



姜黄素对糖尿病心肌病大鼠心脏的保护作用及机制研究

陈 洁

(武汉职业技术学院 生物工程学院,湖北 武汉 430074)

摘 要:探讨姜黄素对糖尿病心肌病(DCM)大鼠心肌组织损伤的保护作用及其可能的机制。方法:50只SPF级健康雄性SD大鼠随机选取10只作为空白对照组,其余复制糖尿病心肌病模型。将造模成功的大鼠随机分为模型组、姜黄素低剂量组、姜黄素高剂量组。连续给药4周后,给大鼠做超声心电图、HE和Masson染色检测心肌纤维化程度;生化检测血脂血糖;Western blot检测心肌组织中PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 和CYP2J2蛋白表达。结果:与空白对照组相比,模型组大鼠血糖血脂指标明显升高,心脏收缩功能降低,HE染色显示心肌细胞肥大,Masson染色显示心肌胶原纤维明显增多,PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 和CYP2J2蛋白表达减少($P<0.05$)。与模型组比较,姜黄素可明显改善DCM大鼠血糖血脂水平,使心脏收缩功能显著提高,心肌细胞形态恢复,胶原纤维沉积减少,PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 和CYP2J2蛋白明显升高($P<0.05$)。结论:姜黄素可以改善糖尿病心肌病大鼠心肌损伤,其分子机制可能与其激活心肌CYP2J2/PPARs信号通路有关。

关键词:姜黄素;糖尿病心肌病;信号通路;心肌保护

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1671-931X(2023)06-0110-07

DOI:10.19899/j.cnki.42-1669/Z.2023.06.017

糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)是糖尿病最常见的慢性并发症之一,与糖尿病患者心力衰竭的发生密切相关。据统计,大约12%糖尿病患者晚期会出现心肌结构和功能的异常,即出现心肌纤维化和心功能障碍,但这种改变并不受高血压、高血脂、心脏瓣膜病及冠状动脉粥样硬化性心脏病等诸多心血管危险因素的影响^[1]。对于这种特殊形式的心脏病,目前其病理生理机制仍不清楚,临床上

尚无有效的治疗方法来缓解。

姜黄素(curcumin, CUR)是一种从多年生草本植物姜黄中分离出来的天然多酚类化合物,是姜黄的主要活性成分,具有降血糖、抗氧化、调脂、抗病毒、抗感染、抗肿瘤等广泛的药理活性。研究发现, CUR对压力超载诱导的心肌肥厚有保护作用^[2],但 CUR对糖尿病心肌病的作用及可能机制的相关研究知之甚少。近年发现,多酚类化合物的生物作用多与

收稿日期:2023-11-12

基金项目:2022年湖北省教育厅科学研究计划指导性项目“姜黄素基于PPARs信号通路干预糖尿病心肌肥厚的分子机制研究”(项目编号:B2022518)。

作者简介:陈洁(1980—),女,湖北武汉人,武汉职业技术学院生物工程学院副教授,研究方向:生化及分子药理。

其诱导或抑制 CYP 的活性有关,而 CYP2J2 可通过激活 PPAR γ 实现对 AngII 诱导的心脏重构的保护作用^[3]。另外,研究显示, CUR 与 PPARs 两个受体亚型都有亲和力 and 内在活性,可能是一个 PPAR 泛激动剂^[4]。因此,本研究在建立小鼠糖尿病心肌病模型基础上采用具有降糖作用的 CUR 进行治疗干预,观察 CUR 对糖尿病心肌病的保护作用及基于 PPARs 的可能分子机制,以探索治疗 DCM 的有效药物和新的作用靶点。

一、材料与方法

(一) 实验材料

1. 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,6 周龄,体质量 (180 ± 20)g,由湖北省疾病预防控制中心提供,许可证号:SYXK(鄂)2017-0065。大鼠在温度(23 ± 2)℃、相对湿度(50 ± 10)%、自然采光条件下,标准饲料喂养 7d 进行实验。

