芍药苷对2型糖尿病模型大鼠心肌损伤的改善作用及机制研究Δ

李姗姗[1*]，田春雨[1,2,3#]，张国伟[1]，马雷雷[1]，李继安[2,3]，刘佳璇[2]，刘　颖[2]，李　爽[1]，李小龙[2]，沈佳欢[2]（1.华北理工大学药学院，河北 唐山　063210；2.华北理工大学中医学院，河北 唐山　063210；3.河北省中西医结合防治糖尿病及其并发症重点实验室，河北 唐山　063210）

中图分类号　R285　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2021）23-2846-08
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2021.23.06

摘　要　目的：研究芍药苷对2型糖尿病（T2DM）模型大鼠心肌损伤的改善作用及机制。方法：实验设置正常组、模型组、阳性对照组（二甲双胍 90 mg/kg）和芍药苷高、中、低剂量组（90、60、30 mg/kg），每组8只大鼠。除正常组外，其余各组大鼠均通过饲以高糖高脂饲料+腹腔注射链脲佐菌素（30 mg/kg）的方法建立T2DM模型。造模成功后，各给药组大鼠灌胃相应药液，正常组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水，每天1次，连续4周。测定大鼠体质量、空腹血糖值并进行口服葡萄糖耐量实验；测定大鼠血清中糖化血清蛋白（GSP）、总胆固醇（TC）、三酰甘油（TG）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、超氧化物歧化酶（SOD）、丙二醛（MDA）、肌酸激酶同工酶MB（CK-MB）、肌钙蛋白Ⅰ（cTnⅠ）水平，观察大鼠心肌组织病理形态学变化，检测大鼠心肌细胞凋亡指数，并分别采用免疫组化法和Western blot法检测大鼠心肌组织中B细胞淋巴瘤2（Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bax）、胱天蛋白酶3（caspase-3）蛋白表达水平。结果：与正常组比较，模型组大鼠体质量和血清中GSH-Px、SOD水平以及心肌组织中Bcl-2蛋白表达水平均显著降低（$P<0.01$），空腹血糖值、血糖曲线下面积、血清中生化指标（GSP、TC、TG、MDA、CK-MB、cTnⅠ）水平、心肌细胞凋亡指数和心肌组织中Bax、caspase-3蛋白表达水平均显著升高或增加（$P<0.05$或$P<0.01$）；心肌组织排列相对不规则，部分肌纤维断裂。与模型组比较，除芍药苷低剂量组大鼠体质量和血清中SOD、MDA水平以及心肌组织中Bax蛋白表达水平外，芍药苷各剂量组大鼠的上述指标水平均得到显著回调（$P<0.05$或$P<0.01$）。结论：芍药苷可调节T2DM模型大鼠的糖脂代谢、增强其抗氧化能力、抑制其心肌细胞凋亡，对其心肌损伤具有一定的改善作用；该作用的分子机制可能与上调心肌组织中Bcl-2蛋白表达，下调心肌组织中Bax、caspase-3蛋白表达有关。

关键词　芍药苷；2型糖尿病；心肌损伤；细胞凋亡

Study on Improvement Effects and Mechanism of Paeoniflorin on Myocardial Injury in Type 2 Diabetic Model Rats

LI Shanshan[1], TIAN Chunyu[1,2,3], ZHANG Guowei[1], MA Leilei[1], LI Ji'an[2,3], LIU Jiaxuan[2], LIU Ying[2], LI Shuang[1], LI Xiaolong[2], SHEN Jiahuan[2] (1. College of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Hebei Tangshan 063210, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, North China University of Science and Technology, Hebei Tangshan 063210, China; 3. Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine in Prevention and Treatment of Diabetes and Its Complications in Hebei Province, Hebei Tangshan 063210, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE: To study the improvement effects of paeoniflorin (PF) on myocardial injury in type 2 diabetes mellitus (T2DM) model rats and its mechanism. METHODS: The experiment was set up in the normal group, model group, positive control group (metformin 90 mg/kg), PF high-dose, medium-dose and low-dose groups (90, 60, 30 mg/kg), with 8 rats in each group. Except for normal group, other groups were given high-glucose and high-fat diet and intraperitoneal injection of streptozotocin (30 mg/kg) to induce T2DM model. After modeling, administration groups were given relevant medicine intragastrically, normal group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically, once a day, for consecutive 4 weeks. The body weight, fasting blood glucose and oral glucose tolerance were measured; serum levels of glycosylated serum protein (GSP), total cholesterol (TC), triacylglycerol (TG), glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), creatine kinase isoenzyme-MB (CK-MB) and troponin Ⅰ (cTnⅠ) were determined. The pathomorphological changes of myocardium were observed. The apoptosis index of rat cardiomyocytes was detected. The protein expression of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2 related X protein (Bax) and caspase-3 in rat myocardium were detected by immunohistochemistry and Western blot. RESULTS: Compared with normal group, the

Δ 基金项目：对发展中国家科技援助项目（No.KY201904005）；河北省自然科学基金资助项目（No.H2020209235）；河北省中医药管理局科研计划项目（No.2020219）；华北理工大学中医学院院内开放课题（No.ZY2021007）；华北理工大学大学生创新创业训练计划项目（No.X2019331）

＊硕士研究生。研究方向：药理学。E-mail：292312100@qq.com
＃通信作者：教授，硕士生导师，博士。研究方向：糖脂代谢性疾病的中医药治疗。E-mail：tcy4479@sina.com

body weight, serum levels of GSH-Px and SOD, protein expression of Bcl-2 in myocardium were decreased significantly in model group ($P<0.01$); while fasting blood glucose, area under blood glucose curve, serum levels of biochemical indexes (GSP, TC, TG, MDA, CK-MB, cTn Ⅰ), cardiomyocyte apoptosis index, protein expression of Bax and caspase-3 in myocardium were increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). The arrangement of myocardium was relatively irregular, and some muscle fibers were broken. Compared with model group, except for body weight, serum levels of SOD and MDA, the protein expression of Bax in myocardium in PF low-dose group, above indexes of PF groups were reversed significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: PF can regulate glycolipid metabolism, enhance antioxidant ability, inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve myocardial injury in T2DM model rats; the mechanism may be associated with increasing the protein expression of Bcl-2 and down-regulating the protein expression of Bax and caspase-3 in myocardium.

