

褪黑素对糖尿病大鼠心肌细胞凋亡及 MAPK 通路的影响

熊方圆¹ 唐松涛^{1,2} 苏欢¹ 周青¹ 汪渊¹ 朱华庆¹

摘要 目的 观察褪黑素(MLT)对2型糖尿病大鼠心肌损伤的保护作用及其抗凋亡机制。方法 24只雄性SD大鼠随机分为对照组、模型组、治疗组。采用链脲佐菌素(STZ) 25 mg/kg 腹腔注射诱导糖尿病大鼠模型,造模成功后开始给予MLT治疗24周。24周后,取心脏组织,HE染色检测心肌组织的形态变化,Masson染色检测心肌组织的胶原纤维的变化,原位末端标记法(TUNEL)检测心肌组织细胞凋亡的变化,Western blot检测其相关凋亡蛋白和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路相关蛋白的表达水平。结果 HE染色显示MLT能改善心肌组织形态的紊乱情况,Masson染色显示MLT能缓解心肌组织胶原纤维的堆积。与糖尿病大鼠比较,MLT能明显改善糖尿病大鼠心肌组织的细胞凋亡情况。Western blot显示MLT能下调凋亡蛋白Bax和caspase3的表达($P < 0.05$),上调抗凋亡蛋白Bcl-2的表达($P < 0.05$);此外,MLT也能明显下调p-JNK蛋白的表达($P < 0.05$)。结论 MLT可能通过下调血糖、MAPK通路中p-JNK信号通路表达,改善糖尿病大鼠心肌组织的凋亡。

关键词 糖尿病;心肌组织;MLT;凋亡;MAPK

中图分类号 R 34; R 541.9; R 587.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)05-0634-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.05.003

糖尿病性心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)是糖尿病的主要并发症之一,也是2型糖尿病患者最主要的死亡原因之一。氧化应激,心肌能量代谢,心肌细胞的凋亡等在DCM的发生和发展过程中起着重要作用^[1-2],但其发病机制复杂,有待于进一步研究。褪黑素(melatonin, MLT)是一种内源性分泌吲哚内物质,主要由哺乳类动物和人类松果体分泌,具有抗炎和抗凋亡的作用^[3]。该研究通过观察MLT对2型糖尿病大鼠心肌细胞凋亡及丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,

MAPK)通路蛋白的影响,探讨MLT对糖尿病性心肌损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料 24只健康雄性SPF级SD大鼠,150~180 g,购于安徽医科大学实验动物中心;MLT溶于无水乙醇,避光保存、链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)溶于柠檬酸盐溶液,现配现用,均购于美国Sigma公司;HE染色液、Masson染色试剂盒和二抗均购于北京中杉金桥生物技术有限公司;一步法原位末端标记法(terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;抗体caspase 3、Bax、Bcl-2、ERK、p-ERK、JNK、p-JNK、p38和p-p38购于美国Santa Cruz公司;BCA试剂盒和ECL显色试剂盒均购于美国Pierce公司。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病模型复制及分组 选用24只6周龄雄性SD大鼠,160~200 g。适应性喂养1周后,随机分为3组:①对照组8只,以基础饲料喂养,腹腔注射与STZ注射液相同体积的柠檬酸钠缓冲液;②模型组8只,以高脂饲料(包含2%胆固醇,10%猪油和88%基础饲料)喂养,一次性腹腔注射25 mg/kg的STZ,1周后取尾静脉血检测血糖,以血糖浓度 ≥ 11.1 mmol/L为2型糖尿病大鼠造模成功;③治疗组8只,按模型组喂养和造模,造模成功后给予MLT[10 mg/(kg·d)溶于2%乙醇生理盐水]灌胃,其余两组用相同体积的生理盐水灌胃。共24周。

1.2.2 标本采集及处理 连续灌胃24周后,前一晚禁食,第2天测空腹血糖(fasting blood-glucose, FBG)。腹腔注射10%水合氯醛予以麻醉,开胸,迅速取出心脏。每组各取6只大鼠左心室,10%福尔马林固定,石蜡包埋,每个大鼠心脏标本制成3张6 μm 的切片备用;其余大鼠心肌组织放于-80℃备用。

1.2.3 HE染色 石蜡切片脱蜡至水,苏木精染色,1%盐酸乙醇分化,伊红染色,脱水透明,中性树脂封片。

2017-01-13 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81570419)

