

左卡尼汀对糖尿病心肌病模型大鼠心肌细胞凋亡的影响

王波*, 刘东方, 杨刚毅, 龙敏, 程伟(重庆医科大学附属第二医院内分泌科, 重庆 400010)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)07-0933-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.07.21

摘要 目的 探讨左卡尼汀对糖尿病心肌病模型大鼠心肌细胞凋亡的影响。方法 采用高脂高糖饲料加腹腔注射链脲佐菌素建立糖尿病心肌病大鼠模型, 随机分为模型(生理盐水)组和左卡尼汀低、中、高剂量(30、40、50 mg/d)组, 另取正常大鼠作为正常对照(纯净水)组, 每组10只, 给予相应药物, 每天1次, 连续6周。末次给药后检测各组大鼠心室内压、心肌细胞凋亡指数和心肌细胞中B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、p53基因蛋白的表达。结果 与正常对照组和模型组比较, 左卡尼汀低、中、高剂量组大鼠的心率、左心室收缩压、左心室内压最大上升和下降速率均降低, 左心室舒张末期压升高, 差异具有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组比较, 左卡尼汀低、中、高剂量组大鼠的心肌细胞凋亡指数、Bax和p53基因蛋白的表达均明显降低, Bcl-2基因蛋白的表达明显升高, 差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 其中以左卡尼汀中剂量组效果最显著。结论 左卡尼汀对糖尿病心肌病模型大鼠心肌细胞的凋亡有抑制作用。

关键词 左卡尼汀; 糖尿病心肌病; 大鼠; 心肌细胞; 凋亡

Effect of *L*-carnitine on Cardiac Cell Apoptosis of Diabetic Cardiomyopathy Rats

WANG Bo, LIU Dong-fang, YANG Gang-yi, LONG Min, CHENG Wei (Department of Endocrinology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE**: To study the effect of *L*-carnitine on cardiac cell apoptosis of diabetic cardiomyopathy rats. **METHODS**: Diabetic cardiomyopathy model rats were established by using high-lipid high-sugar forage and intraperitoneal injection of streptozotocin, then randomly divided into model group (normal saline), *L*-carnitine low, medium and high dose groups (30, 40, 50 mg/d) and normal control group (pure water), 10 for each with drug administration for 6 weeks, once a day. Rat ventricular pressure, cardiac myocyte apoptosis index, and protein expression of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bax, p53 gene were determined after the last administration. **RESULTS**: Compared with normal control group and model group, the heart rate, left ventricular systolic blood pressure, maximum rising and falling rate of left heart indoor pressure were decreased, and the left ventricular end-diastolic pressure was increased in *L*-carnitine treatment group, there was significant difference ($P < 0.01$). Compared with model group, apoptosis index, Bax and protein expressions of p53 gene was significantly decreased, and exprotein pression of Bcl-2 gene was significantly increased in *L*-carnitine treatment group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), especially significant in the *L*-carnitine medium dose group. **CONCLUSIONS**: The *L*-carnitine can suppress the cardiac cell apoptosis of diabetic cardiomyopathy rats.

KEYWORDS *L*-carnitine; Diabetic cardiomyopathy; Rats; Cardiac cell; Apoptosis

糖尿病心肌病(Diabetic cardiomyopathy, DCM)是指糖尿病患者独立于冠心病、高血压等之外的心肌细胞原发损伤性疾病, 其主要病因是血糖升高和胰岛素作用减弱所致的心肌细胞结构、酶学、炎症因子、基因及信号通路变化等病理机制, 最终导致心肌纤维化、心脏扩大、心室壁肥厚、舒张和(或)收缩功能障碍等^[1]。然而迄今为止, DCM的发病机制仍未完全阐明, 近年来研究发现其发病机制与心肌细胞凋亡有密切联系^[2]。已有研究表明, 抑制DCM细胞凋亡的药物包括胰岛素和胰岛素样生长因子、抗氧化剂及血管紧张素II受体拮抗药等^[3]。左卡尼汀(*L*-carnitine)是一种改善心肌细胞代谢的药物, 现已广泛应用于临床, 但关于其对DCM心肌细胞凋亡的影响的文献报道较少。为探讨左卡尼汀对DCM模型大鼠心肌细胞凋亡的影响, 现实验如下。

