

吡格列酮通过抑制炎症反应和 TGF- β 1/Smad3 信号通路抗 2 型糖尿病大鼠心肌纤维化的研究

王灵纳, 康福新

海南医学院第二附属医院 老年病科, 海南 海口 570000

摘要: 目的 观察吡格列酮对 2 型糖尿病 (T2DM) 模型大鼠心肌纤维化的影响。方法 清洁级雄性 SD 大鼠随机分为对照组和模型组, 对照组喂饲正常食物, 模型组喂饲高脂饲料, 2 周后模型组大鼠一次性尾 iv 链脲佐菌素 (STZ) 50 mg/kg。造模成功大鼠又随机分为模型组和吡格列酮低、高剂量 (5、10 mg/kg) 组, 除对照组, 其余大鼠继续给予高脂饲料, 每天 ig 给药 1 次至 12 周。心室彩色超声检测心输出量 (CO)、左心室舒张末期 (LVIDd) 和收缩末期内径 (LVIDs); 眼眶采血, 应用葡萄糖氧化酶法检测试剂盒测血糖; 天狼猩红染色计算胶原容积分数; ELISA 法检测外周血肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白介素-6 (IL-6) 水平; Western blotting 检测心肌组织转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 和 Smad3 蛋白表达。结果 与模型组比较, 吡格列酮组血糖、LVIDd 和 LVIDs 显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), CO 显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 吡格列酮低、高剂量组心肌间质胶原纤维显著减少, 胶原容积分数显著降低 ($P < 0.01$); 吡格列酮组 TNF- α 和 IL-6 表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 吡格列酮组 TGF- β 1 和 Smad3 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.01$); 作用均呈剂量相关性。结论 吡格列酮通过抑制炎症反应以及 TGF- β 1/Smad3 信号通路, 发挥抗糖尿病大鼠心肌纤维化的作用。

关键词: 吡格列酮; 糖尿病心肌病; 心肌纤维化; TGF- β 1/Smad3 信号通路

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2020) 09-1754-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.09.013

Pioglitazone inhibits myocardial fibrosis in type 2 diabetic rats by inhibiting inflammatory response and TGF- β 1/Smad3 signaling pathway

WANG Lingna, KANG Fuxin

Department of Geriatrics, Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570000, China

Abstract: Objective To observe the effect of pioglitazone on myocardial fibrosis in Type 2 diabetes mellitus (T2DM) rats. **Methods** SD rats were divided into control group and T2DM model group. Rats in control group was fed with normal food. T2DM model group was given 40% calories for fat. After two weeks, the T2DM model group was injected with STZ (50 mg/kg). T2DM rats were divided into: model group, pioglitazone low and high dose group. Except for the control group, the rest of the rats were continued given high-fat diet, once ig a day to 12 weeks. Cardiac output (CO), left ventricular end diastolic (LVIDD) and end systolic diameter (LVIDS) were measured by echocardiography. Blood samples were collected from orbit and blood glucose was measured by glucose oxidase method. Collagen volume fraction was calculated by Sirius red staining. TNF- α and IL-6 was detected by ELISA analysis. TGF- β 1 and Smad3 was detected by Western blotting. **Results** Blood glucose, LVIDd and LVIDds in pioglitazone group were significantly lower than those in model group ($P < 0.05$ and 0.01), while CO was significantly higher than that in model group ($P < 0.05$). In pioglitazone low and high dose groups, myocardial interstitial collagen fibers and collagen volume fraction were significantly decreased compared with model group ($P < 0.01$). The expression of TNF- α and IL-6 in pioglitazone group was lower than that in model group ($P < 0.01$). The relative gray values of TGF- β 1 and Smad3 in pioglitazone group was lower than that in model group ($P < 0.01$). **Conclusion** Pioglitazone can inhibit inflammatory and TGF- β 1/Smad3 path way to block myocardial fibrosis in diabetic rats.

