

原儿茶醛对链脲佐菌素诱导小鼠糖尿病心肌病的改善作用

丁萍¹, 叶志明¹, 刘冰², 张陆勇^{1*}

(1. 广东药科大学新药研发中心, 广东广州 510006) (2. 广东药科大学药学院, 广东广州 510006)

摘要: 研究了原儿茶醛 (Protocatechualdehyde, PCA) 对糖尿病心肌病 (Diabetic Cardiomyopathy, DCM) 小鼠的心脏保护作用及其可能的分子机制。成功构建 DCM 小鼠模型后给予 PCA 干预治疗。记录小鼠心脏与体质量比值, 测定心功能, 检测心肌组织中促炎症因子、肌钙蛋白 I、乳酸脱氢酶 (Lactate Dehydrogenase, LDH) 和肌酸激酶 (Creatine Kinase, CK) 的表达水平, 并通过苏木精-伊红 (Hematoxylin Eosin, HE) 和马松染色观察了心肌组织的形态学变化。检测心肌组织和大鼠心肌细胞中核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (Nod Like Receptor Protein 3, NLRP3) 等蛋白的表达, 并评估了 PCA 对心肌细胞存活率的影响。结果显示, PCA 干预 DCM 小鼠中心脏与体质量比值、射血分数和短轴缩短距分别增加为 5.42 mg/g、54.91% 和 28.07%, 血清中 LDH、CK 和肌钙蛋白 I 分别降低为 538.51 U/L、885.93 U/L 和 221.87 pg/mL, 同时降低了肿瘤坏死因子 α , 白细胞介素 1β 和白细胞介素 6 的水平 ($P < 0.05$)。同时, PCA 也能有效抑制高糖引起的心肌细胞毒性和 NLRP3 炎症小体的激活。PCA 具有保护 DCM 小鼠心肌的作用, 抑制 NLRP3 炎症小体的激活可能是发挥心脏改善作用的途径。

关键词: 原儿茶醛; 链脲佐菌素; 糖尿病心肌病; NLRP3

文章编号: 1673-9078(2024)03-48-55

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.3.0400

Effects of Protocatechualdehyde on Streptozotocin Induced Diabetic Cardiomyopathy in Mice

DING Ping¹, YE Zhiming¹, LIU Bing², ZHANG Luyong^{1*}

(1. The Center for Drug Research and Development, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China) (2. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The protective effects of protocatechualdehyde (PCA) on hearts of mice with diabetic cardiomyopathy (DCM) and its possible molecular mechanism were investigated. After the successful construction of DCM mouse models, PCA intervention was made. The heart-to-body mass ratio of mice and the cardiac function were determined. The expression levels of pro-inflammatory factors, troponin I, lactate dehydrogenase (LDH), and creatine kinase (CK) in the myocardial

引文格式:

丁萍, 叶志明, 刘冰, 等. 原儿茶醛对链脲佐菌素诱导小鼠糖尿病心肌病的改善作用[J]. 现代食品科技, 2024, 40(3): 48-55.

DING Ping, YE Zhiming, LIU Bing, et al. Effects of protocatechualdehyde on streptozotocin induced diabetic cardiomyopathy in mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(3): 48-55.

收稿日期: 2023-04-04

基金项目: 广东省普通高校药物早期毒性评价创新团队项目 (2018KCXTD016)

作者简介: 丁萍 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 药理学, E-mail: 2982778960@qq.com

通讯作者: 张陆勇 (1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 新药筛选、毒理学, E-mail: lyon Zhang@163.com

tissues were also determined. Hematoxylin and eosin (HE) staining and Masson staining methods were used to observe the morphological changes of the myocardial tissues. The expressions of nod-like receptor protein 3 (NLRP3) in the myocardial tissue and myocardial cells were detected, and the effects of PCA on the survival rate of myocardial cells were evaluated. The results showed that the heart-to-body mass ratio, ejection fraction, and fractional shortening increase by 5.42 mg/g, 54.91%, and 28.07%, respectively, after PCA intervention. At the same time, serum LDH, CK, and troponin I concentrations decrease to 538.51 U/L, 885.93 U/L, and 221.87 pg/mL, respectively. The levels of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-6 also decreased ($P < 0.05$). PCA also inhibited myocardial cytotoxicity and activation of NLRP3 inflammasome induced by high glucose concentrations. PCA can protect the myocardium of DCM mice. Inhibition of the activation of NLRP3 inflammasome may be the way to cardiac improvement.

