

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.13.006

大蒜素改善糖尿病心肌病大鼠心功能及纤维化的作用及对 NF- κ B 信号通路的影响

陆晓丹,宗刚军,周建英,张丽君

(中国人民解放军第101医院·江南大学附属医院,江苏 无锡 214000)

摘要:目的 探讨大蒜素改善糖尿病心肌病大鼠心功能及纤维化的作用及其对 NF- κ B 信号通路的影响。方法 取 SD 大鼠 100 只,根据体质量随机分成对照组,模型组,大蒜素低、中、高剂量组,模型组。构建糖尿病心肌病模型,造模成功后给予相应药物灌胃,对照组和模型组给予等体积生理盐水。试验结束后,脉冲多普勒检测各组大鼠心功能指标;检测大鼠心肌中 Toll 受体 4(TLR4)、核因子- κ B(NF- κ B)mRNA 及蛋白,白细胞介素 2(IL-2)、白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平。结果 与对照组比较,大蒜素各剂量组左室舒张早期最大血流/二尖瓣心房收缩期最大血流(E/A)、左室射血分数(LVEF)、左心室短轴缩短率(FS)降低($P < 0.05$);与模型组比较,大蒜素各剂量组 EA, LVEF, FS 升高($P < 0.05$),且随着给药剂量的增加,EA, LVEF, FS 逐渐升高,量效关系明显($P < 0.05$);与对照组比较,大蒜素各剂量组 TLR4、NF- κ B mRNA 及蛋白,以及 IL-2, IL-6, TNF- α 表达水平升高($P < 0.05$);与模型组比较 TLR4, NF- κ B mRNA 及蛋白,以及 IL-2, IL-6, TNF- α 蛋白表达水平降低($P < 0.05$),且随着给药剂量的增加,TLR4 及 NF- κ B mRNA 及蛋白,以及 IL-2, IL-6, TNF- α 表达水平逐渐降低,量效关系明显($P < 0.05$)。结论 大蒜素可改善糖尿病心肌病大鼠心脏舒张和收缩功能,减轻心室肥大和纤维化程度,其机制可能与大蒜素能抑制炎症信号通路 TLR4 及 NF- κ B mRNA 和蛋白表达水平,抑制炎症因子 IL-2, IL-6, TNF- α 的表达有关。

关键词:大蒜素;大鼠;糖尿病心肌病;心功能;纤维化;核因子- κ B

中图分类号:R965.2;R977.1*5

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)13-0022-004

Effect of Allicin on Improving Cardiac Function and Fibrosis in Rats with Diabetic Cardiomyopathy and Its Effect on NF- κ B Signaling Pathway

LU Xiaodan, ZONG Gangjun, ZHOU Jianying, ZHANG Lijun

(The 101st Hospital of PLA, Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, China 214000)

Abstract: Objective To investigate the effect of allicin on improving cardiac function and fibrosis in rats with diabetic cardiomyopathy and its effect on NF- κ B signaling pathway. **Methods** Totally 100 SD rats were randomly divided into 5 groups according to body weight: control group, model group, allicin low, medium and high dosage groups. The diabetic cardiomyopathy models were established, and the corresponding drugs were given orally after the model was successfully established, while the rats in the control group and model group were given normal saline of equal volume. At the end of the experiment, the indexes of cardiac function were detected by pulsed Doppler, and the levels of Toll receptor 4(TLR4), nuclear factor- κ B(NF- κ B) mRNA and protein, interleukin-2(IL-2), interleukin-6(IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in rat myocardium were detected. **Results** Compared with the control group, the E/A, left ventricular ejection fraction(LVEF) and fractional shortening(FS) in each allicin dosage group were lower($P < 0.05$). Compared with model group, the E/A, LVEF and FS in each allicin dosage group were higher($P < 0.05$), with the increase of dosage, the EA, LVEF and FS increased gradually, and the dosage-effect relationship was obvious($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression levels of TLR4, NF- κ B mRNA and protein, IL-2, IL-6 and TNF- α in each allicin dosage group were higher($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression levels of TLR4, NF- κ B mRNA and protein, IL-2, IL-6 and TNF- α in each allicin dosage group were lower($P < 0.05$), with the increase of dosage, the expression levels of TLR4, NF- κ B mRNA and protein, IL-2, IL-6 and TNF- α decreased gradually, and the dosage-effect relationship was obvious($P < 0.05$). **Conclusion** Allicin can improve the diastolic and contractile function of heart and reduce the degree of ventricular hypertrophy and fibrosis in rats with diabetic cardiomyopathy. The mechanism may be related to the inhibition of the expression levels of inflammatory signaling pathway TLR4 and NF- κ B mRNA and protein as well as the inhibition of the expression of IL-2, IL-6 and TNF- α .

