

· 基础研究 ·

黄芪多糖干预糖尿病心肌氧化应激的实验研究

孙奇林¹ 鞠 婧¹ 王 浩² 杨叶虹³ 陈雯洁¹ 赵雪兰¹ 张 玉¹ 陈 蔚¹

摘要 目的 研究黄芪多糖对糖尿病心肌氧化应激的影响。**方法** 12 只 4 周龄的雄性健康转基因 SOD2^{+/-} KO 小鼠 (C57BL/6J 背景) 随机分为转基因组及黄芪多糖转基因组, 每组 6 只; 18 只正常对照小鼠随机分为对照组、糖尿病组及黄芪多糖糖尿病组, 每组 6 只。糖尿病组和黄芪多糖糖尿病组采用链脲佐菌素腹腔注射法制作糖尿病动物模型, 给予黄芪多糖转基因组和黄芪多糖糖尿病组小鼠黄芪多糖灌胃口服治疗 10 周, 其余组给予等量生理盐水灌胃。检测小鼠体重、血糖、糖化血红蛋白, 超声心动图检测心脏功能和血液动力学 [左心室短轴缩短率 (LVFS)、左心室收缩压 (LVSP)、左心室舒张末期压 (LVEDP)、左室内压最大上升速率 (+LV dp/dt_{max})、左室内压最大下降速率 (-LVdp/dt_{min})]、透射电镜观察心肌超微结构, 免疫组化法检测心肌细胞凋亡程度, 荧光定量法检测心肌活性氧水平, 免疫组化法检测心肌氧化损伤产物水平, Western Blot 法检测心肌 SOD 蛋白表达水平, SOD 试剂盒检测心肌 SOD 酶活性。**结果** 与对照组比较, 糖尿病组小鼠体重、心脏/体重比值、LVSP、LVFS、±LV dp/dt、SOD2 蛋白表达水平和酶活性下降, 血糖、糖化血红蛋白、LVEDP 水平、细胞凋亡程度、ROS 及氧化应激损伤产物水平升高, 心肌超微结构存在严重损伤 ($P < 0.05$)。与糖尿病组比较, 黄芪多糖糖尿病组小鼠体重、心脏/体重比值、LVSP、LVFS、±LV dp/dt、SOD2 蛋白表达水平和酶活性升高, 血糖、糖化血红蛋白水平、LVEDP、细胞凋亡程度、ROS 和氧化应激损伤产物水平降低, 心肌超微结构损伤改善 ($P < 0.05$)。与转基因组比较, 黄芪多糖转基因组小鼠体重、心脏/体重比值、LVSP、LVFS、±LV dp/dt、SOD2 蛋白表达水平和酶活性升高, 血糖和糖化血红蛋白水平、LVEDP、细胞凋亡程度、ROS、氧化应激损伤产物水平降低, 心肌超微结构损伤改善 ($P < 0.05$)。**结论** 黄芪多糖能抑制糖尿病心肌的氧化应激损伤, 从而对糖尿病心脏起到保护作用。

关键词 黄芪多糖; 糖尿病心肌病; 氧化应激; 过氧化物歧化酶

Effect of Astragalus Polysaccharides in Inhibiting Myocardial Oxidative Stress of Diabetes Mellitus SUN Qi-lin¹, JU Jing¹, WANG Hao², YANG Ye-hong³, CHEN Wen-jie¹, ZHAO Xue-lan¹, ZHANG Yu¹, and CHEN Wei¹ 1 Department of Geriatrics, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai (200040); 2 Experimental Teaching Center of Basic Medicine, Fudan University, Shanghai (200032); 3 Department of Endocrinology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai (200040)

ABSTRACT Objective To investigate the effect of Astragalus polysaccharides (APS) for myocardial oxidative stress of diabetes mellitus (DM). **Methods** Twelve four-week-old male healthy transgenic SOD2^{+/-} KO mice (C57BL/6J background) were randomly divided into transgenic group and APS-transgenic group, 6 in each group. Eighteen normal control mice were divided into control group, diabetic group and APS-DM group, 6 in each group. Diabetic group and APS-DM group were administrated with intraperitoneal injection of streptozotocin to prepare the animal model of diabetes mellitus. The mice in APS-DM group and APS transgenic group were administrated with APS injection for 10 weeks, while the other groups were given an equal amount of normal saline. Mice body weight, blood glucose, glycosylated hemoglobin were detected. Echocardiography was used to detect cardiac function and hemodynamics [left

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 81473460)

作者单位: 1. 复旦大学附属华山医院老年科 (上海 200040); 2. 复旦大学医学院动物实验中心 (上海 200032); 3. 复旦大学附属华山医院内分泌代谢科 (上海 200040)