作者单位:¹安徽医科大学分子生物学实验室、生物化学与分子生物学教研室、安徽省/省部共建教育部重要遗传病基因资源利用重点实验室,合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院内分泌科,合肥 230022

作者简介:熊方圆,女,硕士研究生;

朱华庆,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: aydzhq@126.com

1.2.4 Masson 染色 按 Masson 染色试剂盒说明书处理。切片脱蜡至水,按试剂 A、磷钼酸、试剂 D、试剂 B 先后顺序染色,脱水透明封片。

1.2.5 大鼠心肌细胞凋亡检测 采用 TUNEL 标记凋亡的心肌细胞,按一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书处理。使用荧光显微镜观察,呈现为绿色荧光的为凋亡细胞。高倍镜下每张切片随机取 5 个视野观察,计数每个视野凋亡细胞和细胞总数,并计算平均凋亡细胞所占的百分比作为凋亡细胞阳性指数。

1.2.6 Western blot 法检测 取出大鼠左心室,称 50 mg,加入 1 ml 裂解液,于冰上充分研磨成匀浆,移入 1.5 ml 的 EP 管中, -80°C 、 4°C 中反复冻融 3 次, $14\,000\text{ r/min}$ 离心 30 min,吸取上清液(蛋白)入另一个 1.5 ml 的 EP 管中。用 BCA 法测蛋白浓度并将所有样本调成相同浓度,加入蛋白上样缓冲液,混匀煮沸变性,于 -80°C 保存。配制 SDS-PAGE 胶,各组等量上样电泳,电泳后转入 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,一抗(β -actin、Bcl-2、Bax、caspase3、ERK、p-ERK、JNK、p-JNK、p38、p-p38) 4°C 孵育过夜,二抗室温孵育 2 h,于暗室滴加 ECL,覆盖 X 线片显影,定影。胶片扫描后用 Quantity One 分析灰度值。

1.3 统计学处理 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS

16.0 软件进行单因素方差分析,两两比较用 q 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MLT 对糖尿病大鼠体重(body weight, BW) 和 FBG 含量影响 注射 STZ 后,模型组大鼠血糖明显升高,且表现出多饮、多食、多尿,伴消瘦;治疗组大鼠状态良好,较模型组症状有所改善。与对照组相比,模型组和治疗组血糖均显著升高,提示大鼠糖尿病模型复制成功。与模型组相比,治疗组血糖明显降低。见表 1。

2.2 HE 染色结果 对照组心肌纤维为粉红色,排列整齐,胞质胞核组织结构清晰;而模型组心肌纤维染色不均匀且排列紊乱。与模型组相比,治疗组心肌纤维排列较整齐。见图 1。

2.3 Masson 染色结果 与对照组相比,模型组心肌胶原纤维显著增多。而与模型组相比,治疗组心肌胶原纤维明显降低。见图 2。

2.4 MLT 对糖尿病大鼠心肌凋亡的影响 对照组大鼠心肌内偶尔可见凋亡细胞,属生理性死亡。模型组和治疗组中凋亡细胞明显增多,但是经过 MLT 治疗后,凋亡细胞明显减少,心肌细胞凋亡率差异有统计学意义($F = 485.177$, $P < 0.01$)。见图 3。

2.5 心肌组织 Bax、Bcl-2 和 caspase3 的蛋白表达

表 1 MLT 对各组大鼠 BW 和 FBG 的影响($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	项目	1	2	3	4	5
对照	BW(g)	168.83 \pm 6.49	350.17 \pm 15.84	446.50 \pm 25.22	511.33 \pm 23.24	557.33 \pm 18.74
	FBG(mmol/L)	4.90 \pm 0.34	4.73 \pm 0.30	4.87 \pm 0.42	4.77 \pm 0.26	4.82 \pm 0.49
模型	BW(g)	167.33 \pm 9.16	352.00 \pm 10.49	352.50 \pm 11.15*	362.00 \pm 18.36*	369.17 \pm 31.51*
	FBG(mmol/L)	4.82 \pm 0.49	4.75 \pm 0.44	22.03 \pm 2.83*	21.42 \pm 2.98*	19.71 \pm 1.51*
治疗	BW(g)	162.57 \pm 7.81	359.26 \pm 32.08	411.38 \pm 38.22*#	463.62 \pm 53.50*#	507.00 \pm 64.96*#
	FBG(mmol/L)	4.58 \pm 0.41	4.73 \pm 0.46	18.76 \pm 2.69*#	16.46 \pm 2.66*#	15.84 \pm 1.94*#

