



**Abstract:** **Objective** To investigate the effect and mechanism of *Zicui Tongmai Yin* on autophagy and apoptosis of H9c2 cardiomyocytes induced by high glucose in rats. **Methods** Twenty free specific pathogenic grade Sprague Dawley rats were randomly divided into blank plasma group and *Zicui Tongmai Yin* group by using a random number table method, with 10 rats in each group. The rats in the *Zicui Tongmai Yin* group were given  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  *Zicui Tongmai Yin* by gavage every day, for 7 days; and the rats in the blank plasma group were given equal dose of sterilized ultrapure water by gavage for 7 days. Abdominal aortic blood was collected and plasma was separated for standby. The H9c2 cardiomyocytes in logarithmic growth phase were divided into normal control group, blank control group and *Zicui Tongmai Yin* group according to random number table method; and the diluted fetal bovine serum, plasma in the blank plasma group and plasma in the *Zicui Tongmai Yin* group were added in each group, and concentration gradients of 5%, 10% and 15% were set in each group. The proliferation of H9c2 cardiomyocytes in each group was detected by using cell counting kit-8 method to screen the optimal drug containing plasma concentration. The H9c2 cardiomyocytes in logarithmic growth phase were randomly divided into normal control group, high-glucose induction group, high-glucose induction + traditional Chinese medicine containing plasma group and high-glucose induction + empagliflozin group by using a random number table method. The cells in the normal control group did not receive any drug intervention, while the cells in the high-glucose induction group were added  $33.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  of D-glucose and 10% plasma in the blank control group, the cells in the high-glucose induction + traditional Chinese medicine plasma group were added  $33.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  of D-glucose and 10% plasma in the *Zicui Tongmai Yin* group, and the cells in the high-glucose induction + empagliflozin group cells were treated with  $33.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  D-glucose and  $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  empagliflozin; after 24 hours of administration, the lactate dehydrogenase (LDH) release rate of cells in each group was detected by using cytotoxicity colorimetry, the apoptosis rate of cells in each group was detected by flow cytometry, and the expressions of autophagy and apoptosis related proteins p62, Bcl-2-associated X protein (Bax), microtubule associated protein 1 light chain 3 (LC3)-I, LC3-II and Bcl-2 of cells in each group were detected by Western blot. **Results** At concentrations of 5% and 15%, the proliferation ability of H9c2 cells in the *Zicui Tongmai Yin* group was significantly lower than that in the normal control group and blank control group ( $P < 0.05$ ); there was no significant difference in the proliferation ability of H9c2 cells between the normal control group and the blank control group ( $P > 0.05$ ). At a concentration of 10%, there was no significant difference in the proliferation ability of H9c2 cells among the normal control group, blank control group and *Zicui Tongmai Yin* group ( $F = 0.110, P > 0.05$ ). The apoptosis rate of H9c2 cells in the normal control group, high-glucose induction + traditional Chinese medicine containing plasma group, and high-glucose induction + empagliflozin group was significantly lower than that in the high-glucose induction group ( $t = 43.527, 23.836, 21.617; P < 0.01$ ); the apoptosis rate of H9c2 cells in the high-glucose induction + empagliflozin group and the high-glucose induction + traditional Chinese medicine containing plasma group was significantly higher than that in the normal control group ( $t = 14.933, 11.723; P < 0.05$ ); there was no significant difference in the apoptosis rate of H9c2 cells between the high-glucose induction + traditional Chinese medicine containing plasma group and the high-glucose induction + empagliflozin group ( $t = 1.995, P > 0.05$ ). The LDH release rate of H9c2 cells in the normal control group, high-glucose induction + traditional Chinese medicine containing plasma group and high-glucose induction + empagliflozin group was significantly lower than that in the high-glucose induction group ( $t = 58.660, 31.408, 26.557; P < 0.01$ ); the LDH release rate in the high-glucose induction + empagliflozin group and the high-glucose induction + traditional Chinese medicine containing plasma group was significantly higher than those in the normal control group ( $t = 14.167, 11.740; P < 0.05$ ); there was no significant difference in the LDH release rate of H9c2 cells between the high-glucose induction + traditional Chinese medicine containing plasma group and the high-glucose induction + empagliflozin group ( $t = 1.801, P > 0.05$ ). The expression levels of p62 and Bax in H9c2 cells in the normal control group, high-glucose induction + traditional Chinese medicine containing plasma group and high-glucose induction + empagliflozin group were significantly lower than those in the high-glucose induction group, while the LC3-II/LC3-I and Bcl-2 were significantly higher than those in the high-glucose induction group ( $P < 0.05$ ); the Bcl-2/Bax in H9c2 cells in the high-glucose induction group were significantly lower than that in the normal control group and the high-glucose induction + traditional Chinese medicine containing plasma group ( $P < 0.05$ ); there was no significant difference in Bcl-2/Bax in H9c2 cells between the high-glucose induction group and the high-glucose induction + empagliflozin group ( $P > 0.05$ ); the levels of p62, Bax in H9c2 cells in the high glucose induction + empagliflozin group and high glucose induction + traditional Chinese medicine containing plasma group were significantly higher than those in the normal control group, while Bcl-2, LC3-II/LC3-I, Bcl-2/Bax were significantly lower than those in the normal control group ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the expression levels of p62, Bax, LC3-II/LC3-I, Bcl-2 and Bcl-2/Bax in H9c2 cells between the high-glucose induction + traditional Chinese medicine containing plasma group and the high glucose induction + empagliflozin group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** *Zicui Tongmai Yin* can activate high-glucose induced autophagy of H9c2 myocardial cells, inhibit apoptosis of H9c2 cells, and alleviate myocardial cell damage.

