

四氢生物蝶呤对糖尿病小鼠心肌损伤的保护作用

李袁静¹, 刘 柳², 汪道文², 罗素新¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院内科, 重庆 400016;

2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院高血压病研究所, 武汉 430030)

【摘要】目的: 研究四氢生物蝶呤(Tetrahydrobiopterin, BH4)对 db/db 糖尿病小鼠心肌中氧化应激的影响及其可能机制。方法: 给予糖尿病模型 db/db 小鼠磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer solution, PBS), 低剂量 BH4[10 mg/(kg·d)]、高剂量 BH4[50 mg/(kg·d)]干预 8 周, 并以 C57 小鼠为正常对照组, 检测心功能指标, 检测心肌组织 H₂O₂ 水平、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量和超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活性。结果: 糖尿病组心功能指标明显降低, 心肌内 H₂O₂ 水平明显增加, MDA 含量增加, 而 SOD 活性没有明显降低; 而不同剂量的 BH4 能改善心功能指标, 降低心肌组织内 H₂O₂ 水平和 MDA 含量, 并明显提高 SOD 活性。结论: BH4 可以提高糖尿病小鼠心脏功能, 降低心肌内氧化应激状态, 提高抗氧化能力, 提示改善氧化应激可能是 BH4 改善糖尿病心肌病的机制之一。

【关键词】四氢生物蝶呤; 糖尿病心肌病; 氧化应激

【中国图书分类法分类号】R587.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-04-12

Protective effect of tetrahydrobiopterin on myocardium injury in db/db mice

LI Yuanjing¹, LIU Liu², WANG Daowen², LUO Suxin¹

(1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

2. Department of Internal Medicine and Gene Therapy Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of the tetrahydrobiopterin, which is known to be an important cofactor of nitric oxide synthase (NOS) and an antioxidant, on development of diabetic cardiomyopathy in db/db mice and the underlying mechanism. **Methods:** Db/db mice were treated with phosphate buffer solution (PBS), low dosage tetrahydrobiopterin (BH4) [10 mg/(kg·d)] or high dosage BH4 [50 mg/(kg·d)] for 8 weeks by gavages. C57 mice were used as normal control. Cardiac function was measured by inserting a Millar catheter into the left ventricle. Then, myocardial H₂O₂ level, malondialdehyde (MDA) level and superoxide dismutase (SOD) activity were detected in every group. **Results:** The cardiac function in diabetic group was significantly suppressed compared with that in normal control group. Meanwhile, compared with those in normal control group, H₂O₂ and MDA in diabetic group were both increased. However, no difference was observed in SOD activity between normal control group and diabetic group. After treatment of BH4, the cardiac function was improved in both low dosage and high dosage BH4 groups than in diabetic group. In addition, treatment with BH4 attenuated the H₂O₂ and MDA levels and increased the SOD activity. **Conclusion:** The data suggest that BH4 can significantly improve cardiac function of db/db diabetic mice, attenuate the oxidative stress and improve antioxidant capacity.

【Key words】 tetrahydrobiopterin; diabetic cardiomyopathy; oxidative stress

糖尿病性心肌病变^[1]为糖尿病常见的慢性并发症之一, 由于其病因复杂, 因而其确切的致病机制尚未得到彻底阐明。氧化应激等都参与了糖尿病性心肌病的病程发展^[2]。而四氢生物蝶呤(Tetrahydrobiopterin, BH4)是一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, NOS)的重要辅助因子, 在 BH4 充足的情况下,

NOS 可催化 L-精氨酸(L-arginine, L-Arg)生成 NO 和 L-胍氨酸。当 BH4 不足的情况下, 导致 NOS 的脱耦联反应, 主要的终产物是氧自由基。而氧化应激是糖尿病导致心肌损伤过程中的重要机制。有实验证明糖尿病动物体内 BH4 水平明显下降^[3,4]。本实验旨在观察长期外源性给予糖尿病小鼠 BH4 干预对于糖尿病小鼠心脏功能和氧化应激的影响, 以期探索改善糖尿病心肌病变的新途径。

作者介绍: 李袁静(1983-), 女, 博士,

研究方向: 心血管内科学。

通信作者: 罗素新, 女, 副教授, Email: luosuxin0204@163.com。

1 材料及方法

1.1 动物及分组

健康雄性 C57 小鼠 10 只作为正常对照组,鼠龄 10~12 周。相同鼠龄的自发性糖尿病模型 db/db 小鼠(购买于上海斯莱克实验动物中心)30 只随机分为 3 组,给予不同剂量的 BH4 灌胃法干预。糖尿病组:db/db 小鼠,不以 BH4 干预;BH4 低剂量组:db/db 小鼠以 BH4 10 mg/kg 灌胃法干预;BH4 高剂量组:db/db 小鼠以 BH4 50 mg/kg 灌胃法干预;每日灌胃法定量,给药 8 周。每 10 d 测量记录体重,并检测饮食饮水量。所有的动物实验已通过伦理委员会论证。

