# 当归多糖对糖尿病KK-Ay小鼠心肌细胞凋亡的影响Δ

崔阳阳[1*]，杨丽霞[2#]，米登海[2]，魏瑞贤[1]（1.甘肃中医药大学中医临床学院，兰州 730099；2.甘肃省中医药研究院中心实验室，兰州 730050）

**中图分类号** R965 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2023）10-1211-05
**DOI** 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.10.11

**摘 要 目的** 探讨当归多糖对糖尿病KK-Ay小鼠心肌细胞凋亡的影响。**方法** 将KK-Ay小鼠随机分为模型组、二甲双胍组（200 mg/kg）和当归多糖高、中、低剂量组（400、200、100 mg/kg），C57BL/6J小鼠作为空白组，每组8只，各组小鼠每日灌胃相应药液或生理盐水1次，连续4周。末次给药后，检测小鼠的空腹血糖、总胆固醇（TC）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）、胰岛素（INS）水平，心肌组织中B细胞淋巴瘤2（Bcl-2）、活化的胱天蛋白酶（cleaved-caspase-3）、凋亡信号调节激酶1（ASK1）、磷酸化氨基末端蛋白激酶（p-JNK）、磷酸化需肌醇酶1α（p-IRE1α）蛋白表达以及心肌细胞凋亡情况。**结果** 与模型组比较，二甲双胍组和当归多糖中、高剂量组小鼠空腹血糖、TC、LDL-C含量和心肌细胞凋亡率以及p-JNK、p-IRE1α、ASK1、cleaved-caspase-3蛋白表达水平均显著降低，INS水平和Bcl-2蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。**结论** 当归多糖可改善糖尿病KK-Ay小鼠的血糖和血脂水平，抑制心肌细胞凋亡，其机制可能与抑制IRE1/ASK1/JNK信号通路有关。

**关键词** 当归多糖；糖尿病心肌病；KK-Ay小鼠；细胞凋亡；IRE1/ASK1/JNK信号通路

## Effects of *Angelica sinensis* polysaccharide on the apoptosis of cardiomyocytes in diabetic KK-Ay mice

CUI Yangyang[1], YANG Lixia[2], MI Denghai[2], WEI Ruixian[1] (1. Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730099, China; 2. Central Laboratory of Gansu Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China)

**ABSTRACT OBJECTIVE** To investigate the effects of *Angelica sinensis* polysaccharide on the apoptosis of cardiomyocytes in diabetic KK-Ay mice. **METHODS** KK-Ay mice were randomly divided into model group, metformin group (200 mg/kg) and *A. sinensis* polysaccharide high-dose, medium-dose and low-dose groups (400, 200 and 100 mg/kg); C57BL/6J mice were included in blank group, with 8 mice in each group. Each group was given relevant medicine intragastrically or normal saline, once a day, for consecutive 4 weeks. After the final administration, the levels of fasting glucose, total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and insulin (INS) were detected; the protein expressions of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), cleaved-caspase-3, apoptosis signal-regulated kinase 1 (ASK1), phosphorylated c-Jun *N*-terminal kinase (p-JNK), phosphorylated inositol-requiring enzyme 1α (p-IRE1α) in myocardium, and apoptosis in cardiomyocytes were also detected. **RESULTS** Compared with model group, the fasting glucose, TC and LDL-C content, apoptotic rate of cardiomyocyte, protein expressions of p-JNK and p-IRE1α, ASK1, cleaved-caspase-3 were significantly lower in the metformin group and *A. sinensis* polysaccharide medium-dose, high-dose groups; INS level and relative expression of Bcl-2 protein were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** *A. sinensis* polysaccharide can improve the levels of blood glucose and blood lipid and inhibit cardiomyocyte apoptosis in diabetic KK-Ay mice, and the mechanism may be related to the inhibition of IRE1/ASK1/JNK signaling pathway.

