



厦门大学学报(自然科学版)  
*Journal of Xiamen University(Natural Science)*  
ISSN 0438-0479,CN 35-1070/N

## 《厦门大学学报(自然科学版)》网络首发论文

题目: 瓜蒌薤白半夏汤通过调整氧化应激激活 PI3K/Akt/eNOS 通路发挥对 II 型糖尿病合并急性心肌缺血的保护作用

作者: 孙笛洋, 荀丽英, 周继栋, 杨玉婕, 王蕾, 赵启韬

收稿日期: 2021-09-11

网络首发日期: 2022-05-06

引用格式: 孙笛洋, 荀丽英, 周继栋, 杨玉婕, 王蕾, 赵启韬. 瓜蒌薤白半夏汤通过调整氧化应激激活 PI3K/Akt/eNOS 通路发挥对 II 型糖尿病合并急性心肌缺血的保护作用[J/OL]. 厦门大学学报(自然科学版).  
<https://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1070.N.20220505.1542.002.html>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

# 瓜蒌薤白半夏汤通过调整氧化应激激活 PI3K/Akt/eNOS 通路发挥对 II 型糖尿病合并急性心肌缺血的保护作用

孙笛洋<sup>1</sup>, 荀丽英<sup>2</sup>, 周继栋<sup>1</sup>, 杨玉婕<sup>1</sup>, 王蕾<sup>1</sup>, 赵启韬<sup>2\*</sup>

(1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355; 2. 山东中医药大学中医学院, 山东 济南 250355)

\*通信作者: qitaozhao@163.com

**摘要** 以调整氧化应激状态、激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路为切入点, 探讨瓜蒌薤白半夏汤(GXBD)保护 II 型糖尿病合并急性心肌缺血(T2DM-AMI)的作用机制。将 36 只大鼠随机分为对照组(Ctrl)、模型组(T2DM-AMI)、瓜蒌薤白半夏汤组(GXBD), 每组 12 只, 对 T2DM-AMI 组、GXBD 组联合使用灌服高脂乳剂(HFE)、腹腔注射链脲佐菌素(STZ)、冠脉结扎 3 种方法制造 T2DM-AMI 大鼠模型。GXBD 组用瓜蒌薤白半夏水煎液干预。四唑红(TTC)染色检测心肌梗死率, 苏木素-伊红(HE)染色测其病理损伤情况, 酶联免疫(ELISA)法检测血浆氧化损伤成分氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)、晚期糖基化终产物(AGEs)、黄嘌呤氧化酶(XO)、髓过氧化物酶(MPO)、血浆抗氧化成分一氧化氮(NO)、硫氧还蛋白(Trx)、硫氧还蛋白还原酶(TrxR)、无机硝酸盐(NOx), 以及总自由基(T-ROS)总抗氧化能力(T-AOC)的含量或活性。蛋白质印迹(Western blot)方法检测心肌组织磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)和内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的蛋白表达及磷酸化水平。聚合酶链式反应(RT-PCR)检测其中 *Pi3k*、*Akt* 和 *eNOS* 基因的 mRNA 表达水平。结果显示 T2DM-AMI 大鼠心肌梗死严重, 血液中上述 4 种氧化损伤成分及 T-ROS 水平显著升高, 4 种抗氧化成分及 T-AOC 水平显著降低, 心肌组织中 PI3K、Akt 和 eNOS 蛋白表达及磷酸化水平显著下调, 相应基因的 mRNA 表达水平同样显著下降, 而 GXBD 干预可显著逆转这些病理变化。综上, GXBD 可能通过提高抗氧化能力、清除自由基、纠正异常的氧化应激状态、激活心肌组织中 PI3K/Akt/eNOS 信号通路, 发挥对 T2DM-AMI 的保护作用。

**关键词** 瓜蒌薤白半夏汤; II 型糖尿病; 心肌缺血; 氧化应激; PI3K/Akt/eNOS 通路

中图分类号 R 96

文献标志码 A

DOI: 10.6043/j.issn.0438-0479.202109017

## Gualou Xiebai Banxia decoction has a protective effect on type II diabetes mellitus complicated with acute myocardial ischemia by regulating the activation of PI3K/Akt/eNOS pathway by oxidative stress

SUN Diyang<sup>1</sup>, XUN Liying<sup>2</sup>, ZHOU Jidong<sup>1</sup>, YANG Yujie<sup>1</sup>, WANG Lei<sup>1</sup>, ZHAO Qitao<sup>2\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

**Abstract** By adjusting oxidative stress state and activating PI3K/Akt/eNOS signaling pathway, this paper explores the mechanism of Gualou XieBaxia decoction (GXBD) in protecting type II diabetes mellitus complicated with acute myocardial ischemia (T2DM-AMI), and partially reveals the scientific connotation of "eliminating phlegm and eliminating arthralgia" of GXBD. T2DM-AMI rat model was made by gavage of high-fat emulsion (HFE), intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) and coronary artery ligation, and GXBD water decoction was used for intervention. TTC staining was used to detect the myocardial infarction rate, HE staining was used to detect the pathological damage, ELISA was used to detect the content of oxidative stress components in plasma, and Western blot was used to detect the protein expression and phosphorylation levels of PI3K, AKT and endothelial nitric oxide synthase (eNOS). The mRNA expression levels of PI3K and other genes were detected by RT-PCR. Results showed that T2DM-AMI rats had severe myocardial infarction, abnormal content of oxidative stress components in blood, and significantly down-regulated expression and phosphorylation levels of the above three

收稿日期: 2021-09-11

基金项目: 国家自然科学基金(81573852); 山东省自然科学基金(ZR2019BH017)

网络首发时间: 2022-05-06 13:57:10 网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1070.N.20220505.1542.002.html>

proteins in myocardial tissue. mRNA expression levels of the genes were also significantly reduced. GXBD intervention can significantly reduce the rate of myocardial infarction, improve the pathological damage of the myocardium, increase the content of antioxidant components such as Trx and total antioxidant capacity in the blood, reduce the content of oxidative damage components such as AGEs and the level of total free radicals, regulate the abnormal oxidative stress state of the model rats. At the same time, the expression level and phosphorylation level of PI3K and mRNA expression level of the corresponding genes were significantly up-regulated in myocardial tissue. As a conclusion, by improving oxidative stress state, GXBD can activate PI3K/Akt/eNOS signaling pathway in myocardial tissue, thus playing a protective role against T2DM-AMI. This study partially revealed the mechanism of GXBD in the intervention of diabetes mellitus complicated with coronary heart disease, and its biological connotation of "eliminating phlegm and dispersing constipation, opening chest and removing arthralgia".