Key words: allicin; rats; diabetic cardiomyopathy; cardiac function; fibrosis; nuclear factor- κ B

糖尿病性心肌病被定义为心肌的结构和功能异常,与冠状动脉疾病或高血压无关。其调控机制涉及氧化应激、神经激素激活、炎症、钙稳态受损、线粒体损伤、心肌细胞凋亡和自噬^[1]。Toll 样受体(TLR)为先天免疫反应

的识别受体,可通过损伤相关分子模式激活,TLR 亚型 TLR4 在心脏中广泛表达,TLR4 参与心肌炎的调节,并在缺氧缺血性心脏损伤、肥大型心脏病损伤中起关键作用^[2]。核因子- κ B(NF- κ B)是调节胚胎免疫、细胞凋

第一作者:陆晓丹,女,大学本科,住院医师,研究方向为心血管,(电子信箱)171779780@qq.com。

亡、血管生成、发育和增殖的主要转录因子,并可通过TLR4激活。NF- κ B介导多种炎症介质的基因表达,如细胞间黏附分子-1、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素6^[3]。NF- κ B与心脏内的免疫和应激反应密切相关^[4]。大蒜素是大蒜的活性成分,具有抗氧化、抗炎、神经保护、抗菌和抗肿瘤作用;在阿霉素诱导的大鼠心脏毒性模型中,大蒜素降低心肌组织中的一氧化氮水平,并通过降低血清白细胞介素1 β (IL-1 β)和TNF- α 水平显示出抗炎作用,同时可抑制NF- κ B的蛋白表达或核转位^[5]。此外,大蒜素可通过降低PI3K/Akt通路的活化,对心肌肥厚和纤维化具有保护作用。本研究中拟探讨大蒜素改善糖尿病心肌病大鼠心功能及纤维化的作用及对NF- κ B信号通路的影响,为糖尿病心肌病的治疗提供理论参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物、仪器与试剂

清洁级SD大鼠100只,12周龄,体质量(119.54 $\pm$ 12.34)g,由广西医科大学动物实验中心提供,合格证号为SCXK(桂)2014-0002。自由摄取饲料、自由饮水,自动控制昼夜循环(12h/12h,光照7:00~19:00),室温(22 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C。试验严格按照《中华人民共和国实验动物管理条例》《实验动物质量管理方法》进行。

大蒜素注射液(正大天晴集团股份有限公司,国药准字H32025640,规格为每支5mL:6mg),根据成人剂量公式换算,大鼠用药量为成人的20.13倍,以10.0mL/kg体质量灌胃,得药液浓度为10.0g/mL。戊四氮(纯度99.99%,Sigma公司),TLR4、NF- κ B ELISA试剂盒(上海邦奕生物科技有限公司);TLR4、NF- κ B一抗、二抗(武汉伊艾博科技有限公司);DAB显色试剂盒(博士德生物工程有限公司)。热电MK3型酶标仪(美国热电)。

1.2 分组与给药

根据大鼠体质量随机分成对照组(A组),模型组(B组),大蒜素低剂量组(C₁组,10.0mg/kg)、中剂量组(C₂组,20.0mg/kg)、高剂量组(C₃组,40.0mg/kg),每组20只,雌雄各半。B组、大蒜素各剂量组大鼠禁食12h,腹腔1次性注射链脲佐菌素(65 μ g/g),7d后空腹测血糖,血糖大于16.7mmol/L且出现糖尿病症状(多饮、多食、多尿),说明建模成功。高脂饲料喂养3个月,诱导糖尿病心脏损伤,期间大蒜素各剂量组腹腔灌胃给予相应药物,A组和B组给予等体积生理盐水。试验结束后,采用脉冲多普勒检测各组大鼠心功能指标,包括左室舒张早期最大血流/二尖瓣心房收缩期最大血流(E/A)、左室射血分数(LVEF)、左心室短轴缩短率(FS)。

