

基于 Keap1/Nrf2/ARE 通路探讨达格列净对高糖环境下大鼠心肌细胞保护作用

李博雅 张晴 梁伊娜 丛浩南 文丽波 (通讯作者)

齐齐哈尔医学院 黑龙江 齐齐哈尔 161000

【摘要】目的：糖尿病心肌病（DCM）是一种由糖尿病引起的心肌病变，其主要特征为心肌纤维化。本文旨在研究达格列净作为 SGLT2 抑制剂对高糖环境下大鼠心肌细胞的保护作用及其机制。方法：本研究选取 48 只 8 周龄雄性 SD 大鼠进行实验，分为 4 组，分别为对照组、DM 组、DM+达格列净组和 DM+二甲双胍组。首先使用 STZ 构建糖尿病动物模型，然后每周进行血糖和糖耐量检测，最终通过超声心动图检测大鼠心脏结构和功能。实验结束后，采集血清和心脏组织样本进行 HbA1c、胰岛素浓度测定以及 Western blot、Masson 染色和免疫组织化学染色分析。通过分析 Nrf2/ARE、氧化应激和心肌纤维化等指标，评估达格列净对 2 型糖尿病大鼠心肌损伤的作用。结果：通过临床研究和动物实验，本研究发现达格列净可以通过影响 Keap1/Nrf2/ARE 通路，在降低血清 Nrf2、Keap1 及尿酸水平的同时，还可以优化了血糖控制、改善胰岛 β 细胞功能，并改善了机体氧化应激反应。研究结果可为预防和治疗 DCM 提供理论支持，对改善患者生存质量和降低心衰发生率具有重要意义。

【关键词】：达格列净；糖尿病；心肌细胞

DOI:10.12417/2811-051X.26.06.035

糖尿病是世界范围内发病率较高的慢性代谢综合征，也是 21 世纪最严重的公共卫生问题之一。心力衰竭作为糖尿病的严重并发症之一，是糖尿病患者发病和死亡的首要原因，其在糖尿病患者中的发病率高达 19%~26%。^[1]糖尿病心肌病（diabetic cardiomyopathy, DCM）是指在高糖状态下出现的以心脏结构和功能异常为主要特征的病理改变，是糖尿病重要的并发症之一。心血管疾病是糖尿病患者死亡的主要原因。糖尿病会损害心脏代谢灵活性。^[2]国内外研究表明，DCM 可能与细胞坏死、细胞凋亡、炎症反应、晚期糖基化终末产物（AGEs）产生、心肌脂质过氧化损伤、心肌细胞内质网应激、氧化应激、线粒体功能障碍、钙离子调节障碍、肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活等有关，这些因素相互作用导致心肌纤维化和肥大的病理改变，最终影响心肌收缩舒张功能，发展为心力衰竭。^[3]钠-葡萄糖协同转运蛋白（sodium glucose co-transporter, SGLT）-2 抑制剂可以抑制肾脏对葡萄糖的重吸收，使过量的葡萄糖从尿液中排出，降低血糖。^[4]达格列净是一种高效、可逆和选择性的 SGLT-2 抑制剂，在世界范围内适用于治疗 2 型糖尿病（type 2 diabetes, T2D），大量的临床研究表明，达格列净除了具有很好的降血糖功能外，还降低了心血管（cardiovascular, CV）死亡率或心力衰竭（hospitalization for heart failure, HHF）住院率，具有心脏保护功能。^[5]有实验研究表明，达格列净可通

过降低巨噬细胞的活化及促炎因子的分泌而改善急性心肌梗死患者心肌纤维化已有多项研究证实了达格列净对射血分数保留或降低的心力衰竭患者具有积极的远期疗效。本文主要通过临床研究和动物实验研究来探讨以达格列净为代表的 SGLT2 抑制剂对于糖尿病心肌细胞的保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 动物

48 只 8 周龄雄性 SD 大鼠，体重 200-250g，保持温度 20~24℃，相对湿度 50%~60%，分笼饲养于齐齐哈尔医学院 SPF 级动物实验室，光照 12h，明暗交替，自由进食、自由饮水。普通饲料配方：75%碳水化合物、16%蛋白质、8%脂肪。高糖高脂饲料配方：74%普通饲料，10%猪油，10%蔗糖，5%蛋黄粉，1%胆固醇。

1.2 实验试剂

链脲佐菌素，达格列净，二甲双胍，裂解液，蛋白酶抑制剂，磷酸酶抑制剂，PMSF，Marker，超纯水，acr，Masson 染色试剂。

1.3 实验仪器

血糖仪、多普勒超声、酶标仪、切片机、显微镜、恒温箱、干燥箱、-80℃冰箱、石蜡包埋机、小动物 M 型超声仪。

1.4 方法

1.4.1 动物选取:

