

灯盏花素对糖尿病大鼠心肌及神经肽 Y 水平的影响

赵凌云^{1,2},李学英¹,罗蔓莉¹,许永杰¹,刘晓红^{3*}

(¹遵义医学院细胞生物学与遗传学教研室,贵州 遵义 563003;²开封市第二人民医院肿瘤科,河南 开封 475000;³遵义医学院生理学教研室,贵州 遵义 563003)

[摘要] 目的:探讨灯盏花素对糖尿病大鼠心肌的干预作用及对神经肽 Y(NPY)水平的影响。方法:建立 T1DM 大鼠模型,将成模后的成年 Wistar 大鼠随机分为糖尿病模型组、胰岛素治疗组、灯盏花素低剂量干预组、灯盏花素高剂量干预组,另设正常对照组。观察血糖、体重、心脏重量指数、心系数,放免法测定 NPY 水平,常规 HE 染色观察心肌组织的形态学改变。结果:糖尿病大鼠心脏重量指数、心系数以及血浆、心肌组织内 NPY 水平显著升高,HE 染色显示心肌细胞存在等多种病理改变。胰岛素治疗与灯盏花素干预后均能改善糖尿病大鼠心肌组织的病理变化,其中灯盏花素高剂量干预效果同胰岛素治疗组。在干预和治疗过程中血浆 NPY 水平降低,心肌组织 NPY 水平升高。结论:糖尿病大鼠血浆 NPY 水平增高,灯盏花素可以降低血浆 NPY 水平,改善糖尿病大鼠心功能、心肌细胞肥大现象,并可改善糖尿病大鼠的一般生理状况。

[关键词] 灯盏花素;糖尿病;心肌;神经肽 Y

[中图分类号] R587.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)02-164-04

doi:10.7655/NYDXBNS20140208

Effect of breviscapine on myocardial intervention and neuropeptide Y levels in diabetic rats

Zhao Lingyun^{1,2},Li Xueying¹,Luo Manli¹,Xu Yongjie¹,Liu Xiaohong^{3*}

(¹Department of Cell Biology and Genetics,Zunyi Medical University,Zunyi 563003;²Department of Carcinoma,the Second People's Hospital of Kaifeng,Kaifeng 475000;³Department of Physiology,Zunyi Medical University,Zunyi 563003,China)

[Abstract] Objective:The aim of this study was to investigate the interventional effects of breviscapine on myocardial tissue of and neuropeptide Y level of diabetic rats. Methods:Experimental diabetes model of wistar rats were established by intraperitoneal injection of streptozotocin. They were randomly divided into untreated group,insulin treatment group,low dose breviscapine intervention group,high dose breviscapine intervention group and normal control group. The body weight and blood glucose at state of empty stomach were measured before execution. Furthermore,cardiac mass index and heart coefficient of rats were measured after execution. NPY levels in plasm and myocardial tissue were measured by radioimmunoassay (RIA). The pathologic changes of myocardium were observed using HE staining. Results:Cardiac mass index,heart coefficient and NPY levels in plasma and myocardial tissue of diabetic rats were significantly increased. Various pathological changes were observed in diabetic rats. TRI and breviscapine intervention improved myocardial tissue pathological changes of diabetic rats,the effect of high dose intervention of breviscapine is similar to that of insulin therapy. NPY levels were decreased in plasma during breviscapine intervention,while increased in myocardial tissue. The results showed that NPY levels were significantly higher in diabetic rats as compared with control group. Conclusion:Breviscapine didn't reduce the level of blood glucose,however,it improved physiological functions,such as myocanrdium hypertrophy and cardiac function in rats with diabetic cardiomyopathy.