KEYWORDS Paeoniflorin; Type 2 diabetes mellitus; Myocardial injury; Apoptosis

糖尿病是以慢性高血糖为特征的代谢性疾病，其中2型糖尿病（type 2 diabetes mellitus，T2DM）作为最常见的糖尿病类型，占所有糖尿病病例的90%以上[1]。目前，糖尿病引发的各种并发症（如糖尿病诱发的心血管疾病）已成为糖尿病患者的主要死亡原因[2]。研究表明，T2DM可造成心肌胰岛素敏感性下降、心肌细胞氧化损伤，进而威胁心脏功能[3]；同时，T2DM也会加剧左心室肥厚的发展，增加心脏对缺血性损伤的易感性[4]。由于心肌损伤是许多心脏疾病的共同基础，故研发出可以防治T2DM诱导的心肌损伤的药物对于减缓T2DM相关心脏疾病的进展具有重要意义。

芍药苷是从芍药根中提取得到的一种单萜糖苷类化合物，是芍药根的主要活性成分之一[5-6]。其分子式为$C_{23}H_{28}O_{11}$，为无定形类白色粉末，具有吸湿性，熔点为196 ℃[7]。药动学研究显示，芍药苷具有易吸收、口服生物利用度高等特点[8]。药理学研究发现，芍药苷具有抗氧化、抗炎、免疫调节、扩张血管等药理作用[9]。此外，芍药苷被证明可以减轻心肌缺血再灌注损伤模型大鼠心脏的水肿、降低其心肌梗死发生率等[10-12]，具有较好的心肌保护作用。

T2DM诱导心肌损伤的机制尚未完全阐明，目前认为可能的损伤机制有氧化应激、内质网应激、炎症等[13]。有研究表明，在高血糖状态下促凋亡蛋白——B细胞淋巴瘤2（Bcl-2）相关X蛋白（Bax）可被活化，并且Bax/Bcl-2的比值会降低，从而促进心肌细胞的凋亡[14]。另有研究表明，在糖尿病状态下线粒体细胞色素C会被诱导释放，进而促使胱天蛋白酶3（caspase-3）激活，最终导致心肌细胞凋亡[15]。因此，本研究拟考察芍药苷对T2DM模型大鼠心肌损伤的保护作用，并从Bax/Bcl-2/caspase-3信号通路角度初步研究芍药苷改善T2DM模型大鼠心肌损伤的分子机制，为芍药苷的进一步开发利用提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有GA-3型稳益血糖仪（三诺生物传感股份有限公司），PowerEase Touch 350W型电泳仪（美国Thermo Fisher Scientific公司）、ChemiDoc TMC XRS+型凝胶成像系统（美国Bio-Rad公司），TP1020型组织脱水机、RM2245型组织切片机（德国Leica公司），M200PR0型酶标仪（瑞士Tecan公司），BX53型显微镜、SZX71型荧光体式显微成像系统（日本Olympus公司）。

1.2 主要药品与试剂

芍药苷原料药（批号D1016A，纯度＞98%）购自大连美仑生物技术有限公司；盐酸二甲双胍片（批号H20023370，规格为0.5 g/片）购自中美上海施贵宝制药有限公司；高糖高脂饲料（批号21031004）、链脲佐菌素（STZ，批号18883-66-4）均购自北京博爱港生物技术有限公司；糖化血清蛋白（GSP）、总胆固醇（TC）、三酰甘油（TG）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、丙二醛（MDA）、超氧化物歧化酶（SOD）检测试剂盒（批号分别为20210402、20200110、20200110、20210528、20210601、20210602）均购自南京建成生物工程研究所；肌酸激酶同工酶MB（CK-MB）酶联免疫吸附检测（ELISA）试剂盒（批号202104）购自江苏酶标生物科技有限公司；大鼠心肌肌钙蛋白Ⅰ（cTnⅠ）ELISA试剂盒（批号05/2021）购自厦门仑昌硕生物科技有限公司；苏木精、伊红染色试剂盒（批号分别为C210302、C201102）均购自珠海贝索生物技术有限公司；通用型免疫组化SP试剂盒（批号2131C0804）购自北京中杉金桥生物技术有限公司；TUNEL细胞凋亡检测试剂盒、BCA蛋白检测试剂盒（批号分别为110919201008、092820210207）均购自上海碧云天生物技术有限公司；兔源β-肌动蛋白（β-actin）多克隆抗体（批号9100026001）购自武汉三鹰生物技术有限公司；兔源Bax单克隆抗体、兔源Bcl-2单克隆抗体、兔源caspase-3多克隆抗体（批号分别为GR3325129-1、GR3275117-8、GR224831-1）均购自美国Abcam公司；辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗兔/小鼠免疫球蛋白G（IgG）二抗（批号BST13J17B16G56）购自武汉博士德生物工程有限公司；其余试剂均为实验室常用规格，水为双蒸水。

1.3 动物

本研究所用的动物为SPF级健康SD雄性大鼠，共60只，鼠龄为4周龄，体质量为115～125 g，购自北京华

阜康生物科技股份有限公司，实验动物生产许可证号为SCXK（京）2020-0004。大鼠购入后饲养于温度22～25 ℃、相对湿度40%～60%的动物房中。本研究中动物实验方案经华北理工大学实验动物伦理委员会审查批准后实施（批准号为LX2019084）。

2 方法

2.1 T2DM大鼠模型的建立

将60只大鼠适应性喂养1周后分为正常组（n=8）和造模组（n=52）。正常组大鼠饲以正常饲料，造模组大鼠饲以高糖高脂饲料。饲养4周后，造模组大鼠一次性腹腔注射30 mg/kg STZ溶液（pH=4.4），正常组大鼠腹腔注射等体积的生理盐水。3 d后，检测造模组大鼠的空腹血糖值，以空腹血糖值≥11.1 mmol/L为判断T2DM模型构建成功的标准[16]。结果，本研究的成模率约为92%（共有48只大鼠建模成功）。

2.2 动物分组与给药

将造模成功的40只大鼠按随机数表法随机分为模型组、阳性对照组（二甲双胍90 mg/kg[16]）和芍药苷高、中、低剂量组（90、60、30 mg/kg[17]），每组8只。正常组和模型组大鼠灌胃生理盐水，各给药组大鼠灌胃相应药液（均以生理盐水为溶剂溶解），灌胃体积均为7.5 mL/kg，每天1次，连续4周。灌药期间正常组大鼠继续饲以正常饲料，其余各组大鼠均继续饲以高糖高脂饲料。

