

糖尿病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002610

柚皮素通过抑制 NLRP3 炎症小体激活 改善糖尿病小鼠心肌重构

何夕松¹, 李家富¹, 程圣杰¹, 李 燕¹, 兰 卓¹, 游丽萍¹, 谢发江²

(1. 西南医科大学附属医院心血管内科, 泸州 646000; 2. 达州市中心医院心血管内科, 达州 635000)

【摘要】目的:研究柚皮素(naringenin, NAR)对糖尿病小鼠心肌重构的作用及对 NLRP3 炎症小体的影响。**方法:**将雄性 C57BL/6 小鼠 35 只随机分为正常(N)组(7 只)和糖尿病模型组(28 只), 糖尿病模型组连续腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ) 3 d, 正常组腹腔注射相应溶剂, 1 周后断尾取血测随机血糖, 以随机血糖大于 16.7 mmol/L 作为 1 型糖尿病小鼠成模标准。最终 28 只模型组小鼠均造模成功, 并随机分为糖尿病(DM)组、柚皮素低剂量(DM+LN)组、柚皮素中剂量(DM+MN)组、柚皮素高剂量(DM+HN)组, 每组 7 只。各组连续灌胃给药 8 周后处死小鼠, 观察柚皮素对小鼠体质量及血糖的影响; HE 及 Masson 染色观察心脏形态改变, 并测量心肌胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF); TUNEL 荧光染色观察心肌细胞凋亡; Western blot 测定心肌组织 NLRP3、ASC、Caspase-1、白介素(interleukin, IL)-1 β 、I 型胶原蛋白、纤连蛋白(fibronectin, FN)水平; PCR 检测 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β mRNA 表达。**结果:**Masson 染色结果分析显示, DM 组[(37.68 $\pm$ 1.14)%]的 CVF 较 DM+LN 组[(13.58 $\pm$ 0.86)%]、DM+MN 组[(9.50 $\pm$ 0.59)%]、DM+HN 组[(6.38 $\pm$ 1.41)%]明显增加($P=0.000$); TUNEL 荧光染色结果分析显示, DM 组[(64.94 $\pm$ 5.25)%]心肌细胞凋亡较 DM+LN 组[(48.80 $\pm$ 6.11)%]、DM+MN 组[(31.85 $\pm$ 4.44)%]、DM+HN 组[(13.64 $\pm$ 1.79)%]明显增加($P=0.000$); Western blot 结果显示, DM 组(0.52 $\pm$ 0.03)心肌 NLRP3 蛋白表达量较 DM+LN 组(0.33 $\pm$ 0.07)、DM+MN 组(0.23 $\pm$ 0.06)、DM+HN 组(0.15 $\pm$ 0.04)增加($P=0.000$); 同时 DM 组(0.69 $\pm$ 0.09)心肌 IL-1 β 蛋白表达也较 DM+LN 组(0.42 $\pm$ 0.09)、DM+MN 组(0.25 $\pm$ 0.04)、DM+HN 组(0.09 $\pm$ 0.03)增加($P=0.000$)。**结论:**NAR 可以改善糖尿病小鼠心肌纤维化、减少心肌细胞凋亡, 从而抑制心肌重构, 其机制之一可能是抑制了 NLRP3 炎症小体激活, 降低了炎症水平。

【关键词】柚皮素; 糖尿病心脏病; 炎症反应; NLRP3 炎症小体; 心肌重构**【中图分类号】**R363.2; R587.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2020-03-18

Naringenin ameliorates myocardial remodeling by inhibiting NLRP3 inflammasome activation in diabetic mice

He Xisong¹, Li Jiafu¹, Cheng Shengjie¹, Li Yan¹, Lan Zhuo¹, You Liping¹, Xie Fajiang²

(1. Department of Cardiovascular Diseases, Affiliated Hospital of Southwest Medical University;

2. Department of Cardiovascular Diseases, Dazhou Central Hospital)

【Abstract】Objective: To study the effects of NAR on myocardial remodeling as well as its effects on NLRP3 inflammasome in diabetic mice. **Methods:** Male C57BL/6 mice ($n=35$) were randomly divided into normal group (N group, $n=7$) and experimental group ($n=28$). The mice in the experimental group were injected with STZ for 3 days to induce diabetes mellitus. Random blood glucose was measured after 7 days. Mice with random blood glucose over 16.7 mmol/L were regarded as diabetes mellitus. Finally, all the twenty-eight mice in the experimental group were successfully modeled. Twenty-eight diabetes mice were randomly divided into diabetes group (DM group), diabetes+low dose of NAR group (DM+LN group), diabetes+ middle dose of NAR group (DM+MN group), and diabetes+high dose of NAR group (DM+HN group). The mice in treatment group received different doses of NAR through intraperitoneal

injection for 8 weeks. At the end of the study, the mice were sacrificed to observe the effects of NAR at different dose on the body weight and blood glucose. HE staining was used observe pathological changes of myocardial tissue. The myocardial CVF was calculated by Masson staining. Apoptosis was detected by TUNEL fluorescent staining. Western blot was applied to determine the protein levels of NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 β , type

作者介绍:何夕松, Email: hexisong24@163.com,
研究方向: 心血管疾病的研究和治疗。

通信作者:李家富, Email: ljf198@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:31300946); 泸州市-川医大联合课题资助项目(编号:2015IZCYD-S03(7/7))。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200708.0909.016.html>
(2020-07-09)

