

普萘洛尔对糖尿病模型大鼠心肌异常电生理效果的影响及机制

刘军*,王昕,邓骥,贾静,肖静(湖北医药学院附属襄阳医院药学部,湖北襄阳 441000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)10-1357-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.10.18

摘要 目的:研究普萘洛尔对糖尿病模型大鼠心肌异常电生理效果的影响及机制。方法:取SD大鼠随机分为正常对照(生理盐水)组、糖尿病(生理盐水)组、PD98059[细胞外信号转导(ERK)抑制剂,10 mg/kg]组和普萘洛尔低、中、高剂量(1、20、50 mg/kg)组,每组8只。除正常对照组外其余各组大鼠一次性尾iv四氧嘧啶(20 mg/kg)复制糖尿病模型,各组大鼠ig相应药物,每日1次,连续给药42 d。分析各组大鼠心脏指数、体表心电图、右心室乳头肌跨膜电位(APD)变化;检测血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-2、IL-6、IL-10蛋白表达和心肌组织中大鼠肉瘤蛋白(Ras)、快速反应肉瘤蛋白(Raf)、ERK激酶(MEK)及细胞外调节激酶1/2(ERK1/2)的表达。结果:与正常对照组比较,糖尿病组大鼠心脏指数增加,心率降低,QT间期和APD延长,TNF- α 、IL-2、IL-6、IL-10、Ras、Raf、MEK及ERK1/2蛋白的相对表达量均增强($P<0.01$)。与糖尿病组比较,普萘洛尔中、高剂量组和PD98059组大鼠心脏指数降低,心率增加,QT间期和APD缩短,TNF- α 、IL-2、IL-6、IL-10、Ras、Raf、MEK及ERK1/2蛋白的相对表达量均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:普萘洛尔可改善糖尿病模型大鼠心肌异常电生理效果,其可能是通过下调血清中炎症反应和抑制MEK/ERK通路的激活而发挥作用。

关键词 糖尿病;普萘洛尔;心肌异常;电生理;细胞外信号转导激酶/细胞外信号转导信号通路;炎症反应;大鼠

Effect and Mechanism of Propranolol on the Myocardial Abnormal Electrophysiology Station in Diabetic Model Rats

LIU Jun, WANG Xin, DENG Ji, JIA Jing, XIAO Jing (Dept. of Pharmacy, Xiangyang Hospital Affiliated to Hubei Medical College, Hubei Xiangyang 441000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects and mechanism of propranolol on the myocardial abnormal electrophysiology station in diabetic model rats. METHODS: SD rats were randomly divided into normal control (normal saline) group, diabetic (normal saline) group, PD98059 (ERK inhibitor, 10 mg/kg) group and propranolol low-dose, medium-dose and high-dose (1, 20, 50 mg/kg) groups, with 8 rats in each group. Except for normal control group, rats were given alloxan (20 mg/kg) intravenously via tail vein to induce diabetic model. They were given relevant medicine intragastrically, once a day, for consecutive 42 days. The cardiac index, electrocardiogram and action potential durations (APD) of rats were analyzed; the expression of TNF- α , IL-2, IL-6 and IL-10 protein in serum were detected, and the expression of Ras, Raf, ERK kinase (MEK) and ERK1/2 in myocardial tissue were detected. RESULTS: Compared with normal control group, cardiac index increased in diabetes group; heart rate decreased; QT interval and APD were prolonged; the relative expression of TNF- α , IL-2, IL-6, IL-10, Ras, Raf, MEK and ERK1/2 protein increased ($P<0.01$). Compared with diabetes group, cardiac index decreased in propranolol medium-dose and high-dose groups and PD98059 group, heart rate increased, QT interval and APD were shortened; the relative expression of TNF- α , IL-2, IL-6, IL-10, Ras, Raf, MEK and ERK1/2 protein decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: Propranolol can improve myocardial abnormal electrophysiology station of diabetic model rats by down-regulating inflammatory reactions in serum and inhibiting the activation of MEK/ERK signaling pathway.

KEYWORDS Diabetes; Propranolol; Myocardial abnormality; Electrophysiology station; MEK/ERK signaling pathway; Inflammatory reaction; Rats

糖尿病及其并发症老龄化社会人群的主要疾病之一,给患者家庭和社会带来沉重的经济和社会负担^[1-2]。糖尿病心肌病是糖尿病并发症中的主要类型,表现为患者心脏功能异常,并可能发展成为心力衰竭、心律失常,甚至会引起死亡^[3-4]。心肌细胞信号传导以心肌电冲动为主,其中心房、心室功能的统一主要靠心肌电冲动产生的兴奋和收缩偶联^[5-6]。细胞外信号转导(ERK)通路是细胞内信号转导的最主要的信号通路之一,参与了细胞的增殖、分化、发育及凋亡过程^[7-8]。ERK通路的异常与多种心脏病病理模型的发病过程相关,也是药物治疗心脏病的重要靶点之一^[9-10]。PD98059为ERK通路抑制剂,是研究该信号通路的重要工具药物。普萘洛尔为 β 肾上腺素受体拮抗药,能够减慢心率、抑制心脏收缩力及房室传导、降低循环血流量,临床上可用于多种因素引起的心律失常,包括房性