**Key words:** *Zicui Tongmai Yin*; H9c2 cardiomyocytes; autophagy; apoptosis

目前,糖尿病呈全球蔓延趋势,是造成世界范围内人类死亡和疾病负担的主要原因之一,已成为全球人类共同面对的一个重大健康问题。糖尿病心肌病是糖尿病的一种常见血管并发症,以心肌结构和功能异常为特征。目前,关于糖尿病心肌病的治疗涉及降糖、降脂、控制血压、改善心肌重构等,有效地控制血糖仍是治疗糖尿病心肌病的基本手段。然而,多种降糖药物存在一定的不良反应,如噻唑烷二酮类、二肽基肽酶-4 抑制剂沙格列汀和阿格列汀均可增加心力衰竭住院风险<sup>[1-2]</sup>。近年来,关于糖尿病心肌病新的治疗手段不断涌现,但糖尿病心肌病的高发病率和高病死率仍然困扰着广大临床医务工作者;因此,仍需开发新的治疗糖尿病和糖尿病心肌病的药物。中医药治疗糖尿病疗效确切,具有毒副作用小、价格低廉、患者依从性好的优点。本课题组前期研究表明,应用益气养阴、活血通络的滋脾通脉饮治疗糖尿病心肌病可取得显著的疗效<sup>[3-4]</sup>。自噬可消除受损的蛋白质和细胞器,是维持细胞器功能和内环境稳定的关键生物过程。自噬的影响因素很多,包括高血糖、氧化应激、胰岛素抵抗等,这些影响因素可通过相关的信号通路导致心肌细胞损伤<sup>[5-6]</sup>。研究显示,自噬参与糖尿病心肌病的病理生理过程<sup>[7-9]</sup>。基于此,本研究通过观察滋脾通脉饮对高糖诱导的 H9c2 心肌细胞自噬和凋亡的影响,探讨滋脾通脉饮含药血浆对高糖诱导下心肌细胞的保护作用及机制,以期对滋脾通脉饮治疗糖尿病心肌病提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及细胞** 20 只无特定病原体级雄性 Sprague Dawley 大鼠购自湖南斯莱克景达公司,体质量 200 ~ 280 (250 ± 20) g,饲养于无特定病原体级动物房内,温度 23 ℃,湿度 60%,每 12 h 交替照明,自由饮食、饮水。大鼠 H9c2 心肌细胞由长沙艾碧维生物科技有限公司提供。

**1.2 药物、主要试剂与仪器** 滋脾通脉饮由湖南省中医药研究院附属医院门诊中药房提供,由黄芪、生地、麦冬、玄参、山茱萸、天花粉、地龙、生蒲黄、丹参、川芎、鬼箭羽、全蝎、水蛭、僵蚕、山楂等药物组成,药物质量浓度为 4 400 g · L<sup>-1</sup>;恩格列净购自上海勃林格殷格翰药业有限公司(国药准字 H20201008)。细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自上海沪震有限公司,乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 细胞毒性检测试剂盒购自上海源业生物科技有

限公司, p62、微管相关蛋白 1 轻链 3 ( microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3 ) - II 、 LC3 - I 、 Bcl-2、Bcl-2 相关 X 蛋白 ( Bcl-2-associated X protein, Bax )、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 ( glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH ) 一抗及山羊抗小鼠 IgG 二抗、辣根过氧化物酶 ( horseradish peroxidase, HRP ) 标记山羊抗兔 IgG 二抗购自美国 Proteintech 公司, Beclin-1 抗体购自北京博奥森生物科技有限公司,转膜缓冲液、10 × 丽春红染液、脱脂奶粉、放射免疫沉淀裂解液、蛋白磷酸酶抑制剂、胰蛋白酶消化液、磷酸缓冲盐溶液 ( phosphate buffered saline, PBS )、细胞冻存液均购自中国长沙 Abiowell 公司,蛋白酶抑制剂购自北京金泰宏达公司,显影液、定影液购自上海佳信公司,达尔伯克改良伊格尔培养基 ( Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM ) 购自美国 Sigma 公司,胎牛血清 ( fetal bovine serum, FBS ) 购自美国 Gibco 公司,双抗 ( 青链霉素 ) 购自上海碧云天生物技术有限公司, Rapamycin 购自美国 ApexBio 公司;细胞培养瓶购自瑞士 Nest 公司,超净工作台购自北京亚泰隆公司,直热式 CO<sub>2</sub> 培养箱购自上海三藤仪器公司,倒置生物显微镜购自北京中显恒业仪器公司,低速离心机购自上海知信实验仪器技术有限公司, WD-9413A 型凝胶成像分析系统购自北京六一生物科技有限公司。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 滋脾通脉饮含药血浆的制备** 按随机数字表法将 20 只 SD 大鼠分为空白血浆组和滋脾通脉饮组,每组 10 只。2 组大鼠均按照临床 70 kg 成人剂量的 5 倍给药,滋脾通脉饮组大鼠每天给予 10 mL · kg<sup>-1</sup> 滋脾通脉饮灌胃,空白血浆组大鼠给予等剂量的灭菌超纯水灌胃,连续灌胃 7 d。末次灌胃 1 h 后,予以 100 g · L<sup>-1</sup> 水合氯醛 ( 3 mL · kg<sup>-1</sup> ) 腹腔注射麻醉,然后采集腹主动脉血,乙二胺四乙酸二钠抗凝, 3 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min 分离血浆, 0.22 μm 滤膜过滤, 56 ℃ 恒温水浴锅中灭活 30 min,然后分装至无菌 EP 管中,置于 -80 ℃ 冰箱保存备用。