2.3 体质量、空腹血糖值测定和口服葡萄糖耐量实验

在灌胃前及灌胃第1、2、3、4周时，分别测定大鼠体质量。在灌胃前和灌胃第4周时，分别测定大鼠的空腹血糖值（空腹血糖值测定前，大鼠先禁食不禁水12 h）。在第4周灌胃结束后进行大鼠口服葡萄糖耐量实验：按2 g/kg的剂量灌胃大鼠50%葡萄糖注射液，分别于灌胃葡萄糖注射液后第0、15、30、45、60、120 min时测定大鼠血糖值，并计算血糖的曲线下面积（AUC）：AUC=[（血糖值$_{0\ min}$+血糖值$_{30\ min}$）×15/60+（血糖值$_{30\ min}$+血糖值$_{60\ min}$）×15/60+（血糖值$_{60\ min}$+血糖值$_{120\ min}$）×30/60][18]。

2.4 样本取材及处理

口服葡萄糖耐量实验后，于大鼠腹主动脉采血5 mL，然后以3 000 r/min离心血样10 min，收集血清，于－80 ℃保存，备用。取血后，将大鼠处死，取其心肌组织，以冰生理盐水冲洗后用滤纸吸干。将一部分心肌组织置于4%多聚甲醛溶液中浸泡24 h；将另一部分心肌组织放入20%蔗糖溶液中；将剩余的心肌组织迅速置于液氮中保存，然后转至－80 ℃冰箱中长期保存，备用。

2.5 血清中生化指标测定

取“2.4”项下血清，分别测定血清中血脂指标（GSP、TC、TG）、氧化应激相关指标（GSH-Px、SOD、MDA）和心肌损伤特异性诊断指标（CK-MB、cTnⅠ）的水平。上述指标的测定均按照对应试剂盒说明书方法操作。

2.6 心肌组织病理形态学观察

采用苏木精-伊红（HE）染色法进行观察。取“2.4”项下于4%多聚甲醛溶液中浸泡24 h的大鼠心肌组织，常规制备石蜡切片（厚度为4 μm），然后行常规HE染色。将染色后的组织切片置于显微镜下观察（心肌细胞核呈蓝色、细胞质呈红色）。

2.7 心肌细胞凋亡指数测定

每组随机选取3个样本，采用TUNEL染色法进行测定。取“2.4”项下于20%蔗糖溶液中保存的大鼠心肌组织，用OTC包埋剂包埋后冰冻切片，将切片用4%多聚甲醛溶液固定30 min；用磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤2次，加入含0.5% Triton X-100的PBS，于室温孵育5 min；用PBS洗涤2次，滴加TUNEL检测液，于37 ℃避光孵育60 min；用DAPI封片，然后置于荧光体式显微镜下观察（凋亡细胞呈绿色荧光，细胞核呈蓝色荧光）。采用Image J 1.46r软件记录每个视野中的凋亡细胞数量和总细胞数量，计算心肌细胞凋亡指数：凋亡指数（%）=（凋亡细胞数/细胞总数）×100%[19]。

2.8 心肌组织中Bax、Bcl-2、caspase-3蛋白表达测定

2.8.1 免疫组化法测定 每组随机选取3个样本进行实验。按“2.6”项下方法制备石蜡切片，以二甲苯和梯度乙醇进行脱蜡和水合后，滴加EDTA溶液进行抗原修复；滴加3%过氧化氢溶液，于室温静置15 min；用PBS冲洗3次、每次5 min，然后加入Bax一抗（稀释比例1∶1 000）、Bcl-2一抗（稀释比例1∶2 000）、caspase-3一抗（稀释比例1∶5 000），于4 ℃孵育过夜；滴加HRP标记的山羊抗兔/小鼠IgG二抗，于室温孵育10 min；用PBS冲洗3次、每次5 min，进行DAB显色，然后以苏木精复染；用水冲洗后，再进行脱水、封片，然后将组织切片置于显微镜下进行观察（目标蛋白的阳性表达呈棕褐色），并采用Image J 1.46r软件分析各蛋白的平均光密度值（平均光密度值越大，表示蛋白表达水平越高）。

2.8.2 Western blot法测定 每组随机选取3个样本进行实验。取“2.4”项下冻存的大鼠心肌组织，加入RIPA裂解液提取组织中的总蛋白，按照BCA蛋白定量试剂盒说明书方法测定蛋白的质量浓度后，将蛋白在100 ℃条件下加热变性。取变性后蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（分离胶电压80 V，浓缩胶电压120 V，电泳时间105 min），然后电转至聚偏二氟乙烯膜上（电流220 mA，转膜时间1 h），加入牛血清白蛋白（BSA）封闭液封闭2 h；用TBST洗膜3次、每次10 min，分别加入β-actin一抗（稀释比例1∶1 000）、Bax一抗（稀释比例1∶1 000）、Bcl-2一抗（稀释比例1∶2 000）和caspase-3一抗（稀释比例1∶5 000），于4 ℃孵育过夜；用TBST洗膜3次、每次10 min，加入HRP标记的山羊抗兔/小鼠IgG二抗（稀释比例1∶10 000），于室温孵育2 h；用超敏ECL化学发光试剂显影、曝光。使用Image Lab 5.2.1软件测定各蛋白条带的灰度值，以目的蛋白条带灰度值与内参β-actin蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。

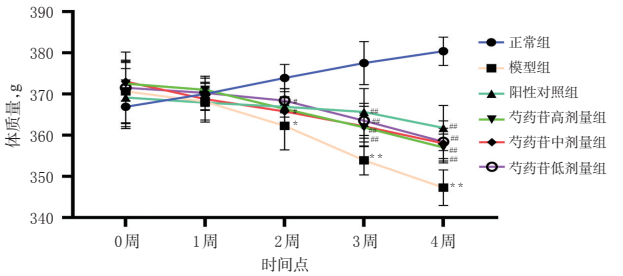
2.9 统计学方法

采用SPSS 25.0软件进行统计分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析；若方差齐时两组间比较采用LSD检验，若方差不齐时两组间比较采用Tamhane's检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 大鼠体质量测定结果

