

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.01.005
文章编号: 1005-8982 (2018) 01-0021-04

硫化氢对糖尿病大鼠心肌纤维化及基质金属蛋白酶 7 和缝隙连接蛋白 43 表达的影响

孟艳霞, 邓立普

(南华大学附属南华医院 内科, 湖南 衡阳 421002)

摘要: 目的 探讨硫化氢 (H₂S) 对糖尿病大鼠心肌纤维化及基质金属蛋白酶 7 (MMP-7) 和缝隙连接蛋白 43 (Cx43) 表达的影响。**方法** 将 52 只 SD 大鼠随机分为 4 组, 每组 13 只: 糖尿病模型组 (STZ 组), 硫化氢干预模型组 (STZ+H₂S 组), 硫化氢干预正常组 (H₂S 组), 正常对照组 (Control 组)。予以链脲佐菌素 (STZ) (40 mg/kg) 处理 STZ 组和 STZ+H₂S, 复制糖尿病大鼠模型, 复制成功后, 每天予以硫氢化钠 NaHS 溶液 (100 μmol/kg) 处理 STZ+H₂S 组与 H₂S 组, 予以等量生理盐水对 Control 组行腹腔注射, 8 周后将大鼠处死。VG 染色观察 4 组大鼠心肌组织病理学改变, Western blot 检测 IV 型胶原蛋白、MMP-7、Cx43 蛋白的表达。**结果** STZ 组与 Control 组相比, STZ 大鼠心肌细胞排列紊乱明显, 细胞间胶原沉积增加, 心室肌组织中 IV 型胶原蛋白及 MMP-7 蛋白表达增加 ($P < 0.05$), 而 Cx43 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); STZ+H₂S 组与 STZ 组相比, STZ+H₂S 组心肌细胞排列紊乱有所改善, 细胞间胶原沉积减少, 心室肌组织中 IV 型胶原蛋白及 MMP-7 蛋白表达也减少 ($P < 0.05$), Cx43 蛋白表达上调 ($P < 0.05$)。**结论** H₂S 可改善糖尿病大鼠心肌纤维化, 其机制可能与通过调控 MMP-7 上调 Cx43 蛋白表达有关。

关键词: 硫化氢; 糖尿病; 纤维化; 基质金属蛋白酶 7; 缝隙连接蛋白 43

中图分类号: R-332; R587.1

文献标识码: A

Effect of hydrogen sulfide on myocardial fibrosis and MMP7 and connexin 43 expressions in diabetic rats

Yan-xia Meng, Li-pu Deng

(Department of Medicine, the Affiliated Nanhua Hospital, South China University,
Hengyang 421002, Hunan, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of hydrogen sulfide on myocardial fibrosis and the expressions of connexin 43 (Cx43) and MMP7 in diabetic rats. **Methods** Fifty-two rats were randomly divided into four groups (13 in each): diabetes mellitus group (STZ group), diabetes mellitus treated with H₂S group (STZ+H₂S group), normal rats treated with H₂S group (H₂S group) and control group. The STZ group and the STZ+H₂S group were treated with Streptozotocin according to the standard of 40 mg/kg to make diabetes model. After the modeling, NaHS (the provider of H₂S, 100 μmol/kg) was administered to the rats of the STZ+H₂S group and the H₂S group every day; the rats in the control group were injected with equal amount of saline into peritoneal cavity. After 8 weeks, the pathological changes of myocardium in the four groups were observed by VG staining. The expression levels of collagen IV, MMP7 and Cx43 were analyzed by Western blot. **Results** Compared with the control group, the expression levels of collagen IV and MMP7 in the myocardial tissue were significantly increased ($P < 0.05$), while the expression level of Cx43 protein was significantly decreased in the STZ group ($P < 0.05$), accompanied by disorder of myocardial cells. Compared with the STZ group, the expression levels of collagen IV and MMP7 protein in the myocardial tissue were significantly decreased in the STZ+H₂S group ($P < 0.05$), while the expression level of Cx43 was significantly increased ($P < 0.05$) and the disorder of myocardial cells was improved. **Conclusions** Hydrogen sulfide could reduce myocardial fibrosis in diabetic rats, which may be related to the upregulation of connexin 43 expression by MMP7.