**1.3.2 细胞培养** 将 H9c2 细胞接种于含体积分数 10% FBS、体积分数 1% 双抗的 DMEM 中,置于 37 ℃、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱中,培养至细胞密度达 80% 左右,取对数生长期细胞用于后续实验。

**1.3.3 CCK-8 法检测细胞增殖情况** 取对数生长

期 H9c2 细胞接种到 96 孔细胞培养板中,置于 37 ℃、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中过夜,用预冷的培养液将细胞同步化处理,然后随机分为正常对照组、空白对照组和滋脾通脉饮组,分别加入稀释后的胎牛血清、空白血浆组血浆及滋脾通脉饮组血浆,每组设置体积分数 5%、10%、15% 的浓度梯度;干预 24 h 后,吸弃上清,各孔中滴加 10 μL CCK-8,继续置于 37 ℃、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养 2 h,然后检测各孔在 450 nm 处的吸光度值,以吸光度值表示细胞的增殖能力,吸光度值越高表示细胞增殖能力越强。实验重复 3 次,取均值。

**1.3.4 细胞毒性比色法检测 LDH 释放率** 取对数生长期 H9c2 细胞铺板在 96 孔板中,待细胞贴壁后分为正常对照组、高糖诱导组、高糖诱导 + 中药含药血浆组、高糖诱导 + 恩格列净组。正常对照组细胞不加任何药物干预;高糖诱导组细胞加 33.3 mmol · L<sup>-1</sup> D-葡萄糖和体积分数 10% 空白血浆组血浆;高糖诱导 + 中药含药血浆组细胞加 33.3 mmol · L<sup>-1</sup> D-葡萄糖和体积分数 10% 滋脾通脉饮组血浆;高糖诱导 + 恩格列净组细胞加 33.3 mmol · L<sup>-1</sup> D-葡萄糖和 0.01 μmol · L<sup>-1</sup> 恩格列净,继续培养 24 h;分别加入 60 μL 的 LDH 细胞毒性检测试剂,混匀,室温下使用水平摇床避光孵育 30 min,应用酶标仪测定 490 nm 处吸光度 (absorbance, A) 值,计算 LDH 释放率,LDH 释放率 = [(实验组 A 值 - 总自然释放 A 值) / (最大释放组 A 值 - 总自然释放 A 值)] × 100%。

**1.3.5 流式细胞术检测 H9c2 细胞凋亡情况** 取对数生长期 H9c2 细胞,按“1.3.4”项分组培养 24 h 后,用不含乙二胺四乙酸胰酶消化,收集细胞;PBS 洗涤细胞 2 次,每次 2 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min,收集约 3.2 × 10<sup>5</sup> 个细胞;加入 500 μL 的 Binding buffer 悬浮细胞,然后加入 5 μL 人膜联蛋白 V (annexin V)-别藻蓝蛋白 (allophycocyanin, APC) 混匀后,再加入 5 μL 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 溶液,充分混匀,室温避光反应 10 min;应用流式细胞仪检测细胞凋亡率。实验重复 3 次,取均值。

**1.3.6 Western blot 法检测 H9c2 细胞中 p62、LC3-II/LC3-I、Bcl-2、Bax 蛋白表达** 取对数生长期 H9c2 细胞,按“1.3.4”项分组培养 24 h 后,用冰预冷 PBS 洗涤 1 次,加入 200 μL 放射免疫沉淀裂解液冰上裂解 10 min;4 ℃ 下 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min,取上清液 1.5 mL,应用二喹啉甲酸法检测蛋白浓度;取 100 μL 蛋白上清,加入 25 μL 5 × loading

