

芦丁对 1 型糖尿病小鼠心肌酶及心肌组织形态学影响^{*}

曹皓轩¹, 孙竹梅², 勾向博³, 李鹏飞⁴, 史晨曦⁴, 白 静^{3△}

1. 华北理工大学药学院(唐山 063000); 2. 华北理工大学临床医学院(唐山 063000);
3. 华北理工大学基础医学院(唐山 063000); 4. 华北理工大学冀唐医学院(唐山 063000)

【摘要】 目的 研究芦丁对糖尿病小鼠心肌酶指标及心肌组织形态学的影响。**方法** 48 只雄性昆明小鼠每日腹腔注射链脲佐菌素(STZ) 62.5 mg/kg, 连续 5 d, 建立 1 型糖尿病小鼠模型; 另取正常组小鼠 12 只, 不造模。成模小鼠随机分为模型组, 厄贝沙坦组, 芦丁低、高剂量组, 每组 12 只。各组按小鼠体质量每日 1 次灌胃给药, 共 8 周, 芦丁低、高剂量组分别按 50、100 mg/kg 给予芦丁灌胃, 厄贝沙坦组按 45 mg/kg 给予厄贝沙坦灌胃, 正常组与模型组分别给予等量羧甲基纤维素钠溶液灌胃。给药 8 周后检测血清中肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、羟丁酸脱氢酶(HBDH)和乳酸脱氢酶(LDH)的含量; 通过 HE 染色、Masson 三色染色以及电镜观察, 进行心肌组织形态学的分析。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠血清心肌酶水平升高($P<0.01$); 与模型组相比, 芦丁低、高剂量组可不同程度降低血清心肌酶水平, 高剂量组作用更为明显($P<0.05$); 与低剂量组比较, 芦丁高剂量组 HBDH 和 LDH 值有下降($P<0.05$), 厄贝沙坦组差异无统计学意义; 与高剂量组比较, 厄贝沙坦组 LDH 值升高($P<0.05$)。形态学观察显示, 与正常组心肌细胞比较, 模型组心肌细胞形态异常并伴有纤维化。芦丁低、高剂量组及厄贝沙坦组相比模型组, 心肌组织形态及纤维化程度有不同程度改善。**结论** 芦丁可降低糖尿病心肌病小鼠血清心肌酶含量, 改善病变心肌细胞形态, 降低纤维化程度, 减轻心肌损伤。

【关键词】 芦丁 糖尿病 心肌酶 形态学

Effects of Rutin on Myocardial Enzyme and Cardiac Morphology in Diabetic Mice CAO Hao-xuan¹, SUN Zhu-mei², GOU Xiang-bo³, LI Peng-fei⁴, SHI Chen-xi⁴, BAI Jing^{3△}. 1. Department of Pharmacology, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China; 2. School of Clinical Medical, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China; 3. School of Basic Medical Sciences, North China University of Technology, Tangshan 063000, China; 4. Ji Tang Medical College, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China

△ Corresponding author, E-mail: baijing7858@163.com

【Abstract】 Objective To study the effects of rutin on myocardial enzyme in serum and myocardial morphology in diabetic mice induced by streptozotocin (STZ). **Methods** A model of type 1 diabetic mice was established in 48 male kunming mice with daily intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) 62.5 mg/kg for 5 consecutive days. 12 male Kunming mice were selected as normal group randomly. The established successfully diabetic mice were randomly divided into the model group, irbesartan group [45 mg/(kg · d)], low-, high-dose rutin groups [50, 100 mg/(kg · d)]. The mice in the normal and the model groups were given sodium carboxymethyl cellulose solution (CMC-Na, 1 g/L) by intragastric administration respectively. After administration for 8 weeks, the levels of creatine kinase (CK), creatine kinase isoenzymes (CK-MB), hydroxybutyrate dehydrogenase (HBDH), and lactate dehydrogenase (LDH) in serum were detected by blood biochemical analyzer. The cardiac myocardial morphology was observed by HE staining, Masson trichrome staining and electron microscope. **Results** Compare to the normal group, the levels of the myocardial enzyme in serum evidently increased in the model group ($P<0.01$); Compare to the model group, the levels of the myocardial enzyme in serum decreased in low-, high-dose rutin groups; The levels of HBDH and LDH declined remarkably in the high-dose rutin group relative to the low-dose group ($P<0.05$); Compared to the high-dose group, the level of LDH increased in the irbesartan group ($P<0.05$). Moreover, relative to the model group, the morphology of myocardial tissue, the degree of fibrosis and the ultrastructure of myocardial tissue in mice were significantly improved in low-, high-dose rutin groups, and the effects were more significant in the high-dose rutin group. **Conclusion** Rutin could decrease