I collagen, and FN. PCR was used to analyze mRNA of *NLRP3*, *ASC*, *Caspase-1*, and *IL-1 β* . **Results:** Masson staining showed that the CVF was significantly higher in DM group[(37.68 $\pm$ 1.14)%] than in DM+LN group[(13.58 $\pm$ 0.86)%], DM+MN group[(9.50 $\pm$ 0.59)%] and DM+HN group[(6.38 $\pm$ 1.41)]($P=0.000$). TUNEL fluorescent staining showed that cell apoptotic rate was significantly higher in DM group[(64.94 $\pm$ 5.25)%] than in DM+LN group[(48.80 $\pm$ 6.11)%], DM+MN group[(31.85 $\pm$ 4.44)%] and DM+HN group[(13.64 $\pm$ 1.79)]($P=0.000$). Western blot results demonstrated that the DM group(0.52 $\pm$ 0.03) had significantly higher expression of NLRP3 compared with the DM+LN group(0.33 $\pm$ 0.07), DM+MN group(0.23 $\pm$ 0.06) and DM+HN group(0.15 $\pm$ 0.04) ($P=0.000$). Moreover, the DM group(0.69 $\pm$ 0.09) had significantly higher expression of IL-1 β than the DM+LN group(0.42 $\pm$ 0.09), DM+MN group(0.25 $\pm$ 0.04) and DM+HN group(0.09 $\pm$ 0.03) ($P=0.000$). **Conclusion:** NAR significantly attenuates the myocardial fibrosis and apoptosis in the diabetic mice, and its mechanism may be associated with inhibiting NLRP3 inflammasome activation, reducing the level of inflammation.

[Key words] naringenin; diabetic cardiomyopathy; inflammation; NLRP3 inflammasome; myocardial remodeling

糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)最先是由 Hamby RI 等^[1]在 1974 年作为一个明确概念首次提出,是指排除冠心病、高血压、心脏瓣膜病及其他可能引起心肌病变的病因,糖尿病患者出现心肌结构和功能发生特异性改变。其发病机制目前仍不明确,多数认为是由多种因素综合导致的结果,如炎症、细胞凋亡、氧化应激、代谢紊乱、RAAS 系统激活、亚细胞组分异常、免疫调节紊乱等多因素相互作用,导致心脏间质纤维化,出现心室重构,影响心脏收缩与舒张功能,最终出现心力衰竭^[2-4]。

DCM 的病理基础是心肌间质纤维化,而炎症反应在纤维化过程中起重要作用^[5]。NLRP3 炎症小体是由 NOD 样受体蛋白 3(NOD-like receptor protein, NLRP3)、凋亡相关微粒蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC)和 Caspase-1 组成的高分子蛋白复合物^[6]。它与糖尿病的心肌病变有密切关系。NLRP3 炎症小体在固有免疫反应中起重要作用。研究表明,糖尿病小鼠中沉默 *NLRP3* 基因能减轻小鼠的炎症反应,改善小鼠的心肌纤维化、凋亡等,从而缓解小鼠心功能恶化^[7]。

柚皮素(naringenin, NAR)是一种存在于各种水果及药用植物中的二氢黄酮类化合物,广泛用于体内外研究。它具有缓解心肌肥厚、降低缺血再灌注损伤心肌的氧化应激、抗心律失常、抗心肌纤维化等多种作用^[8-10]。NAR 能够抑制心脏 NLRP3 炎症小体通路的活化,减轻急性胰腺炎小鼠的心肌损伤,保护心脏功能^[11]。NAR 在糖尿病心肌病变中同样具有保护作用,通过活化 EETs-PPARs 通路,改善糖尿病小鼠心肌肥厚^[12]。You Q 等^[13]发现,NAR 可以通过抗氧化、抗凋亡、抗炎和抗纤维化缓解心肌细胞对高糖诱导的损伤。虽然已有研究表明 NAR 可以减

轻 DCM 的心肌重构,但其机制是否通过抑制 NLRP3 炎症小体的激活目前尚无报道。本研究通过建立 1 型糖尿病小鼠模型后给予不同剂量的 NAR 干预,探讨 NAR 改善心肌重构的作用及其机制,为临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂

健康雄性 SPF 级 6 周龄 C57BL/6 小鼠 35 只,体质量(16.0 $\pm$ 0.4) g,购自北京斯贝福生物技术有限公司。动物许可证号 SCXK(京)2016-0002。STZ 购自美国 Sigma 公司,货号 S8050;NAR 购自 Aladdin 公司,货号 480-41-1;抗 NLRP3 抗体购自 CST 公司,货号 #15101;抗白介素(interleukin, IL)-1 β 抗体购自 BIOSS 公司,货号 bs-0812R;抗 Caspase-1 抗体(货号 ab1872)、抗 ASC 抗体(货号 ab175449)、抗 GAPDH 抗体(货号 ab37168)、抗 Collagen I 抗体(货号 ab34710)、抗 Fibronectin 抗体(货号 ab45688)均购自 Abcam 公司;BCA 蛋白质浓度测定试剂盒购自 ASPEN 公司,货号 AS1086。

1.2 主要仪器

CX-21 型普通光学显微镜、IX51 型倒置显微镜购自 OLYMPUS 公司;JB-P5 型包埋机、JT-12K 型脱水机、JK-5 型组织摊片机购自武汉俊杰电子有限公司;DYY-6C 型电泳仪购自北京市六一仪器厂;TGL-16 冷冻离心机购自湖南湘仪仪器厂;基因扩增仪 TC-XP 型 PCR 仪购自杭州博日科技公司;StepOne™ Real-Time PCR System 型荧光定量 PCR 仪购自 Life Technologies 公司。

