

• 基础研究 •

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 通路激活对糖尿病大鼠心肌纤维化的影响

赵树梅, 李虹伟, 沈潞华

【摘要】 目的 探讨过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)通路激活对糖尿病大鼠心肌纤维化进展、糖尿病早期心肌重塑和心功能的影响。方法 48只SD大鼠,除正常对照组(I组, $n=16$)外,其余大鼠注射链脲佐菌素制备1型糖尿病大鼠模型后分成2组:糖尿病组(II组, $n=16$)和糖尿病吡格列酮治疗组(III组, $n=16$)。喂养14周后,测定各组大鼠心肌纤维化程度指标;行超声心动图检查及心室内压测定,评价心脏重塑及心功能变化情况。结果 14周后,与I组相比,II组大鼠心肌羟脯氨酸含量显著升高($P<0.05$)。天狼星红染色显示II组大鼠心肌弥漫性纤维化较I组明显增强;III组纤维化程度较II组明显减轻。II组大鼠左室收缩压显著降低、左室舒张末压显著升高;而III组上述情况明显改善。结论 吡格列酮干预可减轻糖尿病大鼠心肌纤维化程度,并在一定程度上改善糖尿病早期心脏重塑和心功能状况。

【关键词】 过氧化物酶体增殖物受体;糖尿病;大鼠;心肌纤维化;心功能

【中图分类号】 R587.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-5403(2010)06-0525-04

Effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ signal pathway activation on cardiac fibrosis in diabetic rats

ZHAO Shumei, LI Hongwei, SHEN Luhua

Cardiovascular Research Center, Beijing Friendship Hospital, Beijing 100050, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) signal pathway activation on cardiac fibrosis in diabetic rats, and the effects on cardiac remodeling and cardiac function at early stage of diabetes. Methods Forty-eight SD rats were divided into 3 groups; control, diabetic, and pioglitazone (Piog) treatment groups, with 16 in each group. Except control group, other 32 rats received abdominal injection of streptozotocin (STZ) to prepare type 1 diabetic models. After 14 weeks, fibrosis indices were determined; cardiac remodeling and cardiac function were evaluated by echocardiography and intraventricular pressures indices. Results After 14 weeks, compared with control group, hydroxyproline concentration in diabetic group significantly increased ($P<0.05$). Sirius red staining showed that cardiac fibrosis was more obvious in diabetic group than in control group, and significantly lessened in Piog group than in diabetic group. In diabetic group, the left ventricular systolic pressure reduced significantly and the left ventricular end-diastolic pressure increased significantly, which were obviously improved by Piog administration. Conclusion Piog treatment can alleviate cardiac fibrosis in diabetic rats and improve cardiac remodeling and cardiac function at early stage of diabetes.

【Key words】 peroxisome proliferator-activated receptor γ ; diabetes mellitus; rats; cardiac fibrosis; cardiac function

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)是核受体超家族的一员;被激活后通过与目的基因启动子或增强子的应答元件结合,启动目的基因的转录与表

达,合成相关酶类和蛋白质,发挥特定的生物学效应。PPAR γ 配体可改善胰岛素敏感性、保护胰岛 β 细胞功能,其合成配体噻唑烷二酮类药物(thiazolidinediones, TZDs)在临床上广泛用于治疗2型糖

作者单位:100050北京市,首都医科大学附属北京友谊医院心血管中心
通讯作者:沈潞华, Tel:13488659426, E-mail: yd678182@163.com

尿病。数项研究显示 TZDs 还可抑制多种器官纤维化^[1,2],保护器官功能;同时,TZDs 还具有广泛的心血管系统效应,如降低血压、抑制动脉粥样硬化、限制心肌梗死范围等^[3,4]。本研究旨在探讨 PPAR γ 激动剂吡格列酮(pioglitazone, Piog)对糖尿病大鼠心肌纤维化和心功能的影响。

1 材料与方 法

1.1 动物 SD 大鼠 48 只,体重(200±20)g。除正常对照组(I组,n=16)外,其余 32 只一次性腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, Sigma 公司)60mg/kg。72,120h 后两次测定血糖≥16.7mmol/L 定义为 I 型糖尿病大鼠^[5]。模型大鼠分成 2 组,糖尿病组(II组,n=16);糖尿病治疗组(III组,n=16)。III组大鼠成模后每天给予 Piog 10mg/kg(生理盐水稀释)灌胃,其他 2 组每天给予等量的生理盐水灌胃,标准喂养 14 周。