通讯作者: 陈 蔚, Tel: 021-52887270, E-mail: chenwei_0424@163.com

DOI: 10.7661/j. cjm. 20191101. 250

ventricular fractional shortening(LVFS),left ventricular systolic pressure(LVSP),left ventricular end diastolic pressure(LVEDP),maximal rate of the increase of left ventricular pressure($+LV\ dp/dt_{max}$),maximal rate of the decrease of left ventricular pressure($-LVdP/dt_{min}$)]。Electron microscope was used to observe the myocardial ultrastructure, and immunohistochemistry was used to detect myocardial cell apoptosis and proliferation activity. Fluorescence quantitative method was used to detect myocardial reactive oxygen species (ROS) levels, immunohistochemical method to detect myocardial oxidative damage product level. Western Blot was used to detect SOD protein expression levels, and SOD kit was used to detect SOD enzyme activity. Results Compared with control group, mice weight, heart weight/body weight ratio, LVSP, LVFS, $\pm LV\ dp/dt$, SOD2 protein expression levels and enzyme activity were decreased in diabetic group, blood sugar and glycated hemoglobin levels, LVEDP, the degree of cells apoptosis, ROS and oxidative stress damage product levels were increased, myocardial ultrastructure were damaged ($P < 0.05$). Compared with diabetes group, mice weight, heart weight/body weight ratio, LVSP, LVFS, $\pm LV\ dp/dt$, SOD2 protein expression levels and enzyme activity were increased in APS-diabetic group, blood sugar and glycated hemoglobin levels, LVEDP, the degree of cells apoptosis, ROS and oxidative stress damage product levels were decreased, myocardial ultrastructural injury were improved ($P < 0.05$). Compared with transgenic group, mice weight, heart weight/body weight ratio, LVSP, LVFS, $\pm LV\ dp/dt$, SOD2 protein expression levels and enzyme activity were increased in APS transgenic group, blood sugar and glycated hemoglobin levels, LVEDP, the degree of cells apoptosis, ROS and oxidative stress damage product levels were decreased, myocardial tissue and ultrastructural injury were improved ($P < 0.05$). Conclusion APS can protect the diabetic heart by preventing oxidative stress injury of diabetic myocardium.

KEYWORDS Astragalus polysaccharide; diabetic cardiomyopathy; oxidative stress; superoxide dismutase

糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)是指发生于糖尿病(diabetes melitus, DM)患者但不能用高血压性心脏病、冠状动脉粥样硬化性心脏病及其他心脏疾病来解释的特异性心肌病变^[1]。氧化还原失衡是 DCM 的主要发病机制之一^[2,3],活性氧(reactive oxygen species, ROS)过量生成能够造成心肌细胞氧化应激损伤^[4]。过氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是生物体内重要的抗氧化酶,其中 SOD2 是抑制心肌线粒体生成 ROS 的主要抗氧化酶^[5]。研究表明,DM 鼠心肌的氧化还原失衡、过度凋亡与心肌内 SOD2 表达降低显著相关,调控 SOD2 表达是阻断 DM 心肌氧化还原失衡的一个重要靶点^[6,7]。黄芪是一种传统中药,黄芪多糖(Astragalus polysaccharides, APS)是黄芪的均一多糖部分,是其活性成分之一^[8,9]。笔者前期研究发现 APS 口服治疗(剂量为 $[1.0\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 或 $[2.0\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$)对 DM 小鼠心脏均有保护作用,不同剂量 APS 对 DM 小鼠的作用无显著性差异^[10]。本研究以链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的 DM 小鼠和部分敲除 SOD2 基因的转基因小鼠为模型,探讨 APS 通过调控 SOD2 表达抑制 DCM 氧化应激损伤的可能机制,为 APS 治疗

DCM 提供进一步的理论依据和实验基础。

材料和方法

1 动物 SPF 级雄性 SOD2 基因敲除小鼠(SOD2^{+/-})小鼠 12 只,4 周龄,体重(18 ± 2)g,购自上海南方模式生物科技股份有限公司;同时购入与上述小鼠同品系的同龄、同性别的 C57BL/6J 小鼠 18 只,体重(18 ± 2)g。动物许可证:SCXK(沪)2014-0002。以上小鼠饲养于复旦大学上海医学院实验动物科学部,使用许可证号:SYXK(沪)2014-0029。饲养条件为恒温(23 ± 2)℃,相对湿度(50 ± 5)%,每日光照 12 h,普通饲料适应性喂养 1 周,饲养期间所有小鼠自由摄食、饮水。动物常规管理由专人负责。该项目获得复旦大学动物科学部动物福利和伦理小组批准(No. 2019 华山医院 JS-263)。

2 试剂及仪器 APS 购自上海中科院生理所。STZ(S8050),美国 Sigma 公司;MEM 培养基(11095-080),美国 Gibco 公司;SOD 活性检测试剂盒试剂盒(S0109),中国碧云天公司;ROS 检测试剂盒(S0063),中国碧云天公司;BCA 蛋白定量试剂盒(QF217936),美国 Thermo Fisher 公司;ECL 显

影试剂盒 (RH238934), 美国 Thermo Fisher 公司; 蛋白裂解液 (RJ239701), 美国 Thermo Fisher 公司; PVDF 膜 (MB0323), 美国 Milipoler 公司; 蛋白 Marker (D530A), 日本 TaKaRa 公司; 胶原酶 II (LS004176), 美国 Worthington 公司; Hairpin-1 寡核苷酸探针, Synthetic Genetics 公司; Ki67 抗体 (558615), 美国 BD Bioscience Pharmigen 公司; 硝基酪氨酸抗体 (4G10), 美国 Upstate 公司; 8-OH-dG 抗体 (ZY-5913R), 美国 QED Bioscience 公司; SOD1 抗体 (ab13498), 英国 Abcam 公司; SOD2 抗体 (ab13533), 英国 Abcam 公司; GAPDH 抗体 (ab181602), 英国 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔二抗 (ab205718), 英国 Abcam 公司。

小动物彩色超声诊断仪 (Vevo 2100 型), 加拿大 VisualSonics 公司; 组织研磨仪 (tissue lyser II), 美国 Qiagen 公司; 分析天平 (NSA124S), 德国 Sartorius 公司; 微量血糖测试仪 (CR2032), 德国 Bayer 公司; 超薄切片机 (Ultracut S 型), 澳大利亚 leica 公司; 透射电镜 (H-7500), 日本日立公司; 脱色摇床 (TS-1 型), 江苏海门市麒麟医用仪器厂; 酶标仪 (RT6000), 日本 TaKaRa 公司; 垂直电泳槽 (Mini 型), 美国 Bio-Rad 公司; 电泳仪 (PowerPac HC), 美国 Bio-Rad 公司; 半干转膜仪 (Trans-Blot SD Cell), 美国 Bio-Rad 公司; 凝胶成像系统 (Gel Doc XR), 美国 Bio-rad 公司; 台式冷冻高速离心机 (5427R), 德国 Eppendorf 公司。

