文章编号:1000-5404(2014)03-0253-04

论著

瘦素对糖尿病心肌病大鼠心室重构的影响

余 帆,徐彤彤 (541001 广西 桂林,桂林医学院附属医院特需病区)

[摘要] **目的** 观察瘦素对糖尿病性心肌病(diabetic cardiomyopathy,DCM)模型大鼠心室重构的影响。**方法** 10只SPF级健康SD雄性大鼠作为正常对照组(NC组),予以普通饲料喂养。另取50只SPF级健康SD雄性大鼠采用高糖高脂喂养后2次腹腔注射链脲佐菌素(STZ)的方法建立DCM大鼠模型,将DCM大鼠按随机抽签法分为A组、瘦素50 μg/kg组(B组)、瘦素100 μg/kg(C组)。在第11周时,B、C组分别给予每日腹腔注射瘦素50、100 μg/kg,而NC组与A组均注射等量蒸馏水,持续5 d。第12周末检测4组空腹血糖、胰岛素、瘦素及血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ,Ang-Ⅱ)水平;心脏彩超测定大鼠心脏左室舒张末期内径(left ventricular internal diameter at end-diastole,LVIDd)、左室舒张末压(left ventricular end-diastolic pressure,LVEDP)、左室射血分数(left ventricular ejection fraction,LVEF)。**结果** 与NC组相比,A组出现心功能减退,其瘦素、胰岛素及Ang-Ⅱ水平升高($P<0.01$);不同剂量瘦素干预后,B组与C组大鼠心功能各项指标变化显著,心功能减退更为严重,瘦素、胰岛素及Ang-Ⅱ水平显著升高($P<0.01$),且C组变化程度显著高于B组。**结论** 瘦素可能通过神经内分泌系统参与了糖尿病心肌病的发生、发展,且与胰岛素抵抗、肾素-血管紧张素系统等密切相关。

[关键词] 瘦素;糖尿病心肌病;胰岛素抵抗;血管紧张素Ⅱ
[中图法分类号] R542.2; R587.2; R977.6 [文献标志码] A

Effects of leptin on ventricular remodeling in diabetic cardiomyopathy rats

Yu Fan, Xu Tongtong (VIP Ward, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi Zhuang Autonomous Region, 541001, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish the diabetic cardiomyopathy (DCM) rat model and then observe the effects of leptin on ventricular remodeling in DCM rats. **Methods** Ten healthy male SD rats (SPF, 8 weeks old, weighing 170 to 190 g) were selected as normal control group (NC) who were given normal diet. Fifty healthy SD rats (SPF, 8 weeks old, weighing 170 to 190 g) were intraperitoneally injected twice with streptozocin (STZ) to induce DCM. The DCM rats were randomly divided into three groups: a DCM group (group A, $n=10$), a 50 g/kg leptin group (group B, $n=10$) and a 100 g/kg leptin group (group C, $n=10$). The DCM rats were fed with high fat/high sucrose diet. In the eleventh week, the groups B and C were separately given daily intraperitoneal injections of leptin of 50 g/kg and 100 g/kg, respectively, while groups NC and A were injected with distilled water for 5 d. Serum IL-6, angiotensin Ⅱ (Ang-Ⅱ), LVEDP, LVIDd, and LVEF were tested at the end of the 12th week. **Results** There was abnormal cardiac function in DCM rats. Serum IL-6 and Ang-Ⅱ in DCM rats (group A) were significantly higher than that of the controls ($P<0.01$). After the intervention of leptin, the cardiac function decline was more severe while the serum IL-6 and Ang-Ⅱ levels became higher ($P<0.01$), especially in group C. **Conclusion** Leptin may be involved in the occurrence and development of DCM, probably through activating the rennin angiotensin system and inflammatory factors.