^{*} 河北省自然科学基金(No. H2014209194)资助

△ 通信作者, E-mail: baijing7858@163.com

the levels of myocardial enzyme in serum in diabetic mice, improve the cardiac cell morphology and alleviate myocardial injury.

[Key words] Rutin Diabetes Myocardium Morphology

随着人们生活水平的提升,糖尿病发病率也不断攀升。据世界卫生组织(WHO)统计,到 2030 年全球糖尿病患者将达到 4 亿^[1],其中,将有多于 75% 的糖尿病患者死于心血管疾病^[2]。与非糖尿病患者相比,糖尿病患者心血管患病率高出约 2~4 倍^[3],已成为糖尿病患者死亡的主要原因之一^[4]。糖尿病心肌病是一种不能归因于高血压、冠状动脉疾病和其他心血管疾病的特异性心肌病^[5],其特点是通过改变心脏的结构和功能,导致心肌纤维化和心肌细胞坏死^[6]。近年越来越多的学者开始探索糖尿病心肌病的发病机制及从事特效药物的研发工作。

在心血管药物中,黄酮类药物具有举足轻重的地位。芦丁属于黄酮类化合物^[7],被公认为有良好舒张血管、拮抗血小板活化因子、抗炎、抗氧化、保护胰腺的效果^[8-9]。在具有心血管疾病防治和胰腺保护功效的同时,芦丁还可能逆转糖尿病心肌损伤的作用^[10]。因此,芦丁也许可以成为一种潜在的治疗心肌损伤的药物。本实验旨在通过观察芦丁对糖尿病小鼠心肌酶指标和心肌形态学的影响,探索其在糖尿病心肌病方面的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物、材料

雄性昆明小鼠 70 只,体质量(35 ± 10)g,SPF 级,军事医学科学院卫生学环境医学研究所购入(合格证号 0000349)。

链脲佐菌素(STZ):VETEC 公司;柠檬酸钠溶液:Solarbio 公司;羧甲基纤维素钠:国药集团化学试剂有限公司;芦丁试剂:Abcam 公司;厄贝沙坦片(批号 5A195):赛诺菲(杭州)制药有限公司;40 mL/L 多聚甲醛溶液:Solarbio 公司;恩氟烷:ABBOTT 公司生产;Masson 三色染色试剂盒:Solarbio 公司。5D-2 型血糖仪及配套试纸:北京怡成生物电子技术股份有限公司;Chemray240 型全自动生化分析仪:Rayto 公司;BX-53 型光学显微镜:OLYMPUS Rayto 公司;低温高速离心机:德国 Eppendorf 公司;日立 H-7650 透射电子显微镜。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病模型建立

雄性昆明小鼠进行适应

性饲养 1 周后,随机选取 12 只作为正常组,不造模;其它 48 只小鼠每日腹腔注射 1 次 62.5 mg/kg STZ,连续给药 5 d。空腹 72 h 后对小鼠测随机血糖,若小鼠血糖浓度 ≥ 16.6 mmol/L 则为造模成功。