48 只 8 周龄雄性 SD 大鼠, 体重 200-250g, 随机分为 4 组, 每组 12 只, 饲养 12 周。各组如下: 1. 对照组: 正常饮食喂养 SD 大鼠; 2. DM 组: 未经治疗的 T2DM 大鼠; 3. DM+达格列净组: 用达格列净治疗的 DM 大鼠, 治疗量 10mg/kg/天; 4. DM+二甲双胍组: 用二甲双胍治疗的 DM 大鼠, 治疗量 10mg/kg/天。正常对照组、DM 组给予等量生理盐水, 连续 12 周。上述所有动物均在相同的条件下饲养, 6 只/笼, 室温 22±2℃, 湿度 55±5%, 人工照明明暗各 12h/天, 动物自由取食和饮水。

1.4.2 造模:

链脲佐菌素 (STZ) 40mg/kg 腹腔注射法构建糖尿病动物模型。STZ 配制: 100ml 枸橼酸缓冲液 (0.1mM, pH4.4) 加 1000mgSTZ, 充分溶解混匀, 所得 STZ 浓度为 10mg/ml。SD 大鼠禁食 12h 后 (可自由饮水) 进行腹腔注射, 剂量为 4ml/kg 体重, 注射完毕后立即给予自由饮水取食。注射三天后测空腹血糖 (禁食 12 h), 剪尾法取第二滴血, 使用雅培血糖测试仪检测空腹血糖水平, 血糖值 ≥16.7mM 大鼠为糖尿病动物模型试验标准。每周进行一次血糖和糖耐量的检测, 直到 12 周。

1.4.3 超声心动图检测检测大鼠的心脏结构以及心脏功能:

12 周后, 取材前行超声心动图检测。大鼠麻醉, 置于恒温加热板上, 取仰卧位, 固定四肢。胸部脱毛, 取湿纱布擦拭, 以充分暴露胸前区。均匀涂抹耦合剂, 将超声探头 (RMV710B 型) 至于动物胸骨左缘。首先截取左室长轴切面 B 超图。随后切换至 M 超, 以测量左心室舒张及收缩末期内径, 并计算短轴收缩率 (FS) 和左室射血分数 (LVEF)。随后转动超声探头, 至大鼠四腔心切面, 截取脉冲多普勒图像, 并测算二尖瓣舒张早期与舒张晚期血流速度峰值之比 (E/A)。随后切换至组织多普勒图像, 测算二尖瓣环组织舒张早期与舒张晚期速度峰值之比 (e'/a)。

1.4.4 取材:

腹腔注射 3% 戊巴比妥 (35mg/kg) 麻醉, 腹主动脉取血, 将血静置 1h, 以 3000r/min 离心 10 分钟, 取血清放置于 -80℃ 冰箱。大鼠胸腔剪开, 然后取出心脏, 应用 PBS 液冲洗, 应用刀片切开室间隔, 切取左心室。分成两份, 一份立即置于液氮中冷冻, 然后放入 -80℃ 冰箱冻存, 用于 Western blot 和 ELISA 检测, 另一份用 OCT 固定包埋成蜡块, 用于 Masson 染色、HE 染色及免疫组织化学染色。

1.4.5 HbA1c 测定:

取大鼠血于抗凝管中, 2000rpm 离心后取出 20μl 血细胞层, 加入 1ml 的溶血液充分混匀。37℃ 恒温 1 分钟, 660nm 为主波长, 800nm 单色光做副波长。再在生化仪的贮存器中存入数值和曲线, 应用标准曲线与实测吸光度值 A 进行比较, 通过

标准曲线, 通过仪器的 CPU 求出 HbA1c 的实测值。

1.4.6 胰岛素测定:

取血清, 用胰岛素抗体包被微孔板, 再往微孔中加入血清标本, 使其与有 HRP 标记的胰岛素抗体相结合, 形成抗体-抗原-酶标抗体复合物, 洗涤后加底物 TMB 显色, 在 HRP 的催化下 TMB 为蓝色, 然后在酸性条件下, 转变成黄色, 而且颜色深浅和样品中胰岛素含量呈正相关。在 450nm 波长下用酶标仪测定吸光度值, 应用标准曲线来计算样品中胰岛素浓度值。

1.4.7 western blotting 分析 Nrf2/ARE、氧化应激、心肌纤维化指标

蛋白制备 → 蛋白含量测定 → 电泳 → 转膜。

免疫印迹: 封闭 → 加一抗 → 加二抗。

检测: ECL 显色 → 置于图象扫描仪下扫描。

1.4.8 Masson 染色:

在二甲苯中放入心肌组织石蜡切片, 脱蜡至水。使用自来水、蒸馏水依次进行冲洗, 再用 Regaud 苏木精染液进行染核 5-10min。充分用蒸馏水冲洗, 接着应用 Masson 丽春红酸性复红液 5-10min, 充分应用蒸馏水冲洗, 再用 2% 冰醋酸水溶液进行浸洗, 分化时用 1% 磷钼酸水溶液 3-5min, 直接用胺蓝色液 5min。再进行浸洗时用 0.2% 冰醋酸水溶液片刻。最终应用二甲苯透明、中性树胶封固、无水酒精以及 95% 酒精封固。最后分析心肌胶原容积分数应用 Image-pro plus 图片处理软件, 得出 CVF。