3 动物分组及给药 将 12 只 5 周龄的雄性健康转基因 SOD2^{+/-}KO 小鼠按照随机数字表法分为转基因组及 APS 转基因组 ($n=6$); 将 18 只正常对照小鼠按照随机数字表法分为对照组、DM 组及 APS-DM 组 ($n=6$)。DM 组和 APS-DM 组给予 STZ (60 mg/kg) 单次腹腔注射, 其余组采用相同剂量的生理盐水进行腹腔注射^[11,12]。STZ 给药 3 天后, 血糖水平至少为 15 mmol/L 的小鼠被认为是 DM 鼠, 并纳入本研究。造模成功率为 75%, 失败模型予以替补。小鼠造模成功后开始给药干预, APS 转基因组和 APS-DM 组小鼠 APS [2.0 g/(kg·d)] 胃管给药治疗 10 周, 其余组给予等量生理盐水灌胃, 同样为期 10 周。其中 APS 的剂量在课题组前期研究的基础上确定^[13]。

4 检测指标及方法

4.1 体重、血糖及糖化血红蛋白检测 治疗期间每周监测小鼠血糖、体重, 并在 16 周时使用亲和色

谱微柱法测量糖化血红蛋白。

4.2 心脏功能及血液动力学参数检测 APS 治疗 10 周后, 使用氯胺酮 (10 mg/100g) 腹腔注射进行麻醉, 采用 Vevo 2100 型小动物彩色超声诊断仪, 探头频率 30 MHz, 采集小鼠心脏超声图像, 并记录心率 (heart rate, HR), 左心室短轴缩短率 (left ventricular fractional shortening, LVFS) 等数据。麻醉状态下由右侧颈总动脉插管至左心室, 连接压力换能器采集生物信号, 运用 MedLab 数据采集系统, 依次记录左心室收缩压 (left ventricular systolic pressure, LVSP), 左心室舒张末期压 (left ventricular end diastolic pressure, LVEDP), 左室内压最大上升速率 (maximal rate of the increase of left ventricular pressure, +LVdp/dt_{max}), 左室内压最大下降速率 (maximal rate of the decrease of left ventricular pressure, -LVdp/dt_{min}, “-”代表方向)。

4.3 心肌超微结构观察 APS 治疗 10 周后小鼠颈椎脱臼致死, 留取血、心脏组织。全心称重后, 计算各组小鼠的心脏重量和体重之比。将一部分心肌组织制成半薄切片, 心肌组织戊二醛固定、脱水、包埋、切片 (厚度 50~60 nm)、3% 醋酸铀-枸橼酸铅双重染色, 置于电子显微镜下观察心肌超微结构。

4.4 心肌细胞的分离 处死小鼠后, 用 Eagle-Joklik 培养液给予小鼠主动脉插管逆向灌注小鼠心脏去除心脏内循环血液细胞, 留取心脏组织。将部分心室组织切成小块, 用 0.02% 胶原酶 II 消化后粗头吸管反复吹打, 并经 200 目筛网过滤至新的 1.5 mL 离心管中, 制备成单细胞悬液, 用于流式细胞术检测。

4.5 凋亡水平检测 应用免疫组织化学法测定心肌组织的凋亡细胞含量。使用 Hairpin-1 寡核苷酸探针标记凋亡细胞, 用流式细胞术分离并检测 Hairpin-1 阳性的细胞含量, 使用 Schwartz-Saltykov 方法计算每单位体积心肌的凋亡细胞的数量。该实验使用 Bio-Rad Radiance 2100 MP 多光子显微镜和 Image Pro 分析软件进行。

4.6 增殖水平检测 应用免疫组织化学法测定心肌组织的增殖细胞含量。使用 Ki67 抗体标记增殖细胞, 用流式细胞术分离并检测 Ki67 抗体阳性的细胞含量, 使用 Schwartz-Saltykov 方法计算每单位体积心肌的增殖细胞的数量。该实验使用 Bio-Rad Radiance 2100 MP 多光子显微镜和 Image Pro 分析软件进行。

4.7 ROS 检测 利用 DHE/ET 荧光探针定量法检测 ROS 含量。二氢乙锭可自由透过活细胞膜进入

细胞内,并被细胞内的 ROS 氧化,形成氧化乙锭渗入染色体 DNA 中,产生红色荧光。根据活细胞中红色荧光的产生,可以判断细胞 ROS 含量的多少和变化。使用 Bio-Rad Radiance 2100 MP 多光子显微镜和 Image Pro 分析软件对细胞内 DHE 荧光强度进行分析,测量 ROS 形成。

4.8 氧化应激损伤产物检测 应用免疫组织化学法测定心肌氧化应激损伤水平。使用硝基酪氨酸(Nitrotyrosine)抗体检测细胞中蛋白的氧化损伤;使用 8-羟基脱氧鸟苷(8-OH-dG)抗体测定细胞中 DNA 的氧化损伤。使用 Bio-Rad Radiance 2100 MP 多光子显微镜和 Image Pro 分析软件进行测量。