1.2 心功能检测

所有实验动物干预结束后,用戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉后,固定,采用美国 Millar 公司 P-V Loop 导管经右颈总动脉,主动脉弓插入至左心室,通过 POWERLAB 生理记录系统测量记录左室收缩末压(Left ventricular end systolic pressure, LVESP)、左室舒张末容积(Left ventricular end diastolic volume, LVEDV)、左室最大上升速率(+dp/dt_{max})、左室最大下降速率(-dp/dt_{max})、射血分数(Ejection fraction, EF)等血流动力学指标。

1.3 心肌组织超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活性与丙二醛(Malondialdehyde, MDA)水平

各实验组于干预结束后取心肌组织进行匀浆。按照南京建成生物工程研究所检测试剂盒要求,采用硫代巴比妥法检测 MDA 水平,用 721 分光光度计检测。

1.4 心肌组织原位 H₂O₂ 染色

取各组小鼠心肌组织制作 10 μm 冰冻切片,与 DCFH-DA 探针(2', 7'-二氯荧光黄双乙酸盐,在细胞内脱乙酰基被 H₂O₂ 氧化后形成荧光化合物 DCF)在 37 ℃ 条件下孵育 20 min 染色后封片,在共聚焦显微镜下观察照相;用 Image J 软件将图像转化为 0~255 单位灰度值(0 代表完全染色,255 代表无染色),荧光染色强度以相对灰度值计算,以 C57 组相对灰度值为 100%。

1.5 统计学方法

所有实验数据采用均数 ± 标准误($\bar{x} \pm S_x$)表示。Sigma plot 11.0 统计软件进行数据处理,多组间数据比较采用 One-way ANOVA 方差分析;P 值 < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血流动力学改变

糖尿病组与正常对照组小鼠心功能相比,心率增加,左室最大容积减少, LVESP 明显升高,而 LVEDV、+dp/dt_{max}、-dp/dt_{max} 等血流动力学指标均明显降低,有统计学差异。与糖尿病组相比,不同剂量 BH4 干预组的心率均有所下降,左室最大容积增加, LVESP、LVEDV、+dp/dt_{max}、-dp/dt_{max} 等指标均有改善。如表 1 所示。

2.2 心肌组织 MDA 含量的变化

糖尿病组与正常对照组小鼠心肌组织 MDA 含量相比明显增加[(4.92 ± 0.19)/(2.54 ± 0.13) nmol/mg protein, P < 0.05]。而经过 8 周不同剂量 BH4 干预组小鼠心肌组织 MDA 含量与糖尿病组比均明显降低[(3.99 ± 0.20)、(3.52 ± 0.16)/(4.92 ± 0.19) nmol/mg protein, P < 0.05]。见图 1。

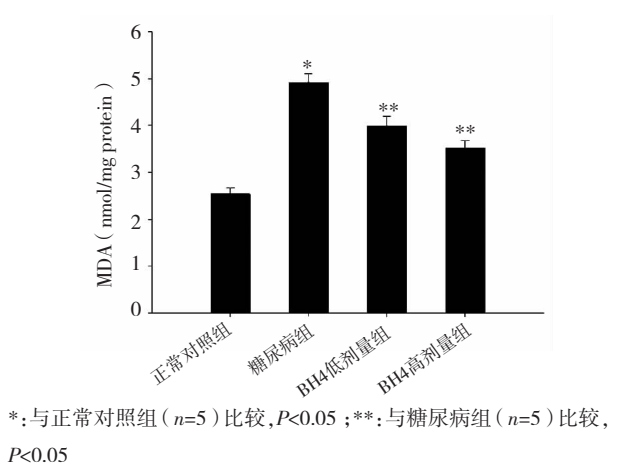


图 1 各组小鼠心肌组织中 MDA 水平
Fig.1 Expression of MDA in myocardium tissue of each group

2.3 心肌组织 H₂O₂ 染色

如图 2 所示,与正常对照组小鼠心肌组织相比,db/db 小鼠心肌组织中荧光染色明显增多,心肌组织中 H₂O₂ 水平明显高于正常小鼠[(206.60 ± 4.74)% vs. (103.00 ± 2.79)%, P < 0.05]。而不同剂量 BH4 干预后的荧光染色明显降低,提示 BH4 可降低 db/db 小鼠心肌中 H₂O₂ 水平,尤其是高剂量 BH4[(153.40 ± 3.09)% vs. (206.60 ± 4.74)%、(136.20 ± 1.98)% vs. (206.60 ± 4.74)%, P < 0.05]。如图 3 所示。提示 BH4 可明显改善糖尿病心肌组织中氧化应激水平。