2. 试剂与仪器

姜黄素购自美国 R&D Systems 公司;链脲佐菌素(STZ)购自美国 Sigma 公司;总胆固醇(TCH)测定试剂盒、甘油三酯(TG)测定试剂盒、胰岛素检测试剂盒和糖化血红蛋白(HbA1c)测定试剂盒购自南京建成;PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 和 β -actin 抗体购自美国 Proteintech 公司。电子天平(上海方瑞仪器有限公司,型号:FA2104);台式低温离心机(美国 Thermo 公司,型号:ST8);超声显像仪(德国西门子公司,型号:SEQUOIA512)。

(二) 实验方法

1. 动物模型制备及分组处理

50 只 SD 大鼠随机选取 10 只作为空白对照组,其余给予高糖高脂饲料(20% 蔗糖、10% 猪油、3% 胆固醇、1% 胆盐和 66% 基础饲料)混合喂养 4 周后,按 40mg/kg 体质量连续 3 天腹腔注射 STZ(溶于 0.1% 柠檬酸缓冲液, pH4.5, 临用前配制)。7d 后尾部取血测空腹血糖(FBG),FBG ≥ 16.7 mmol/L 视为糖尿病模型造模成功。继续给予糖尿病小鼠高糖高脂饲料喂养 8 周,随机选取 2 只大鼠处死,对心肌组织进行 HE 及 Masson 染色,观察心肌细胞形态改变,如出现心肌排列紊乱、细胞肥大、心肌纤维化等变化,则说明大鼠心肌受损,糖尿病心肌病模型造模成功。取 30 只成模大鼠,随机分为 3 组:模型组、姜黄素低剂量组、姜黄素高剂量组。姜黄素低、高剂量组分别按

照 100、200mg/kg 剂量灌胃给药姜黄素;空白对照组及模型组均等体积灌胃生理盐水,1 次/d,共 4 周。

2. 样本收集

给药结束后,用小动物超声仪检测各组大鼠心脏功能;称重后颈动脉采血并处死大鼠,血液室温静置 1h, 3000r/min 离心 10min,取上清液于 -20℃ 冰箱保存待用;快速分离大鼠心脏并用生理盐水灌注,用滤纸吸干水分后分离心室称重;取部分心肌组织置于 4% 多聚甲醛中固定,剩余心肌组织放入 -80℃ 冰箱保存待用。

3. 心功能检测

末次给药后对大鼠进行超声心电图检查。大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛溶液进行麻醉,胸部脱毛备皮,仰卧位固定于操作台上,用小动物超声仪进行 M 型超声检查,检测左心室短轴缩短率(Left Ventricular Fractional Shortening, LVFS)和左心室射血分数(Left Ventricular Ejection Fraction, LVEF)两项指标用于评价大鼠心脏功能。

4. 生化指标检测

取出血清,按照试剂盒说明书操作,分别检测空腹血糖(FBG)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、胰岛素(INS)和糖化血红蛋白(HbA1c)血清水平。

5. 心肌肥厚指标测定

小鼠称重后处死,立即取出心脏并分离左心室,分别测量心脏的全心质量及左心室质量,计算心肌肥厚指数 HMI(heart mass index)和左心室质量指数 LVMI(left ventricular mass index)。

$HMI = \text{全心质量} / \text{体质量}(\text{mg/g})$

$LVMI = \text{左心室质量} / \text{体质量}(\text{mg/g})$

6. 心肌组织病理学检查

将新鲜的左心室组织用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,脱蜡,梯度乙醇脱水,苏木精-伊红(Hematoxylin Eosin, HE)染色,透明,中性树胶封片,显微镜下观察心肌病理改变情况,拍照。

心肌组织石蜡包埋、切片、脱蜡至水,铬化处理,用 Regaud 苏木精染液染色,充分洗涤,盐酸乙醇分化后用 Masson 丽春红酸性复红液染色,洗涤分化,用苯胺蓝复染后梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固,显微镜下观察心肌胶原的沉积情况、心肌纤维化程度。

