·基础研究·

参芪复方对糖尿病模型大鼠血管病变的保护作用及机制

呼永河[1]　侯　君[2]　郑德志[3]　李聃丹[4]　郝新忠[5]　谢春光[6]
杜　联[6]　倪　青[7]　沈　毅[1]　李　静[1]

摘要　**目的**　探讨参芪复方对糖尿病模型大鼠血管病变的保护作用及机制。**方法**　将 18 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组及参芪复方组，每组各 6 只。采用高脂饲料喂养联合小剂量链脲佐菌素（streptozotocin，STZ）注射建立糖尿病大鼠模型。参芪复方组大鼠每日以参芪复方 2 g/kg 灌胃，模型组及正常对照组大鼠以等量生理盐水灌胃 12 周。12 周后采用二维和背向散射积分等超声技术观察糖尿病大鼠腹主动脉血管结构及功能变化；采用 HE、Masson 染色法观察主动脉血管和心肌微血管纤维化程度；测定离体大鼠主动脉血管环张力；实时荧光定量（RT-PCR）技术检测心肌转化生长因子-β（TGF-β）基因表达；Western blot 检测大鼠心肌 TGF-β、胶原Ⅰ（collagen Ⅰ）、胶原Ⅲ（collagen Ⅲ）及磷酸化 P38 MAPK 蛋白的表达。**结果**　与对照组比较，模型组大鼠腹主动脉收缩期内径、舒张期内径、Peterson 弹性模量、僵硬度指数及背向散射积分均明显增加，背向散射积分变化幅度、横断面扩张系数明显降低（$P<0.05$）。经参芪复方治疗 12 周后，上述指标均明显改善（$P<0.05$）。HE、Masson 染色切片结果显示，与模型组比较，参芪复方组大鼠主动脉血管及心肌纤维化程度明显减轻（$P<0.05$）；离体大鼠主动脉血管环张力测定结果显示，参芪复方组对乙酰胆碱诱导的血管舒张反应和最大舒张百分比明显提高（$P<0.05$）。与对照组比较，模型组大鼠心肌 TGF-β mRNA 表达，TGF-β、collagen Ⅰ、collagen Ⅲ蛋白表达增加（$P<0.05$），P38 MAPK 磷酸化增加（$P<0.05$）。与模型组比较，参芪复方组 TGF-β mRNA、TGF-β、collagen Ⅰ、collagen Ⅲ蛋白表达降低，P38 MAPK 磷酸化水平降低（$P<0.05$）。**结论**　参芪复方对糖尿病血管病变包括大血管和微血管病变均有保护作用，其机制可能是通过下调糖尿病大鼠心肌 TGF-β 表达，进而抑制 P38 MAPK 信号传导途径降低Ⅰ、Ⅲ型胶原合成，从而减轻大血管和心肌微血管纤维化。

关键词　参芪复方；2 型糖尿病；糖尿病血管病变；糖尿病心肌病；间质纤维化

Protection and Mechanism of Shenqi Compound for Diabetic Angiopathy Model Rats　HU Yong-he[1], HOU Jun[2], ZHENG De-zhi[3], LI Dan-dan[4], HAO Xin-zhong[5], XIE Chun-guang[6], DU Lian[6], Ni Qing[7], Shen Yi[1], and LI Jing[1]

1 Department of Traditional Chinese Medicine, Chengdu Military General Hospital, Chengdu (610083), China; 2 Department of Pharmacy, Chengdu Military General Hospital, Chengdu (610083), China; 3 Institute of Cardiovascular Surgery, Chengdu Military General Hospital, Chongqing (400037), China; 4 Base for Clinical Pathology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing (400037), China; 5 Department of Endocrinology, Chengdu Military General Hospital, Chengdu (610083), China; 6 Department of Internal Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu (610075), China; 7 Department of Endocrinology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100053), China

基金项目：总后勤部中医药专项基金资助项目（No.10ZYZ120）；全军医学科技“十二五”科研重点项目（No. BWS11J067）

作者单位：1.成都军区总医院中医科（成都 610083）；2. 成都军区总医院药剂科（成都 610083）；3. 第三军医大学新桥医院全军心血管外科研究所（重庆 400037）；4. 第三军医大学新桥医院临床药理基地（重庆 400037）；5. 成都军区总医院内分泌科（成都 610083）；6. 成都中医药大学内科教研室（成都 610075）；7.中国中医科学院广安门医院内分泌科（北京 100053）