及室性早搏、窦性和室上性心动过速、心房颤动等。本研究将PD98059作为阳性对照药,旨在研究普萘洛尔对糖尿病模型大鼠心肌异常电生理效果的影响,并为其临床应用提供实验参考。

1 材料

1.1 仪器

Multiskan Spectrum型全波长酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司);Medlab JCK381型生物信号采集处理系统(南京美易科技有限公司);Module P800型全自动生化分析仪、MagNA Lyser型组织匀浆仪(瑞士罗氏公司)。

1.2 药品与试剂

PD98059(美国Sigma Aldrich公司,批号:20120709,纯度:99.0%);总蛋白提取试剂盒、二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(南京建成生物工程研究中心,批号:20130406、20130708);肿瘤坏死因子 α (TNF- α)蛋白酶联免疫吸附(ELISA)检测试剂

*副主任药师。研究方向:医院药学。电话:0710-3420100。E-mail:2330123732@qq.com

盒(美国Omega公司,批号:20141012);白细胞介素(IL)-2、IL-6、IL-10 ELISA检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号:20140309);ERK激酶(MEK)/ERK通路蛋白ELISA检测试剂盒(上海哈灵生物科技有限公司,批号:20140821)。

1.3 动物

清洁级SD大鼠,♀♂不拘,体质量220~240 g,上海斯莱克实验动物中心提供,许可证号SCXK(沪)2008-0033。所有实验大鼠均在恒温恒湿条件下适应性饲养7 d,期间自由饮食。

2 方法

2.1 分组、建模与给药

取48只大鼠随机分为6组:正常对照(生理盐水)组、糖尿病(生理盐水)组、PD98059(10 mg/kg)组和普萘洛尔低、中、高剂量(1,20,50 mg/kg)组,每组8只,给药剂量参照预实验设计。大鼠于实验前禁食12 h,除正常对照组外其余各组大鼠一次性尾iv四氧嘧啶(50 mg/kg)复制糖尿病模型,正常对照组大鼠给予等量的溶剂(生理盐水)。以血糖水平持续>16.7 mmol/L作为糖尿病模型复制成功的标志。建模成功后,PD98059组和普萘洛尔各剂量组大鼠ig相应药物,连续给药42 d。所有大鼠饲养于温度(22±2)℃、湿度(55±5)%的洁净环境中,维持12 h光照周期。所有操作均经过医院动物伦理委员会同意。

2.2 大鼠心脏指数、体表心电图及右心室乳头肌跨膜电位(APD)时程测定

取各组大鼠ip乌拉坦(1.5 g/kg)麻醉后采用Medlab JCK381型生物信号采集处理系统分析体表II导联心电图。之后取出大鼠心脏,除去血液称质量后迅速移入台氏液中,分离大鼠右心室乳头肌,立即置于台氏液中,待稳定后在5 min内用Medlab JCK381型生物信号采集处理系统分析APD时程。按心脏质量/体质量×100计算心脏指数。

2.3 ELISA法检测相关蛋白表达

采用BCA法对大鼠心肌组织提取后的总蛋白进行定量分析。以等量的总蛋白进行ELISA法检测相关蛋白的表达,包括血清中TNF-α、IL-2、IL-6、IL-10蛋白表达和心肌组织中大鼠肉瘤蛋白(Ras)、快速反应肉瘤蛋白(Raf)、MEK及细胞外调节激酶1/2(ERK1/2)的表达。所有操作均严格按照说明书进行,以β-actin作为参照进行靶点蛋白表达的定量分析。

2.4 统计学方法

数据统计处理均采用SPSS19.0统计软件完成。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析,组间比较采用One-way ANOVA检验,两两比较采用t检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠心脏指数、体表心电图及APD时程测定结果

本研究在对模型大鼠异常的QT间期、APD时程及普萘洛尔的改善作用分析时发现,糖尿病组大鼠心脏指数明显升高,心率明显降低,QT间期[(91.2±15.6) ms]和APD时程明显延长,且与正常对照组大鼠相比差异有统计学意义($P < 0.01$);而与糖尿病组比较,普萘洛尔中、高剂量组和PD98059组大鼠的上述参数均明显改善($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组大鼠体表心电图指标及APD的测定结果见表1。