4.9 SOD2 蛋白表达水平和酶活性检测 使用 Western Blot 法检测 SOD2 蛋白表达水平。简而言之,用 PBS 洗涤细胞,加入 100 μ L 裂解缓冲液(150 mmol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl,1% TritonX-100,1 mmol/L EDTA,蛋白酶抑制剂混合物,10 mmol/L NaF,和 2 mmol/L Na_3VO_4 ,pH7.5),使用 BCA 蛋白定量试剂盒测量蛋白质浓度,加载各组等量蛋白到每条泳道中,用 12% SDS-PAGE 电泳分离法,将蛋白质转移至 PVDF 膜上,用 5%脱脂乳封闭膜。将封闭后的 PVDF 膜与一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBTS 溶液漂洗 3 次,每次 5 min。然后在室温条件下与二抗孵育 1 h,漂洗 3 次,每次 5 min。加入 ECL 显色液后,在暗室中进行曝光显色。使用兔抗鼠针对 SOD1 和 SOD2 的抗体做为一抗,使用 HRP 标记的

羊抗兔 IgG 作为二抗,GAPDH 作为上样对照。通过扫描对应于靶向抗体的蛋白质条带测定蛋白质表达水平,计算各组样品条带密度与正常对照条带密度的比值。

使用 BCA 蛋白定量试剂盒测量蛋白质浓度,使用 SOD 试剂盒检测 SOD2 酶活性。

5 统计学方法 采用 GraphPad Prism 5 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组体重及血糖、糖化血红蛋白水平比较(表 1) 与对照组比较,转基因组和 APS 转基因组小鼠体重、血糖和糖化血红蛋白水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。与对照组比较,DM 组小鼠 6、16 周血糖和 16 周糖化血红蛋白水平升高($P < 0.05$),16 周体重降低($P < 0.05$);与 DM 组比较,APS-DM 组小鼠 6、16 周血糖和 16 周糖化血红蛋白水平降低($P < 0.05$),16 周体重升高($P < 0.05$)。

2 各组心脏功能和血液动力学比较(表 2) 与对照组比较,DM 组和转基因组小鼠的心脏/体重比值降低,血液动力学明显紊乱,LVSP、LVFS 和 $\pm \text{LV dp/dt}$ 降低,LVEDP 升高($P < 0.05$);与 DM 组比较,APS-DM 组小鼠心脏/体重比值升高,LVSP、LVFS 和 $\pm \text{LVdp/dt}$ 升高,LVEDP 降低($P < 0.05$);与转基因组比较,APS 转基因组心脏/体重比值升高,LVSP、LVFS 和 $\pm \text{LVdp/dt}$ 升高,LVEDP 降低($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠体重、血糖、糖化血红蛋白比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	6 周		16 周		
		体重(g)	空腹血糖(mmol/L)	体重(g)	随机血糖(mmol/L)	糖化血红蛋白(%)
对照	6	27.80 $\pm$ 0.72	5.70 $\pm$ 0.10	32.70 $\pm$ 0.68	6.10 $\pm$ 0.27	4.50 $\pm$ 0.20
DM	6	26.10 $\pm$ 0.78	16.50 $\pm$ 0.40 *	22.40 $\pm$ 0.74 *	23.60 $\pm$ 0.71 *	8.80 $\pm$ 0.60 *
APS-DM	6	28.10 $\pm$ 0.62	5.80 $\pm$ 0.18 Δ	32.20 $\pm$ 0.42 Δ	6.20 $\pm$ 0.12 Δ	4.60 $\pm$ 0.25 Δ
转基因	6	27.20 $\pm$ 0.78	5.20 $\pm$ 0.10	33.50 $\pm$ 0.76	6.20 $\pm$ 0.20	4.62 $\pm$ 0.20
APS 转基因	6	27.80 $\pm$ 0.81	5.70 $\pm$ 0.10	34.50 $\pm$ 0.34	6.10 $\pm$ 0.20	4.60 $\pm$ 0.15

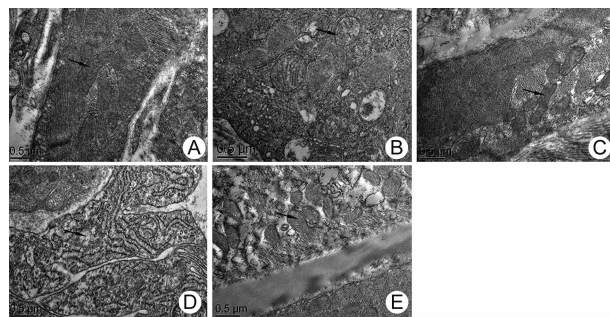
注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与 DM 组比较, $\Delta P < 0.05$

表 2 各组小鼠心脏功能和血液动力学各指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	心脏重量/体重 比值(mg/g)	HR (次/min)	LVSP (mmHg)	LVFS (%)	LVEDP (mmHg)	+LV dp/dt _{max} (mmHg/s)	-LV dp/dt _{min} (mmHg/s)
对照	6	5.60 $\pm$ 0.20	508.00 $\pm$ 15.00	97.10 $\pm$ 2.40	61.0 $\pm$ 2.50	7.40 $\pm$ 1.10	8 335.00 $\pm$ 472.00	6 836.00 $\pm$ 570.00
DM	6	4.50 $\pm$ 0.10 *	514.00 $\pm$ 13.00	81.60 $\pm$ 3.00 *	35.00 $\pm$ 1.40 *	12.10 $\pm$ 3.00 *	5 105.00 $\pm$ 598.00 *	4 439.00 $\pm$ 322.00 *
APS-DM	6	5.60 $\pm$ 0.20 Δ	504.00 $\pm$ 11.00	96.40 $\pm$ 2.10 Δ	57.00 $\pm$ 2.10 Δ	7.50 $\pm$ 1.40 Δ	8 251.00 $\pm$ 348.00 Δ	6 698.00 $\pm$ 479.00 Δ
转基因	6	4.10 $\pm$ 0.41 *	510.00 $\pm$ 18.00	82.60 $\pm$ 2.41 *	33.00 $\pm$ 1.21 *	12.50 $\pm$ 2.11 *	5 180.00 $\pm$ 4221.00 *	4 605.00 $\pm$ 761.00 *
APS 转基因	6	5.80 $\pm$ 0.25 Δ	502.00 $\pm$ 12.00	98.60 $\pm$ 1.82 Δ	55.00 $\pm$ 2.32 Δ	7.30 $\pm$ 1.02 Δ	8 224.00 $\pm$ 2 452.00 Δ	6 460.00 $\pm$ 4 982.00 Δ