1.2 心功能指标测定

1.2.1 超声心动图 各组大鼠以 6%水合氯醛麻醉,行二维、M 型超声心动图检查,测定心室舒张末内径(end-diastolic diameter, EDD)、室间(interventricular septum, IVS)隔厚度及射血分数(ejection fraction, EF)。因各组大鼠心脏体积和质量相差较大,以上指标/心质量得到校正,如 EDD-I, IVS-I,进行比较。

1.2.2 心室内压测定 麻醉大鼠行右侧颈动脉置管,头端置入左心室,连接压力换能器、压力检测系统,测定心率(heart rate, HR)、左室收缩压(left ventricle systolic pressure, LVSP)、左室舒张末压(left ventricle end-diastolic pressure, LVEDP)、室内压最大上升速率(+dp/dt_{max})和室内压最大下降速率(-dp/dt_{max})等指标,标志各组大鼠的心功能状态。

1.3 心肌纤维化程度测定

1.3.1 羟脯氨酸测定 碱水解法测定。按试剂盒步骤进行。使用碱水解液将心肌组织胶原的一级结构破坏,使蛋白质分解成氨基酸;利用氨基酸在氧化剂的作用下产生的氧化产物与二甲氨基苯甲醛作用呈现紫红色,通过分光光度计比色,计算出水解液中羟脯氨酸的含量。

1.3.2 天狼星红染色 石蜡切片常规二甲苯、梯度乙醇脱蜡至水,入 1%苦味酸天狼星红染液 1h;自来水冲洗 10min 后, Mayer 苏木精复染细胞核 1min,再次自来水冲洗 10min。梯度乙醇脱水,二甲苯透明后,以中性树脂封片。偏振光显微镜下观

察胶原分布情况。

1.4 统计学处理 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析(one way-ANOVA),两两比较用 S-N-K 检。率的比较使用卡方检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。所有资料均予 SPSS12.0 软件包处理。

2 结 果

2.1 14 周后大鼠生存率、体质量、心质量、随机血糖及心肌羟脯氨酸含量情况 见表 1。

2.2 天狼星红染色结果 天狼星红染色是胶原纤维特异性染色方法,偏振光显微镜下可见,II 组大鼠心肌弥漫性纤维化(I 型胶原呈红黄色,III 型胶原呈绿色),较 I 组明显增强;而 III 组纤维化程度较 II 组有所减轻(图 1)。

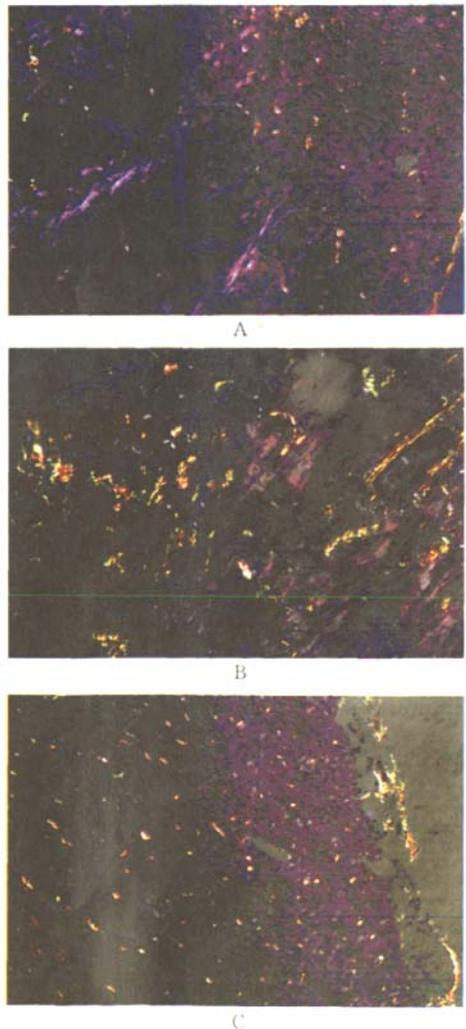


图 1 大鼠心肌纤维化情况(天狼星红染色 ×20) A:正常对照组;B:糖尿病组;C:Piog 治疗组

表1 糖尿病造模14周后三组大鼠生存率、体质量、心质量、心肌羟脯氨酸含量及随机血糖的比较(n=16)