[Key words] breviscapine;diabetic;myocardium;neuropeptide Y

[Acta Univ Med Nanjing,2014,34(02):164-167]

[基金项目] 贵州省教育厅基金资助(2004213);贵州省卫生厅基金资助(2004)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:lxh680718@yahoo.com

糖尿病 (diabetes mellitus,DM) 及其并发症已成为全球共同关注的重大卫生问题^[1-2],因此,控制和延缓 DM 及其并发症发生发展刻不容缓。而糖尿

病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM) 为 DM 最常见的并发症之一,降低 DM 的心血管并发症发生率已成为目前医学研究中的热点。既往 DCM 发病机制主要集中于代谢异常、胰岛素抵抗、氧化应激、细胞因子等作用,但 DM 神经内分泌机制的研究少见报道。神经肽 Y(neuropeptide, NPY)是新近发现的存在于哺乳动物中枢神经系统和外周组织的生物活性多肽,参与机体广泛的生理功能调节,与 DM 的发病密切相关。最新研究发现, NPY 表达和释放异常增加直接或间接参与了 DM、DM 肾病的发病^[3-4],文献报道 DCM 大鼠血浆、心肌组织内 NPY 水平升高,心肌收缩力下降,提示 NPY 是加重心肌病变的因素^[5-6]。因此,推测 NPY 可能参与了 DM 心肌病的致病过程。Eric 等^[7]报道 NPY 的释放增加或减少伴随缺血性心肌疾病的整个病程,但尚不清楚 NPY 是否具有保护心功能作用。传统中药灯盏花素因其独特的疗效和安全低毒的特点已得到社会的认可,并广泛应用于临床。除用于心脑血管的疾病外,也逐渐用于 DM 肾病、肝脏、心脏、周围神经病变以及肺心病等的治疗^[8]。但是灯盏花素干预和胰岛素治疗 DM 过程中是否 NPY 水平也发生相应变化,未见文献报道。本实验拟用链脲佐菌素(streptozocin, STZ)制备实验性 DM 大鼠模型,给予不同剂量灯盏花素干预以探讨灯盏花素对 DCM 的改善作用及神经肽 Y 的水平影响。

1 材料和方法

1.1 材料

选用清洁级 6 周龄健康 Wister 雄性大鼠 100 只,体重(220 ± 30)g[北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证编号(SCXK 京)2009-0004]。常规适应性喂养 1 周以后,将成年雄性 Wister 大鼠一次性腹腔注射链脲佐菌素诱导 T1DM 模型,对照组注射等体积柠檬酸缓冲溶液。72 h 后,以禁食 17 h 空腹血糖(FPG > 11.1 mmol/L)作为成模的判断依据。2 周后,将建模成功的大鼠随机分为:①糖尿病模型组:注射等体积的 0.9%氯化钠注射液;②胰岛素治疗组:注射胰岛素 6 U/(kg·d);③灯盏花素低剂量干预组:注射灯盏花素 50 mg/(kg·d);④灯盏花素高剂量干预组:注射灯盏花素 100 mg/(kg·d);连续注射 2 周,第 7 周处死大鼠,每周测体重 1 次,每 3 d 测血糖 1 次,期间动物自由饮水、饮食。

本研究所用的胰岛素、灯盏花素用 0.9% 氯化钠溶解,剂量参照相关文献^[9-10],每日新鲜配制,治

疗 2 周后检测相关指标。

1.2 方法

1.2.1 血糖检测

血糖仪检测血糖水平,血糖测定采用中国三诺安稳公司安稳血糖仪。

1.2.2 NPY 水平检测

放射法测定血清、心肌组织 NPY 的水平,试剂盒购于北京普尔伟业生物科技有限公司。

1.2.3 心脏各项指标的测定

大鼠麻醉后开胸快速取心脏,4℃ 预冷生理盐水冲洗后用电子天平称心脏质量。以心脏/体重的比值为心脏重量指数;以左室质量/体重的比值(即心系数)作为反映 DM 大鼠心肌左室肥厚严重程度的指标。

1.2.4 心肌组织形态学观察

部分心肌组织标本经 10%中性福尔马林溶液固定,常规梯度乙醇脱水,石蜡包埋,制成厚 4 μm 石蜡切片,HE 染色,光镜观察心肌组织病理变化。

1.3 统计学方法

统计分析采用 SPSS17.0 软件包处理,本实验所有数据均以均数 + 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 SNK-*q* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体重、空腹血糖的变化

与正常对照组相比,其余组大鼠体重显著减轻,血糖水平明显上升($P < 0.05$);与糖尿病模型组比较,胰岛素治疗组、高、低剂量灯盏花素干预组大鼠体重无明显变化($P > 0.05$),除胰岛素治疗组血糖水平有下降趋势外($P < 0.05$),余各组血糖值未见明显变化($P > 0.05$,表 1)。