1: 购买时; 2: 高脂喂养 2 个月后; 3: 造模后 2 个月; 4: 造模后 4 个月; 5: 造模后 6 个月; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

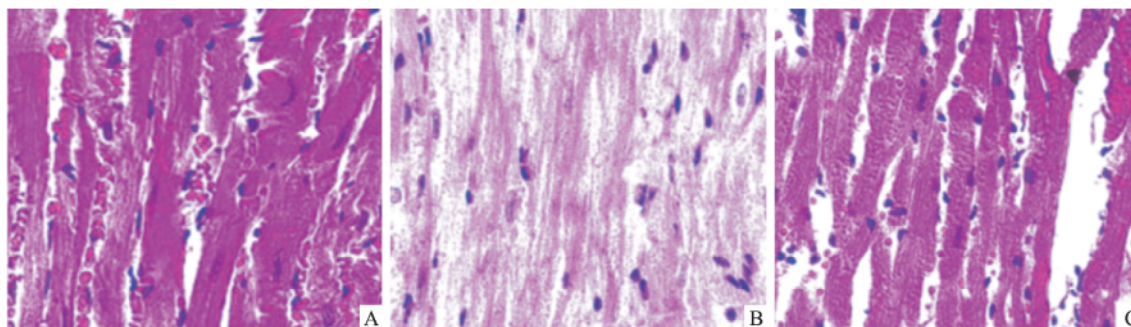


图 1 各组大鼠心肌形态的变化 $\times 400$

A: 对照组; B: 模型组; C: 治疗组

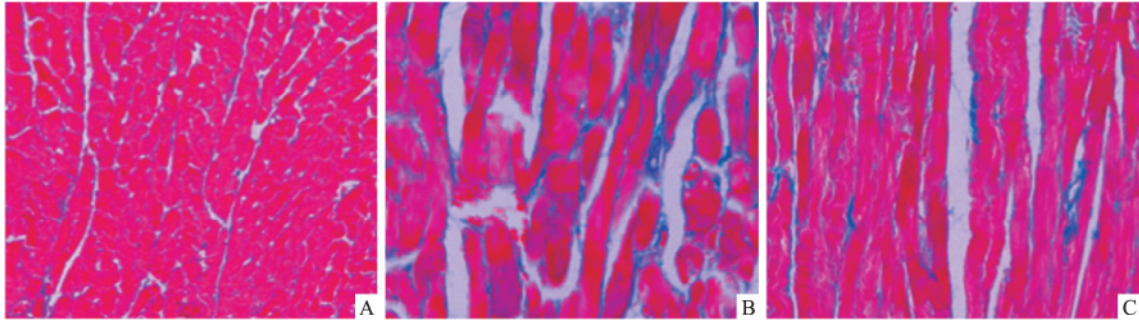


图2 各组大鼠心肌胶原纤维的变化 ×200
A: 对照组; B: 模型组; C: 治疗组

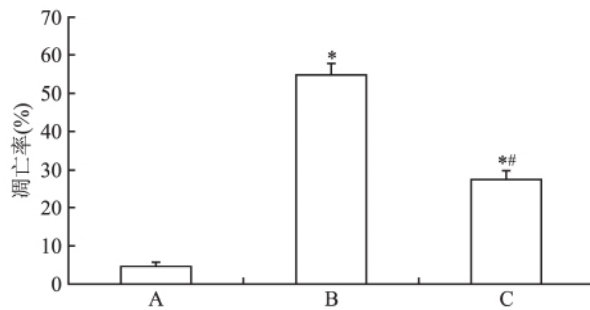
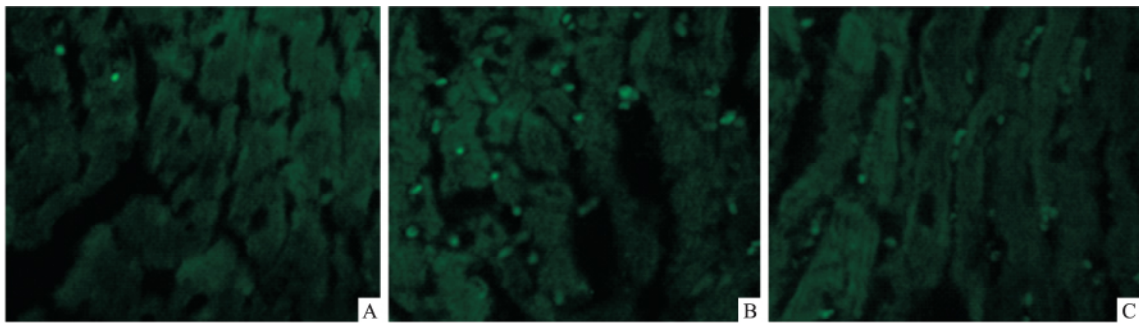


