doi:10.11659/jjssx.01E020061

·基础研究·

地龙提取物对2型糖尿病心肌病的治疗作用与机制探讨

陈梓健,蒋正午,高 乐,南 辉,衷 驰,黄 柘,高 红,贺气志 (长沙医学院基础医学院应用生物教研室,湖南 长沙 410200)

[摘 要] **目的** 探讨地龙提取物对2型糖尿病心肌病(DCM)的治疗作用与机制。**方法** 将50只雄性SD大鼠按照随机原则分成对照组、模型组、地龙干预组、开博通干预组和结合干预组,每组10只,其中后4组高糖高脂饮食,并腹腔注射链脲佐菌素(STZ)诱导2型DCM大鼠模型建立,对照组正常饮食。筛选并确认建模完成后,地龙干预组腹腔注射地龙提取物,开博通干预组腹腔注射开博通注射液,结合干预组腹腔注射前两者药物各一半有效剂量,对照组和模型组注射等量生理盐水。干预15周后所有大鼠行常规超声心动图检查,测定左心室射血分数(LVEF);通过酶联免疫吸附试验法测定血清血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)水平;行心导管检查测定左心室内压最大上升/下降速率(LV±dp/dtmax);迅速取出心肌组织,称湿重(HW);通过TUNEL凋亡染色方法测定各组大鼠心肌凋亡指数(AI)。**结果** 模型组大鼠LV±dp/dtmax及LVEF均明显低于对照组($P<0.05$),血糖、血清AngⅡ含量、HW及AI均明显高于对照组及地龙干预组($P<0.05$);结合干预组大鼠LV±dp/dtmax及LVEF均明显高于模型组($P<0.05$),血糖、血清AngⅡ水平、HW及AI均明显低于模型组($P<0.05$)。结合干预组血糖水平、AI低于开博通组($P<0.05$)。**结论** 地龙提取物可降低血糖水平和血清AngⅡ水平,减轻心肌组织间质纤维化,与开博通联合应用可有效改善DCM大鼠心肌功能。

[关键词] 地龙提取物;糖尿病心肌病;血管紧张素-Ⅱ;大鼠;心功能

[中图分类号] R587.2;R285.5 [文献标识码] A [收稿日期] 2020-01-12

Effect and mechanism of earthworm extract on treatment of type 2 diabetic cardiomyopathy

CHEN Zi-jian, JIANG Zheng-wu, GAO Le, NAN Hui, ZHONG Chi, HUANG Zhe, GAO Hong, HE Qi-zhi (Department of Applied Biology, School of Basic Medicine, Changsha Medical University, Changsha Hunan 410200, China)

Abstract: Objective To study the therapeutic effect and mechanism of earthworm extract on type 2 diabetic cardiomyopathy (DCM). **Methods** A total of 50 male SD rats were randomly divided into control group, model group, earthworm intervention group, captopril intervention group and combination intervention group, with 10 rats in each group. The control group was fed with the normal diet, while the other four groups were fed with high-sugar and high-fat diet and injected with streptozotocin (STZ) intraperitoneally to induce type 2 DCM rat model. After screening and confirming the model, extract of earthworm was intraperitoneally injected into the earthworm intervention group, captopril injection was intraperitoneally injected into the captopril intervention group, half dose of each drug was intraperitoneally injected into the combination intervention group, and the other groups were injected with the same amount of saline. After 15 weeks, left ventricular ejection fraction (LVEF) was detected by routine echocardiography, serum Angiotensin Ⅱ (AngⅡ) was detected by enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA), left ventricular pressure (LV + dp/dtmax) was determined by cardiac catheterization, and myocardial tissue was quickly removed and weighed. Myocardial apoptotic index (AI) was measured by TUNEL staining. **Results** The LV + dp/dtmax and LVEF in the model group were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$). The levels of blood glucose, serum AngⅡ, humid weight (HW) and AI in the model group were significantly higher than those in control group and earthworm intervention group ($P<0.05$). The LV + dp/dtmax and LVEF in the combination intervention group were significantly higher than those in the model group ($P<0.05$); while the levels of blood glucose, serum AngⅡ, HW and AI in the combination intervention group were lower than those in the model group ($P<0.05$). The levels of blood glucose and AI in the combination intervention group were lower than those in the captopril intervention group ($P<0.05$). **Conclusion** Earthworm extract can reduce the levels of blood glucose, serum AngⅡ and myocardial tissue fibrosis, and earthworm extract combined with captopril can effectively improve the myocardial function of DCM rats.