3.2 大鼠血清炎症因子测定结果

糖尿病组大鼠血清中炎症因子TNF-α、IL-2、IL-6及IL-10蛋白表达增强,且与正常对照组大鼠比较差异有统计学意义

表1 各组大鼠体表心电图指标及APD的测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 1 Results of surface electrocardiogram indicator and APD of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	心脏指数	心率/次/min	QT间期,ms	APD,ms
正常对照组	2.54±0.43	469±32.3	58.4±5.25	4.12±0.12
糖尿病组	3.41±0.40*	390±26.7*	91.2±15.6*	8.88±0.23*
普萘洛尔低剂量组	2.50±0.31 ^{##}	392±33.6	90.3±11.6	8.69±0.97
普萘洛尔中剂量组	2.84±0.41 ^{##}	414±38.7 ^{##}	77.7±12.5 ^{##}	8.12±0.82 ^{##}
普萘洛尔高剂量组	3.10±0.32*	422±42.5 [#]	68.3±10.1 ^{##}	7.18±0.27 [#]
PD98059组	3.04±0.28*	434±43.1 [#]	71.7±9.4 [#]	6.54±0.24 [#]

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与糖尿病组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. normal control group,* $P < 0.01$; vs. diabetes group,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);而与糖尿病组比较,普萘洛尔中、高剂量组和PD98059组大鼠的上述炎症因子的蛋白表达均降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组大鼠血清中TNF-α、IL-2、IL-6、IL-10蛋白相对表达量的测定结果见表2。

表2 各组大鼠血清中TNF-α、IL-2、IL-6、IL-10蛋白相对表达量的测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 2 Results of relative expression of TNF-α, IL-2, IL-6 and IL-10 protein in serum of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	TNF-α/β-actin	IL-2/β-actin	IL-6/β-actin	IL-10/β-actin
正常对照组	0.34±0.10	0.19±0.03	0.25±0.11	0.31±0.12
糖尿病组	0.98±0.13*	0.78±0.20**	0.78±0.08**	0.98±0.21**
普萘洛尔低剂量组	0.91±0.22	0.77±0.21	0.75±0.15	0.91±0.27
普萘洛尔中剂量组	0.78±0.25 [#]	0.68±0.19 [#]	0.68±0.18 [#]	0.83±0.25 [#]
普萘洛尔高剂量组	0.61±0.13 ^{##}	0.57±0.14 ^{##}	0.63±0.12 ^{##}	0.71±0.17 ^{##}
PD98059组	0.77±0.18 ^{##}	0.48±0.16 ^{##}	0.57±0.15 ^{##}	0.75±0.19 ^{##}

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与糖尿病组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. normal control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$; vs. diabetes group,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

3.3 大鼠心脏组织Ras及Raf蛋白表达测定结果

糖尿病组大鼠心肌组织中Ras、Raf蛋白表达增强,且与正常对照组大鼠比较差异有统计学意义($P < 0.01$);而与糖尿病组比较,普萘洛尔中、高剂量组和PD98059组大鼠的上述蛋白表达降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组大鼠心肌细胞中Ras、Raf蛋白相对表达量的测定结果见表3。

表3 各组大鼠心肌细胞中Ras、Raf蛋白相对表达量的测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 3 Results of relative expression of Ras and Raf in cardiac muscle cell of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	Ras/β-actin	Raf/β-actin
正常对照组	0.24±0.06	0.27±0.07
糖尿病组	0.90±0.16*	0.93±0.21*
普萘洛尔低剂量组	0.89±0.23	0.91±0.19
普萘洛尔中剂量组	0.57±0.20 [#]	0.78±0.18 [#]
普萘洛尔高剂量组	0.55±0.11 ^{##}	0.62±0.16 ^{##}
PD98059组	0.51±0.14 ^{##}	0.49±0.10 ^{##}

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与糖尿病组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. normal control group,* $P < 0.01$; vs. diabetes group,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

3.4 大鼠心肌组织中MEK及ERK1/2蛋白表达测定结果

糖尿病组大鼠心肌组织中MEK、ERK1/2蛋白表达增强,且与正常对照组大鼠比较差异有统计学意义($P<0.01$);而与糖尿病组比较,普萘洛尔中、高剂量组和PD98059组大鼠的上述蛋白表达均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组大鼠心肌细胞中MEK、ERK1/2蛋白相对表达量的测定结果见表4。

表4 各组大鼠心肌细胞中MEK、ERK1/2蛋白相对表达量的测定结果($\bar{x}\pm s, n=8$)

Tab 4 Results of relative expression of MEK and ERK1/2 in cardiac muscle cell of rats in each group($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	MEK/ β -actin	ERK1/2/ β -actin
正常对照组	0.30 \pm 0.09	0.31 \pm 0.05
糖尿病组	0.92 \pm 0.18*	1.02 \pm 0.13*
普萘洛尔低剂量组	0.89 \pm 0.22	0.97 \pm 0.15
普萘洛尔中剂量组	0.87 \pm 0.10*	0.85 \pm 0.18*
普萘洛尔高剂量组	0.65 \pm 0.14**	0.66 \pm 0.17**
PD98059组	0.69 \pm 0.16**	0.48 \pm 0.12**