Key words: protocatechualdehyde; streptozotocin; diabetic cardiomyopathy; NLRP3

糖尿病心肌病 (Diabetic Cardiomyopathy, DCM) 是由糖尿病引发的一种新型心肌疾病, 其发病机制不等同于高血压性心脏病和心脏瓣膜病, 是糖尿病患者发病和死亡的重要原因^[1]。DCM 可导致心脏结构和功能的异常改变, 产生心绞痛、心力衰竭和心律失常等不良症状, 降低患者的生活水平^[2]。王俊锋等^[3]的研究提到我国每年糖尿病发病率呈现上升阶梯形势, 预计到 2035 年将达到 1.43 亿人。目前治疗 DCM 的常用药物包括肾素-血管紧张素-醛固酮系统抑制剂和 β 受体拮抗剂, 但这些药物可能会引起低血压、心动过缓和传导阻滞等不良反应^[4]。因此, 开发新型的有效药物治疗 DCM 是一个亟待解决的重要课题。

高血糖导致晚期糖基化终产物的积累, 从而诱发炎症和氧化应激, 进一步造成心肌细胞凋亡、心肌顺应性下降和 DCM 的发生^[5,6]。另外, DCM 也伴有慢性炎症反应, 导致细胞代谢失调, 加剧胰岛素抵抗, 形成恶性循环^[7]。因此, 抑制过度的炎症反应可能是治疗 DCM 的一个重要策略。

丹参是一种药食两用植物, 既可以用于中药制剂, 用于食品和保健品的开发也是具有非常大的潜在价值, 其药理活性主要取决于其有效成分^[8]。研究表明, 丹参中含有丹参酮类、挥发油类和多糖类有机化合物等多种成分^[9]。其中, 原儿茶醛 (Protocatechualdehyde, PCA) 是丹酚酸类物质的主要代表, 具有清除自由基、抗炎、抗氧化、抑制血小板凝集、扩张血管等多种药理作用^[10]。丹参中的丹酚酸 B 主要是降解为 PCA 发挥药理活性作用, 具有多种生物学活性^[11]。研究发现, PCA 对许多炎症相关疾病有改善效果。特别在心血管疾病方面, 最新的 Wei 等^[12]研究报告显示 PCA 对急性心肌缺血缺氧诱导的心肌损伤发挥有益的改善效果。然而,

目前还没有关于 PCA 治疗 DCM 的研究报道。

链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ) 和高脂饮食是常用的诱导小鼠 DCM 模型的方法, 该模型不仅能够完美地模拟糖尿病和高脂血症等疾病的发生, 也能够模拟出 DCM 的典型症状, 如心肌肥大、心功能障碍以及结构和代谢的改变^[13]。STZ 和高脂饮食诱导小鼠 DCM 模型被广泛用于 DCM 的研究^[14], 其可靠性已经得到了广泛的验证和确认。因此, 本研究以 STZ 和高脂饮食诱导小鼠 DCM 模型, 评估 PCA 对 DCM 的影响, 并揭示其可能的分子机制, 为 DCM 的治疗提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 动物与细胞

体质量 (16 \pm 2) g 的雄性 C57 小鼠, 来源于广东省医学实验动物中心, 动物许可证号: SCXK (粤) 2018-0002。动物实验得到广东药科大学实验动物管理与使用委员会批准, 批准号为 SPF2022193。大鼠心肌细胞购买于中国科学院上海细胞库。

1.2 试剂与仪器

PCA, 上海麦克林生化科技有限公司; STZ, 上海皓元生物医药科技公司; 超声螯合剂, 天津津亚科技发展有限公司; 异氟烷, 深圳瑞沃德生命科技有限公司; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (Nod Like Receptor Protein 3, NLRP3) 和白细胞介素 1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) 抗体, 武汉泰克生物科技有限公司; 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1 (Cysteiny Aspartate Specific Proteinase 1, Caspase-1) 抗体, 三鹰生物技术有限公司; 酶联免疫吸附测定 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 试剂盒, 上海酶联生物科技有限公司。智

能细胞成像系统和 1510 型全波长酶标仪, 美国赛默飞世尔科技公司; 小动物超声影像系统, 美国贝克曼库尔特有限公司; 3300 小型化学发光成像系统, 上海勤翔科学仪器有限公司; 电泳仪, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠 DCM 模型建立与实验分组

将 24 只雄性 4 周龄 C57 小鼠用普通饲料适应性喂养 1 周后开始实验, 随机分为正常组 ($n=5$)、PCA 组 ($n=5$) 和实验组 ($n=14$), 按照 Yang 等^[14]的实验方法建立 DCM 模型。正常组和 PCA 给予普通饲料, 实验组给予高脂饲料喂养 4 周。4 周后, 实验组一次性腹腔注射 100 mg/kg STZ, 继续予以高脂饲料喂养 12 周建造 DCM 模型, 正常组和 PCA 组腹腔注射等体积柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。12 周后, 禁食不禁水 12 h, 测定空腹血糖, 实验组小鼠的血糖值 $\geq 1.66 \times 10^{-2}$ mol/L, 则认为糖尿病小鼠造模成功。继续心脏超声检测小鼠心功能, 测量并记录射血分数 (Ejection Fractions, EF) 和短轴缩短距 (Fractional Shortening, FS), 最终 10 只小鼠 DCM 模型建立成功, 未达标准者予以剔除。将 10 只实验组 DCM 小鼠随机分为 DCM 组和 DCM+PCA 组, 每组 5 只。PCA 组和 DCM+PCA 组每天按剂量 30 mg/kg^[15] PCA 灌胃一次, 持续给药 6 周。正常组和 DCM 组灌胃等量生理盐水。