Keywords: earthworm extract; diabetic cardiomyopathy; angiotensin Ⅱ; rat; heart function

糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)作为糖尿病患者的严重并发症之一,会增加患者发生心力衰竭的风险,是患者病死的主要原因之一,如今临床上仍然缺乏有效的防治方法。有研究表明,在DCM的发病过程中,体内高糖环境与肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotension-aldosterone system, RAAS)

[基金项目] 长沙医学院创新训练项目(长医教[2019]61号-171)

[通信作者] 贺气志,E-mail:314190831@qq.com

扮演着重要的角色,由于体内高糖环境可导致大量活性氧的产生,RAAS 在心肌间质纤维化、心肌重塑方面具有重要作用[1-3]。地龙是我国重要的中药材之一,其提取物的主要成分为地龙蛋白。地龙提取物在临床上与西药联合治疗糖尿病并发症取得了显著疗效,可减轻糖尿病并发骨质疏松患者疼痛、促进糖尿病足患者创面愈合、改善糖尿病肾病患者肾小球硬化、改善糖尿病视网膜病变患者微血管循环等,但是对于 DCM 却鲜有应用[4-7]。本研究应用链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)诱导建立 2 型 DCM 大鼠模型,以地龙提取物及开博通进行干预治疗,采用常规超声心动图、TUNEL 凋亡染色法等评价该干预治疗方法对 2 型 DCM 大鼠心肌收缩功能的影响并探究其主要机制,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雄性 SD 大鼠 50 只,鼠龄 40 ~ 50 d,体质量 190 ~ 230 g,SPF 级,合格证号:SCXK(沪)2017-0005,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司;Acuson Sequoia 512 C 彩色多普勒超声诊断系统(配备 15 L8w-S线阵探头,频率为 12 ~ 14 MHz),购自德国 Simens公司;戊巴比妥钠购自 Sigma-Aldrich 公司;开博通注射液购自中美上海施贵宝制药有限公司;地龙提取物购自北京双鹤高科天然药物有限公司;链脲佐菌素(STZ)购自 Sigma-Aldrich 公司;血糖检测试纸购自约翰逊中国医疗设备有限公司;大鼠血清血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)检测试剂盒购自上海晶抗生物工程有限公司;TUNEL 试剂盒购自罗氏公司。

1.2 方法

将 50 只健康清洁级雄性 SD 大鼠随机分成对照组、模型组、地龙干预组、开博通干预组和结合干预组,每组 10 只,其中后 4 组高糖高脂饮食,并腹腔注射链脲佐菌素(STZ,15 mg/kg,QW ×4)以诱导 2 型 DCM 大鼠模型建立,对照组正常饮食。筛选时使用超声心动图检测心功能,使用血糖试纸检测血糖浓度,血糖≥16.7 mmol/L 且 - dp/dtmax≤5 250 mmHg/s 则认为 2 型DCM 模型建立成功。地龙干预组腹腔注射地龙提取物溶液(8 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)进行干预,开博通干预组腹腔注射开博通注射液(1 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)进行干预,结合干预组腹腔注射前两者药物各一半有效剂量,对照组和模型组注射与结合干预组等量生理盐水。于第 15 周末取尾静脉血,采用血糖试纸检测各组空腹血糖。采集腹主动脉血,3 000 r/min 离心 10 min 分离血清,采用酶联免疫吸附试验法检测血清 AngⅡ水平,具体方法参照试剂盒说明。将 1% 戊巴比妥钠按 20 mg/kg 行腹腔注射,经右颈动脉插管入左心室,测定等容舒张/收缩期左室内压上升/下降的最大速率(LV ± dp/dtmax),并以超声心动图测定左心室射血分数(left ventricular pressure,LVEF)。快速取出大鼠心肌组织并以冷等渗盐水洗净,滤纸吸净,称湿重(heart weight,HW)。取各组心肌组织切片,采用 TUNEL 凋亡染色方法染色,每个染色切片在 400 倍的光学显微镜下随机选取 5 个视野,记录所有心肌细胞数和凋亡细胞数,计算心肌细胞凋亡指数(apoptotic index,AI)。

1.3 统计学分析

实验数据用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,干预前后数据比较采用 t 检验,组间数据比较采用单因素方差分析,$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血糖、血清 AngⅡ水平比较