[**Key words**] leptin; diabetic cardiomyopathy; insulin resistance; angiotensin-Ⅱ

Supported by the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region (2012GXNSFAA502001), the Project of Scientific Research and Technology Development Plan of Guilin City (20130120-1) and the Project of Medical Health Technology Research and Development of Guangxi Zhuang Autonomous Region (S201316-03). Corresponding author: Xu Tongtong, E-mail: xutongtongguilin@163.com

[基金项目] 广西壮族自治区自然科学基金(2012GXNSFAA502001);桂林市科学研究与技术开发计划课题(20130120-1);广西医疗卫生适宜技术研究与开发课题(S201316-03)

[通信作者] 徐彤彤,E-mail:xutongtongguilin@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131219.2029.012.html(2013-12-19)

糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy,DCM)作为一种独立于糖尿病心脏并发症之外的特异性心肌病变,也是导致糖尿病患者死亡的主要原因之一[1]。DCM的发病机制十分复杂,以神经内分泌异常为主,包括脂代谢异常、胰岛素抵抗(insulin resistance,IR)、肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system,RAS)过度激活等。这些病理生理过程会导致心肌收缩与舒张功能障碍,主要以左心室舒张功能和收缩功能障碍为主。既往研究表明,瘦素(leptin,LP)拥有广泛的神经内分泌代谢作用[2],可参与能量、脂肪代谢及交感兴奋等方面的调控,但对DCM心室重构方面的影响报道较少。本研究通过复制DCM大鼠模型,观察不同剂量外源性LP对DCM大鼠心脏结构及心功能的影响,探讨LP对DCM心室重构的作用。

1 材料与方法

1.1 动物和主要药品、试剂

1.1.1 实验动物 SPF级SD成年健康雄性大鼠60只,8周龄,体质量170~190 g,由桂林医学院实验动物中心提供(许可证号:SCXK桂2013-0001)。动物饲养条件:室温18~25 ℃,相对湿度50%~80%,每天日照时间为8:00~20:00。实验前测每只大鼠血糖值在正常血糖值范围3.0~5.0 mmol/L内。

1.1.2 主要药品和试剂 链脲佐菌素(STZ,购自美国Sigma公司),重组LP(购自美国R&D Systems公司),LP酶联免疫分析法ELISA试剂盒(购自美国DSL公司),^{125}I-胰岛素放射免疫分析药盒。

1.1.3 主要仪器设备 血糖仪、Leica显微镜、超声匀浆机、高速离心机、电子天平秤、Beckman全自动生化分析仪、Philips 7500数字化超声心动图仪。

1.2 饲料

正常对照组(NC组)喂养的普通饲料由医学院实验动物中心提供。DCM组喂养的高糖高脂饲料为临时配制,其饲料配方为每100克饲料中含标准饲料粉25.5 g、大豆粉10.0 g、酵母粉0.5 g、奶粉10.0 g、蛋黄粉10.0 g、猪油15.0 g、蔗糖20.0 g、麻油5.0 g、花生10.0 g、食盐0.5 g。将上述配料充分混匀,烤熟压制成形后喂养,喂养前临时配制。

1.3 模型制备及分组

60只大鼠中按随机抽签法选取10只作为NC组,给予普通饲料,另50只给予高糖高脂饲料。大鼠在喂养4周后断粮不断水12 h后尾静脉采血测定血糖及血清胰岛素。采血后即给大鼠进行第1次腹腔注射STZ 55 mg/kg(STZ溶于pH=4.2 0.1 mmol/L柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,浓度为10 g/L);第1次注射8 d后进行第2次等量STZ注射,第2次注射5 d后大鼠尾静脉采血测定血糖,以随机血糖>16.7 mmol/L且持续1周,并伴有胰岛素抵抗指数升高,大鼠出现多饮、多尿、多食现象,则视为糖尿病(diabetes mellitus,DM)大鼠造模成功。而后DM大鼠予以高糖高脂饲料继续喂养8周,NC组予以普通饲料喂养,4组的饲养总时间均为12周。在第12周随机抽取符合DM标准的6只大鼠经超声心动图测定左室功能并取心肌组织观察微结构以确定DCM是否造模成功。DCM病变模型标准:大鼠心功能减退,且其心肌肌原纤维排列紊乱,局部心肌间质纤维增生,微血管内皮细胞肿胀,基底膜增厚。选取40只造模成功的DCM大鼠,按随机抽签法分为A组、LP 50 μg/kg组(B组)、LP 100 μg/kg(C组)(n=10)。在第11周时,B、C组分别给予每日腹腔注射LP 50、100 μg/kg,而NC组与A组均注射等量蒸馏水,持续5 d。

