased in model group ($P<0.05$ or $P<0.01$); EF and FS were significantly decreased ($P<0.01$); the fibers of myocardial cells was disordered, and the blue-stained collagen fibers between the myocardium increased; DNA

[△] 基金项目 国家重点研发计划项目(No.2020YFC2004700);国家级大学生创新创业训练计划项目(No.202114432006);河北省重点研发计划项目(No.21377755D);河北省中医药管理局中医药类科研计划课题(No.2020149)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:心血管病中医药防治及机制。E-mail:237805941@qq.com

通信作者 教授,硕士生导师,博士。研究方向:心血管病中医药防治及机制。电话:0311-89926080。E-mail:LWJ712004@126.com

damaged positive cells in myocardial tissue of gold hamsters increased significantly. Compared with model group, the above indexes of administration groups were reversed to varying degrees; the gap of myocardial cells were clear, and the fibers disorder was improved; the DNA damaged positive cells in the myocardial tissue were reduced to varying degrees. **CONCLUSIONS** Yangxin dingji capsule can inhibit the cardiomyocyte pyroptosis and relieve the inflammatory injury of DCM in DCM model golden hamsters by regulating the NLRP3/caspase-1/GSDMD signaling pathway, so as to protect the cardiomyocytes.

KEYWORDS Yangxin dingji capsule; diabetic cardiomyopathy; NLRP3/caspase-1/GSDMD signaling pathway; cardiomyocyte

随着糖尿病发病率的升高,心血管并发症已成为糖尿病患者高死亡率的主要原因。糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)是糖尿病特异性心脏并发症,主要表现为心绞痛、心律失常、充血性心力衰竭,可独立于冠状动脉疾病、高血压或瓣膜性心脏病发生^[1]。炎症损伤、氧化应激、纤维化等是DCM的重要发病机制,而细胞焦亡是一种炎症性的细胞死亡方式,可介导心肌组织炎症损伤,进而加速病程进展^[2-3]。核转录因子 κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)是调节炎症过程的关键因子,可以激活核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)炎症小体,并诱导细胞焦亡,从而释放炎症因子^[4-5]。养心定悸胶囊是由炙甘草汤化裁而来,具有益气滋阴、通阳复脉之功效,临床用于治疗心动悸、脉结代等症,但其作用机制尚不明确。有研究显示,养心定悸胶囊能有效提高慢性心律失常患者的心率,改善心悸、胸闷、乏力等临床症状,改善血脂代谢水平和动脉血液循环,增强心肌供血,降低心血管事件的发生率和病死率^[6]。实验研究表明,养心定悸胶囊可通过提高血清超氧化物歧化酶、还原型谷胱甘肽水平,降低白细胞介素6(interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α 等水平,抑制心肌组织氧化应激和炎症反应,从而改善异丙肾上腺素诱导的大鼠缺血性心律失常^[7]。同时,养心定悸胶囊可有效改善心脏缺血再灌注损伤模型大鼠的血流动力学及心律失常,含药血清还可有效提高大鼠心肌细胞活力^[8]。本研究以链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导金黄地鼠建立DCM模型,观察焦亡通路分子在DCM模型金黄地鼠心肌组织中的表达,并探讨养心定悸胶囊对心肌细胞的保护作用机制,以期为DCM的临床治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

DP72CCD型BX53显微镜购自日本Olympus公司; Vevo2100型超声仪购自加拿大Visual Sonics公司; Power Pac型电泳仪、Mini Protean型电泳槽、Trans-Blot型半干转膜仪、CFX96实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪均购自美国Bio-Rad公司; EVOS FL Auto2型全自动活细胞显微成像分析系统购自美国Thermo Fisher Scientific公司; Odyssey SA型近红外双色激光扫描仪购自美国LI-COR公司。

1.2 主要药物与试剂

STZ、二甲苯(批号分别为V900890、534056)购自美国Sigma公司; 养心定悸胶囊(批号06717101141,规格0.5 g/粒)购自河北永丰药业有限公司; 恩格列净片剂(批号J20171073,规格10 mg)购自德国Boehringer Ingelheim公司; 兔SP试剂盒(批号SP-9001)购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 柠檬酸钠缓冲液(批号C1013)购自北京索莱宝科技有限公司; 兔NF- κ B抗体、兔 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、TUNEL检测试剂盒(批号分别为10745-1-AP、20536-1-AP、PF-00006)购自美国Proteintech公司; 兔NLRP3抗体(批号NBP2-12446)购自美国Novus Biologicals公司; 兔天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶1(caspase-1)抗体(批号GB11383)购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 兔IL-1 β 抗体、兔消皮素D(gasdermin D, GSDMD)抗体(批号分别为ab283818、ab219800)购自英国Abcam公司; 生物素标记的羊抗兔IgG二抗(批号D00804-07)购自美国LI-COR公司; 总胆固醇(total cholesterol, TC)检测试剂盒(批号A111-1-1)购自南京建成生物工程研究所有限公司; IL-1 β 、转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)酶联免疫吸附检测试剂盒(批号分别为SXR026、SXR059)购自上海森雄科技实业有限公司; 肌酸激酶同工酶MB(creatine kinase MB, CK-MB)试剂盒(批号K030)购自长春汇力生物技术有限公司; RNA提取试剂盒(批号LS1040)购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 高糖高脂饲料(10%猪油+20%蔗糖+2.5%胆固醇+0.5%胆酸钠+67%基础饲料)购自北京科澳协力饲料有限公司。

1.3 实验动物

SPF级健康雄性5周龄金黄地鼠50只,体质量(100 \pm 20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号为SCXK(京)2016-0011。实验动物饲养于河北中医学院肝肾病重点实验室,自由饮食。饲养环境通风良好,12 h昼夜节律,温度20~25 $^{\circ}$ C,相对湿度40%~70%。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

