

N-乙酰半胱氨酸对糖尿病大鼠心肌损伤的保护作用

孟庆芸¹, 符丽娟², 张博³

(辽宁医学院药理学教研室, 辽宁省锦州市 121001)

[关键词] N-乙酰半胱氨酸; 糖尿病心肌病; 转化生长因子 $\beta 1$; SMAD3; SMAD7

[摘要] **目的** 探讨 N-乙酰半胱氨酸对糖尿病心肌病大鼠心肌损伤的保护作用及机制。**方法** 用链脲佐菌素建立糖尿病模型, 50 只雄性 SD 大鼠随机分为 5 组: 正常组、糖尿病组、N-乙酰半胱氨酸低、中及高剂量组, N-乙酰半胱氨酸低、中及高剂量组分别按 50、100 及 200 mg/(kg·d) 灌胃 12 周。测定大鼠心功能、心脏质量指数及左心室质量指数、血清和左心室心肌组织中超氧化物歧化酶及谷胱甘肽过氧化物酶的活力; Masson 染色观察形态学变化及测量心肌胶原容积分数; 免疫组织化学法检测转化生长因子 $\beta 1$ 、SMAD3、SMAD7 的蛋白表达水平。**结果** 与正常组相比, 糖尿病组大鼠左心室舒张期末压显著升高, 左心室收缩压和 $\pm dp/dt_{\max}$ 显著降低, 心脏质量指数及左心室质量指数明显增高, 超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活力明显下降, 心肌胶原容积分数明显升高, 转化生长因子 $\beta 1$ 和 SMAD3 蛋白的表达增加, SMAD7 蛋白的表达减少 (P 均 < 0.01)。与糖尿病组相比, N-乙酰半胱氨酸各剂量组灌胃 12 周后以上指标均得到改善, 以高剂量组改善最为明显 ($P < 0.01$)。**结论** N-乙酰半胱氨酸对糖尿病心肌病有保护作用, 其机制可能与抑制氧化应激, 下调转化生长因子 $\beta 1$ 、SMAD3 表达及上调 SMAD7 表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Protective Effect of N-acetylcysteine on Myocardial Injury in Diabetic Rats

MENG Qing-Yun, FU Li-Juan, and ZHANG Bo

(Department of Pharmacology of Liaoning Medical College, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

[KEY WORDS] N-acetylcysteine; Diabetic Cardiomyopathy; TGF- $\beta 1$; SMAD3; SMAD7

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protective effects and mechanism of N-acetylcysteine (NAC) on myocardial injury in diabetic rats. **Methods** The diabetic model was established with streptozotocin (STZ). The fifty male SD rats were randomly divided into five groups: the normal group, the diabetic group, the low, middle and high dose N-acetylcysteine treatment group. N-acetylcysteine of 50, 100 and 200 mg/kg was respectively given to the low, middle and high dose drug treatment groups by gavage 12 weeks. Rats' heart function, body weight (BW), heart weight (HW) and left heart weight (LHW) were tested, HW/BW and LHW/BW were calculated, the activities of SOD and GSH-PX in serum and myocardial tissue were measured. Morphological change was observed and myocardial collagen volume fraction was measured by Masson staining. The protein expression levels of TGF- $\beta 1$, SMAD3 and SMAD7 were determined by immunohistochemistry. **Results** Compared with the control group, LVEDP of the diabetic group was significantly increased ($P < 0.01$) and LVSP, $\pm dp/dt_{\max}$ were significantly reduced ($P < 0.01$). All the cardiac mass index and left ventricular mass index were higher ($P < 0.01$). The activities of SOD and GSH-PX were significantly reduced ($P < 0.01$). The levels of TGF- $\beta 1$ and SMAD3 were significantly up-regulated ($P < 0.01$), the level of SMAD7 was declined significantly ($P < 0.01$). Compared with the diabetic group, all above indexes of NAC treatment groups had been improved by gavage 12 weeks, high dose group had been improved obviously ($P < 0.01$). **Conclusions** NAC has a protective effect on myocardial in diabetic rats, the mechanism may be related to the inhibition of oxidative stress, reducing the expression of TGF- $\beta 1$, SMAD3 and increasing the expression of SMAD7.