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与 DM 组比较, $\Delta P < 0.05$;与转基因组比较, $\Delta P < 0.05$

3 各组心肌超微结构比较(图 1) 与对照组比较,DM 组和转基因组心肌超微结构明显损害,线粒体嵴溶解且明显肿胀,呈不规则形状,糖原颗粒、脂滴含量增加;APS 治疗后,各组小鼠的心肌超微结构出现了明显好转,线粒体形态正常,线粒体嵴明显增多。



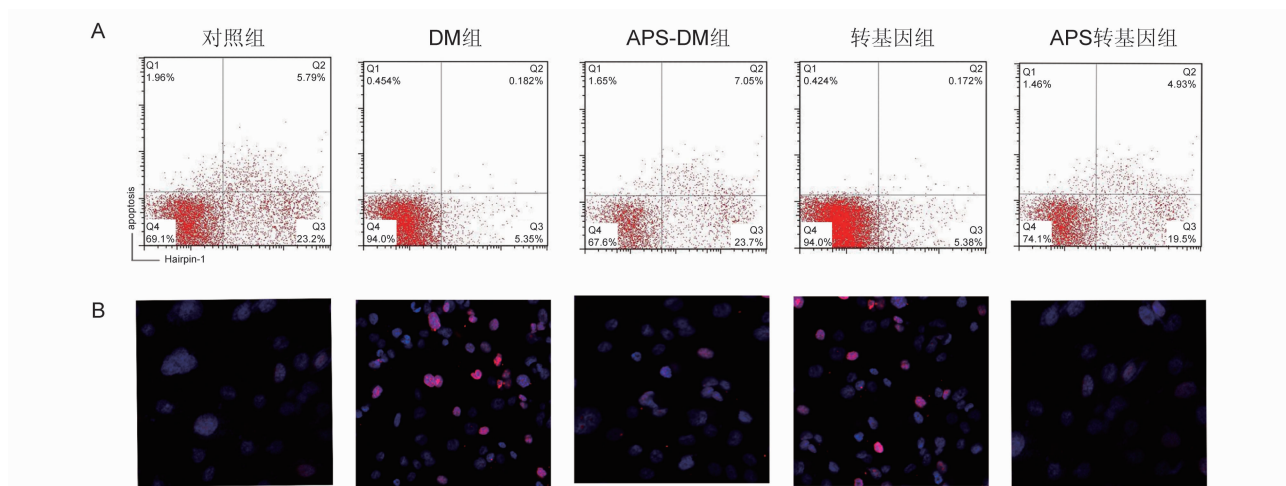
注:A 为对照组;B 为 DM 组;C 为 APS-DM 组;D 为转基因组;E 为 APS 转基因组;箭头所指为典型变化处

图 1 各组透射电镜下心肌超微结构变化 ($\times 23\ 300$)

4 各组凋亡和增殖情况的比较(图 2、3,表 3) 与对照组比较,DM 组和转基因组凋亡程度升高($P < 0.05$);与 DM 组比较,APS-DM 组凋亡程度降低($P < 0.05$);与转基因组比较,APS 转基因组凋亡程度降低($P < 0.05$)。与对照组比较,DM 组和转基因组增殖程度降低($P < 0.05$);与 DM 组比较,APS-DM 组增殖程度升高($P < 0.05$);与转基因组比较,APS 转基因组增殖程度升高($P < 0.05$)。

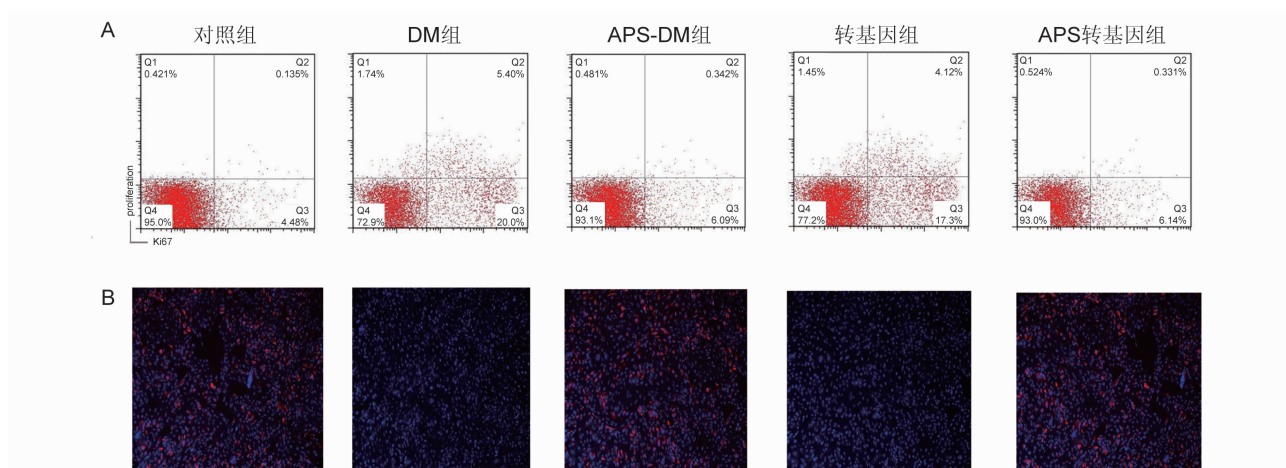
DM 组和转基因组 ROS 水平升高($P < 0.05$);与 DM 组比较,APS-DM 组 ROS 水平降低($P < 0.05$);与转基因组比较,APS 转基因组 ROS 水平降低($P < 0.05$)。