金黄地鼠适应性饲养1周后,使用Excel软件生成的随机数字将50只金黄地鼠分为对照组(10只)和造模组(40只)。对照组金黄地鼠全程给予正常饲料喂养,造模

组金黄地鼠全程给予高糖高脂饲料喂养^[9]。饲养6周后,造模组金黄地鼠连续3 d腹腔注射STZ(溶于pH4.5的柠檬酸钠缓冲液中)30 mg/kg,对照组金黄地鼠腹腔注射相同体积的柠檬酸钠缓冲液。STZ注射3 d后,通过尾静脉采血检测金黄地鼠的血糖,血糖>16.7 mmol/L视为成功诱导糖尿病,继续饲养4周使其自然发展为DCM^[10]。将造模成功的34只DCM模型金黄地鼠随机分为模型组(9只)、中药高剂量组(8只)、中药低剂量组(8只)、恩格列净组(9只,阳性对照)。对照组和模型组金黄地鼠灌胃生理盐水。参照文献[7, 11],中药高剂量组金黄地鼠灌胃养心定悸胶囊2 g/(kg·d),中药低剂量组金黄地鼠灌胃养心定悸胶囊1 g/(kg·d),恩格列净组金黄地鼠灌胃恩格列净10 mg/(kg·d),药物均溶解于0.9% NaCl溶液中。所有金黄地鼠每日灌胃1次,连续灌胃8周。

2.2 取材与处理

金黄地鼠灌胃8周后,取尾部血用于后续实验。然后,禁食不禁水12 h,金黄地鼠吸入异氟烷麻醉,并进行股动脉取血,以4 000 r/min于-4 ℃离心10 min分离血清,置于-80 ℃冰箱以备后续实验。同时迅速取出金黄地鼠心脏并用冰生理盐水冲洗,排出残余血液并分离周围组织。将心脏沿纵轴切割分离,一部分心肌组织放入中性甲醛中固定以备病理形态观察,另一部分心肌组织放入-80 ℃冰箱保存以备Western blot及PCR检测。

2.3 一般情况观察

实验期间,观察金黄地鼠的饮食、饮水、尿量、毛发等变化,记录金黄地鼠死亡情况。

2.4 血糖、血脂及心肌酶检测

取“2.2”项下金黄地鼠尾部血0.1 mL,使用血糖仪检测血糖。取“2.2”项下血清20 μL,严格按照试剂盒说明书要求检测血脂TC水平和心肌酶CK-MB水平。

2.5 左室射血分数、短轴缩短率检测

金黄地鼠吸入异氟烷麻醉后,应用超声仪获取左室长轴二维超声图像,计算左室射血分数(ejection fraction, EF)和短轴缩短率(fractional shortening, FS)。EF(%)=心脏每搏输出量/舒张末期心室容积×100%,FS(%)=(左心室舒张末期内径-左心室收缩末期内径)/左心室舒张末期内径×100%。

2.6 心肌组织病理形态观察

取“2.2”项下中性甲醛中的心肌组织进行常规脱水、固定、石蜡包埋、切片,分别采用苏木精-伊红(HE)染色、Masson染色,于显微镜下观察心肌组织的病理形态变化并拍照。

2.7 血清炎症因子检测

采用酶联免疫吸附试验检测。取“2.2”项下血清20 μL,严格按照试剂盒说明书要求检测IL-1β、TGF-β1水平。

2.8 心肌组织 NLRP3、caspase-1、GSDMD、NF-κB、IL-1β mRNA 表达水平检测

采用PCR法检测。称取“2.2”项下心肌组织50 mg,经液氮研磨后,加入RNA裂解液、无水乙醇,以10 000 r/min于4 ℃离心10 min;加入现配制的DNA酶孵育液50 μL,室温静置15 min,加入RNA洗液600 μL,以10 000 r/min室温离心1 min。逆转录采用两步法反应程序,预变性95 ℃ 10 min,44个循环反应:95 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s。扩增完毕后,得到各样本各目的基因及内参基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的量化周期(quantification cycle, Cq)值,ΔCq=目的基因Cq值-内参Cq值;定量(quantification, Q)=2^{-ΔCq},得到每个目的基因的Q值及Q均值,各目的基因表达的相对定量(RQ)值=每个目的基因的Q值/Q均值;将RQ值用于统计分析,得到mRNA表达水平。PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,PCR引物序列及产物长度见表1。

表1 PCR引物序列及产物长度

基因	引物序列	产物长度/bp
GAPDH	上游引物:5'-TGAACGGGAAGCTCACTGGC-3'	70
	下游引物:5'-CATGTGAGATCCACGACGGACA-3'	
NLRP3	上游引物:5'-CAGAGACTATGTTGGGGCG-3'	196
	下游引物:5'-CTCCGATGTAGAGTCAAAGTTTCTG-3'	
caspase-1	上游引物:5'-TGCAGATGCTTATGACAGCGA-3'	137
	下游引物:5'-CTATCTGACCAGCTTCGCC-3'	
GSDMD	上游引物:5'-AAGTGCTGCGCAGTATTAGCA-3'	107
	下游引物:5'-TCTGGACCCACAAGCCCAAT-3'	
NF-κB	上游引物:5'-CTCAGGACGAATAGCTCGG-3'	97
	下游引物:5'-AGTAGGTGTGCCACCTCG-3'	
IL-1β	上游引物:5'-GGAGGCTCCGAGATGAACA-3'	79
	下游引物:5'-TGTCCGTTGAGATGGAGAGC-3'	