通讯作者：呼永河，Tel：028－86570206，E-mail：huyonghezyy@163.com

DOI：10.7661/CJIM.2014.09.1078

ABSTRACT Objective To investigate the protective effect and mechanism of Shenqi Compound on diabetic angiopathy modeled rats. Methods Totally 18 SD rats were randomized into 3 groups, i.e., the normal control group, the diabetic mellitus (DM) group, and Shenqi Compound group, 6 in each group. The DM rat model was established by feeding high-fat diet (to induce hyperlipidemia) + intraperitoneal injection of small dose streptozotocin (STZ). Shenqi Compound was given to rats in the Shenqi Compound group at the daily dose of 2 g/kg. Equal volume of normal saline was given to rats in the model group and the normal control group by gastrogavage. All treatment was lasted for 12 weeks. Then 2-D and ultrasonic integrated backscatter technique were used to evaluate structural and functional changes of abdominal aorta in the progression of diabetic macroangiopathy. The fibrosis degree of the aorta vessel and myocardium capillaries were observed by using HE and Masson trichrome staining. The tension of the aortic vascular ring was determined. The transforming growth factor β (TGF-β) mRNA expression was detected by real time PCR (RT-PCR). The protein expression of TGF-β, collagen Ⅰ, collagen Ⅲ, connective tissue growth factor (CTGF), and phosphorylation P38 MAPK were detected by Western blot. Results Compared with the normal control group, abdominal aortic systolic inner diameter, diastolic inner diameter, Peterson elastic modulus, stiffness index, and backscatter integral significantly increased; the rangeability of integral backscatter and the extension coefficient of cross section significantly decreased in the DM group (all $P<0.05$). After 12 weeks aforesaid indices were obviously improved in the Shenqi Compound group ($P<0.05$). Results of HE and Masson staining showed that the fibrosis degree of the aorta vessel and myocardium capillaries was obviously alleviated in rats of the Shenqi Compound group ($P<0.05$). Results of the aortic vascular ring tension showed that acetylcholine induced vasodilatation and maximum diastolic percent were obviously elevated in the Shenqi Compound group ($P<0.05$). Compared with the normal control group, the mRNA expression of TGF-β, and the protein expression of TGF-β, collagen Ⅰ, and collagen Ⅲ, and phosphorylation of P38 MAPK all significantly increased in the DM group ($P<0.05$). Compared with the DM group, the mRNA expression of TGF-β, and the protein expression of TGF-β, collagen Ⅰ, and collagen Ⅲ, and phosphorylation of P38 MAPK all decreased ($P<0.05$). Conclusions Shenqi Compound could effectively improve the arterial function in diabetic marcoangiopathy and microvascular dysfunction. The mechanism might be due to the down-regulating the expression of TGF-β, and further suppressing the phosphorylation of P38 MAPK, reducing the synthesis of collagen Ⅰ and collagen Ⅲ, therefore, ameliorating arterial and myocardial interstitial fibrosis.

KEYWORDS Shenqi Compound; type 2 diabetes; diabetic angiopathy; diabetic cardiomyopathy; interstitial fibrosis

糖尿病(diabetes mellitus,DM)微血管病变是糖尿病特有的慢性血管并发症,主要表现为心脏、肾脏、眼等微血管病变[1]。既往研究表明,糖尿病血管病变主要包括动脉粥样硬化、血管平滑肌细胞和成纤维细胞大量增殖所致的动脉中膜、外膜不规则增厚、纤维化和钙化[2-4]。糖尿病患者血管结缔组织基质成分显著改变,高糖诱导的胶原过度表达与血管壁纤维化、硬化高度相关[5]。参芪复方是成都中医药大学谢春光教授的经验方,主要由人参、黄芪、山药、山茱萸、生地黄、天花粉、丹参、制大黄等组成,具有益气养阴、清热生津、活血化瘀的作用,以补本虚为主,泻标实为辅,对症治疗糖尿病及其并发症,切合糖尿病血管病变的病机[6-9]。在临床观察中发现,本方能明显改善患者神疲乏力、口渴多饮、便秘和舌质暗等症状,提高患者的生活质量。本研究运用分子生物学、组织病理学、超声心动图技术和计算机图像分析等方法对糖尿病大鼠主动脉大血管和左心室微血管进行定性观察及定量分析,深入研究 TGF-β/P38 MAPK 信号传导通路在糖尿病血管并发症中的作用,并应用参芪复方对糖尿病模型大鼠进行干预治疗。通过对大血管和微血管的研究,寻找早期诊治糖尿病血管病变的新靶点。

材料与方法

1 动物 雄性 3 月龄 SD 大鼠 20 只,SPF 级,体重 220 ~ 240 g(购于四川大学华西医学中心实验动物中心,合格证号:川实动管第 9 号)。每日自由饮水摄

食。普通饲料成分及热量:脂肪 5%、碳水化合物 55%、蛋白质 23%、包括纤维素及灰分在内的其他成分占 17%,总热量为 3.2 kcal/g;高脂饲料成分及热量:脂肪 50%、碳水化合物 17%、蛋白质 25%、包括纤维素及灰分在内的其他成分占 8%,总热量为 4.7 kcal/g。

2　药物、试剂及仪器　彩色超声多普勒仪:Sonos7500 (s8 HP 3 ~8 MHz, Philips 公司),生物机能实验系统:BL-420E (成都泰盟科技有限公司),石蜡切片机: RM2243(德国 Leica 公司), 荧光定量 PCR 仪: ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem 公司),核酸蛋白分析仪:DV800 (Bechman 公司),数字凝胶成像系统: Flurochem 9900 -50(Alpha Innotech 公司),转移电泳仪:PowerPac Universal 500w(Bio-Rad 公司),RNA 提取试剂盒: Trizol (Invitrogen 公司),TGF-β、collagen Ⅰ、collagen Ⅲ、P38 MAPK antibody (Santa Cruz 公司)。参芪复方颗粒(批号:20130720)由成都军区总医院药剂科生产,每 1 克相当于原生药材 10 g。