5 各组 ROS 水平的比较(图 4) 与对照组比较,



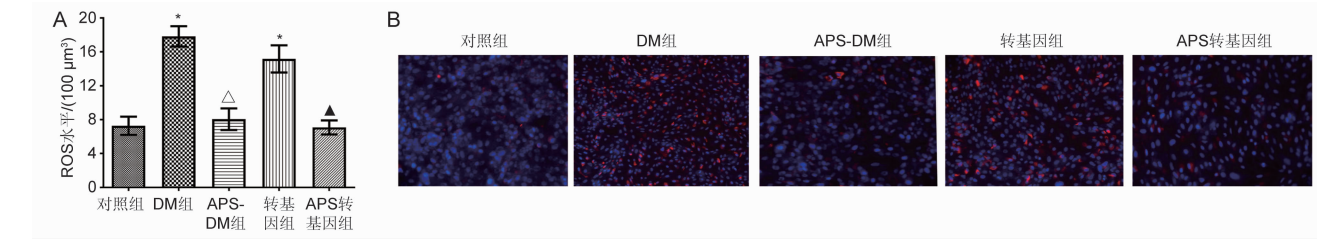
注:A 为流式结果图;B 为免疫组织化学法检测凋亡细胞图像结果,蓝色为心肌细胞,红色为凋亡阳性

图 2 各组心肌凋亡结果比较 ($\times 800$ 万)



注:A 为流式结果图;B 为免疫组织化学法检测增殖细胞图像结果,蓝色为心肌细胞,红色为增殖阳性

图 3 各组心肌增殖结果比较 ($\times 800$ 万)



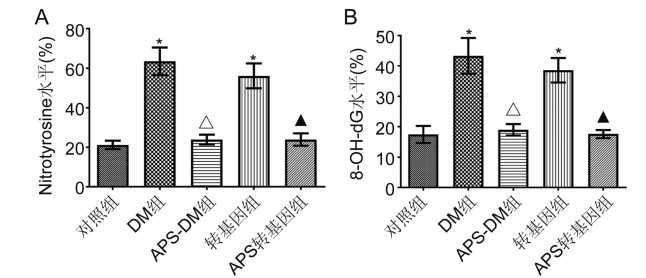
注:A 为 ROS 水平比较;B 为免疫荧光法检测 ROS 水平图像结果;与对照组比较,* $P < 0.05$;与 DM 组比较,△ $P < 0.05$;与转基因组比较,▲ $P < 0.05$

图 4 各组 ROS 水平的比较

表 3 各组心肌凋亡与增殖结果比较 (细胞数量/10 ⁶ , $\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	Hairpin-1 阳性	Ki67 阳性	
对照	6	2 912.92 ± 636.39	61 260.19 ± 9 374.20	
DM	6	28 873.21 ± 3 511.32 *	30 661.26 ± 4 635.25 *	
APS-DM	6	3 267.87 ± 504.83 △	58 006.71 ± 4 764.12 △	
转基因	6	26 103.36 ± 2 926.39 *	26 987.75 ± 4 743.15 *	
APS 转基因	6	2 897.89 ± 869.34 ▲	59 088.8 ± 5 771.32 ▲	

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与 DM 组比较,△ $P < 0.05$;与转基因组比较,▲ $P < 0.05$

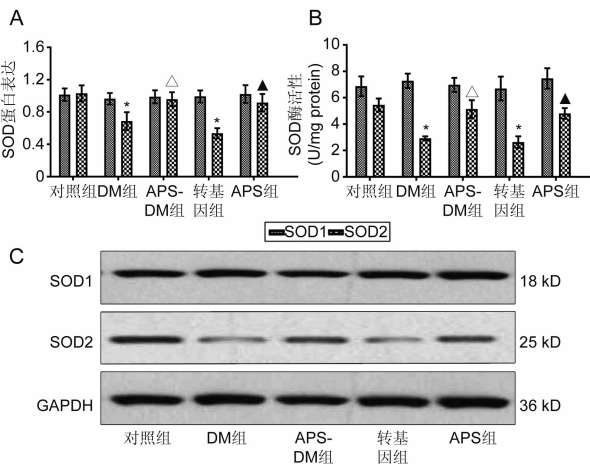
6 各组氧化应激损伤产物水平比较(图 5) 与对照组比较,DM 组和转基因组氧化应激损伤产物 Nitrotyrosine、8-OH-dG 水平均升高($P < 0.05$);与 DM 组比较,APS-DM 组氧化损伤产物 Nitrotyrosine、8-OH-dG 水平均降低($P < 0.05$);与转基因组比较,APS 转基因组氧化损伤产物 Nitrotyrosine、8-OH-dG 水平均降低($P < 0.05$)。



注: A 为 Nitrotyrosine 水平比较;B 为 8-OH-dG 水平比较;与对照组比较,* $P < 0.05$;与 DM 组比较,△ $P < 0.05$;与转基因组比较,▲ $P < 0.05$

图 5 各组氧化应激损伤产物水平比较

7 各组 SOD2 蛋白表达水平和酶活性的比较(图 6) 与对照组比较,DM 组和转基因组 SOD2 蛋白表达水平和酶活性降低($P < 0.05$);与 DM 组比较,APS-DM 组 SOD2 蛋白表达水平和酶活性升高($P < 0.05$);与转基因组比较,APS 转基因组 SOD2 蛋白表达水平和酶活性升高($P < 0.05$)。