**Key words** Gualou Xiebai Banxia decoction; type II diabetes mellitus; myocardial ischemia; oxidative stress; PI3K/Akt/eNOS pathway

糖尿病(DM)患者缺血性心脏病的发病率是非糖尿病患者的 2~4 倍,而且更易出现心肌梗死、心力衰竭等心血管事件<sup>[1]</sup>。因此,DM 的心肌缺血保护是一个亟待解决的重要问题。

该类疾病属于中医的“胸痹、心痛”范畴。DM 患者血液中高血脂、高血糖,及其有害代谢产物会逐渐损伤心血管,发展为心血管并发症,进而导致心肌缺血、心绞痛等。对于该病理过程,中医学解释为“痰浊致瘀”。瓜蒌薤白半夏汤(GXBD)是中医临床治疗该类病症的经典方剂,疗效显著且无明显副作用<sup>[2-3]</sup>。对于该方的作用机制,传统中药理论宏观而模糊地解释为“祛痰散结、开胸除痹”;然而其现代科学内涵至今不明,其疗效的提高以及进一步的精制研发因而受到严重的制约。

本研究前期发现,对 II 型糖尿病合并急性心肌缺血(T2DM-AMI)大鼠, GXBD 水煎液可显著降低其血脂含量、血清 5 项心肌酶活性,以及心肌梗死面积,同时也显著升高了其血清内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的活性、一氧化氮(NO)的含量<sup>[4-5]</sup>;对体外缺血缺氧损伤的大鼠原代心肌细胞、骨髓间充质干细胞,该方水提物及有效部位均可显著改善其生长状态,降低其凋亡率,同时还显著上调了细胞内磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)及蛋白激酶 B(PKB/Akt)的蛋白表达及磷酸化水平<sup>[6-7]</sup>。因而推测 GXBD 可能通过激活心肌细胞 PI3K/Akt/eNOS 信号通路发挥干预 T2DM-AMI 的作用。

众所周知,PI3K/Akt/eNOS 信号通路是维持细胞生存的关键通路,其中任何一种信号蛋白的异常,都会严重影响细胞的生存<sup>[8-9]</sup>。而该通路在自由基攻击下,会改变其调控方向,由维持细胞生存转而促使细胞凋亡<sup>[10-11]</sup>。生理条件下,PI3K 诱导 Akt 磷酸化,p-Akt 导致下游 eNOS 的磷酸化<sup>[10]</sup>。p-eNOS 以 L-精氨酸为底物,在四氢生物喋呤(BH4)辅助下合成一氧化氮(NO)。而在过度氧化应激状态下,BH4 被自由基、过氧化物所氧化,从而使 eNOS 蛋白解偶联失活,转而催化产生 O<sub>2</sub><sup>-</sup>而不是 NO,从而导致细胞凋亡<sup>[11]</sup>。AMI 发生后,心脏处于异常的氧化应激状态。由于线粒体呼吸链电子传递中断、缺血区补体系统的激活及儿茶酚胺自动氧化等,心肌细胞活性氧(ROS)、活性氮(RON)等产量急剧增加,从而使 PI3K、Akt、eNOS 等蛋白失活,导致心肌细胞的大量凋亡<sup>[12]</sup>。

为探究 GXBD 是否通过清除自由基,逆转 AMI 后异常的氧化应激状态,从而激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路,抑制心肌细胞凋亡,发挥干预 T2DM-AMI 作用,本研究采用 GXBD 水煎液干预 T2DM-AMI 大鼠模型;检测各组大鼠血液中总自由基(T-ROS)、主要氧化损伤成分,如晚期糖基化末端产物(AGEs)、氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)、黄嘌呤氧化酶(XO)、髓过氧化物酶(MPO)等<sup>[13-14]</sup>,以及总抗氧化能力(T-AOC)、主要抗氧化成分,如硫氧还蛋白(Trx)、硫氧还蛋白还原酶(TrxR)等<sup>[15]</sup>;同时分析各组动物心肌组织中 PI3K、Akt 及 eNOS 的蛋白表达及磷酸化水平;旨在以改善氧化应激,调控 PI3K/Akt/eNOS 通路为切入点,探讨 GXBD 保护 T2DM-AMI 的作用机制,部分揭示其“开胸除痹、祛痰散结”的科学内涵。

## 1 材料

### 1.1 试剂

GAPDH 大鼠单克隆抗体、HRP 标记的山羊多克隆抗体抗大鼠 IgG 及总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒购自英国 Abcam 公司(ab9484、ab6789 及 ab65329);PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、eNOS 及 p-eNOS

兔多克隆抗体购自美国 Affinity Biosciences 公司(AF5112、AF4369、AF6261、AF0016、AF0096、AF3247); RNA 提取试剂盒(PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser)、SYBR 定量试剂盒(Power SYBR Green Master Mix9767)购自日本 Takara 公司(RR047A、RR820A)、硫氧还蛋白(Trx)、硫氧还蛋白还原酶(TrxR)、无机硝酸盐(NOx)试剂盒购自美国 Cayman 公司(11526-1、11526-1、#780001), 黄嘌呤氧化酶(XO,8458)试剂盒购自美国 Sciencell 公司, 链脲佐菌素(STZ, IS0250)购自中国北京 Solarbio 公司, 氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)、晚期糖基化终产物(AGEs)试剂盒购自中国武汉 Bio-swamp 公司(RA20455、RA20685), 髓过氧化物酶(MPO,mL003250)试剂盒购自中国上海 MLbio 公司。