1.3 模型建立

35 只 C57BL/6 小鼠适应性喂养 7 d,按随机数表法分为正常(N)组(7 只)和糖尿病模型组(28 只)。禁食 12 h,造模组小鼠腹腔注射 1% STZ 80 mg/kg, N 组小鼠予以等体积柠檬酸钠缓冲液代替,每天 1 次,连续 3 d。2 周后取尾静脉血测随机血糖,大于 16.7 mmol/L 视为 1 型糖尿病造模成功的

标准。成模后糖尿病模型组随机分为糖尿病(DM)组、柚皮素低剂量(DM+LN)组、柚皮素中剂量(DM+MN)组、柚皮素高剂量(DM+HN)组,每组 7 只。随后各柚皮素干预组分别给予 25 mg/kg、50 mg/kg、75 mg/kg 柚皮素混悬液灌胃,N 组及 DCM 组给予 DM+MN 组等体积生理盐水灌胃,每天 1 次,普通饲料喂养 8 周。记录末次体质量及血糖后,予以 1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉小鼠,取出心脏保存。

1.4 主要方法

1.4.1 组织标本检测 将取出的心肌组织置入 4%多聚甲醛溶液中固定,制作成厚 4 μm 的石蜡切片。HE 染色观察心肌细胞形态及结构改变,Masson 染色观察心肌间质纤维化程度并计算心肌胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF),TUNEL 荧光染色观察心肌细胞凋亡。

1.4.2 Western blot 测定蛋白水平 心肌组织用预冷的 PBS 缓冲液漂洗 2 或 3 次,去除血污,剪成小块置于匀浆器中,加入组织蛋白提取试剂,冰浴彻底匀浆;于离心管中震荡匀浆液;冰浴 30 min,同时用移液器反复吹打以裂解匀浆液;4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 5 min,收集上清液;使用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒测定样品蛋白浓度,保证每个样品总蛋白上样量均为 40 μg ;在蛋白样品中加入适量 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液,95~100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水浴 5 min;配 8%、10%、12%、15%、18%、20%分离胶和 5%浓缩胶,进行电泳分离;转 PVDF 膜,将转好的膜加入封闭液室温封闭 1 h;除去封闭液,根据抗体说明书加入稀释后的一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;TBST 洗膜 3 次,每次 5 min;加入稀释好的二抗,室温孵育 30 min,用 TBST 在室温下摇床上洗 4 次,每次 5 min;滴加新鲜配制的 ECL 混合溶液(A:B=1:1)到膜的蛋白面侧,暗室中曝光;根据不同光强度调整曝光条件,显影、定影,用 AlphaEaseFC 软件处理系统分析目标带的光密度值。

1.4.3 实时荧光定量 PCR 测定基因表达 取约 100 mg 组织于 1 mL 预冷的 TRIpure 中充分研磨,并用三氯甲烷与异丙醇进行 RNA 提取。采用 EntiLink™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒进行 cDNA 合成。实时荧光定量 PCR 是在 Life Technologies 公司的 StepOne™ Real-Time PCR 仪上完成,每个样品均做 3 个复孔,使用 EnTurbo™ SYBR Green PCR Super-Mix 试剂盒进行,反应体系包括 2 $\times$ Master Mix 10.0 μL ;引物工作液(2.5 $\mu\text{mol/L}$)1.0 μL ;Template 1.0 μL ;ddH₂O 2.0 μL ;Rox 1.0 μL ,引物序列见表 1。

1.5 统计学处理

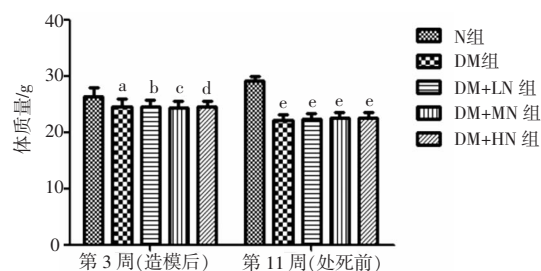
所有资料使用 SPSS 17.0 统计软件进行处理。所得到的

数值以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多样本均数间的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

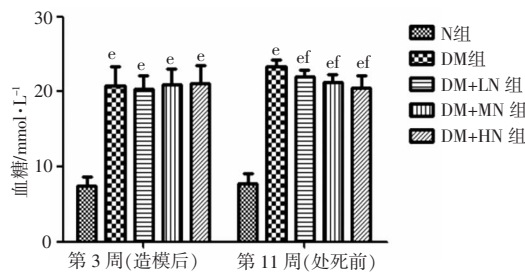
2 结果

2.1 NAR 对小鼠一般体征、体质量及血糖的影响

N 组小鼠精神状态良好,反应灵敏,毛发干燥,色泽黝黑,进食、饮水等均正常,体质量逐渐增加。DM 组小鼠精神萎靡,体型消瘦,毛发稍湿润,有多饮、多食、多尿等症状;DM 组小鼠[(23.4 $\pm$ 0.9) mmol/L]与 N 组[(7.7 $\pm$ 1.4) mmol/L]相比,血糖明显升高($P=0.000$);DM 组小鼠[(22.2 $\pm$ 0.9) g]与 N 组[(29.1 $\pm$ 0.9) g]相比,体质量降低($P=0.000$)。各 NAR 干预组小鼠精神状态良好,但体型消瘦,毛发稍湿润,三多一少症状较 DM 组无明显改善;DM+LN 组、DM+MN 组、DM+HN 组血糖分别为(22.0 $\pm$ 0.9) mmol/L、(21.3 $\pm$ 1.0) mmol/L、(20.5 $\pm$ 1.6) mmol/L,均较 DM 组的(23.4 $\pm$ 0.9) mmol/L 下降($P=0.035$ 、0.003、0.000),但体质量差异无统计学意义;随 NAR 剂量增加血糖有下降趋势,但无统计学意义(图 1)。