2.9 心肌组织 NLRP3、caspase-1、GSDMD、NF-κB、IL-1β 蛋白阳性表达观察

采用SABC法,使用兔SP试剂盒检测。取“2.6”项下石蜡包埋的心肌组织,切成5 μm的薄片,置于载玻片上,烤片2 h,依次加入二甲苯30 min、无水乙醇10 min、95%乙醇5 min、80%乙醇5 min进行脱蜡复水,将石蜡切片与NLRP3、caspase-1、GSDMD、NF-κB、IL-1β一抗(稀释度均为1:100)于4 ℃孵育12 h,使用羊抗兔IgG聚合物于37 ℃孵育1 h,DAB显色,苏木精染色,封片,于显微镜下观察并拍照。细胞呈现淡黄或黄褐色颗粒表示目的蛋白呈阳性表达。

2.10 心肌组织 GSDMD 蛋白表达水平检测

采用Western blot法检测。称取“2.2”项下心肌组织50 mg,提取总蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,随后将印记转至PVDF膜上,使用快速封闭液封闭后,将膜与GSDMD、内参β-actin一抗(稀释度分别为1:500、1:1 000)于4 ℃孵育12 h,然后与羊抗兔IgG二抗(稀释度为1:5 000)于37 ℃孵育1 h,显影,拍照。采用Image J软件计算,以目标蛋白灰度值与内参蛋白灰度值比值表示目标蛋白的表达水平。

2.11 心肌细胞DNA损伤检测

使用TUNEL检测试剂盒进行检测。取“2.6”项下石蜡包埋的心肌组织,切成5 μm的薄片,二甲苯浸泡2次,每次30 min,然后浸泡于不同浓度的乙醇(100%、95%、80%)中,每次5 min。蛋白酶K孵育组织20 min,平衡缓冲液孵育5 min,TUNEL反应缓冲液孵育2 h,使用含DAPI的封片剂封片,于显微镜下观察并拍照。明亮的绿色荧光表示细胞DNA损伤,为阳性细胞;蓝色荧光表示细胞核。

2.12 统计学方法

使用Orign 2019软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据比较前进行正态性及方差齐性检验,满足正态性且方差齐性者,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 各组金黄地鼠一般情况观察结果

对照组金黄地鼠一般情况良好,饮食、饮水及尿量均正常,毛发整齐有光泽。模型组金黄地鼠精神萎靡,动作迟缓懒动,毛色晦暗无光泽,饮食和饮水量增加,多尿并伴有腥臭味。恩格列净组及中药低、高剂量组金黄地鼠上述症状较模型组均有不同程度改善。除对照组外,40只金黄地鼠注射STZ后,造模成功的DCM模型金黄地鼠有34只,成模率为85.00%。进行灌胃后,模型组、恩格列净组和中药低、高剂量组因感染、糖尿病并发

症等原因,每组各死亡1只,总死亡率为11.76%(4/34)。

3.2 养心定悸胶囊对DCM模型金黄地鼠血糖、血脂及心肌酶的影响

与对照组比较,模型组金黄地鼠血糖、TC、CK-MB水平均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,恩格列净组金黄地鼠血糖水平显著降低($P<0.05$),中药高剂量组和恩格列净组CK-MB水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图1。

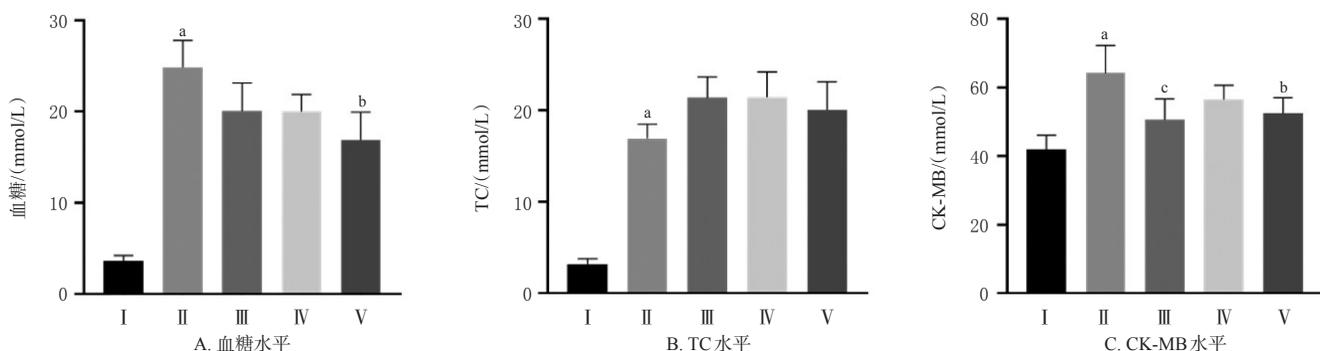
3.3 养心定悸胶囊对DCM模型金黄地鼠EF、FS的影响

与对照组比较,模型组金黄地鼠EF、FS均显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,中药低、高剂量组和恩格列净组金黄地鼠EF、FS均显著升高($P<0.01$)。结果见图2。

