

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.01.003
网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190910.1631.006.html>(2019-09-11)

达格列净对心肌肥厚和心肌纤维化的影响研究^{*}

李 刚¹, 杨大春², 刘天虎¹, 余朝萍¹, 王 强^{2△}

(1. 四川省成都市郫都区人民医院心血管内科 611730; 2. 西部战区总医院心血管内科, 成都 610083)

[摘要] **目的** 探讨达格列净对腹主动脉缩窄(AC)压力超负荷大鼠模型的心肌肥厚和心肌纤维化的影响。**方法** 将 60 只雄性 SD 大鼠分为假手术(Sham)组、Sham+达格列净组、AC 组、AC+达格列净组,通过建立腹 AC 压力超负荷模型,12 周后检测心脏功能、心肌肥厚和心肌纤维化情况,以及心肌组织氧化应激、炎症反应相应指标。**结果** 与 AC 组比较,AC+达格列净组左心室舒张末期压力(LVEDP)降低 $[(9.03 \pm 2.65) \text{ mm Hg vs. } (16.93 \pm 3.11) \text{ mm Hg}]$,等容舒张期左心室压力下降最大变化率 $(-dP/dt)$ 升高 $[(7\ 886 \pm 547) \text{ mm Hg/s vs. } (6\ 257 \pm 467) \text{ mm Hg/s}]$,左心室重量指数(LVMI)降低 $[(3.520 \pm 0.108) \text{ vs. } (4.351 \pm 0.116)]$,心肌细胞面积缩小 $[(335.7 \pm 27.6) \mu\text{m}^2 \text{ vs. } (398.5 \pm 35.6) \mu\text{m}^2]$,胶原容积分数(CVF)降低 $[(7.54 \pm 0.89) \% \text{ vs. } (13.65 \pm 1.62) \%]$,差异有统计学意义 $(P < 0.05)$ 。同时,与 AC 组比较,AC+达格列净组丙二醛(MDA)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)水平降低,超氧化物歧化酶(SOD)水平升高,差异有统计学意义 $(P < 0.05)$ 。**结论** 达格列净可减轻心肌氧化应激和炎症反应来抑制心肌肥厚及心肌纤维化。

[关键词] 心肌病,肥大性,家族性;心内膜心肌纤维化症;达格列净;氧化性应激;炎症

[中图分类号] R541.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2020)01-0013-05

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Study on the effect of dapagliflozin on cardiac hypertrophy and fibrosis^{*}

LI Gang¹, YANG Dachun², LIU Tianhu¹, YU Chaoping¹, WANG Qiang^{2△}

(1. Department of Cardiology, Pidun District People's Hospital, Chengdu, Sichuan 611730, China;

2. Department of Cardiology, the General Hospital of Western Theater Command, Chengdu, Sichuan 610083, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of dapagliflozin on cardiac hypertrophy and myocardial fibrosis in rats with abdominal aortic coarctation (AC) pressure overload. **Methods** A total of 60 male SD rats were divided into the Sham group, the Sham + dapagliflozin group, the AC group, the AC + dapagliflozin group. By establishing abdominal AC model, detected cardiac function, cardiac hypertrophy and myocardial fibrosis after 12 weeks, as well as myocardial tissue oxidative stress and inflammatory response corresponding indicators. **Results** Compared with the AC group, the left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) in the AC + dapagliflozin group decreased $[(9.03 \pm 2.65) \text{ mm Hg vs. } (16.93 \pm 3.11) \text{ mm Hg}]$, and the maximum rate of change in left ventricular pressure during isovolumic diastole $(-dP/dt)$ increased $[(7\ 886 \pm 547) \text{ mm Hg/s vs. } (6\ 257 \pm 467) \text{ mm Hg/s}]$, left ventricular mass index (LVMI) decreased $[(3.520 \pm 0.108) \text{ vs. } (4.351 \pm 0.116)]$, cardiomyocyte area decreased $[(335.7 \pm 27.6) \mu\text{m}^2 \text{ vs. } (398.5 \pm 35.6) \mu\text{m}^2]$, collagen volume fraction (CVF) decreased $[(7.54 \pm 0.89) \% \text{ vs. } (13.65 \pm 1.62) \%]$, the differences were statistically significant $(P < 0.05)$. At the same time, compared with the AC group, the levels of malondialdehyde (MDA), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6 and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the AC + dapagliflozin group decreased, while the level of superoxide dismutase (SOD) increased, the differences were statistically significant $(P < 0.05)$. **Conclusion** Dapagliflozin reduces myocardial oxidative stress and inflammatory responses to inhibit cardiac hypertrophy and myocardial fibrosis.