A. 各组小鼠体质量变化



B. 各组小鼠血糖变化

注:a,与 N 组比较, $P=0.013$;b,与 N 组比较, $P=0.009$;c,与 N 组比较, $P=0.004$;d,与 N 组比较, $P=0.012$;e,与 N 组比较, $P=0.000$;f,与 DM 组比较, $P=0.000$

图 1 各组小鼠体质量及血糖的变化 ($n=7, \bar{x}\pm s$)

表 1 引物序列

基因名称	上游序列	下游序列	引物长度/bp
<i>GAPDH</i>	TGAAGGGTGGAGCCAAAAG	ACTCTTCTGGGTGGCAGTGAT	227
<i>NLRP3</i>	TCTCAAGTCTAAGCACCAACCG	CGAAGCAGCATTGATGGGAC	165
<i>Caspase-1</i>	AGGGAATATGTGGGACCACATAC	CTGAATCTTTTAACAACACCACTC	174
<i>ASC</i>	CAATGACTGTGCTTAGACACATG	ACTTCTGTGACCCTGGCAATG	175
<i>IL-1β</i>	GGGGCCTCAAAGGAAAGAATCT	GAGGTGCTGATGTACCAGTTGG	195

2.2 NAR 对心肌纤维化的影响

2.2.1 HE 染色 N 组心肌纤维染色均匀,排列整齐,走行正常,轮廓清晰,细胞核位于细胞中央,细胞间隙正常;而 DM 组心肌纤维着色不均,排列紊乱,轮廓模糊,细胞核散乱分布,可见细胞水肿、肥大;各 NAR 干预组心肌纤维排列较整齐,轮廓大致清晰,细胞水肿、肥大较 DM 组明显改善(图 2)。

2.2.2 Masson 染色 N 组小鼠可见极少量的胶原纤维沉积;

而 DM 组小鼠可见大量胶原纤维沉积;各 NAR 干预组胶原纤维分布较 DM 组明显减少。进一步行 CVF 分析,DM 组 CVF $[(37.69 \pm 1.14)\%]$ 较 N 组 $[(2.44 \pm 0.46)\%]$ 明显增大($P=0.000$);DM+LN 组、DM+MN 组、DM+HN 组 CVF 分别为 $(13.58 \pm 0.86)\%$ 、 $(9.50 \pm 0.59)\%$ 、 $(6.38 \pm 1.41)\%$,较 DM 组的 $(37.69 \pm 1.14)\%$ 均下降(均 $P=0.000$);且随 NAR 剂量增加,各 NAR 干预组 CVF 依次减少($P=0.000$ 、 0.000 、 0.003) (图3)。

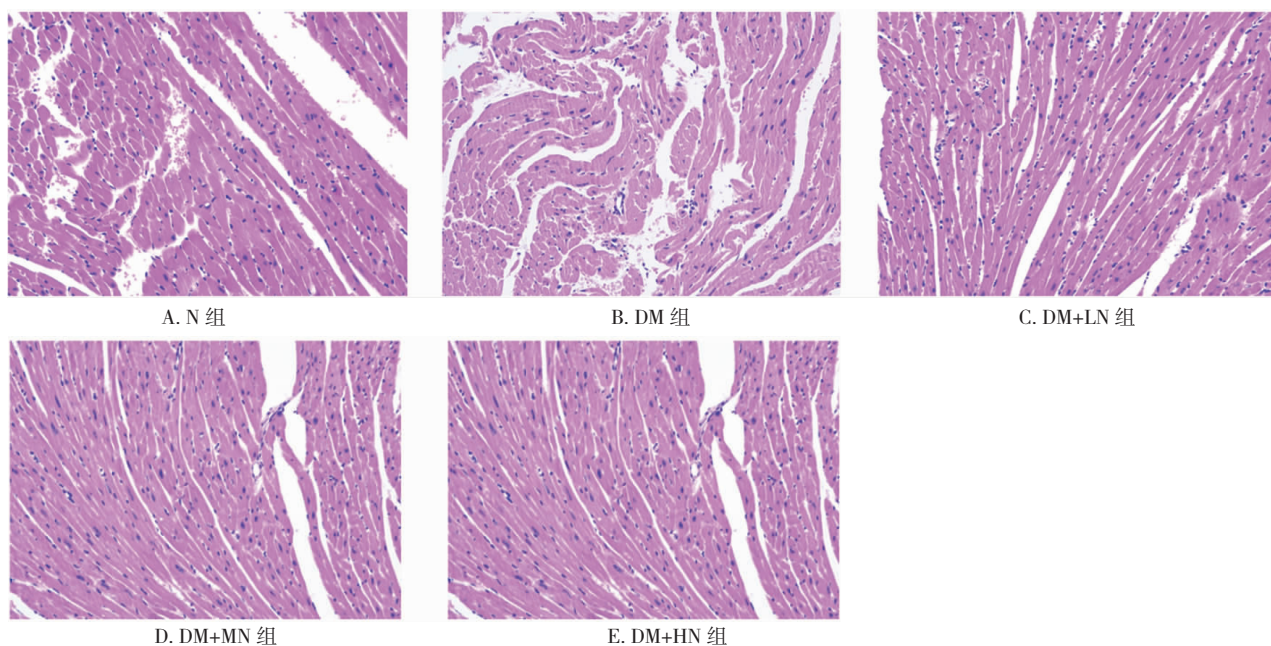


图 2 各组小鼠 HE 染色 (200 ×)