3.4 养心定悸胶囊对DCM模型金黄地鼠心肌组织病理形态的影响

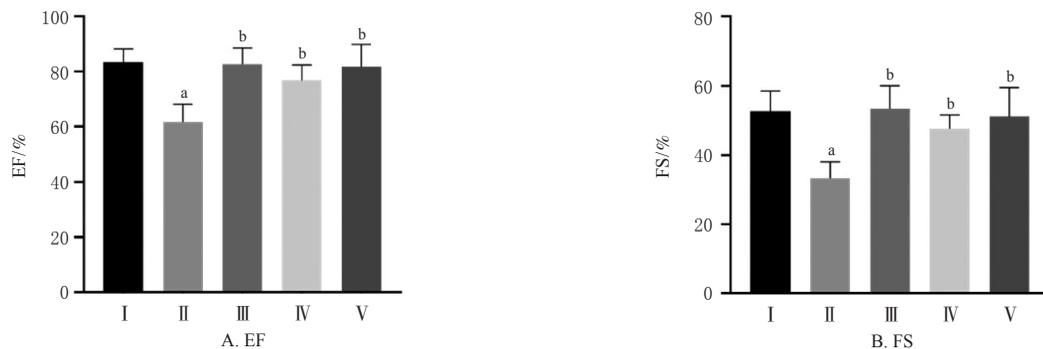
HE染色结果显示,对照组金黄地鼠心肌细胞结构清晰、排列整齐、层次鲜明,核圆形或椭圆形,染色质分布均匀,心肌间隙清晰可见。模型组金黄地鼠心肌细胞结构不清、排列杂乱,组织肿胀,胞体增大且大小不均,细胞核呈长杆状。中药低、高剂量组和恩格列净组金黄地鼠心肌细胞间隙清晰,细胞排列整齐,细胞核形态正常,染色质分布均匀,尤其中药高剂量组和恩格列净组改善较明显。结果见图3。

Masson染色结果显示,对照组金黄地鼠心肌纤维排列整齐,心肌细胞结构清晰,细胞核大小均一,胶原纤维



I:对照组;II:模型组;III:中药高剂量组;IV:中药低剂量组;V:恩格列净组;a:与对照组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与模型组比较, $P<0.01$

图1 各组金黄地鼠血糖、TC、CK-MB水平比较柱状图



I:对照组;II:模型组;III:中药高剂量组;IV:中药低剂量组;V:恩格列净组;a:与对照组比较, $P<0.01$;b:与模型组比较, $P<0.01$

图2 各组金黄地鼠EF、FS比较柱状图

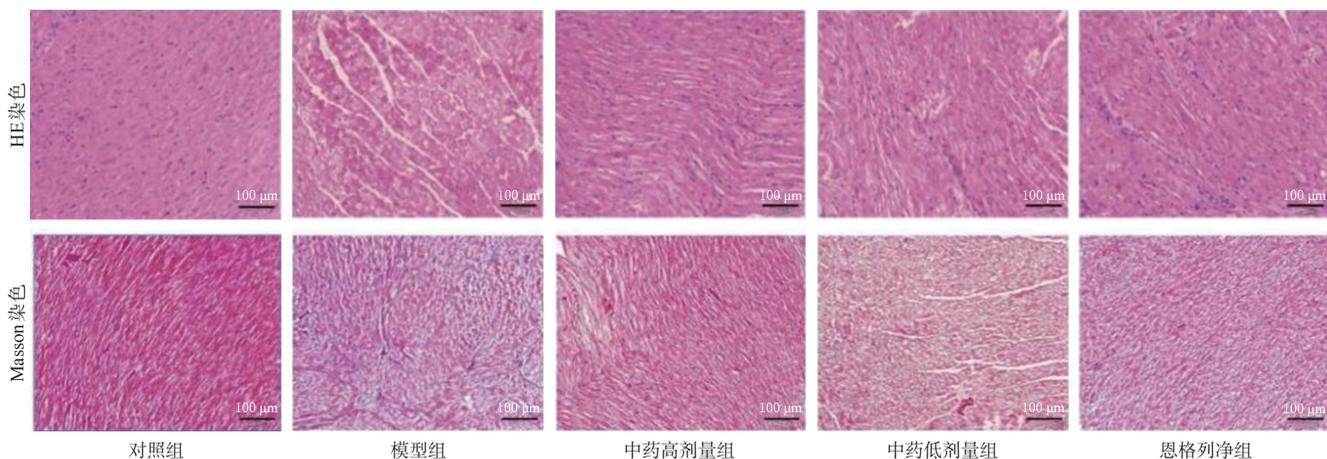


图3 各组金黄地鼠心肌组织HE、Masson染色显微图

着色淡。模型组金黄地鼠心肌纤维排列紊乱、稀疏,心肌细胞肥大变性,细胞核大小不一,心肌间蓝染的胶原纤维增多。中药低、高剂量组和恩格列净组金黄地鼠心肌细胞肥大及纤维排列紊乱得到改善,心肌间蓝染的胶原纤维较少;但中药低剂量组金黄地鼠心肌间蓝染的胶原纤维仍有较多沉积,组织分布较紊乱。结果见图3。

3.5 养心定悸胶囊对DCM模型金黄地鼠血清炎症因子的影响

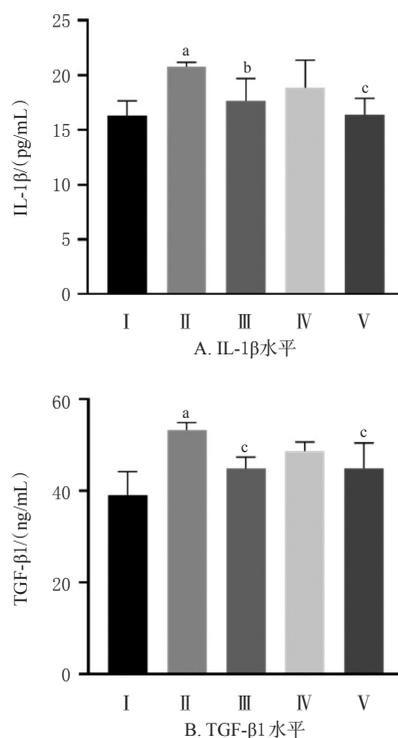
与对照组比较,模型组金黄地鼠血清IL-1 β 、TGF- β 1水平均显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,中药高剂量组、恩格列净组金黄地鼠血清IL-1 β 、TGF- β 1水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见图4。

