肝X受体激动剂GW3965对大鼠糖尿病心肌病的影响*

成永霞[1]，王 翀[1]，徐 彪[2]，王 莹[1]，颜 彬[1]**
（1. 牡丹江医学院，黑龙江 牡丹江 157011；2. 牡丹江医学院附属红旗医院，黑龙江 牡丹江 157011）

[摘 要] **目的：**研究肝X受体（LXRs）激动剂GW3965对链脲佐菌素（STZ）诱导的糖尿病心肌病大鼠心室功能、血脂代谢和心肌细胞凋亡的影响。**方法：**健康雄性清洁级SD大鼠，均分为对照组、模型组和GW3965组，模型组和GW3965组大鼠腹腔注射STZ建立糖尿病模型，对照组给予等量生理盐水处理；8周后GW3965组皮下注射GW3965（50 mg/kg），每周1次，连续4周，模型组及对照组大鼠皮下注射等体积无菌生理盐水；末次给药后监测各组大鼠左室收缩压（LVSP）、左室舒张末压（LVEDP）及左室内压最大变化速率（±dp/dtmax），测定大鼠血清血脂总胆固醇（TC）、甘油三酯（TG）及游离脂肪酸（NEFA），观察各组大鼠病理学及心肌细胞凋亡情况。**结果：**与对照组比较，模型组大鼠LVEDP、血清TC、TG、NEFA的含量明显升高，而LVSP、±dp/dtmax显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）；与模型组比较，GW396组大鼠的LVSP、±dp/dtmax显著升高，LVEDP、血清TC、TG、NEFA显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）；对照组大鼠心肌纹理清晰、致密，心肌细胞形态正常；模型组大鼠心肌细胞肥大，心肌结构紊乱，心肌纤维损伤、断裂明显；与模型组比较，GW396组大鼠心肌细胞病变、坏死程度显著减轻，肌纤维断裂情况明显好转；对照组大鼠心肌细胞核呈蓝色，未见凋亡；模型组大鼠心肌组织中出现棕黄色颗粒，心肌细胞发生大量凋亡；与模型组比较，GW396组大鼠心肌组织中棕黄色颗粒显著减少，心肌细胞发生凋亡情况减少。**结论：**LXRs激动剂GW3965对糖尿病心肌病大鼠具有保护作用，可以改善心功能，抑制心肌细胞凋亡。

[关键词] 糖尿病心肌病；大鼠，Sprague-Dawley；模型，动物；心功能；血脂代谢；细胞凋亡
[中图分类号] R587.23；R542.2 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707（2017）02-0155-04
DOI：10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.02.007

The Effect of Liver X Receptors Agonist GW3965 on Rats with Diabetic Cardiomyopathy

CHENG Yongxia[1], WANG Chong[1], XU Biao[2], WANG Ying[1], YAN Bin[1]
(*1. Mu Danjiang Medical College, Mu Danjiang 157011, Hei Longjiang, China; 2. Affiliated Hospital of Mu Danjiang Medical College, Mu Danjiang 157011, Hei Longjiang, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the effect of liver x receptors (LXRs) agonist GW3965 on ventricular function, lipid metabolism and myocardial apoptosis in rats with diabetic cardiomyopathy induced by streptozotocin (STZ). **Methods**: Healthy male SD rats (200~250 g) were randomly divided into three groups: control group, model group and GW3965 group. The rats in model group and GW3965 group were injected with STZ intraperitoneally to establish diabetic model; control group was treated with equal volume of saline. After eight weeks, GW3965 group was injected with GW3965 (50 mg/kg) subcutaneously, once a week for four weeks; model group and control group was injected with equal volume of sterilized saline; after the last administration, LVSP, LVEDP and ±dp/dtmaxwere monitored; testing TC, TG and NEFA of rats and observing pathology and myocardial apoptosis of rats. **Results**: Comparing with control group, content of LVEDP, TC, TG and NEFA obviously increased, while LVSP and ±dp/dtmax obviously decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$); comparing with