1.4 生化指标测定

第12周末实验前禁食12 h,各组大鼠处死前腹腔静脉采血4 mL,摇匀,抗凝,4 ℃,1 000 r/min低温离心8 min,分离血清置于-70 ℃冰箱保存待测。各项操作严格按说明书步骤进行。随机空腹血糖(FBG)测定采用静脉葡萄糖氧化酶法;空腹血清胰岛素(FINS)测定采用放射免疫法;血脂测定采用酶法分析,Beckman全自动生活分析仪检测FBG、甘油三酯(TG)、血清总胆固醇(TC)、HDL-c、LDL-c。用ELISA测定LP和血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ,Ang-Ⅱ)。胰岛素指数(HOMA-IR)=FBG×FINS/22.5。

1.5 超声心动图测定

用10%水合氯醛0.3 mL/100 g腹腔注射麻醉大鼠后固定在手术台上,使用Philips7500数字化超声心动图仪行M型超声和二维超声测定左室舒张末期内径(left ventricular internal diameter at end-diastole, LVIDd)、左室舒张末压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)、左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)。

1.6 取材及心肌形态学观察

超声心动图检查后,打开胸腔,摘取心脏,剪去多余的血管,用生理盐水冲洗后再以滤纸吸干,迅速以电子天平称全心质量(heart weight,HW);沿房室交界处剪去心房部分,以室间隔与左室游离壁的总质量作为左室质量(left ventricles weight,LVM);计算左室质量指数(LVMI,mg/g),即左室质量与体质量的比值。另取心尖组织,经固定、脱水、包埋后,切成4 μm厚切片,HE染色,显微镜下观察细胞形态。

1.7 统计学处理

应用SPSS 17.0统计软件,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,两组间比较行t检验,多组间比较行方差分析。

2 结果

2.1 动物一般情况

50只DM大鼠中,剔除在第12周末血糖虽升高但未达到成模标准的2只大鼠,进行随机检测的6只大鼠和另外死亡的2只大鼠(其可能死因为感染或糖尿病并发症)外,经过筛选与抽样检测,选取符合DCM标准大鼠40只进行下一步实验。

2.2 各组大鼠生化指标比较

与NC组比较,另外3组DCM大鼠糖脂代谢各项指标差异有统计学意义(P<0.01),且LP、HOMA-IR及Ang-Ⅱ水平均明显升高(P<0.01);与A组相比,B、C两组LP、HOMA-IR及Ang-Ⅱ水平有不同程度的升高,其中C组升高更为明显(P<0.01)。见表1。

2.3 各组大鼠心脏超声检测比较

与NC组比较,另外3组DCM大鼠各项指标差异有统计学意义,LVEDP与LVIDd升高,LVEF降低(P<0.05,P<0.01);与A组相比,B、C两组大鼠LVEDP与LVIDd均有不同程度的升高,LVEF均有不同程度的降低(P<0.05,P<0.01),其中C组心功能减退更为明显。见表2。

表 1　不同剂量 LP 处理后各组大鼠生化指标比较($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	FBG(mmol/L)	FINS(mIU/L)	HOMA-IR	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	Leptin(μg/L)	Ang-Ⅱ(mg/L)
NC 组	4.76±0.35	12.54±6.52	2.18±0.31	0.64±0.16	1.28±0.34	3.02±0.11	52.3±14.6
A 组	18.70±8.48[a]	26.77±1.84[a]	6.12±0.76[a]	2.61±0.43[a]	3.24±0.23[a]	10.67±0.25[a]	85.20±18.50[a]
B 组	20.50±7.14[ab]	27.96±1.71[ab]	6.56±0.47[ab]	2.64±0.35[ab]	3.34±0.21[ab]	16.07±2.1[ab]	114.10±22.20[ab]
C 组	22.40±5.93[ab]	28.50±2.07[ab]	6.67±0.26[ab]	2.80±0.40[ab]	3.46±0.24[ab]	24.08±1.78[ab]	138.90±35.70[ab]

a: $P<0.01$,与 NC 比较;b:$P<0.01$,与 A 组比较

表 2　不同剂量 LP 处理后各组大鼠心功能超声检测比较($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	LVEDP(mmHg)	LVIDd(mm)	LVEF(%)
NC 组	6.37±1.13	6.12±0.43	0.81±0.04
A 组	7.45±1.29[b]	6.18±0.45[ac]	0.72 ±0.03[ac]
B 组	13.54±2.19[bd]	6.54±0.52[bc]	0.64±0.05[ac]
C 组	18.46±2.32[bd]	6.76±0.87[bd]	0.59±0.05[bd]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 NC 组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 A 组比较