3.6 养心定悸胶囊对DCM模型金黄地鼠心肌组织相关因子mRNA表达水平的影响

与对照组比较,模型组金黄地鼠心肌组织NLRP3、caspase-1、GSDMD、NF- κ B、IL-1 β mRNA表达水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,中药高剂量组金黄地鼠心肌组织NLRP3、caspase-1、GSDMD、NF- κ B、IL-1 β mRNA,中药低剂量组金黄地鼠心肌组织NLRP3、caspase-1、NF- κ B mRNA及恩格列净组金黄地鼠心肌组织NLRP3、caspase-1、NF- κ B mRNA表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见表2。

3.7 养心定悸胶囊对DCM模型金黄地鼠心肌组织相关蛋白阳性表达的影响

显微镜观察结果显示,与对照组比较,模型组金黄地鼠心肌组织NLRP3、caspase-1、GSDMD、NF- κ B、IL-1 β 蛋白阳性表达均明显增多,NF- κ B主要表达在细胞核,其余蛋白主要表达在细胞质。与模型组比较,中药高剂量组、恩格列净组金黄地鼠心肌组织NLRP3、caspase-1、GSDMD、NF- κ B、IL-1 β 蛋白和中药低剂量组金黄地鼠心肌组织NF- κ B、IL-1 β 蛋白阳性表达均明显减少;中药低剂量组金黄地鼠心肌组织NLRP3、caspase-1、GSDMD蛋白阳性表达均略有减少。结果见图5。



I:对照组;II:模型组;III:中药高剂量组;IV:中药低剂量组;V:恩格列净组;a:与对照组比较, $P < 0.01$;b:与模型组比较, $P < 0.05$;c:与模型组比较, $P < 0.01$

图4 各组金黄地鼠血清IL-1 β 、TGF- β 1水平比较柱状图

表2 各组金黄地鼠心肌组织NLRP3、caspase-1、GSDMD、NF- κ B、IL-1 β mRNA表达水平比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	NLRP3	caspase-1	GSDMD	NF- κ B	IL-1 β
对照组	1.00 \pm 0.43	1.00 \pm 0.47	1.00 \pm 0.25	1.00 \pm 0.43	1.00 \pm 0.16
模型组	5.21 \pm 0.86 ^a	1.45 \pm 0.12 ^b	4.00 \pm 1.19 ^a	2.53 \pm 0.52 ^a	1.47 \pm 0.14 ^a
中药高剂量组	2.40 \pm 0.78 ^c	1.04 \pm 0.19 ^d	1.13 \pm 0.37 ^c	1.54 \pm 0.27 ^c	1.24 \pm 0.30 ^d
中药低剂量组	2.61 \pm 0.75 ^c	1.02 \pm 0.16 ^d	2.04 \pm 1.12 ^c	1.68 \pm 0.16 ^c	1.38 \pm 0.68
恩格列净组	2.59 \pm 0.55 ^c	1.13 \pm 0.14 ^d	3.32 \pm 0.83	0.60 \pm 0.13 ^c	1.48 \pm 0.25

a:与对照组比较, $P < 0.01$;b:与对照组比较, $P < 0.05$;c:与模型组比较, $P < 0.01$;d:与模型组比较, $P < 0.05$