图3 各组大鼠心肌凋亡的变化 ×400
A: 对照组; B: 模型组; C: 治疗组; 与对照组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.01$

Western blot 结果显示,各组心肌中 Bax、Bcl-2 和 caspase3 的表达差异有统计学意义 ($F = 52.087、25.306、60.92, P < 0.05$)。与对照组比较,模型组中 Bax 和 caspase3 的表达水平均明显增强, Bcl-2 的表达上调不明显, Bax/Bcl-2 比值上调明显。与模型组比较,治疗组 Bax 和 caspase3 表达水平显著降低, Bcl-2 表达明显升高, Bax/Bcl-2 比值明显下降。见图 4。

2.6 MLT 对心肌组织 MAPK 通路相关蛋白的影响 与对照组相比,模型心肌组织中 p-JNK 和 p-ERK 的表达水平明显升高 ($P < 0.05$), 而 p-p38 的变化不明显。与模型组相比,治疗组心肌组织中 p-JNK 的表达水平明显下降 ($P < 0.05$), p-p38 的表达水平略升高, 而 p-ERK 的表达无明显变化。见图 5。

3 讨论

DCM 是糖尿病患者致死的主要原因之一,其发病机制很复杂,传统的治疗方法对 DCM 有一定疗

效,但目前尚无有效的治疗方法。因此需要努力寻找新型的治疗 DCM 的特效药。

MLT 是由哺乳动物的松果体分泌的一种胺类激素,已有研究^[4-6]表明 MLT 对阿霉素心脏毒性、心血管疾病、糖尿病视网膜病变均有保护作用。本研究结果表明,模型组大鼠心肌严重损害,HE 染色显示其心肌纤维排列紊乱,间隙变大,且染色不均,与以往研究^[7-8]结果一致,Masson 染色显示胶原纤维含量明显增多。MLT 给药治疗组心肌损害好转,表明 MLT 对糖尿病大鼠心肌损害有一定的保护作用。但是其保护机制不明,需进一步研究。

心肌细胞的凋亡在糖尿病心肌症的发生和进展中都起着重要的作用^[2,9]。Bojunga et al^[10]的研究指出高血糖能促进心肌中促凋亡蛋白 Bax 的表达,本实验也表明,糖尿病大鼠心肌中促凋亡蛋白 Bax 明显上调,且 Bax/Bcl-2 上升,此外, TUNEL 检测出糖尿病大鼠心肌组织中细胞凋亡明显增加。但是,经过 MLT 治疗后, Bax 明显下调,而 Bcl-2 明显上