在实验期间，正常组大鼠的体质量呈上升趋势，而模型组和各给药组大鼠的体质量均呈下降趋势。灌胃前和灌胃第1周时，各组大鼠的体质量差异均无统计学意义（$P>0.05$）。灌胃第2周时，与正常组比较，模型组大鼠体质量显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，阳性对照组和芍药苷高剂量组大鼠体质量均显著升高（$P<0.05$）。灌胃第3、4周时，与正常组比较，模型组大鼠体质量显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组大鼠体质量均显著升高（$P<0.01$）。各组大鼠的体质量测定结果见图1。



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

Note：vs. normal group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；vs. model group，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$

图1 各组大鼠的体质量测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Fig 1 Body weight of rats in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

3.2 空腹血糖值和血糖AUC测定结果

与正常组比较，模型组大鼠灌胃前和灌胃第4周时的空腹血糖值均显著升高（$P<0.01$），血糖AUC显著增大（$P<0.01$）。灌胃第4周时，与模型组比较，阳性对照组和芍药苷高、中剂量组大鼠的空腹血糖值均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），芍药苷高、中、低剂量组大鼠的血糖AUC均显著减小（$P<0.05$或$P<0.01$）。各组大鼠的空腹血糖值和血糖AUC测定结果见表1。

3.3 血清中GSP、TC、TG水平测定结果

与正常组比较，模型组大鼠血清中GSP、TC、TG水平均显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组大鼠血清中上述指标水平均显著降低（$P<0.01$）。各组大鼠血清中GSP、TC、TG水平测定结果见表2。

3.4 血清中GSH-Px、SOD、MDA水平测定结果

与正常组比较，模型组大鼠血清中GSH-Px、SOD水平均显著降低（$P<0.01$），MDA水平显著升高（$P<0.01$）。与模型组比较，各给药组大鼠血清中GSH-Px、SOD（除芍药苷低剂量组外）水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），血清中MDA水平（除芍药苷低剂量组外）均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。各组大鼠血清中GSH-Px、SOD、MDA水平测定结果见表3。

表1 各组大鼠的空腹血糖值和血糖AUC测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Tab 1 FBG and AUC of blood glucose of rats in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	空腹血糖值，mmol/L		血糖AUC
	灌胃前	灌胃第4周	
正常组	4.26±0.37	4.29±0.43	9.47±0.87
模型组	25.23±2.40**	25.41±2.14**	50.38±1.64**
阳性对照组	25.79±1.32	16.50±1.52$^{\#\#}$	47.17±3.48
芍药苷高剂量组	25.20±1.43	21.70±1.95$^{\#\#}$	41.29±1.60$^{\#\#}$
芍药苷中剂量组	24.73±2.29	22.30±1.93$^{\#}$	45.80±2.90$^{\#\#}$
芍药苷低剂量组	25.35±2.56	24.55±2.22	46.04±3.45$^{\#}$

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

Note：vs. normal group，$^{**}P<0.01$；vs. model group，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$

表2 各组大鼠血清中GSP、TC、TG水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$，mmol/L）

Tab 2 Serum levels of GSP，TC and TG of rats in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=8$，mmol/L）

组别	GSP	TC	TG
正常组	0.13±0.01	0.31±0.03	1.12±0.11
模型组	1.55±0.07**	2.42±0.22**	2.73±0.14**
阳性对照组	0.74±0.07$^{\#\#}$	1.38±0.12$^{\#\#}$	1.49±0.15$^{\#\#}$
芍药苷高剂量组	0.47±0.04$^{\#\#}$	1.27±0.11$^{\#\#}$	1.25±0.04$^{\#\#}$
芍药苷中剂量组	0.41±0.04$^{\#\#}$	1.55±0.16$^{\#\#}$	1.45±0.14$^{\#\#}$
芍药苷低剂量组	0.57±0.05$^{\#\#}$	1.86±0.15$^{\#\#}$	1.75±0.33$^{\#\#}$

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

Note：vs. normal group，$^{**}P<0.01$；vs. model group，$^{\#\#}P<0.01$

表3 各组大鼠血清中GSH-Px、SOD、MDA水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Tab 3 Serum levels of GSH-Px，SOD and MDA of rats in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	GSH-Px，U/mL	SOD，U/mL	MDA，nmol/mL
正常组	875.69±55.64	80.96±4.09	4.12±1.01
模型组	664.60±27.92**	51.02±4.63**	12.09±1.01**
阳性对照组	852.74±38.83$^{\#\#}$	85.29±2.46$^{\#\#}$	7.36±2.09$^{\#\#}$
芍药苷高剂量组	843.84±57.95$^{\#\#}$	67.99±2.70$^{\#\#}$	6.89±0.89$^{\#\#}$
芍药苷中剂量组	789.56±32.69$^{\#\#}$	61.24±3.81$^{\#\#}$	8.92±0.69$^{\#}$
芍药苷低剂量组	762.68±69.21$^{\#}$	57.51±5.61	12.03±0.68

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

Note：vs. normal group，$^{**}P<0.01$；vs. model group，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$

3.5 血清中CK-MB、cTnⅠ水平测定结果

与正常组比较，模型组大鼠血清中CK-MB、cTnⅠ水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组大鼠血清中CK-MB水平以及芍药苷各剂量组大鼠血清中cTnⅠ水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。各组大鼠血清中CK-MB、cTnⅠ水平测定结果见表4。

表4　各组大鼠血清中CK-MB、cTnⅠ水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，n=8，ng/mL）

Tab 4　Serum levels of CK-MB and cTnⅠ of rats in each group（$\bar{x}\pm s$，n=8，ng/mL）

组别	CK-MB	cTnⅠ
正常组	4.63±0.27	1.37±0.09
模型组	5.64±0.66**	1.66±0.12*
阳性对照组	4.63±0.27##	1.48±0.11
芍药苷高剂量组	4.75±0.18##	1.28±0.20##
芍药苷中剂量组	4.85±0.37#	1.38±0.15#
芍药苷低剂量组	4.94±0.31#	1.36±0.12#

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

Note：vs. normal group，*P<0.05，**P<0.01；vs. model group，#P<0.05，##P<0.01

3.6　心肌组织病理形态学观察结果

正常组大鼠心肌组织排列规则，心肌细胞完整，无肌纤维断裂。与正常组比较，模型组大鼠心肌组织排列相对不规则，肌束间隔增宽，部分肌纤维断裂。与模型组比较，阳性对照组和芍药苷高剂量组大鼠心肌组织病理形态学变化明显改善，心肌组织排列较为整齐；芍药苷中、低剂量组大鼠肌束间隔增宽的幅度明显减小，部分肌纤维断裂。各组大鼠心肌组织病理形态学显微图见图2。