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(81500224)。 作者简介:李刚(1971—),主治医师,硕士,主要从事心力衰竭、心律失常及心血管介入研究。 [△] 通信作者, E-mail: qwang_86@163.com。

[Key words] cardiomyopathy, hypertrophic, familial; endomyocardial fibrosis; dapagliflozin; oxidative stress; inflammation

心力衰竭是各种心脏疾病的终末阶段,心肌重构是心力衰竭的关键病理环节,其基础是心肌肥大和心肌纤维化^[1]。糖尿病是心力衰竭的临床常见合并症,也是导致心力衰竭的重要病因^[2]。钠-葡萄糖协同转运蛋白 2(sodium glucose linked co-transporter 2, SGLT2)抑制剂是一种新型的降糖药物,WIVIOTT 等^[3]研究证实,达格列净可以明显降低 2 型糖尿病患者的心力衰竭住院及心血管死亡风险。然而,达格列净对心肌重构的影响和机制尚不清楚。本研究选用腹主动脉缩窄(aortic constriction, AC)压力超负荷致心力衰竭大鼠模型,观察 SGLT2 抑制剂达格列净对心肌肥厚和纤维化的影响,并研究其可能机制,旨在为达格列净用于糖尿病合并心力衰竭的治疗提供理论依据,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠 60 只,体质量约 250~300 g,12 周龄,购自陆军军医大学实验动物中心,实验动物严格保证“3R”原则。

1.1.2 试剂

苦味酸-天狼星红染液购自生工生物工程(上海)股份有限公司。ELISA 检测试剂盒[白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)]购自美国 eBioscience 公司。超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)活性试剂盒购自江苏南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 动物的分组及干预

将大鼠分为假手术(Sham)组、Sham+达格列净组、AC 组、AC+达格列净组,每组 15 只,按照前期的方法建立腹 AC 致心力衰竭模型^[4],腹腔注射戊巴比妥钠 50 mg/kg,将大鼠麻醉满意后,固定、备皮、消毒和铺巾;腹部正中切口进入腹腔,于双肾动脉上方游离并充分暴露腹主动脉;22G(约 0.72 mm)的垫扎针沿腹主动脉长轴贴放,用 4-0 丝线将腹主动脉与针一起结扎后抽出 22G 针,使腹主动脉直径相应缩窄至约 1 mm,Sham 组和 Sham+达格列净组仅为游离暴露腹主动脉,穿线而不结扎。再按照参考文献^[5]的方法,Sham+达格列净组和 AC+达格列净组予以每天 1 次喂养达格列净 1 mg/kg,Sham 组和 AC 组予以喂养安慰剂,喂养 12 周。

1.2.2 大鼠心脏功能及血流动力学的检测

按照参考文献^[6]的方法,将大鼠麻醉后,仰卧位固定、备皮、消毒和铺巾,分离右侧颈总动脉并插管,PowerLab 多导生理记录仪(澳大利亚 AD Instruments 公司)测量收缩压(systolic blood pressure, SBP)、舒张压(diastolic blood pressure, DBP)和平均动脉压(mean artery pressure, MAP);将导管插入左心室并记录心腔内压力曲线,Chart 5 软件计算左心室收缩末期压力(left ventricular end-systolic pressure, LVESP)、左心室舒张末期压力(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)、左心室重量指数(left ventricular mass index, LVMI)、等容收缩期左心室内压力上升最大变化率(+dP/dt)和等容舒张期左心室压力下降最大变化率(-dP/dt)。测量结束脱颈处死大鼠,开胸快速取出心脏标本,分别置于甲醛中固定和冻存于-80℃冰箱备用。