Key words: pioglitazone; diabetic cardio myopathy(DCM); myocardial fibrosis; TGF- β 1/Smad3 path way

收稿日期: 2019-12-13

基金项目: 海南省自然科学基金资助项目(20168394)

第一作者: 王灵纳, 女, 汉族, 本科, 主治医师, 研究方向内科(老年病)。E-mail: wln54412073@163.com

糖尿病是近年来高发的一种疾病,高糖环境可以导致心肌胶原沉积,间质纤维化,进而发展为糖尿病心肌病(diabetic cardio myopathy, DCM)^[1],严重影响心脏的收缩和舒张功能,成为晚期糖尿病患者死亡的主要原因^[2]。吡格列酮是一种经典的过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR γ)激动剂^[3],临床使用中发现吡格列酮不仅可以降低血糖,还具有心脏保护作用^[4]。本研究通过给予SD大鼠高脂饮食,联合ip小剂量链脲佐菌素(STZ)构建2型糖尿病(T2DM)模型,观察吡格列酮对T2DM模型大鼠心肌纤维化的影响,并探讨其相关的机制。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

吡格列酮(批号20190222,质量分数98.8%),杭州中美华东制药有限公司;链脲佐菌素(STZ),美国Sigma公司;肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白介素-6(IL-6)检测试剂盒,购自上海康朗生物科技有限公司;转化生长因子 β 1(TGF- β 1)、Smad3、 β -actin抗体,购自美国Abcam公司;BCA蛋白浓度检测试剂盒,购自碧云天生物科技有限公司;天狼猩红,购自美国Sigma公司;葡萄糖氧化酶法检测试剂盒(批号MB091122),购自美国雅培公司。

1.2 主要仪器

ADVIA2400全自动生化分析仪,德国西门子公司;BX53MRF-S显微镜,日本奥林巴斯公司;垂直电泳仪和电转移槽,美国Bio-Rad公司。

1.3 实验动物

80只清洁级雄性SD大鼠,7周龄,170~190 g,购自海南省动物实验中心,实验动物生产许可证号SYXK(琼)2018-0034,清洁级环境,室温下适应性饲养7 d后,进行T2DM模型制作。

2 方法

2.1 实验造模、分组给药

参考Reed等的方法^[5]构建T2DM大鼠模型。80只清洁级雄性SD大鼠使用随机数字表法分为对照组($n=20$)和模型组($n=60$),对照组喂饲正常食物,模型组喂饲高脂饲料(基础饲料添加28%蔗糖、20%炼猪油、1%胆固醇和0.25%胆酸盐),2周后T2DM模型组大鼠尾iv一次性注射STZ(50 mg/kg)。72 h后测血糖 >11.1 mmol/L判定为造模成功,选取造模成功的47只大鼠,随机分为模型组($n=15$)和吡格列酮低、高剂量(5、10 mg/kg)组(均为 $n=16$)。T2DM模型大鼠自由进食饮水,继续给予高脂饲料,每天ig给药1次,对照组和模型组

ig等体积生理盐水。12周后断颈处死各组大鼠,检测相关指标。

2.2 实验室观察指标

大鼠处死前,心室彩色超声检测心输出量(CO)、左心室舒张末期(LVIDd)和收缩末期内径(LVIDs)。眼眶采血,应用葡萄糖氧化酶法检测试剂盒测血糖。

2.3 心肌间质纤维染色

取大鼠心肌送我院病理科制作石蜡切片,常规石蜡包埋,切片脱蜡后,天狼猩红染液染色5 min,脱水透明后,常规中性树胶封片,200倍显微镜下观察心肌纤维染色情况,Image 6.0版多媒体彩色病理图像分析软件采集图像,200 $\times$ 光镜下选取5个视野(左上、左下、右上、右下、中间各1个)进行半定量分析,计算胶原容积分数。