表 1 各组大鼠空腹血糖、体重的比较

Table 1 Comparison of fasting blood glucose levels and body weight in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	体重(g)	血糖(mmol/L)
正常对照组	8	331.30±17.50	5.20±0.63
糖尿病模型组	8	244.91±32.50*	20.15±3.47*
胰岛素治疗组	8	232.13±23.61*	16.72±2.09**
低剂量灯盏花素组	8	252.86±21.50*	20.17±5.32*
高剂量灯盏花素组	8	226.93±24.79*	21.21±4.54*

与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与糖尿病模型组比较,** $P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠心脏重量指数与心系数的变化

7 周初,心脏重量指数、心系数显著增高($P < 0.05$),但心脏重量指数在各组间大致相似($P > 0.05$);与糖尿病模型组比较,胰岛素治疗组、高剂量

灯盏花素组心系数下降 ($P < 0.05$), 低剂量灯盏花素组未见明显变化 ($P > 0.05$, 表 2)。

表 2 各组大鼠体重、心脏重量指数与心系数的比较

Table 2 Comparison of body weight, heart weight index and heart coefficient ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	心脏重量指数(10^{-2})	心系数(10^{-2})
正常对照组	8	0.20±0.08	0.21±0.03
糖尿病模型组	8	0.27±0.03*	0.28±0.04*
胰岛素治疗组	8	0.27±0.02*	0.22±0.02#
低剂量灯盏花素组	8	0.26±0.05*	0.26±0.05
高剂量灯盏花素组	8	0.25±0.05*	0.24±0.04#

与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与糖尿病模型组比较, # $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠 HE 变化

HE 染色结果显示 (图 1), DM 大鼠左心室心肌细胞排列明显紊乱, 细胞间隙增宽, 心肌纹理欠清晰, 并有炎性细胞浸润及局灶性坏死, 说明 DM 大鼠发病早期存在心肌肥厚现象。对照组心肌未见异常。经予以胰岛素治疗后从组织形态上看心肌细胞肥大

不再明显, 纹理较清晰, 组织间隙无疏松。当分别给予低剂量、高剂量灯盏花素干预后, 心肌组织形态矫正等均同胰岛素的治疗效果, 基本接近对照组心肌组织的形态学改变。

2.4 各组大鼠血浆及心肌组织内 NPY 水平的变化

与对照组比较, DM 大鼠血浆 NPY 水平明显升高 ($P < 0.05$), 经低剂量灯盏花素干预后血浆 NPY 水平依然较高 ($P > 0.05$), 而当给予胰岛素治疗、高剂量灯盏花素干预后血浆 NPY 水平显著下调 ($P < 0.05$), 接近正常水平, 而高剂量灯盏花素干预组与胰岛素治疗组的疗效无明显差别 ($P > 0.05$)。

与对照组比较, DM 大鼠心肌组织中 NPY 水平无明显变化 ($P > 0.05$), 经胰岛素治疗、低剂量灯盏花素干预后心肌组织中 NPY 水平值有上升趋势, 但变化不显著 ($P > 0.05$), 而经高剂量灯盏花素干预后心肌组织中 NPY 水平显著上调 ($P < 0.05$, 表 3)。

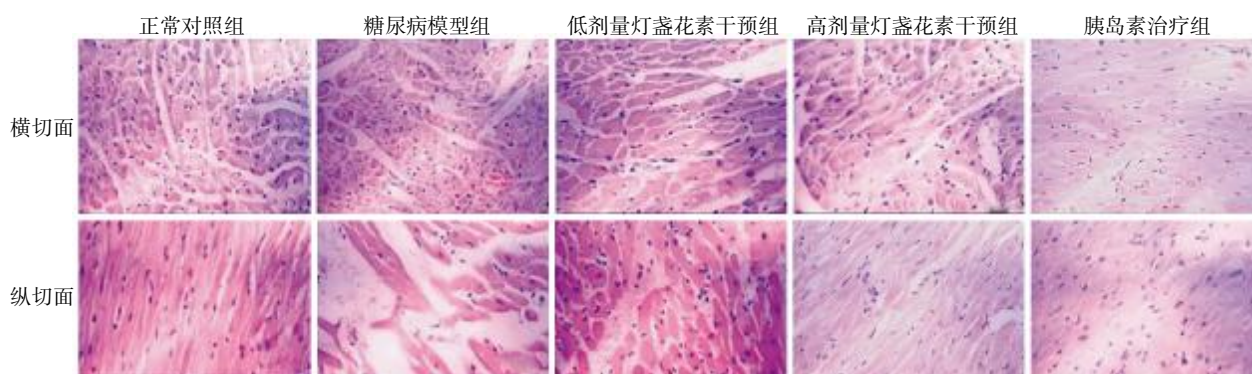


图 1 各组大鼠心脏病理改变(HE, $\times 400$, $n = 8$)