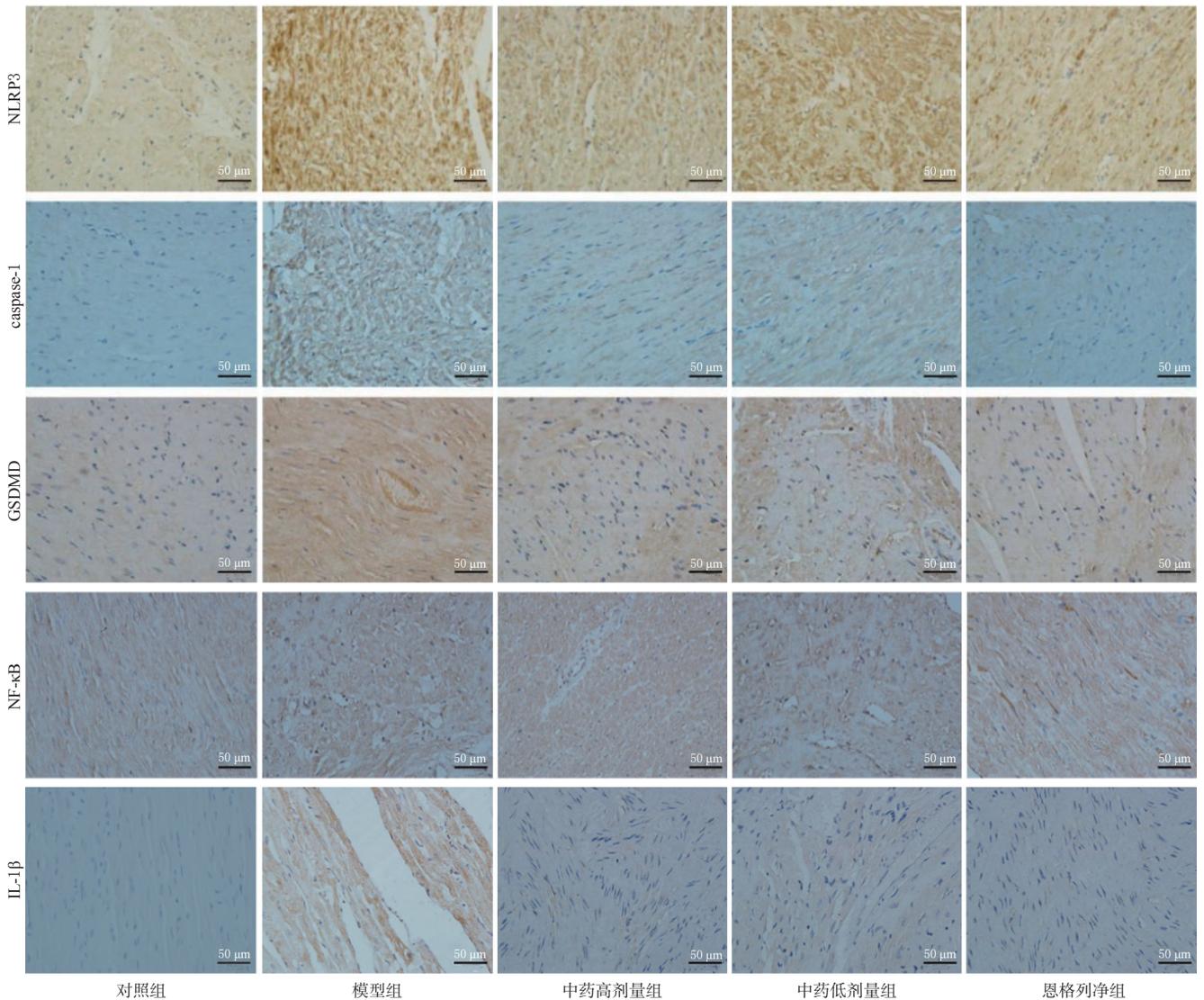


图5 各组金黄地鼠心肌组织NLRP3、caspase-1、GSDMD、NF-κB、IL-1β蛋白阳性表达显微镜

3.8 养心定悸胶囊对DCM模型金黄地鼠心肌组织GSDMD蛋白表达水平的影响

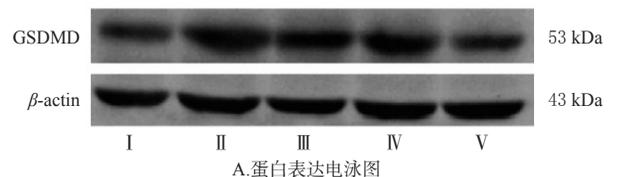
与对照组比较,模型组金黄地鼠心肌组织GSDMD蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,中药低、高剂量组和恩格列净组金黄地鼠心肌组织GSDMD蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见图6。

3.9 养心定悸胶囊对DCM模型金黄地鼠心肌组织DNA损伤的影响

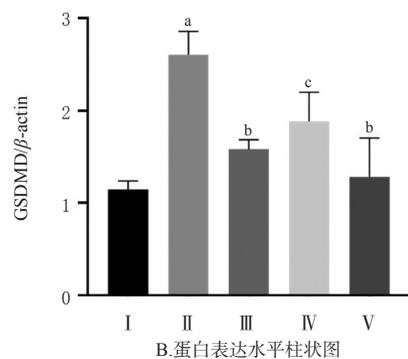
TUNEL染色结果显示,对照组金黄地鼠心肌组织仅见少量DNA损伤阳性细胞。与对照组比较,模型组金黄地鼠心肌组织DNA损伤阳性细胞明显增加。与模型组比较,中药低、高剂量组和恩格列净组金黄地鼠心肌组织DNA损伤阳性细胞均有不同程度减少。结果见图7。

4 讨论

DCM的发病机制尚未完全阐明,目前公认的发病机制包括炎症、高血糖、蛋白非酶糖基化、氧化应激、钙



A.蛋白表达电泳图



B.蛋白表达水平柱状图

I:对照组;II:模型组;III:中药高剂量组;IV:中药低剂量组;V:恩格列净组;a:与对照组比较, $P < 0.01$;b:与模型组比较, $P < 0.01$;c:与模型组比较, $P < 0.05$