胶原容积分数=胶原面积/视野细胞横截面

2.4 TNF- α 和IL-6表达的检查

ELISA法检测各组大鼠静脉血TNF- α 和IL-6表达水平,严格按照试剂盒说明书操作。

2.5 Western blotting检测

取出各组大鼠心肌组织50 mg,超声组织匀浆后加入蛋白裂解液,100 $^{\circ}$ C水浴20 min,提取总蛋白。BCA法进行总蛋白定量后,10 μ g总蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳,80 V电泳2 h,电转移蛋白至PVDF膜,1:1 000稀释入TGF- β 1、Smad3、 β -actin抗体,4 $^{\circ}$ C孵育过夜,加入二抗,碱性磷酸酯酶显色后,X线片曝光。Bandscan5.0软件扫描各条带,对照内参计算各样品TGF- β 1和Smad3蛋白的相对灰度值。

2.6 统计学处理

用SPSS18.0统计学软件进行分析,计量资料符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组均数间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- t 检验。

3 结果

3.1 吡格列酮对T2DM模型大鼠血糖和心功能的影响

如表1所示,与对照组比较,模型组血糖、LVIDd和LVIDs显著升高,CO显著降低($P<0.01$);吡格列酮组血糖、LVIDd和LVIDs显著低于模型组($P<0.05$ 、 0.01),而CO显著高于模型组($P<0.05$ 、 0.01),且作用呈剂量相关性。

3.2 吡格列酮对T2DM模型大鼠心肌纤维化的影响

如图1和表2所示,与对照组比较,模型组红染的心肌间质胶原纤维显著增多,胶原容积分数显著

表1 4组血糖、CO、LVIDd和LVIDs的比较

Table 1 Comparison of blood sugar, CO, LVIDd, and LVIDs among four groups

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	血糖/(mmol·L ⁻¹)	CO/(mL·min ⁻¹)	LVIDd/mm	LVIDs/mm
对照	—	6.34±1.05	142.36±12.43	7.54±0.84	4.42±0.53
模型	—	14.46±1.24**	113.24±8.32**	10.46±1.13**	7.26±1.15**
吡格列酮	5	11.07±1.13 [#]	127.16±9.51 [#]	9.28±1.07 [#]	6.13±0.85 [#]
	10	9.52±1.08 ^{##}	134.74±10.35 ^{##}	8.42±0.87 ^{##}	5.32±0.44 ^{##}

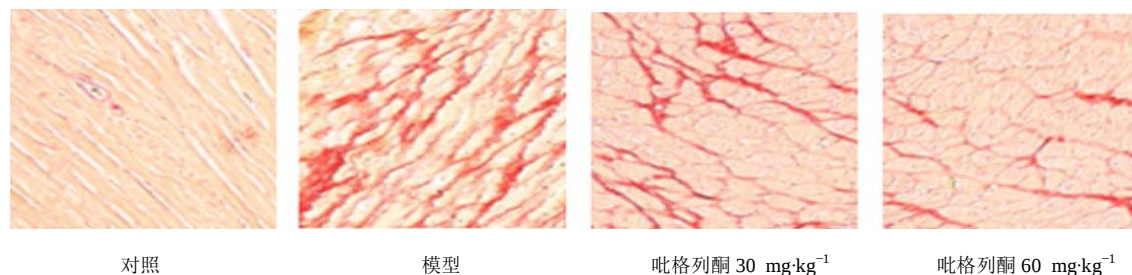
与对照组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ^{**} $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group

图1 心肌间质胶原纤维的天狼猩红染色(200×)

Fig. 1 Sirius red staining of myocardial interstitial collagen fibers (200 ×)

表2 4组心肌间质胶原容积分数比较

Table 2 Comparison of myocardial interstitial collagen volume fraction among four groups

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	心肌间质胶原容积分数/%
对照	—	0.72±0.13
模型	—	26.52±3.84**
吡格列酮	5	12.27±2.15 [#]
	10	5.42±1.08 ^{##}

与对照组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:^{##} $P<0.01$ ^{**} $P<0.01$ vs control group; ^{##} $P<0.01$ vs model group

升高($P<0.01$);与模型组比较,吡格列酮低、高剂量组心肌间质胶原纤维显著减少,胶原容积分数显著降低($P<0.01$)。

3.3 吡格列酮对T2DM模型大鼠外周血TNF- α 和IL-6水平的影响

如表3所示,与对照组比较,模型组外周血TNF- α 和IL-6水平显著升高($P<0.01$);吡格列酮低、高剂量组TNF- α 和IL-6表达水平显著低于模型组($P<0.01$),且作用呈剂量相关性。