表 1 各组心功能指标比较				
Tab.1 In vivo hemodynamic characterization of normal control group, diabetic group, BH4-low and BH4-high dosage groups				
心功能指标	正常对照组	糖尿病组	BH4低剂量组	BH4高剂量组
心率 (bpm)	300.00 ± 4.68	356.00 ± 3.37*	287.00 ± 5.82**	285.00 ± 5.42**
左室最大容积 (μl)	18.14 ± 0.28	14.60 ± 0.28*	15.70 ± 0.20**	16.37 ± 0.24**
LVESP (mmHg)	97.22 ± 2.10	127.31 ± 2.02*	112.20 ± 2.67**	115.40 ± 2.40**
LVEDV (mmHg)	5.69 ± 0.16	11.10 ± 0.31*	7.31 ± 0.23**	7.25 ± 0.25**
每分搏出量 (μl/min)	756.00 ± 56.60	575.00 ± 31.00*	788.00 ± 44.00**	733.00 ± 47.60**
+dp/dt _{max} (mmHg/s)	3 470.00 ± 312.00	7 220.00 ± 449.00*	5 890.00 ± 298.00**	5 470.00 ± 516.00**
-dp/dt _{max} (mmHg/s)	-2 860.00 ± 101.00	-4 510.00 ± 210.00*	-3 550.00 ± 263.00**	-3 020.00 ± 207.00**

注:*, 与正常对照组 (n=7) 比较, P<0.05; **, 与糖尿病组 (n=7) 比较, P<0.05

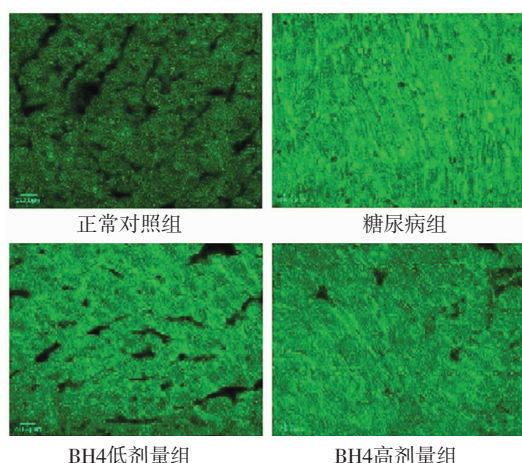
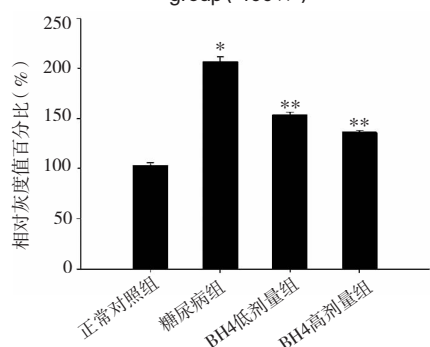


图2 各组小鼠心肌组织切片 DCFH-DA 染色 (400 ×)

Fig.2 DCFH-DA staining of myocardium tissue slices of each group (400 ×)



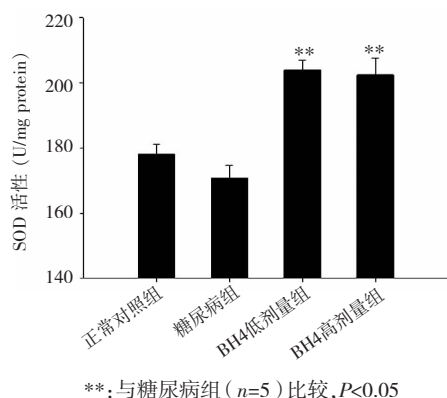
*: 与正常对照组 ($n=5$) 比较, $P<0.05$; **: 与糖尿病组 ($n=5$) 比较, $P<0.05$

图3 各组小鼠心肌 DCFH-DA 染色相对灰度值百分比

Fig.3 Percentage of relative grayscale value for myocardium tissue DCFH-DA staining in each group