**KEYWORDS** *Angelica sinensis* polysaccharide; diabetic cardiomyopathy; KK-Ay mice; apoptosis; IRE1/ASK1/JNK signaling pathway

随着人们生活水平的逐渐提高，糖尿病的患病率逐年提升，截至2030年，糖尿病全球患病率将上升到10.2%（5.78亿人），将成为造成人们死亡的第七大原因[1-2]。心血管并发症是糖尿病的主要死亡原因，约44%的1型糖尿病患者和52%的2型糖尿病患者都死于心血管疾病[1-2]。糖尿病心肌病（diabetic cardiomyopathy，DCM）是糖尿病导致的主要心血管并发症之一。细胞凋亡作为DCM的重要病理特征，参与了DCM病变的整个过程[3]。内质网应激（endoplasmic reticulum stress，ERS）会诱发需肌醇酶1α（inositol-requiring enzyme 1α，

Δ**基金项目** 甘肃省科技计划项目（No.20JR10RA432）

＊**第一作者** 硕士研究生。研究方向：中医药防治糖尿病。E-mail：995563704@qq.com

＃**通信作者** 主任医师，硕士生导师，博士。研究方向：中医药防治糖尿病。E-mail：yanglixia-415@163.com

IRE1α）活化，进而激活凋亡信号调节激酶1（apoptosis signal-regulating kinase 1，ASK1）和氨基末端蛋白激酶（c-Jun *N*-terminal kinase，JNK），最终导致细胞凋亡[4－5]。

中医并无病名与DCM相对应，一般将其归为“消渴”“心悸”“胸痹”“真心痛”等范畴。研究表明，当归多糖具有降糖、降脂、抗氧化、保护心脏、免疫调节等作用[6]。本研究通过IRE1/ASK1/JNK信号通路探讨了当归多糖对糖尿病KK-Ay小鼠心肌细胞凋亡的影响，旨在为当归多糖的临床应用提供依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括7080型全自动生化分析仪（日本Hitachi公司）、101-1AB型台式电热恒温鼓风干燥箱（天津市泰斯特仪器有限公司）、DYCZ-40G型转印电泳仪（北京六一生物科技有限公司）、5424R型高速冷冻离心机（德国Eppendorf公司）、iMark型酶标仪（美国Bio Rad公司）、DW-HL528型超低温冰箱（中科美菱低温科技股份有限公司）、DM2500型显微镜（德国Leica公司）等。

### 1.2 药品与试剂

当归多糖（批号CY210714，纯度98.14%）购自杨凌慈缘生物技术有限公司；盐酸二甲双胍缓释片（批号H20123024，规格0.5 g/片）购自河北山姆士药业有限公司；小鼠胰岛素（insulin，INS）ELISA试剂盒（批号202205）、低密度脂蛋白胆固醇（low-density lipoprotein cholesterol，LDL-C）含量测定试剂盒（批号CD20220527K）、总胆固醇（total cholesterol，TC）含量测定试剂盒（批号CD202205-26K）均购自上海酶联生物科技有限公司；预染Marker试剂（批号01011775）购自美国Thermo Fisher Scientific公司；BCA蛋白定量试剂盒（批号20191022）购自北京索莱宝科技有限公司；兔B细胞淋巴瘤2（B-cell lymphoma 2，Bcl-2）、磷酸化IRE1α（pho-sphorylated IRE1α，p-IRE1α）单克隆抗体（批号分别为BA01167674、BS-16698R）均购自北京博奥森生物技术有限公司；兔活化的胱天蛋白酶（cleaved-caspase-3）单克隆抗体（批号M12202117）购自沈阳万类生物科技有限公司；兔甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-pho-sphate dehydrogenase，GAPDH）单克隆抗体（批号GR303514-13）购自美国Abcam公司；辣根过氧化物酶（HRP）标记的兔IgG二抗（批号CR2102123）购自武汉赛维尔生物科技有限公司；兔磷酸化JNK（phosphorylated JNK，p-JNK）单克隆抗体（批号BST17414380）购自武汉博士德生物工程有限公司；兔ASK1单克隆抗体（批号29r3489）购自美国Affinity抗体公司；TUNEL细胞凋亡检测试剂盒（批号40306ES50）购自翌圣生物科技（上海）股份有限公司；其余试剂均为分析纯或实验室常用规格。

### 1.3 实验动物

糖尿病KK-Ay小鼠和C57BL/6J小鼠均为10～12周龄，SPF级，雄性，购自北京华阜康生物科技有限公司，生产许可证号均为SCXK（京）2019-0008。本实验已通过甘肃中医药大学动物实验伦理会审查（编号2021-368）。