模型组大鼠血糖与血清 AngⅡ水平均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);地龙干预组大鼠血糖与血清 AngⅡ水平均低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$);开博通干预组大鼠血清 AngⅡ水平低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$);结合干预组大鼠血糖均低于模型组及开博通干预组,血清 AngⅡ水平低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。地龙组与结合干预组血糖和血清 AngⅡ水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 各组大鼠血糖、血清 AngⅡ水平比较($\bar{x} \pm s$,$n=10$)

组别	血糖(mmol/L)	血清 AngⅡ(mg/L)
对照组	5.24 ± 0.31 *	70.12 ± 5.7 *
模型组	23.16 ± 2.12	125.43 ± 15.68
开博通干预组	24.09 ± 1.89	94.42 ± 6.13 *
地龙干预组	17.34 ± 1.67 *	97.15 ± 9.14 *
结合干预组	18.11 ± 1.95 *#	96.61 ± 5.62 *

*:与模型组比较,$P<0.05$;#:与开博通组比较,$P<0.05$

2.2 各组大鼠心肌不同指标比较

模型组大鼠 HW 及 AI 均高于对照组,LV ± dp/dtmax 及 LVEF 均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);地龙干预组及结合干预组大鼠 HW 及 AI 均低于模型组,LV ± dp/dtmax 及 LVEF 均高于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$);开博通干预组大鼠 HW 低于模型组,LV ± dp/dtmax 及 LVEF 均高于模型

组,差异有统计学意义($P<0.05$);开博通干预组大鼠AI与模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);结合干预组大鼠AI低于开博通组,差异有统计学意义($P<0.05$);结合干预组与地龙干预组LV±dp/dtmax、HW、LVEF、AI比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表2。

表2 各组大鼠心肌不同指标比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	LV-dp/dtmax(mmHg/s)	LV+dp/dtmax(mmHg/s)	HW(g)	LVEF(%)	AI(%)
对照组	4 109.35±154.35*	4 587.24±166.63*	0.91±0.13*	81.52±5.36*	9.74±4.36*
模型组	2 842.73±143.41	3 023.63±155.27	1.12±0.21	71.96±6.74	26.36±6.85
开博通干预组	3 673.23±146.02*	3 853.36±145.16*	0.93±0.15*	83.51±5.72*	24.15±5.62
地龙干预组	3 473.34±135.62*	4 102.24±153.83*	0.96±0.16*	85.26±7.25*	16.73±4.62*
结合干预组	3 497.93±121.18*	4 272.62±153.72*	0.94±0.61*	87.73±4.98*	17.01±4.28*#

*:与模型组比较,$P<0.05$;#:与开博通干预组比较,$P<0.05$

3 讨论

随着当今社会人们生活方式和饮食习惯的变化,2型糖尿病(type 2 diabetes,T_2DM)成为了我国患病人数排名前三的慢性疾病之一。患者糖脂代谢紊乱、氧化应激等病理改变促使众多并发症发生。其中,DCM作为T_2DM并发症之一,不同于高血压性心脏病、冠状动脉粥样硬化性心脏病及瓣膜病变等的代谢性心肌疾病,其发病机制与治疗侧重点有所不同。

有研究表明,RAAS的功能异常可能是导致糖尿病或高血压患者心血管系统功能障碍的重要原因之一,并且与非糖尿病患者相比,糖尿病患者血清AngⅡ水平明显较高,其在加重早期糖尿病诱导的心肌肥大中起关键作用。根据近年来针对DCM的防治研究发现,中药葛芪合剂治疗DCM可使血中糖基化终末产物(AGEs)、血清AngⅡ水平下降,使左房室结构和收缩功能改善[8-10]。红景天苷、黄芪多糖可明显降低DCM大鼠白细胞介素-6和血清AngⅡ水平,减轻心肌损伤,具有心肌保护作用[11]。益气活血中药联合血管紧张素受体阻断剂(angiotensin receptor blockers,ARB)类药物能够显著改善DCM患者心室重构,提高心肌功能,其机制可能与其改善血液流变学、抑制TGD-β等表达有关[12]。同时,益气活血中药可抑制TGF-β/Smad通路,从而防治糖尿病引起的心肌纤维化[13]。虽然每种中药对DCM的治疗作用不相同,但可以肯定的是,降低血清AngⅡ水平是重要的研究方向。洪韫嘉等[14]利用HPLC法准确比较地龙与其他常见中药如丹参、黄芪等的血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)活性,认为地龙与其他中药相比含有较强的ACEI活性。本研究发现,经过15周干预后,地龙干预组大鼠血清AngⅡ水平及心脏HW明显低于模型组,地龙干预组大鼠心脏LVEF、LV±dp/dtmax均明显高于模型组,提示地龙提取物可通过抑制RAAS缓解DCM大鼠心肌间质纤维化。