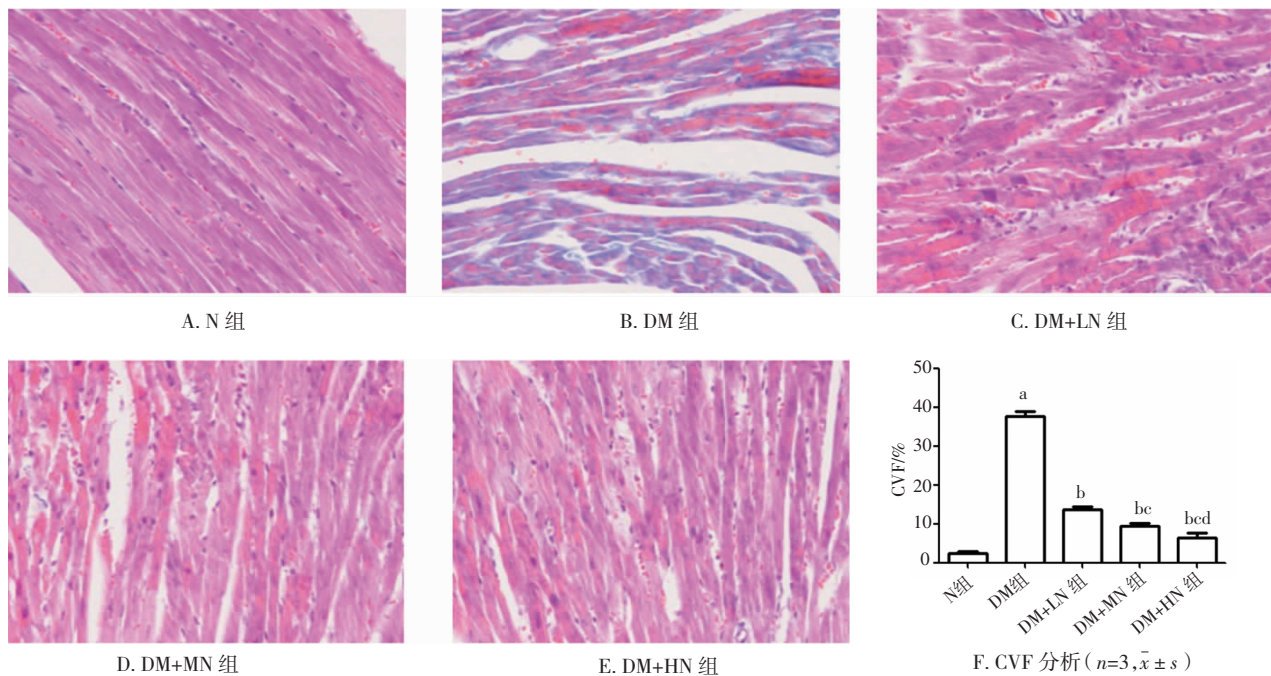


图 3 各组小鼠 Masson 染色结果 (400 ×) 及 CVF 分析

2.3 NAR 对心肌细胞凋亡的影响

TUNEL 观察心肌细胞凋亡情况可见 N 组心肌组织仅有少量的凋亡细胞;与 N 组 $(0.41 \pm 0.06)\%$ 相比,DM 组 $(64.94 \pm 5.25)\%$ 的心肌凋亡细胞明显增多($P=0.000$);DM+LN 组、DM+MN 组、DM+HN 组心肌细胞凋亡率分别为 $(48.80 \pm 6.11)\%$ 、 $(31.85 \pm 4.44)\%$ 、 $(13.64 \pm 1.79)\%$,较 DM 组的 $(64.94 \pm 5.25)\%$ 明显减少($P=0.001, 0.000, 0.000$),且随 NAR 剂量增加,各 NAR 干预组凋亡细胞随之减少($P=0.001, 0.001, 0.000$) (图4)。

2.4 Western blot 测定小鼠心脏组织 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 、I 型胶原蛋白、FN 蛋白水平

与 N 组相比,DM 组小鼠心肌组织中 NLRP3 炎症小体

蛋白(NLRP3、ASC 和 Caspase-1)、IL-1 β 及 I 型胶原蛋白、FN 蛋白表达水平明显升高(均 $P=0.000$);各 NAR 干预组小鼠 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 、I 型胶原蛋白、FN 蛋白水平均较 DM 组下降(表 2、图 5)。

2.5 PCR 测定小鼠心脏组织 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β mRNA 表达

与 N 组相比,DM 组小鼠心肌组织中 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1*、*IL-1 β* mRNA 表达均明显上调(均 $P=0.000$);各 NAR 干预组小鼠 *NLRP3*、*ASC*、*Caspase-1*、*IL-1 β* mRNA 较 DM 组下调(均 $P=0.000$) (表 3)。