## 2 方法

### 2.1 建模、分组与采样

所有小鼠均适应性喂养1周。C57BL/6J小鼠喂养普通饲料，随机取8只为空白组。糖尿病KK-Ay小鼠喂养高脂高糖饲料，测得平均随机血糖≥13.9 mmol/L后，随机分为模型组、二甲双胍组（200 mg/kg[7]）和当归多糖高、中、低剂量组（400、200、100 mg/kg[8]），每组8只。各组小鼠灌胃相应药液或生理盐水，每日1次，连续4周。末次灌胃后，各组小鼠心脏采血，分离血清，于－20 ℃保存；分离心脏，取部分心肌组织置于4%多聚甲醛溶液中固定，另一部分心肌组织置于液氮储存。

### 2.2 生化指标检测

采用全自动生化分析仪检测各组小鼠血清中空腹血糖、TC、LDL-C含量以及INS水平。

### 2.3 心肌细胞凋亡率检测

取各组小鼠的心肌组织，石蜡包埋切片，室温梯度脱水，按细胞凋亡检测试剂盒说明书操作，用TUNEL工作液孵育和4′，6-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI）染色后，采用显微镜观察并采集图片。采用Image J软件分析蓝色或绿色阳性表达的平均光密度（average optical density，AOD）值，用以评价小鼠心肌细胞的凋亡率。

### 2.4 心肌组织中ASK1、p-JNK、p-IRE1α蛋白表达检测

采用免疫组化法进行检测。取各组小鼠的心肌组织，石蜡包埋切片、复水、修复抗原、封闭、孵育抗体、脱水、封片后，采用显微镜观察并采集图片。采用Image J软件分析棕黄色或棕褐色阳性表达的AOD值，用以评价ASK1、p-JNK、p-IRE1α蛋白的表达水平。

### 2.5 心肌组织中Bcl-2、cleaved-caspase-3蛋白表达检测

采用Western blot法进行检测。取各组小鼠0.1 g心肌组织，放入1.5 mL的EP管中，经裂解、匀浆、离心、蛋白定量、变性、电泳、封闭后，抗体孵育（一抗cleaved-caspase-3、Bcl-2的稀释比均为1∶1 000，GAPDH的稀释比为1∶5 000；二抗稀释比为1∶5 000），ECL曝光条带。利用Image J软件分析蛋白质条带的灰度值，以GAPDH为内参分析目标蛋白的表达量，再以空白组为标准进行归一化处理。

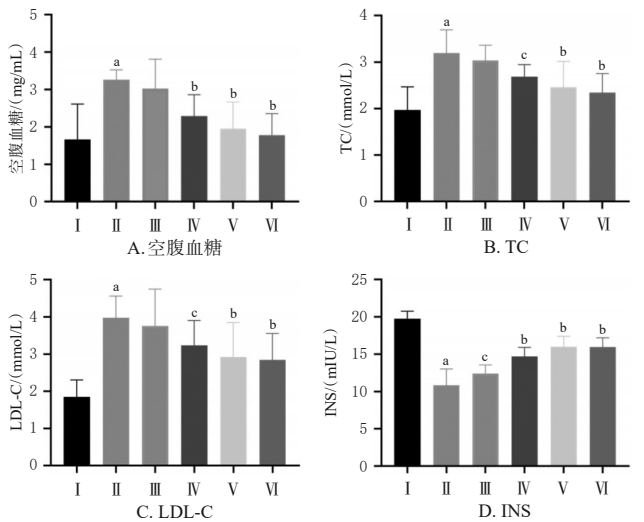
### 2.6 统计学分析

采用SPSS 23.0软件进行统计分析，实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用方差齐性检验和单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-$t$检验。检验水准$\alpha=0.05$。

## 3 结果

### 3.1 小鼠空腹血糖、TC、LDL-C含量和INS水平

与空白组比较，模型组小鼠空腹血糖、TC、LDL-C含量均显著升高（$P<0.01$），INS水平显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，二甲双胍组和当归多糖中、高剂量组小鼠空腹血糖、TC、LDL-C含量均显著降低，二甲双胍组和当归多糖各剂量组小鼠INS水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图1。

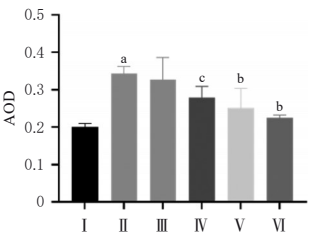



Ⅰ：空白组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：当归多糖低剂量组；Ⅳ：当归多糖中剂量组；Ⅴ：当归多糖高剂量组；Ⅵ：二甲双胍组；a：与空白组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.05$