Figure 1 The myocardium pathological changes in rats of five groups(HE, $\times 400$, $n = 8$)

表 3 各组大鼠血浆及心肌组织内 NPY 水平的比较

Table 3 Comparison of NPY levels of plasma and heart muscle tissue (pg/ml , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	血浆	心肌组织
正常对照组	8	643.59±139.59	94.74±33.01
糖尿病模型组	8	1144.23±173.41*	115.86±23.22
胰岛素治疗组	8	827.55±212.70#	153.80±46.67
低剂量灯盏花素组	8	1225.16±212.70*	167.91±88.74
高剂量灯盏花素组	8	662.79±200.10#	261.19±114.86**
F 值		14.236	6.649
P 值		<0.001	<0.001

与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与糖尿病模型组比较, # $P < 0.05$ 。

3 讨论

本研究以大剂量 STZ 单次腹腔注射建立 T1DM 模型。造模成功的大鼠除了多饮、多食、多尿、体毛

枯黄、动作迟缓等典型的症状外, 空腹血糖均 > 11.1 mmol/L、体重下降明显、血糖增高, 且在第 7 周初实验终止时, 左心室肥厚的指标(心系数及心脏重量指数)均增加; DM 大鼠心肌 HE 染色显示心肌细胞肥大、肿胀、变性, 并有炎性细胞浸润等病理改变, 符合 DCM 早期的病理表现, DCM 模型建立成功。

本研究发现, 早期 DCM 大鼠心脏重量指数、心系数增加, 心肌组织病理改变也提示其心肌细胞肥大、炎性细胞浸润、灶性坏死等, 与 Yu 等^[1]研究结果一致。当使用胰岛素治疗、灯盏花素干预后, 其相应心功能指标及心肌组织的病理变化均得到不同程度的改善, 以高剂量灯盏花素最为明显。故认为灯盏花素对 DM 大鼠的心肌改善有促进作用。

NPY 为一种含有 36 个氨基酸的生物活性多肽, 在心血管系统中广泛分布, 与去甲肾上腺素共存

于交感神经末梢,并与其共同释放到外周组织中,具有协同增强去甲肾上腺素的缩血管作用,因此,近年来 NPY 与 DCM 的关系颇受关注。本研究结果显示,灯盏花素可以改善 DM 大鼠心肌结构和功能。同时,本实验将灯盏花素引起的心肌结构和功能改善与血浆和心肌组织 NPY 水平变化进行同步研究,揭示 DM 大鼠心功能与 NPY 水平的相关性。临床体内实验证实,充血性心力衰竭患者血浆 NPY 水平增高的程度与心功能分级呈正相关^[12],心功能越差,血浆 NPY 水平越高,反之,血浆 NPY 水平也降低。因此,有学者报道,血浆 NPY 水平是心血管疾病诊断和治疗的有效指标^[13-14]。本实验 7 周初,DM 大鼠血浆 NPY 水平较正常大鼠明显升高,当分别给予胰岛素治疗、高剂量灯盏花素干预后,DM 大鼠血浆 NPY 水平下降(表 3),以高剂量灯盏花素尤为显著。虽然低剂量灯盏花素干预后 DM 大鼠血浆 NPY 值升高,但无统计学意义 ($P > 0.05$),作者认为这可能为实验中偶发因素造成。在心肌组织中,DM 大鼠心肌组织中 NPY 水平较正常大鼠无明显变化;当使用低剂量灯盏花素干预后,其 NPY 水平没有出现明显变化;但使用高剂量灯盏花素后其 NPY 水平上升 ($P < 0.05$),超过了胰岛素治疗组心肌组织中 NPY 水平。可见,胰岛素发挥治疗作用的同时 NPY 水平上升,灯盏花素促进 DM 大鼠心肌改善的同时也出现了 NPY 水平的上升,推测可能是对大剂量药物干预的应激。阿兰达^[15]曾通过动物实验证明,应激性心肌病大鼠心肌组织中 NPY 呈明显高表达。当机体处于应激状态时,儿茶酚胺类物质增加,通过多巴胺系统直接影响下丘脑 NPY 的释放,具体详细机制尚不清楚。Robina 等^[16]认为,慢性 2 型 DM 心肌组织中 NPY 表达增加可能参与了心脏重建,造成了血清和心肌组织 NPY 水平的差异性改变。因此,血浆 NPY 水平变化可能与大鼠 DCM 的发生发展及保护有关,但其保护机制有待更深入的研究阐明。