[收稿日期] 2011-07-12

[基金项目] 辽宁省科技厅科学技术计划项目(2011225015)

[作者简介] 孟庆芸, 硕士, 研究方向为心血管药理学, E-mail 为 mengqingyun5521@126.com。通讯作者符丽娟, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管药理学, E-mail 为 flg1988@163.com。张博, 硕士, 研究方向为糖尿病视网膜膜病变, E-mail 为 base.out@hotmail.com。

糖尿病心肌病(DCM)是糖尿病主要慢性并发症之一,其发病机制比较复杂,氧化应激、炎症因子、肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)等参与了糖尿病心肌病的病理过程,其中氧化应激在糖尿病多种并发症中发挥着重要的生物学作用。糖尿病时,心肌成纤维细胞合成释放一系列生长因子,如血管紧张素原、TGF- β 1、ET-1、TNF- α 等,最终导致细胞外基质沉积^[1]。研究表明,TGF- β 1在人和糖尿病动物模型的心肌组织中活化^[2],促进了糖尿病心肌病的发生与发展。SMAD作为TGF- β 1的胞内信号转导,参与TGF- β 1信号跨细胞转导。N-乙酰半胱氨酸(NAC)具有抗氧化能力,已有研究表明其可以抑制糖尿病小鼠的心肌代偿性肥大^[3],但具体机制尚不明确。本研究建立糖尿病大鼠模型,观察NAC对糖尿病大鼠心肌氧化应激反应及TGF- β 1、SMAD3和SMAD7表达的影响,探讨NAC对糖尿病心肌病的保护作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料

NAC购自武汉麦可欣科技有限公司;链脲佐菌素(STZ)购自美国Sigma公司;兔抗鼠TGF- β 1、SMAD3及SMAD7抗体购自沈阳市和平区生物试剂经营部。

1.2 糖尿病模型的建立及分组

健康雄性SD大鼠50只,体重250~300g,由辽宁医学院实验动物中心提供。适应性饲养1周后,其中40只一次性尾静脉注射STZ 30 mg/kg,72 h后尾静脉取血,测血糖,以血糖 ≥ 16.7 mmol/L、尿糖阳性者定为糖尿病模型,然后将糖尿病大鼠随机分为四组:糖尿病组、NAC低、中及高剂量组。另外10只作为正常组。糖尿病大鼠成模后1周,NAC各剂量组分别按50、100及200 mg/(kg·d)灌胃,糖尿病组和正常组给予等量生理盐水灌胃,饲养12周。

1.3 血糖、心脏质量指数、左心室质量指数、SOD及GSH-PX活力的测定

尾静脉取血,血糖仪测大鼠血糖,普通天平称大鼠体重,电子天平称大鼠心脏重量、左心室重量,计算大鼠心脏质量指数和左心室质量指数。制成10%的组织匀浆液,离心上清,SOD测定采用黄嘌呤氧化酶法,GSH-PX测定采用紫外比色法。

1.4 血流动力学测定

大鼠用20%乌拉坦(5 mL/kg)麻醉,分离大鼠

颈总动脉,逆行插管到左心室,测定左心室收缩期末压(LVSP)、左心室舒张期末压(LVEDP)、左心室内压最大上升和下降速率($\pm dp/dt_{max}$)。

1.5 Masson染色

常规石蜡切片脱蜡后,行Masson染色,光镜下观察心肌细胞呈红色或黄色,胶原纤维呈蓝绿色,拍片,扫描,采用图像分析仪测定心肌胶原容积分数(CVF)。

1.6 免疫组织化学法检测TGF- β 1、SMAD3及SMAD7的蛋白表达

石蜡防脱切片60℃烤片90 min,常规脱蜡至水洗,高压热修复抗原,滴加正常羊血清封闭液,滴加1:100稀释一抗,滴加生物素化二抗,滴加试剂SABC,DAB显色,苏木素轻度复染,脱水,透明,封片。阴性对照用PBS代替一抗。采用CIAS-1000型细胞图像分析系统测量切片TGF- β 1、SMAD3、SMAD7的累计光密度值(IOD)。