3.7　心肌细胞凋亡指数测定结果

与正常组比较，模型组大鼠心肌细胞凋亡指数显著升高（P<0.01）；与模型组比较，各给药组大鼠心肌细胞凋亡指数均显著降低（P<0.01）。各组大鼠心肌细胞凋亡情况显微图见图3，凋亡指数测定结果见表5。

3.8　心肌组织中Bax、Bcl-2、caspase-3蛋白表达测定结果

3.8.1　免疫组化实验结果　与正常组比较，模型组大鼠心肌组织中Bax、caspase-3蛋白的平均光密度值均显著升高（P<0.01），Bcl-2蛋白的平均光密度值显著降低（P<0.01）。与模型组比较，各给药组大鼠心肌组织中Bax、caspase-3蛋白的平均光密度值均显著降低（P<0.05或P<0.01），Bcl-2蛋白的平均光密度值均显著升高（P<0.05或P<0.01）。各组大鼠心肌组织中Bax、Bcl-2、caspase-3蛋白表达的免疫组化图见图4，平均光密度值测定结果见表6。

3.8.2　Western blot实验结果　与正常组比较，模型组大鼠心肌组织中Bax、caspase-3蛋白表达水平均显著升高（P<0.01），Bcl-2蛋白表达水平显著降低（P<0.01）。与模型组比较，各给药组大鼠心肌组织中Bax（除芍药苷低剂量组外）、caspase-3蛋白表达水平均显著降低（P<0.05或P<0.01），Bcl-2蛋白表达水平均显著升高（P<0.05或P<0.01）。各组大鼠心肌组织中Bax、Bcl-2、caspase-3蛋白表达的电泳图见图5，蛋白表达水平测定结果见表7。

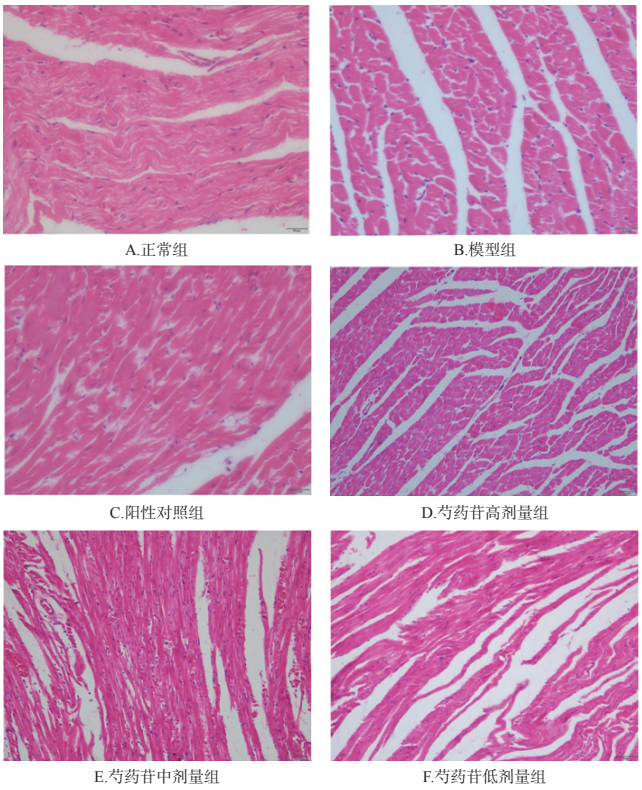


图2　各组大鼠心肌组织病理形态学显微图（HE染色，×200）

Fig 2　Micrographs of pathological morphology of myocardium of rats in each group（HE staining，×200）

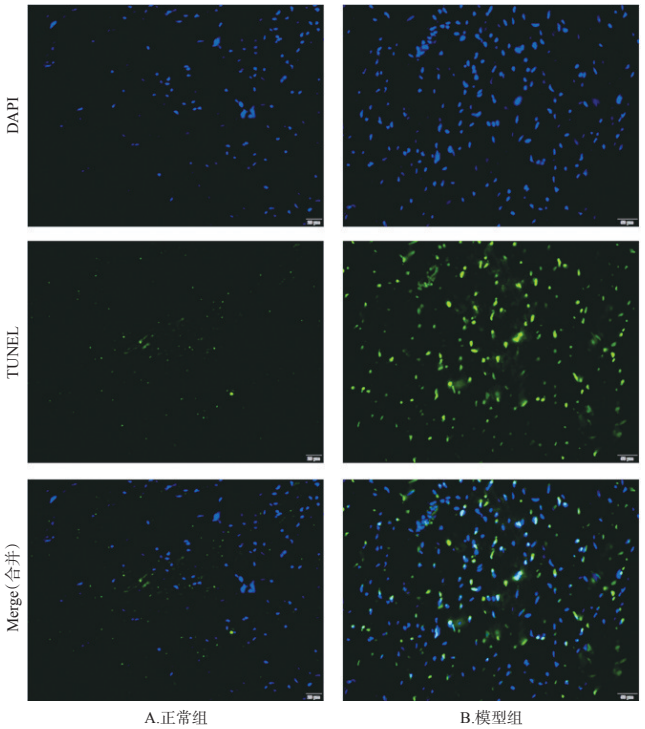
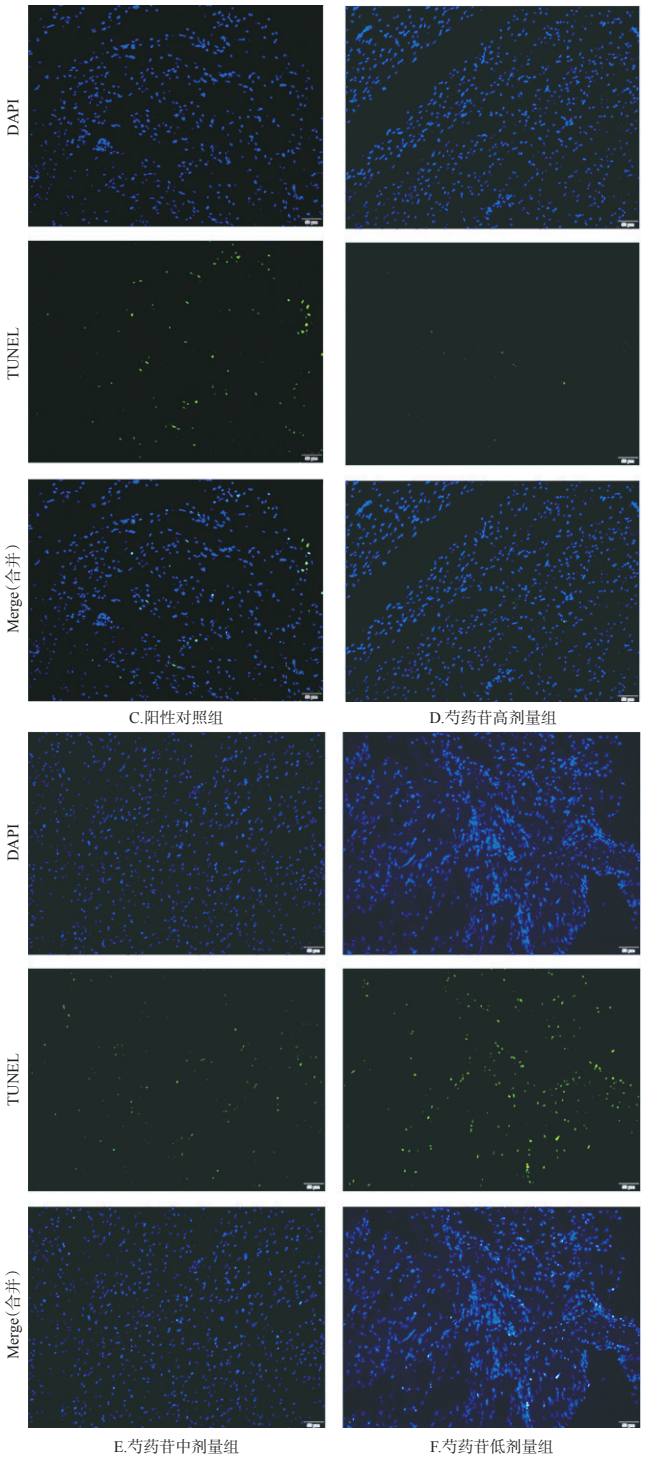