1.2.2 分组与给药 据乔爱春等^[11]研究,厄贝沙坦可降低糖尿病患者早期心肌病患者血浆 N 端前脑钠肽(NT-proBNP)水平,对早期糖尿病心肌病患者的病情发展有干预效果。本实验将选取厄贝沙坦片作为阳性对照,以观察芦丁对糖尿病心肌病的治疗效果。

将造模成功的小鼠随机分为模型组、芦丁低剂量组、芦丁高剂量组、厄贝沙坦组,每组 12 只。芦丁低、高剂量组分别按 50、100 mg/kg 给予芦丁灌胃,厄贝沙坦组按 45 mg/kg 给予厄贝沙坦灌胃,正常组和模型组按 10 mg/kg 给予羧甲基纤维素钠溶液(1 g/L)灌胃,每日 1 次,连续 8 周。

1.2.3 取样 各组小鼠在给药 8 周后,禁食 12 h,对所有小鼠使用恩氟烷麻醉,进行眼内眦取血约 1.5 mL,装 EP 管后立刻置于冰盒内。处死小鼠,迅速取出心脏,在冰的生理盐水中洗净后去除筋膜,滤纸吸干后称重。剪米粒大小浸入戊二醛(电镜专用,25 mL/L),4℃保存,为电镜观察做固定;余下部分浸入体积分数为 4% 多聚甲醛 4℃保存,留作病理切片。

1.2.4 血清心肌酶指标的检测 所取血液在 4℃低温条件下进行 10 min、3 000 r/min 离心,取上清进行生化分析,分别测定肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、羟丁酸脱氢酶(HBDH)和乳酸脱氢酶(LDH)。

1.2.5 病理染色和电镜观察 取于 4℃甲醛环境下放置 48 h 的组织,置流水下冲洗 6 h 后依次进行梯度酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡,硬蜡包埋后置于 4℃充分凝固,随后制作 5 μ m 石蜡切片。对切片进行 HE 染色及 Masson 染色,在光镜下观察组织形态与纤维化程度。取 25 mL/L 戊二醛中的心肌组织,切片后通过电镜观察心肌组织的超微结构。

1.2.6 统计学方法 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 ANOVA 进行多组间差异比较,采用 bonferroni 法进行两两间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芦丁对各组小鼠心肌酶的影响

与正常组比较,模型小鼠血清中心肌酶学指标 CK、CK-MB、HBDH 和 LDH 水平均增加 ($P<0.01$);与模型组相比,芦丁低、高剂量组及厄贝沙坦组的心肌酶学指标有不同程度下降,芦丁高剂量组

作用更明显 ($P<0.05, P<0.01$),其中 CK、HBDH 与正常水平相当;与低剂量组比较,芦丁高剂量组 HBDH 和 LDH 值下降 ($P<0.05$),厄贝沙坦组差异无统计学意义;与芦丁高剂量组比较,厄贝沙坦组 LDH 值升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见附表。

2.2 HE 染色观察心肌组织形态

附表 芦丁对各组小鼠血清心肌酶的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table Effects of rutin on serum myocardial enzymes in groups of mice ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Group	CK/(U/L)	CK-MB/(U/L)	HBDH/(U/L)	LDH/(U/L)
Normal	29.8±3.7	34.1±6.2	6.22±0.63	194.1±35.2
Model	49.0±7.3**	81.9±16.6**	7.86±0.47**	336.5±105.3**
Low-dose rutin	34.8±3.3##	73.5±12.8**	7.26±0.73**	307.5±92.3**
High-dose rutin	33.6±2.8##	71.2±11.4***#	6.98±0.69#△	268.3±78.5***#△
Irbesartan	35.2±3.4*##	73.7±13.0**	7.13±0.82*	295.6±91.4***▲

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, vs. normal group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, vs. model group; △ $P<0.05$, vs. low-dose rutin group; ▲ $P<0.05$, vs. high-dose rutin group