3　造模及分组　6 只对照组大鼠给予普通饲料,其余 14 只大鼠给予高脂饮食,4 周后一次性腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ,35 mg/kg),1 周后取禁食 12 h 大鼠的尾血用稳步倍加型血糖仪(检测范围为 0.5 ~27.6 mmol/L)测定血糖值,以空腹血糖 ≥16.7 mmol/L 为糖尿病组大鼠造模成功的指标,建模成功率为 85.7%。将造模成功大鼠随机分为模型组及参芪复方组,每组各 6 只,此后参芪复方组大鼠每日以参芪复方 2 g/kg 灌胃 12 周,模型组及正常对照组大鼠以等量生理盐水灌胃 12 周。

4　样本制备及采集　干预 12 周后,大鼠腹腔注射 3%戊巴比妥钠 1 mL/kg 麻醉固定,取主动脉壁和左心室,一部分放入冻存管投入液氮保存,检测基因和蛋白表达;另一部分立即置于 4 ℃预冷的 4%多聚甲醛溶液中固定,行病理学检测。

5　观察指标及检测方法

5.1　超声观察腹主动脉结构及功能　给予大鼠戊巴比妥腹腔注射麻醉,使心率保持在 300 次/min,连接肢体导联监测心电图。以二维、M 型超声于腹主动脉长轴切面进行观察并测量收缩期内径(Ds)、舒张期内径(Dd),并计算腹主动脉 Peterson 弹性模量(Ep)、僵硬度指数(β)、横断面扩张系数(CD)。Ep、β 和 CD 按以下公式计算:$Ep = (\Delta P/\Delta D) \times Dd = [(Ps - Pd)/(Ds - Dd)] \times Dd$ ($10^6 dyn/cm^2$), $\beta = \ln(Ps/Pd)/([Ds - Dd]/Dd)$, $CD = \Delta A : [A \times (Ps - Pd)] = \pi \times [(Ds/2)^2 - (Dd/2)^2] : [\pi \times (Dd/2)^2 \times (Ps - Pd) \times 0.133\ 32]$ (kPa^{-1}) (Ps,收缩压;Pd,舒张压; A,主动脉管腔横截面积; ΔA,主动脉管腔横截面积变化)。采用超声背向散射积分技术,于腹主动脉长轴切面采集腹主动脉壁背向散射积分数据,包括校正平均背向散射积分(IBS %)和背向散射积分周期变化幅度(CVIB)。所有测量均由同一位操作者完成,均在同一部位取 3 个连续心动周期的平均值。

5.2　主动脉及心肌血管纤维化评价　对大鼠主动脉和左心室分别进行 HE 染色、Masson 染色及心肌 Masson 染色。应用 Image-pro Plus 图像分析仪进行心肌胶原半定量分析,计算心肌胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)%及心肌血管周围胶原面积/管腔面积(PVCA/LA),测定主动脉中层厚度、中膜胶原比例。

5.3　主动脉组织羟脯氨酸含量测定　称取约 50 mg干燥至恒重的主动脉组织,ELISA 法测定羟脯氨酸含量。主动脉胶原含量 = 羟脯氨酸含量/13.5%[10]。

5.4　离体大鼠主动脉血管环张力测定　大鼠断头后迅速剖开胸腹部取出胸主动脉,置于通有 95% O_2 和 5% CO_2 混合气体的 Krebs 液中,其组成为: NaCl 119 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L, $CaCl_2$ 2.5 mmol/L, $MgCl_2$ 1.2 mmol/L, KH_2PO_4 1.2 mmol/L, $NaHCO_3$ 25 mmol/L, D-Glucose 11.1 mmol/L, pH 7.4。小心去除血管周围结缔组织和脂肪组织,清除血管内血液,剪成长约 3 mm 的血管环,钢钩固定于含 Krebs 液的浴皿中,并通过张力换能器连于生物机能实验系统记录仪。给予血管环 2 g 的初始张力,平衡 60 min,以 60 mmol/L 的 KCl 收缩血管,判断血管活性,然后用 Krebs 液洗脱达基线。待动脉环稳定后,用 10^{-6} mol/L 苯肾上腺素(PE)收缩血管,分别用 10^{-9} ~10^{-5} mol/L 的乙酰胆碱(ACh)和硝酸甘油(NTG)舒张血管,并计算舒张百分比(舒张幅度/苯肾上腺素预收缩幅度)。

5.5　实时荧光定量(RT-PCR)技术检测 TGF-β mRNA 相对表达量　(1) RNA 提取:按 Trizol 说明书提取心肌的总 RNA。(2) RT:在 20 μL 的反应体系中,以 1 μg RNA 为模板逆转录获得主动脉 cDNA。(3) RT-PCR:自基因库查得大鼠目的基因 TGF-β 和 β-actin 的 cDNA 序列,设计 PCR 引物,各基因引物序列如下:TGF-β:上游为 5′-TTGCCCTCTACAACCAACACAA-3′,下游为 5′-GGCTTGCGACCCACGTAGTA-3, β-actin :上游为 5′-GACGGTCAGGTCATCACTATCG-3′, 下游为 5′-ACGGATGTCAA