buffer 混匀,沸水煮 5 min,放入冰盒中速冷备用;应用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,恒定电压 75 V 电泳 130 min,然后转至硝酸纤维素膜;用脱脂奶粉封闭,室温放置 90 min;滴加 p62、LC3-II、LC3-I、Bcl-2、Bax、GAPDH 一抗 (滴度均为 1 : 5 000),4 ℃ 孵育过夜;然后,使用 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗 (滴度为 1 : 5 000) 或 HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (滴度为 1 : 6 000) 室温孵育 90 min,用含吐温-20 的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution with tween-20, PBST) 清洗 3 次,每次约 15 min;使用增强型化学发光液显色;应用 WD-9413A 型凝胶系统成像,Image J 软件分析灰度值,以 GAPDH 为内参蛋白,目的蛋白相对表达量以目的蛋白灰度值与内参蛋白灰度值的比值表示。实验重复 3 次,取均值。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS 21.0 软件进行数据统计与分析。计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间比较采用 One-way ANOVA 分析,两两比较采用最小显著性差异法 *t* 检验;*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 正常对照组、空白对照组和滋脾通脉饮组 H9c2 细胞增殖情况比较** 结果见表 1。体积分数 5%、15% 浓度时,正常对照组、空白对照组和滋脾通脉饮组 H9c2 细胞增殖能力比较差异有统计学意义 (*F* = 5.741、6.041, *P* < 0.05);滋脾通脉饮组 H9c2 细胞增殖能力显著低于正常对照组和空白对照组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05);正常对照组与空白对照组 H9c2 细胞增殖能力比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。10% 浓度时,正常对照组、空白对照组和滋脾通脉饮组 H9c2 细胞增殖能力比较差异无统计学意义 (*F* = 0.110, *P* > 0.05),说明体积分数 10% 含药血浆对细胞增殖抑制的影响最小,故选用体积分数 10% 含药血浆作为含药血浆干预浓度。

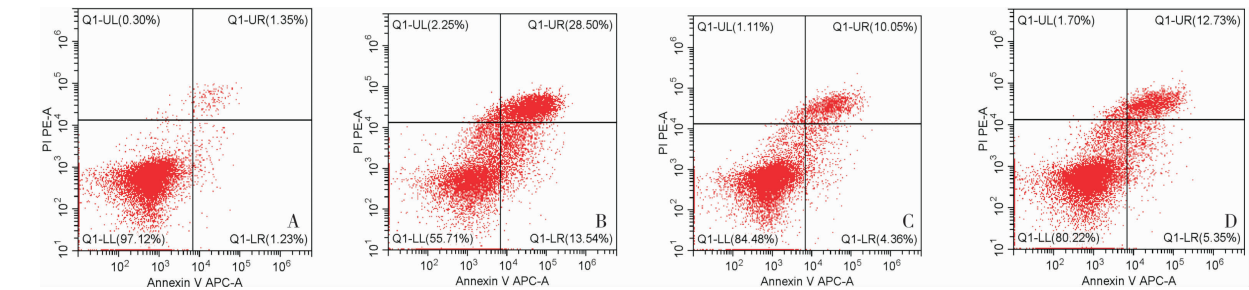
表 1 正常对照组、空白对照组和滋脾通脉饮组 H9c2 细胞增殖能力比较

Tab. 1 Comparison of proliferation ability of H9c2 cells among the normal control group, blank control group and Zicui Tongmai Yin group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	细胞增殖能力(A 值)		
		5% 稀释度	10% 稀释度	15% 稀释度
正常对照组	3	1.81 ± 0.55	1.92 ± 0.61	1.73 ± 0.53
空白对照组	3	1.74 ± 0.32	2.02 ± 0.39	1.69 ± 0.34
滋脾通脉饮组	3	1.26 ± 0.40 <sup>a</sup>	1.97 ± 0.42	1.14 ± 0.35 <sup>a</sup>
<i>F</i>		5.741	0.110	6.041
<i>P</i>		<0.05	>0.05	<0.05

注:与正常对照组和空白对照组比较<sup>a</sup>*P* < 0.05。

**2.2 正常对照组、高糖诱导组、高糖诱导 + 中药含药血浆组、高糖诱导 + 恩格列净组 H9c2 细胞凋亡率比较** 结果见图 1。正常对照组、高糖诱导组、高糖诱导 + 中药含药血浆组、高糖诱导 + 恩格列净组 H9c2 细胞凋亡率分别为  $(2.63 \pm 0.29)\%$ 、 $(42.89 \pm 2.60)\%$ 、 $(14.35 \pm 0.27)\%$ 、 $(17.56 \pm 2.26)\%$ 。正常对照组、高糖诱导 + 中药含药血浆组和高糖诱导 + 恩格列净组 H9c2 细胞凋亡率显著低



A:正常对照组;B:高糖诱导组;C:高糖诱导 + 中药含药血浆组;D:高糖诱导 + 恩格列净组。

图 1 正常对照组、高糖诱导组、高糖诱导 + 中药含药血浆组、高糖诱导 + 恩格列净组 H9c2 细胞凋亡情况

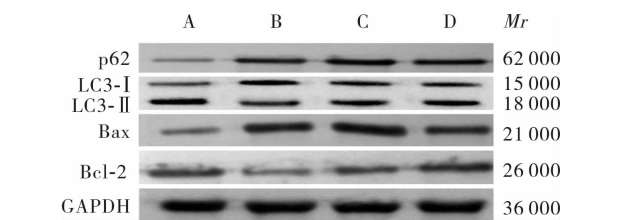
Fig. 1 Apoptosis of H9c2 cells in the normal control group, high-glucose induction group, high-glucose induction + traditional Chinese medicine containing plasma group and high-glucose induction + empagliflozin group