7. Western blot 检测心肌组织 PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 和 CYP2J2 蛋白表达

提取心肌组织的总蛋白,BCA 法进行蛋白定

量。取 50 μ g 总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,电泳结束后切胶转膜,将蛋白转移到 PVDF 膜上后,5% 脱脂奶粉室温封闭 2h,加入 anti-PPAR α (1 : 1000)、anti-PPAR β (1 : 1000)、anti-PPAR γ (1 : 1000)、anti-CYP2J2 (1 : 1000)、anti- β -actin (1 : 2000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;加 HRP 标记的二抗 (1 : 2000) 室温孵育 1h,用 ECL 发光液显影,Bio-Rad 成像系统成像,ImageJ 软件分析蛋白条带灰度值。

(三) 统计学方法

实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 23.0 统计软件进行分析。各组间比较用单

因素方差分析进行检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

(一) CUR 对 DCM 大鼠血糖和血脂的影响

与空白对照组相比,模型组大鼠除 INS 含量明显降低外($P < 0.01$),FBG、HbA1c、TG 和 TC 水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比,给予姜黄素不同剂量可明显改善糖尿病心脏病大鼠上述指标($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠 INS、HOME.IR、HbA1c、TG 和 TC 水平的变化($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	INS(mIU/L)	FBG(mmol/L)	HbA1c(%)	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)
空白对照组	85.2 \pm 7.1	4.9 \pm 0.9	24.9 \pm 3.9	0.7 \pm 0.2	1.8 \pm 0.5
模型组	52.3 \pm 5.1 ^{##}	18.6 \pm 2.5 ^{##}	45.1 \pm 3.1 ^{##}	3.5 \pm 0.5 ^{##}	6.2 \pm 1.0 ^{##}
姜黄素低剂量组	69.2 \pm 6.0*	9.1 \pm 1.9**	35.1 \pm 2.6*	2.4 \pm 0.3*	4.0 \pm 0.8*
姜黄素高剂量组	82.3 \pm 8.2**	6.5 \pm 1.1**	26.2 \pm 3.2**	1.0 \pm 0.4**	2.9 \pm 0.3**

注:与空白对照组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

(二) CUR 对 DCM 大鼠心肌肥厚及心脏功能的影响

糖尿病心脏病形成 4 周后,与空白对照组比较,模型组大鼠 LVMI、HMI 均明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,给予姜黄素不同剂量后,大鼠 LVMI、HMI

显著降低($P < 0.05$)。超声仪检测结果显示,与空白对照组比较,模型组大鼠 LVEF、LVFS 明显降低($P < 0.05$),说明大鼠心脏收缩功能显著下降。给予姜黄素不同剂量干预后,与模型组比较,大鼠心脏收缩功能显著提高($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠心肌肥厚指标及心脏超声检测结果比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	LVMI(mg/g)	HMI(mg/g)	LVEF(%)	LVFS(%)
空白对照组	3.0 \pm 0.3	4.1 \pm 0.2	75.6 \pm 10.2	34.3 \pm 6.5
模型组	5.5 \pm 0.5 ^{##}	6.5 \pm 0.5 ^{##}	48.3 \pm 8.7 ^{##}	24.9 \pm 4.4 ^{##}
姜黄素低剂量组	4.0 \pm 0.3*	5.1 \pm 0.4*	59.6 \pm 5.2*	28.8 \pm 5.0
姜黄素高剂量组	3.6 \pm 0.2**	4.8 \pm 0.5**	62.1 \pm 7.4*	32.5 \pm 6.1**