1 材料

1.1 仪器

*主治医师, 博士。研究方向: 2型糖尿病病理生理与脂肪因子的关系。电话: 023-63693352。E-mail: wangbo_cq@163.com

Medlab生物信号采集处理系统(南京美易科技有限公司); 蛋白电泳仪、电转仪及凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

1.2 药品与试剂

左卡尼汀注射液(哈尔滨誉衡药业股份有限公司, 批号: 20111111, 规格: 1 g/5 ml); 链脲佐菌素(STZ, 美国Sigma公司); 抗p53、B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)和-肌动蛋白(-actin)兔抗鼠单克隆抗体以及羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗均购自美国Abnova公司; 蛋白裂解液(RIPA)、ECL化学发光试剂盒及原位缺口末端标记法(TUNEL)试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 动物

清洁级健康SD大鼠50只, ♂、♀, 8周龄, 体质量180~200 g, 由重庆医科大学动物实验中心提供, 实验动物使用合格证号为SYXK(渝)2007-0001。

2 方法

2.1 建模

2.1.1 糖尿病模型 参照文献[4-5]的方法并加以改进,建立大鼠糖尿病模型。取大鼠,分笼饲养,室温(23±2)℃,相对湿度(55±2)%,自由饮水、进食。适应性喂养7 d后,随机抽取10只为正常对照组,其余大鼠用高脂高糖饲料(基础料66.6%、蔗糖20%、猪油10%、胆固醇0.4%、蛋黄粉3%)喂养4周后,按照45 mg/kg腹腔注射新配制的STZ(0.1%柠檬酸缓冲液为溶剂,pH 4.5),正常对照组大鼠腹腔注射等量容积的柠檬酸钠缓冲液。注射3 d后采集尾静脉血测血糖值,持续3 d血糖值>16.7 mmol/L为糖尿病建模成功。

2.1.2 DCM模型 糖尿病模型大鼠建模成功后,继续用高脂高糖饲料饲养6周,随机抽取6只大鼠,处死后立即摘除心脏,测量并计算其心脏指数(心脏湿质量/大鼠体质量)显著升高,同时制成心肌组织切片于光镜下观察均显示心肌病变,则DCM大鼠模型建立成功。DCM模型大鼠成模标准^[6]光镜下心肌细胞核染色质边集,心肌肌原纤维明显断裂、肌丝成分减少,且排列多紊乱,心肌间胶原纤维大量增生,心肌细胞内线粒体肿胀变形、嵴稀疏紊乱,结构破坏,心肌内微血管内皮细胞肿胀明显,且微血管基底膜出现大量不规则微血管瘤。

2.2 分组与给药

本实验采用分层抽取、完全随机对照实验方法,分为正常对照(纯净水)组、模型(生理盐水)组和左卡尼汀低、中、高剂量(30、40、50 mg/d)组,每组10只,后4组大鼠均为DCM模型大鼠。各组大鼠灌胃给予相应药物,给药量为10 ml/kg,每天灌胃1次,连续给药6周。

2.3 指标检测

2.3.1 心室内压的测定 末次给药后,各组大鼠行腹腔内注射麻醉(20%乌拉坦溶液,5 ml/kg),采用手术游离右颈总动脉,通过右颈总动脉向左心室导入心室插管,30 min后,使用Medlab生物信号采集处理系统记录各组大鼠的心率(HR)、左室舒张末压(LVEDP)、左室收缩压(LVSP)、左室内压最大上升和下降速率(dp/dt_{max})。

2.3.2 心肌细胞凋亡的检测 各组大鼠心肌行常规石蜡切片后,采用TUNEL法行心肌细胞凋亡检测。每只大鼠随机抽取3张切片在光镜下观察,细胞核呈棕黄色为凋亡阳性细胞。每张切片随机取5个无重叠且具有代表性的高倍镜视野($\times 400$)计算阳性凋亡细胞数,其平均值即为细胞凋亡指数^[7]。