瓜蒌(*Furctus trichosanthis*)、薤白(*Bulbus allii macrostemonis*)、半夏(*Ruizoma pinelliae*)均购自山东中医药大学附属医院, 经山东中医药大学药学院中药鉴定教研室郭庆梅教授鉴定, 品质上乘。黄酒, 购自即墨黄酒厂。

瓜蒌薤白半夏汤(Gualou Xiebai Banxiadecoction, GXBD)的制备: 瓜蒌、薤白、半夏(比例 8:3:4。每 1000 g 药材配黄酒 550 mL)加水至盖过药材浸泡 2~3 h 后, 水开小火煎煮 20 min, 倒出第 1 份药液。加热水浸过药物煎煮 15 min 倒出第 2 份药液。合并两次的水煎液抽滤浓缩至生药浓度为 1 g/mL 的煎液。-20 °C 保存备用。用时 37 °C 水浴加热后按 20 g/kg d 剂量灌胃。

高脂乳剂(Highfatemulsion, HFE)的制备: 参考荀丽英等的方法<sup>[7]</sup>, 将胆固醇、猪油、胆酸钠、丙基硫氧嘧啶、吐温-80、丙二醇、蒸馏水按体积比为 10:20:2:1:20:20:30 配制。首先将猪油加热融化搅拌, 依次加入胆固醇、胆酸钠和丙基硫氧嘧啶, 搅拌均匀。再加入吐温-80、丙二醇和蒸馏水, 待固体完全溶解后, 冷却至室温。-20 °C 冰箱保存备用。用时 37 °C 水浴融化按 1mL/100g d 剂量灌胃。该剂量是本研究长期摸索出的最佳剂量。

## 1.2 实验动物

健康 SPF 级 SD 大鼠, 30 只, 体质量(200±20) g, 购自北京维通利华实验动物中心有限公司, 许可证号: SCXK(京)2016-0006。于 SPF 级动物房进行饲养, 饲养条件: 温度(25±0.5) °C, 相对湿度 40%~70%, 12 h 明暗循环, 自由进食饮水, 适应性饲养 7 d 后开展实验。实验动物的饲养、处置过程得到山东中医药大学实验室动物管理和使用委员会的批准(批号: SDTUCM20160512001), 符合中华人民共和国科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》和山东中医药大学伦理委员会的标准。

## 2 方 法

### 2.1 实验设计

大鼠随机分为对照组(Ctrl)、模型组(T2DM-AMI)和瓜蒌薤白半夏汤组(GXBD)。除 Ctrl 组外, 其余大鼠均灌服 HFE。分别于实验开始的第 7、14 及 21 天对所有大鼠进行血脂检测, 剔除血脂升高不明显的大鼠。第 22 天对高脂血症大鼠, 腹腔注射 STZ 制备 T2DM 模型。第 25 天, 检测各组大鼠空腹及进食后 2 h 血糖含量, 并进行口服葡萄糖耐量实验(OGTT)。剔除血糖升高不显著的动物。第 28 天, GXBD 组大鼠上午灌服 HFE, 下午灌服 GXBD, 连续给药 12 d。在相同的时间内, T2DM-AMI 组灌服 HFE+同体积的生理盐水(NS), Ctrl 组上午、下午均灌服同体积 NS。第 36 天, GXBD、T2DM-AMI 组进行冠脉结扎手术。第 39 天, 所有动物全部处死, 取心脏、血液, 并根据实验要求处理、保存备用。

为保证最终的实验数据符合统计学要求, 实验开始时每组 10 只大鼠, 实验结束时每组随机取 8 只大鼠的数据进行统计学处理。

### 2.2 动物模型制备

为客观模拟 II 型糖尿病合并冠心病的发病过程, 参考本课题组前期实验方法, 采用三步法建立 T2DM-AMI 大鼠模型<sup>[7]</sup>。首先 HFE 灌胃制备高脂血症模型造成大鼠体内胰岛素抵抗状态; 然后采用腹腔注射 STZ 制备 T2DM 模型; 最后, 结扎大鼠冠状动脉制备 T2DM-AMI 模型。

高脂血症模型: HFE 连续灌胃 3 周同时喂以普通饲料, 对照组灌服同等剂量的 NS 并喂以普通饲

料。分别于灌服高脂乳后第 14 和 21 天,大鼠乙醚麻醉,眼眶取血,测定血浆血脂总甘油三脂(TG)、总胆固醇(TG)、低密度脂蛋白(LDL)及高密度脂蛋白(HDL)含量。与对照组相比,TC、TG 及 LDL 显著升高, HDL 显著降低者视为高脂血症造模成功。

**T2DM 模型:** 上述高脂血症大鼠过夜禁食, 单次腹腔注射高剂量 STZ (40 mg/kg d)。3 d 后, 大鼠空腹 18 h, 尾静脉取血, 检测血糖含量。同时给予葡萄糖水(2 g/kg)灌胃, 进行 OGTT, 2 h 后测餐后血糖。空腹血糖浓度大于 10 mmol/L 或者餐后血糖浓度大于 16.7 mmol/L 的视为成功的 T2DM 模型大鼠。

**T2DM-AMI 模型:** 取上述 T2DM 模型大鼠进行冠脉结扎手术。腹腔注射戊巴比妥(50 mg/kg)麻醉后, 连接呼吸机并进行气管插管。于左侧第 3、4 肋间开胸暴露心脏后, 以圆形无创伤缝合针、6/0 丝线于左冠状动脉前降支起始部下约 2 mm 处结扎, 连接生物机能实验系统。以心电图 ST 段抬高和心肌变暗红色为结扎成功的标志。

### 2.3 心肌梗死率检测

各组大鼠麻醉后取出心脏, NS 洗净。吸干表面 NS-20 °C 冷冻。约 0.5 h 后从结扎线下方切成厚度约 1~2 mm 且厚薄均匀的薄片。TTC 溶液 37 °C 避光孵育 15 min。然后取出拍照。梗死的心肌组织不能被 TTC 染色, 呈白色; 未梗死区域可被 TTC 染色, 呈红色。病理图像分析系统测算心肌切片上白色和红色区域的面积, 并计算心肌梗死率。心肌梗死率=梗死区面积/(梗死区面积+非梗死区面积)×100%。