图3　各组大鼠心肌细胞凋亡情况显微图（TUNEL染色，×200）

Fig 3　Micrographs of cardiomyocyte apoptosis of rats in each group（TUNEL staining，×200）



续图3

Continued fig 3

表5　各组大鼠心肌细胞凋亡指数测定结果($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab 5　Cardiomyocyte apoptosis index of rats in each group($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	凋亡指数,%	组别	凋亡指数,%
正常组	5.98±0.19	芍药苷高剂量组	5.98±0.45$^{\#\#}$
模型组	19.12±2.29**	芍药苷中剂量组	13.40±0.90$^{\#\#}$
阳性对照组	12.36±1.66$^{\#\#}$	芍药苷低剂量组	14.19±0.85$^{\#\#}$

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

Note: vs. normal group, $^{**}P<0.01$; vs. model group, $^{\#\#}P<0.01$

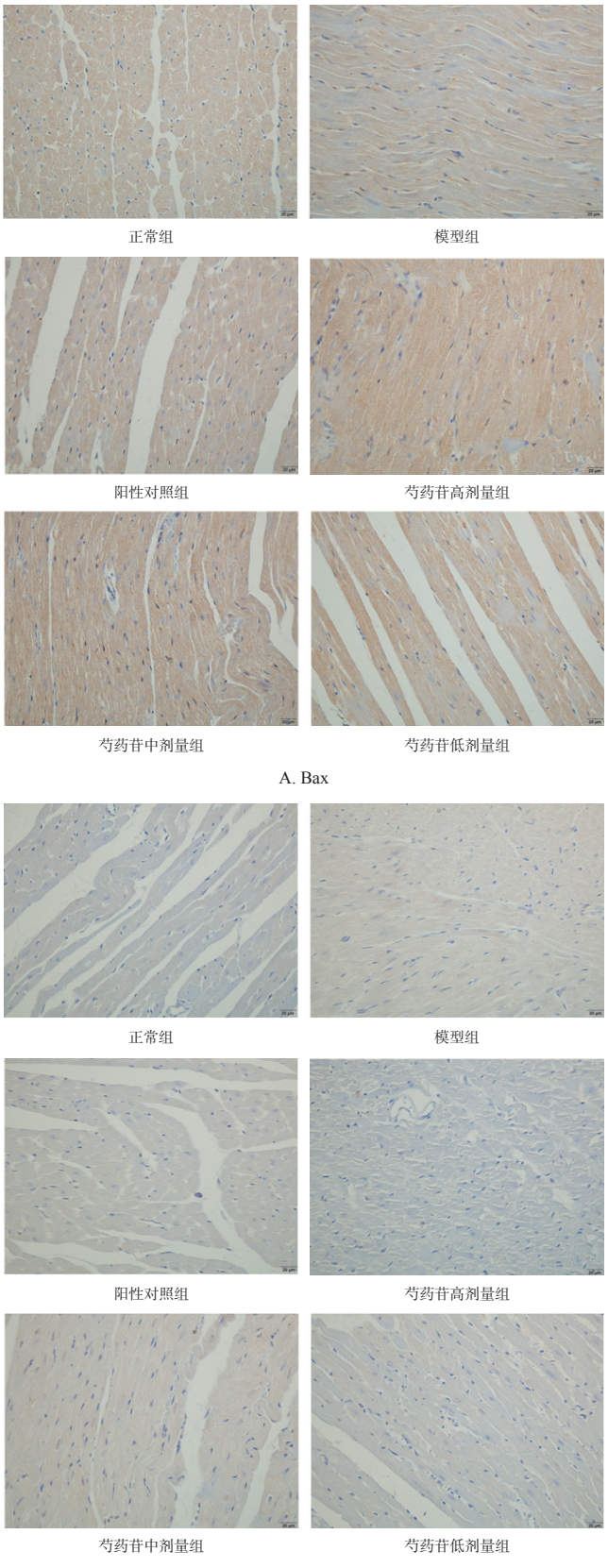
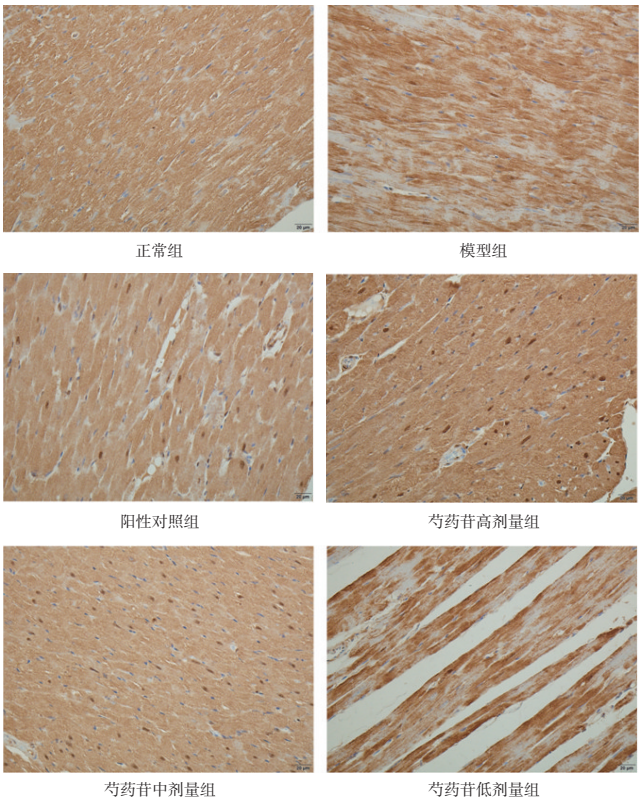