2.4 心肌组织 SOD 活性变化

与 C57 小鼠相比, db/db 小鼠心肌组织内 SOD 活性没有明显降低 [(178.03 ± 2.97) vs. (170.81 ± 3.81) U/mg protein, $P>0.05$]. 而低剂量 BH4 组和高剂量 BH4 组小鼠心肌内 SOD 活性明显高于糖尿病组 [(203.81 ± 3.12) , (202.39 ± 5.10) vs. (178.03 ± 2.97) U/mg protein, $P<0.05$]. 提示 BH4 干预可能提高心肌内 SOD 活性。见图 4。



** : 与糖尿病组 ($n=5$) 比较, $P<0.05$

图4 各组小鼠心肌组织内 SOD 活性

Fig.4 Comparison of SOD activity in myocardium among groups

3 讨论

氧化应激增加是糖尿病病程发展的重要机制之一, 氧自由基的增多可损伤心肌细胞和上皮细胞, 严重影响糖尿病心脏功能。BH4 是 NOS 催化产生 NO 的重要辅酶因子, 糖尿病状态下, 氧化应激增加, 造成 BH4 被大量氧化。有动物实验证明外源性补充 BH4 可明显减少氧自由基的产生, 降低脂质过氧化物的水平, 从而延缓并减少心脑血管疾病的发生发展^[9]。本实验给予糖尿病 db/db 小鼠长期外源性干预 BH4 从而观察小鼠心功能和心肌氧化应激的改善情况。

糖尿病病程发展过程中, 心脏微血管病变和代谢紊乱导致心功能明显下降, 有研究显示糖尿病动物存在自由基代谢异常, 从而对心肌损伤起促进作用, 应用某些抗自由基损伤的药物则有一定疗效。2 型糖尿病中高血糖和游离脂肪酸可引起氧化应激, 在糖尿病病理发展中占有重要作用^[6,7]。有实验证实活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 在高血糖和游离脂肪酸引起的细胞损伤中有重要作用^[6]。牛内皮细胞在高糖诱导下能产生大量 ROS。BH4 是易被还原物质, 当大量 ROS 产生时被氧化, 而已证实在 BH4 缺乏的情况下, NOS 催化 NO 的过程出现脱耦联, 从而产生 O_2^- 和 H_2O_2 ^[8,9], 进一步产生氧自由基, 加重细胞损伤。三磷酸鸟苷 (Guanosine triphosphate, GTP) 是生物合成 BH4 的前体物质, 在病理条件下, GTP-环水解酶的功能受到损伤, 导致 BH4 合成发生障碍, 而外源性补充 BH4 可维持细胞正常 BH4 水平^[10]。BH4 缺乏导致 NOS 的功能障碍, 催化产生 O_2^- 及其降解产物 H_2O_2 、 OH^- 以及 $ONOO^-$ 在内皮和血管的氧化损伤中起到重要的作用^[11]。BH4 不仅是 NO 合成过程中必要的辅助因子, 同时也是还原剂, 是体内的抗氧化成分, 它能清除 ROS 如 O_2^- 和过氧亚硝基阴离子 ($ONOO^-$) 等^[12]。

本实验中, 糖尿病 db/db 小鼠的心功能明显受损, 而外源性补充 BH4 则有效地改善了 db/db 小鼠心功能状态。BH4 可能是通过 2 种途径改善心功能。一方面, 糖尿病时 BH4 缺乏, NOS 催化产生 NO 减少, 转而产生 O_2^- 增多, 引起氧化损伤, 而 BH4 的补充则明显改善 NOS 的活性, 减少了氧自由基形成并改善了血管活性; 另一方面, BH4 作为还原剂也起到了直接抗氧化的作用。除了改善氧化应激水平外, BH4 还可能通过改善心脏血流动力学或心肌代谢等方面提高心功能, 需更进一步实验证实。而长期干预 BH4 后, 糖尿病心肌中 SOD 的活性也明显升

高,说明 BH4 的抗氧化作用也通过增加抗氧化系统能力来实现,其主要机制有待进一步研究阐明。而与对照组相比,db/db 小鼠心肌 SOD 的活性并没有明显减少,提示糖尿病可能未达到影响 SOD 活性的病程,而氧化应激导致机体对 SOD 的代偿性增多,需要进一步加大样本量继续探讨。