收稿日期: 2017-01-23

[通信作者] 邓立普, E-mail: 1456608926@qq.com; Tel: 18907345315

Keywords: hydrogen sulfide; diabetes; fibrosis; matrix metalloproteinase 7; connexin 43

糖尿病是一组以慢性高血糖为特征的代谢性疾病,2013 年全球糖尿病患者达 3.82 亿^[1]。近年来,糖尿病患病率在我国逐渐增加,成人糖尿病患病率目前高达 9.7%^[2],我国成为全球糖尿病患病率增长速度最快的国家之一^[3]。糖尿病可增加急性心血管事件和心源性猝死的发生率,其原因可能与糖尿病患者心肌的缝隙连接重构和离子通道重构相关。

糖尿病引起的血管损害和代谢异常可导致心肌电生理重构进而引起心肌纤维化和心肌重构^[4-5]。细胞缝隙连接广泛存在于细胞间,是心肌细胞间电连接形式,具有维持心肌电生理活动的重要作用,缝隙连接蛋白 43 (Connexin 43, Cx43) 是构成心室细胞缝隙连接的主要蛋白,是心脏正常电活动的关键蛋白。基质金属蛋白酶 7 (matrix metalloproteinase, MMP-7) 主要表达于心肌细胞和巨噬细胞,属于基质溶解因子。MMP-7 可降解细胞外基质中的 IV 胶原蛋白、层黏连蛋白、纤黏连蛋白等参与组织重建,同时可能具有降解 Cx43 的作用。

硫化氢 H₂S 具有改善心室重构、抗炎和抑制氧化应激等作用^[6]。而 H₂S 对糖尿病大鼠心肌重构和心室 Cx43 蛋白的调控作用以及相关机制尚少见研究。本研究拟通过复制糖尿病大鼠模型,观察 H₂S 通过调控 MMP-7 改善糖尿病大鼠心肌纤维化及上调心肌组织 Cx43 蛋白表达的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年清洁级雄性 SD 大鼠 52 只 [购自南华大学动物实验中心;动物合格证号:SYXK(湘)2010-0006],体重(300±20)g。动物实验在南华大学动物实验中心完成,实验室环境温度 12~24℃。分笼饲养,人工照明,白天黑夜各 12 h;所有大鼠均可自由获得水和食物。

1.2 主要实验试剂

兔源 MMP-7、Cx43 和 CollagenIV 的一抗和 GAPDH 一抗购于中国博士德公司,硫化氢 NaHS 购于美国 Sigma 公司,抗兔二抗购于美国 Proteintech 公司,BCA 蛋白定量试剂盒、细胞裂解液购于上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 实验分组及糖尿病模型复制

SD 大鼠适应性喂养 1 周后,随机分为对照组

(Control 组)、糖尿病模型组(STZ 组)、H₂S 干预模型组(STZ+H₂S 组)、H₂S 干预正常组(H₂S 组)。STZ+H₂S 组与 STZ 组大鼠按体重腹腔注射链脲佐菌素(STZ)(40 mg/kg);予以链脲佐菌素注射后的 24 h 内给予 5% 葡萄糖水防止大鼠发生低血糖休克;予以链脲佐菌素注射 72 h 后,尾静脉采血测血糖,血糖值 >16.7 mmol/L 提示复制模型成功。而后,每天予以硫化氢 NaHS 溶液(100 μmol/kg)对 H₂S 组和 STZ+H₂S 组大鼠进行腹腔注射;予以等量生理盐水对 Control 组和 STZ 组行腹腔注射,持续 8 周。Control 组、STZ 组、STZ+H₂S 组和 H₂S 组复制模型成功的实验大鼠分别为:12、9、9 和 10 只。

1.4 VG 染色光镜下观察大鼠左心室心肌组织病理学形态

取 4 组大鼠左心室心肌组织,做成切片后,行 VG(van gieson)染色,光镜下观察大鼠心肌结构及纤维化程度。

1.5 Western blot 检测左心室心肌组织 IV 胶原蛋白、MMP-7、Cx43 蛋白表达

取 4 组大鼠左心室心肌组织,提取蛋白并定量。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,湿转法将蛋白转至 PVDF 膜。用 TBST 配制的 5% 脱脂牛奶封闭 1.5 h, Collagen IV、MMP-7、Cx43 (稀释度均为 1:400)以及(GAPDH)(稀释度为 1:8000)一抗 37℃ 孵育 1 h 后于 4℃ 条件下过夜, TBST 缓冲液充分洗膜后用 HRP 标记的二抗(稀释度为 1:8000)37℃ 孵育 1 h, ECL 显色,曝光后扫描,用 Image J 图像分析软件进行光密度分析。以目的条带与 GAPDH 的灰度比值分别表示 IV 胶原蛋白、MMP-7 和 Cx43 的蛋白表达水平。