2.4　各组大鼠心脏质量、左室质量及左室质量指数比较

与 NC 组比较,另外 3 组 DCM 大鼠体质量、HW 降低($P<0.01$);LVM 与 LVMI 显著升高($P<0.01$)。在不同剂量的 LP 干预后,与 A 组比较,B、C 两组 LVM 与 LVMI 显著降低,体质量和 HW 显著增高($P<0.05$,$P<0.01$),且以 C 组变化更为明显。见表 3。

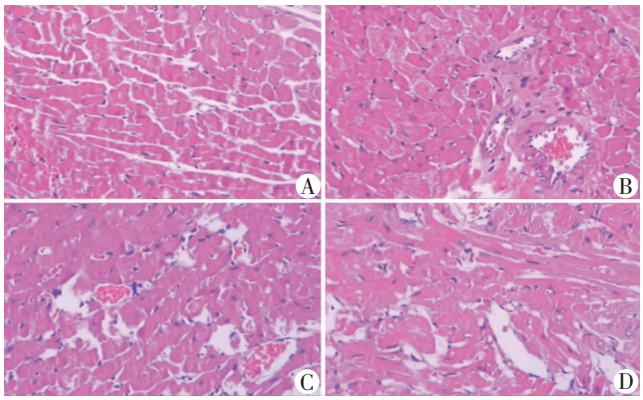
表 3　不同剂量 LP 处理后各组大鼠体质量、心脏质量、左室质量及左室质量指数比较($n=10$,$\bar{x}\pm s$)

组别	体质量(g)	HW(mg)	LVM(mg)	LVMI(mg/g)
NC 组	345.05±0.46	1 075.70±5.65	809.47±6.52	2.34±0.19
A 组	289.70±6.48[a]	847.70±5.20[a]	862.77±1.64[a]	2.98±0.75[a]
B 组	293.50±5.14[ab]	899.08±6.58[ac]	828.96±1.71[ac]	2.82±0.47[ac]
C 组	298.40±7.93[ab]	913.65±3.74[ac]	823.50±2.07[ac]	2.76±0.26[ac]

a:$P<0.01$,与 NC 比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与 A 组比较

2.5　病理学检测结果

NC 组心肌细胞排列整齐,细胞核大小均一,心肌间质未见明显改变。3 个 DCM 组心肌细胞肥大变性,并出现坏死,细胞核大小不均一,心肌肌原纤维排列紊乱,部分视野可见心肌间质明显纤维化,但微血管基底膜尚未见明显改变。在不同剂量的 LP 干预后,可见心肌病变进一步加重,并出现轻度微血管基底膜增厚,其中 C 组变化更为明显。见图 1。



A:NC 组;B:A 组;C:B 组;D:C 组

图 1　不同剂量 LP 处理后各组大鼠心脏病理学改变　(HE ×400)

3　讨论

糖尿病心肌病的发生是多因素的,此时机体会存在糖脂代谢紊乱、IR、RAS 活化等状态。而 DM 心脏病变的病理基础是以微血管与心肌间质病变为主,存在广泛心肌间质纤维化与胶原蛋白沉积,由此导致相关电生理、心脏自主神经功能异常及心肌顺应性减退等[3]。而心肌微血管病变、障碍的后果是心肌缺血坏死、再灌注损伤及代偿性纤维化。DCM 患者广泛存在心功能异常情况,临床特征以左心室肥厚、舒张功能减退为主[4]。