**2.3 常对照组、高糖诱导组、高糖诱导 + 中药含药血浆组、高糖诱导 + 恩格列净组 H9c2 细胞 LDH 释放率比较** 正常对照组、高糖诱导组、高糖诱导 + 中药含药血浆组、高糖诱导 + 恩格列净组 H9c2 细胞 LDH 释放率分别为  $(4.54 \pm 0.85)\%$ 、 $(44.33 \pm 1.72)\%$ 、 $(16.28 \pm 0.85)\%$ 、 $(18.71 \pm 2.20)\%$ 。正常对照组、高糖诱导 + 中药含药血浆组和高糖诱导 + 恩格列净组 H9c2 细胞 LDH 释放率显著低于高糖诱导组,差异有统计学意义 ( $t = 58.660, 31.408, 26.557, P < 0.01$ );高糖诱导 + 恩格列净组和高糖诱导 + 中药含药血浆组 H9c2 细胞 LDH 释放率显著高于正常对照组,差异有统计学意义 ( $t = 14.167, 11.740, P < 0.05$ );高糖诱导 + 中药含药血浆组与高糖诱导 + 恩格列净组 H9c2 细胞 LDH 释放率比较差异无统计学意义 ( $t = 1.801, P > 0.05$ )。

**2.4 正常对照组、高糖诱导组、高糖诱导 + 中药含药血浆组、高糖诱导 + 恩格列净组 H9c2 细胞自噬和凋亡相关蛋白表达水平比较** 结果见图 2 和表 2。正常对照组、高糖诱导 + 中药含药血浆组和高糖诱导 + 恩格列净组 H9c2 细胞中 p62、Bax 表达显著低于高糖诱导组,LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ、Bcl-2 显著高于高糖诱导组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );高糖诱导组 H9c2 细胞中 Bcl-2/Bax 显著低于正常对照组和高糖诱导 + 中药含药血浆组,差异有统计学意义

于高糖诱导组,差异有统计学意义 ( $t = 43.527, 23.836, 21.617, P < 0.01$ );高糖诱导 + 恩格列净组和高糖诱导 + 中药含药血浆组 H9c2 细胞凋亡率显著高于正常对照组,差异有统计学意义 ( $t = 14.933, 11.723, P < 0.05$ );高糖诱导 + 中药含药血浆组与高糖诱导 + 恩格列净组 H9c2 细胞凋亡率比较差异无统计学意义 ( $t = 1.995, P > 0.05$ )。

( $P < 0.05$ );高糖诱导组与高糖诱导 + 恩格列净组 H9c2 细胞中 Bcl-2/Bax 比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );高糖诱导 + 恩格列净组和高糖诱导 + 中药含药血浆组 H9c2 细胞中 p62、Bax 显著高于正常对照组,Bcl-2、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ、Bcl-2/Bax 显著低于正常对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。高糖诱导 + 中药含药血浆组与高糖诱导 + 恩格列净组 p62、Bax、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ、Bcl-2 表达水平及 Bcl-2/Bax 比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。



A:正常对照组;B:高糖诱导组;C:高糖诱导 + 中药含药血浆组;D:高糖诱导 + 恩格列净组。

图 2 正常对照组、高糖诱导组、高糖诱导 + 中药含药血浆组、高糖诱导 + 恩格列净组 H9c2 细胞 p62、Bax、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ和 Bcl-2 蛋白表达

Fig. 2 Expressions of p62, Bax, LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ and Bcl-2 protein in H9c2 cells in the normal control group, high-glucose induction group, high-glucose induction + traditional Chinese medicine containing plasma group and high-glucose induction + empagliflozin group

表 2 正常对照组、高糖诱导组、高糖诱导 + 中药含药血浆组、高糖诱导 + 恩格列净组 H9c2 细胞中 p62、Bax、LC3-II/LC3-I 和 Bcl-2 蛋白表达水平比较

Tab.2 Comparison of the expression levels of p62, Bax, LC3- II /LC3- I and Bcl-2 protein in H9c2 cells among the normal control group, high-glucose induction group, high-glucose induction + traditional Chinese medicine containing plasma group and high-glucose induction + empagliflozin group

组别	n	p62	LC3- II /LC3- I	Bax	Bcl-2	Bcl-2/Bax
正常对照组	3	0.24 ± 0.05	1.97 ± 0.13	0.16 ± 0.07	0.97 ± 0.09	6.98 ± 2.85
高糖诱导组	3	0.96 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.85 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.61 ± 0.12 <sup>a</sup>
高糖诱导 + 恩格列净组	3	0.55 ± 0.05 <sup>ab</sup>	1.14 ± 0.16 <sup>ab</sup>	0.36 ± 0.08 <sup>ab</sup>	0.63 ± 0.10 <sup>ab</sup>	1.83 ± 0.45 <sup>a</sup>
高糖诱导 + 中药含药血浆组	3	0.51 ± 0.07 <sup>ab</sup>	1.18 ± 0.16 <sup>ab</sup>	0.34 ± 0.08 <sup>ab</sup>	0.64 ± 0.11 <sup>ab</sup>	2.06 ± 0.82 <sup>ab</sup>
F		261.870	260.130	140.640	43.000	35.190
P		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注：与正常对照组比较<sup>a</sup>*P* < 0.05；与高糖诱导组比较<sup>b</sup>*P* < 0.05。