注:A 为 SOD1 和 SOD2 蛋白表达水平检测结果;B 为 SOD1 和 SOD2 酶活性检测结果;C 为 SOD1、SOD2 蛋白电泳图;与对照组比较,* $P < 0.05$;与 DM 组比较,△ $P < 0.05$;与转基因组比较,▲ $P < 0.05$

图 6 各组 SOD2 蛋白表达和酶活性比较

讨 论

DM 是影响人类健康的三大主要慢性病之一,DCM 是一种独立于高血压病和动脉粥样硬化之外的特异性心肌病变,与 DM 患者心血管疾病的高发病率和高死亡率密切相关,作为 DM 一种独特的心脏并发症已经得到公认^[14]。然而,目前国内外尚无特效药物用于治疗 DM 及其并发症。因此,寻找安全有效的药物治疗以阻断或延缓 DCM 的发生、发展具有重要的意义。

有研究已证实,持续的高血糖诱导心肌细胞的氧化应激损伤是 DCM 的重要发病机制之一^[15,16]。氧化应激发生时,ROS 生成过多,抗氧化酶水平相对不足,体内氧化/抗氧化作用失衡,进一步损伤线粒体呼吸链酶和线粒体内三羧酸循环,由此不断恶性循环,引起细胞凋亡,改变心脏的稳态,最终促进了 DCM 的发生及其向心力衰竭的发展。其中,ROS 是需氧细胞在代谢过程中产生的一系列活性氧簇,包括:O²⁻ (超氧

自由基)、 H_2O_2 (过氧化氢)、 $\cdot\text{OH}$ (羟基自由基)等^[17]。SOD 依据体内分布不同分为三个亚型: SOD1 位于胞浆内, SOD2 位于线粒体内, SOD3 位于细胞外。线粒体是细胞产生 ROS 的主要场所, 而 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 无法穿透线粒体膜, SOD2 是以 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 为唯一底物的酶类清除剂, 构成抗 ROS 的第一道防线, 其含量可以间接反映心肌的氧化应激损伤程度以及抗氧化应激损伤的能力, 因此 SOD2 是抑制细胞线粒体生成 ROS 的最重要的抗氧化酶之一^[18-20]。研究表明, DM 鼠心肌的氧化应激损伤和凋亡与心肌内 SOD2 表达降低关系密切, 而给予 SOD2 类似物干预治疗后或利用转基因技术在其体内过表达 SOD2 基因后, DM 鼠心肌的氧化应激损伤减少, 心肌的病理和功能得到改善, 提示调控 SOD2 是抑制 DM 心肌氧化应激损伤的一个重要靶点^[21]。

黄芪是传统药用草本植物, 其用药始载于《神农本草经》, 药用迄今已有 2 000 多年的历史。黄芪被列为上品, 性微温味甘, 归肺脾二经, 具有补气升阳、固表止汗、利尿脱毒的作用, 主治“气虚证”^[8,22,23]。据中国传统医药理论记载, 黄芪是古代治疗消渴的高频用药之一, 在消渴病 (DM 属于中医学“消渴”范畴) 的治疗中发挥重要作用。黄芪临床应用广泛, 我国药典规定药用黄芪有两种: 豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根。APS 是经黄芪的根部提取、纯化而得到的均一多糖部分, 是黄芪的主要活性成分之一对于 DM 及其并发症有确切的治疗效果^[24,25]。APS 作为天然中药, 来源广泛, 造价低, 制备方便, 不良反应小, 有望成为预防或延缓 DM 的新型药物。这将为 DCM 的防治提供新的中医药治疗思路, 便于理解中药性味的本质及其治疗药物的筛选。

此前笔者研究表明, APS 口服治疗 [剂量为 $1.0\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 或 $2.0\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$] 可显著纠正 STZ 诱导的 DM 小鼠和 db/db 肥胖型 DM 鼠的高血糖症 (包括降低血糖水平和糖化血红蛋白水平)^[10,13], 同时显著改善 STZ 诱导的 DM 和 db/db 小鼠心肌功能不全, 抑制心肌纤维化和保护心肌超微结构^[9,26]。

本研究结果显示, APS 治疗对 DCM 的氧化应激损伤具有积极作用。第一, APS 治疗矫正糖尿病组和转基因组小鼠的心脏功能障碍和血液动力学紊乱, 改善其心肌组织结构异常和超微结构异常, 提示 APS 可以保护 DM 心肌和氧化应激心肌的组织结构和心脏功能。第二, APS 治疗抑制糖尿病组和转基因组小鼠凋亡程度, 表明 APS 治疗可以抑制 DM 心肌和氧化应激心肌的细胞凋亡和坏死。第三, APS 治疗降低糖尿病

组和转基因组心肌 ROS 水平和氧化损伤产物的水平, 增加心肌 SOD2 酶活性和蛋白表达水平, 提示 APS 可以抑制 DM 心肌和氧化应激心肌的 ROS 生成, 减少细胞中 DNA 和蛋白的氧化应激损伤, 而这可能与 APS 对心肌 SOD2 酶的调控作用有关。

此外, SOD2^{+/-} 组是氧化应激模型, 有心肌氧化应激损伤的表现, 但血糖正常, APS 治疗后心功能有显著性改善, 说明 APS 可以直接阻断心肌的氧化应激, 从而起到保护心脏的作用。DM 组有高血糖和心肌氧化应激损伤的表现, APS 治疗后血糖显著降低、心肌氧化应激显著抑制、心功能显著改善, 提示 APS 治疗可以改善血糖和阻断心肌氧化应激。因此, APS 可以保护小鼠 DM 心肌、抑制小鼠 DCM, 其作用可能是通过调控心肌 SOD2 酶表达水平, 抑制 ROS 生成, 抑制高血糖引发的心肌氧化应激损伤, 该效果独立于其对高血糖的作用效果。