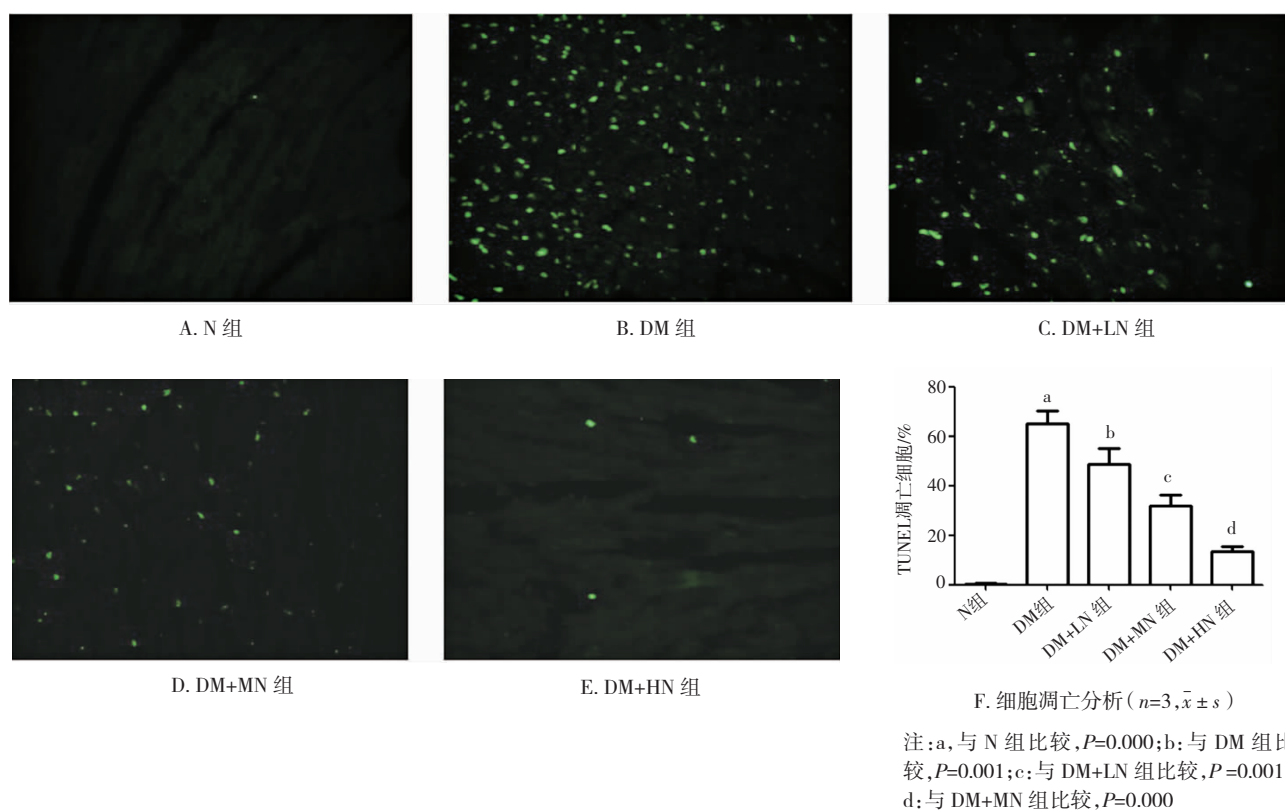


图 4 各组小鼠心肌 TUNEL 染色结果 (400 ×)

表 2 各组中 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 、I 型胶原蛋白、FN 的蛋白表达水平 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	NLRP3	ASC	Caspase-1	IL-1 β	Collagen I	FN
N组	0.10 ± 0.02	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01
DM组	0.52 ± 0.03 ^a	0.45 ± 0.05 ^d	0.47 ± 0.03 ^f	0.70 ± 0.09 ^h	0.60 ± 0.02 ^j	0.64 ± 0.01 ^l
DM+LN组	0.33 ± 0.07 ^b	0.22 ± 0.02 ^e	0.21 ± 0.01 ^g	0.42 ± 0.09 ⁱ	0.39 ± 0.03 ^k	0.35 ± 0.04 ^m
DM+MN组	0.23 ± 0.06 ^c	0.11 ± 0.03 ^e	0.13 ± 0.01 ^g	0.25 ± 0.04 ^j	0.21 ± 0.03 ^k	0.19 ± 0.01 ^m
DM+HN组	0.15 ± 0.14 ^c	0.06 ± 0.00 ^e	0.07 ± 0.00 ^g	0.10 ± 0.03 ^j	0.10 ± 0.02 ^k	0.11 ± 0.01 ^m
F 值	35.123	118.042	423.946	54.976	253.613	472.427
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,与 N 组比较 $P=0.000$;b:与 DM 组比较, $P=0.001$;c:与 DM 组比较, $P=0.000$;d:与 N 组比较, $P=0.000$;e:与 DM 组比较, $P=0.000$;f:与 N 组比较, $P=0.000$;g:与 DM 组比较, $P=0.000$;h:与 N 组比较, $P=0.000$;i:与 DM 组比较, $P=0.000$;j:与 N 组比较, $P=0.000$;k:与 DM 组比较, $P=0.000$;l:与 N 组比较, $P=0.000$;m:与 DM 组比较, $P=0.000$