1.3.2 心脏超声检测小鼠心功能

20 只小鼠均需要检测心功能。吸入异氟烷麻醉, 固定, 脱去胸腔前毛发, 鼠板四角固定处和小鼠胸腔前均涂抹超声耦合剂, 使用超声检测仪测定心超图后处理数据, 取 3 次平均值得出 EF 和 FS 值。

1.3.3 检测小鼠心肌损伤指标和炎症因子

小鼠眼球采血置于 1.5 mL 离心管, 在 4 °C, 12 000 r/min 的条件下离心 30 min, 取上清。用 ELISA 法检测血清中肌酸激酶 (Creatine Kinase, CK)、乳酸脱氢酶 (Lactate Dehydrogenase, LDH)、肌钙蛋白 I, 以及炎症因子 IL-1 β 、白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor Alpha, TNF- α) 的水平。

1.3.4 小鼠取材、测量心脏体重与总体重比值 (Heart Weight/Body Weight, HW/BW)

心脏灌注前, 小鼠眼球采血并固定。心脏灌注

时, 先在胸腔开口处插入注射器, 向心脏内注入磷酸缓冲液, 再剪开右心耳, 磷酸缓冲液从右心室流出。心脏灌注至肝肾颜色变浅后, 取出心脏并称重。将心脏切成两半, 一半冻存于 -80 °C 冰箱, 一半用质量分数为 4% 的多聚甲醛溶液固定。

1.3.5 小鼠心脏组织形态观察

用苏木精-伊红 (Hematoxylin Eosin, HE) 和马松染色法观察心肌损伤情况。染色前先将切片脱蜡, HE 染色用苏木素和伊红浸染后脱水封片, 马松染色用苏木素和丽春红酸性品红滴染后脱水封片。染色切片在通风橱中放置 2 d, 在显微镜找到合适的倍镜和位置拍照记录。

1.3.6 细胞分组

将大鼠心肌细胞分组: 对照组 (5.5×10^3 mol/L 葡萄糖 (Glucose, GLU) + 含各种氨基酸和葡萄糖的培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) 培养基作用 24 h)、PCA 组 (5.5×10^3 mol/L GLU+DMEM 培养基 + 5×10^{-6} mol/L PCA 作用 24 h)、高糖组 (3.3×10^{-2} mol/L GLU+DMEM 培养基刺激 24 h)、高糖+PCA 组 (3.3×10^{-2} mol/L GLU+DMEM 培养基 + 5×10^{-6} mol/L PCA 共作用 24 h)^[16,17], 于 37 °C 和体积分数为 5% 的二氧化碳细胞箱培养。

1.3.7 噻唑蓝 (Methyl Thiazolyl Tetrazolium, MTT) 法检测细胞存活率

大鼠心肌细胞贴壁于 96 孔板, 用不同浓度 PCA 处理 48 h, 每孔加入 0.02 mL MTT 和 0.18 mL 无血清 DMEM 培养基, 于细胞箱避光孵育 4 h。去除上清液, 每孔加入 0.15 mL 二甲基亚砜, 在 570 nm 波长下测定吸光度值, 绘制标准曲线。

1.3.8 蛋白质免疫印迹法检测心肌组织和细胞的蛋白表达水平

动物蛋白样品由心脏组织匀浆制备, 匀浆液中含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂, 以防止蛋白降解。细胞蛋白样品由细胞裂解制备, 细胞在 6 孔板中贴壁后, 用药物处理后裂解, 裂解液中加入蛋白酶抑制剂。蛋白浓度先定量后电泳, 转膜, 封闭, 一抗孵育过夜, 二抗室温孵育 1 h, 显影。

1.3.9 数据和统计学分析

将拍照记录的小鼠心脏超声图片在超声影像系统 M-mode 模式中处理, 自动导出 EF 和 FS 值。将蛋白质免疫印迹法得到的系列条带置于 Image 软件中分析, 得到蛋白相对表达量, 记录, 于 Prime 软

件中作图分析。采用 GraphPad Prism 7.01 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用最小差值检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 PCA对DCM小鼠LDH、CK和肌钙蛋白I含量的影响

表 1 各组小鼠LDH、CK和肌钙蛋白I含量变化

Table 1 The content of LDH, CK and troponin I were changed in each group (n=5)