LP 作为一种由脂肪细胞分泌的多靶器官、多功能肽类激素,通过与受体结合而发挥相应生物学效应,如减少摄食,增加能量释放,抑制脂肪细胞的合成等,且与血脂、血压、IR、交感神经系统(sympathetic nervous system, SNS)、RAS 等明显相关[5-6]。研究证实,机体存在"脂肪-胰岛素"内分泌调控轴以维持系统平衡,一旦平衡破坏,IR 可导致高 LP 血症,而高 LP 血症又可进一步介导 IR[7-8]。当机体处于高水平 LP 状态时,会对 LP 的代谢效应(降低食欲、减轻体质量等)作用缺失,而 SNS 与 RAS 等心血管效应作用得以保留[9]。而 IR 不仅可以通过抑制磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K-Akt)途径,激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径,直接促进心肌细胞有丝分裂而导致心肌肥厚,还可通过激活 SNS 和增加 Ang-Ⅱ受体的表达而间接导致心肌肥厚[10-11]。Larson 等[12]与 Zibadi 等[13]阐明 LP 在与肥胖、糖脂代谢异常相关的心肌肥厚与心脏衰竭中,导致心肌纤维化和舒张功能障碍。文献[14-15]表明 LP 水平可直接或间接作用于心血管系统,特别针对心脏结构与功能的影响。国外研究表明[16],LP 和 LP 受体水平的增加可上调早期 Ang-Ⅱ和活性氧(ROS)的表达,导致心肌细胞肥大。同时,LP 水平的增加,通过血管平滑肌细胞激活诱导型一氧化氮合酶,释放一氧化氮而影响 Ang-Ⅱ的增殖和心脏收缩功能[17]。研究表明,Ang-Ⅱ不仅可激活磷脂酶 C 相关原癌基因的表达与 MAPK 途径参与心肌肥厚[18],还可通过促进炎症介质与氧化应激以诱导心脏发生心肌纤维重构;还可通过刺激醛固酮分泌,引起钠水潴留从而诱发心肌

肥厚[19]。

另外,在DM时细胞易发生糖脂代谢异常而出现“脂中毒”现象[20],其也可能导致了心肌内脂类堆积,引起心功能异常和心肌肥厚。

本研究中心功能超声检测表明,3组DCM大鼠心功能均有不同程度的减退:其中左室舒张末压(LVEDP)与左室舒张末期内径(LVIDd)升高,左室射血分数(LVEF)与心脏质量降低;左室质量与左室质量指数显著升高;与A组相较,在经不同剂量瘦素干预后,B、C两组大鼠体质量水平无显著变化,B、C两组大鼠左室质量指数显著降低,且以C组变化明显,其LP、HOMA-IR及Ang-Ⅱ水平有不同程度的升高,其中以C组LP、HOMA-IR及Ang-Ⅱ水平升高更为明显($P<0.01$),推测LP抵抗存在选择性。提示RAS作为心肌组织一个局部开放式内分泌系统,其主要通过Ang-Ⅱ这一RAS效应分子,参与到心肌肥厚的信号转导中。结果表明,LP可能通过增强脂肪细胞分泌的血管紧张素原的表达,使Ang-Ⅱ高表达而参与糖尿病心肌病的发生、发展。机体存在的“LP-胰岛素”交叉信号通路轴,在高浓度LP状态下不但不发挥调控作用反而会影响心肌代谢,而进一步损伤心肌组织,参与到DCM心肌重构之中。

本研究表明,DCM大鼠存在糖脂代谢紊乱、胰岛素抵抗、心功能减退及高LP、高Ang-Ⅱ水平等状态;给予不同剂量的LP干预后,并不能改善DCM大鼠心功能,反而更进一步损伤心肌,且以高剂量LP干预后变化更为明显。其可能机制为:①LP虽具有糖、脂肪、能量代谢等调节作用,但在高LP水平时这些调控作用将会降低,而心血管效应(SNS与RAS)作用得以保留,即LP抵抗存在选择性。②DCM大鼠存在IR状态及“LP-胰岛素”轴的调控失衡,通过MAPK途径促进心肌细胞有丝分裂而导致心肌肥厚,同时过度激活的SNS且LP显著上调Ang-Ⅱ水平可产生血流动力学改变并诱导心脏发生心肌纤维重构。由此可见,LP可能通过神经内分泌系统参与DCM大鼠心室重构的发生、发展,且与胰岛素抵抗、肾素-血管紧张素系统等密切相关。这为DCM心室重构的防治提供了新的思路和方法。

参考文献:

[1] 杨跃进, 王红, 宋光远. 糖尿病心肌病[J]. 中国糖尿病杂志, 2012, 20(10): 794-796.