CGTCACACTTC-3′。扩增条件：94 ℃ 15 s，60 ℃ 60 s，72 ℃ 2 s，42 个循环。所有基因扩增前94 ℃预变性10 min，扩增后72 ℃延伸10 min。每一对引物均设阴性对照。反应结束后建立 RT-PCR 溶解曲线证实扩增的特异性，读取 Ct 值，以管家基因 β-actin 为内参，校正每个样品的 Ct 值得出 ΔCt 值，表达的差异以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示，$\Delta Ct = Ct_{target} - Ct_{\beta\text{-actin}}$，$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{treated} - \Delta Ct_{control}$。

5.6 Western blot 检测蛋白表达量 取新鲜大鼠左心室组织，提取蛋白，BCA 法测定蛋白浓度，SDS-PAGE 电泳，Western blot 检测心肌 TGF-β、collagen Ⅰ、collagen Ⅲ、磷酸化 P38 MAPK 的蛋白表达量。

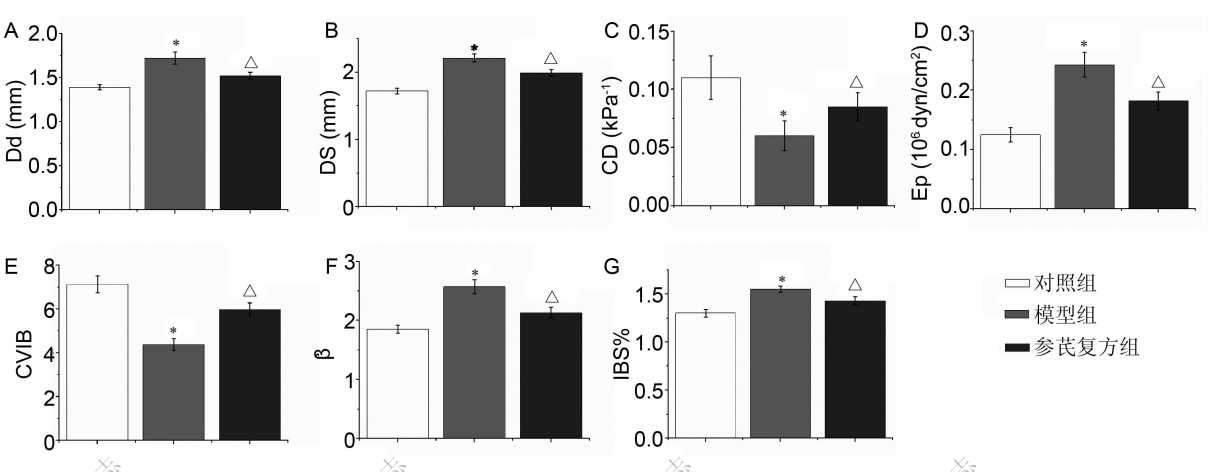
6 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计学软件进行数据分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多样本均数比较采用单因素方差分析。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠腹主动脉超声指标比较（图 1） 干预 12 周后，与对照组比较，模型组大鼠腹主动脉 Ds、Dd、Ep、β 均明显增加（$P < 0.05$），CD 降低（$P < 0.05$）。超声背向散射积分结果显示，与对照组比较，模型组大鼠腹主动脉 IBS % 明显增加，CVIB 明显降低（均 $P < 0.05$）。与模型组比较，参芪复方组上述指标均表现出不同程度的改善（$P < 0.05$）。

2 各组大鼠主动脉及心肌血管纤维化改变比较（图 2－5） 大鼠腹主动脉血管 HE 染色结果显示，模型组内皮细胞排列紊乱、致密，仍贴于内弹力板上。血管平滑肌细胞肥大、扭曲、排列紊乱，层数增多，细胞核大小不一，细胞膜及核膜欠清晰、完整，胞浆染色不均，可见大量肌纤维断裂。参芪复方组平滑肌细胞排列、细胞核形状明显好转，内弹力板破坏现象减轻。主动脉血管 Masson 染色结果表明，主动脉血管平滑肌细胞及弹力纤维呈红色，间质胶原纤维呈蓝绿色。对照组主动脉胶原纤维分布均匀、纤细，相邻细胞的胶原纤维网完好，血管周围纤维化程度轻；模型组大鼠主动脉胶原组织明显增多，排列紊乱，分布不匀，血管周围纤维化明显。参芪复方组胶原纤维明显减少，分布略稀疏。选取血管横切面 Masson 染色图片，采用 Image-pro Plus 对各组大鼠主动脉 Masson 染色图片进行半定量分析，结果显示，与对照组比较，模型组 PVCA/LA、CVF 均明显增加（$P < 0.05$）。与模型组比较，参芪复方组 PVCA/LA、CVF 含量明显降低（$P < 0.05$）。心肌微血管 Masson 染色显示，心肌细胞为深红色，胶原纤维被染为蓝绿色条带状。在对照组中，仅看到有少量的胶原纤维散在于心肌微血管中；模型组心肌血管中胶原纤维最为丰富，呈网状分布，血管壁周围胶原纤维沉积明显，管壁明显增厚，管腔狭窄，PVCA/LA 和 CVF 较对照组升高（$P < 0.05$）。与模型组比较，参芪复方组心肌血管纤维化程度明显减轻，PVCA/LA 和 CVF 值明显下降（$P < 0.05$）。