### 2.4 心肌组织病理损伤检测

大鼠麻醉, 4%多聚甲醛预灌注后, 摘取心脏, 冰 PBS 洗净。4%多聚甲醛固定 24 h。常规脱水, 石蜡包埋, 切片(厚度 5 μm)后进行 HE 染色。显微镜下观察并拍照。

### 2.5 血浆氧化应激成分含量检测

腹主动脉取血, 肝素钠抗凝, 经 2000 r/min 离心 10 min 得血清。参照 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 生化分析仪检测其中 AGEs、ox-LDL、MPO、XO、T-AOC、Trx、TrxR 及 NO 的水平。

### 2.6 Western blot 检测

提取心肌组织蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 配制 10%聚丙烯酰胺凝胶, 进行还原性 SDS-PAGE 电泳。100 V 恒压 90 min, 湿法转膜(NC 膜)。5%脱脂奶粉的 TBST(含 0.05%吐温-20 的 TBS 缓冲液)封闭 2 h。一抗(GADPH 浓度 1:3000, PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、eNOS 及 p-eNOS 浓度均为 1:150)。4 °C 过夜孵育。TBST 洗膜 3 次, 10 min/次。二抗室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次, 10min/次。ECL 化学发光液显影。BIO-RAD 凝胶成像系统照相并进行定量分析。

### 2.7 RT-PCR 检测

提取心肌组织总 RNA, 并根据试剂盒说明书将 RNA 逆转录成 cDNA。利用 ABI 7500 实时 PCR 系统、TB Green Master Mix 和基因特异性引物进行基因扩增。引物序列见表 1。用  $\Delta\Delta C_T$  法对实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 结果进行相对定量分析。

表1 qRT-PCR引物序列  
Tab. 1 Sequences of qRT-PCR primers

| 基因名称         | 上游引物                          | 下游引物                        |
|--------------|-------------------------------|-----------------------------|
| <i>Pi3k</i>  | 5'-CGCAGATGATACTCCTGACACC-3'  | 5'-CAGACCCGCAGCACAAAA-3'    |
| <i>Akt</i>   | 5'-ATGGACTTCCGGTCAGGTTCA-3'   | 5'-GCCCTTGCCCAGTAGCTTCA-3'  |
| <i>eNos</i>  | 5'-CTGTGTGACCCTCACCATAACAA-3' | 5'-AGCACAGCCACGTTAATTCCA-3' |
| <i>Gapdh</i> | 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'  | 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3' |

### 2.8 数据统计

采用 SPSS 22.0 统计分析软件对实验数据进行组间 *t*-检验及方差分析, 实验数据以均数( $\bar{x}$ )±标准差(SD)表示,  $P < 0.05$  有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 GXBD 显著降低模型大鼠心肌梗死率

经 TTC 染色处理后，梗死的心肌组织呈白色，非梗死区域被染色呈红色。病理图像分析系统的定量分析结果显示：T2DM-AMI 组大鼠心肌缺血严重，心肌梗死率为(33.81±1.61)%；给予 GXBD 后大鼠心脏梗死面积显著减少，心肌梗死率较 T2DM-AMI 下降约 14%(图 1、表 2， $P<0.05$ )。

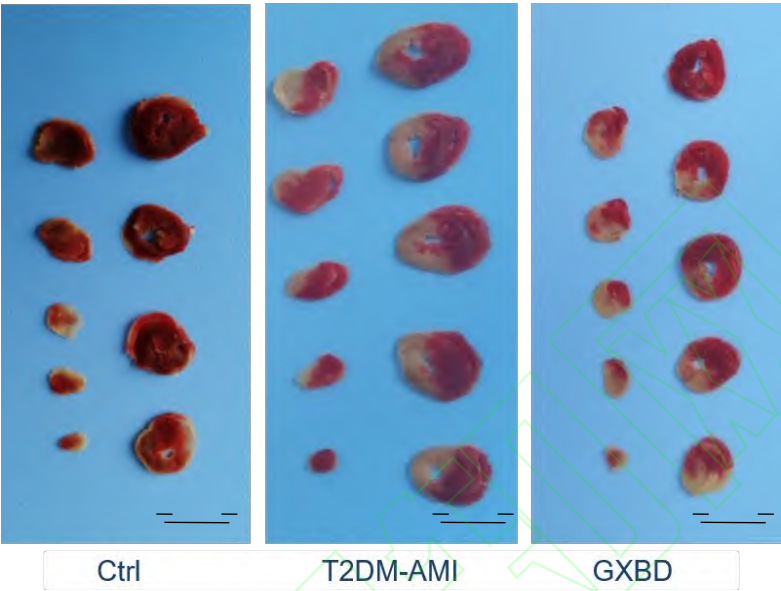


图 1 各组大鼠心肌组织 TTC 染色  
Fig. 1 TTC staining of rat myocardial tissue in each group

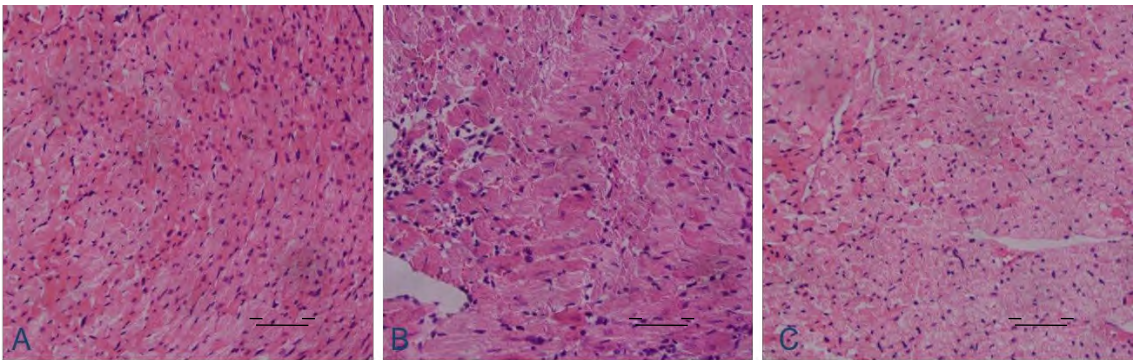
表2 各组大鼠心肌梗死率( $\bar{X} \pm s, n=8$ )  
Tab. 2 Myocardial infarction rate in each group( $\bar{X} \pm s, n=8$ )

| 组别       | 心肌梗死率/%                  |
|----------|--------------------------|
| Ctrl     | 3.21±1.45                |
| T2DM-AMI | 33.81±1.61 <sup>△△</sup> |
| GXBD     | 19.83±1.97 <sup>*</sup>  |