组别	LDH/ (U/L)	CK/ (U/L)	肌钙蛋白 I (pg/mL)
正常组	452.21±36.21 ^c	591.48±35.65 ^c	197.48±14.14 ^c
PCA组	450.54±36.10 ^c	593.93±40.50 ^c	201.77±10.46 ^c
DCM组	1 081.12±83.56 ^a	1 084.35±97.57 ^a	251.82±13.69 ^a
DCM+ PCA组	538.51±42.92 ^b	885.93±42.65 ^b	221.87±11.31 ^b

注: P<0.05 认为具有统计学差异, 不同字母代表显著性差异, 下表同。

目前血清心肌酶指标活力的测定已广泛用于诊断和研究心肌损害性疾病, 其中 LDH、CK 和肌钙蛋白 I 较为特异地反映心肌细胞的损伤程度^[18], 心肌细胞损伤会升高 LDH 和 CK 的活性及其肌钙蛋白 I 的含量。如表 1 所示, 与正常组比较, PCA 组数据没有显著性差异, Wan 等^[16]和本实验均发现, 单独使用 30 mg/kg PCA 剂量灌胃 6 周不会引起小鼠心肌损伤, 证明此剂量下 PCA 无明显的心脏毒性作用, 不会干扰实验进展; DCM 组小鼠血清中 LDH、CK 表达水平分别为 1 081.12 U/L、1 084.35 U/L, 与正常组比较极显著升高了 139.07%、83.33% (P<0.01), 肌钙蛋白 I 含量为 251.82 pg/mL, 与正常组比较显著升高了 27.52% (P<0.05), 充分证明 DCM 组小鼠心肌损伤严重, 人工诱导的 DCM 模型构建成功。与 DCM 相比较, DCM+PCA 组小鼠 LDH、CK 和肌钙蛋白 I 含量显著降低 (P<0.05), 以上结果表明, PCA 活性成分对 STZ 诱导的心肌损伤指标的上升具有一定调节作用, PCA 对 DCM 疾病可以发挥改善作用。

2.2 PCA对DCM小鼠心肌组织中炎症因子的影响

IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 是心肌损伤预后的主要

指标。IL-6 主要参与炎症反应、调节免疫应答和自身免疫病^[19]。IL-1 β 是一种促炎性细胞因子, 可激活多种炎症细胞^[20]。TNF- α 可引起组织损伤并调节免疫反应, 在凋亡途径发挥重要作用^[21]。如表 2 所示, 与正常组比较, PCA 组未发生显著变化, 说明单独使用 30 mg/kg PCA 剂量灌胃 6 周不会引起小鼠心脏炎症反应, 表明 PCA 不会直接导致炎症反应的发生; DCM 组小鼠血清中炎症因子浓度显著增加, 模型小鼠心肌组织中 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 含量较正常组增加了 2 倍、7 倍和 4 倍 (P<0.05), 表明 DCM 组小鼠炎症损伤严重, 导致心肌损伤。与 DCM 组比较, DCM+PCA 组心肌组织中 IL-6 和 IL-1 β 水平显著降低分别为 60.17 ng/L 和 22.05 ng/L (P<0.05), TNF- α 水平极显著降低为 38.12 ng/L (P<0.01), 与 Yang 等^[11]的研究结果一致, PCA 提取物抑制了促炎因子白细胞介素和 TNF- α 的生成。以上结果表明 PCA 减轻炎症反应所致的心肌损伤可能与下调细胞炎症因子水平相关, 抑制 DCM 的发生及发展。

表 2 各组小鼠IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量变化

Table 2 Changes of IL-1 β , IL-6 and TNF- α content in each group (ng/L, n=5)

组别	IL-6	IL-1 β	TNF- α
正常组	39.17±2.95 ^c	8.47±1.13 ^c	16.86±2.28 ^c
PCA组	36.24±2.16 ^c	8.05±1.18 ^c	18.82±2.90 ^c
DCM组	82.39±3.99 ^a	60.11±7.87 ^a	76.54±5.06 ^a
DCM+PCA组	60.17±3.31 ^b	22.05±2.16 ^b	38.12±3.88 ^b

2.3 PCA对DCM小鼠心功能的影响

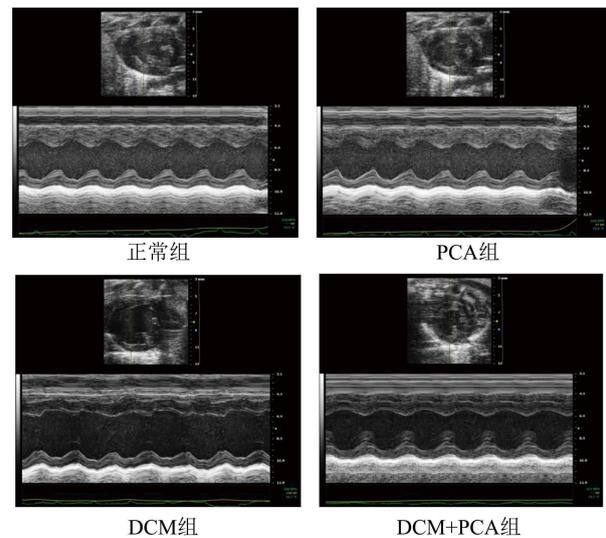


图 1 各组小鼠的心脏超声图像

Fig.1 Echocardiographic images of each group of mice

表 3 各组小鼠的心功能指标

Table 3 Cardiac function indexes of mice in each group ($n=5$)