1.7 统计学方法

所有数据以用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠的血糖、心脏质量指数及左心室质量指数比较

与正常组相比,糖尿病组大鼠血糖、心脏质量指数及左心室质量指数明显增高($P < 0.01$)。与糖尿病组相比,NAC各剂量组血糖、心脏质量指数及左心室质量指数明显降低,以高剂量组降低最为明显($P < 0.01$;表1)。

2.2 CVF含量变化

与正常组相比,糖尿病组CVF含量明显升高($P < 0.01$);与糖尿病组相比,NAC各剂量组CVF含量明显降低,尤以高剂量组降低最为明显($P < 0.01$;表1)。

2.3 各组大鼠血清和心肌组织SOD、GSH-PX活力的变化

与正常组比较,糖尿病组大鼠血清和心肌组织SOD、GSH-PX活力明显下降($P < 0.01$)。与糖尿病组比较,NAC各剂量组大鼠血清及心肌组织SOD、GSH-PX活力明显升高,以高剂量组改善最为明显($P < 0.01$;表2)。

表 1. 各组大鼠血糖、心脏质量指数、左心室质量指数及 CVF 的比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1. Comparison of blood glucose, cardiac mass index, left ventricular mass index and CVF of rats in each group

分 组	血糖 (mmol/L)	心脏质量指数 (mg/g)	左心室质量指数 (mg/g)	CVF
正常组	4.72 ± 1.042	2.40 ± 0.30	1.76 ± 0.09	6.00% ± 0.96%
糖尿病组	27.65 ± 4.24 ^a	4.73 ± 0.32 ^a	2.70 ± 0.35 ^a	16.00% ± 3.21% ^a
NAC 低剂量组	22.10 ± 3.19 ^{ab}	4.38 ± 0.24 ^a	2.38 ± 0.24 ^a	14.38% ± 3.04% ^a
NAC 中剂量组	20.13 ± 2.26 ^{abc}	3.56 ± 0.28 ^{abc}	2.16 ± 0.08 ^{abc}	11.00% ± 2.45% ^{abc}
NAC 高剂量组	19.08 ± 2.28 ^{abd}	3.05 ± 0.20 ^{abd}	2.04 ± 0.01 ^{abd}	9.04% ± 2.01% ^{abd}

a 为 $P < 0.01$, 与正常组比较; b 为 $P < 0.01$, 与糖尿病组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 NAC 低剂量组比较; d 为 $P < 0.01$, 与 NAC 中剂量组比较。

表 2. 各组大鼠血清和心肌组织中 SOD、GSH-PX 的活力比较($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2. Comparison of the activities of SOD and GSH-PX in serum and myocardial tissue of rats in each group

分 组	血清		心肌组织	
	SOD (kNU/L)	GSH-PX (mmol/L)	SOD (kNU/g)	GSH-PX (mmol/g)
正常组	148.7 ± 14.12	137.10 ± 12.12	18.42 ± 2.75	10.31 ± 1.87
糖尿病组	122.43 ± 12.87	82.63 ± 6.10 ^a	12.19 ± 2.82	5.48 ± 1.43 ^a
NAC 低剂量组	129.53 ± 15.12	91.36 ± 6.95 ^a	13.38 ± 2.86	7.60 ± 2.01 ^a
NAC 中剂量组	138.19 ± 13.32	104.70 ± 9.79 ^{abc}	14.99 ± 3.02	7.95 ± 0.39 ^{abc}
NAC 高剂量组	141.12 ± 14.75	123.65 ± 9.85 ^{bcd}	16.75 ± 2.76	8.58 ± 0.97 ^{cbd}

a 为 $P < 0.01$, 与正常组比较; b 为 $P < 0.01$, 与糖尿病组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 NAC 低剂量组比较; d 为 $P < 0.01$, 与 NAC 中剂量组比较。

2.4 血流动力学比较

与正常组相比, 糖尿病组 LVEDP 显著升高, LVSP、 $\pm dp/dt_{\max}$ 显著降低 ($P < 0.01$)。与糖尿病组

相比, NAC 各剂量组 LVEDP 显著降低, LVSP、 $\pm dp/dt_{\max}$ 显著升高, 以高剂量组改善最为明显 ($P < 0.01$; 表 3)。

表 3. 各组大鼠血流动力学变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3. Hemodynamic changes of rats in each group