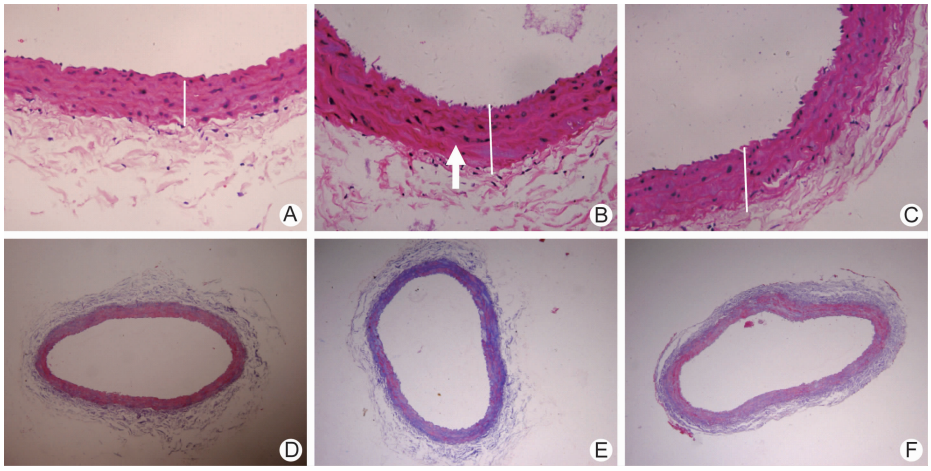
3 各组大鼠主动脉组织羟脯氨酸含量比较（表 1） 与对照组比较，模型组大鼠主动脉胶原含量均明显增加（$P < 0.05$）；与模型组比较，参芪复方组胶原含量降低（$P < 0.05$）。



注：A 为 Dd；B 为 Ds；C 为 CD；D 为 Ep；E 为 CVIB；F 为 β；G 为 IBS%；与对照组比较，*$P < 0.05$；与模型组比较，△$P < 0.05$

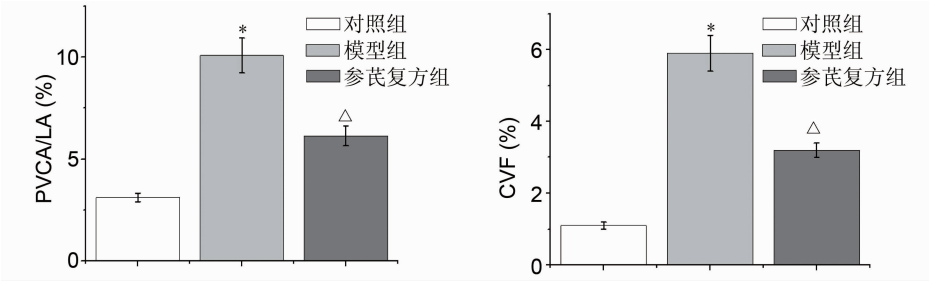
图 1 各组大鼠腹主动脉超声指标比较

中国中西医结合杂志



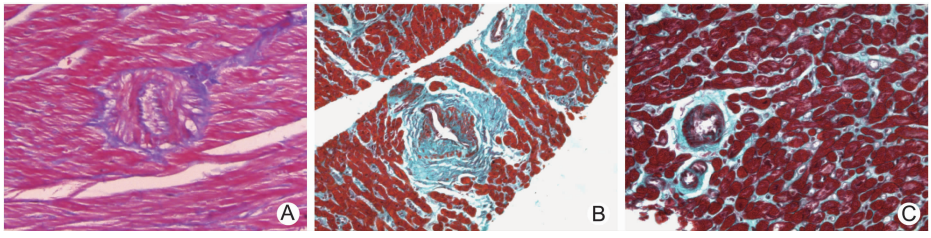
注：A、D 为对照组；B、E 为模型组；C、F 为参芪复方组；箭头所示为病理变化。A ~ C（HE 染色，×200）；D ~ F（Masson 染色，×200）

图 2　各组大鼠主动脉病理学改变



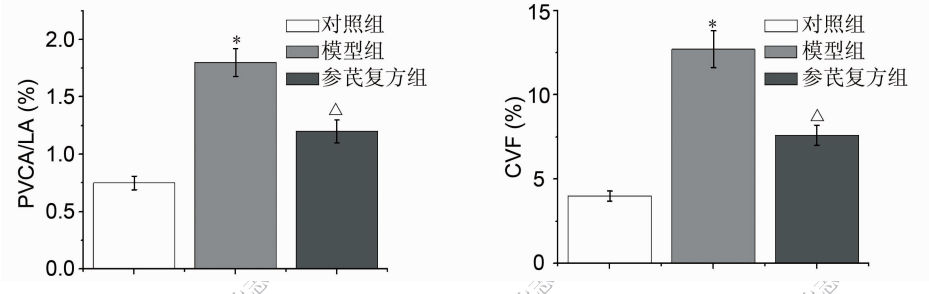
注：与对照组比较，$^{*}P<0.05$；与模型组比较，$^{\Delta}P<0.05$