组别	生存率(n(%))	体质量(g)	心质量(g)	羟脯氨酸含量(mg/g)	随机血糖(mmol/L)
I组	16(100)	590±37	7.8±0.4	0.035±0.005	9.2±2.9
II组	7(44)*	238±21*	3.9±0.5*	0.046±0.005*	22.6±5.7*
III组	13(81)*	285±58*	4.6±0.6**	0.039±0.008*	18.5±2.6*

注: I组:正常对照组; II组:糖尿病组; III组:Piog治疗组。与对照组比较,*P<0.05;与糖尿病组比较,**P<0.05

2.3 心功能指标结果 与I组比较, II组LVSP明显降低, LVEDP明显升高;经Piog干预, III组LVSP升高, LVEDP降低, 差异具有统计学意义(P<0.05)。超声结果显示, 3组EF值、EDD无显著差异(P>0.05), 但II和III组发生了室间隔增厚, IVS均显著高于I组(P<0.05;表2)。

3 讨论

心肌纤维化是心肌组织结构中胶原纤维过量聚积或胶原成分发生改变, 表现为心肌成纤维细胞增生, I、III型胶原合成增加^[6], 降解减少;非胶原蛋白-纤连蛋白、层连蛋白合成增加^[7], 细胞外基质代谢失衡、堆积, 导致心脏室壁僵硬增加、舒张功能减退, 最终出现收缩功能障碍, 发生心力衰竭;同时研究发现心肌纤维化还与心律失常、心源性猝死的发生密切相关。目前对于心肌纤维化发生、发展机制的研究还处于探索阶段, 尚缺乏规范的诊断、评价方法, 以及有效、系统的药物治疗和干预措施。

本研究以糖尿病大鼠作为模型来探讨心肌纤维化发生、发展, 以及药物干预的影响和可能的机制。据文献资料显示, 糖尿病大鼠成模后3个月尚属糖尿病早期阶段;本研究中成模14周后, II组大鼠心质量、体质量显著下降;死亡率显著高于III组。PPARγ激动剂为胰岛素增敏剂, 本研究显示其对I型糖尿病大鼠血糖水平无明显影响; II、III组随机血糖均显著高于I组, 但II、III组间血糖差异无统

计学意义, 可除外两组间血糖差异对心肌纤维化结果的影响;也可说明II组大鼠死亡率高于III组与血糖因素无关。

羟脯氨酸是胶原蛋白特有的氨基酸, 占胶原氨基酸总量的13%, 因此羟脯氨酸含量反映了胶原总体水平和组织纤维化的程度。本研究中, II组大鼠心肌羟脯氨酸的含量显著高于I组, PPARγ激动剂治疗显著降低羟脯氨酸的含量, 抑制心肌纤维化。天狼星红染色进一步证实了PPARγ激动剂治疗可减轻糖尿病心肌纤维化, 且发现糖尿病心肌的纤维化早期主要发生在外膜下及小冠状动脉周围。

14周时, 糖尿病大鼠心肌已经发生了间质纤维化、重塑, 超声心动图显示EDD-I与对照组比较无显著差异, 但IVS-I明显高于对照组。心功能方面, 3组大鼠EF无统计学差异;但是, 心室内压测定发现糖尿病大鼠LVEDP已经显著升高, LVSP显著降低;Piog干预显著改善了糖尿病大鼠室内压状况。+dp/dt_{max}在各组间无显著差异; -dp/dt_{max}在II组明显低于I组, 说明早期糖尿病影响了大鼠心肌舒张功能, 但Piog干预未能改善这一状况。

心肌纤维化的发生、发展存在着复杂的机制, 与核转录因子、炎症因子、促纤维化因子表达变异有关;笔者以往的研究证实, PPARγ通路激活可抑制心肌成纤维细胞血管紧张素II 1型受体的表达^[8], 降低肾素-血管紧张素系统的作用而抑制纤维化的程度;而糖尿病组织纤维化恰恰与肾素-血管紧