注：<sup>\*</sup>与 T2DM-AMI 组相比， $P<0.05$ ；<sup>△△</sup>与 Ctrl 组相比， $P<0.01$ 。

3.2 GXBD 显著减轻模型大鼠心肌组织病理损伤

各组大鼠心肌切片 HE 染色结果如图 2 所示。Ctrl 组心肌细胞大小规则、结构正常、组织排列整齐。T2DM-AMI 组可见大片梗死区域，梗死区心肌细胞排列紊乱，边界不清。GXBD 组心肌梗死区域明显减少，细胞不规则情况及坏死程度减轻(图 2)。



A~C 分别为 Ctrl、T2DM-AMI 和 GXBD 组，放大倍率 400 倍。

图 2 各组大鼠心肌组织石蜡切片 HE 染色照片  
Fig. 2 HE staining photos of paraffin sections of rat myocardial tissue in each group

3.3 GXBD 显著降低模型大鼠血浆心肌酶活性

血浆 CK、CK-MB 活性是衡量心肌细胞坏死程度的金指标。检测数据显示：T2DM-AMI 组血浆心肌酶 CK 和 CK-MB 活性显著升高，而 GXBD 组大鼠血浆该两种酶活性明显降低(表 3， $P<0.05$  或  $0.01$ )。

表3 各组大鼠血浆CK、CK-MB活性( $\bar{X} \pm s, n=8, U/L$ )  
Tab. 3 Plasma CK and CK-MB activities of rats in each group ( $\bar{X} \pm s, n=8, U/L$ )

| 组别    | Ctrl         | T2DM-AMI                   | GXBD           |
|-------|--------------|----------------------------|----------------|
| CK    | 181.21±14.62 | 453.86±37.07 <sup>△△</sup> | 204.90±20.51*  |
| CK-MB | 120.55±6.96  | 556.00±31.59 <sup>△△</sup> | 241.66±19.06** |

注：\*与 T2DM-AMI 组相比， $P<0.05$ ；<sup>△△</sup>与 Ctrl 组相比， $P<0.01$ 。

3.4 GXBD 调节模型大鼠血浆氧化应激成分的含量

用 ELISA 方法分别检测了各组大鼠血浆中 4 种氧化损伤成分 AGEs、ox-LDL、MPO 及 XO 的含量，并检测了其中总自由基(T-ROS)的水平。检测数据表明：与 Ctrl 组相比，T2DM-AMI 组血浆中上述 4 种氧化损伤成分及 T-ROS 水平均显著增加；而 GXBD 组大鼠血浆中上述成分水平均明显降低(表 4， $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。

表4 各组大鼠血浆氧化损伤成分水平( $\bar{X} \pm s, n=8$ )  
Tab. 4 Levels of oxidative damage components in plasma of rats in each group ( $\bar{X} \pm s, n=8$ )

| 成分             | Ctrl 组         | T2DM-AMI 组                   | GXBD 组           |
|----------------|----------------|------------------------------|------------------|
| AGEs (ng/mL)   | 379.58±35.09   | 1096.67±66.58 <sup>△△</sup>  | 830.42±57.45**   |
| ox-LDL (ng/mL) | 0.59±0.16      | 4.66±0.15 <sup>△△</sup>      | 2.37±0.19**      |
| MPO (U/L)      | 84.57±22.57    | 486.55±24.33 <sup>△△</sup>   | 371.09±14.67*    |
| XO (U/L)       | 29.90±2.16     | 65.69±4.04 <sup>△△</sup>     | 46.10±2.96**     |
| T-ROS          | 4566.45±251.21 | 7910.93±330.39 <sup>△△</sup> | 4998.03±248.24** |

注：\*、\*\*与 T2DM-AMI 组相比， $P<0.05$ 、 $P<0.01$ ；<sup>△△</sup>与 Ctrl 组相比， $P<0.01$ 。

检测数据表明：与 Ctrl 组相比，T2DM-AMI 组血浆中抗氧化成分 Trx、NO 及 TrxR 的水平显著降低( $P<0.05$ )；经 GXBD 干预后上述成分含量和总抗氧化能力均明显提高(表 5， $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。

表5 各组大鼠血浆抗氧化成分水平( $\bar{X} \pm s, n=8$ )  
Tab. 5 Levels of plasma antioxidant components in each group ( $\bar{X} \pm s, n=8$ )

| 成分          | Ctrl 组       | T2DM-AMI 组                | GXBD 组         |
|-------------|--------------|---------------------------|----------------|
| T-AOC (U/L) | 1.70±0.13    | 2.42±0.14 <sup>△</sup>    | 4.53±0.35**    |
| Trx (pg/mL) | 325.91±17.79 | 148.69±10.30 <sup>△</sup> | 273.61±16.52** |
| TrxR (mU/L) | 18.32±1.45   | 10.73±0.98 <sup>△</sup>   | 22.17±0.86**   |
| NO (μmol/L) | 57.00±3.25   | 29.10±1.23 <sup>△</sup>   | 41.85±0.85*    |