图 3　各组大鼠主动脉 PVCA/LA 及 CVF 含量比较



注：A 为对照组；B 为模型组；C 为参芪复方组

图 4　各组大鼠左心室病理学改变（Masson 染色，×200）



注：与对照组比较，$^{*}P<0.05$；与模型组比较，$^{\Delta}P<0.05$

图 5　各组大鼠左心室 PVCA/LA 及 CVF 含量比较

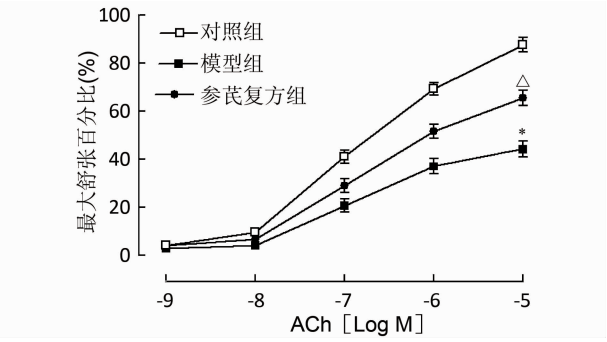
中国中西医结合杂志

表 1 各组大鼠主动脉组织羟脯氨酸含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	羟脯氧酸(μg/mg)
对照	6	6.58 ± 0.52
模型	6	18.52 ± 1.13 *
参芪复方	6	11.47 ± 0.79 △

注:与对照组比较,*P <0.05;与模型组比较,△P <0.05

4 各组大鼠离体主动脉血管环张力比较(图 6)与对照组比较,模型组 ACh 诱导的内皮依赖性血管舒张反应受损,最大舒张百分比降低(P <0.05);与模型组比较,参芪复方组中 ACh 诱导的血管舒张反应明显提高,最大舒张百分比亦提高(P <0.05)。



注:与对照组比较,*P <0.05;与模型组比较,△P <0.05

图 6 各组大鼠主动脉对 ACh 诱导的内皮依赖性血管最大舒张百分比比较

5 各组大鼠心肌 TGF-β mRNA 表达水平比较(表 2) 与对照组比较,模型组大鼠 TGF-β mRNA 表达水平明显升高(P <0.05);与模型组比较,参芪复方组 TGF-β mRNA 表达水平降低(P <0.05)。

表 2 各组大鼠心肌 TGF-β mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

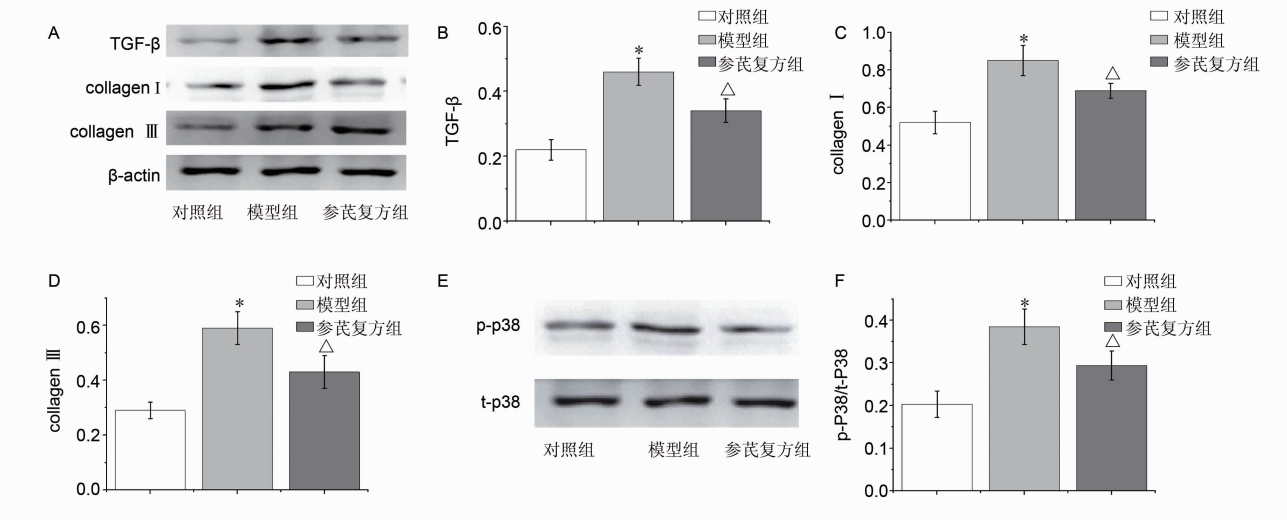
组别	n	TGF-β/β-actin
对照	5	0.15 ± 0.02
模型	5	0.38 ± 0.03 *
参芪复方	5	0.27 ± 0.03 △

注:与对照组比较,*P <0.05;与模型组比较,△P <0.05

6 各组大鼠心肌关键分子蛋白表达水平比较(图 7) 与对照组比较,模型组大鼠心肌 TGF-β、collagen Ⅰ、collagen Ⅲ蛋白表达水平显著增加,P38 MAPK 磷酸化增加(P <0.05)。与模型组比较,参芪复方组 TGF-β、collagen Ⅰ、collagen Ⅲ蛋白表达降低,P38 MAPK 磷酸化水平降低(P <0.05)。