HE 染色结果如图 1 所示,可见正常组小鼠心肌细胞排列有序,胞核为清晰蓝色,纹路清晰。模型组细胞间隙增大,细胞大小不一并伴有部分细胞萎缩,横纹排列无条理,胞核颜色较深。芦丁低剂量组、厄贝沙坦组与模型组横纹排列整齐度稍改善,间隙缩小;芦丁高剂量组相比模型组细胞形态趋于正常,排列有序。芦丁低剂量组、厄贝沙坦组、芦丁高剂量组细胞萎缩症状逐渐改善,胞核颜色逐渐清晰,芦丁高剂量组改善尤为明显。

2.3 Masson 染色观察心肌纤维化程度

Masson 染色结果如图 2 所示,被染成红色的是肌纤维胞浆和红细胞,蓝褐色的是细胞核,胶原纤维被染成蓝色。从图中可以看出正常组心肌组织基本无胶原纤维表达;模型组心肌组织间胶原纤维聚集情况最为明显,表明心肌纤维化程度最为严重。与模型组相比较,芦丁低剂量组、厄贝沙坦组、芦丁高剂量组胶原纤维聚集程度依次减轻,即芦丁高剂量组心肌纤维化情况好转最为明显。

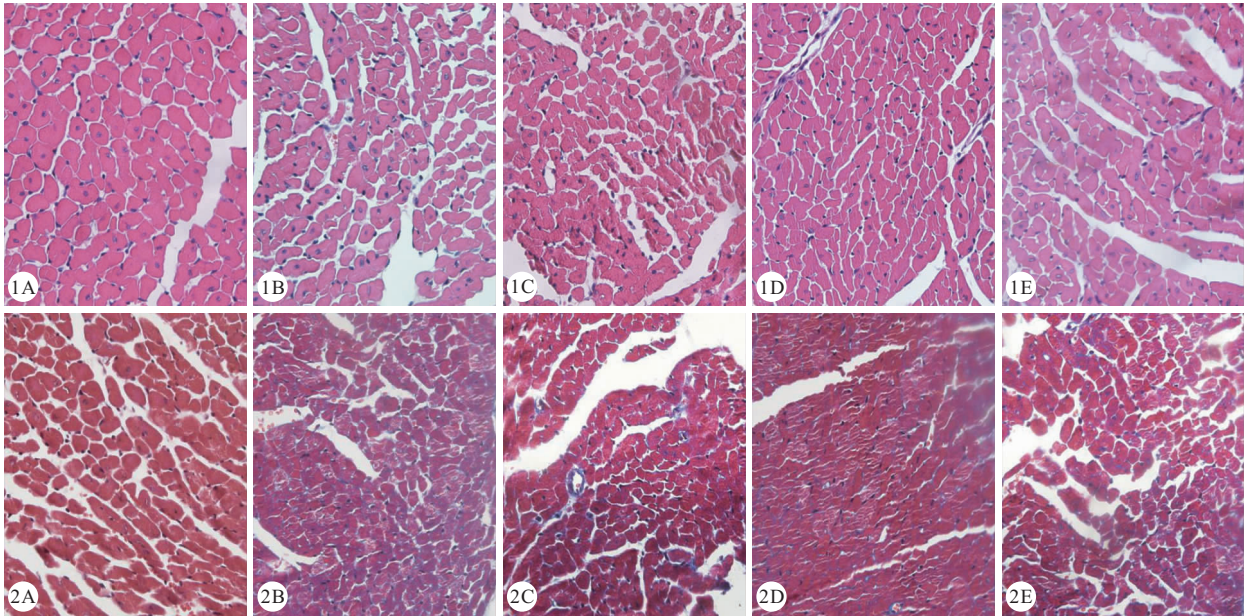


图 1 HE 染色观察各组小鼠心肌细胞形态。×400

图 2 Masson 染色观察各组小鼠心肌细胞形态。×400

Fig 1 The myocardial cell morphology of each group of mice in HE staining. ×400

Fig 2 The myocardial cell morphology of each group of mice in Masson staining. ×400

in Masson staining. ×400

A: Normal group; B: Model group; C: Low-dose rutin group; D: High-dose rutin group; E: Irbesartan group