1.3 检测指标与方法

心肌病变:采用三色(MASSON)染色法观察各组鼠

心肌纤维化程度。

TLR4及NF- κ B mRNA水平(qRT-PCR法):使用RNeasy Mini Kit(Qiagen, Germany)从所有组织样品中分离总RNA。使用Reverse Transcription试剂盒(Applied Biosystem, USA)通过PCR扩增通过逆转录合成互补DNA(cDNA);使用Power SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystem, USA)和用于TLR4及NF- κ B的特异性引物在Lightcycler 96系统(Roche, USA)上进行qRT-PCR。TLR4正向引物5'-CTATCGAAGGGACC-TAG-3',反向引物5'-ACCTACTTCAGCAGGCCTCG-3';NF- κ B正向引物5'-CTTCTGGGGACTTCT-3',反向引物5'-CTAGTTTCAGCAGGCTTGTC-3'(产品规格均为150bp)。 β -肌动蛋白用作内部对照,引物序列为正向5'-ATCGTGCGTGACATTAAGGAGAAG-3'反向5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3'(产物大小179bp)。每份样品的qRT-PCR反应一式3份进行。TLR4、NF- κ B的qRT-PCR热曲线为94 $^{\circ}$ C 10min、94 $^{\circ}$ C 30s、58 $^{\circ}$ C 35s、72 $^{\circ}$ C 1min;45个循环。通过相对基因定量方法(2^{- $\Delta\Delta$ CT}方法)计算mRNA倍数变化。

TLR4、NF- κ B、IL-2、IL-6、TNF- α 水平(ELISA法):按照无菌条件操作,称取0.1g心肌组织,加入少量液氮,在研钵中迅速将心肌碾碎至粉末状;将组织粉末转入2mL Eppendorf管中,加入1.2mL PBS(pH 7.4),充分振荡混匀,2000g,4 $^{\circ}$ C,离心20min。仔细收集上清液。获取心肌组织匀浆后,采用Elisa法检测心肌中TLR4、NF- κ B、IL-2、IL-6、TNF- α 蛋白水平。

TLR4及NF- κ B蛋白表达水平:通过使用TLR4、NF- κ B兔多克隆抗体和抗兔辣根过氧化物酶(HRP)标记的二级抗体,在4 μ m石蜡包埋的组织切片上进行TLR4及NF- κ B蛋白表达的检测。使用3%过氧化氢溶液和蛋白质阻断试剂来终止蛋白质的酶活性和非特异性结合。组织切片的抗原修复在Tris EDTA缓冲液(pH 9.0)中进行。用二氨基联苯胺(DAB)底物和Mayer's苏木精复染物检测阳性染色。以高放大倍数(40 $\times$)观察500个细胞。在至少5个视野中使用半定量方法对染色的组织切片进行评分。染色标准为0表示<5%阳性染色细胞(阴性表达);+1表示5%~20%阳性染色细胞(弱表达);+2表示21%~50%阳性染色细胞(中度表达);+3表示>50%阳性染色细胞(强表达)。

1.4 统计学处理

采用SPSS19.0统计学软件处理。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析比较,多重比较采用LSD-t检验。检验水准 α 为0.05, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心功能指标

由表1可见,与A组比较,大蒜素各剂量组EA, LVEF, FS降低($P < 0.05$);与B组比较,大蒜素各剂量组EA, LVEF, FS升高($P < 0.05$),且随着给药剂量的增加,EA, LVEF, FS逐渐升高,量效关系明显($P < 0.05$)。

2.2 心肌细胞结构

由图1可见,A组心肌细胞完整,结构正常,染色清晰,核呈卵圆形位于中央,在心肌间质及血管周围见少量亮绿色胶原纤维;B组可见大量肥大、坏死心肌细胞,排列紊乱,且细胞脱落现象明显,细胞核固缩,心肌纤维化明显,绿色胶原纤维明显增加;C₃组见少量坏

死、肥大心肌细胞,绿色胶原纤维较B组明显减少;C₁及C₂组较B组坏死心肌细胞减少,但绿色胶原纤维依然明显存在,具有明显的剂量依赖效应。

2.3 TLR4, NF- κ B mRNA 表达水平

由表1可见,与A组比较,大蒜素各剂量组TLR4及NF- κ B mRNA表达水平升高($P < 0.05$);与B组比较,大蒜素各剂量组TLR4及NF- κ B mRNA表达水平降低($P < 0.05$),且随着给药剂量的增加而逐渐降低,量效关系明显($P < 0.05$)。