2.3.3 心肌细胞Bcl-2、Bax及p53蛋白表达的检测 提取各组大鼠心肌组织,研磨制成细胞悬液,用蛋白裂解液(含有10 mmol/L苯甲基磺酰氟)提取心肌细胞总蛋白,再测定蛋白浓度(Bradford法)。各组取等量蛋白于凝胶电泳槽的胶孔内上样,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,于电转槽内将蛋白电转至聚偏二氯乙烯膜上。封闭液封闭1 h后,采用兔抗鼠一抗抗p53、Bax、Bcl-2抗体(1:1 000稀释)及 β -actin(1:2 500)过夜孵育。羊抗兔IgG二抗(1:2 500稀释)孵育1 h后,采用ECL化学发光试剂在凝胶成像系统显影成像。用Quantity One图象分析软件对条带进行分析。

2.4 统计学处理

采用SPSS 18.0统计软件进行分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组比较用 t 检验,组间比较用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况

实验过程中,建立糖尿病模型时大鼠死亡4只,正常对照组大鼠无死亡,左卡尼汀各剂量组大鼠治疗期间各有2只死亡,死亡原因可能为感染或糖尿病并发症。最后共有42只大鼠完成实验,正常对照组有10只,模型组和左卡尼汀各剂量组各有8只。

与正常对照组比较,模型组大鼠消瘦明显、毛发无光泽、皮肤晦暗、行动迟缓、饮水量显著增多且尿量明显增加。正常对照组大鼠血糖值维持于6.0 mmol/L,模型组大鼠血糖值均高于16.7 mmol/L。与正常对照组比较,模型组和左卡尼汀低、中、高剂量组大鼠的心脏指数均明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$)结果见表1。

表1 各组大鼠的心脏质量指数比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of cardiac weight index in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	心脏指数
正常对照组	10	0.002 978 0.000 208
模型组	8	0.004 809 0.001 302*
左卡尼汀低剂量组	8	0.005 503 0.001 062*
左卡尼汀中剂量组	8	0.005 703 0.001 287*
左卡尼汀高剂量组	8	0.005 819 0.001 661*

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$

Note vs. normal control group,* $P < 0.01$

3.2 心室内压变化

与正常对照组比较,模型组大鼠的HR、LVSP、 dp/dt_{max} 均明显降低,LVEDP明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,左卡尼汀低、中、高剂量组大鼠的HR、LVSP、 dp/dt_{max} 均明显降低,LVEDP明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),其中左卡尼汀中剂量组效果最明显,结果见表2。

表2 各组大鼠心室内压指标比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Comparison of heart indoor pressure index in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HR /次/min	LVEDP /mm Hg	LVSP /mm Hg	$-dp/dt_{max}$ /mm Hg/s	$+dp/dt_{max}$ /mm Hg/s
正常对照组	10	243.22 9.78	5.23 0.62	137.22 6.42	3 551.22 155.32	3 788 152.43
模型组	8	218.59 11.03*	8.62 0.82*	117.23 4.22*	2 772.78 222.56*	3 002.23 303.23*
左卡尼汀低剂量组	8	194.53 13.14**	10.87 0.82**	97.72 6.23**	2 047.25 205.39**	2 812.63 243.12*
左卡尼汀中剂量组	8	173.53 10.05**	11.58 0.93**	85.43 5.14**	1 908.47 345.35**	2 720.74 280.27*
左卡尼汀高剂量组	8	180.67 13.23**	10.95 0.76**	92.78 7.29**	1 988.80 235.74**	2 739.94 234.76*

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note vs. normal control group,* $P < 0.01$;vs. model group,** $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3.3 心肌细胞凋亡指数变化

与正常对照组比较,模型组大鼠的心肌细胞凋亡指数均明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,左卡尼汀组低、中、高剂量组大鼠的心肌细胞凋亡指数均明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),其中左卡尼汀中剂量组效果最明显,结果见表3。