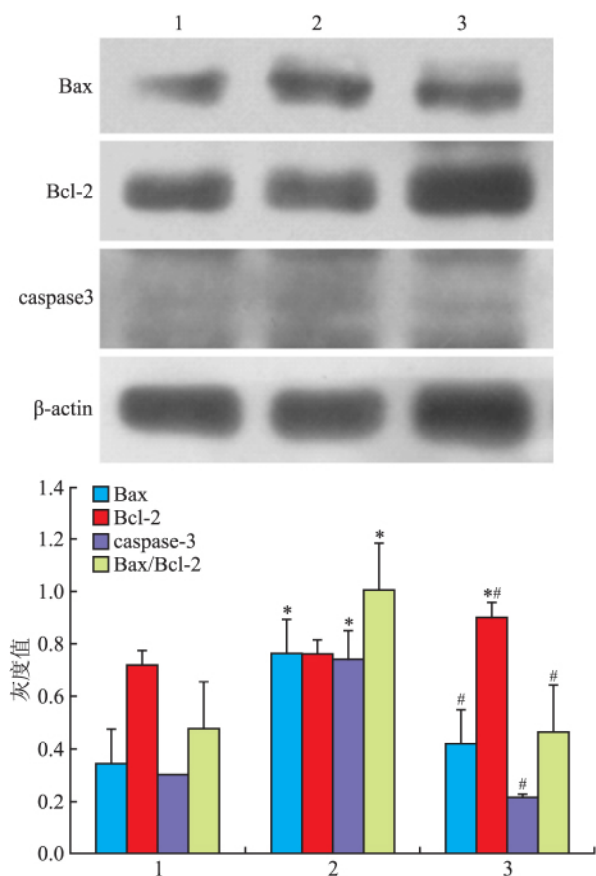


图4 MLT对糖尿病大鼠心肌组织凋亡相关蛋白的影响

1: 对照组; 2: 模型组; 3: 治疗组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

调,且凋亡阳性细胞明显减少。大多数 caspase 家族成员都是细胞凋亡的启动子,在细胞凋亡的发生、发展中发挥着至关重要的作用^[11],其中 caspase3 是细胞凋亡中最重要的执行者,因此被称为“死亡蛋白酶”。本研究表明高血糖能够促进心肌细胞中 caspase3 的表达,经过 MLT 治疗后,其表达量明显下降。这些结果均表明高血糖能引起心肌细胞凋亡,MLT 能抑制心肌细胞凋亡。

MAPK 信号转导通路是一条关键的调节细胞凋亡的通路,主要包括 JNK、ERK 和 p38MAPK 三条途径。近年来,很多研究^[11-14]都表明 JNK 信号通路能介导细胞凋亡,参与了多种细胞(如肿瘤细胞、肝细胞、神经细胞等)凋亡的发生发展,在细胞凋亡的过程中发挥着重要作用。本研究用 Western blot 检测了糖尿病大鼠心肌细胞中 MAPK 通路有关蛋白的表达水平,其结果显示,与对照组相比,模型组心肌组织中 p-JNK 和 p-ERK 表达显著升高,经过 MLT 治疗后,p-JNK 的表达明显下降。因此,本研究推测

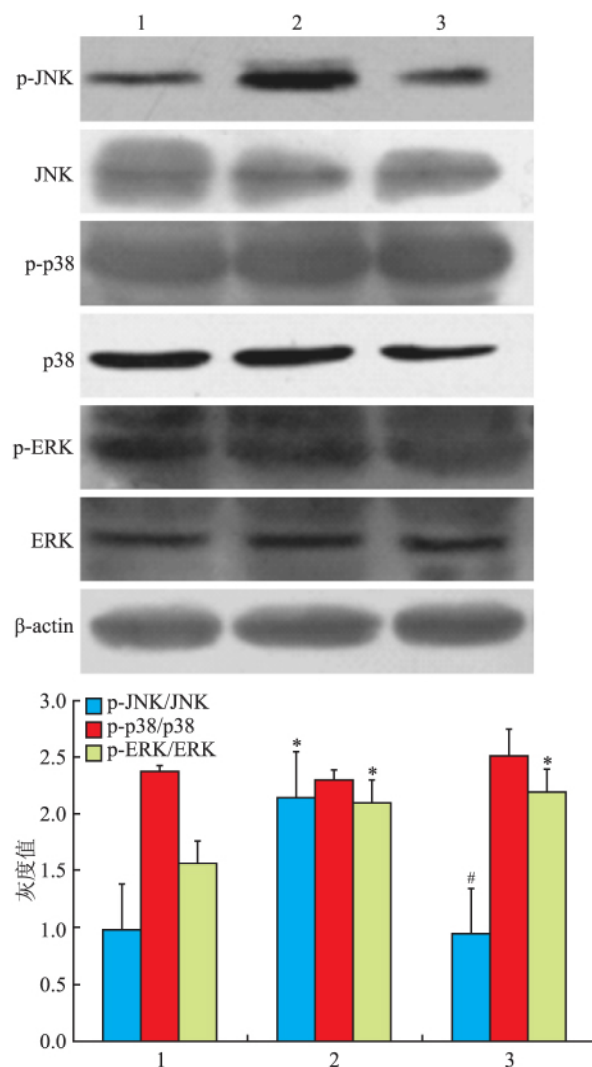


图5 MLT对糖尿病大鼠心肌 MAPK 通路相关蛋白的影响

1: 对照组; 2: 模型组; 3: 治疗组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

高血糖诱导的心肌细胞凋亡可能与 MAPK 通路的激活有关,MLT 可能通过调控 MAPK 通路改善心肌细胞凋亡。

综上所述,MLT 对糖尿病心肌的保护作用可能与降低血糖、调控 MAPK 通路、下调 Bax/Bcl-2 比值有关。然而其具体途径仍不明确,需要进一步的探讨与研究。