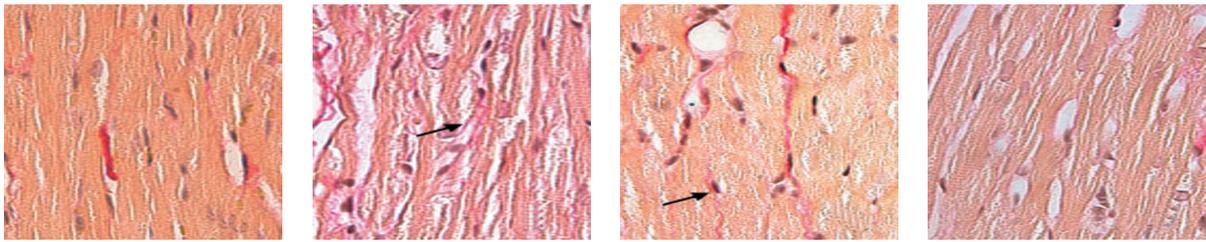
1.6 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。均数间的比较采用方差分析,有统计学意义后,两组间均数比较采用 SNK-q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌组织 VG 染色结果

与 Control 组比较,STZ 组大鼠心肌细胞排列紊乱,细胞间明显胶原沉积;与 STZ 组比较,STZ+H₂S 组大鼠心肌细胞排列紊乱有所改善,细胞间胶原沉积明显减少。H₂S 组与 Control 组比较表现相似。见图 1。

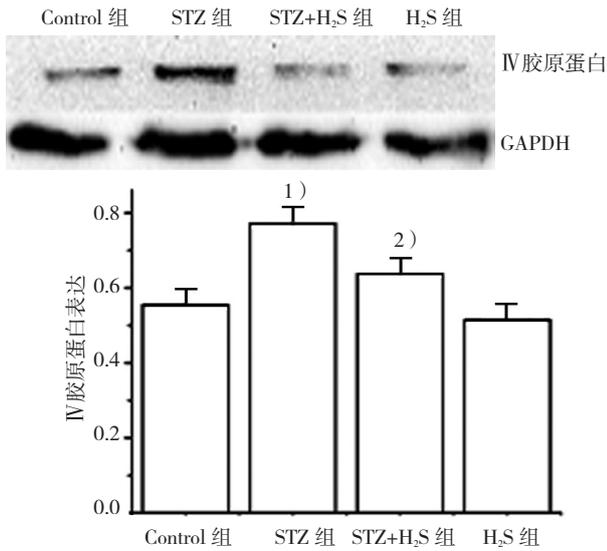


A: Control 组; B: STZ 组; C: STZ+H₂S 组; D: H₂S 组

图 1 4 组大鼠心肌组织 VG 染色结果 (×400)

2.2 H₂S 对 IV 型胶原蛋白表达的影响

与 Control 组 IV 型胶原蛋白表达水平 (0.568 ± 0.027) 比较, STZ 组大鼠心室肌组织的 IV 型胶原蛋白表达水平 (0.716 ± 0.026) 升高 ($P < 0.05$); 与 STZ 组比较, STZ+H₂S 组大鼠心室肌组织的 IV 型胶原蛋白表达水平 (0.644 ± 0.010) 降低 ($P < 0.05$); H₂S 组心室肌组织 IV 型胶原蛋白表达水平 (0.589 ± 0.019) 与 Control 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2。