1.2.3 心肌组织病理学检测

各组心脏标本经甲醛固定后,石蜡包埋切片,行苏木素-伊红(HE)染色和苦味酸-天狼星红染色。用 Image-Pro Plus 显微镜图像分析软件测量心肌细胞大小和心肌间质纤维化情况。按照参考文献^[7]的方法,计算心肌胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF),CVF=胶原面积/总面积 $\times 100\%$,每个标本取 3 张切片,每张切片中随机取 2 个视野,计算其平均值。

1.2.4 心肌组织中 MDA、SOD、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MCP-1 水平测定

按照参考文献^[8]的方法,取左心室心肌组织 100 mg,生理盐水冲洗 3 次后在冰浴中匀浆,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液,用于检测心肌组织中的 MDA、SOD、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MCP-1 水平。检测方式按照试剂盒使用说明书进行实验操作,ELISA 分析 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MCP-1 水平,应用硫代巴比妥酸(TBA)法检测 MDA 水平,应用黄嘌呤氧化酶(羟胺)法检测 SOD 活性。

1.3 统计学处理

采用 SPSS18.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD 法),多组间比较单因素方差分析(ANOVA)进行,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 达格列净对心脏功能的影响

表 1 各组大鼠的血流动力学和心功能数据比较 (n=15, $\bar{x} \pm s$)

项目	Sham 组	Sham+达格列净组	AC 组	AC+达格列净组
SBP(mm Hg)	110.56±6.26	113.34±5.63	202.52±16.71 ^a	208.89±17.82
DBP(mm Hg)	72.63±4.88	75.41±4.64	122.62±13.39 ^a	126.89±14.45
MAP(mm Hg)	84.82±5.69	87.96±5.42	149.17±14.92 ^a	153.48±16.26
LVESP(mm Hg)	108.37±5.13	109.52±5.69	198.14±15.72 ^a	202.39±16.88
LVEDP(mm Hg)	2.52±0.58	2.65±0.72	16.93±3.11 ^a	9.03±2.65 ^b
+dP/dt(mm Hg/s)	9 767±683	9 653±675	9 248±524	9 687±636
-dP/dt(mm Hg/s)	9 422±654	9 438±702	6 257±467 ^a	7 886±547 ^b

^a: $P<0.05$,与 Sham 组比较;^b: $P<0.05$,与 AC 组比较

与 Sham 组,AC 组大鼠左心室舒张功能受损,SBP、DBP、MAP 和 LVEDP 升高,-dP/dt 降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 AC 组比较,AC+达格列净组舒张功能损害减轻,LVEDP 降低,-dP/dt 升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

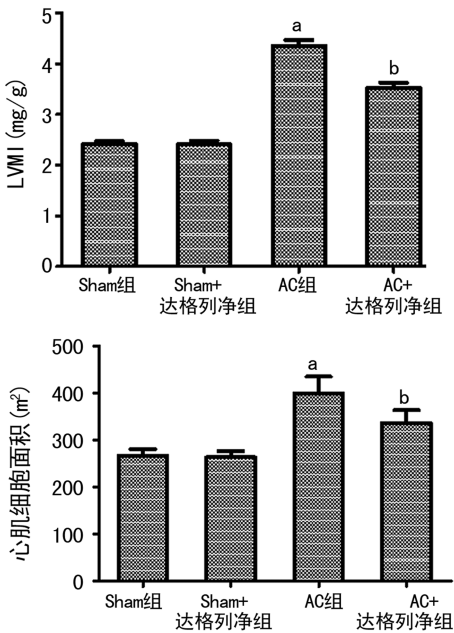
2.2 达格列净对心肌肥厚的影响

与 Sham 组,AC 组大鼠左心室呈现明显的心肌肥厚,LVMI 升高 [(4.351±0.116) mg/g vs. (2.417±0.052) mg/g],心肌细胞面积增大 [(398.5±35.6) μm^2 vs. (265.5±14.1) μm^2],差异有统计学意义($P<0.05$);与 AC 组比较,AC+达格列净组心肌肥厚得到改善,LVMI 降低 [(3.520±0.108) mg/g vs. (4.351±0.116) mg/g],心肌细胞面积缩小 [(335.7±27.6) μm^2 vs. (398.5±35.6) μm^2],差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1、2。

2.3 达格列净对心肌纤维化的影响

与 Sham 组比较,AC 组 CVF 增加 [(13.65±1.62)% vs. (1.83±0.31)%],差异有统计学意义($P<0.05$);与 AC 组比较,AC+达格列净组 CVF 减