分 组	LVSP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	+ dp/dt _{max} (mmHg/s)	- dp/dt _{max} (mmHg/s)
正常组	102.40 ± 5.22	3.91 ± 0.72	5459.19 ± 406.68	5025.39 ± 98.71
糖尿病组	52.55 ± 3.20 ^a	8.48 ± 1.23 ^a	1927.26 ± 323.87 ^a	4640.54 ± 61.33 ^a
NAC 低剂量组	74.86 ± 5.35 ^a	8.60 ± 2.03 ^a	4822.94 ± 347.16 ^a	4765.37 ± 112.67 ^a
NAC 中剂量组	115.60 ± 9.90 ^{abc}	7.35 ± 0.79 ^{abc}	5031.59 ± 371.37 ^{abc}	4849.02 ± 97.64 ^{abc}
NAC 高剂量组	127.35 ± 5.45 ^{bcd}	6.45 ± 0.93 ^{bcd}	5274.43 ± 379.53 ^{bcd}	4998.22 ± 78.93 ^{bcd}

a 为 $P < 0.01$, 与正常组比较; b 为 $P < 0.01$, 与糖尿病组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 NAC 低剂量组比较; d 为 $P < 0.01$, 与 NAC 中剂量组比较。

2.5 大鼠心肌 TGF- β 1、SMAD3 及 SMAD7 的蛋白表达

正常组大鼠心肌 TGF- β 1、SMAD3 的蛋白表达呈弱阳性, 细胞浆或细胞膜轻度或点状染棕黄色, 范围较小, 而 SMAD7 的蛋白表达呈强阳性, 范围较大; 糖尿病组大鼠心肌 TGF- β 1、SMAD3 的蛋白表达呈强阳性, 心肌细胞较强或大范围着棕褐色, 而

SMAD7 的蛋白表达呈弱阳性, 范围较小; NAC 各剂量组心肌 SMAD7 的蛋白表达呈阳性, 心肌细胞中等强度或中等范围着棕色 (图 1-3)。与正常组比较, 糖尿病组 TGF- β 1 和 SMAD3 的 IOD 显著下降, SMAD7 的 IOD 显著升高 ($P < 0.01$); 与糖尿病组比较, NAC 各剂量组 TGF- β 1、SMAD3 的 IOD 有不同程度的升高, SMAD7 的 IOD 显著下降, 尤以高剂量组

变化最为明显($P < 0.01$; 表 4)。

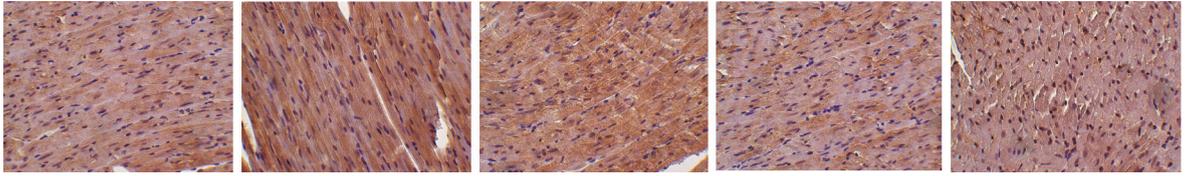


图 1. 各组大鼠心肌 TGF- β 1 蛋白的表达($\times 400$) 从左至右为正常组、糖尿病组、NAC 低剂量组、NAC 中剂量组、NAC 高剂量组。