3.4 心肌细胞Bcl-2、Bax、p53蛋白表达变化

与正常对照组比较,模型组大鼠心肌细胞的Bcl-2蛋白表达减弱,Bax、p53蛋白表达增强,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,左卡尼汀低、中、高剂量组大鼠心肌细胞的Bcl-2蛋白表达增强,Bax、p53蛋白表达减弱,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),其中左卡尼汀中剂量组效果

最明显 结果见表4。

表3 各组大鼠的心肌细胞凋亡指数比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Comparison of cardiac cell apoptosis index in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	心肌细胞凋亡指数
正常对照组	10	1.05 0.34
模型组	8	34.75 2.34*
左卡尼汀低剂量组	8	27.74 1.03*
左卡尼汀中剂量组	8	14.48 1.52**
左卡尼汀高剂量组	8	17.79 1.27**

注 :与正常对照组比较 , * $P < 0.01$;与模型组比较 , # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

Note :vs. normal control group , * $P < 0.01$;vs. model group , # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

表4 各组大鼠心肌细胞中 Bcl-2、Bax、p53 基因蛋白的表达比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Comparison of expressions of Bcl-2 , Bax and p53 gene protein in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bcl-2/ -actin	Bax/ -actin	p53/ -actin
正常对照组	10	0.850 0 0.120 0	0.263 6 0.057 2	0.124 0 0.047 2
模型组	8	0.407 0 0.102 3*	0.989 0 0.178 1*	0.708 2 0.178 3*
左卡尼汀低剂量组	8	0.611 3 0.104 9*	0.882 0 0.423 5*	0.406 0 0.062 7*
左卡尼汀中剂量组	8	0.774 8 0.111 2**	0.708 0 0.108 4**	0.368 0 0.078 2**
左卡尼汀高剂量组	8	0.713 8 0.027 3**	0.801 0 0.134 1**	0.389 0 0.045 4**

注 :与正常对照组比较 , * $P < 0.01$;与模型组比较 , # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

Note :vs. normal control group , * $P < 0.01$;vs. model group , # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

4 讨论

左卡尼汀通过抑制线粒体使心肌细胞的能量代谢由脂肪酸转换为葡萄糖氧化从而改善心肌代谢^[8]。当心肌代谢出现障碍时,葡萄糖代谢过程中需要的氧含量降低,因此左卡尼汀能使细胞耐受低氧环境,减少氧自由基的生成,从而改善心肌代谢,对心肌细胞起到保护作用^[9]。

DCM 主要是以左室心肌肥厚、收缩期和(或)舒张期心功能障碍为特点的疾病,检测其心功能是研究临床治疗 DCM 药物的重要方法之一。研究发现,糖尿病模型大鼠建模 12 周末,其心脏舒张和收缩功能均出现障碍,具体表现为 LVSP 降低、LVEDP 升高、 dp/dt_{max} 降低^[9]。本实验结果显示,与模型组比较,左卡尼汀各剂量组大鼠的 LVEDP 升高, LVSP 和 dp/dt_{max} 均明显降低,与葛敏等^[6]报道的一致。这提示改善心肌代谢药物左卡尼汀能改善 DCM 模型大鼠的心脏功能,尤其是心脏的舒张功能。这为临床应用左卡尼汀提供了更多的实验依据。

DCM 心功能不全最主要的病因之一是心肌细胞凋亡。细胞凋亡是通过多种自身调控基因启动细胞内部机制,激活一系列细胞内源性酶而促进细胞自主死亡的过程,其在维持细胞正常增殖、生长代谢等生物学过程中起着重要作用^[6]。研究表明,p53、Bax 及 Bcl-2 蛋白是影响细胞凋亡的重要因子。Bcl-2 是一种能促进细胞生长、抑制细胞凋亡的线粒体内膜蛋白,Bax 基因是 Bcl-2 家族中的重要成员之一,且 Bax 的转录合成与 p53 有着密切联系,其主要功能是促进细胞凋亡。研究表明,p53 基因是激活心肌细胞凋亡的重要因子之一,且由 p53 激活引起的心肌细胞凋亡能被 Bcl-2 抑制。这些结果均表明 Bcl-2 是一个很重要的抗凋亡基因^[9]。刘欣等^[10]研究表明,与正常对照比较,在 DCM 模型大鼠中,促凋亡蛋白 p53、Bax 表达升高,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下降,本实验结果与其一致。在