3.4 吡格列酮对T2DM模型大鼠TGF- β 1/Smad3通路的影响

如图2和表4所示,与对照组比较,模型组TGF- β 1和Smad3蛋白表达显著增加($P<0.01$);与模型组比较,吡格列酮组TGF- β 1和Smad3蛋白表达显著降低($P<0.01$),且成剂量相关性。

表3 4组TNF- α 和IL-6表达水平的比较Table 3 Comparison of expression of TNF- α and IL-6 among four groups

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TNF- α /(μ mol·L ⁻¹)	IL-6/(μ mol·L ⁻¹)
对照	—	7.24±1.15	5.63±1.04
模型	—	31.53±3.26**	27.48±3.11**
吡格列酮	5	22.28±2.45 [#]	20.36±2.24 [#]
	10	14.23±1.64 ^{##}	12.25±1.32 ^{##}

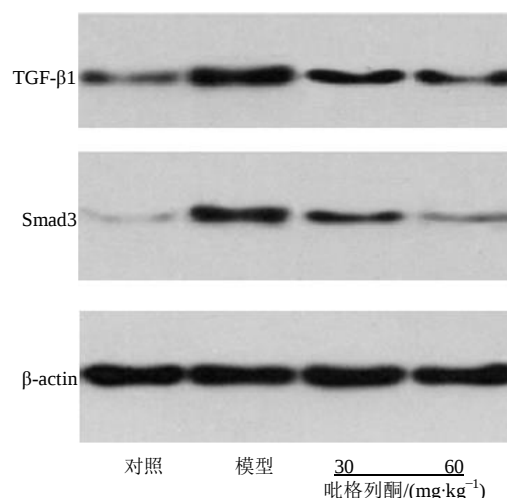
与对照组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:^{##} $P<0.01$ ^{**} $P<0.01$ vs control group; ^{##} $P<0.01$ vs model group图2 TGF- β 1和Smad3蛋白的Western blotting检测
Fig. 2 Western blotting of TGF- β 1 and Smad3 proteins

表4 4组TGF- β 1和Smad3蛋白相对灰度值的比较
Table 4 Comparison of expression of TGF- β 1 and Smad3 among four groups

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TGF- β 1/ β -actin	Smad3/ β -actin
对照	—	0.21±0.05	0.09±0.02
模型	—	0.82±0.17**	0.65±0.12**
吡格列酮	5	0.48±0.11 ^{##}	0.27±0.06 ^{##}
	10	0.30±0.06 ^{##}	0.14±0.03 ^{##}

与对照组比较:** $P < 0.01$;与模型组比较:^{##} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ vs model group

4 讨论

心肌间质纤维化是DCM主要的病理特征,糖尿病患者内分泌的紊乱使机体处于一种炎症激活状态^[6],TGF- β 1是一个受炎症激活的因子,参与到器官慢性纤维化的进程中,TGF- β 1通过其下游激酶底物Smads蛋白传导致纤维化信号,其中TGF- β 1/Smad3信号通路已被公认与器官纤维化密切相关^[7]。沈豪等^[8]使用靶向TGF- β /Smads信号通路的治疗,发现可以抑制糖尿病模型大鼠心肌纤维化的进程。