**图1 各组小鼠空腹血糖、TC、LDL-C含量和INS水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）**

### 3.2 心肌细胞凋亡率

与空白组比较，模型组小鼠心肌细胞凋亡率显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，二甲双胍组和当归多糖中、高剂量组小鼠心肌细胞凋亡率均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图2、图3（当归多糖低、中剂量组图略）。

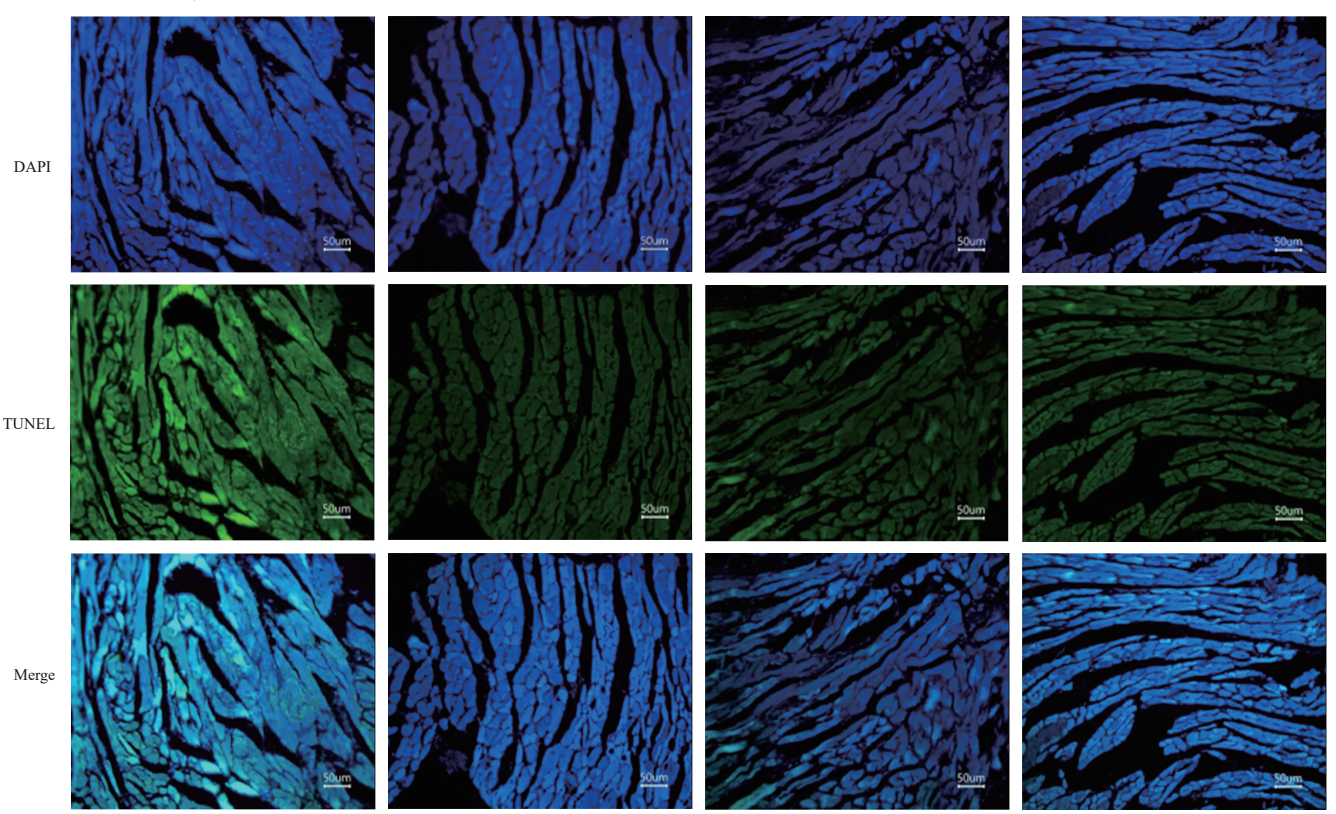



Ⅰ：空白组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：当归多糖低剂量组；Ⅳ：当归多糖中剂量组；Ⅴ：当归多糖高剂量组；Ⅵ：二甲双胍组；a：与空白组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.05$