在糖尿病及其并发症的发生和发展过程中,氧化应激起到关键作用[15-16]。其中产生氧化应激的主要原因是体内高血糖环境,血糖经线粒体电子传递链三羧酸循环(TCA循环)分解,产生大量超氧阴离子(O_2^-),从而通过减弱NO生物活性,减少醛糖还原酶含量,增强自氧化和O_2^-介导的氧化应激,促进AGEs与其受体结合,导致氧化应激损伤,从而损伤血管内皮细胞和心肌细胞[17-18]。有研究表明,地龙的抗氧化能力是维生素E的50倍,有利于O_2^-的清除和微血管破坏的修复[19-20]。曹兰秀等[21]和赖纪英等[22]发现,地龙提取物对提高胰岛素敏感度、改善胰岛素抵抗有一定疗效。蚓激酶为地龙活性成分之一,临床上常与阿司匹林结合用于心脑血管疾病的二级预防[23-24]。葛蜜成[25]发现,蚓激酶可有效改善血脂。本研究发现,地龙干预组大鼠血糖及AI明显低于模型组,提示地龙提取物可通过降低血糖减少DCM大鼠心肌细胞凋亡。

本研究发现,地龙提取物通过降低血清AngⅡ水平改善心肌间质纤维化。有研究表明地龙提取物具有强抗氧化性、降血糖作用,且未发现明显副作用[26]。考虑临床常用药开博通含有剧烈不良反应,患者难以耐受,本研究可为日后地龙提取物用于临床治疗DCM提供理论基础。本研究将地龙提取物与开博通注射液结合,进行共同干预,发现其与仅使用地龙提取物治疗DCM效果相近,推测可能与ACEI生物活性饱和有关,需作进一步研究。

本研究尚存在局限性,因为DCM的发病机制极为复杂,地龙提取物是否通过降低血糖及AngⅡ以外的其他机制防治DCM仍有待进一步研究。本研究经过15周干预后发现,地龙提取物的确对DCM大鼠心功能有显著改善,但本研究未进行地龙提取物不同浓度

的效果比较及地龙提取物与开博通注射液不同剂量配比的效果比较。今后应进一步优化给药时间、剂量及浓度,进行深入研究。

[参考文献]

[1] Alam U, Asghar O, Azmi S, et al. General aspects of diabetes mellitus [J]. Handb Clin Neurol, 2014, 126(2): 211 - 222. doi: 10.1016/B978 - 0 - 444 - 53480 - 4.00015 - 1.

[2] 李杰玉,张 静,林玉玲,等. 糖尿病心肌病患者过氧化物酶增殖物激活受体水平变化的研究[J]. 中国现代医学杂志,2019,29(21): 91 - 94. doi:10.3969/j.issn.1005 - 8982.2019.21.018.

[3] Kawakami T, Fujikawa A, Ishiyama Y, et al. Protective effect of composite earthworm powder against diabetic complications via increased fibrinolytic function and improvement of lipid metabolism in ZDF rats [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2016, 80(10): 1980 - 1989. doi: 10.1080/09168451.2016.1166932.

[4] 杨利芳. 观察复方地龙片联合阿法骨化醇软胶丸、碳酸钙咀嚼片治疗糖尿病合并骨质疏松的疗效[J]. 中西医结合心血管病电子杂志,2018,6(30): 178. doi: 10.16282/j.cnki.cn11 - 9336/r.2018.30.134.

[5] Goodarzi G, Qujeq D, Elmi MM, et al. The effect of the glycolipoprotein extract (G-90) from earthworm, eisenia foetida, on the wound healing process in alloxan-induced diabetic rats[J]. Cell Biochem Funct, 2016, 34(4): 242 - 249. doi: 10.1002/cbf.3186.

[6] 李 璐,王永香,王秀海,等. 地龙及其复方治疗糖尿病肾病的机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(7): 227 - 234. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.2017.07.0227.

[7] 杨 新,刘 欣,万 明,等. 地龙抗凝血活性物质研究进展[J]. 江汉大学学报(自然科学版),2017,45(1): 83 - 88. doi: 10.16389/j.cnki.cn42 - 1737/n.2017.01.014.

[8] Jia G, Whaley-Connell A, Sowers JR. Diabetic cardi-omyopathy: a hyperglycaemia- and insulin-resistance-ind-uced heart disease[J]. Diabetologia, 2018, 61(1): 21 - 28. doi: 10.1007/s00125 - 017 - 4390 - 4.