在本实验中,观察到 db/db 小鼠的 $+dp/dt_{\max}$ 和 $-dp/dt_{\max}$ 均高于 C57 小鼠,在前期的其他实验中也观察到类似的情况^[13,14]。结合其他的心功能指标分析,可能的解释认为,db/db 糖尿病小鼠左心室的最大压、LVESP、LVEPV 及 $+dp/dt_{\max}$ 和 $-dp/dt_{\max}$ 均明显高于正常小鼠,可能是由于糖尿病引起的血容量增加,并且交感神经兴奋导致心率增加,心脏收缩功能代偿性加强等。在本实验中,干预 BH4 对糖尿病心脏功能有明显的改善作用,但 BH4 低剂量组和高剂量组的改善作用没有明显的区别。在以往实验研究中,口服给予小鼠 $10 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ^[15]和 $5 \text{ mg}/\text{d}$ [约 $200 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]^[16]均可增加 eNOS 活性,增加 NO 的产生,并减少 ROS 产生。本实验中以 $10 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 作为低剂量,而 5 倍剂量 $50 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 作为高剂量进行实验,结果发现低剂量 BH4 干预已可改善血流动力学指标,而提高到 $50 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 并没有明显进一步改善。可能原因是 BH4 对糖尿病心脏血流动力学改善可能通过增加 eNOS 活性产生 NO 等机制实现,而 $10 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 时已达到明显改善血流动力学的剂量,而增加到 $50 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 并未达到更进一步提高心功能的剂量,而 BH4 对糖尿病心脏功能的改善作用是否有剂量依赖性需用不同剂量的 BH4 干预的进一步实验证明。

糖尿病心肌中氧自由基增多,除来源于线粒体呼吸链代谢产生外,NADPH 氧化酶、一氧化氮合酶等催化的反应均伴有活性氧产生。而外源性给予 BH4,可明显减少糖尿病心肌内氧化应激水平,而除了增加 NOS 活性外,BH4 还可能通过其他途径改善心肌内氧化应激水平,其机制尚需进一步实验探讨。

参 考 文 献

- [1] Nakashima H, Akiyama Y, Tasaki H, et al. Coronary microvascular dysfunction in coronary artery disease associated with glucose intolerance[J]. J Cardiol, 1997, 30(2): 59-65.
- [2] Li Y J, Wang P H, Chen C, et al. Improvement of mechanical heart function by trimetazidine in db/db mice[J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(5): 560-569.
- [3] Alp N J, Mussa S, Khoo J, et al. Tetrahydrobiopterin-dependent preservation of nitric oxide-mediated endothelial function in diabetes by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression[J]. J Clin Invest, 2003, 112(5): 725-735.
- [4] Shinozaki K, Nishio Y, Okamura T, et al. Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats[J]. Circ Res, 2000, 87(7): 566-573.
- [5] Harrison D G, Ohara Y. Physiologic consequences of increased vascular oxidant stresses in hypercholesterolemia and atherosclerosis: implications for impaired vasomotion[J]. Am J Cardiol, 1995, 75(6): 75B-81B.
- [6] Rolo A P, Palmeira C M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2006, 212(2): 167-178.
- [7] Anderwald C, Roden M. Adipotoxicity and the insulin resistance syndrome[J]. Pediatr Endocrinol Rev, 2004, 1(3): 310-319.
- [8] Stuehr D J, Cho H J, Kwon N S, et al. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991, 88(17): 7773-7777.
- [9] Pou S, Pou W S, Bredt D S, et al. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase[J]. J Biol Chem, 1992, 267(34): 24173-24176.
- [10] Scott-Burden T. Regulation of nitric oxide production by tetrahydrobiopterin[J]. Circulation, 1995, 91(1): 248-250.
- [11] Cai S, Alp N J, Smith I, et al. GTP cyclohydrolase I gene transfer augments intracellular tetrahydrobiopterin in human endothelial cells: effects on nitric oxide synthase activity, protein levels and dimerisation[J]. Cardiovasc Res, 2002, 55(4): 838-849.
- [12] Werner-Felmayer G, Golderer G, Werner E R, et al. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, utilization and pharmacological effects[J]. Curr Drug Metab, 2002, 3(2): 159-173.
- [13] Buchanan J, Mazumder P K, Hu P, et al. Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity[J]. Endocrinology, 2005, 146(12): 5341-5349.
- [14] Van den Bergh A, Flameng W, Herijgers P. Type II diabetic mice exhibit contractile dysfunction but maintain cardiac output by favourable loading conditions[J]. Eur J Heart Fail, 2006, 8(8): 777-783.
- [15] Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice[J]. J Clin Invest, 2002, 110(3): 331-340.
- [16] Landmesser U, Dikalov S, Price S R, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension[J]. J Clin Invest, 2003, 111(8): 1201-1209.

(责任编辑:冉明会)