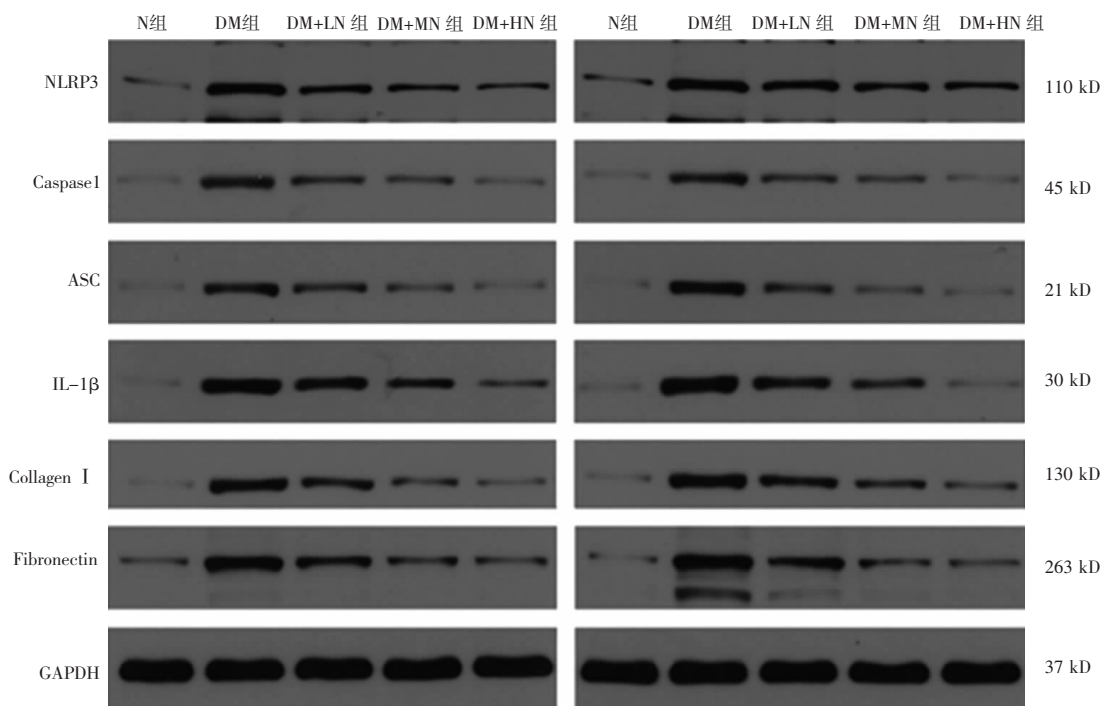


图 5 Western blot 检测各组小鼠心脏组织 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 、I 型胶原蛋白、FN 蛋白的表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

表 3 各组小鼠心脏组织 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β mRNA 表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	NLRP3($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	ASC($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	Caspase-1($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	IL-1 β ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)
N组	1.07 $\pm$ 0.08	1.03 $\pm$ 0.12	1.03 $\pm$ 0.03	1.02 $\pm$ 0.03
DM组	4.38 $\pm$ 0.14 ^a	4.33 $\pm$ 0.12 ^c	4.79 $\pm$ 0.17 ^e	4.46 $\pm$ 0.06 ^e
DM+LN组	3.16 $\pm$ 0.07 ^b	3.11 $\pm$ 0.15 ^d	3.37 $\pm$ 0.13 ^f	3.00 $\pm$ 0.07 ^h
DM+MN组	2.11 $\pm$ 0.14 ^b	2.28 $\pm$ 0.06 ^d	2.58 $\pm$ 0.15 ^f	2.59 $\pm$ 0.29 ^h
DM+HN组	1.71 $\pm$ 0.08 ^b	1.62 $\pm$ 0.06 ^d	1.38 $\pm$ 0.10 ^f	1.45 $\pm$ 0.13 ^h
F 值	451.853	433.716	458.784	256.760
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,与 N 组比较, $P=0.000$;b,与 DM 组比较, $P=0.000$;c,与 N 组比较, $P=0.000$;d,与 DM 组比较, $P=0.000$;e,与 N 组比较, $P=0.000$;f,与 DM 组比较, $P=0.000$;g,与 N 组比较, $P=0.000$;h,与 DM 组比较, $P=0.000$

3 讨论

DCM的病理特点包括心肌间质纤维化、心肌细胞凋亡、心肌细胞肥大等^[14-15],最终导致心肌重构。其临床特征为舒张功能障碍,晚期也可出现收缩功能障碍。目前对 DCM 尚无有效治疗手段,其基本治疗原则是积极控制血糖,并根据个体差异增加他汀类药物、ACEI/ARB 类药物、 β 受体阻滞剂等发挥心肌保护作用。目前针对 DCM 的靶基因、关键分子受体、细胞因子及机制的药物研究也陆续成为研究热点。研究表明,NLRP3 炎性小体活化具有感知代谢紊乱、启动稳态调节程序等积极作用,然而机体在

受到高血糖刺激会过度活化 NLRP3 炎症小体^[16]。NLRP3 寡聚化与 ASC 作用后,募集 pro-Caspase-1,激活 Caspase-1,然后活化 IL-1 β 前体(pro-interleukin-1 β)和 IL-18 前体(pro-interleukin-18)产生 IL-1 β 和 IL-18,从而产生炎症反应促进心肌重构,推动 DCM 病程。因此,抑制 NLRP3 炎性小体活化,减轻炎症反应,能明显改善糖尿病对心肌的重构作用。NAR 作为一种二氢黄酮类化合物,其抗炎、抗凋亡作用被多次报道。许爱斌等^[17]研究发现,NAR 可以改善大鼠心肌缺血再灌注损伤后的炎症反应,进而减轻心肌损伤。魏文迎等^[18]研究发现,NAR 可以减轻心肌细胞凋亡,改善 Ang II 引起的心肌细胞肥大。故本实验通过连续腹腔注射 STZ 建立 1 型糖尿