3 讨论

糖尿病是一种以慢性高血糖为特点的代谢性疾病,近年来其发病率呈现逐年上升趋势。糖尿病心肌病是糖尿病常见并发症,氧化应激、内质网应激、细胞外基质蛋白和晚期糖基化产物的堆积是糖尿病心肌病的早期特征。随着病情进一步发展,逐步出现左心室肥厚和收缩功能不全,最后导致心力衰竭。糖尿病心肌病常表现为心肌细胞的变性坏死、细胞凋亡,以及心肌细胞重建和心功能减退。目前,针对糖尿病心肌病治疗措施主要包括降糖、降脂、控制血压、改善心肌重构等,而有效地控制血糖是治疗的基本手段;然而,多种降糖药物存在一定的不良反应。中医药治疗糖尿病疗效确切,具有毒副作用小、价格低廉、患者依从性好等优点。滋脾饮出自于《医学衷中参西录》,原方由黄芪、生地、山药、山萸肉、生猪胰组成,用于治疗消渴。中药复方滋脾通脉饮为湖南省名中医卜献春教授在原方基础上加減而成,功效为益气养阴、活血通络。该方在临床应用了多年,疗效满意,得到了患者的一致好评。前期研究显示,该方不仅能改善糖脂代谢和氧化应激、抑制炎症反应、减轻胰岛素抵抗,而且还能改善糖尿病心肌病心肌纤维化,改善心肌重构<sup>[3-4,10-12]</sup>;但具体机制有待进一步深入探讨。因此,本研究应用大鼠 H9c2 心肌细胞探讨中药复方滋脾通脉饮对糖尿病心肌病治疗的效果和机制。

本研究结果显示,5%、15% 浓度时,滋脾通脉饮组 H9c2 细胞增殖能力显著低于正常对照组、空白对照组;10% 浓度时,正常对照组、空白对照组和滋脾通脉饮组 H9c2 细胞增殖能力比较差异无统计学意义,说明 10% 含药血浆对细胞增殖抑制的影响最小,故选用 10% 含药血浆作为含药血浆干预浓度。

LDH 是存在于细胞质的一种酶,当细胞膜受到损伤时,LDH 即释放到细胞培养基中。因此检测培养基中 LDH 的量可以作为测定受损细胞数量的指标。本研究结果显示,高糖诱导组 H9c2 细胞凋亡率和 LDH 释放率显著高于正常对照组、高糖诱导 + 中药含药血浆组和高糖诱导 + 恩格列净组,高糖诱导 + 中药含药血浆组与高糖诱导 + 恩格列净组 H9c2 细胞凋亡率和 LDH 释放率显著高于正常对照组,高糖诱导 + 中药含药血浆组与高糖诱导 + 恩格列净组 H9c2 细胞凋亡率和 LDH 释放率比较差异无统计学意义;说明,高糖刺激下的 H9c2 心肌细胞凋亡率和 LDH 释放率明显上升,提示心肌细胞损伤;而滋脾通脉饮和恩格列净可抑制 H9c2 细胞凋亡和 LDH 释放,减轻心肌细胞损伤,且滋脾通脉饮和恩格列净作用相当。

自噬是一种细胞内降解机制,通过吞噬受损的细胞器而形成自噬体,然后与溶酶体融合并降解其包裹的内容物,在应激条件下对于维持细胞内稳态有极其重要的作用<sup>[13]</sup>。自噬在维持心脏的结构、功能和心肌细胞完整性中发挥极其重要的作用。适度的自噬对心脏正常功能的维持尤其重要<sup>[14]</sup>,但过度的自噬可能引发心脏结构、功能和心肌细胞完整性的异常。研究显示,自噬紊乱与糖尿病心肌病的发生发展密切相关,恢复正常的自噬水平对糖尿病心肌病有明显的保护作用<sup>[15]</sup>。泛素连接蛋白 p62 是反映自噬活性的蛋白,为自噬特异性降解底物,存在于多种细胞中,参与各种信号传导过程。当自噬被激活时,自噬体与溶酶体融合,溶酶体酶降解自噬囊泡中的 p62,导致其水平下降;当自噬被抑制时可以导致自噬体堆积,使 p62 水平升高,出现自噬障碍。研究显示,p62 蛋白水平与自噬活性呈负相关关系,p62 的积累在自噬障碍中起着重要的作用<sup>[16]</sup>。LC3



是 p62 的受体,为自噬小体的标志蛋白,可作为自噬标志物;LC3 有 LC3-I 和 LC3-II 2 种形式,通常以 LC3-II/LC3-I 比值和 p62 表达水平来评价细胞自噬。LC3-II/LC3-I 比值越高,表示自噬活性越强<sup>[17]</sup>。本研究结果显示,高糖诱导组 H9c2 细胞中 p62 表达显著高于正常对照组、高糖诱导 + 中药含药血浆组和高糖诱导 + 恩格列净组,高糖诱导组 LC3-II/LC3-I 显著低于正常对照组、高糖诱导 + 中药含药血浆组和高糖诱导 + 恩格列净组;高糖诱导 + 中药含药血浆组与高糖诱导 + 恩格列净组 p62、LC3-II/LC3-I 表达水平比较差异无统计学意义。这说明,高糖刺激可引起 H9c2 心肌细胞自噬相关蛋白 p62 显著升高和 LC3-II/LC3-I 明显下降,提示 H9c2 心肌细胞自噬发生障碍并加重了心肌细胞损伤;恩格列净和滋脾通脉饮可通过抑制自噬相关蛋白 p62 和提高 LC3-II/LC3-I 水平而抑制心肌细胞凋亡,进而减轻心肌细胞损伤。