[参考文献]

- [1] 莫一菲,周 健,贾伟平. 国际糖尿病联盟 2011~2021 年全球糖尿病计划解读 [J]. 中国医学前沿杂志:电子版,2012,4(9):20-23
- [2] Beaglehole R, Bonita R, Horton R, et al. Priority actions for the non-communicable disease crisis [J]. *Lancet*, 2011, 377(9775): 1438-1447
- [3] Jaakkola U, Kallio J, Heine RJ, et al. Neuropeptide Y

- polymorphism significantly magnifies diabetes and cardiovascular disease risk in obesity: the Hoorn Study [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2009, 63(1): 150-152
- [4] Chen Y, Qin W, Luo X, et al. Effect of breviscapine on neuropeptide Y and its Y2 receptor expression in streptozotocin induced diabetic rats [J]. *Chin J Public Heal*, 2010, 26(10): 1275-1276
 - [5] 李国强. 神经肽 Y 和糖尿病心肌病关系初步研究及运动对大鼠糖尿病心肌病的影响[D]. 河北医科大学硕士学位论文, 2006
 - [6] Zhang XM, Shen F, Xu ZY, et al. Expression changes of thrombospondin-1 and neuropeptide Y in myocardium of STZ-induced rats [J]. *Int J Cardiol*, 2005, 105(2): 192-197
 - [7] Alston EN, Parrish DC, Hasan W, et al. Cardiac ischemia-reperfusion regulates sympathetic neuropeptide expression through gp130-dependent and independent mechanisms [J]. *Neuropeptides*, 2011, 45(1): 33-42
 - [8] 朱发彦, 杨 芳, 王建军, 等. 灯盏花中黄酮类化合物的研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(10): 5853-5857
 - [9] 汪 枫, 陈孝宇, 左 莉, 等. 胰岛素对糖尿病大鼠肾小管骨桥蛋白表达的影响 [J]. *中华疾病控制杂志*, 2008, 12(4): 343-346
 - [10] Wang M, Zhang WB, Zhu JH, et al. Breviscapine ameliorates cardiac dysfunction and regulates the myocardial Ca^{2+} -cycling proteins in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Acta Diabetologica*, 2010, 47(1): 209-218
 - [11] Yu W, Wu J, Cai F, et al. Curcumin alleviates diabetic cardiomyopathy in experimental diabetic rats [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52013
 - [12] McDermott BJ, Millar BC, Piper HM. Cardiovascular effects of neuropeptide Y: receptor interactions and cellular mechanisms [J]. *Cardiovasc Res*, 1993, 27(6): 893-905
 - [13] Zheng Q, Bao Y, Yang Y. The Clinical application of determination of plasma NPY levels for diagnosis and treatment of cardiovascular diseases [J]. *J Radioimmunol*, 2010, 23(1): 18-19
 - [14] Morris MJ, Cox HS, Lambert GW, et al. Region-specific neuropeptide Y overflows at rest and during sympathetic activation in humans [J]. *Hypertension*, 1997, 29(1 Pt 1): 137-143
 - [15] 阿兰达. 大鼠应激性心肌病神经肽 Y 和 PGC-1 α 表达的实验研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2010
 - [16] Matyal R, Mahmood F, Robich M, et al. Chronic type II diabetes mellitus leads to changes in neuropeptide Y receptor expression and distribution in human myocardial tissue [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 665(1-3): 19-28
- [收稿日期] 2013-04-17