讨 论

较好的糖尿病血管纤维化大鼠模型应具备如下基本特征:(1)糖尿病状态能持续稳定维持,糖尿病能加速动脉硬化尤其是血管纤维化或加重动脉硬化;(2)对该动物模型的干预具有可操作性。高脂饮食联合 STZ 注射诱导的 2 型糖尿病大鼠模型是研究糖尿病血管病变应用最广泛的动物模型[11]。本研究注射 STZ



注:A 为 Western blot 检测各组大鼠 TGF-β、collagen Ⅰ、collagen Ⅲ蛋白表达;B 为各组大鼠 TGF-β 蛋白定量;C 为各组大鼠 collagen Ⅰ蛋白定量;D 为各组大鼠 collagen Ⅲ蛋白定量;E 为各组大鼠 P38 蛋白表达;F 为各组大鼠 P38 蛋白表达定量;与对照组比较,*P <0.05;与模型组比较,△P <0.05

图 7 各组大鼠心肌组织 TGF-β、collagen Ⅰ、collagen Ⅲ及 P38 MAPK 蛋白表达水平比较

中国中西医结合杂志

后大鼠血糖迅速升高伴胰岛素水平下降，说明糖尿病模型制备成功。经腹主动脉超声和组织病理学证实血管纤维化动物模型构建成功。该动物模型具备以下优势：(1) 未采用基因操作技术，因此基本避免了基因变异或缺陷对后续研究的不利影响；(2) 该动物模型具有胰岛素抵抗状态，糖尿病状态可长期稳定维持，动物模型的糖尿病状态与人类 2 型糖尿病类似。但该大鼠模型还存在部分不足：(1) 现有的动物模型中，大鼠的糖尿病不能完全模拟人类 2 型糖尿病，因此所得结论推及至人仍需进一步验证；(2) 人类糖尿病晚期多发动脉粥样硬化病变，而在该模型中，大多数糖尿病大鼠血管病变仍仅表现为血管纤维化，即使在糖尿病的病程晚期，动脉粥样硬化程度并不高，这与人类糖尿病病变并不完全一致，因此只能用于研究糖尿病早期病变；(3) 长期高脂饮食联合 STZ 注射诱发的 2 型糖尿病大鼠模型的造模周期较长，且停用高脂饮食后，血糖会逐渐恢复正常，导致在科研中难以准确评价动脉硬化发生的主要因素是年龄还是糖尿病。尽管如此，大鼠作为动物模型研究仍然具有不可比拟的优势，选择大鼠作为研究糖尿病血管病变的动物模型不可替代[12-14]。

血管重构是一个动态过程，包括平滑肌细胞、成纤维母细胞的增殖、迁移、凋亡以及胶原基质成分合成、降解及重新排列等过程。糖尿病血管重构主要指糖尿病所导致的血管结构改变，包括血管壁增厚、组织病理学改变、管壁/管腔比值改变等。血管重构又是血管对外在病理性刺激的复杂动态反应过程，包括信号的感受、转导和调节因子的合成、释放，最终产生结构变化[15,16]。糖尿病血管重构与糖尿病大血管病变密切相关。主动脉纤维化是糖尿病主动脉重构的主要病理变化[13]。本研究结果表明，2 型糖尿病大鼠主动脉重构以血管纤维化为主，主要表现为主动脉内径增加，主动脉中膜厚度及血管壁内胶原比例明显增加，动脉壁弹性、顺应性及可扩张性明显降低，主动脉僵硬度指数明显增加。经参芪复方治疗 12 周后，能有效延缓糖尿病主动脉重构的进展，改善血管功能。既往研究发现，参芪复方对糖尿病血管病变如糖尿病心肌病具有保护作用[16]，本实验还发现参芪复方可逆转糖尿病大鼠主动脉纤维化的进展。本研究主动脉超声结果显示，糖尿病大鼠经参芪复方治疗后腹主动脉舒张期内径减小，横断面扩张系数明显增加，腹主动脉僵硬度指数、Petersons 弹性模量明显减少；腹主动脉校正平均背向散射积分均明显减小，背向散射积分心动周期的变化幅度明显增加，以上结果均证实参芪复方可降低主动脉僵硬度，增加可扩张性及顺应性，减轻主动脉纤维化程度。

离体血管环实验能较好地反映血管内皮依赖性和非依赖性舒张功能，是评价血管功能的经典实验。本实验研究表明，与对照组比较，模型组大鼠胸主动脉环对肾上腺素能受体激动剂 NE 呈收缩增强趋势，对浓度依赖的 ACh 舒张反应下降，与 Zhu BH 等[17]的研究一致。经参芪复方治疗后，收缩增强趋势降低，对浓度依赖的 ACh 的舒张反应提高，表明参芪复方对血管内皮细胞具有保护作用。

研究表明，MAPK 信号转导通路是糖尿病状态下介导心肌肥大及间质纤维化的重要信号途径[18]。在糖尿病状态下，过表达的 TGF-β 可能通过激活 MAPK 信号途径而引起糖尿病大血管重构的各种病理性改变[19,20]。参芪复方通过何种分子机制改善糖尿病血管重构，是否通过对 P38 MAPK 信号通路的调节实现对糖尿病血管重构的逆转作用，参芪复方能否逆转糖尿病心肌病的进程？笔者通过检测糖尿病大鼠左室心肌组织中 TGF-β、P38 MAPK，Ⅰ、Ⅲ型胶原的表达情况发现，与模型组比较，参芪复方组大鼠心肌组织 TGF-β 表达水平及 P38 MAPK 磷酸化水平明显降低，血管间质中Ⅰ、Ⅲ型胶原表达下降。