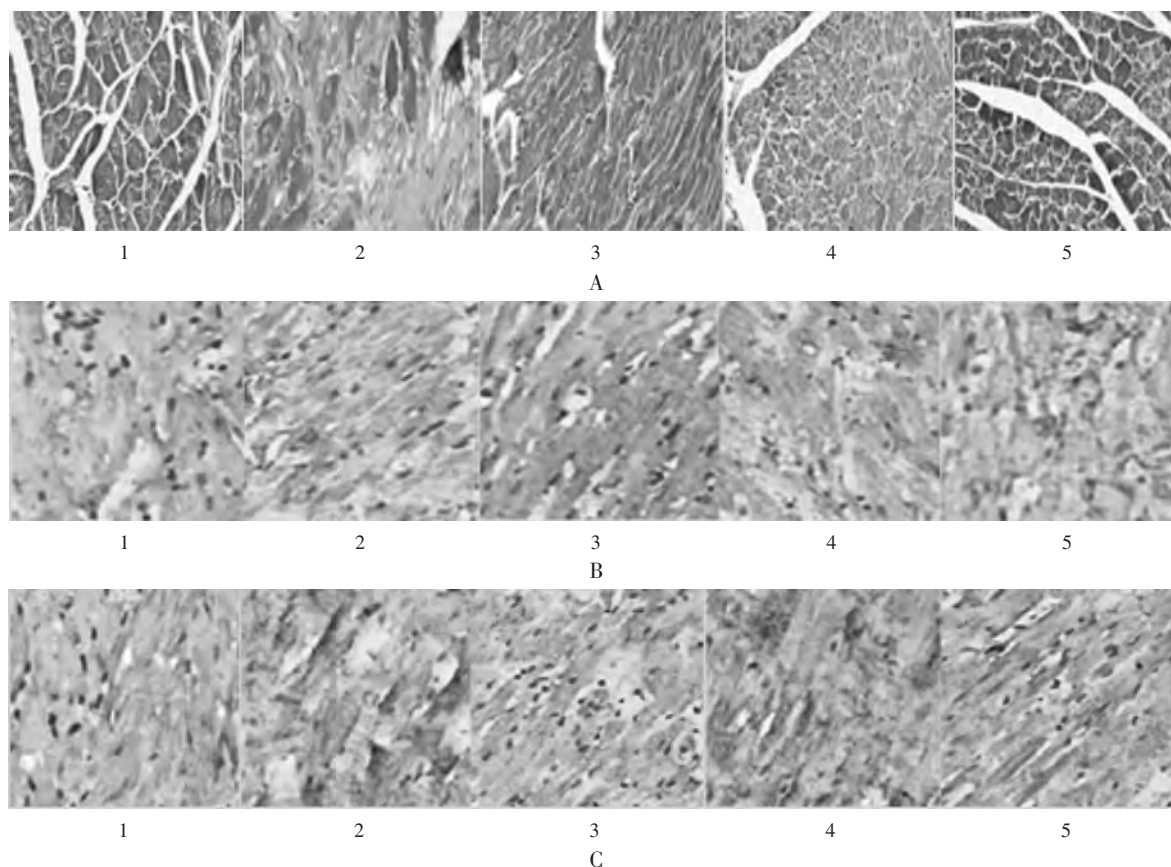
2.4 TLR4 及 NF- κ B 蛋白表达水平

由表1可见,与A组比较,大蒜素各剂量组TLR4及NF- κ B蛋白表达水平升高($P < 0.05$);与B组比

表1 各组检测指标水平比较($\bar{X} \pm s, n = 20$)