2.4 电镜观察心肌超微结构

电镜结果如图 3 所示,正常组具有排列紧密整齐的心肌纤维以及明显的 Z 线与 M 线,椭圆形线粒体内可见大量的基质和嵴。模型组心肌纤维以及线

粒体排列无序,形态不规则,嵴出现溶解情况甚至消失,间隙含大量空泡;与模型组相比较,芦丁低、高剂量组及厄贝沙坦组心肌纤维排列均有好转,线粒体形态改善,嵴的消失溶解情况减轻,空泡明显减少,

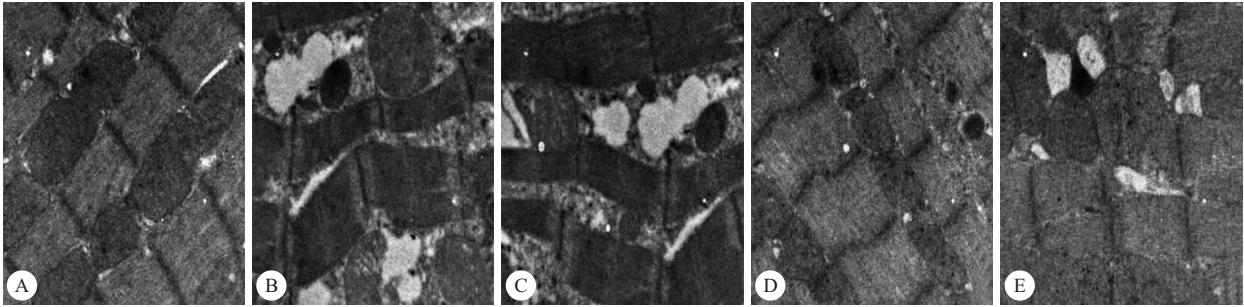


图 3 电镜观察各组小鼠心肌细胞形态。×10 000

Fig 3 The myocardial cell morphology of each group of mice under electron microscope. ×10 000

A: Normal group; B: Model group; C: Low-dose rutin group; D: High-dose rutin group; E: Irbesartan group

芦丁高剂量组的形态更加趋于正常。

3 讨论

本实验通过小剂量多次腹腔注射 STZ,建立 1 型糖尿病小鼠模型。芦丁给药 8 周后,血生化测定小鼠心肌酶指标,并对心肌组织进行光学及电镜观察,探讨芦丁对 1 型糖尿病小鼠心肌的保护作用。

在对小鼠的血生化分析中,着重观察 LDH、CK、CK-MB、HBDH 等心肌酶的指标。有研究^[12]显示,发生急性心肌梗死、冠心病等患者体内血液中均存在血脂及心肌酶异常情况,因此,临床主要通过对患者进行脂代谢及心肌酶检测,从而判断其发生心血管疾病的概率^[13]。心肌酶存在于心肌细胞内,催化心肌细胞的代谢及调节其正常活动,当心肌受到损伤时,心肌细胞破损导致心肌酶流入血液,使得血液中含有量增加。本实验中,与正常组相比,糖尿病小鼠的心肌酶 CK、CK-MB、HBDH 与 LDH 显著增高,在芦丁给药 8 周后各项指标均降低,高剂量组降低尤为明显,表明芦丁可以减轻心肌损伤,减少心肌酶释放入血,对心肌具有一定的保护作用,效果优于厄贝沙坦和低剂量芦丁。该结论与 GUIMARAES 等^[14]报道的芦丁可改善糖尿病大鼠的心功能结果相一致,但该研究仅从血清胰岛素浓度、心脏的超声心动图以及心脏舒张功能角度来研究芦丁对糖尿病大鼠心功能的治疗作用,并未就与心肌病诊断相关的心肌酶方面进行分析。