参考文献

- [1] 高嵩,危春英. 糖尿病心肌病发病机制及对心功能影响的研究进展[J]. 医学综述, 2011, 19(18): 2796-9.
- [2] 贾强,杨锐,马善峰,等. 硫化氢对糖尿病大鼠心肌损伤保护作用及其抗凋亡机制[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(2): 172-6.
- [3] Puig Á, Rancan L, Paredes S D, et al. Melatonin decreases the

- expression of inflammation and apoptosis markers in the lung of a senescence-accelerated mice model [J]. *Exp Gerontol*, 2016, 75: 1 - 7.
- [4] Zhang Y, Li L, Xiang C, et al. Protective effect of melatonin against Adriamycin-induced cardiotoxicity [J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5(5): 1496 - 500.
- [5] Tengattini S, Reiter R J, Tan D X, et al. Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin [J]. *J Pineal Res*, 2008, 44(1): 16 - 25.
- [6] 贾秀月 孟德欣 李怀荆 等. 褪黑素对糖尿病大鼠视网膜保护作用的研究[J]. *黑龙江医药科学* 2011, 34(2): 37 - 8.
- [7] 李 冀 王艳丽 蒋希成 等. 金丹活性部位对 MIRI 大鼠心肌病理形态及超微结构损伤的影响[J]. *中医药信息* 2013, 30(4): 17 - 9.
- [8] 倪 青 汪升慧 黄 静 等. 益气活血中药对糖尿病心肌病大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. *北京中医药* 2016, 36(6): 560 - 3.
- [9] Okoshi K, Guimarães J F, Di Muzio B P, et al. Diabetic cardiomyopathy [J]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2007, 51(2): 160 - 7.
- [10] Bojunga J, Nowak D, Mitrou P S, et al. Antioxidative treatment prevents activation of death-receptor and mitochondrion-dependent apoptosis in the hearts of diabetic rats [J]. *Diabetologia*, 2004, 47(12): 2072 - 80.
- [11] Stepień A, Izdebska M, Grzanka A. The types of cell death [J]. *Postepy Hig Med Dosw(Online)*, 2007, 61: 420 - 8.
- [12] Tsay J G, Chung K T, Yeh C H, et al. Calvatia lilacina protein extract induces apoptosis through endoplasmic reticulum stress in human colon carcinoma cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(4): 1579 - 88.
- [13] Uehara T, Bennett B, Sakata S T, et al. JNK mediates hepatic ischemia-reperfusion injury [J]. *J Hepatol*, 2005, 42(6): 850 - 9.
- [14] Wang T, Gu J, Wu P F, et al. Protection by tetrahydroxystilbene glucoside against cerebral ischemia: involvement of JNK, SIRT1 and NF- κ B pathways and inhibition of intracellular ROS/RNS generation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(3): 229 - 40.

Effects of melatonin on myocardial apoptosis and MAPK pathway in diabetic rats

Xiong Fangyuan¹, Tang Songtao^{1, 2}, Su Huan¹, et al

(¹Dept of Biochemistry and Laboratory of Molecular Biology Anhui Medical University;

Dept of Key Laboratory Gene Resource Utilization for Severe Disease of Anhui Province, Hefei 230032;

²Dept of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore protective effects of melatonin(MLT) on myocardial in rats with type 2 diabetes and its potential mechanism. **Methods** 24 male SD rats were divided into control group, model group and treatment group randomly. In order to induce diabetes, rats were intraperitoneally injected with streptozocin. Then rats in treatment group were given MLT by gavage for 24 weeks. Finally, hearts were collected. Haematoxylin-eosin(HE) staining and Masson staining were performed to observe the myocardial morphology change. TUNEL was used to observe myocardial apoptosis. Apoptosis-related protein and MAPK pathways related proteins were detected by Western blot. **Results** HE staining showed that MLT reversed the disarrangement of myocardial fibers. Masson staining displayed that MLT decreased the collagen deposition in cardiac tissue. Compared with model group, MLT could alleviate myocardial apoptosis in diabetic rats. Western blot showed that MLT decreased the expression of pro-apoptotic protein Bax and caspase3 ($P < 0.05$), and increased the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 ($P < 0.05$). Besides, MLT remarkably decreased the expression of p-JNK ($P < 0.05$). **Conclusion** MLT maybe ameliorate apoptosis of myocardial cell through decreasing blood glucose and suppressing p-JNK/MAPK overexpression in diabetic rats.

Key words diabetic; myocardial; MLT; apoptosis; MAPK