组别	EF/%	FS/%	HW/BW (mg/g)
正常组	68.24±4.31 ^a	35.24±2.89 ^a	5.91±1.19 ^a
PCA组	69.94±7.76 ^a	34.55±3.49 ^a	5.98±1.13 ^a
DCM组	48.32±5.67 ^c	22.98±2.76 ^c	4.59±1.35 ^c
DCM+PCA组	54.91±4.28 ^b	28.07±2.83 ^b	5.42±1.32 ^b

EF是指心脏跳动一次泵出的血液量占心室舒张末期容积量的百分比,临床常用于判断心功能的基本情况以及心力衰竭的诊断。FS指左心室短轴缩短率,可以用于评估心室的收缩能力。一般心脏重量占体质量的百分之零点五,与体质量成比例关系,HW/BW可以反映一定的健康情况。如图1

和表3所示,与正常组比较,PCA组小鼠EF、FS和HW/BW值无显著差异,说明单独使用30 mg/kg PCA剂量灌胃6周不会引起小鼠心功能障碍,证明此剂量下PCA无明显的心脏毒性作用。表明PCA单独处理不会使小鼠心功能受损;DCM组小鼠EF、FS分别为48.32%、22.98%,与正常组比较分别极显著降低了29.19%、34.79% ($P<0.01$),HW/BW值显著降低为4.59 mg/g ($P<0.05$),结合DCM组小鼠出现糖尿病心肌病变以及心功能恶化现象,表明DCM小鼠造模成功。与DCM组比较,DCM+PCA组小鼠EF极显著升高为54.91% ($P<0.01$),FS和HW/BW值较DCM组分别显著升高了22.15%和18.08% ($P<0.05$),表明PCA明显改善DCM小鼠的心脏功能。

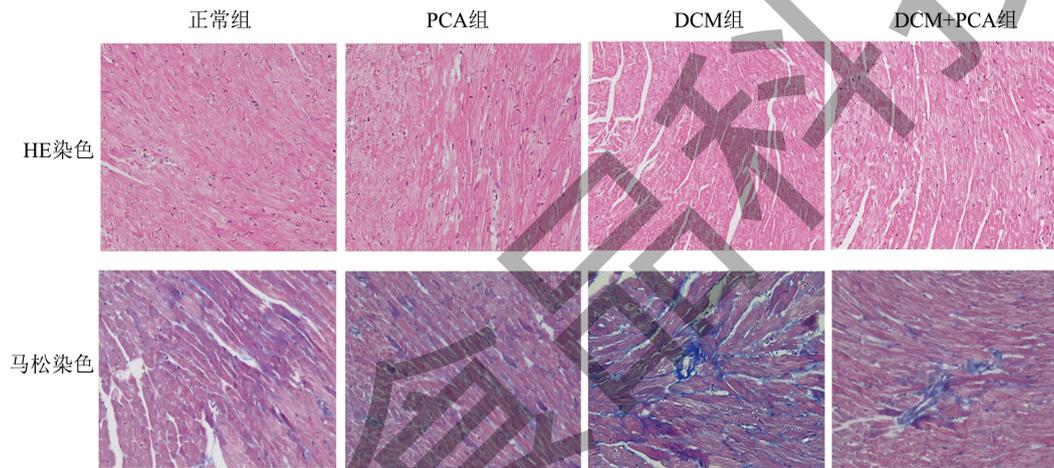


图 2 镜下观察各组小鼠心脏组织形态 (400×)

Fig.2 The morphology of heart tissue was observed under microscope (400×)

2.4 HE和马松染色观察DCM小鼠的心肌损伤情况

组织病理学染色结果直接表明STZ成功诱导了小鼠DCM。如图2所示,HE染色结果显示,与正常组比较,DCM组小鼠心肌细胞排列紊乱,心肌纤维排列混乱;与DCM组比较,DCM+PCA组心肌细胞排列情况得到明显改善。马松染色结果显示,与正常组比较,DCM组小鼠左心室心肌组织存在心肌纤维化,心肌胶原纤维增多,心肌间质和血管周围胶原纤维增多且排列紊乱;与DCM组比较,DCM+PCA组小鼠有一定的程度的减轻,心肌间质胶原纤维明显减少。结果提示PCA活性成分可减轻DCM小鼠心肌纤维化及心肌细胞凋亡,改善心肌损伤。