目前,糖尿病心肌病的诊断主要还是通过心肌纤维化程度结合病理切片观察。心脏的细胞外存在

胶原纤维,它能够联结心肌细胞和肌束,从而对心脏起到支持和保护作用^[15],而心脏胶原纤维表达量提升是心肌纤维化重要表现。据 CROSTON 等^[16]报道,线粒体功能障碍与高血糖密切相关,高血糖是线粒体能量与形态破坏的关键因素。本实验采用 HE、Masson 经典三色染色以及透射电镜来观察小鼠心肌细胞形态,从而判断小鼠心肌损伤程度。结果显示,芦丁低、高剂量组及厄贝沙坦组与模型组相比,心肌损伤程度均有所改善,其中高剂量组与正常形态最接近。可见芦丁对糖尿病心肌形态异常具有明显的改善作用,且高剂量芦丁效果更为明显。

综上,芦丁可降低糖尿病心肌病小鼠血清心肌酶含量,改善病变心肌细胞形态,降低纤维化程度,减轻心肌损伤。本研究从血清心肌酶水平及心肌组织形态学方面证实了芦丁对心肌的保护作用,从而为芦丁开发成为防治糖尿病心肌病的新型药物提供了科学的实验数据。虽说大多数心肌损伤可根据心肌酶确诊,但不是唯一的诊断依据。LDH、CK 在人体内分布较广泛,一种酶同时存在于许多器官组织中,缺乏组织特异性。实验下一步会结合多普勒组织成像技术、定量组织速度显像等临床新技术进一步观察芦丁对心脏的保护作用,还将从分子生物学角度结合 Western blot 以及 PCR 来进一步研究芦丁对心肌损伤的治疗作用。

参 考 文 献

[1] SHAW JE, SICREE RA, ZIMMET PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diabetes Res