*[基金项目]国家青年科学基金项目（81500629）
**通信作者 E-mail：Yanbin8396@163.com
网络出版时间：2017-02-17 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170217.1104.011.html

model group, LVSP and ± dp/dtmax of GW396 Group rats obviously increased, content of LVEDP, TC, TG and NEFA obviously decreased($P<0.05$ or $P<0.01$); myocardial texture of control group rats was clear and tight, cardiomyocytes morphology was normal; while in model group rats, myocardial texture was fat, myocardial structure was disorder, cardiac muscle fibers was damaged with clear fracture; comparing with model group, cardiomyocytes of GW396 group rats had lesion, necrosis degree was alleviated, muscle fiber fracture was obviously improved; myocardial nuclear of control group rats were blue with no apoptosis; cardiac muscular tissue of model rats discovered brown and yellow particles, large scale apoptosis of cardiomyocytes were found; comparing with model group, cardiac muscular tissue of GW396 group found obvious decreased brown and yellow particles, cardiomyocytes apoptosis decreased. **Conclusion**: GW3965, the LXRs agonist, has protective effect on rats with diabetic cardiomyopathy via improving cardiac function and inhibiting the apoptosis of myocardial cells.

[**Key words**] diabetic cardiomyopathy; rats, Sprague-Dawley; model, animal; cardiac function; lipid metabolism; cell apoptosis

糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)是一种独立于高血压、冠心病、动脉粥样硬化之外的特异性心肌病变,发病率高、危害大[1]。DCM 主要病理表现为心室增厚、心肌功能改变、心肌纤维化、心肌细胞凋亡和局灶性心肌坏死,可直接导致心率失常、心力衰竭、心绞痛和猝死等[2]。糖脂代谢紊乱引发的心肌细胞功能改变可反馈性的调控脂代谢紊乱[2-3]。肝 X 受体(liver X receptors,LXRs)参与糖、脂肪和胆固醇代谢等多种生理活动过程,可以作为心血管和代谢性疾病治疗的潜在药理靶标[4]。LXR 激动剂 GW3965 和 T0901317 可以预防动脉粥样硬化,抑制炎症反应,缓解心肌肥大,减轻缺血再灌注损伤,GW3965 还可通过调控 MAPK 和 Akt 通路活性减轻胰岛素抵抗,抑制氧化应激和炎症反应,发挥对心肌的保护功能[5-6]。本研究通过建立 DCM 大鼠模型,采用 GW3965 进行干预,观察 DCM 模型大鼠血脂代谢、心室功能及心肌细胞凋亡的情况,初步探讨 GW3965 对 DCM 的影响,期望为 DCM 的临床治疗提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料

200 ~ 250 g 雄性 SD 大鼠(本实验室动物中心提供),GW3965(阿拉丁公司),苏木精、STZ、DAB 显色液(Solarbio 公司),柠檬酸钠、柠檬酸、曙红 Y、二甲苯、无水乙醇、过氧化氢(国药集团),Triton X-100(碧云天生物公司),TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(万类生物公司),总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)及游离脂肪酸(NEFA)检测试剂盒(南京建成生物研究所)。

1.2　方法

1.2.1　实验分组及造模　取健康 SD 大鼠 9 只,随机均分为对照组、模型组和 GW3965 组,适应性喂养 1 周后,模型组和 GW3965 组大鼠腹腔注射 65 mg/kg STZ(溶于预冷的 0.01 mol/L、pH4.4 的柠檬酸钠缓冲液)诱导糖尿病模型,3 d 后大鼠血糖浓度 > 16.7 mmol/L 则证明糖尿病模型诱导成功;对照组大鼠给予同等剂量的生理盐水进行处理。造模 8 周后 GW3965 组大鼠皮下注射 GW3965(50 mg/kg),每周 1 次,连续 4 周,模型组及对照组大鼠皮下注射等体积无菌生理盐水。

1.2.2　心功能检测　给药结束时,各组大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(3.5 mL/kg)麻醉大鼠,生理机能实验系统分析大鼠心功能指标左室收缩压(LVSP)、左室舒张末压(LVEDP)、左室内压最大变化速率(± dp/dtmax)。

1.2.3　部分生化指标测定　取各组大鼠静脉血,离心,收集血清。采用商品化试剂盒测定各组大鼠血清中血脂相关指标总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和游离脂肪酸(NEFA)含量变化,按照说明书进行操作,酶标仪测定 510 nm、500 nm 波长下吸光值(OD),计算 TC、TG 的含量;分光光度计测定 440 nm 波长下 OD 值,计算 NEFA 的含量。