2.5 PCA对DCM小鼠心肌组织NLRP3炎症小体相关蛋白的影响

NLRP3炎症小体是由NLRP3、Caspase-1和凋亡相关斑点样蛋白组成的复合物。它能够激活Caspase-1,促进IL-1 β 等促炎性细胞因子的成熟和释放^[22]。Olhava等^[23]的研究表明,心肌细胞NLRP3炎症小体的激活与DCM的发生和发展有关。如图3所示,与正常组比较,DCM组小鼠心肌组织中NLRP3、Cleaved caspase-1和Cleaved IL-1 β 蛋白相对表达含量分别为3.85、5.98和3.82,较正常组分别极显著增多了3倍、6倍和4倍 ($P<0.01$),说明DCM小鼠心肌组织炎症损伤严重;与DCM组比较,DCM+PCA组小鼠心肌NLRP3、Cleaved caspase-1和Cleaved IL-1 β 蛋白相对表达含量显著降低了29.61%、35.28%

和 54.19% ($P < 0.05$)。DCM 小鼠心脏组织中 NLRP3、Cleaved caspase-1 和 Cleaved IL-1 β 蛋白的表达显著高于正常组，而 PCA 干预能够有效降低这些蛋白的表达，说明 PCA 可以减少 STZ 联合高脂饲料诱导的 DCM 小鼠心肌 NLRP3 炎症小体相关蛋白的激活。此外，NLRP3 炎症小体的过度激活还与多种心血管疾病如心肌缺血再灌注有关^[24]。因此，PCA 作为一种 NLRP3 炎症小体的抑制剂，可能对多种心血管疾病有治疗作用。

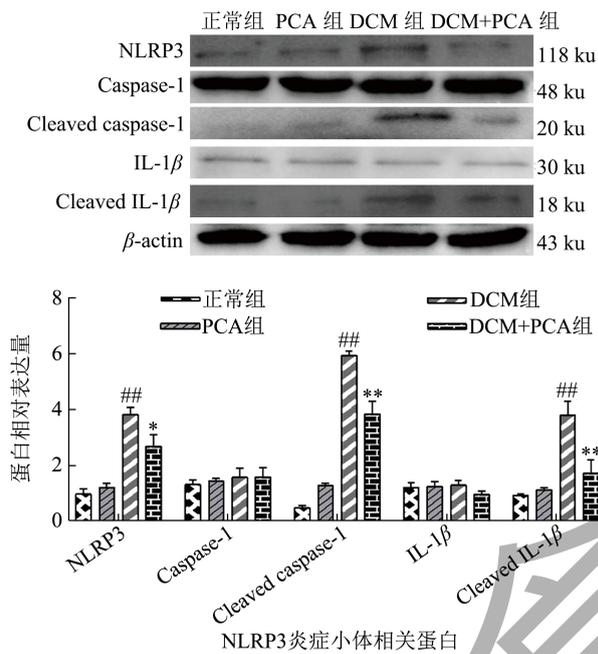


图3 各组小鼠心肌组织中 NLRP3 炎症小体相关蛋白水平的变化

Fig.3 Changes of NLRP3 inflammasome related protein levels in myocardial tissue of mice in each group ($n=5$)

注：与正常组比较，[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ ；与 DCM 组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

2.6 PCA 对高糖诱导的大鼠心肌细胞存活率的影响

如图 4 所示，与正常组比较，高糖 24 h 处理后的心肌细胞存活率显著降低了 42.29% ($P < 0.05$)，说明高糖对心肌细胞具有一定的毒性作用；与高糖组比较，低浓度 PCA (1.25×10^{-6} mol/L) + 高糖诱导的心肌细胞存活率无显著性差异，中浓度 PCA (2.50×10^{-6} mol/L) + 高糖诱导的心肌细胞存活率显著升高为 74.31% ($P < 0.05$)；高浓度 PCA (5×10^{-6} mol/L) + 高糖处理大鼠心肌细胞的存活率极显著升高为 80.17% ($P < 0.01$)，以上说明中和高浓度 PCA 均可以明显抑制高糖诱导的心肌细胞存活

率降低，但高浓度 PCA 作用的更明显。 5×10^{-6} mol/L PCA 能缓解高糖对大鼠心肌细胞的毒性作用^[16]，提示 PCA 可改善 DCM，具有潜在的临床应用价值。因此，选用 5×10^{-6} mol/L PCA 用于后续细胞实验。