少 [(7.54±0.89)% vs. (13.65±1.62)%],差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3。



^a: $P<0.05$,与 Sham 组比较;^b: $P<0.05$,与 AC 组比较。

图 1 达格列净对大鼠心肌肥厚的影响

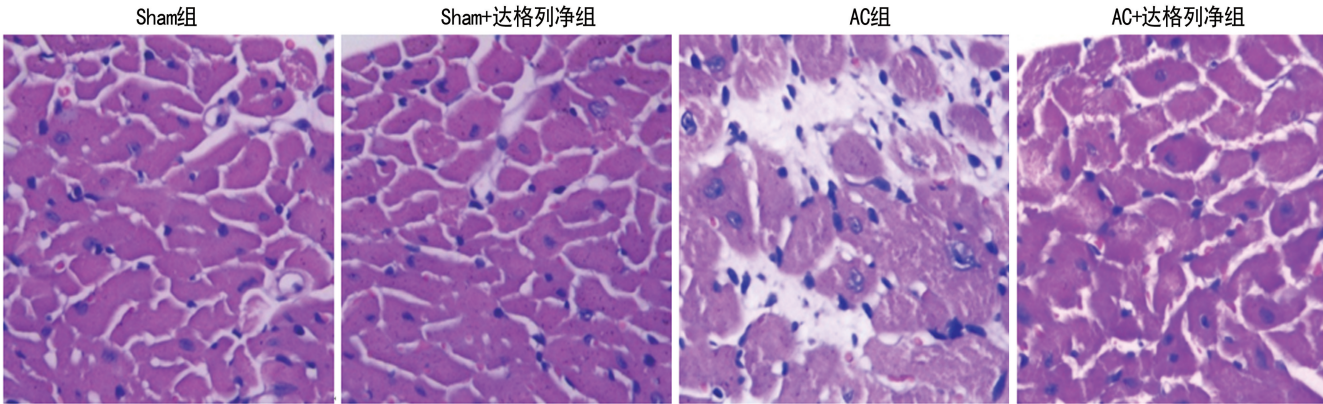


图 2 大鼠心肌细胞 HE 染色情况 (×400)

2.4 达格列净对心肌细胞氧化应激、炎症反应的影响

与 Sham 组比较,AC 组 MDA、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MCP-1 水平升高,SOD 水平降低,差异有统计学意

义($P<0.05$);与 AC 组比较,AC+达格列净组 MDA、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MCP-1 水平降低,SOD 水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