DCM 的发生、发展中,高浓度血糖通过活性氧簇线粒体途径导致心肌细胞凋亡,且其凋亡程度与血糖浓度呈正相关^[11]。高浓度血糖通过使蛋白糖基化而激活 p53 基因,继而增加血管紧张素 II 的合成,血管紧张素 II 可通过激酶使 p53 蛋白磷酸化,从而诱导心肌细胞凋亡;氧自由基可直接增强促凋亡蛋白 p53 的表达,同时降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,增加促凋亡蛋白 Bax 的表达。

本研究表明,应用左卡尼汀后,模型大鼠心肌细胞凋亡指数明显降低,其中中剂量组下降最显著,心肌细胞中的促凋亡蛋白 p53、Bax 蛋白均表达减弱,抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白表达明显增强,这与 Backlund T 等^[12]的研究结果一致。由此表明,左卡尼汀可能通过调节 p53、Bax、Bcl-2 等凋亡相关蛋白的表达而抑制 DCM 模型大鼠心肌细胞凋亡。

综上所述,左卡尼汀可能通过调节 p53、Bax、Bcl-2 蛋白的表达而抑制 DCM 模型大鼠心肌细胞凋亡。但左卡尼汀对心肌细胞凋亡的具体分子作用机制还未明晰,有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Hayat SA, Patel B, Khattar RS, et al. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms, diagnosis and treatment[J]. *Clin Sci*, 2004, 107(12): 539.
- [2] 潘大彬,汪旻晖,曹衢.糖尿病心肌病发病机制的研究进展[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2013, 18(7): 831.
- [3] 程国杰,崔亮.糖尿病心肌病与心肌细胞凋亡[J]. *北京医学*, 2008, 30(1): 46.
- [4] 周迎生,高妍,李斌,等.高脂喂养联合链脲佐菌素注射的糖尿病大鼠模型特征[J]. *中国实验动物学报*, 2005, 13(3): 154.
- [5] Aabun J, Villarreal FJ. The pathogenesis of myocardial fibrosis in the setting of diabetic cardiomyopathy[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47(4): 693.
- [6] 葛敏,刘彤,关宿东,等.绞股蓝总苷对糖尿病心肌病大鼠心脏功能的影响[J]. *沈阳药科大学学报*, 2007, 24(6): 355.
- [7] 赵益霞,苑树锁.左卡尼汀联合其他药物治疗的临床应用[J]. *江西医药*, 2012, 47(1): 88.
- [8] 纪征,许丽辉,张燕,等.糖尿病大鼠心肌细胞中 survivin、p27 mRNA 表达及相关蛋白变化的研究[J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29(2): 167.
- [9] Parlakpınar H, Sahna E. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on myocardial ischemia-reperfusion-induced apoptotic cell death[J]. *Toxicology*, 2005, 209(1): 1.
- [10] 刘欣,赵秀兰.糖尿病大鼠心肌细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达研究[J]. *中国心血管杂志*, 2005, 10(1): 4.
- [11] Montanari D, Yin H, Dobrzynski E, et al. Kallikrein gene delivery improves serum glucose and lipid profiles and cardiac function in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Diabetes*, 2005, 54(6): 1573.
- [12] Backlund T, Palojoki E, Saraste A, et al. Sustained cardiomyocyte apoptosis and left ventricular remodeling after myocardial infarction in experimental diabetes[J]. *Diabetologia*, 2004, 47(2): 325.

(收稿日期 2014-08-16 修回日期 2014-12-01)

(编辑 邹丽娟)