图6 各组金黄地鼠心肌组织GSDMD蛋白表达水平比较

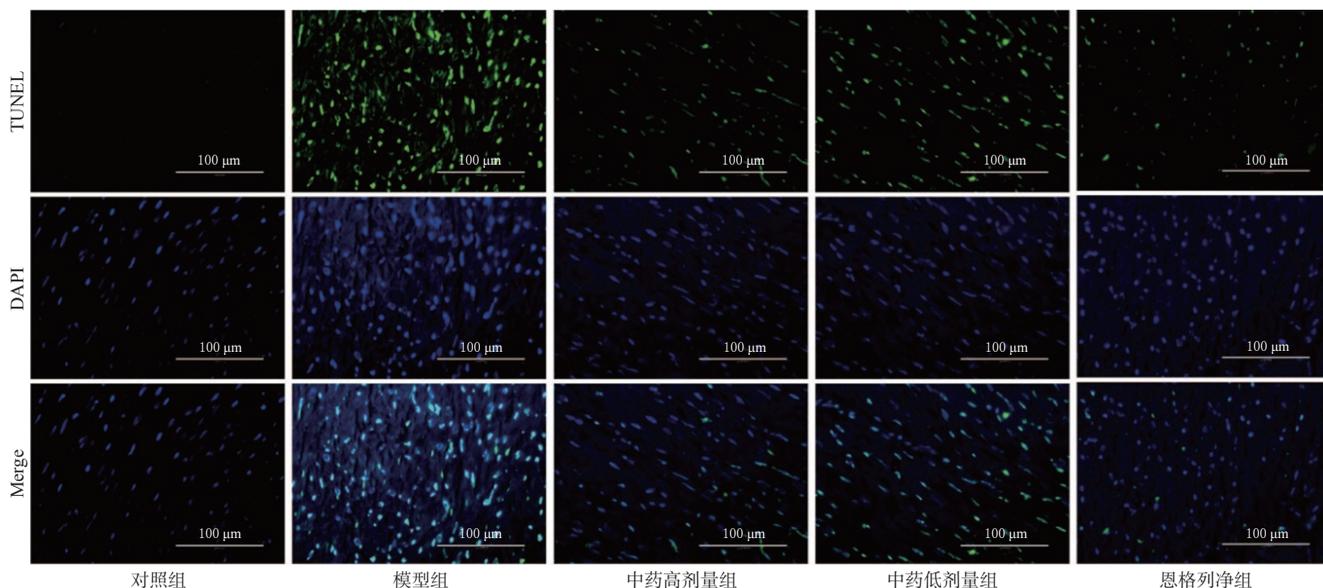


图7 各组金黄地鼠心肌组织DNA损伤显微图

离子转运异常等,其中炎症是导致左心室功能障碍的独立危险因素,而细胞焦亡是一种伴随显著炎症反应的程序性细胞死亡方式^[3,12]。养心定悸胶囊由炙甘草汤化裁而来,炙甘草汤源自汉代张仲景《伤寒论》,由炙甘草、生地、麦冬、红参、阿胶、黑芝麻、大枣、桂枝、生姜组成,具有益气滋阴、通阳复脉之功效^[7]。方中人参皂苷Rb1^[13]、人参皂苷Rg1^[14]、甘草酸^[15]等有效成分具有改善DCM的功效。恩格列净是一种钠-葡萄糖协同转运蛋白2抑制剂,可有效控制2型糖尿病患者的血糖水平,并可显著降低心血管不良事件和低血糖的发生风险^[16-17]。因此,本文选择其作为阳性对照。

本研究结果表明,养心定悸胶囊对DCM模型金黄地鼠心肌组织具有保护作用。DCM常表现为心肌收缩功能障碍,而EF和FS是DCM左心室收缩功能障碍的重要指标^[18]。本研究以脂质代谢和人类更为接近的金黄地鼠为实验对象,结果显示,养心定悸胶囊可降低DCM模型金黄地鼠的EF和FS,表明养心定悸胶囊可改善其心肌收缩功能障碍。心肌组织病理观察结果显示,DCM模型金黄地鼠出现心肌细胞排列杂乱、心肌间蓝染的胶原纤维增多等组织病理形态;养心定悸胶囊灌胃8周后,金黄地鼠心肌间隙清晰,细胞排列整齐,细胞核形态正常,心肌间蓝染的胶原纤维有所减少,纤维排列紊乱得到改善。研究表明,CK-MB主要存在于心肌细胞中,是诊断心肌细胞损伤灵敏而特异的酶学指标,在DCM模型金黄地鼠心肌细胞中表达升高^[19]。本研究结果显示,DCM模型金黄地鼠CK-MB水平升高,说明存在心肌细胞损伤,而养心定悸胶囊可降低DCM模型金黄地鼠血清中的CK-MB水平,减轻心肌细胞损伤。同时,本实验研究显示,给予养心定悸胶囊后,DCM模型金黄地鼠血糖有降低趋势,可能是由于养心定悸胶囊中地黄活性成分梓醇^[20]和人参活性成分人参皂苷Rg3^[21]的作用。本研究结果显示,养心定悸胶囊对DCM模型金黄地鼠血脂

水平(TC)并无影响。

心肌组织炎症损伤与DCM的发展有关,在炎症过程中,心肌细胞和炎症细胞分泌刺激纤维化的细胞因子,可导致心脏肥大、纤维化和功能障碍^[22]。研究表明,在焦亡细胞中,NLRP3炎症小体激活后,可促进促炎因子IL-1 β 释放到细胞外,加剧炎症损伤^[23],并诱导心肌肥厚和功能障碍^[24]。TGF- β 1是心肌纤维化和心肌肥大发生发展密切相关的炎症细胞因子之一,通过降低TGF- β 1的表达可有效改善心肌纤维化状态^[25]。本研究结果显示,模型组金黄地鼠血清中的TGF- β 1、IL-1 β 水平均显著升高,心肌组织IL-1 β 表达上调,加剧了心肌组织病理改变;而中药高剂量组和恩格列净组金黄地鼠血清中的TGF- β 1、IL-1 β 水平均显著降低,心肌组织IL-1 β 表达下调,表明养心定悸胶囊可抑制IL-1 β 、TGF- β 1的产生,减轻心肌组织炎症损伤,进而改善心肌纤维化。

有研究显示,DCM模型大鼠表现出严重的炎症反应、心肌纤维化、细胞死亡、超微结构紊乱,并发现焦亡相关分子NLRP3、caspase-1和IL-1 β 过度表达;通过抑制NLRP3炎症小体的活化,可减轻细胞焦亡及炎症损伤,改善DCM模型大鼠心肌组织的形态结构和纤维化程度^[5,26]。同时,有研究发现,高表达线粒体乙醛脱氢酶2可通过降低活性氧的产生来抑制NLRP3炎症小体活化及细胞焦亡,从而减轻高糖诱导的H9C2心肌细胞损伤所致的毒性反应,并增强细胞活性^[27]。本研究结果显示,模型组金黄地鼠心肌组织中的NLRP3、caspase-1、GSDMD、NF- κ B、IL-1 β mRNA及蛋白表达均上调,提示NLRP3/caspase-1/GSDMD信号通路活化,导致细胞焦亡,加重心肌组织炎症损伤。而养心定悸胶囊干预后,可以下调以上指标的表达,抑制NLRP3炎症小体活化,同时减轻心肌细胞DNA损伤,从而抑制心肌组织细胞焦亡,减轻炎症损伤,发挥对心肌细胞的保护作用。

综上所述,DCM模型金黄地鼠心肌组织NLRP3/

caspase-1/GSDMD 信号通路表达增强,养心定悸胶囊可通过调控该信号通路抑制 DCM 模型金黄地鼠心肌细胞焦亡,减轻 DCM 炎症损伤,从而保护心肌细胞。然而,中医药作用具有多途径、多靶点的特点,养心定悸胶囊作为一种中成药,含 9 味中药,有效成分复杂,未来将进一步研究其有效成分,并进行离体实验验证,为临床应用提供更多的实验依据。