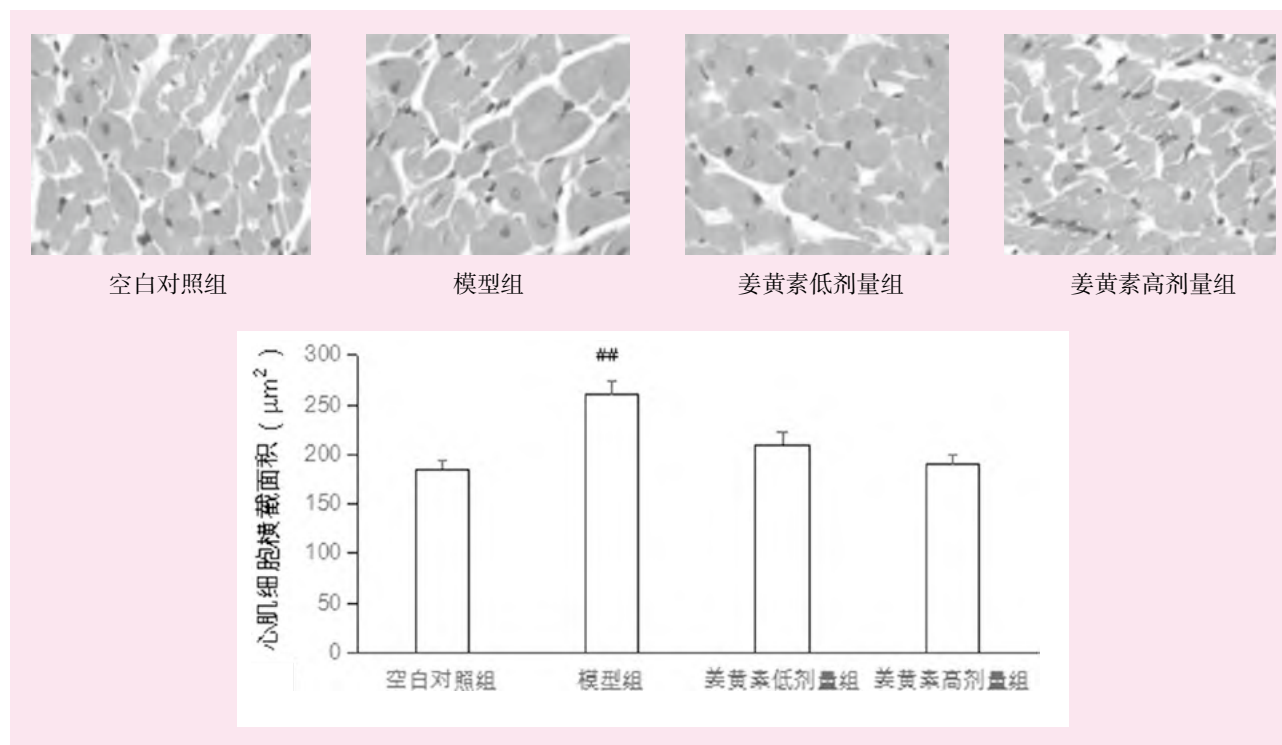
注:与空白对照组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