综上所述, APS 通过调控 SOD2 表达, 提高细胞的抗氧化能力, 抑制 DM 心肌的氧化应激损伤, 实现对 DCM 小鼠的心肌保护作用。APS 抑制 DM 心肌氧化应激的分子机制仍有待进一步深入研究。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] Jia G, Hill MA, Sowers JR. Diabetic Cardiomyopathy [J]. Circ Res, 2018, 122(4): 624-638.
- [2] Mahalakshmi A, Kurian GA. Evaluating the impact of diabetes and diabetic cardiomyopathy rat heart on the outcome of ischemia-reperfusion associated oxidative stress [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 118: 35-43.
- [3] Liu P, Su J, Song X, et al. Activation of nuclear β -catenin/c-Myc axis promotes oxidative stress injury in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 493(4): 1573-1580.
- [4] He L, He T, Farrar S, et al. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(2): 532-553.
- [5] Majd S, Power JHT. Oxidative stress and decreased mitochondrial superoxide dismutase 2 and peroxiredoxin 1 and 4 based mechanism of concurrent activation of AMPK and mTOR in Alzheimer's disease [J]. Curr Alzheimer Res, 2018, 15(8): 764-776.
- [6] Barman S, Srinivasan K. Attenuation of oxidative

- stress and cardioprotective effects of zinc supplementation in experimental diabetic rats [J]. *Br J Nutr*, 2017, 117(3): 335–350.
- [7] Balamurugan M, Santharaman P, Madasamy T, et al. Recent trends in electrochemical biosensors of superoxide dismutases [J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 116: 89–99.
- [8] 汪娟. 黄芪的药理作用研究进展 [J]. *医疗装备*, 2018, (14): 202–203.
- [9] Chen W, Sun Q, Ju J, et al. Effect of Astragalus Polysaccharides on cardiac dysfunction in db/db mice with respect to oxidant stress [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 8359013.
- [10] Chen W, Yu MH, Li YM, et al. Beneficial effects of astragalus polysaccharides treatment on cardiac chymase activities and cardiomyopathy in diabetic hamsters [J]. *Acta Diabetol*, 2010, 47 (Suppl 1): 35–46.
- [11] Baba H, Kurano M, Nishida T, et al. Facilitatory effect of insulin treatment on hepatocellular carcinoma development in diabetes [J]. *BMC Res Notes*, 2017, 10(1): 478.
- [12] Chanpoo M, Petchpiboonthai H, Panyarachun B, et al. Effect of curcumin in the amelioration of pancreatic islets in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *J Med Assoc Thai*, 2010, 93 (Suppl 6): S152–S159.
- [13] Chen W, Lai Y, Wang L, et al. Astragalus polysaccharides repress myocardial lipotoxicity in a PPAR α -dependent manner *in vitro* and *in vivo* in mice [J]. *J Diabetes Complications*, 2015, 29 (2): 164–175.
- [14] Jia G, Whaley-Connell A, Sowers JR. Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia-and insulin-resistance-induced heart disease [J]. *Diabetologia*, 2018, 61(1): 21–28.
- [15] Robson R, Kundur AR, Singh I. Oxidative stress biomarkers in type 2 diabetes mellitus for assessment of cardiovascular disease risk [J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2018, 12(3): 455–462.
- [16] Karam BS, Chavez-Moreno A, Koh W, et al. Oxidative stress and inflammation as central mediators of atrial fibrillation in obesity and diabetes [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2017, 16(1): 120.
- [17] Rharass T, Lucas S. High glucose level impairs human mature bone marrow adipocyte function through increased ros production [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10: 607.
- [18] Case AJ. On the origin of superoxide dismutase: an evolutionary perspective of superoxide-mediated redox signaling [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2017, 6(4): 542–551.
- [19] Zou X, Ratti BA, O'Brien JG, et al. Manganese superoxide dismutase (SOD2): is there a center in the universe of mitochondrial redox signaling? [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2017, 49(4): 325–333.
- [20] Vendrov AE, Stevenson MD, Alahari S, et al. Attenuated superoxide dismutase 2 activity induces atherosclerotic plaque instability during aging in hyperlipidemic mice [J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(11): e006775.
- [21] Li J, Dai X, He X, et al. Effect of SOD2 methylation on mitochondrial DNA4834-bp deletion mutation in marginal cells under oxidative stress [J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2019, doi: 10.17305/bjbm.2019.4353.
- [22] Li J, Harata-Lee Y, Denton MD, et al. Long read reference genome-free reconstruction of a full-length transcriptome from *Astragalus membranaceus* reveals transcript variants involved in bioactive compound biosynthesis [J]. *Cell Discov*, 2017, 3: 17031.
- [23] 李思耐, 林谦, 高群, 等. 黄芪党参对心肌梗死后心衰小鼠心肌复极时间的干预研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38(2): 232–236.
- [24] Sun S, Yang S, Dai M, et al. The effect of Astragalus polysaccharides on attenuation of diabetic cardiomyopathy through inhibiting the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in high glucose-stimulated H9C2 cells [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 310.
- [25] Yang X, Zhu X, Tang X, et al. Astragalus polysaccharides meliorate cardiovascular dysfunction in iron-overloaded thalassemic mice [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2019, 244(14): 1202–1209.
- [26] Ju J, Chen W, Lai Y, et al. Astragalus polysaccharides improve cardiomyopathy in STZ-induced diabetic mice and heterozygous (SOD2 +/–) knockout mice [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2017, 50(8): e6204.

(收稿: 2018–07–11 在线: 2019–12–18)

责任编辑: 汤 静