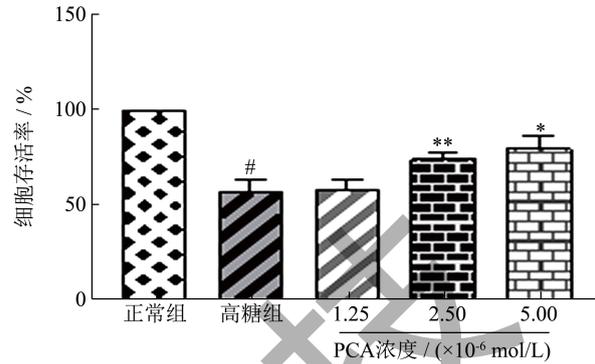


图4 PCA 对高糖诱导的心肌细胞存活率的影响

Fig.4 The effect of PCA on high glucose-induced cell viability in myocardium cells ($n=3$)

注：与正常组比较，[#] $P < 0.05$ ；与高糖组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

2.7 PCA 对高糖诱导大鼠心肌细胞中 NLRP3 炎症小体相关蛋白水平的影响

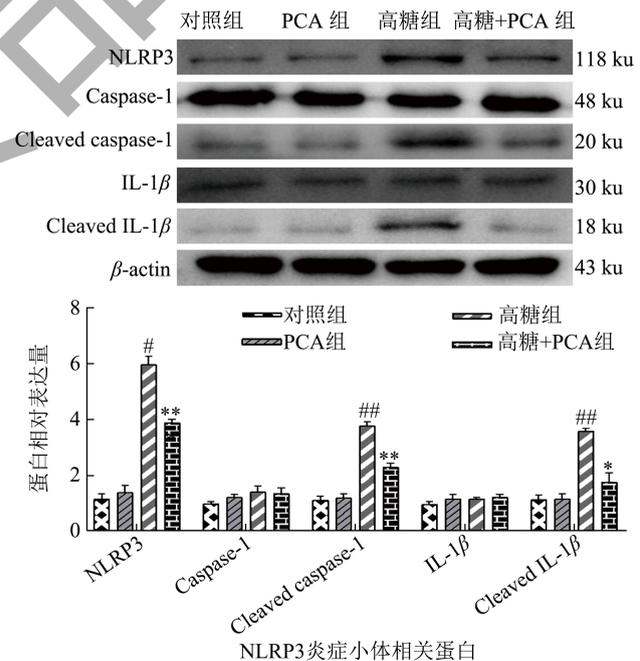


图5 不同心肌细胞中 NLRP3 炎症小体相关蛋白水平的变化
Fig.5 Changes of NLRP3 inflammasome related protein levels in different myocardium cells ($n=3$)

注：与对照组比较，[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ ；与高糖组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

如图 5 所示，与对照组比较，高糖可诱导心肌细胞 NLRP3 蛋白、Cleaved caspase-1 和 Cleaved IL-1 β

蛋白表达含量显著升高为 5.89、3.92 和 3.76 ($P < 0.05$), 说明心肌细胞经高糖诱导会出现炎症紊乱及相关损伤; 与 PCA 共培养后, 大鼠心肌细胞中 NLRP3 蛋白、Cleaved caspase-1 和 Cleaved IL-1 β 表达含量较对照组均分别明显降低了 34.31%、44.39% 和 54.26% ($P < 0.05$)。上述实验结果与 Haneklaus 等^[25]研究一致, 高糖诱导的心肌细胞 NLRP3 炎症小体的激活也能被 PCA 抑制, 表明 PCA 可显著抑制高糖所致的大鼠心肌细胞毒性作用, 充分证实了 PCA 能抑制 NLRP3 炎症小体的激活, 其抗 DCM 作用可能与此有关。

3 结论

综上所述, PCA 不会影响小鼠心功能障碍、心肌损伤和心脏炎症反应, 没有明显的毒性作用, 可以抑制心肌组织炎症因子的升高, 改善 STZ 诱导的 DCM。因此, PCA 防治 STZ 诱导的 DCM 的作用机制可能通过抑制心肌组织 NLRP3 炎症小体激活, 减弱炎症因子表达量的上调, 改善小鼠心肌损伤和心功能, 从而抑制心肌炎症反应。其具体的作用机制有待于进一步的研究与证实。因此, 本实验可为临床上应用 PCA 减轻 DCM 患者的心脏损伤提供实验基础, 并为开发丹参的保健应用价值提供新的理论依据。