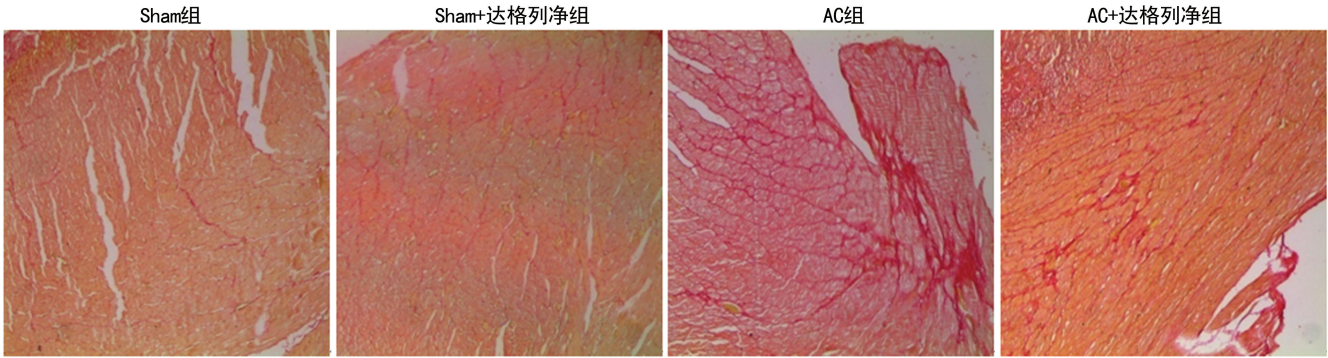
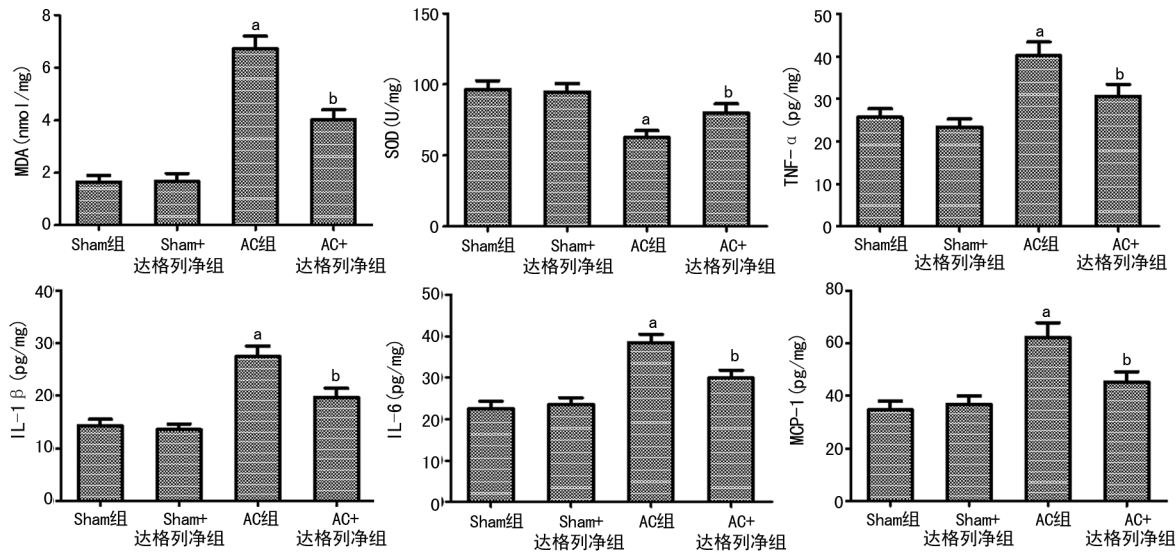


图 3 大鼠心肌细胞苦味酸-天狼星红染色情况(×200)



^a: $P < 0.05$, 与 Sham 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 AC 组比较。

图 4 达格列净对心肌组织中氧化应激、炎症反应的影响

3 讨 论

心力衰竭是诸多心血管疾病死亡的最终原因。心肌负荷过重、心肌缺血及神经体液失调激活了心肌细胞内多条信号通路促成心肌重构^[9],改善心肌重构能显著延缓慢性心力衰竭的发生、发展^[14]。糖尿病是导致冠状动脉粥样硬化性心脏病、糖尿病性心肌病和心力衰竭的重要原因,也是心力衰竭的临床常见并发症^[2]。

传统的糖尿病药物中,二甲双胍是目前唯一被循证医学证实具有心血管保护作用的降糖药^[10]。达格列净是在国内上市的第 1 个新型 SGLT2 抑制剂, SGLT2 抑制剂主要通过抑制肾脏重吸收葡萄糖,从而加速葡萄糖从尿液中排泄达到降低血糖。一系列的临床研究证实, SGLT2 抑制剂可以降低糖尿病心血管死亡和心力衰竭住院风险^[11-13]。

在本研究中,本课题组建立大鼠腹 AC 压力超负荷致心力衰竭模型,发现达格列净可以抑制心肌细胞肥大和间质纤维化,明显改善大鼠的心脏舒张功能。

心肌重构发生早期,心肌细胞肥大和心肌间质异常纤维化在血流动力学上主要表现为心肌舒张功能的降低,本实验提示,达格列净可以通过抑制心肌肥大和心肌间质纤维化来改善大鼠的心脏功能。

氧化应激是心肌重构发生、发展的重要因素^[15]。MDA 是氧自由基攻击细胞膜后生成的脂质过氧化产物,可用于评估脂质氧化情况和组织损伤程度;SOD 通过清除组织中过氧化氢(H_2O_2)和超氧化物,达到组织的氧化与抗氧化平衡,维持细胞膜结构和功能的稳定。新近研究证实,达格列净可以通过降低糖尿病小鼠的氧化应激水平从而抑制肝脏和肾脏的纤维化^[16];达格列净可通过抑制转化生长因子- β (TGF- β)/Smad 通路并激活 Nrf2/ARE 信号来减轻糖尿病小鼠的氧化应激水平从而抑制心肌纤维化^[17]。本研究发现,达格列净可以使得心肌组织心力衰竭病理演变过程中的 MDA 减少、SOD 活性增加,提示达格列净可能通过抑制氧化应激从而改善心肌重构。

TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MCP-1 细胞因子介导的炎症反应参与心肌重构的发生、发展^[18],达格列净可通过减轻糖尿病小鼠的炎症反应来抑制肝脏和肾脏的纤

维化^[16]。本研究证实,达格列净使心肌组织中的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MCP-1 的水平明显减少,提示达格列净可能通过抑制心肌炎性反应来改善心肌重构。

综上所述,达格列净通过延缓心肌重构来改善实验大鼠的心脏功能,可能与其抑制心脏氧化应激和炎症反应相关,这为糖尿病合并高血压性心力衰竭的防治提供了新策略。

参考文献

- [1] RAI V, SHARMA P, AGRAWAL S, et al. Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research[J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 424(1): 123-145.
- [2] LEHRKE M, MARX N. Diabetes mellitus and heart failure[J]. *Am J Med*, 2017, 130(6S): S40-S50.
- [3] WIVIOTT S D, RAZ I, BONACA M P, et al. Dapagliflozin and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(4): 347-357.
- [4] 王强, 马双陶, 杨大春, 等. 肾交感神经去除术对心肌肥厚和心肌纤维化的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(11): 1993-1997.
- [5] ORABY M A, EL-YAMANY M F, SAFAR M M, et al. Dapagliflozin attenuates early markers of diabetic nephropathy in fructose-streptozotocin-induced diabetes in rats[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 910-920.
- [6] WANG Q, MA S, LI D, et al. Dietary capsaicin ameliorates pressure overload-induced cardiac fibrosis and heart failure via the transient receptor potential vanilloid type 1 [J]. *Am J Hypertens*, 2014, 27(12): 1521-1529.
- [7] WANG Q, ZHANG Y, LI D, et al. Transgenic over-expression of transient receptor potential vanilloid subtype 1 attenuates isoproterenol-induced myocardial fibrosis in mice[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(2): 601-609.
- [8] 王强, 杨永健, 李德, 等. 富氢生理盐水对心肌梗死后心肌重构的影响[J]. *西部医学*, 2016, 28(3): 307-311.
- [9] VAN BERLO J H, MAILLET M, MOLKEN-TIN J D. Signaling effectors underlying patho-

- logic growth and remodeling of the heart[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(1): 37-45.
- [10] DZIUBAK A, WÓJCICKA G, WOJTAK A, et al. Metabolic effects of metformin in the failing heart[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): E2869.
- [11] ZINMAN B, WANNER C, LACHIN J M, et al. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(22): 2117-2128.
- [12] NEAL B, PERKOVIC V, MAHAFFEY K W, et al. Canagliflozin and cardiovascular and renal events in type 2 diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(7): 644-657.
- [13] ZELNIKER T A, WIVIOTT S D, RAZ I, et al. SGLT2 inhibitors for primary and secondary prevention of cardiovascular and renal outcomes in type 2 diabetes: a systematic review and Meta-analysis of cardiovascular outcome trials[J]. *Lancet*, 2019, 393(10166): 31-39.
- [14] SCHIRONE L, FORTE M, PALMERIO S, et al. A review of the molecular mechanisms underlying the development and progression of cardiac remodeling[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 3920195.
- [15] RABABA'H A M, GUILLORY A N, MUSTAFA R, et al. Oxidative stress and cardiac remodeling: an updated edge [J]. *Curr Cardiol Rev*, 2018, 14(1): 53-59.
- [16] TANG L, WU Y, TIAN M, et al. Dapagliflozin slows the progression of the renal and liver fibrosis associated with type 2 diabetes[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2017, 313(5): E563-E576.
- [17] LI C, ZHANG J, XUE M, et al. SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2019, 18(1): 15.
- [18] BACMEISTER L, SCHWARZL M, WARNKE S, et al. Inflammation and fibrosis in murine models of heart failure[J]. *Basic Res Cardiol*, 2019, 114(3): 19.