Figure 1. The expression of myocardial TGF- β 1 protein in rats

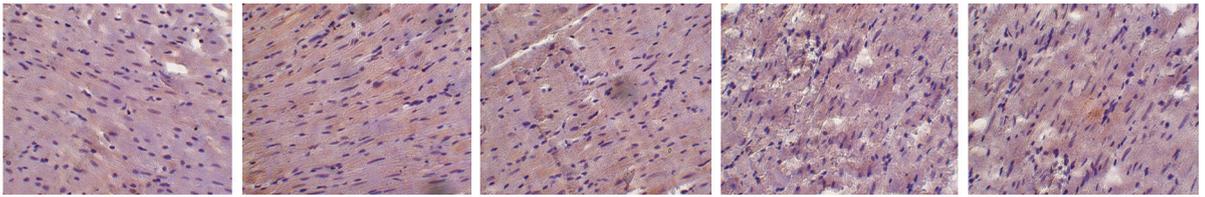


图 2. 各组大鼠心肌 SMAD3 蛋白表达($\times 400$) 从左至右为正常组、糖尿病组、NAC 低剂量组、NAC 中剂量组、NAC 高剂量组。

Figure 2. The expression of myocardial SMAD3 protein in rats

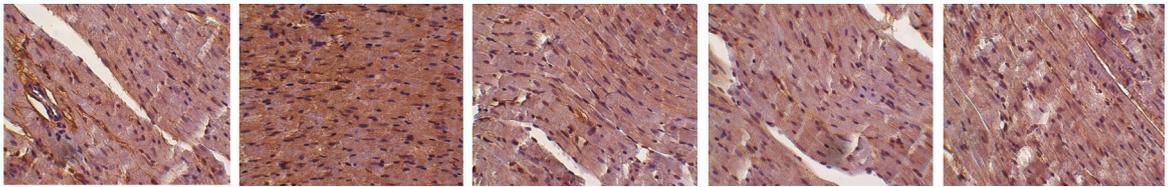


图 3. 各组大鼠心肌 SMAD7 蛋白表达($\times 400$) 从左至右为正常组、糖尿病组、NAC 低剂量组、NAC 中剂量组、NAC 高剂量组。

Figure 3. The expression of myocardial SMAD7 protein in rats

表 4. 各组大鼠心肌 TGF- β 1、SMAD3 及 SMAD7 的 IOD($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4. The IOD of myocardial TGF- β 1, SMAD3 and SMAD7 in rats

分 组	TGF- β 1	SMAD3	SMAD7
正常组	69.90 \pm 4.35	89.38 \pm 11.10	50.39 \pm 8.28 ^a
糖尿病组	43.18 \pm 3.44	44.51 \pm 3.99 ^a	82.82 \pm 9.61 ^a
NAC 低剂量组	55.69 \pm 6.77 ^b	64.0 \pm 10.25 ^a	72.28 \pm 8.92 ^{abd}
NAC 中剂量组	58.45 \pm 1.39 ^{bc}	57.01 \pm 5.25 ^{abc}	55.28 \pm 8.82 ^{abc}
NAC 高剂量组	62.34 \pm 1.56 ^{bd}	49.10 \pm 5.15 ^{abd}	54.49 \pm 6.58 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与正常组比较; b 为 $P < 0.01$, 与糖尿病组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 NAC 低剂量组比较; d 为 $P < 0.01$, 与 NAC 中剂量组比较。

3 讨 论

糖尿病心肌病是糖尿病的严重并发症之一,主要表现为心肌肥厚和纤维化,早期以舒张功能障碍为主,最后发展为收缩功能不全,是导致糖尿病晚期死亡的主要原因之一。已有研究证实,高血糖是导致心肌纤维化的重要因素。因此,研究高血糖导致

心肌纤维化的分子机制对于糖尿病及其并发症的治疗有非常重要的意义。本研究中,与正常组相比,糖尿病组大鼠血糖明显升高,NAC 各剂量组均可有效降低血糖浓度,有效保护糖尿病引起的心肌损伤。

研究发现氧化应激在糖尿病及其慢性并发症的发生发展中占据重要地位,导致糖尿病心肌病的晚期糖基化终末产物、己糖胺合成通路、多元醇通路、蛋白激酶 C 途径均与氧化应激产生过多自由基密切相关,抗氧化剂阻断氧化应激损伤途径,在糖尿病的治疗中显现出日益重要的作用。本研究中,与正常组相比,糖尿病组大鼠血清和心肌组织 SOD、GSH-PX 活力明显下降,表明此时糖尿病大鼠心肌已出现明显氧化损伤。经 NAC 干预 12 周后心肌氧化损伤得到明显改善,血清和心肌组织 SOD、GSH-PX 活力明显升高,提示 NAC 对糖尿病心肌病具有保护作用,其机制可能与抑制氧化应激有关。

近年的研究表明,细胞因子分泌增多及细胞外基质组成异常在糖尿病心肌病发病中起着重要的作用^[4]。TGF- β 1 是多功能生长因子,是组织器官纤维化的主要调控因子之一^[5,6]。近年来发现 TGF- β 1