[2] Hamed E A, Zakary M M, Ahmed N S, *et al*. Circulating leptin and insulin in obese patients with and without type 2 diabetes mellitus: relation to ghrelin and oxidative stress[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2011, 94(3): 434-441.

[3] Boudina S, Abel E D. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects[J]. Rev Endocr Metab Disord, 2010, 11(1): 31-39.

[4] Maisch B, Alter P, Pankuweit S. Diabetic cardiomyopathy--fact or fiction?[J]. Herz, 2011, 36(2): 102-115.

[5] 胡龙江, 吕湛, 苟连平. 胰岛素抵抗、瘦素抵抗与2型糖尿病并发冠心病的关系研究[J]. 中华临床医师杂志:电子版,2011, 5(2): 387-391.

[6] Hall J E, da-Silva A A, do-Carmo J M, *et al*. Obesity-induced hypertension: role of sympathetic nervous system, leptin, and melanocortins[J]. J Biol Chem, 2010, 285(23): 17271-17276.

[7] Magge S N. Cardiovascular Risk in Children and Adolescents with Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus[J]. Curr Cardiovasc Risk Rep, 2012, 6(6):591-600.

[8] Marroqui L, Gonzalez A, Neco P, *et al*. Role of leptin in the pancreatic β-cell: effects and signaling pathways[J]. J Mol Endocrinol, 2012, 49(1):R9-R17.

[9] Konner A C, Bruning J C. Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders[J]. Cell Metab, 2012, 16(2): 144-152.

[10] Rahmouni K, Sigmund C D, Haynes W G, *et al*. Hypothalamic ERK mediates the anorectic and thermogenic sympathetic effects of leptin[J]. Diabetes, 2009, 58(3): 536-542.

[11] De-Mello W C, Frohlich E D. On the local cardiac renin angiotensin system. Basic and clinical implications[J]. Peptides, 2011, 32(8): 1774-1779.

[12] Larson J E, Rainer P P, Watts V L, *et al*. Dependence of β3-adrenergic signaling on the adipokine leptin in cardiac myocytes[J]. Int J Obes (Lond), 2011, 36(6):876-879.

[13] Zibadi S, Larson D F, Watson R R. Role of T lymphocytes in leptin-mediated myocardial fibrosis[J]. J Card Fail, 2011, 17(8 Suppl): S18.

[14] Sweeney G, Litwin S E, Abel E D. Obesity and Cardiac Dysfunction[M]//Ahima R S. Metabolic Basis of Obesity. New York: Springer, 2011: 257-292.

[15] Abel E D, Sweeney G. Modulation of the cardiovascular system by leptin[J]. Biochimie, 2012, 94(10):2097-2103.

[16] Chiu C Z, Wang B W, Shyu K G. Angiotensin Ⅱ and the ERK pathway mediate the induction of leptin by mechanical cyclic stretch in cultured rat neonatal cardiomyocytes[J]. Clin Sci (Lond), 2014, 126: 483-495.

[17] Trovati M, Doronzo G, Barale C, *et al*. Leptin and Vascular Smooth Muscle Cells[J]. Curr Pharm Des, 2013, [Epub ahead of print].

[18] De-Mello W C. Recent aspects of angiotensin Ⅱ action in the heart. Implications for myocardial ischemia and heart failure[M]//Kamkin A, Ilya Lozinsky I. Mechanically Gated Channels and their Regulation. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012: 367-378.

[19] Brand S, Amann K, Schupp N. Angiotensin Ⅱ-induced hypertension dose-dependently leads to oxidative stress and DNA damage in mouse kidneys and hearts[J]. J Hypertens, 2013, 31(2): 333-344.

[20] Chen W, Chen W, Xia Y, *et al*. Therapy with Astragalus polysaccharides rescues lipotoxic cardiomyopathy in MHC-PPARα mice[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(3): 2449-2459.

(**收稿**:2013-08-15;**修回**:2013-11-15)

(编辑 栾 嘉)