Bax 是细胞凋亡的标志性蛋白,可导致细胞凋亡<sup>[18]</sup>。研究显示,Bax 水平与糖尿病并发症关系密切<sup>[19]</sup>。正常情况下,抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 处于平衡状态,但在应激状态下,Bcl-2/Bax 比值可发生转变。因此,Bcl-2/Bax 比值可用来评估细胞凋亡水平<sup>[20]</sup>。本研究结果显示,高糖诱导组 H9c2 细胞中 Bax 表达显著高于正常对照组、高糖诱导 + 中药含药血浆组和高糖诱导 + 恩格列净组,Bcl-2 及 Bcl-2/Bax 显著低于正常对照组、高糖诱导 + 中药含药血浆组和高糖诱导 + 恩格列净组;高糖诱导组与高糖诱导 + 恩格列净组 H9c2 细胞中 Bcl-2/Bax 比较差异无统计学意义。高糖诱导 + 中药含药血浆组和高糖诱导 + 恩格列净组 Bax 显著低于正常对照,Bcl-2 及 Bcl-2/Bax 显著高于正常对照组;高糖诱导 + 中药含药血浆组与高糖诱导 + 恩格列净组 Bax、Bcl-2 表达水平及 Bcl-2/Bax 比较差异无统计学意义。这一结果提示,高糖刺激可引起 H9c2 心肌细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2/Bax 明显下降,导致 H9c2 心肌细胞凋亡增加,从而引发 H9c2 心肌细胞损伤;恩格列净和滋脾通脉饮可通过抑制 Bax 和促进 Bcl-2 表达,抑制心肌细胞凋亡,进而减轻心肌细胞损伤。

综上所述,滋脾通脉饮可通过激活高糖诱导的大鼠 H9c2 心肌细胞自噬,抑制 H9c2 细胞凋亡,从而减轻心肌细胞损伤,其机制可能与调节相关信号通路有关,具体有待进一步研究。

参考文献:

[1] VIJAYAKUMAR S, VADUGANATHAN M, BUTLER J. Glucose-lowering therapies and heart failure in type 2 diabetes mellitus: mechanistic links, clinical data, and future directions[J]. *Circulation*, 2018, 137(10): 1060-1073.

[2] SCRIRICA B M, BRAUNWALD E, RAZ I, et al. Heart failure, saxagliptin, and diabetes mellitus: observations from the SAVORTIMI 53 randomized trial[J]. *Circulation*, 2015, 132(15): e198.

[3] 吴刚强,熊春红,毛叶,等. 滋脾通脉饮对糖尿病心脏病大鼠心肌纤维化和转化生长因子  $\beta_1$ /Smads3 信号通路的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(1): 29-35.

WU G Q, XIONG C H, MAO Y, et al. Effect of Zicuitongmai Yin on myocardial fibrosis and TGF- $\beta_1$ /Smads signaling pathway in diabetic cardiomyopathy rats[J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2021, 32(1): 29-35.

[4] 吴刚强,毛叶,温小凤,等. 滋脾通脉饮对糖尿病心脏病大鼠心肌重构的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2021, 19(2): 240-243.

WU G Q, MAO Y, WEN X F, et al. Effect of Zicuitongmai Yin on myocardial remodeling in diabetic cardiomyopathy rats[J]. *Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovasc Dis*, 2021, 19(2): 240-243.

[5] 罗洁荣,黄焕森,夏正远. 别嘌醇通过调节自噬及恢复 Nrf2 通路减轻糖尿病心脏病[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2019, 40(2): 213-217.

LUO J R, HUANG H S, XIA Z Y. Allopurinol alleviates diabetes cardiomyopathy via regulating autophagy synergizing and restoring Nrf2 pathway[J]. *Med J Wuhan Univ*, 2019, 40(2): 213-217.

[6] 李帅,鲍翠玉,李晶. 自噬相关通路在糖尿病心脏病中的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(6): 753-756.

LI S, BAO C Y, LI J. Research progress of autophagy in diabetic cardiomyopathy[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2019, 35(6): 753-756.

[7] XING R, LIU D, CHENG X, et al. MiR-207 inhibits autophagy and promotes apoptosis of cardiomyocytes by directly targeting LAMP2 in type 2 diabetic cardiomyopathy[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 520(1): 27-34.

[8] 郑梦莹,李燕,刘敬禹. 茶多酚对糖尿病心脏病大鼠心功能的保护作用及其机制[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2018, 39(6): 798-804.

ZHENG M Y, LI Y, LIU J Y. The protective effect of teapolyphenol on cardiac function in diabetic cardiomyopathy rats and its mechanism[J]. *J Xi'an Jiaotong Univ (Med Sci)*, 2018, 39(6): 798-804.

[9] WU A, HU P, LIN J, et al. Activating cannabinoid receptor 2 protects against diabetic cardiomyopathy through autophagy induction[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1-10.

[10] 吴刚强,毛叶,温小凤,等. 滋脾通脉饮对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢和胰岛素抵抗的影响[J]. *广西医学*, 2020, 42(23): 3085-3088.