1.4.9 免疫组织化学染色:

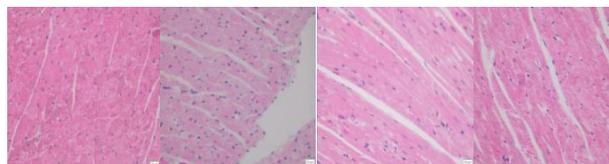
采用 PV 二步法进行免疫组化检测各组大鼠蛋白的表达, 其中阴性对照组应用 0.01MPB 缓冲液代替一抗, 显微镜观察。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况观察

实验期间, 有个别大鼠发生死亡, 属生理性死亡, 不影响实验结果。对照组大鼠毛发有光泽, 饮食和活动情况均正常; 与对照组相比, DM 组精神萎靡, 体型较瘦, 活动减少, 尿量明显增多; 与 DM 组相比, DM+达格列净组出现多饮多食现象, 尿量增多不明显, 活动正常; DM+二甲双胍组出现多饮多食现象, 尿量增多明显, 活动较正常。

2.2 各组大鼠心肌 HE 染色结果



生理盐水组 DCM 模型组 二甲双胍组 达格列净组

3 讨论

糖尿病是威胁人类健康与生命最常见的疾病之一,且发病率逐年增加。患者的血糖水平长时间未获得有效控制,极易对其心脏、神经、眼、肾脏、心脑血管系统等构成慢性损伤。^[6]糖尿病心肌病是糖尿病的心血管并发症中的一种独立疾病,氧化应激反应是糖尿病心肌病发病的重要机制之一。高糖高脂环境下,过量的 ROS 产生会导致氧化应激损伤、炎症反应、心脏肥大和纤维化,最终导致细胞死亡和心功能障碍。达格列净作为新一代 SGLT2 抑制剂,通过抑制位于近端肾小管中的高密度葡萄糖转运蛋白 SGLT2,减少肾脏对葡萄糖的重吸收并促进其在尿液中的排泄,从而独立于胰岛素作用降低葡萄糖水平。

在本次研究中,我们使用高糖高脂饮食结合 STZ 干预的方式建立糖尿病心肌病模型,通过予以大鼠达格列净、二甲双胍药物的干预方式,去评价达格列净对于糖尿病心肌病大鼠的心肌结构与功能、凋亡、氧化应激及 Kcap1/Nrf2/ARE 通路的影响,

并探讨可能的作用机制。

SGLT2 抑制剂是临床新型的糖尿病治疗药物,其可通过抑制患者机体内的 SGLT2,进而减少肾脏葡萄糖重吸收,进而降低血液循环中的葡萄糖水平,且还不会刺激到患者机体内的胰岛素分泌。目前,我国临床上使用的 SGLT2 抑制剂主要有 3 种,即达格列净、恩格列净和坎格列净。其中,达格列净是首批上市的 SGLT2 抑制剂,作为新一代 SGLT2 抑制剂,通过抑制位于近端肾小管中的高密度葡萄糖转运蛋白 SGLT2,减少肾脏对葡萄糖的重吸收并促进其在尿液中的排泄,从而独立于胰岛素作用降低葡萄糖水平,此药能有效阻断近曲小管重吸收葡萄糖,进而加速葡萄糖的排泄,最终发挥较好的降糖功效,并达到缓解临床症状,促进预后转归的目的。

综上所述,达格列净可有效减轻 DCM 小鼠的心肌肥厚,改善心脏结构及功能,减少心肌细胞凋亡,其机制可能与激活 Kcap1/Nrf2/ARE 通路,抑制心肌细胞氧化应激有关。

参考文献:

- [1] 黄静,张驰,范忠才.鸢尾素通过 PI3K-AKT-mTOR 信号通路减轻糖尿病心肌病小鼠的心肌损伤[J].中国病理生理杂志,2022,38(04):599-607.
- [2] Jankauskas SS, Kansakar U, Varzideh F, et al. Heart failure in diabetes[J]. Metabolism, 2021, 125: 154910.
- [3] 丁小艳,吕丽丽,翟满满,等. 糖尿病心肌病发病机制和治疗策略的研究进展[J]. 中国糖尿病杂志,2024,32(9):710-714.
- [4] 刘延旭,罗豪,文聪等.钠—葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂治疗糖尿病相关性心力衰竭作用机制研究进展[J].山东医药,2023,63(32):97-100.
- [5] 周密,杨水生,周康,陈海滨,张沂,宋俊华. 达格列净基于 BMP2 抑制 NLRP3/Caspase-1 介导的细胞焦亡治疗糖尿病合并心衰[J].心脏杂志,2025,(02):132-136.
- [6] 孙峥,王笑辉,袁景,等.达格列净联合利拉鲁肽治疗非酒精性脂肪性肝病合并 2 型糖尿病患者短期疗效研究[J].实用肝脏病杂志,2022,25(06):796-799.