(三) CUR 对 DCM 大鼠心肌组织病理学的影响

HE 染色显示,与空白对照组相比,模型组大鼠心肌细胞肥大、排列紊乱、有大量炎性细胞浸润,且有心肌纤维断裂、溶解等情况,心肌细胞横截面积明

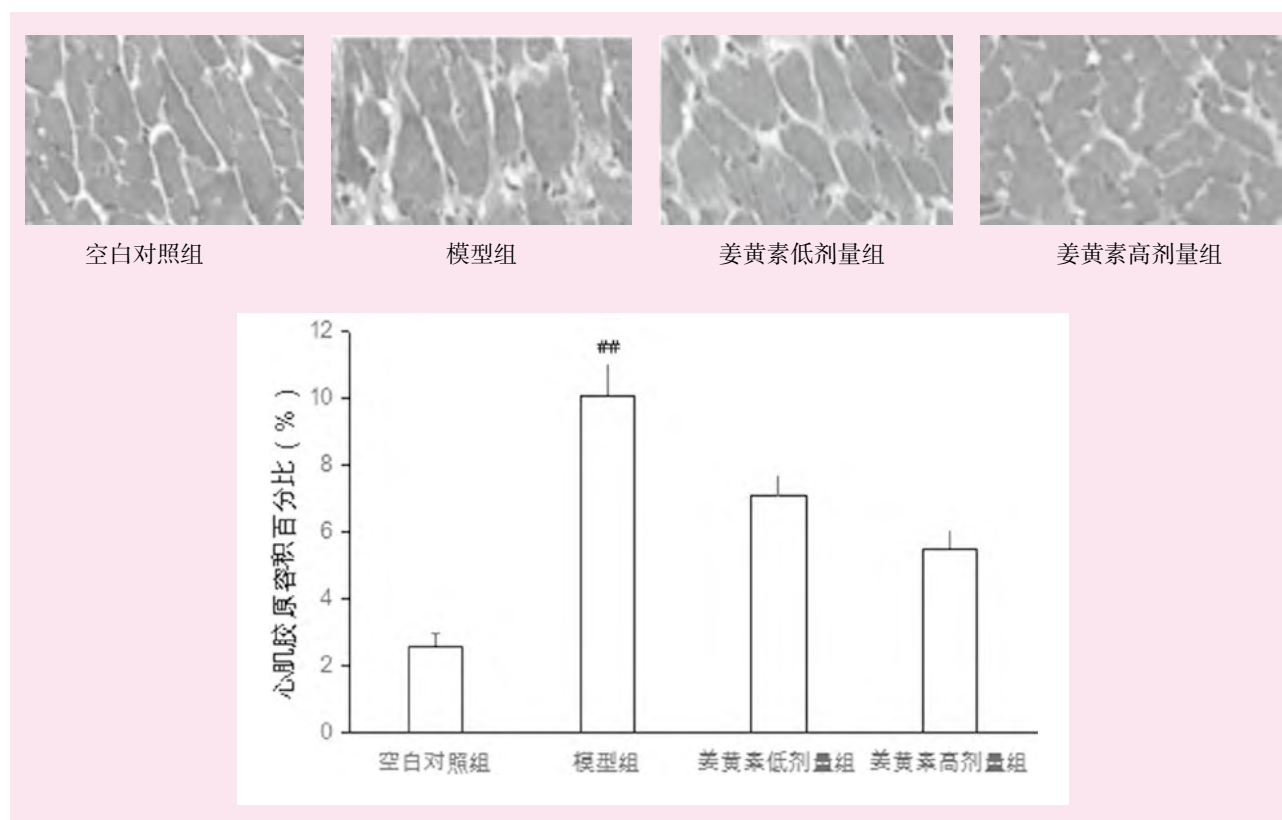
显增大($P < 0.05$);与模型组比较,给予姜黄素干预后大鼠的心肌细胞横截面积明显缩小(图 1)。Masson 染色显示,与空白对照组相比,模型组大鼠心肌组织可见大量胶原纤维沉积,排列紊乱、胶原容积百分比(CVF)增加($P < 0.01$);与模型组比较,姜黄素低、