WU G Q, MAO Y, WEN X F, et al. Effect of Zicui Tongmai Decoction on glycolipid metabolism and insulin resistance in rats

with type 2 diabetes mellitus[J]. *Guangxi Med J*,2020,42(23): 3085-3088.

[11] 李汶珊,易晓利,卜献春,等. 滋脾通脉饮对糖尿病大鼠糖脂代谢及氧化应激的影响[J]. *中医药导报*,2023,29(1):12-18.

LI W S,YI X L,BU X C,*et al.* Effects of Zicui Tongmai Yin on glucose and lipid metabolism and oxidative stress in rats with diabetes cardiomyopathy[J]. *Guiding J Tradit Chin Med Pharmacol*,2023,29(1):12-18

[12] 谭军,易晓利,任迪,等. 滋脾通脉饮治疗糖尿病心肌病疗效研究[J]. *陕西中医*,2022,43(6):715-719.

TAN J,YI X L,REN D,*et al.* Clinical study on treatment of diabetic cardiomyopathy with Zicui Tongmai recipe[J]. *Shaanxi J Tradit Chin Medicine*,2022,43(6):715-719

[13] ONORATI A V,DYEZYNSKI M,OJHA R,*et al.* Targeting autophagy in cancer[J]. *Cancer*,2018,124(16):3307-3318.

[14] KAUR N,RAJA R,RUIZ-VEKASCO A,*et al.* Cellular protein quality control in diabetic cardiomyopathy;from bench to bedside[J]. *Front Cardiovasc Med*,2020,7:e585309.

[15] WANG Y,LIANG B,LAU W B,*et al.* Restoring diabetes-induced autophagic flux arrest in ischemic/reperfused heart by ADIPOR (adiponectinreceptor) activation involves both AMPK-dependent and AMPK-independent signaling[J]. *Autophagy*,2017,13(11): 1855-1869.

[16] LIANG X,WANG C,SUN Y,*et al.* p62/mTOR/LXR $\alpha$  pathway inhibits cholesterol efflux mediated by ABCA1 and ABCG1 during autophagy blockage[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2019,514(4):1093-1100.

[17] 诺明,陶慧,哈森塔娜,等. 舒芬太尼对心肌缺血/再灌注大鼠心肌细胞凋亡及 Bcl-2、LC3 II、Beclin-1 表达的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*,2020,18(1):50-54.

NUO M,TAO H,HASEN TUNER,*et al.* Effects of sufentanil on cardiomyocyte apoptosis and expression of Bcl-2,LC3 II,Beclin-1 in myocardial ischemia/reperfusion rats[J]. *Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovasc Dis*,2020,18(1):50-54.

[18] 龙艳芳,王新蕾,王明璞,等. 雄激素干预成年雄性大鼠中动脉阻断模型大鼠脑组织 Bcl-2、Bax 与 Cyt-C 的表达[J]. *中国组织工程研究*,2019,23(27):4344-4349.

LONG Y F,WANG X L,WANG M P,*et al.* Androgen intervention in the expression of Bcl-2,Bax,and Cyt-C in the brain tissue of adult male middle cerebral artery occlusion model rats[J]. *Chin J Tissue Engineer Res*,2019,23(27):4344-4349.

[19] 陈聪,陈云志,喻嵘,等. 中医药调控糖尿病常见并发症 bax 表达的实验研究述评[J]. *天津中医药大学学报*,2017,36(2): 81-84.

CHEN C,CHEN Y Z,YU R,*et al.* Review of experimental studies of bax expressions of the regulation of traditional Chinese medicine on common complications of diabetes mellitus[J]. *J Tianjin Univ Tradit Chin Med*,2017,36(2):81-84.

[20] KOOHPEYMA H,GOUDARZI I,ELAHDADI S M,*et al.* Folic acid protects rat cerebellum against oxidative damage caused by homocysteine;the expression of Bcl-2,Bax,and caspase-3 apoptotic genes[J]. *Neurotox Res*,2020,37(3):564-577.

( 本文编辑:周二强 )

## 《新乡医学院学报》被 Scopus 数据库收录

近日,接 Elsevier 出版集团邮件通知,经严格评审遴选,《新乡医学院学报》(Journal of Xinxiang Medical University) 正式被 Scopus 数据库收录。《新乡医学院学报》是新乡医学院主管主办的综合性医药卫生类学术期刊,被 Scopus 数据库收录,标志着国际权威数据库对该刊的高度认可,这对提升该刊学术影响力、传播力和显示度有重要意义。

Scopus 数据库是由 Elsevier 出版集团推出的具有科研管理、学术评价功能的数据库,是全球规模最大的同行评议文献(科学期刊、书籍和会议记录)的文摘和引文数据库,覆盖 100% 的 Medline 期刊、100% 的 EI 期刊和约 97% 的 Web of Science 期刊,其学术影响力仅次于 Web of Science(包括 SCI、SSCI 和 A&HCI),被全球诸多重要学术排名机构(如 QS、THE 世界大学排名)作为学科产出及学科发展评估的主要数据来源。

《新乡医学院学报》编辑部衷心感谢各位编委、审稿专家、作者、读者的关心和支持,我们将再接再厉,努力提升办刊水平,积极宣传党和国家的科技政策,推动医学科学研究,促进医学信息交流,为我国医学事业的发展及全人类的健康作出积极贡献。