1) 与 Control 组相比, $P < 0.05$; 2) 与 STZ 组相比, $P < 0.05$

图 2 H₂S 对心肌组织 IV 型胶原蛋白表达的影响

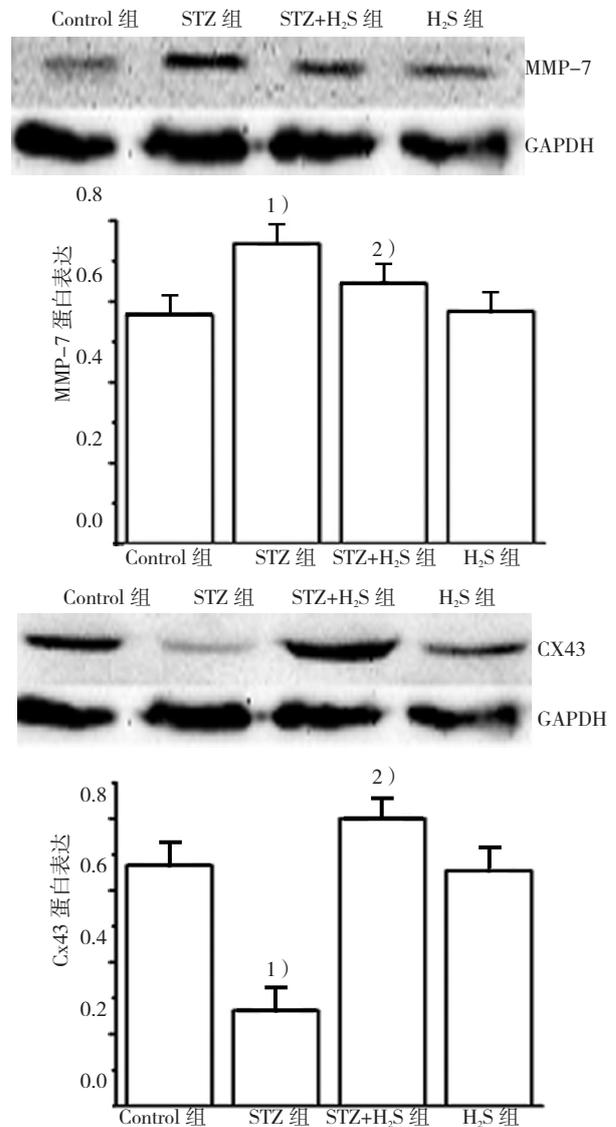
2.3 H₂S 对 MMP-7 和 Cx43 蛋白表达的影响

与 Control 组 MMP-7 蛋白表达水平 (0.568 ± 0.027) 相比, STZ 组大鼠心室肌组织的 MMP-7 蛋白表达水平 (0.752 ± 0.010) 升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 Control 组 Cx43 蛋白表达水平 (0.691 ± 0.019) 相比, STZ 组大鼠心室肌组织的 Cx43 蛋白表达水平 (0.284 ± 0.021) 下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

与 STZ 组 MMP-7 蛋白表达水平 (0.752 ± 0.010) 相比, STZ+H₂S 组大鼠心室肌组织 MMP-7 蛋白表达水平 (0.644 ± 0.010) 下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$);

与 STZ 组 Cx43 蛋白表达水平 (0.284 ± 0.021) 相比, STZ+H₂S 组大鼠心室肌组织 Cx43 蛋白表达水平 (0.772 ± 0.025) 升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

H₂S 组 MMP-7、Cx43 蛋白表达水平分别为 (0.589 ± 0.019) 和 (0.681 ± 0.023), 与 Control 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。



1) 与 Control 组相比, $P < 0.05$; 2) 与 STZ 组相比, $P < 0.05$

图 3 H₂S 对 MMP7 和 Cx43 蛋白表达的影响

3 讨论

糖尿病可引起一系列心肌损害导致糖尿病心肌病^[6]。糖尿病与急性心血管事件和心源性猝死有密切关系,其原因与糖尿病导致的心肌病变相关,机制可能与心室肌的电生理重构有关,但具体机制目前仍不清楚。缝隙连接蛋白 Cx43 表达于心室肌相邻细胞的连接处及闰盘部位,其正常表达是心脏电-机械功能及心脏生理功能的保障^[7-9]。大量研究发现心室肌 Cx43 表达下调和分布紊乱可导致心肌复极化的不一致性,从而导致恶性心律失常的发生^[10-13]。

糖尿病心肌组织中同时存在 MMPs 的失调,并与心肌纤维化和心肌重构有关,MMP-7 属于基质溶解因子,在心肌细胞和巨噬细胞均可表达。魏英杰等^[14]学者在缺血性心肌标本中检测了 17 种 MMPs,发现只有 MMP-7、MMP10 在心肌组织中明显升高。BOIXEL 等^[15]发现 MMP-7 参与了心房组织的早期重构,与正常大鼠相比,急性心肌梗死后的大鼠心肌组织 MMP-7 表达明显增加。MMP-7 可通过降解细胞外基质参与心肌重构,同时研究发现 MMP-7 参与 Cx43 重构的调控。当注入 MMP-7 后正常小鼠也可发生心律失常,在 MMP-7 基因敲除的小鼠中则未见心电传导异常;与野生型小鼠相比,沉默 MMP-7 基因表达的小鼠,其心肌梗死的心肌组织 Cx43 表达增加近 1 倍,同时作者在体外实验也证实了 Cx43 正是 MMP-7 的酶解底物^[16]。本研究发现糖尿病大鼠心室肌存在明显心肌纤维化,IV 型胶原蛋白表达增加,心室肌组织 Cx43 蛋白表达下调,而组织中 MMP-7 蛋白表达上调,提示糖尿病大鼠心室肌 MMP-7 的上调可直接促进心肌细胞 Cx43 降解,进而导致糖尿病大鼠心肌的电生理重构和心律失常的发生。