[9] Musial DC, Miranda-Ferreira R, Padin JF, et al. Function of AT1 and AT2 receptors in atrial contractions from spontaneous hypertensive and diabetic-induced streptozotocin rats[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2018, 45(12): 1274 - 1285. doi: 10.1111/1440 - 1681.13019.

[10] 徐 娜,白淑芝. 糖尿病心肌病发病机制的研究进展[J]. 医学综述,2019,25(3): 520 - 524. doi: 10.3969/j.issn.1006 - 2084.2019.03.021.

[11] 刘 巧,毕启瑞,谭宁华. 地龙蛋白多肽类成分的研究进展[J]. 中草药,2019,50(1): 252 - 261. doi: 10.7501/j.issn.0253 - 2670.2019.01.036.

[12] Grdisa M, Popovic M, Hrzenjak T. Glycolipoprotein extract (G-90) from earthworm Eisenia foetida exerts some antioxidative activity[J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2001, 128(4): 821 - 825. doi: 10.1016/S1095 - 6433(00)00323 - 8.

[13] 黄敬文,高宏伟,段剑飞. 地龙的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药导报,2018,24(12): 104 - 107. doi: 10.13862/j.cnki.cn43 - 1446/r.2018.12.034.

[14] 洪韫嘉,肖晓峰,陈 波,等. 用HPLC法从中药中筛选血管紧张素转化酶抑制剂[J]. 天然产物研究与开发,2008,20(4): 728 - 730. doi: 10.16333/j.1001 - 6880.2008.04.040.

[15] 黄 庆,李志武,马志国,等. 地龙的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(13): 220 - 226. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.2018.09.46.

[16] 任春久,张 瑶,崔为正,等. 氧化应激在2型糖尿病发病机制中的作用研究进展[J]. 生理学报,2013,65(6): 664 - 673. doi: 10.13294/j.aps.2013.06.008.

[17] 张利华,张 薇,韦广洪,等. α-亚麻酸对糖尿病大鼠炎症介质和氧化应激的影响[J]. 中国应用生理学杂志,2012,28(1): 64 - 67. doi: 10.13459/j.cnki.cjap.2012.01.017.

[18] 唐 鼎,涂 乾,李 娟,等. 药用地龙的药理作用和临床研究进展[J]. 中国药师,2015,24(6): 1016 - 1019. doi: 10.3969/j.issn.1008 - 049X.2015.06.044.

[19] 高 玲,赵建军,李艳艳,等. 地龙治疗缺血性脑卒中作用机制的现代研究进展[J]. 时珍国医国药,2019,30(2): 446 - 448. doi: 10.3969/j.issn.1008 - 0805.2019.02.066.

[20] 王佳茜,王少平,刘万卉. 地龙抗血栓肽分离研究[J]. 天津药学,2019,31(3): 1 - 4. doi: 10.3969/j.issn.1006 - 5687.2019.03.001.

[21] 曹兰秀,肖 玮. 地龙降压颗粒对高血压大鼠胰岛素抵抗的实验研究[J]. 中医药学刊,2005,23(3): 484 - 485. doi: 10.13193/j.archtcm.2005.03.101.caolx.048.

[22] 赖纪英,曾召平,胡 阳,等. 慢性心力衰竭患者胰岛素抵抗与认知功能障碍相关性的研究进展[J]. 中国心血管杂志,2015,20(2): 155 - 157. doi: 10.3969/j.issn.1007 - 5410.2015.02.019.

[23] 邓君启,王 侠,刘会芳,等. 蚓激酶联合氟伐他汀治疗糖尿病合并脑梗死的疗效及对患者神经功能的影响[J]. 检验医学与临床,2019,16(19): 2771 - 2774. doi: 10.3969/j.issn.1672 - 9455.2019.19.006.

[24] 金 茜,张 波,令狐金卿,等. 蚓激酶的临床应用[J]. 职业与健康,2017,33(20): 2867 - 2869. doi: 10.13329/j.cnki.zyyjk.2017.0855.

[25] 葛蜜成. 芪蛭地龙汤对气虚血瘀型缺血性脑卒中患者神经功能缺损程度血脂、血流变学指标的影响[J]. 中国中医药科技,2018,25(2): 266 - 268.

[26] 郭征兵. 中药地龙的药理作用及活性成分分析[J]. 当代医学,2017,23(19): 199 - 200. doi: 10.3969/j.issn.1009 - 4393.2017.19.208.

(编辑:左艳芳)