注:与正常对照组比较,* $P<0.01$;与糖尿病组比较,** $P<0.05$,*** $P<0.01$

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

4 讨论

糖尿病心肌病的确切发病原因尚不明确,可能与心肌细胞代谢紊乱、心肌纤维化及钙转运缺陷和自主神经病变有关。心律失常是糖尿病心肌病的重要临床表现,其通常是由心肌电生理特性不均一而导致的。本研究结果发现,糖尿病组大鼠QT间期和APD明显延长;同时,糖尿病组大鼠血清中IL-2、IL-6、IL-10及TNF- α 蛋白表达明显增强,心肌细胞中Ras、Raf、MEK及ERK1/2蛋白表达明显增强。而普萘洛尔中、高剂量组和PD98059组大鼠的上述异常得到明显的恢复。因此,推测普萘洛尔改善糖尿病模型大鼠心肌异常电生理效果可能与下调糖尿病模型大鼠血清中炎症反应和抑制MEK/ERK通路的激活有关。

炎症反应是细胞内最常见的生理或病理学过程,且主要是由炎症反应蛋白介导的,如IL蛋白家族^[11-12]。本研究结果表明,TNF- α 及IL介导的炎症反应参与了糖尿病心肌病电生理的异常。

ERK通路等多种糖尿病的并发症的发生及恶化密切相关。有研究表明,可通过下调ERK及MEK蛋白的表达抑制糖尿病模型大鼠肾脏损伤^[13]。糖尿病上调ERK与表达糖尿病模型大鼠胰腺参与了血管纤维化及功能异常^[14]。本研究结果也表明,普萘洛尔主要通过抑制MEK/ERK信号通路从而改善糖尿病模型大鼠心肌异常的电生理效果。

参考文献

- [1] 季肖丽,姚圣蜜,王倩,等.血小板反应素-1与糖尿病心肌病关系研究[J].中国老年学杂志,2014,34(21):6 229.
- [2] 苏仕月,李结华,宗晓娜.脂联素及脂联素受体1的表达与糖尿病心肌病的关系[J].中国循证心血管医学杂志,2014,6(5):562.
- [3] 彭芝斌,张帆,杨泽敏,等.法舒地尔对糖尿病心肌病大鼠左室重构及心力衰竭的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2014,12(1):72.
- [4] 余帆,徐彤彤.瘦素对糖尿病心肌病大鼠心室重构的影响[J].第三军医大学学报,2014,36(3):253.
- [5] 田新桥,茹翱,赵应征,等.超声微泡靶向递送aFGF对糖尿病心肌病的治疗作用及其机制研究[J].心脏杂志,2013,25(6):750.
- [6] 庄晓东,廖新学.p38丝裂原活化蛋白激酶在糖尿病心肌病发病过程中的作用[J].中国病理生理杂志,2013,29(10):1 859.
- [7] 卢彦珍,王佳,宋娟,等. ERK通路在缺血后处理保护缺血再灌注大鼠心肌间质中的作用[J].中国分子心脏病学杂志,2013,13(6):755.
- [8] 屈春生,陈莉萍,李道麟.替米沙坦对大鼠心肌肥厚组织中Raf/MEK/ERK信号通路的影响[J].重庆医科大学学报,2013,38(11):1 344.
- [9] 徐文明,林健聪,王秀玉,等.调控ERK1/2通路在H2S保护心肌细胞对抗阿霉素损伤中的作用[J].中山大学学报:医学科学版,2013,34(1):48.
- [10] 蒋萌,王霖,蒋海河.脊髓内MAPK-ERK通路在心肌缺血再灌注损伤中的作用[J].中国当代儿科杂志,2013,28(5):387.
- [11] 李冬梅,徐丽,张红果,等.芍药苷对脑缺血再灌注模型沙土鼠脑组织炎症反应因子的影响[J].中国药房,2015,26(1):56.
- [12] 曾勇,杨贵芳,谭超,等.他汀类药物干预高血压病炎症反应的疗效的Meta分析[J].中国药房,2015,26(3):339.
- [13] 郝祥俊,于晓敏,宋成军,等.丝胶对糖尿病大鼠肾脏ERK信号通路的影响[J].中国医科大学学报,2013,42(1):60.
- [14] 沈文拥,陈伟庆,唐鹏.糖尿病大鼠胰腺泡组织中ERK5的表达及意义[J].第三军医大学学报,2010,32(7):692.

(收稿日期:2015-09-15 修回日期:2016-01-15)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——《文摘杂志》(AJ)收录期刊,欢迎投稿、订阅