**图2 各组小鼠心肌细胞凋亡率柱状图（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）**

### 3.3 心肌组织中ASK1、p-JNK、p-IRE1α蛋白表达

空白组小鼠心肌组织中ASK1、p-JNK、p-IRE1α蛋白少量表达。与空白组比较，模型组小鼠心肌组织中ASK1、p-JNK、p-IRE1α蛋白表达均显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，二甲双胍组和当归多糖各剂量组小鼠心肌细胞中ASK1、p-JNK（当归多糖低剂量组除外）、p-IRE1α蛋白表达（当归多糖低剂量组除外）均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图4（当归多糖低、中剂量组图略）、图5。




A. 空白组　B. 模型组　C. 当归多糖高剂量组　D. 二甲双胍组

**图3 各组小鼠心肌细胞凋亡染色图（×200）**

### 3.4 心肌组织中Bcl-2、cleaved-caspase-3蛋白表达

与空白组比较，模型组小鼠心肌组织中Bcl-2蛋白相对表达量显著降低，cleaved-caspase-3蛋白相对表达量显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，二甲双胍组和当归多糖各剂量组小鼠心肌组织中Bcl-2蛋白相对表达量（当归多糖低剂量组除外）均显著升高，cleaved-caspase-3蛋白相对表达量均显著降低（$P<0.01$）。结果见图6。