本研究结果提示, H₂S 可通过抑制心肌组织 MMP-7 的表达上调心肌组织 Cx43 蛋白的表达,这一作用可能与其改善糖尿病大鼠心肌纤维化相关。更改作用机制可能为临床防治糖尿病心肌病的发生、发展提供新的靶点。但 H₂S 通过调控 MMP-7 上调心室肌组织 Cx43 蛋白表达的具体调控机制尚不清楚,其与 H₂S 改善糖尿病大鼠心肌纤维化这一作用的内在关系也需要进一步研究。

参 考 文 献:

[1] GUARIGUATA L, LINNENKAMP U, BEAGLEY J, et al. Global estimates of the prevalence of hyperglycaemia in pregnancy[J].

Diabetes Res & Clin Pract, 2014, 103(2): 176-185.

- [2] 张萍,潘天荣,钟兴,等. 利拉鲁肽联合胰岛素治疗新诊断肥胖 2 型糖尿病的临床疗效及安全性观察 [J]. 中国糖尿病杂志, 2014, 22(11): 974-977.
- [3] XU Y, WANG L, HE J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults[J]. JAMA, 2013, 310(9): 948-959.
- [4] MAK K H, MOLITERNO D J, GRANGER C B, et al. Influence of diabetes mellitus on clinical outcome in the thrombolytic era of acute myocardial infarction. GUSTO-I Investigators. Global utilization of streptokinase and tissue plasminogen activator for occluded coronary arteries[J]. J Am Coll Cardiol, 1997, 30(1): 171-179.
- [5] 孙明谨,文重远,黄婷,等. 糖尿病大鼠心肌 Cx43 的表达及缬沙坦对其影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(15): 2294-2297.
- [6] STABLES C L, MUSA H, MITRA A, et al. Reduced Na⁺ current density underlies impaired propagation propagation in the diabetic rabbit ventricle[J]. J Mol Cell Cardiol, 2014(69): 24-31.
- [7] SOVARI A A, RUTLEDGE C A, JEONG E M, et al. Mitochondria oxidative stress, connexin43 remodeling, and sudden arrhythmic death[J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2013, 6(3): 623-631.
- [8] SOVARI A A, IRAVANIAN S, DOLMATOVA E, et al. Inhibition of c-Src tyrosine kinase prevents angiotensin II-mediated connexin43 remodeling and sudden cardiac death[J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 58(22): 2332-2339.
- [9] 张旭敏,范慧敏,刘中民,等. MYO Cx43 基因转染大鼠成纤维细胞产生电偶联能力细胞实验研究 [J]. 中国急救医学, 2008, 28(3): 235-238.
- [10] 袁勇华,何学华,方亦兵,等. 缝隙连接蛋白 43 在扩张型心肌病大鼠心肌中的表达及其与左室射血分数的相关性 [J]. 临床儿科杂志, 2014, 32(1): 66-69.
- [11] WIEGERINCK R F, VAN VEEN T A, BLTERMAN C N, et al. Trans-mural dispersion of refractoriness and conduction velocity is associated with heterogeneously reduced connexin43 in a rabbit model of heart failure[J]. Heart Rhythm, 2008, 5(8): 1178-1185.
- [12] HESKETH G G, SHAH M H, HALPERIN V L, et al. Ultra structure and regulation of lateralized connexin43 in the failing heart[J]. Circ Res, 2010, 106(6): 1153-1163.
- [13] GLUKHOV A V, FEDOROV V V, LOU Q, et al. Transmural dispersion of repolarization in failing and nonfailing human ventricle[J]. Circ Res, 2010, 106(5): 981-991.
- [14] 魏英杰,胡盛涛,丽君,等. MMP7、MMP10 和 TIMP4 在心力衰竭心室重构中的表达 [J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(3): 440-446.
- [15] BOIXEL C, FONTAINE V, RÜCKER-MARTIN C, et al. Fibrosis of the left atria during progression of heart failure is associated with increased matrix metalloproteinases in the rat[J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 42(2): 336-344.
- [16] LINDSEY M L, ESCOBAR G P, MUKHERJEE R, et al. Matrix metalloproteinase7 affects connexin43 levels, electrical conduction, and survival after myocardial infarction[J]. Circulation, 2006, 113(25): 2919-2928.

(张西倩 编辑)