综合以上结果，笔者得出以下结论：糖尿病大鼠发生心肌重构的同时，心肌 TGF-β 表达水平上调进而激活 P38 MAPK 信号传导途径引起Ⅰ、Ⅲ型胶原合成明显增加，最终导致心肌间质纤维化，是糖尿病微血管病变发生的重要分子机制。参芪复方能减少主动脉中膜胶原组织沉积，降低主动脉僵硬度指数，有效改善糖尿病主动脉纤维化，改善大血管功能，逆转糖尿病主动脉重构的进程，具有保护糖尿病血管病变的作用。

参 考 文 献

[1] Kunz J. Update on diabetic macroangiopathy[J]. Der Pathologe, 2012, 33(3): 192-204.

[2] 赵意平，张柏根. 糖尿病血管病变病理与病理生理改变及临床意义[J]. 中华全科医师杂志，2007，6(11)：652-654.

[3] 刘声远. 糖尿病血管病变机制与防治进展[J]. 微循环学杂志，2006，16(4)：3-6.

[4] Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: Roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis[J]. Hypertension, 2001, 38(3 Pt 2): 581-587.

[5] Hitomi H, Kaifu K, Fujita Y, et al. Angiotensin Ⅱ shifts insulin signaling into vascular remodeling

from glucose metabolism in vascular smooth muscle cells[J]. Am J Hypert, 2011, 24(10): 1149 -1155.

[6] 殷丽平, 谢春光,张红敏,等. 参芪复方对自发性糖尿病大鼠心肌表达的影响[J]. 福建中医药, 2009, 40(3): 38 -40.

[7] 张红敏, 陈世伟,谢春光,等. 参芪复方抗自发性糖尿病 GK 大鼠早期动脉粥样硬化的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(15): 1272 -1276.

[8] 张红敏, 谢春光,陈世伟,等. 参芪复方对糖尿病早期大血管病变大鼠白色脂肪过氧化物酶体增生物激活受体γ(PPARγ)的影响[J]. 中医杂志, 2007, 48(6): 549 -551.

[9] 高泓, 谢春光,赵旭. 糖尿病大血管病变的中医病机分析[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6): 1314 -1315.

[10] Jimenez SA, Bashey RI. Solubilization of bovine heart-valve collagen[J]. Biochem J, 1978, 173(1): 337 -341.

[11] Burlá AK, Lobato NS, Fortes ZB, et al. Cardiac fibrosis and vascular remodeling are attenuated by metformin in obese rats[J]. Int J Cardiol, 2013, 165(3): 483 -487.

[12] 田风胜, 李振彬,王元松,等. 大黄对糖尿病大鼠血管病变保护机制的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(2): 63 -66.

[13] 文晖, 林善锬. 血管紧张素受体拮抗剂缬沙坦对糖尿病大鼠肾脏的保护作用[J]. 中华内科杂志, 1999, 2(3): 157 -159.

[14] Gandini R, Pampana E, Stefanini M, et al. Neck remodeling using the amplatzer vascular plug to facilitate endovascular repair of a contained abdominal aortic rupture[J]. J Endovasc Ther, 2013, 20(1): 20 -25.

[15] Kundumani-Sridharan V, Singh NK, Kumar S, et al. Nuclear factor of activated T cells c1 mediates p21-activated kinase 1 activation in the modulation of chemokine-induced human aortic smooth muscle cell factin stress fiber formation, migration, and proliferation and injury-induced vascular wall remodeling[J]. J Biol Chem, 2013, 288(30): 22150 -22162.

[16] Tieu BC, Ju X, Lee C, et al. Aortic adventitial fibroblasts participate in angiotensin-induced vascular wall inflammation and remodeling[J]. J Vasc Res, 2011, 48(3): 261 -272.

[17] Zhu BH, Guan YY. Contractile responses of diabetic rat aorta to phenylephrine at different stages of diabetic duration[J]. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22(5): 445 -449.

[18] Cheng X, Gao W, Dang Y, et al. Both ERK/MAPK and TGFbeta/Smad signaling pathways play a role in the kidney fibrosis of diabetic mice accelerated by blood glucose fluctuation[J]. J Diabetes Res, 2013: 463740.

[19] Yoshida M, Okubo N, Chosa N, et al. TGFbeta-operated growth inhibition and translineage commitment into smooth muscle cells of periodontal ligament-derived endothelial progenitor cells through Smad- and p38 MAPK-dependent signals[J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(7): 1062 -1074.

[20] Daroqui MC, Vazquez P, Bal de Kier Joffe E, et al. TGFbeta autocrine pathway and MAPK signaling promote cell invasiveness and *in vivo* mammary adenocarcinoma tumor progression[J]. Oncol Rep, 2012, 28(2): 567 -575.

(收稿:2014 -02 -24 修回:2014 -06 -20)

中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志 中国中西医结合杂志