高剂量组心肌纤维化程度明显改善,细胞形态尚可 (如图 2)。



注:与空白对照组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

图 1 HE 染色及各组大鼠心肌细胞横截面积比较



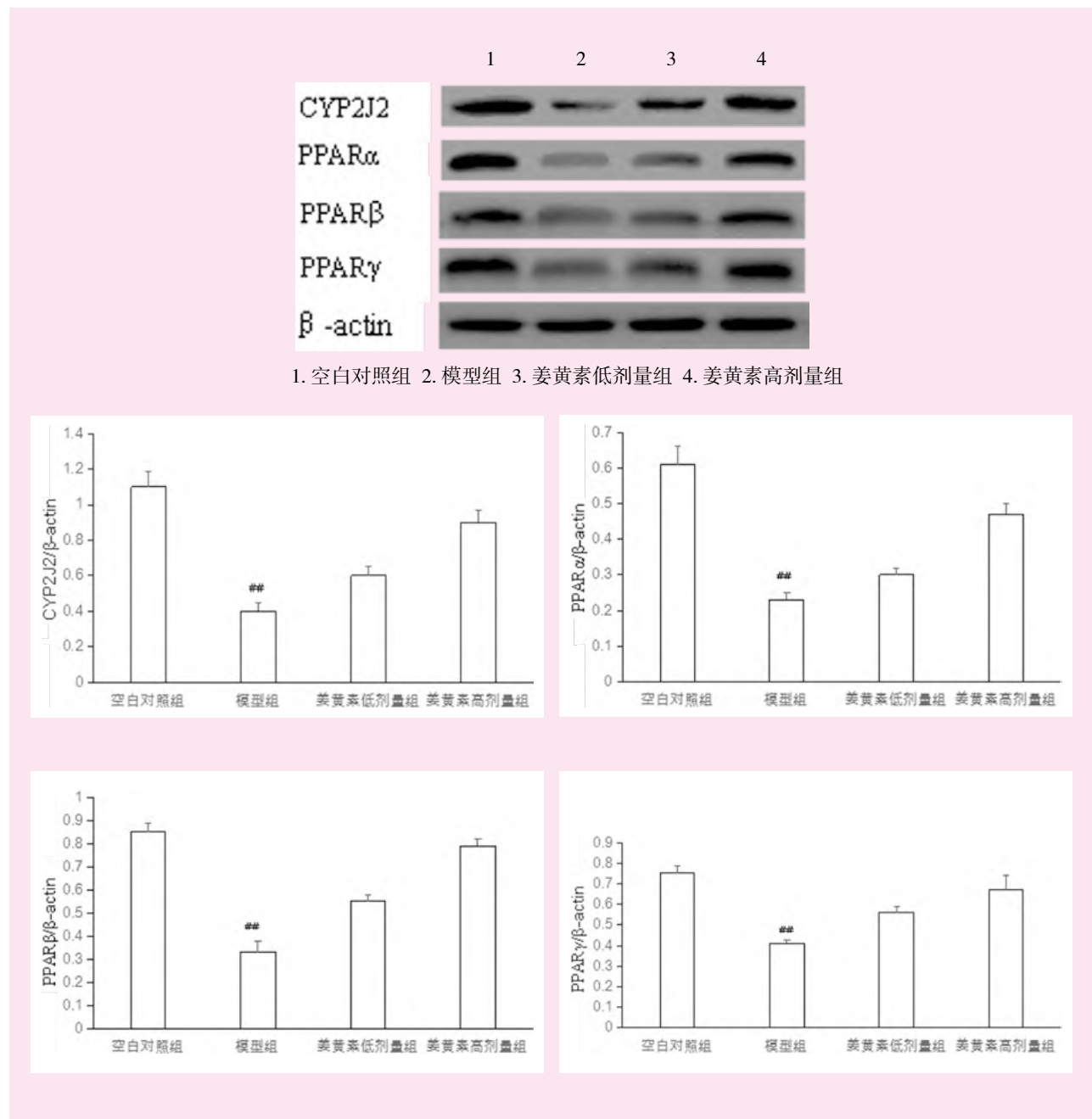
注:与空白对照组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

图 2 Masson 染色及各组大鼠心肌胶原沉积情况

(四)CUR 对 DCM 大鼠心肌 CYP2J2、PPAR α 、PPAR β 和 PPAR γ 蛋白表达的影响

与空白对照组相比,模型组大鼠心肌 CYP2J2、PPAR α 、PPAR β 和 PPAR γ 的蛋白水平明显降低

($P < 0.05$);与模型组比较,给予姜黄素不同剂量干预后,CYP2J2、PPAR α 、PPAR β 和 PPAR γ 的蛋白水平显著升高($P < 0.05$,如图 3)。



注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 Western blot 检测心肌组织中 CYP2J2、PPAR α 、PPAR β 和 PPAR γ 蛋白表达水平