图4　各组大鼠心肌组织中Bax、Bcl-2、caspase-3蛋白表达的免疫组化图(×400)

Fig 4　Immunohistochemical graphs of protein expression of Bax, Bcl-2 and caspase-3 in myocardium of rats in each group(×400)



C. caspase-3

续图4

Continued fig 4

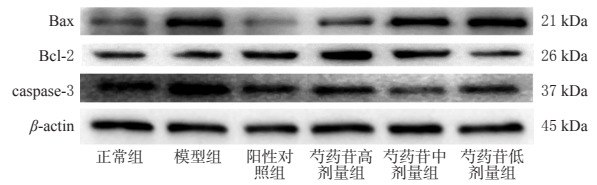


图5　各组大鼠心肌组织中Bax、Bcl-2、caspase-3蛋白表达的电泳图

Fig 5　Electrophoretic graphs of protein expression of Bax, Bcl-2 and caspase-3 in myocardium of rats in each group

表6　各组大鼠心肌组织中Bax、Bcl-2、caspase-3蛋白的平均光密度值测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Tab 6　Average optical density of Bax, Bcl-2 and caspase-3 protein in myocardium of rats in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	Bax	Bcl-2	caspase-3
正常组	0.021 9±0.008 8	0.039 9±0.002 4	0.019 5±0.005 7
模型组	0.119 5±0.011 2**	0.014 7±0.005 5**	0.047 6±0.006 0**
阳性对照组	0.029 0±0.019 7##	0.039 6±0.015 4##	0.036 3±0.007 8##
芍药苷高剂量组	0.030 8±0.005 6##	0.035 4±0.007 3#	0.038 0±0.009 3##
芍药苷中剂量组	0.038 0±0.021 6##	0.034 5±0.013 3#	0.046 2±0.016 1#
芍药苷低剂量组	0.058 7±0.021 8##	0.034 2±0.010 1#	0.043 3±0.008 5#

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

Note：vs. normal group，**$P<0.01$；vs. model group，#$P<0.05$，##$P<0.01$

表7　各组大鼠心肌组织中Bax、Bcl-2、caspase-3蛋白表达水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Tab 7　Protein expression of Bax, Bcl-2 and caspase-3 in myocardium of rats in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	Bax/β-actin	Bcl-2/β-actin	caspase-3/β-actin
正常组	2.29±0.13	4.68±0.55	2.86±1.20
模型组	5.22±0.09**	2.98±0.16**	6.68±1.16**
阳性对照组	2.86±1.24##	4.42±0.40##	3.52±1.25##
芍药苷高剂量组	3.23±0.74##	4.48±0.66#	4.30±1.18##
芍药苷中剂量组	3.42±1.03##	4.34±0.60#	4.51±1.09#
芍药苷低剂量组	5.14±0.56	4.00±0.52#	4.68±0.19#

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

Note：vs. normal group，**$P<0.01$；vs. model group，#$P<0.05$，##$P<0.01$

4　讨论

T2DM的主要临床症状是高血糖和胰岛素抵抗，而胰岛素分泌功能异常可能会促进心血管病变，造成心肌损伤，进而对心脏功能产生有害影响[20]。二甲双胍作为传统的降糖基础药物，可使糖尿病相关并发症的风险降低32%，也可通过抑制心肌细胞凋亡来介导对心肌组织的保护作用[20-21]。因此，本研究以二甲双胍为阳性对照药物。本研究结果显示，芍药苷可明显改善T2DM模型大鼠的血糖（如空腹血糖值、血糖AUC水平）、血脂（如TC、TG等）紊乱，表明其具有调节糖脂代谢的作用。

心肌细胞凋亡是导致心脏重塑和心力衰竭的主要原因；同时，由于心肌细胞再生能力有限，其损伤后会损害心脏的结构和功能[22]。有研究表明，心肌细胞凋亡在心肌损伤的进展中起着至关重要的作用——心肌细胞凋亡可以阻止T2DM引起的心肌损伤的进展[23]。本研究中TUNEL染色结果显示，芍药苷能够显著减少T2DM模型大鼠心肌细胞凋亡；氧化应激相关指标测定结果显示，芍药苷能够显著升高T2DM模型大鼠血清中GSH-Px、SOD水平，降低其血清中MDA水平，表明芍药苷可抑制氧化应激反应，从而对心肌组织产生保护作用。

CK-MB、cTnⅠ主要分布于心肌细胞中，是心肌疾病的常见诊断指标；特别是CK-MB，其作为心肌损伤的特异性指标，当心肌组织受损时，细胞膜的通透性增加，导致血清中CK-MB水平升高[24]。本研究结果显示，芍药苷能够降低T2DM模型大鼠血清中CK-MB、cTnⅠ水平；同时，HE染色结果显示，与模型组比较，芍药苷各剂量组大鼠心肌组织的病理形态学变化均得到不同程度改善，表明芍药苷对T2DM模型大鼠的心肌损伤具有抑制作用。