参考文献

- [1] 朱宇溪,周慢,赵兴旺,等.糖尿病心肌病的中医治疗进展[J].四川中医,2017,35(5):218-220.
- [2] GHULAM M, MUHAMMAD K, VIJAY R, et al. Diabetic cardiomyopathy-a comprehensive updated review [J]. Progress in Cardiovascular Diseases, 2019, 62(4): 315-326.
- [3] 王俊锋,吕素,郭员志,等.2型糖尿病患者一级亲属糖尿病知识、态度、行为的现状调查[J].重庆医学,2018, 47(34):4435-4438.
- [4] EGBERT B, PAULINA W, MICHAEL P, et al. Targeting cardiac hypertrophy: toward a causal heart failure therapy [J]. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2014, 64(4): 293-305.
- [5] GE Z D, LIAN Q Q, MAO X W, et al. Current status and challenges of Nrf 2 as a potential therapeutic target for diabetic cardiomyopathy [J]. International Heart Journal, 2019, 60(3): 512-520.
- [6] THOMAS H M, REBECCA R, DAVID K, et al. Implications of underlying mechanisms for the recognition and management of diabetic cardiomyopathy [J]. Journal of the American College of Cardiology, 2018, 71(3): 339-351.
- [7] 黄泓轲,罗健玮,冉华.大豆异黄酮改善糖尿病心肌病大鼠心功能及心肌纤维化机制的研究[J].中国糖尿病杂志, 2023, 31(5):376-381.
- [8] SHI M, HUANG F F, DENG C P, et al. Bioactivities, biosynthesis and biotechnological production of phenolic acids in Salvia miltiorrhiza [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(6): 953-964.
- [9] 冯科冉,李伟霞,王晓艳.丹参化学成分、药理作用及其质量标志物的预测分析[J].中草药,2022,53(2):609-618.
- [10] KYOUNG J K, MI A K, JEE H J. Antitumor and antioxidant activity of protocatechualdehyde produced from streptomyces lincolnensis m-20 [J]. Archives of Pharmacal Research, 2008, 31(12): 1572-1577.
- [11] YANG J K, LI J C, TAN R Z, et al. Protocatechualdehyde attenuates obstructive nephropathy through inhibiting lncRNA9884 induced inflammation [J]. Phytotherapy Research, 2021, 35(3): 1521-1533.
- [12] WEI G, GUAN Y, YIN Y, et al. Anti-inflammatory effect of protocatechuic aldehyde on myocardial ischemia/reperfusion injury *in vivo* and *in vitro* [J]. Inflammation, 2013, 36(3): 592-602.
- [13] TONG M M, ZHAI P Y, TOSHIRO S, et al. Mitophagy is essential for maintaining cardiac function during high fat diet-induced diabetic cardiomyopathy [J]. Circulation Research, 2019, 124(9): 1360-1371.
- [14] YANG F, QIN Y, WANG Y Q, et al. Metformin inhibits the Nlrp3 inflammasome via Ampk/Mtor-dependent effects in diabetic cardiomyopathy [J]. International Journal of Biological Sciences, 2019, 15(5): 1010-1019.
- [15] CHANG Y T, CHUNG M C, WU M J, et al. Evaluation of the therapeutic effects of protocatechuic aldehyde in diabetic nephropathy [J]. Toxins, 2021, 13(8): 560-572.
- [16] WAN Y J, WANG Y H, GUO Q, et al. Protocatechualdehyde protects oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced myocardial injury via inhibiting perk/atf α /ire 1 α pathway [J]. European Journal of Pharmacology, 2021, 891: 173-723.
- [17] FAN D, YANG Z, LIU F Y, et al. Sesamin protects against cardiac remodeling via Sirt3/Ros pathway [J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2017, 44(6): 2212-2227.
- [18] 徐繁,李潇,肖旭,等.灵芝多糖对阿霉素所致心肌损伤的作用及机制研究[J].中国现代医学杂志,2021,31(10):29-34.
- [19] CHRISTOPHER A H, SIMON A J. Corrigendum: il-6 as a keystone cytokine in health and disease [J]. Nature Immunology, 2017, 18(11): 1271-1276.
- [20] 黎笑兰,张新广,尹少萍.白芨多糖抑制溃疡性结肠炎大鼠

- 炎性反应与氧化应激[J].基础医学与临床,2020,2:224-228.
- [21] RISHI B, MELISSA K S, JEFFREY S C, et al. IL-1 β (interleukin-1 β) and Tnf- α (tumor necrosis factor- α) impact abdominal aortic aneurysm formation by differential effects on macrophage polarization [J]. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2018, 38(2): 457-463.
- [22] WAN Y J, GUO Q, LIU D, et al. Protocatechualdehyde reduces myocardial fibrosis by directly targeting conformational dynamics of collagen [J]. European Journal of Pharmacology, 2019, 855: 183-191.
- [23] EDWARD J O, WILLIAM R R, GARY D G, et al. Targeting the Nlrp3 inflammasome in inflammatory diseases [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2018, 17(8): 588-606.
- [24] HE Y, HIDEKI H, GABRIEL N. Mechanism and regulation of Nlrp3 inflammasome activation [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2016, 41(12): 1012-1021.
- [25] MORITZ H, LUKE A J O. NLRP3 at the interface of metabolism and inflammation [J]. Immunological Reviews, 2015, 265(1): 53-62.

现代食品科技