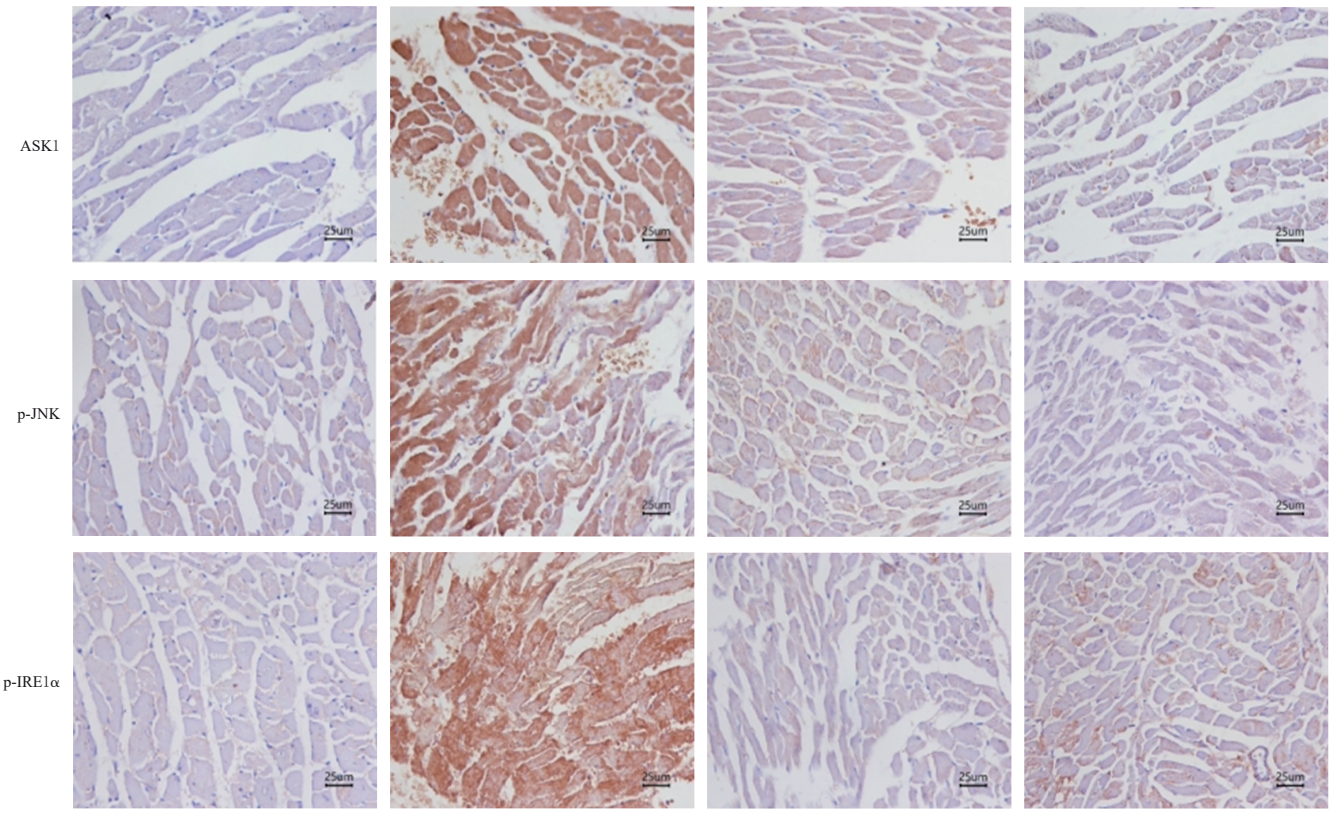
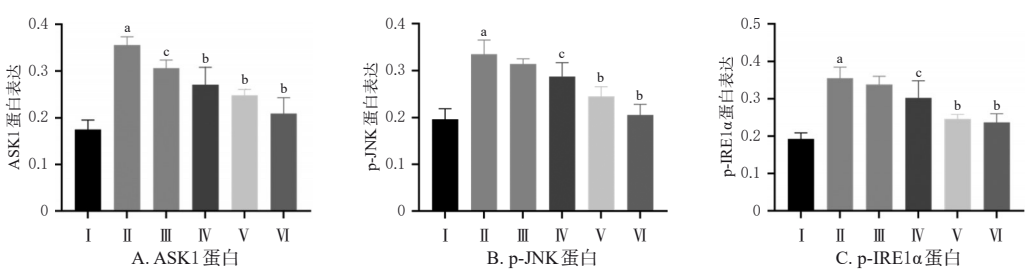
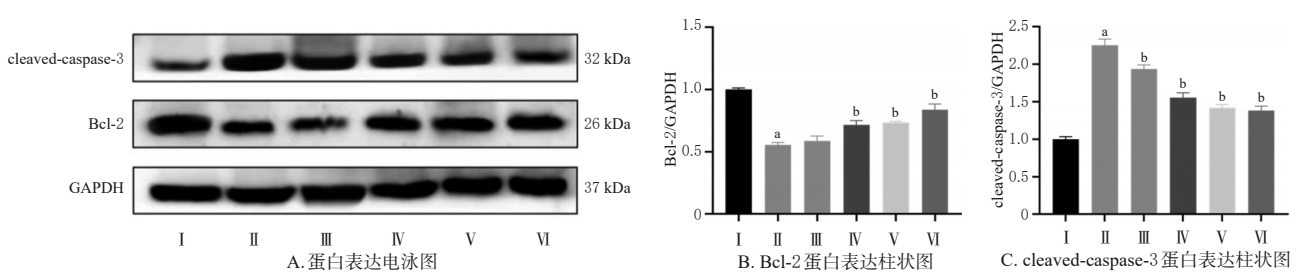



**图4 各组小鼠心肌组织中ASK1、p-JNK、p-IRE1α蛋白表达染色图（×400）**




Ⅰ：空白组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：当归多糖低剂量组；Ⅳ：当归多糖中剂量组；Ⅴ：当归多糖高剂量组；Ⅵ：二甲双胍组；a：与空白组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.05$

**图5 各组小鼠心肌组织中ASK1、p-JNK、p-IRE1α蛋白表达比较（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）**




Ⅰ：空白组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：当归多糖低剂量组；Ⅳ：当归多糖中剂量组；Ⅴ：当归多糖高剂量组；Ⅵ：二甲双胍组；a：与空白组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$

**图6 各组小鼠心肌组织中Bcl-2、cleaved-caspase-3蛋白表达比较（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）**

## 4 讨论

INS抵抗和INS分泌缺陷是糖尿病发生发展的关键，INS通过对其靶细胞的各种作用，而使得INS在维持血糖生理水平方面起着重要作用[9]。脂质代谢紊乱可引起神经酰胺、二酰基甘油等脂毒性中间体在心肌内积累，从而在心脏中产生脂毒性微环境，最终造成糖尿病患者心脏损伤[10]。本研究结果显示，与模型组比较，中、高剂量的当归多糖可显著降低糖尿病KK-Ay小鼠的空腹血糖、TC和LDL-C含量，升高INS水平，表明当归多糖可改善糖尿病KK-Ay小鼠的血糖和血脂水平。