- Clin Pract, 2010, 87(1): 4-14.
- [2] TANG WHW. Glycemic control and treatment patterns in patients with heart failure. *Curr Cardiol Rep*, 2007, 9(3): 242-247.
- [3] MUDD JO, KASS DA. Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature*, 2008, 451(7181): 919-928.
- [4] TANCREDI M, ROSENGREN A, SVENSSON AM, *et al.* Excess mortality among persons with type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 2015, 373(18): 1720-1732.
- [5] 赵航, 冯景辉, 吴秀萍. 糖尿病心肌病发病机制的研究进展. *国际心血管病杂志*, 2016, 43(1): 16-18.
- [6] WANG WK, WANG B, LU QH, *et al.* Inhibition of high-mobility group box 1 improves myocardial fibrosis and dysfunction in diabetic cardiomyopathy. *Int J Cardiol*, 2014, 172(1): 202-212 [2018-02-14]. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.01.011>.
- [7] 张杰, 张秀丽. 芦丁的提取及其在小鼠试验中表现的生物活性综述. *化工科技市场*, 2010, 33(9): 23-26.
- [8] 顾洪雁, 张媛英, 翟静, 等. 维生素 C 和芦丁对力竭运动小鼠组织自由基代谢的影响. *中国组织工程研究*, 2005, 9(44): 132-134.
- [9] 陈爱华, 司力, 赵维中, 等. 芸香苷对急性胰腺炎大鼠血流变学的影响. *中国药理学通报*, 2004, 20(6): 685-688.
- [10] 陈园园. 芦丁对大鼠 2 型糖尿病心肌纤维化的保护作用及机理的研究. 长春: 吉林大学, 2014 [2018-04-11]. [http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?dbcode=CMFD&dbname=CMFD201402&filename=1014281847.nh&uid=WEEvREcwSljHSldRa1FhcEE0RVZycFJyOFY2dnI4MlEV1E2VINjdW9Sbz0=\\$9A4hF_YAuvQ5obgVAqNKPCYcEjKensW4ggI8Fm4gTkoUKaID8j8gFw!!&v=MjIzMdhZZWRtRnlqbVVyck9WRjI2R3JHd0g5bklxSkViUELSOGVYMUxleFlTN0RoMVQzcVRyV00xRnJDVVJMS2Y=](http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?dbcode=CMFD&dbname=CMFD201402&filename=1014281847.nh&uid=WEEvREcwSljHSldRa1FhcEE0RVZycFJyOFY2dnI4MlEV1E2VINjdW9Sbz0=$9A4hF_YAuvQ5obgVAqNKPCYcEjKensW4ggI8Fm4gTkoUKaID8j8gFw!!&v=MjIzMdhZZWRtRnlqbVVyck9WRjI2R3JHd0g5bklxSkViUELSOGVYMUxleFlTN0RoMVQzcVRyV00xRnJDVVJMS2Y=).
- [11] 乔爱春, 冯玫, 李丽琪, 等. 厄贝沙坦对糖尿病心肌病的早期干预效果观察. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2017, 15(22): 2936-2937.
- [12] 张爱民, 常艳敏. 脂肪肝患者血清胆碱酯酶、肝功能、血脂水平的观察. *医学检验与临床*, 2006, 17(1): 64 [2017-12-04]. http://www.wanfangdata.com.cn/details/detail.do?_type=perio&id=qlyxjy200601027. doi: 10.3969/j.issn.1673-5013.2006.01.027.
- [13] 马琳, 朱成勤. 肌钙蛋白 T、肌红蛋白和肌酸激酶同工酶在急性心肌梗死诊断中的意义. *吉林医学*, 2013, 31(17): 257-259.
- [14] GUIMARAES JFC, MUZIO BP, ROSA CM, *et al.* Rutin administration attenuates myocardial dysfunction in diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*, 2015, 14: 90 [2018-02-14]. <https://doi.org/10.1186/s12933-015-0255-7>.
- [15] 刘诗英, 王梦洪. 结缔组织生长因子与心肌纤维化的研究进展. *江西医药*, 2007, 42(7): 661-663.
- [16] CROSTON TL, THAPA D, HOLDEN AA, *et al.* Functional deficiencies of subsarcolemmal mitochondria in the type 2 diabetic human heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 307(1): H54-H65.
- (2018-01-09 收稿, 2018-03-25 修回)
- 编辑 吕熙

本刊征稿启事

《四川大学学报(医学版)》(原《华西医科大学学报》)是中文核心期刊,曾荣获全国优秀科技期刊一等奖,首届国家期刊奖提名奖,第二、三届全国期刊奖百种重点期刊,四川省十佳科技期刊称号和第一、二、三、四、五届中国高校精品科技期刊奖,2016 年度中国高校百佳科技期刊,2016 中国国际影响力优秀学术期刊。本刊被美国《医学索引》(INDEX MEDICUS, IM/MEDLINE),《生物学文摘》(BIOLOGICAL ABSTRACTS, BA),《化学文摘》(CHEMICAL ABSTRACTS, CA),荷兰《医学文摘》(EXCERPTA MEDICA, EM),中国科技论文与引文数据库(CSTPCD),中国生物医学文献光盘数据库(CBMdisc),中文生物医学期刊文献数据库(CMCC),中国学术期刊网全文数据库(CNKI),中国学术期刊(光盘版),万方数据-数字化期刊群等数据库收录。

为了更好地开展国内外学术交流,促进医药卫生事业的发展,凡符合编辑部稿件要求(见每卷末期稿约),均可向本刊投稿。凡属于国家自然科学基金及其他省部级以上科研基金资助的来稿,编辑部将适当地给予优先。

本刊在线投稿网址: <http://scdx.cnjournals.com>

地址:四川省成都市人民南路三段 17 号四川大学学报(医学版)编辑部

邮政编码: 610041

电话/传真: (028) 85501320

E-mail: scuxbyxb@scu.edu.cn

四川大学学报(医学版)编辑部