表2 三组大鼠心功能指标结果

组别	n	LVSP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	+dp/dt _{max} (mmHg/ms)	-dp/dt _{max} (mmHg/ms)	EDD-I	IVS-I	EF(%)
I组	16	53±8	1.1±1.6	1.5±0.8	1.13±0.29	14±3	2.8±0.5	71±8
II组	7	27±8*	5.9±2.3*	0.9±0.4	0.58±0.20*	19±4	5.4±0.6*	58±20
III组	13	41±9**	2.5±2.1*	0.9±0.4	0.69±0.22*	21±4	4.5±1.1*	74±17

注: LVSP:左室收缩压; LVEDP:左室舒张末压; +dp/dt_{max}:室内压最大上升速率; -dp/dt_{max}:室内压最大下降速率; EDD-I:心室舒张末内径指数; IVS-I:室间隔厚度指数; EF:射血分数; I组:正常对照组; II组:糖尿病组; III组:Piog治疗组。与对照组比较,*P<0.05;与糖尿病组比较,**P<0.05

张素过度激活有关。本研究显示,PPAR γ 通路激活可抑制糖尿病心肌纤维化的发生、发展,在病程早期即可改善心脏功能。因此,在使用TZDs药物治疗糖尿病的同时,还可抑制糖尿病心肌重塑。另外,糖尿病导致的心肌纤维化有其特异性因素——糖基化终末产物的生成。已有研究显示,PPAR γ 激动剂可降低糖尿病大鼠血管内皮糖基化终末产物受体的表达,改善血管功能^[9]。因此,PPAR γ 激动剂对糖尿病心肌纤维化的作用机制还有待进一步研究。

【参考文献】

[1] Panchapakesan U, Sumual S, Pollock CA, *et al.* PPAR-gamma agonists exert antifibrotic effects in renal tubular cells exposed to high glucose[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 289(5): F1153-F1158.

[2] Van Westerloo DJ, Florquin S, de Boer AM, *et al.* Therapeutic effects of troglitazone in experimental chronic pancreatitis in mice[J]. *Am J Pathol*, 2005, 166(3): 721-728.

[3] Negro R, Dazzi D, Hassan H, *et al.* Pioglitazone reduces blood pressure in non-dipping diabetic patients[J]. *Minerva Endocrinol*, 2004, 29(1): 11-17.

[4] Yue TL, Chen J, Bao W, *et al.* *In vivo* myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by the pero-

xisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone [J]. *Circulation*, 2001, 104(21): 2588-2594.

[5] 沈亚非, 徐焱成. 链脲佐菌素诱导实验性糖尿病大鼠模型建立的研究[J]. *实用诊断与治疗杂志*, 2005, 19(2): 79-80.

[6] Takano H, Hasegawa H, Nagai T, *et al.* Implication of cardiac remodeling in heart failure: mechanisms and therapeutic strategies[J]. *Intern Med*, 2003, 42(6): 465-469.

[7] Fredersdorf S, Thumann C, Ulucan C, *et al.* Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2004, 13(1): 11-19.

[8] Zhao SM, Shen LH, Li HW, *et al.* Down-regulation of the expression of angiotensin II type I receptor in neonatal rat cardiac fibroblast by activation of PPAR-gamma signal pathway[J]. *Chin J Physiol*, 2008, 51(6): 357-362.

[9] Marx N, Walcher D, Ivanova N, *et al.* Thiazolidinediones reduce endothelial expression of receptors for advanced glycation end products[J]. *Diabetes*, 2004, 53(10): 2662-2668.

(收稿日期:2009-04-21;修回日期:2010-05-31)

• 消息 •

中国科技核心期刊

《中华临床医师杂志(电子版)》2011年度征稿征订

《中华临床医师杂志(电子版)》是中国科技核心期刊,半月刊,全年出刊24期,定价672元,国内刊号CN 11-9147/R,邮发代号80-728,被万方数据库、中国期刊网、维普数据库、美国化学文摘、乌利希期刊指南、波兰哥白尼索引等国内外知名数据库收录。

2011年度重点栏目征稿及2011年优惠征订详情请见中华临床医师杂志官方网站 www.clinicmed.net 的期刊动态。欢迎广大临床医师积极投稿并订阅杂志! 欢迎各位专家组织、推荐、撰写重点栏目论文!

投稿邮箱:北京市100035-50信箱编辑部收

邮编:100035

投稿邮箱:Lcdoctor@163.com

电话:010-62219211

传真:010-62222508

网址:www.clinicmed.net