高糖刺激可导致心肌细胞凋亡数量增加，正常心肌细胞数量减少，心肌舒张功能受限，心脏泵血减少，最终导致心力衰竭[11]。IRE1/ASK1/JNK信号通路在细胞凋亡中存在重要意义[12]。本研究结果显示，中、高剂量的当归多糖可抑制糖尿病KK-Ay小鼠心肌细胞凋亡，下调ASK1、p-JNK、p-IRE1α蛋白表达。

Bcl-2是关键的细胞凋亡基因和调节蛋白，具有明显抑制细胞凋亡的作用[13]。Cleaved-caspase-3为caspase-3的活化形式，cleaved-caspase-3仅存在于正在发生凋亡的细胞中，未发生凋亡或已经坏死的细胞中检测不到cleaved-caspase-3[14]。本研究结果显示，中、高剂量的当归多糖可降低糖尿病KK-Ay小鼠心肌细胞中cleaved-caspase-3蛋白表达水平，升高Bcl-2蛋白表达水平，这进一步证实了当归多糖可抑制糖尿病KK-Ay小鼠心肌细胞凋亡。

综上所述，当归多糖可改善糖尿病KK-Ay小鼠的血糖和血脂水平，抑制心肌细胞凋亡，其机制可能与抑制IRE1/ASK1/JNK信号通路有关。

## 参考文献


[1] WANG M R, LI Y S, LI S, et al. Endothelial dysfunction and diabetic cardiomyopathy[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13: 851941.

[2] SAEEDI P, PETERSOHN I, SALPEA P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2019, 157: 107843.

[3] 张哲，王杏，杨林泉，等. 利拉鲁肽通过调控AMPK/mTOR自噬信号减轻糖尿病大鼠心肌炎症和氧化应激损伤[J]. 中国药理学通报，2022，38(9)：1308-1314.

[4] LI Z H, ZHANG T, DAI H Y, et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in myocardial apoptosis of streptozocin-induced diabetic rats[J]. J Endocrinol, 2008, 196(3): 565-572.

[5] 徐静尊，鲁敏. 内质网应激与自噬及其交互作用影响内皮细胞凋亡[J]. 中国生物化学与分子生物学报，2019，35(3)：240-250.

[6] 任伟钰，郑宜鋆，张月梅，等. 当归多糖药理作用的研究进展[J]. 时珍国医国药，2020，31(10)：2484-2487.

[7] 白宇，杨丽霞，贺云，等. 当归多糖通过TLR4/NF-κB信号通路对糖尿病肾病大鼠的影响[J]. 中成药，2021，43(3)：755-760.

[8] 张勇，武燕彬，孔维佳. 天麻素在KK-Ay小鼠中抗糖尿病作用的实验研究[J]. 中国药理学通报，2018，34(7)：917-924.

[9] LORENZO-ALMORÓS A, CEPEDA-RODRIGO J M, LORENZO Ó. Diabetic cardiomyopathy[J]. Rev Clin Esp (Barc), 2022, 222(2): 100-111.

[10] RITCHIE R H, ZERENTURK E J, PRAKOSO D, et al. Lipid metabolism and its implications for type 1 diabetes-associated cardiomyopathy[J]. J Mol Endocrinol, 2017, 58(4): R225-R240.

[11] 刘霜，徐召霞，石丽君. 锚定蛋白AKAP79/150介导心血管功能调控的研究进展[J]. 生命科学，2020，32(10)：1088-1098.

[12] WANG G S, CHEN J Y, CHEN W C, et al. Surfactin induces ER stress-mediated apoptosis via IRE1-ASK1-JNK signaling in human osteosarcoma[J]. Environ Toxicol, 2022, 37(3): 574-584.

[13] 房佳惠，杨巍. Bcl-2家族蛋白对心肌细胞凋亡作用的研究进展[J]. 现代医学，2017，45(7)：996-1000.

[14] 张胜强，张洪艳，齐宝林，等. 三叶青黄酮诱导肺癌SPC-A-1细胞凋亡与cleaved-caspase-3表达的关系[J]. 中国医院药学杂志，2017，37(12)：1139-1143，1148.



（收稿日期：2022-12-04　修回日期：2023-04-27）

（编辑：邹丽娟）