组别	剂量 (mg/kg)	心功能指标			基因表达		蛋白表达(ng/g)		炎症因子蛋白表达(ng/g)		
		EA	LVEF(%)	FS(%)	TLR4 mRNA	NF- κ B mRNA	TLR4	NF- κ B	IL-2	IL-6	TNF- α
A组		2.23 $\pm$ 0.21	79.23 $\pm$ 2.09	58.16 $\pm$ 1.02	0.85 $\pm$ 0.35	0.78 $\pm$ 0.15	98.54 $\pm$ 15.21	90.24 $\pm$ 910.23	78.98 $\pm$ 16.32	123.65 $\pm$ 23.21	99.36 $\pm$ 18.63
B组		1.39 $\pm$ 0.20 [*]	62.24 $\pm$ 3.98 [*]	39.48 $\pm$ 5.87 [*]	3.58 $\pm$ 0.48 [*]	2.85 $\pm$ 0.34 [*]	268.21 $\pm$ 15.21 [*]	251.36 $\pm$ 12.36 [*]	326.21 $\pm$ 19.69	413.65 $\pm$ 13.69	589.36 $\pm$ 18.34
C ₁ 组	10	1.50 $\pm$ 0.19 [#]	65.99 $\pm$ 2.03 [#]	45.14 $\pm$ 1.65 [#]	3.00 $\pm$ 0.28 [#]	2.36 $\pm$ 0.34 [#]	243.54 $\pm$ 14.21 [#]	234.12 $\pm$ 15.21 [#]	261.36 $\pm$ 15.32 ^{#□}	302.67 $\pm$ 19.32 ^{#□}	432.39 $\pm$ 15.39 ^{#□}
C ₂ 组	20	1.78 $\pm$ 0.20 [#]	70.35 $\pm$ 3.26 [#]	51.29 $\pm$ 2.49 [#]	2.45 $\pm$ 0.54 [#]	1.65 $\pm$ 0.39 [#]	190.47 $\pm$ 11.25 [#]	189.28 $\pm$ 14.19 [#]	196.32 $\pm$ 18.32 ^{#□}	203.36 $\pm$ 17.32 ^{#□}	269.25 $\pm$ 19.99 ^{#□}
C ₃ 组	40	2.06 $\pm$ 0.18 [#]	76.19 $\pm$ 2.79 [#]	56.34 $\pm$ 2.36 [#]	1.34 $\pm$ 0.28 [#]	1.24 $\pm$ 0.29 [#]	86.54 $\pm$ 12.47 [#]	134.44 $\pm$ 12.763 [#]	171.32 $\pm$ 24.36 [#]	160.68 $\pm$ 36.69 [#]	1393.26 $\pm$ 26.39 [#]

注:与A组比较,^{*} $P < 0.05$;与B组比较,[#] $P < 0.05$;与C₃组比较,[□] $P < 0.03$ 。



1. A组 2. B组 3-5. C₁, C₂, C₃组

A. 心肌细胞结构 B. 心肌 TLR4 蛋白表达水平 C. 心肌 NF- κ B 蛋白表达水平

图1 大蒜素对大鼠各检测指标的影响(400 $\times$)

较,大蒜素各剂量组 TLR4 及 NF- κ B 蛋白表达水平降低($P < 0.05$),且随着给药剂量的增加而逐渐降低,量效关系明显($P < 0.05$)。免疫组化法下,TLR4 及 NF- κ B 阳性表达为棕褐色,TLR4 及 NF- κ B 阳性表达情况与各蛋白表达水平符合。

2.5 IL-2, IL-6, TNF- α 蛋白表达水平

由表 1 可见,与 A 组比较,大蒜素各剂量组 IL-2, IL-6, TNF- α 蛋白表达水平升高($P < 0.05$);与 B 组比较,大蒜素各剂量组 IL-2, IL-6, TNF- α 蛋白表达水平降低($P < 0.05$),且随着给药剂量的增加而逐渐降低,量效关系明显($P < 0.05$)。

3 讨论

糖尿病心肌病的特征是左心室肥厚、心肌重塑和舒张/收缩功能障碍,以及不成比例地增加的左心室质量和心肌纤维化,最终发展为心力衰竭^[6]。在心力衰竭的动物模型中,大蒜素可改善心功能不全和结构异常。本研究结果显示,与对照组比较,大蒜素各剂量组 EA, LVEF, FS 降低;与模型组比较,大蒜素各剂量组 EA, LVEF, FS 升高,且随着给药剂量的增加而逐渐升高,量效关系明显。表明大蒜素改善了心脏舒张和收缩功能,结合病理学结果,提示大蒜素减轻了糖尿病大鼠心脏的心室肥大和纤维化。

目前认为,TLR 可能在识别免疫系统内源性或外源性抗原及炎症反应信号转导的启动中起重要作用^[7]。TLR4 可能在炎症细胞因子的合成和释放中起重要作用,糖尿病心肌病是一种非特异性免疫应激反应,而 TLR4 基因的上调可能与糖尿病心肌病的发生和发展有关^[8-9]。TLR4 在先天免疫反应中起重要作用,既是细胞表面的免疫识别受体,又是跨膜信号转导分子^[10]。当 TLR4 被 PAMP 或 DAMP 激活时,可激活 MyD88 和 TRIF 依赖性途径,激活细胞内信号分子,如 IL-1 受体相关激酶 (IRAKs)、肿瘤坏死因子受体相关因子 (TRAFs) 和 TAK1。因此,最终形成激活 NF- κ B 的主要和次要信号波, NF- κ B 诱导炎症细胞因子的转录和翻译,并导致炎症介质的释放。本研究结果显示, NF- κ B 信号通路的激活被证明是大鼠糖尿病心肌病发病的核心。通过损伤诱导的氧化应激,细菌内毒素和细胞因子、NF- κ B 可被激活^[11]。急性炎症中, NF- κ B 可调节多种炎症基因启动子,其产物如 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 对炎症过程至关重要。NF- κ B 活化增强转录炎症细胞因子和已知的细胞因子,反过来又激活 NF- κ B^[12-14]。本研究结果显示,大蒜素能抑制 TLR4, NF- κ B mRNA 及蛋白的表达,抑制炎症因子 IL-2, IL-6, TNF- α 的表达,且量效关系明显。