三、讨论

据国际糖尿病联盟(international diabetes federation, IDF)发布的数据显示,截至 2021 年,全球约有 5.37 亿的糖尿病患者,其中,中国糖尿病患者

人数达 1.41 亿人,发病率高达 12.8%^[2]。DCM 作为糖尿病最常见的并发症之一,是由于长期高糖状态导致心脏微血管病变和心肌细胞肥大,进一步引起心脏结构功能异常,最终诱发心力衰竭、心肌梗死等

多种心血管不良事件,这也是糖尿病患者主要死亡原因之一。目前针对 DCM 的防治措施主要有降糖、降脂、降压和抑制心脏重构,但研究表明这些措施并不能减少糖尿病患者心力衰竭等心血管事件的发生发展,因此探索针对 DCM 病理生理改变的新的治疗药物及作用靶点成为本文研究的重点。

CUR 是从植物的根茎中提取的一种天然化合物,具有良好的抗炎和抗癌特性。我们前期研究证实, CUR 具有降低 2 型糖尿病大鼠血糖水平和改善其葡萄糖耐量受损的作用^[5];且有研究表明, CUR 能通过减轻炎症反应改善压力性心肌肥厚及高脂血症所致的心肌损伤^[6],对高血压所致的心脏病也有保护作用^[7],但其对糖尿病条件下心肌病理生理的影响及可能机制的相关研究知之甚少。本研究超声心电图显示,模型组大鼠与空白对照组相比, LVEF、LVFS 明显降低($P < 0.05$),说明大鼠心脏收缩功能改变,符合 DCM 超声心电图特点;给予 CUR 干预后,与模型组相比,高剂量组两个指标均上升($P < 0.05$),提示 CUR 能一定程度改善 DCM 大鼠心功能。

心肌肥厚和心肌纤维化是 DCM 的特征病理改变。本研究结果显示,模型组大鼠的心肌肥厚指标 LVMI、HMI 均明显升高,给予 CUR 处理能缓解 DCM 大鼠心脏及左心质量的增加;HE 染色观察显示, CUR 能明显改善 DCM 大鼠心肌细胞形态,减轻炎症细胞浸润,使心肌细胞排列相对整齐;Masson 染色观察显示,模型组大鼠心肌有大量蓝染的胶原纤维沉积,细胞肥大,排列紊乱,心肌损伤严重,而应用 CUR 干预后, CVF 明显下降($P < 0.05$),心肌纤维化程度明显改善,且高剂量组尤为明显,提示 CUR 能改善 DCM 大鼠心肌病理改变,抑制纤维化。同时,生化指标检测结果显示, CUR 对 DCM 大鼠 FBG、INS、HbA1c、TG、TC 等血糖血脂指标均有明显改善,说明 CUR 不仅能干预糖尿病心肌病理生理的进展,还能从根本上控制糖尿病血糖血脂水平,从而防治并发症的发生。

过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARs)属于核激素受体家族中的配体激活受体,目前已经发现了 α 、 β 、 γ 三种亚型,他们对血糖血脂代谢、能量平衡、炎症等重要生理过程起到调节作用,其调控异常与一系列代谢综合征有关,因此,PPARs 已成为代谢性疾病的重要防治靶点。同时,有研究显示, PPARs 信号通路的激活对多种因素导致的心肌肥厚有干预

作用^[8],而细胞色素 P450 环氧合酶 2J2(CYP2J2)可通过激活 PPAR γ 实现对 AngII 诱导的心脏重构的保护作用^[3]。因此,本研究探讨了在 CUR 干预下, DCM 大鼠心肌 CYP2J2 及 PPARs 的蛋白表达水平,发现与模型组相比 CYP2J2 及三种亚型 PPARs 的蛋白表达均被激活。