1.2.4　心肌组织病理学观察　取心肌组织,常规脱水、透蜡和包埋,切 5 μm 的薄片,60 ℃温箱烘干,脱蜡至水,依次放入苏木素(5 min)和伊红溶液(3 min)中染色,期间用 1% 盐酸酒精分化处理 3 s,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,滴加中性树胶封片,盖上盖玻片,自然晾干,200 × 显微镜下观察。

1.2.5　心肌细胞凋亡检测　取心肌组织，常规方法制作石蜡切片，脱蜡至水，0.1% 柠檬酸钠透化 8 min，3% H_2O_2 封闭 10 min，PBS 清洗 3 次，加入 TUNEL 反应液 50 μL，37 ℃孵育 1 h，然后滴加相同体积的 Converter-POD，37 ℃孵育 30 min，DAB 显色，苏木素复染，脱水透明处理后滴加中性树胶封片，自然晾干，400 × 显微镜下观察。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析，所有实验数据以均值 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，组间比较采用 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　心功能指标

与对照组大鼠比较，模型组大鼠 LVEDP 明显升高，而 LVSP、± dp/dtmax 显著降低，差异有统计学意义（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）；说明大鼠心功能严重受损；与模型组大鼠比较，GW396 组大鼠的心功能得到了明显改善，LVSP、± dp/dtmax 显著升高，LVEDP 显著下降，差异有统计学意义（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）；见表 1。

表 1　各组大鼠心功能指标比较（$\bar{x} \pm s$，$n=3$）

Tab. 1　Cardiac function index comparison of all groups

心功能指标	对照组	模型组	GW396 组
LVSP（mmHg）	125.65 ± 11.97	96.13 ± 7.70(1)	118.11 ± 2.33(3)
LVEDP（mmHg）	4.13 ± 0.35	9.42 ± 0.63(2)	6.41 ± 1.38(3)
+ dp/dtmax（mmHg/s）	4 508.29 ± 278.30	2 615.40 ± 177.33(2)	3 756.32 ± 216.85(4)
− dp/dtmax（mmHg/s）	3 932.72 ± 311.21	2 060.07 ± 175.13(2)	3 079.16 ± 115.33(4)

与对照组比较，(1) $P<0.05$，(2) $P<0.01$；与模型组比较，(3) $P<0.05$，(4) $P<0.01$

2.2　血清 TC、TG 及 NEFA

与对照组大鼠比较，模型组大鼠血清 TC、TG、NEFA 的含量均显著升高，差异有统计学意义（$P<0.01$），说明大鼠血脂代谢发生紊乱；与模型组比较，GW396 组大鼠血清 TC、TG、NEFA 显著降低差异具有统计学意义（$P<0.01$）；见表 2。

表 2　各组大鼠血清 TC、TG 及 NEFA 水平（$\bar{x} \pm s$，$n=3$）

Tab. 2　Levels of TC, TG and NEFA of rat serum in all groups

组别	TC（mmol/L）	TG（mmol/L）	NEFA（μmol/L）
对照组	1.626 ± 0.083	0.938 ± 0.047	110.559 ± 7.758
模型组	3.229 ± 0.070(1)	1.989 ± 0.040(1)	363.975 ± 5.693(1)
GW396 组	2.247 ± 0.023(2)	1.318 ± 0.039(2)	209.938 ± 5.693(2)

(1) 与对照组比较，$P<0.01$；(2) 与模型组比较，$P<0.01$

2.3　心肌组织病理学变化

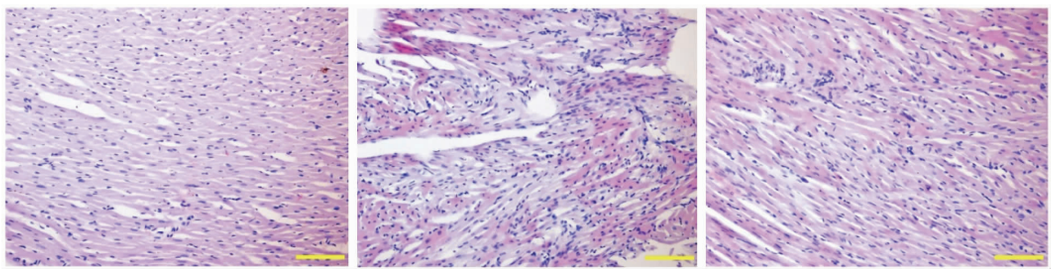
由图 1 可以看出，对照组大鼠心肌纹理清晰、致密，心肌细胞形态正常，排列整齐有序，胞外间质少，胞核明显，分布均匀，无变性、坏死等病理改变；模型组大鼠心肌细胞肥大，心肌结构紊乱，细胞间隙变大，胞核大小不均，可见心肌纤维损伤、断裂明显；与模型组比较，GW396 组大鼠细胞病变、坏死程度显著减轻，形态基本完整，结构清晰，排列整齐，肌纤维断裂情况明显好转。说明 GW396 可以明显改善心肌病变。