参考文献

- [1] HAYAT S A, PATEL B, KHATTAR R S, et al. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms, diagnosis and treatment[J]. Clin Sci (Lond), 2004, 107(6): 539-557.
- [2] BÖNI-SCHNETZLER M, MEIER D T. Islet inflammation in type 2 diabetes[J]. Semin Immunopathol, 2019, 41(4): 501-513.
- [3] ZENG C, WANG R Q, TAN H M. Role of pyroptosis in cardiovascular diseases and its therapeutic implications[J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(7): 1345-1357.
- [4] LI L, LUO W, QIAN Y Y, et al. Luteolin protects against diabetic cardiomyopathy by inhibiting NF- κ B-mediated inflammation and activating the Nrf2-mediated antioxidant responses[J]. Phytomedicine, 2019, 59: 152774.
- [5] LUO B B, LI B, WANG W K, et al. NLRP3 gene silencing ameliorates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetes rat model[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104771.
- [6] 刘娜,刘东升,韩海莉.养心定悸胶囊治疗缓慢性心律失常有效性及安全性的临床观察[J].中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(24): 4026-4029.
- [7] 郭子静,刘刚,马可心,等.养心定悸胶囊对异丙肾上腺素诱导 SD 大鼠缺血性心律失常的拮抗作用及机制[J].中华中医药学刊, 2022, 40(1): 97-102, 268.
- [8] 贾敏,王静,张冀东,等.养心定悸胶囊调控 NOS 途径改善心肌缺血再灌注损伤及其引起的心律失常[J].中国医院药学杂志, 2019, 39(14): 1444-1449.
- [9] 高秀莹,周迎生. 2 型糖尿病鼠类模型的研究进展[J].中国实验动物学报, 2014, 22(4): 71-76.
- [10] 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.
- [11] LI C G, ZHANG J, XUE M, et al. SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart[J]. Cardiovasc Diabetol, 2019, 18(1): 15.
- [12] 黄芷棋,宁一博,贺润铨,等. NLRP3 炎性小体与糖尿病心肌病的发生发展[J].中国药理学通报, 2021, 37(4): 463-467.
- [13] QIN L H, WANG J P, ZHAO R R, et al. Ginsenoside-Rb1 improved diabetic cardiomyopathy through regulating calcium signaling by alleviating protein O-GlcNAcylation[J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(51): 14074-14085.
- [14] YU H T, ZHEN J, YANG Y, et al. Ginsenoside Rg1 ameliorates diabetic cardiomyopathy by inhibiting endoplasmic Reticulum stress-induced apoptosis in a streptozotocin-induced diabetes rat model[J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(4): 623-631.
- [15] THAKUR V, ALCOREZA N, DELGADO M, et al. Cardio-protective effect of glycyrrhizin on myocardial remodeling in diabetic rats [J]. Biomolecules, 2021, 11(4): 569.
- [16] 刘天碧,门鹏,翟所迪.恩格列净治疗 2 型糖尿病的有效性和安全性的循证评价[J].中国新药杂志, 2019, 28(7): 877-885.
- [17] ZINMAN B, WANNER C, LACHIN J M, et al. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes[J]. N Engl J Med, 2015, 373(22): 2117-2128.
- [18] 尚鑫,任晓霞,陈栋,等.抵挡汤对糖尿病心肌病小鼠 NLRP3 炎症小体的作用及机制[J].中国实验方剂学杂志, 2021, 27(9): 19-25.
- [19] 沈莺. ADM2/RAAS 系统功能变化对糖尿病患者心肌病病情发生发展的影响 [J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(10): 1639-1641.
- [20] ZHU H F, WANG Y, LIU Z Q, et al. Antidiabetic and antioxidant effects of catalpol extracted from rehmannia glutinosa (Di Huang) on rat diabetes induced by streptozotocin and high-fat, high-sugar feed[J]. Chin Med, 2016, 11: 25.
- [21] LI Y, HOU J G, LIU Z, et al. Alleviative effects of 20 (R) -Rg3 on HFD/STZ-induced diabetic nephropathy via MAPK/NF- κ B signaling pathways in C57BL/6 mice[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 267: 113500.
- [22] FRATI G, SCHIRONE L, CHIMENTI I, et al. An overview of the inflammatory signalling mechanisms in the myocardium underlying the development of diabetic cardiomyopathy[J]. Cardiovasc Res, 2017, 113(4): 378-388.
- [23] 梁文杰,毕建成,许庆友. NLRP3 炎症小体在慢性肾脏病的表达及中药的干预机制[J].中药药理学与临床, 2016, 32(3): 208-211.
- [24] LIU Z W, ZHAO N, ZHU H L, et al. Circulating interleukin-1 β promotes endoplasmic reticulum stress-induced myocytes apoptosis in diabetic cardiomyopathy via interleukin-1 receptor-associated kinase-2[J]. Cardiovasc Diabetol, 2015, 14: 125.
- [25] SHEN N N, LI X G, ZHOU T, et al. Shensong Yangxin Capsule prevents diabetic myocardial fibrosis by inhibiting TGF- β 1/Smad signaling[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 157: 161-170.
- [26] XU D, ZHANG X Z, CHEN X, et al. Inhibition of miR223 attenuates the NLRP3 inflammasome activation, fibrosis, and apoptosis in diabetic cardiomyopathy[J]. Life Sci, 2020, 256: 117980.
- [27] CAO R P, FANG D, WANG J H, et al. ALDH2 overexpression alleviates high glucose-induced cardiotoxicity by inhibiting NLRP3 inflammasome activation[J]. J Diabetes Res, 2019, 2019: 4857921.

(收稿日期:2021-12-22 修回日期:2022-04-30)

(编辑:舒安琴)