综上所述,大蒜素改善糖尿病心肌病大鼠心脏舒张和收缩功能,减轻心室肥大和纤维化程度,其机制可能与大蒜素能抑制炎症信号通路 TLR4 及 NF- κ B mRNA、

蛋白表达水平,进而抑制炎症因子 IL-2, IL-6, TNF- α 的表达有关。

参考文献:

- [1] KARUPPAQOUNDER V, ARUMUQAM S, GIRIDHARAN VV, et al. Tiny molecule, big power: Multi target approach for curcumin in diabetic cardiomyopathy[J]. Nutrition, 2017, 34(1): 47-54.
- [2] LUO KW, CHEN W, LUNG WY, et al. EGCG inhibited bladder cancer SW780 cell proliferation and migration both in vitro and in vivo via down-regulation of NF- κ B and MMP-9[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2017, 41(2): 56-64.
- [3] MIKLOWITZ DJ, PORTNOFF LC, ARMSTRONG CC, et al. Inflammatory cytokines and nuclear factor-kappa B activation in adolescents with bipolar and major depressive disorders[J]. Psychiatry Research, 2016, 241(3): 315-322.
- [4] ÖZCAN E, SAYGUN NI, ILIKÇ IR, et al. Increased visfatin expression is associated with nuclear factor-kappa B and phosphatidylinositol 3-kinase in periodontal inflammation[J]. Clinical Oral Investigations, 2017, 21(4): 1113-1121.
- [5] ZENG T, ZHOU J, HE L, et al. Blocking Nuclear Factor-kappa B Protects against Diet-Induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Mice[J]. Plos One, 2016, 11(3): 77-78.
- [6] 潘利亚, 张晓冉, 尹新华. 糖尿病心肌病发病机制的研究进展[J]. 中国心血管杂志, 2017, 22(2): 143-146.
- [7] TANG AT, CHOI JP, KOTZIN JJ, et al. Endothelial TLR4 and the microbiome drive cerebral cavernous malformations[J]. Nature, 2017, 545(7654): 305-306.
- [8] IORI V, IYER AM, RAVIZZA T. Blockade of the IL-1R1/TLR4 pathway mediates disease-modification therapeutic effects in a model of acquired epilepsy[J]. Neurobiology of Disease, 2017, 99(3): 12-13.
- [9] LAI JL, LIU YH, LIU C, et al. Indirubin Inhibits LPS-Induced Inflammation via TLR4 Abrogation Mediated by the NF- κ B and MAPK Signaling Pathways[J]. Inflammation, 2017, 40(1): 11-12.
- [10] YE HY, JIN J, JIN LW, et al. Chlorogenic Acid Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury by Inhibiting TLR4/NF- κ B Signal Pathway[J]. Inflammation, 2017, 40(2): 523-529.
- [11] YI H, PENG R, ZHANG LY, et al. LincRNA-Gm4419 knock-down ameliorates NF- κ B/NLRP3 inflammasome-mediated inflammation in diabetic nephropathy[J]. Cell Death & Disease, 2017, 8(2): e2583.
- [12] LU Z, LI Y, WANG J, et al. Long non-coding RNA NKILA inhibits migration and invasion of non-small cell lung cancer via NF- κ B/Snail pathway[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2017, 36(1): 54-55.
- [13] REN D, YANG Q, DAI Y, et al. Oncogenic miR-210-3p promotes prostate cancer cell EMT and bone metastasis via NF- κ B signaling pathway[J]. Molecular Cancer, 2017, 16(1): 117-118.
- [14] MANN M, MEHTA A, ZHAO JL, et al. An NF- κ B-microRNA regulatory network tunes macrophage inflammatory responses[J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 56-58.

(收稿日期: 2018-11-06)