在高糖高脂环境下，心肌细胞会产生大量的晚期糖基化终末产物、聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶等，诱导细胞发生异常凋亡[25]。Bcl-2和Bax是调控细胞凋亡的关键因子：Bax过表达可促进细胞凋亡；而Bcl-2可与Bax

形成二聚体，抑制Bax的表达，从而抑制细胞凋亡[26-27]。caspase-3是caspase家族蛋白中细胞凋亡的效应者，当caspase-3被激活后，可进一步促进细胞凋亡的进程[28]。本研究通过免疫组化和Western blot实验发现，芍药苷可下调T2DM模型大鼠心肌组织中Bax、caspase-3蛋白的表达，上调T2DM模型大鼠心肌组织中Bcl-2蛋白的表达，表明芍药苷可通过调控凋亡相关蛋白的表达来改善T2DM模型大鼠的心肌损伤。

综上所述，芍药苷可调节T2DM模型大鼠的糖脂代谢、增强其抗氧化能力、抑制其心肌细胞凋亡，对其心肌损伤具有一定的改善作用；该作用的分子机制可能与上调心肌组织中Bcl-2蛋白表达，下调心肌组织中Bax、caspase-3蛋白表达有关。

参考文献

[1] 赵雨，吕家顺，刘向东，等.糖尿病心肌病引起的心脏结构和功能改变的研究进展[J].医学研究杂志，2019，48(6)：165-167.

[2] CARRACHER A M，MARATHE P H，CLOSE K L. International diabetes federation 2017[J]. J Diabetes，2018，10(5)：353-356.

[3] RAINS J L，JAIN S K. Oxidative stress，insulin signaling，and diabetes[J]. Free Radic Biol Med，2011，50(5)：567-575.

[4] BOUDINA S，ABEL E D. Diabetic cardiomyopathy，causes and effects[J]. Rev Endocr Metab Disord，2010，11(1)：31-39.

[5] 冯伟科，郭平.芍药苷药理作用研究进展[J].山东中医杂志，2019，38(1)：105-108.

[6] WU S H，WU D G，CHEN Y W. Chemical constituents and bioactivities of plants from the Genus paeonia[J]. Chem Biodivers，2010，41(1)：90-104.

[7] 吴晓芳，易建华，韩晶.芍药苷对缺氧性损伤的保护作用及其机制研究[J].中国中西医结合杂志，2017，37(8)：1020-1023.

[8] ZHOU Y X，GONG X H，ZHANG H，et al. A review on the pharmacokinetics of paeoniflorin and its anti-inflammatory and immunomodulatory effects[J]. Biomed Pharmacother，2020，130(3)：110505.

[9] WANG J S，HUANG Y，ZHANG S，et al. A protective role of paeoniflorin in fluctuant hyperglycemia-induced vascular endothelial injuries through antioxidative and anti-inflammatory effects and reduction of PKC β_1[J]. Oxid Med Cell Longev，2019，2019(11)：1-11.

[10] WU W，QIU C，FENG X，et al. Protective effect of paeoniflorin on acute cerebral infarction in rats[J]. Curr Pharm Biotechnol，2020，21(8)：702-709.

[11] 王微，刘畅，应达时，等.芍药苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[J].中药药理与临床，2016，32(6)：52-56.

[12] 苟丽琼，姜媛媛，吴一超，等.芍药有效成分与药理活性研究进展[J].基因组学与应用生物学，2018，37(9)：287-294.

[13] DILLMANN W H. Diabetic cardiomyopathy：what is it and can it be fixed?[J]. Circ Res，2019，124(8)：1160-1162.

[14] IVANOVIC-MATIC S，BOGOJEVIC D，MARTINOVIC V，et al. Catalase inhibition in diabetic rats potentiates DNA damage and apoptotic cell death setting the stage for cardiomyopathy[J]. J Physiol Biochem，2014，70(4)：947-959.

[15] CAI L，LI W，WANG G，et al. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium：mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway[J]. Diabetes，2002，51(6)：1938-1948.

[16] 张国伟，陈新新，田春雨，等.盐地碱蓬对2型糖尿病大鼠胰腺Bax、Bcl-2、caspase-3蛋白表达的影响[J].天然产物研究与开发，2020，32(10)：1644-1651.

[17] WU F，YE B，WU X，et al. Paeoniflorin on rat myocardial ischemia reperfusion injury of protection and mechanism research[J]. Pharmacology，2019，105(5/6)：281-288.

[18] 张晓英，张致英，王鹏翔，等.绿萝花提取物对α-葡萄糖苷酶的抑制及降血糖作用[J].中药药理与临床，2014，30(3)：107-111.

[19] 张月红，林辉，徐大量，等.丹参饮提取物A通过PI3K-Akt信号通路抗细胞凋亡机制的研究[J].中药新药与临床药理，2017，28(4)：473-477.

[20] 颜贵英，胡松，毛拥军.糖尿病心肌病中微血管病变的研究进展[J].中国循环杂志，2015，30(5)：505-507.

[21] Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes(UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group[J]. Lancet，1998，352(9131)：854-865.

[22] 赵欣梅，张玉彬.细胞凋亡与心力衰竭[J].药学研究，2017，36(8)：467-470.

[23] BATTIPROLU P K，LOPEZ-CRISOSTO C，WANG Z V，et al. Diabetic cardiomyopathy and metabolic remodeling of the heart[J]. Life Sci，2013，92(11)：609-615.

[24] 付孝清，黎昌宏，谭杰. Rho激酶抑制剂联合呋塞米及螺内酯对急性左心衰患者心功能及血清AST、LDH、CK-MB水平的影响[J].心血管康复医学杂志，2019，28(4)：461-466.

[25] GAROFALO T，MANGANELLI V，GRASSO M，et al. Role of mitochondrial raft-like microdomains in the regulation of cell apoptosis[J]. Apoptosis，2015，20(5)：621-634.

[26] 尹智勇，杨俊元，祁宏. Bcl-2蛋白质家族调控细胞凋亡机制的研究进展[J].信阳师范学院学报(自然科学版)，2017，30(2)：340-344.

[27] 刘佳玲，黄林生，叶星宇，等.失巢凋亡效应分子Bcl-2转录抑制因子1的研究进展[J].肿瘤研究与临床，2020，32(2)：133-136.

[28] 于丰铭，徐扬. Caspase-3的研究进展[J].中国细胞生物学学报，2020，42(11)：2072-2078.

（收稿日期：2021-07-18　修回日期：2021-10-22）

（编辑：林　静）