2.4　心肌细胞凋亡

采用 TUNEL 染色对心肌细胞凋亡进行观察，由图 2 可以看出，对照组大鼠心肌细胞核呈蓝色，未见凋亡；与对照组比较，模型组大鼠心肌组织中出现棕黄色颗粒，说明心肌细胞发生大量凋亡；与模型组比较，GW396 组大鼠心肌组织中棕黄色颗粒显著减少。提示 GW396 可以显著抑制心肌细胞凋亡。

3　讨论

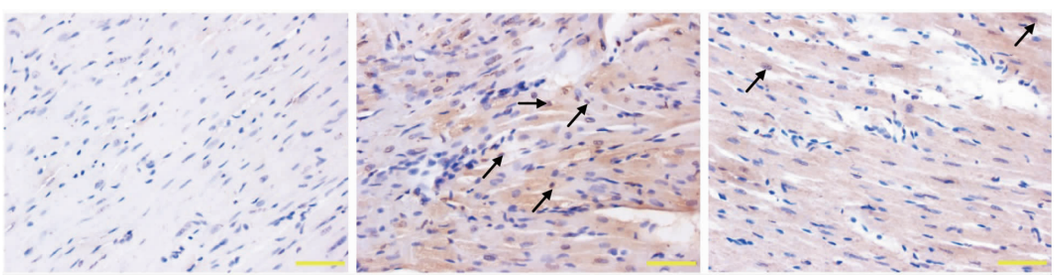
目前，DCM 治疗方法包括控制血糖和恢复心血管功能，但治疗效果不甚满意。因此新药开发或分子干预措施对临床患者恢复具有重大意义。LXRs 包括 LXRα 和 LXRβ 两种亚型，属于核受体超家族成员。LXRα 高表达于肝脏、肾脏、脂肪和肠等代谢活跃的组织，在胆固醇代谢、糖脂代谢、炎症反应和天然免疫中扮演重要角色，被证明可以作为人类糖尿病和代谢性疾病药物治疗的潜在分子靶标[7]。研究发现，LXRα 及其下游靶基因 ACSL3、FAT/CD36 的表达在 STZ 诱导的大鼠心肌组织中明显增加，提示 LXRα 的表达同心肌病变密切相关[8]。H9c2 心肌细胞中，LXRs 激动剂 T0901317



对照组　　模型组　　GW396 组

图 1　各组大鼠心肌组织病理学变化(HE, ×200)

Fig. 1　Cardiac muscular tissue staining of all groups



对照组　　模型组　　GW396 组

图 2　各组大鼠心肌细胞凋亡(TUNEL, ×400)

Fig. 2　Cardiac muscular tissue TUNEL staining of all groups

可以减轻高糖诱导的氧化应激、线粒体损伤和细胞凋亡[9],说明其参与调控心肌细胞凋亡过程。此外,He 等[6]的最新研究证实,在Ⅱ型糖尿病 db/db 小鼠模型中,LXRs 激动剂 GW3965 可以有效改善系统性胰岛素抵抗和心功能不全,促进心肌重构。由此可见,LXRs 很可能在 DCM 进展中发挥重要作用,但国内外鲜见报道。因此本研究初步探索 LXRs 激动剂 GW3965 对 DCM 大鼠的影响。

本研究采用腹腔注射 65 mg/kg STZ 诱导 DCM 大鼠模型,同时皮下注射 50 mg/kg 的 GW3965 干扰治疗 4 周,4 周后采用生理机能实验系统分析各组大鼠心功能指标,同时检测大鼠部分血脂生化指标,HE 染色观察心肌组织病理学,TUNEL 法分析心肌细胞凋亡。实验结果显示,GW3965 可以显著升高 LVSP 和 ± dp/dtmax,降低 LVEDP($P<0.05$ 或 $P<0.01$),改善心功能;抑制 TC、TG、NEFA 等指标的升高($P<0.01$),调节血脂代谢;减轻心肌细胞凋亡和心肌结构紊乱,保护心肌组织。

综上,LXRs 参与了 DCM 的发病机制,能够抑制心肌细胞凋亡,减轻心肌病变,改善心功能,但具体调控机制仍需进一步深入探索。

4　参考文献

[1] Liu Y, Zhang J. Nox2 contributes to cardiac fibrosis in diabetic cardiomyopathy in a transforming growth factor-beta dependent manner [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015 (9):10908 – 10914.