刺激心肌成纤维细胞过度合成细胞外基质蛋白,且抑制胶原酶的降解;它还可以刺激心肌成纤维细胞合成收缩蛋白,使成纤维细胞转变成心肌样细胞^[7],最终导致心肌细胞外基质的沉积,从而引起心肌纤维化。周敏等^[8]研究发现糖尿病大鼠心肌 TGF- β 1 mRNA 表达水平显著高于正常对照组,提示糖尿病大鼠心肌肥厚可能与 TGF- β 1 表达增强有关。本研究中,糖尿病大鼠 TGF- β 1 蛋白表达水平显著升高,而 NAC 治疗可降低 TGF- β 1 的表达,从而减轻心肌纤维化。

SMAD 作为 TGF- β 1 的胞内信号转导蛋白, TGF- β 1 的变化必然影响 SMAD 的活化。已有研究证实心脏 SMAD 改变参与了多种心脏病理生理过程,并可能在心脏新生血管形成、心脏肥厚和心力衰竭中发挥中心作用^[9,10]。正常情况下, TGF- β 1 介导的信号通路不活化,但在糖尿病状态下 TGF- β 1 信号通路激活,使抑制型 SMAD7 表达受到抑制,受体型 SMAD3 表达增加,促进与心肌纤维化相关基因的转录,加速糖尿病心肌病的进一步恶化。本研究中,糖尿病大鼠心肌组织中 SMAD3 的蛋白表达水平显著增加, SMAD7 的蛋白表达水平显著降低,提示 SMAD3 活化可能参与了糖尿病心肌病的发生发展过程, SMAD7 抑制受体激活型 SMAD 信号转导对于心脏可能是一种保护作用。本研究中, NAC 治疗后 SMAD3 的蛋白表达水平显著下降, SMAD7 的蛋白表达水平显著增加,表明 NAC 可影响 TGF- β 1 信号通路活化,其机制可能与下调 TGF- β 1 表达,进而下调 SMAD3 的表达和上调 SMAD7 的表达有关。

综上所述, NAC 可以通过降低血糖、抑制氧化应激, 下调 TGF- β 1、SMAD3 的蛋白表达及上调 SMAD7 的蛋白表达对糖尿病大鼠心肌组织起到保护作用,其具体机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Deidre M, Sonya RS, Francisco JV. Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis cardiovascular research[J]. 2000, 46 (2): 257-263.
- [2] Azar ST, Salti I, Zantout MS, et al. Alteration in plasma transforming growth factor beta in normoalbuminuric type 1 and type 2 diabetic patient[J]. Clin Endocrinol Metab, 2002, 85 (12): 4 680-681.
- [3] Fiordaliso F, Bianchi R, Staszewsky L, et al. Antioxidant treatment attenuates hyperglycemia-induced cardiomyocyte death in rats[J]. J Mol Cell Cardiol, 2004, 37 (5): 959-968.
- [4] Peart JN, Headrick JP. Sustained cardioprotection: exploring unconventional modalities [J]. Vasc Pharmacol, 2008, 49: 63-70.
- [5] 邹正生, 张彩平, 龙石银, 等. 去甲肾上腺素对 THP-1 源性巨噬细胞转化生长因子 β 1 表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15 (2): 90-92.
- [6] 邓长柏, 杨作成. 阻断 Smad3 表达对转化生长因子 β 1 诱导肌成纤维细胞增殖的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16 (4): 281-283.
- [7] Wang B, Hao J, Jones SC, et al. Decreased Smad7 expression contributes to cardiac fibrosis in the infarcted rat heart[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 282 (5): 1 685-696.
- [8] 周敏, 钟惠菊, 吴晓英, 等. 培哚普利对糖尿病大鼠心肌病变及 TGF- β 1 表达的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19 (21): 3 227-230.
- [9] Euler-Taimor G, Heger J. The complex pattern of SMAD signaling in the cardiovascular system [J]. Cardiovasc Res, 2006, 69 (1): 15-25.
- [10] Schneiders D, Heger J, Best P, et al. SMAD proteins are involved in apoptosis induction in ventricular cardiomyocytes[J]. Cardiovasc Res, 2006, 67 (1): 187-196.

(此文编辑 文玉珊)