PPAR γ 作为一个核孤儿受体,参与心脏肥厚、纤维化和炎症反应等各种生物学过程,吡格列酮激活PPAR γ 可以通过多种途径参与到胶原合成和组织纤维化过程中^[9],袁晓晨等^[10]的研究观察到吡格列酮可以抑制高血压大鼠心肌纤维化及胶原合成,严芳英等^[11]研究揭示吡格列酮可以抑制高血压大鼠心肌纤维化是通过调控Sirt3蛋白实现的,Kosuru R等^[12]的研究发现吡格列酮可以抑制心肌的氧化应激反应和炎症反应,进一步激活AMPK/Nrf2/HO-1通路,保护糖尿病大鼠心功能。本研究结果也显示,吡格列酮组大鼠心功能指标得到了显著改善,同时也发现吡格列酮可以显著抑制模型大鼠TNF- α 和IL-6炎症因子的表达。Wei等^[13]的研究发现吡格列酮可以抑制内皮细胞向间充质细胞的转化,阻止了心肌纤维化进程。本研究在糖尿病大鼠模型中也发现了吡格列酮可以剂量相关性的抑制心肌间质胶原纤维的增多,对TGF- β 1/Smad3信号通路的分析发现,吡格列酮可以显著抑制模型大鼠TGF- β 1和Smad3蛋白的上调,说明了吡格列酮可以抑制糖尿病模型大鼠TGF- β 1/Smad3信号通路的激活,其发挥心肌纤维化抑制作用可能与此有关,其详细的调控机制还有待进一步的研究阐明。

本研究结果显示,吡格列酮通过抑制炎症反应以及TGF- β 1/Smad3信号通路,发挥抗糖尿病大鼠

心肌纤维化的作用。

参考文献

- [1] Paiman E H M, van Eyk H J, Bizino M B, et al. Phenotyping diabetic cardiomyopathy in Europeans and South Asians [J]. Cardiovasc Diabetol, 2019, 18(1): 133-140.
- [2] Bell D S H, Goncalves E. Atrial fibrillation and type 2 diabetes: Prevalence, etiology, pathophysiology and effect of anti-diabetic therapies [J]. Diabetes Obes Metab, 2019, 21(2): 210-217.
- [3] 赵凯,潘磊,李晓增,等. PPAR γ 对1型糖尿病心肌病小鼠心肌纤维化的抑制作用及机制 [J]. 山东医药, 2018, 58(17): 33-36.
- [4] 吴晨方,罗玉梅. PPAR- α/γ 激动剂对代谢综合征大鼠模型心室重构中MMP-9表达和TGF- β /Smads通路的影响 [J]. 海南医学, 2014, 25(6): 796-798.
- [5] Reed M J, Meszaros K, Entes L J, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat [J]. Metabolism, 2000, 49(11): 1390-1394.
- [6] Zhao Y, Li S, Quan E, et al. Trimetazidine inhibits cardiac fibrosis by reducing reactive oxygen species and downregulating connective tissue growth factor in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Exp Ther Med, 2019, 18(2): 1477-1485.
- [7] 李丹,王世强,何艳群,等. 运动抑制转化生长因子 β 1/smad信号通路对糖尿病大鼠心肌纤维化影响的研究 [J]. 中国糖尿病杂志, 2018, 26(9): 780-786.
- [8] 沈豪,郭霜,刘秀芬,等. TGF- β /Smads信号通路在姜黄素改善糖尿病大鼠心肌纤维化中的作用 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(4): 522-527.
- [9] 田雨灵,王丽君,吴岳,等. 吡格列酮通过调控TGF- β 信号通路和T细胞调节性免疫机制缓解ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化(英文) [J]. 南方医科大学学报, 2017, 37(8): 1003-1009.
- [10] 袁晓晨,张昕,孙京京,等. 吡格列酮对老年自发性高血压大鼠心肌纤维化及胶原代谢的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(6): 1406-1411.
- [11] 严芳英,单晓兰,李静媛,等. 吡格列酮通过调控Sirt3改善高血压引起的心肌纤维化机制 [J]. 山东大学学报(医学版), 2017, 55(5): 13-18.
- [12] Kosuru R, Kandula V, Rai U, et al. Pterostilbene decreases cardiac oxidative stress and inflammation via activation of AMPK/Nrf2/HO-1 pathway in fructose-fed diabetic rats [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2018, 32(2): 147-163.
- [13] Wei W Y, Zhang N, Li L L, et al. Pioglitazone alleviates cardiac fibrosis and inhibits endothelial to mesenchymal transition induced by pressure overload [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45(1): 26-36.