病小鼠模型,并在其成模后予以不同剂量的 NAR 干预,以研究 NAR 能否通过抑制 NLRP3 炎症小体活化从而抑制心肌重构,改善糖尿病的心肌损伤。

本实验中,28 只糖尿病模型组小鼠通过连续 3 d 注射 STZ 破坏胰岛 β 细胞后最终均成功建模。实验结果表明,糖尿病小鼠心肌 I 型胶原蛋白、FN 大量堆积,病理切片也发现其纤维化严重;予以不同剂量 NAR 干预后, I 型胶原蛋白、FN 下调,心肌间质纤维化改善,表明 NAR 可以改善糖尿病小鼠心肌纤维化;TUNEL 检测心肌细胞凋亡发现,经 NAR 干预后,糖尿病小鼠心肌细胞凋亡明显改善。Western blot 及 PCR 检测可以发现 NAR 能下调糖尿病小鼠心肌的 NLRP3 炎症小体蛋白(NLRP3、ASC 和 Caspase-1)和 IL-1 β ,表明 NAR 可以减轻糖尿病小鼠心肌的炎症反应,且同时伴有心肌重构的减轻。这说明 NAR 可能通过抑制炎症反应,从而减少心肌细胞凋亡,改善心肌纤维化,但 NAR 对糖尿病小鼠有一定的降血糖作用,不排除其通过降糖作用改善心肌损伤,故需进一步行离体细胞实验证实。同时,随着 NAR 剂量的增加,其抗纤维化、抗凋亡作用越强;NLRP3 炎症小体蛋白、IL-1 β 的表达也随着柚皮素剂量增加而减少,说明柚皮素改善心肌重构的作用存在剂量依赖性。由于本实验未设置足够的剂量梯度,尚不能证实 NAR 的最佳剂量、药物副作用等,需进一步改善。

综上所述,NAR 可以减少心肌细胞凋亡、改善心肌纤维化,从而抑制心肌重构。其保护作用可能与抑制 NLRP3 炎症小体激活、减轻炎症反应有关。鉴于目前 DCM 的发病机制尚未完全阐明,对 DCM 尚无有效的治疗手段,阐明 NAR 对 DCM 的作用机制可以为 DCM 的临床干预提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Hamby RI, Zoneraich S, Sherman L. Diabetic cardiomyopathy[J]. JAMA, 1974, 229(13): 1749-1754.
- [2] Jia G, Whaley-Connell A, Sowers JR. Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia- and insulin-resistance-induced heart disease[J]. Diabetologia, 2018, 61(1): 21-28.
- [3] Lai D, Gao J, Bi X, et al. Erratum to: the Rho kinase inhibitor, fasudil, ameliorates diabetes-induced cardiac dysfunction by improving calcium clearance and actin remodeling[J]. J Mol Med (Berl), 2017, 95(2): 167.
- [4] Guan S, Ma Z, Wu Y, et al. Long-term administration of fasudil improves cardiomyopathy in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50(6): 1874-1882.
- [5] Mishra PK, Ying W, Nandi SS, et al. Diabetic cardiomyopathy: an immunometabolic perspective[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2017, 8: 72.
- [6] Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, et al. Inflammasomes in health and disease[J]. Nature, 2012, 481(7381): 278-286.
- [7] Luo B, Li B, Wang W, et al. NLRP3 gene silencing ameliorates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetes rat model[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104771.
- [8] Zhang N, Yang Z, Yuan Y, et al. Naringenin attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy[J]. Exp Ther Med, 2015, 10(6): 2206-2212.
- [9] Tang JY, Jin P, He Q, et al. Naringenin ameliorates hypoxia/reoxygenation-induced endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in H9c2 myocardial cells; involvement in ATF6, IRE1 α and PERK signaling activation[J]. Mol Cell Biochem, 2017, 424(1-2): 111-122.
- [10] 曾梦雅, 王 燕, 李伍夫, 等. 柚皮素与代谢综合征的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(10): 1055-1058.
- [11] 郑 梅, 胡文兰, 阴 英, 等. 柚皮素减轻重症急性胰腺炎小鼠心肌损伤[J]. 基础医学与临床, 2019, 39(2): 213-217.
- [12] Zhang J, Qiu H, Huang J, et al. Naringenin exhibits the protective effect on cardiac hypertrophy via EETs-PPARs activation in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 502(1): 55-61.
- [13] You Q, Wu Z, Wu B, et al. Naringin protects cardiomyocytes against hyperglycemia-induced injuries *in vitro* and *in vivo*[J]. J Endocrinol, 2016, 230(2): 197-214.
- [14] Guleria RS, Choudhary R, Tanaka T, et al. Retinoic acid receptor-mediated signaling protects cardiomyocytes from hyperglycemia induced apoptosis; role of the renin-angiotensin system[J]. J Cell Physiol, 2011, 126(5): 1292-1307.
- [15] 李凯峰, 翟蒙恩, 宋 凡, 等. 糖尿病心脏中血管损伤病理特征的研究[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2018, 48(6): 776-782.
- [16] Zhang W, Xu X, Kao R, et al. Cardiac fibroblasts contribute to myocardial dysfunction in mice with sepsis: the role of NLRP3 inflammasome activation[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e107639.
- [17] 许爱斌, 王 飞, 李俊峡, 等. 柚皮素预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2013, 5(4): 416-418.
- [18] 魏文迎, 徐斯驰, 袁雨培, 等. 柚皮素减轻 Ang II 诱导的原代大鼠心肌细胞肥大作用[J]. 武汉大学学报(医学版), 2017, 38(5): 708-712.

(责任编辑: 冉明会)