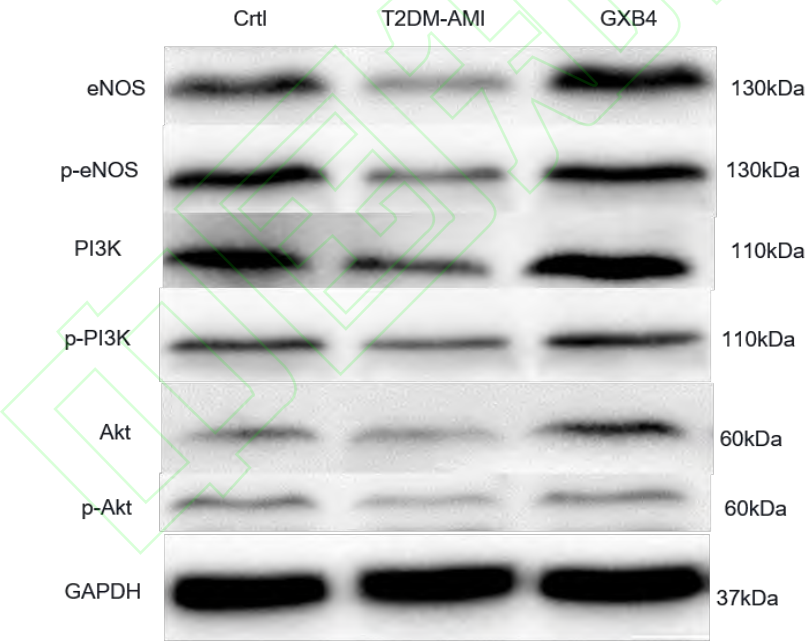
注：\*、\*\*与 T2DM-AMI 组相比  $P<0.05$ 、 $P<0.01$ ；<sup>△</sup>与 Ctrl 组相比  $P<0.05$ 。

3.5 GXBD 上调模型大鼠心肌组织 PI3K、Akt、eNOS 蛋白表达及其磷酸化水平

WB 检测结果显示，与 Ctrl 组相比，T2DM-AMI 大鼠心肌组织中 PI3K、Akt 及 eNOS 蛋白表达量均明显降低，而 GXBD 干预后上述 3 种蛋白表达水平显著上调(图 3、图 4(a)， $P<0.01$  或  $P<0.05$ )

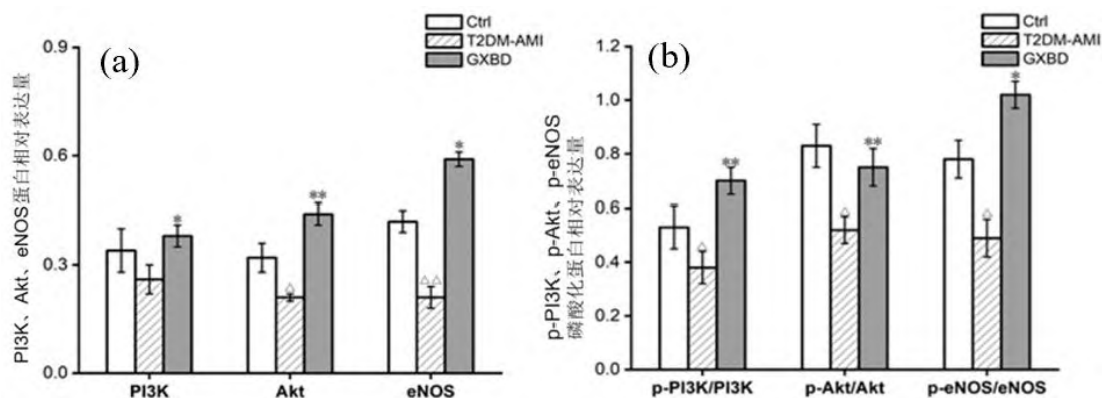
磷酸化是 PI3K、Akt 及 eNOS 蛋白的激活方式。本研究利用 3 种蛋白的磷酸化抗体，检测其磷酸化水平，检测结果显示，与 Ctrl 组相比，T2DM-AMI 大鼠心肌组织中 3 种蛋白的磷酸化蛋白/总蛋白的比值均显著降低；而 GXBD 干预后，上述情况被显著逆转(图 3、图 4(b)， $P<0.01$  或  $P<0.05$ )。

上述数据说明，在 T2DM-AMI 大鼠心肌中，PI3K 等 3 种蛋白的表达及激活均受到了显著抑制，而 GXBD 的干预则显著上调了上述蛋白的表达，并提高其激活程度。



各组大鼠心肌eNOS、PI3K、Akt蛋白表达条带图

图3 各组大鼠心肌组织中 PI3K、Akt、eNOS 总蛋白及其磷酸化蛋白表达条带  
Fig. 3 Expression bands of PI3K, Akt, eNOS total proteins and their phosphorylated proteins in myocardial tissue of rats in each group

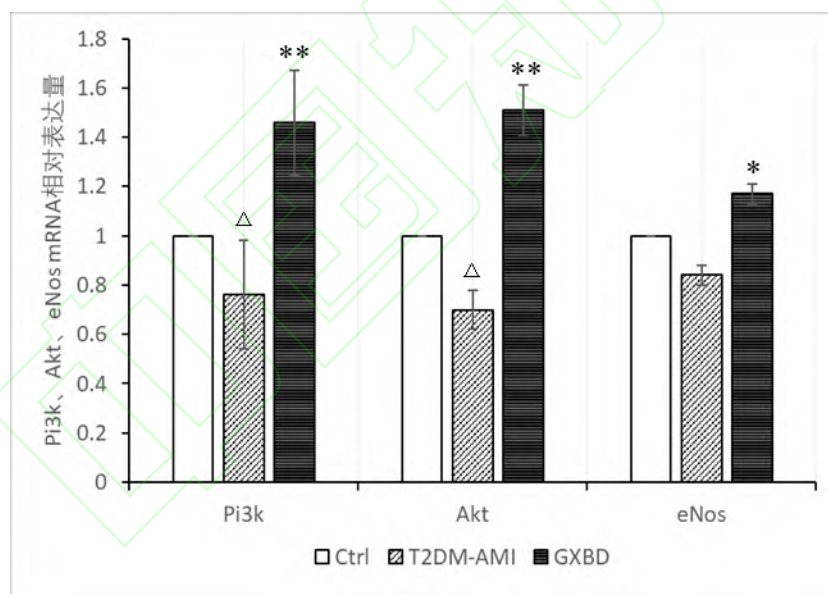


注: \*, \*\*与 T2DM-AMI 组相比  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ ;  $\triangle$ 、 $\triangle\triangle$ 与 Ctrl 组相比  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ .

图 4 各组大鼠心肌组织中(a)PI3K、Akt、eNOS 蛋白相对表达量, (b)p-PI3K、p-Akt、p-eNOS 磷酸化蛋白相对表达量  
Fig. 4 Relative expression levels of (a) PI3K, Akt and eNOS proteins, (b) p-PI3K, p-Akt and p-eNOS phosphorylated proteins in myocardium of rats in each group

### 3.6 GXBD 上调模型大鼠心肌组织 *Pi3k*、*Akt* 及 *eNos* 基因 mRNA 表达水平

RT-PCR 检测结果可进一步验证 WB 的结果。与 Ctrl 组相比, T2DM-AMI 大鼠心肌组织中 *Pi3k* 和 *Akt* mRNA 表达量均显著降低; GXBD 干预后 3 个基因的 mRNA 表达量均显著升高(图 5,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。这一结果说明, GXBD 可显著上调模型大鼠心肌组织 *Pi3k*、*Akt*、*eNos* 基因 mRNA 表达水平。



注: \*, \*\*: 与 T2DM-AMI 组相比  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ ;  $\triangle$ 、 $\triangle\triangle$ : 与 Ctrl 组相比  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ .

图 5 各组大鼠心肌组织中 *Pi3k*、*Akt*、*eNos* 的 mRNA 相对表达量  
Fig. 5 mRNA relative expression levels of *Pi3k*, *Akt* and *eNos* in myocardium of rats in each group

## 4 讨论与结论

瓜蒌薤白半夏汤出至汉代张仲景的《金匱要略》, 至今已有 2000 多年的使用历史<sup>[17]</sup>。其对痰浊阻闭型冠心病(含糖尿病合并冠心病)独特而显著的疗效早已被长期的中医临床实践所证明。该方仅含 3 味药材, 价格低廉, 开发价值很大。而明确其发挥药效的物质基础和作用机制是进一步精制研发的基础。

#### 4.1 PI3K/Akt/eNOS 通路是 GXBD 干预 T2DM-AMI 的重要环节

在前期基础上,本研究进一步发现:GXBD 在显著降低模型大鼠的心肌梗死率、减轻其心肌病理损伤的同时,显著提高了其血液 T-AOC,降低了其中 T-ROS,纠正了异常的氧化应激状态。同时,该方还显著上调了模型大鼠心肌组织内 *pi3k* 等三种基因的 mRNA 表达水平,以及 PI3K 等 3 种蛋白的表达及磷酸化水平,提高了磷酸化蛋白/非磷酸化蛋白的比值。这些结果表明,由于血液中氧化损伤成分含量过高,抗氧化成分水平相对过低,T2DM-AMI 大鼠心肌细胞中的 PI3K/Akt/eNOS 信号通路被严重破坏。GXBD 可能通过清除自由基,改善氧化应激状态,激活心肌细胞中 PI3K/Akt/eNOS 信号通路,从而发挥对 T2DM-AMI 的保护作用,对上述通路的激活可能与其抗氧化作用密切相关。

#### 4.2 GXBD 具有较强的抗氧化特性

清除氧自由基,纠正异常的氧化应激状态,是多种中药发挥药效的机制<sup>[18]</sup>。本研究首次发现,GXBD 可显著降低 T2DM-AMI 大鼠血液中 T-ROS 水平,表现出较强的抗氧化特征,以及清除自由基的能力。

AGEs 和 ox-LDL 是 T2DM 患者血液中两种主要的氧化损伤成分,二者含量的升高会加剧心肌梗死后的心力衰竭<sup>[12-13]</sup>。本研究表明,GXBD 可显著降低 T2DM-AMI 模型大鼠血液中这两种有害成分,其中对 ox-LDL 清除作用尤为显著。

黄嘌呤氧化酶(XO)、髓过氧化物酶(MPO)是体内 ROS 的主要生产者,也是 DM 心脑血管并发症的主要元凶。MPO 是天然免疫系统的主要效应酶,负责催化  $H_2O_2$  与氯离子反应生成初级氧化剂 HClO。该酶衍生的氧化剂通过氧化 LDL、HDL 大大降低 NO 的生物利用度,从而促进 CVD 的进展<sup>[19]</sup>。临床研究证实,T2DM 心血管并发症患者(T2DM-CVD)血清 MPO 水平显著升高,并与死亡风险呈正相关<sup>[20-21]</sup>。XO 是尿酸代谢的关键酶。大型人群前瞻性研究表明,血清 XO 活性升高增加了 T2DM 的患病率<sup>[22]</sup>;同时,T2DM-CVD 体内 XO 活性显著升高,导致了脂质过氧化反应的增强<sup>[23]</sup>。在 MI、I/R 损伤期间,XO 活性显著增强,这也是过量 ROS 的形成的重要因素<sup>[24]</sup>。本研究进一步证实了,血清 XO、MPO 活性的升高与 T2DM-AMI 密切相关;同时发现 GXBD 可显著降低模型动物体内这两种酶的活性。

#### 4.3 GXBD 对内源性抗氧化酶具有显著的保护作用

保护机体内源性的抗氧化系统,也是中药纠正氧化应激状态的重要机制<sup>[25]</sup>。硫氧还蛋白及其还原酶系统(Trx/TrxR)是机体主要的抗氧化系统,能够消除自由基,促进 NO 的释放,调节氧化应激<sup>[14]</sup>。多种研究表明,高糖状态会显著降低 Trx 活性;白藜芦醇、二甲双胍及普罗布考均可通过提高 Trx 的表达来降低血糖水平与心肌梗死范围<sup>[25-27]</sup>。本研究发现,T2DM-AMI 模型动物血浆中 TRx+TrxR 及 NO 水平显著降低,该系统功能下降与 DM-CVD 密切相关;而 GXBD 对该抗氧化系统有显著保护作用,从而提高了体内总抗氧化能力。