[2] Bhandari U, Kumar V, Kumar P, et al. Protective effect of pioglitazone on cardiomyocyte apoptosis in low-dose streptozotocin & high-fat diet-induced type-2 diabetes in rats [J]. Indian J Med Res, 2015 (5):598 – 605.

[3] Chen J, Cha-Molstad H, Szabo A, et al. Diabetes induces and calcium channel blockers prevent cardiac expression of proapoptotic thioredoxin-interacting protein [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009 (5):1133 – 1139.

[4] Im SS, Osborne TF. Liver x receptors in atherosclerosis and inflammation [J]. Circ Res, 2011 (8):996 – 1001.

[5] Wu S, Yin R, Ernest R, et al. Liver X receptors are negative regulators of cardiac hypertrophy via suppressing NF-kappaB signalling [J]. Cardiovasc Res, 2009 (1): 119 – 126.

(下转第 164 页)

scription factors[J]. Oncogene, 2009(30): 2282 - 2288.
[8] Karlsson-Rosenthal C, Millar J. Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery[J]. Trends Cell Biol, 2006(16): 285 - 292.
[9] Helene A, Susana S, Eric B, et al. Differential expression of CDC25 phosphatases splice variants in human breast cancer cells[J]. Clin Chem Lab Med, 2011(10): 1707 - 1714.
[10] Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? Nat Rev Cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2007(7): 495 - 507.
[11] Karlsson-Rosenthal C, Millar JB. Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery[J]. Trends Cell Biol, 2006(6): 285 - 292.
[12] Masaharu A, Kohji O, Takeshi K, et al. Telomerase activation as a repair response to radiation-induced DNA damage in Y79 retinoblastoma cells[J]. CANCER LETTERS, 2013(340)82 - 87.
[13] Jana K, Marcin K, Igor V. et al. Exon-centric regulation of ATM expression is population-dependent and amenable to antisense modification by pseudoexon targeting[J]. Scientific reports, 2016(6): 18741.
[14] Kim KY, Jang WY, Lee JY. et al. Kaempferol activates G2-checkpoint of the cell cycle resulting in G2-arrest and mitochondria-dependent apoptosis in human acute leukemia jurkat T cells[J]. J Microbiol Biotechnol, 2016(2): 287 - 294.

(2016-11-25 收稿,2017-01-20 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 苏晓庆

(上接第 154 页)

[12] Kobow K, Auvin S, Jensen F, et al. Finding a better dIug for epilepsy: antiepileptogenesis argets [J]. Epnepsia, 2012(11): 1868 - 1876.
[13] Post RM. Neurobiology of seizures and behavioral abnormalities[J]. Epilepsia, 2004(2): 5 - 14.
[14] Russmann V, Salvamoser JD, Rettenbeck ML, et al. Synergism of perampanel and zonisamide in the rat amygdala kindling model of temporal lobe epilepsy[J]. Epilepsia, 2016(4): 638 - 647.
[15] Goddard GV. The kindling model of epilepsy[J]. Trends Neurosci, 1983(6): 275 - 279.

(2016-10-20 收稿,2017-01-25 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵 毅

(上接第 158 页)

[6] He Q, Pu J, Yuan A, et al. Liver X receptor agonist treatment attenuates cardiac dysfunction in type 2 diabetic db/db mice [J]. Cardiovasc Diabetol, 2014(13): 149.
[7] Calkin AC, Tontonoz P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012(4): 213 - 224.
[8] Cheng Y, Liu G, Pan Q, et al. Elevated expression of liver X receptor alpha (LXRalpha) in myocardium of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Inflammation, 2011(6): 698 - 706.
[9] Cheng Y, Feng Y, Zhu M, et al. Synthetic liver X receptor agonist T0901317 attenuates high glucose-induced oxidative stress, mitochondrial damage and apoptosis in cardiomyocytes [J]. Acta Histochem, 2014(1): 214 - 221.

(2016-11-05 收稿,2017-02-07 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵 毅