综上所述,本研究结果显示, CUR 可以改善 DCM 大鼠心肌功能,并显著减轻糖尿病心肌细胞肥大和纤维化,该作用可能与其上调 CYP2J2 表达,从而激活 PPARs 信号通路有关。本研究为 CUR 应用于临床糖尿病心肌病的治疗提供了基础实验依据。然而,由于 DCM 发病因素的复杂性和 CUR 作用的广泛性, CUR 是否还通过其他的信号通路或分子机制防治 DCM,仍有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 马越,孔祥婕,彭雯.中国糖尿病疾病负担现状及趋势[J].中国预防医学杂志,2023(4):281-286.
- [2] 曹星,王玉岭,翟蒙恩,等.四氢姜黄素对压力负荷引起的小鼠心肌肥厚的保护作用[J].天津医药,2018(12):1277-1281.
- [3] Tao PZ, Jiang Y, Wang H, et al. CYP2J2-produced epoxyeicosatrienoic acids contribute to the ferroptosis resistance of pancreatic ductal adenocarcinoma in a PPAR γ -dependent manner[J]. Journal of Central South University. Medical sciences. 2021(9):932-941.
- [4] Chen DP, Xi YB, Zhang SZ, et al. Curcumin attenuates inflammation of Macrophage-derived foam cells treated with Poly-L-lactic acid degradation via PPAR γ signaling pathway[J]. Journal of Materials Science. Materials in Medicine, 2022(4):33.
- [5] 陈洁,刘一然.姜黄素对2型糖尿病大鼠脂肪细胞葡萄糖转运及PI3K/Akt信号通路的影响[J].中国比较医学杂志,2019(5):90-97.
- [6] 王利,周绮云,秦菲.姜黄素和/或有氧运动对高脂血症大鼠心肌损伤的保护作用[J].中国食品添加剂,2023(02):156-162.
- [7] Funamoto M, Sunagawa Y, Katanasaka Y, et al. Effects of high-absorption curcumin for the prevention of hypertensive heart disease: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical study[J]. European heart journal open, 2022(5):57.
- [8] Liu YS, Zhang Q, Yang L, et al. Metformin attenuates cardiac hypertrophy via the HIF-1 α /PPAR- γ signaling pathway in high-fat diet rats[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022:919-202.

[责任编辑:鞠守勇]

Cardioprotective Effects of Curcumin on Rats with Diabetic Cardiomyopathy and its Underlying Mechanism

CHEN Jie

(College of Bioengineering, Wuhan Polytechnic, Wuhan, Hubei, 430074, China)

Abstract: To investigate the protective effect of curcumin on myocardial tissue injury in rats with diabetic cardiomyopathy (DCM) and its possible mechanism. Methods: 50 SPF healthy male SD rats were randomly selected, with 10 as the blank control group, and the rest were duplicated as the model of diabetes cardiomyopathy. Randomly divide the successfully modeled rats into model group, low-dose curcumin group, and high-dose curcumin group. After continuous administration for 4 weeks, rats were subjected to echocardiography, HE, and Masson staining to detect the degree of myocardial fibrosis; Biochemical testing to measure blood lipids and blood sugar. Western blot detection of PPAR in myocardial tissue α 、PPAR β 、PPAR γ And CYP2J2 protein expression. Results: Compared with the blank control group, the blood glucose and lipid indexes of rats in the model group were significantly increased, and the systolic function of the heart was decreased. HE staining showed hypertrophy of cardiomyocytes, and Masson staining showed significantly increase of myocardial collagen fibers. The expressions of PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ and CYP2J2 were decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, curcumin can significantly improve blood glucose and lipid levels in DCM rats, significantly improve cardiac contractile function, restore cardiomyocyte morphology, reduce collagen fiber deposition, PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ and CYP2J2 protein was significantly increased ($P < 0.05$). Conclusion: Curcumin can ameliorate myocardial injury in rats with diabetic cardiomyopathy, and its molecular mechanism may be related to the activation of myocardial CYP2J2/PPARs signaling pathway.

Key words: curcumin; diabetic cardiomyopathy; signal path; myocardial protection