综上所述,本研究结果表明:依靠自身的抗氧化成分,清除机体内的自由基,或者保护机体内源性的抗氧化系统,提升其抗氧化能力,进而维护心肌细胞内 PI3K 等蛋白的完整性,激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路,可能是 GXBD 发挥 T2DM-AMI 心肌保护作用的重要机制,也是中药“祛痰散结、开胸除痹”功效在细胞内信号转导层次上的体现。

#### 参考文献:

- [1] [1] 杨礼,黄丽君,杨林军,等.白藜芦醇对 2 型糖尿病合并缺血再灌注大鼠模型氧化应激和心肌病理的影响[J].中国临床药杂志,2019,28(1):12-18.
- [2] [2] 高飞,荆莹飞,李静华,等.瓜蒌薤白半夏汤加减方治疗冠心病心绞痛的系统评价[J].中西医结合心脑血管病杂志,2018,16(23):3410-3415.
- [3] [3] 邢孔玉,曾德菲,邓靖,等.瓜蒌薤白半夏汤加减方治疗不稳定型心绞痛的临床观察[J].中国中医急症,2021,30(4):720-722.
- [4] [4] 荀丽英,李航,高兆慧,等.瓜蒌薤白半夏汤调节血脂及心肌保护作用的实验研究[J].山东中医药大学学报,2014,38(6):593-595.
- [5] [5] 郑梦梦,赵启韬,周继栋,等.瓜蒌薤白半夏汤促进 2 型糖尿病合并急性心肌缺血大鼠内皮祖细胞动员的作用及其机制[J].暨南大学学报(自然科学与医学版),2018,39(5):435-441.
- [6] [6] 薛慧文,李建锋,傅施施,等.瓜蒌薤白半夏汤不同提取部位对心肌细胞保护作用比较研究[J].药物评价研究,2018,41(1):

67-72.

- [7] 姜晶晶, 傅施施, 桑晓宇, 等. 瓜蒌薤白半夏汤正丁醇部位通过 PI3K/AKT 信号通路抑制缺血缺氧骨髓间充质干细胞凋亡[J]. 中药药理与临床, 2021, 37 (4): 2-7.
- [8] KIELCZEWSKI J L, JARAJAPU Y P R, MCFARLAND E L, et al. Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates vascular repair by enhancing nitric oxide generation[J]. *Circ Res*, 2009, 105: 897-905.
- [9] ZHANG X, HUANG L F, HUA L, et al. Resveratrol protects myocardial apoptosis induced by ischemia-reperfusion in rats with acute myocardial infarction via blocking P13K/Akt/e-NOS pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(4):1789-1796.
- [10] TIE G, YAN J, YANG Y, et al. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis in endothelial progenitor cells by inactivating the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway[J]. *Vasc Res*, 2010, 47 (6): 519-530.
- [11] KUZKAYA N, WEISSMANN N, HARRISON D G, et al. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols. Implications for uncoupling of endothelial nitric-oxide synthase[J]. *Biol Chem*, 2003, 278: 22546-22554.
- [12] BAO X M, WU C F, LU G P. Atorvastatin inhibits homocysteine-induced oxidative stress and apoptosis in endothelial progenitor cells involving Nox4 and p38 MAPK[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 210(1): 114-121.
- [13] QIAN W, CAI X, QIAN Q, et al. Astragaloside IV protects endothelial progenitor cells from the damage of ox-LDL via the LOX-1/NLRP3 inflammasome pathway[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 2579-2589.
- [14] JIN H M, ZHANG Z J, WANG C G, et al. Melatonin protects endothelial progenitor cells against AGE-induced apoptosis via autophagy flux stimulation and promotes wound healing in diabetic mice[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2018, 50:154.
- [15] TINKOV A A, BJØRKLUND G, SKALNY A V, et al. The role of the thioredoxin/thioredoxin reductase system in the metabolic syndrome: towards a possible prognostic marker[J]. *Cell Mole Life Sci*, 2018, 75 (9):1567-1586.
- [16] 荀丽英, 赵启韬, 武继彪. 胸痹痰浊壅塞证动物模型的构建[J]. 山东中医药大学报, 2015, 39 (1): 73-75
- [17] 范永升. 金匱要略[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 136.
- [18] THIRUNAVUKKARASU M, PENUMATHSA S V, KONERU S, et al. Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase[J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43(5):720-729.
- [19] TIETGE U J F. The impact of myeloperoxidase on HDL function in myocardial infarction[J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2018, 25(2): 137-142.
- [20] JELIĆ-KNEZOVIĆ N, GALIJAŠEVIĆ S, LOVRIĆ M, et al. Levels of nitric oxide metabolites and myeloperoxidase in subjects with type 2 diabetes mellitus on metformin therapy[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2019, 127(1): 56-61.
- [21] KOŁODZIEJ A R, ABO-ALY M, ELSAWALHY E, et al. Prognostic role of elevated myeloperoxidase in patients with acute coronary syndrome: a systemic review and meta-analysis[J]. *Mediators Inflamm*, 2019, 2019: 2872607.
- [22] LI X, MENG X, GAO X. Elevated serum xanthine oxidase activity is associated with the development of type 2 diabetes: a prospective cohort study[J]. *Diabetes Care*, 2018, 41(4): 884-890.
- [23] AZENABOR A, ERIVONA R, ADEJUMO E, et al. Xanthine oxidase activity in type 2 diabetic Nigerians[J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2019, 13 (3): 2021-2024.
- [24] ANTÓNIO N, FERNANDES R, SOARES A, et al. Impact of prior chronic statin therapy and high-intensity statin therapy at discharge on circulating endothelial progenitor cell levels in patients with acute myocardial infarction: a prospective observational study[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2014, 70(10):1181-1193.
- [25] THIRUNAVUKKARASU M, PENUMATHSA S V, KONERU S, et al. Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase[J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43(5):720-729.
- [26] LIU J H, LIU D F, WANG N N, et al. Possible role for the thioredoxin system in the protective effects of probucol in the pancreatic islets of diabetic rats[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2011, 38(8):528-533.
- [27] HOU X, SONG J, LI X N, et al. Metformin reduces intracellular reactive oxygen species levels by upregulating expression of the antioxidant thioredoxin via the AMPK-FOXO3 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(2):199-205.