

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.22.005

达格列净对糖尿病合并心肌缺血大鼠心肌细胞能量代谢及血液流变学的作用研究*

白净¹ 徐晶^{2Δ} 杨禹娟¹ 王亚萍¹ 李文波¹

(陕西省人民医院 1 心血管内科;2 心血管内科 陕西 西安 710068)

摘要 目的:探讨达格列净对糖尿病合并心肌缺血大鼠心肌细胞能量代谢及血液流变学的作用研究。**方法:**2 型糖尿病雌性 Goto-Kakizaki 大鼠根据实验要求分为三组:对照组,心肌缺血组和达格列净组。通过右颈总动脉血流动力学系统评估大鼠 SBP、MAP 和 DBP;LabScribe 2 软件操作的记录系统监测大鼠的心脏收缩舒张功能;TTC 染色和组织学分别检测大鼠的心肌梗塞面积百分比和心肌损伤评分;TUNEL 测定法测定大鼠心肌细胞凋亡;测定试剂盒和荧光追踪检测大鼠心肌中的 ATP 含量、ADP/ATP 比率、线粒体膜电位 MMP;蛋白印迹分析线粒体裂解融合因子线粒体蛋白 2(Mitochondrial protein 2, MFN2),视神经萎缩 1 (Optic nerve atrophy 1, OPA1)和动力蛋白相关的蛋白 1(Dynein-related protein 1, DRP1)的蛋白表达;RT-PCR 分析大鼠心肌细胞中能量代谢相关因子 PGC1- α 和 CPT-1 的转录。**结果:**心肌缺血组较对照组的 SBP、MAP 升高($P<0.05$),达格列净组较心肌缺血组降低($P<0.05$),与对照组相比,心肌缺血组和达格列净组的 DBP 比较无差异($P>0.05$)。心肌缺血组较对照组 LVEF 降低($P<0.05$),LVIDs、LVPWs 和 LVPWd 升高($P<0.05$),达格列净组较心肌缺血组的 LVEF 升高($P<0.05$),LVIDs、LVPWs 和 LVPWd 降低($P<0.05$)。心肌缺血组较对照组的梗塞面积占比和组织损伤评分升高($P<0.05$),达格列净组较心肌缺血组梗塞面积、组织损伤评分降低($P<0.05$)。与对照组相比,心肌缺血组 TUNEL 阳性细胞数量增多($P<0.05$)。此外,与心肌缺血组相比,达格列净组的 TUNEL 阳性细胞数量降低($P<0.05$)。线粒体膜电位 MMP。心肌缺血组较对照组的 ATP 含量和 MMP 降低($P<0.05$),ADP/ATP 比率升高($P<0.05$),达格列净组较心肌缺血组 ATP 含量和 MMP 升高($P<0.05$),ADP/ATP 比率降低($P<0.05$)。心肌缺血组较对照组 MFN2 和 OPA1 的蛋白表达降低($P<0.05$),DRP1 蛋白表达升高($P<0.05$),达格列净组较心肌缺血组 MFN2 和 OPA1 的蛋白表达升高($P<0.05$),DRP1 蛋白表达降低($P<0.05$)。心肌缺血组较对照组 PGC1- α 和 CPT-1 的 mRNA 表达降低($P<0.05$),达格列净组较心肌缺血组 PGC1- α 和 CPT-1 的 mRNA 表达升高($P<0.05$)。**结论:**达格列净给药可减轻糖尿病合并心肌缺血大鼠的心肌梗死面积,增强心室功能和心肌细胞能量代谢,发挥心脏保护作用。

关键词:达格列净;心肌缺血;糖尿病;血液流变学;线粒体

中图分类号:R-33;R587.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2021)22-4223-06

Effects of Dapagliflozin on Energy Metabolism and Hemorheology of Myocardial Cells in Diabetic Rats with Myocardial Ischemia*

BAI Jing¹, XU Jing^{2Δ}, YANG Yu-juan¹, WANG Ya-ping¹, LI Wen-bo¹

(1 Department of Cardiovascular Medicine III; 2 Department of Cardiovascular Medicine I, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of dapagliflozin on myocardial cell energy metabolism and hemorheology in diabetic rats with myocardial ischemia. **Methods:** Female Goto-Kakizaki rats with type 2 diabetes were divided into three groups according to experimental requirements: control group, myocardial ischemia group and dapagliflozin group. The rat SBP, MAP and DBP were evaluated by the right common carotid artery hemodynamic system. The systolic and diastolic function of rats were monitored by a recording system operated by LabScribe 2 software. The percentage of myocardial infarction area and myocardial injury score were detected by TTC staining and histology. The apoptosis of rat cardiomyocytes was measured by TUNEL assay. Detect the ATP content, ADP/ATP ratio, mitochondrial membrane potential MMP in rat myocardium by measuring kit and fluorescence tracking. The protein expressions of mitochondrial cleavage fusion factor mitochondrial protein 2 (Mitochondrial protein 2, MFN2), optic nerve atrophy 1 (OPA1) and Dynein-related protein 1 (DRP1) were analyzed by western blot. The transcription of energy metabolism-related factors PGC1- α and CPT-1 in rat cardiomyocytes was analyzed by RT-PCR. **Results:** Compared with the control group, the SBP and MAP of the myocardial ischemia group were increased ($P<0.05$), and the dapagliflozin group was lower than the myocardial ischemia group ($P<0.05$). Compared with the control group, the myocardial ischemia group There was no difference in the DBP of the gliflozin group ($P>0.05$). Compared with the control group, the LVEF of the myocardial ischemia group was lower($P<0.05$), and the LVIDs, LVPWs and LVPWd were

* 基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2019JM-530);陕西省分子心脏病学重点实验室开放课题基金项目(KLMC-2018-04)

作者简介:白净(1985-),女,硕士,主治医师,研究方向:心血管内科相关疾病,电话:17791898169,E-mail:bjing168168@126.com

Δ 通讯作者:徐晶(1987-),女,硕士,主治医师,研究方向:心血管内科相关疾病,电话:18091885965,E-mail:xujing871008@163.com

(收稿日期:2021-04-04 接受日期:2021-04-28)

increased($P<0.05$). The LVEF of the dapagliflozin group was higher than that of the myocardial ischemia group($P<0.05$). LVIDs, LVPWs and LVPWd decreased ($P<0.05$). Compared with the control group, the infarct area and tissue damage score of the myocardial ischemia group were higher ($P<0.05$), and the infarct area and tissue damage score of the dapagliflozin group were lower than that of the myocardial ischemia group ($P<0.05$). Compared with the control group, the number of TUNEL positive cells in the myocardial ischemia group increased ($P<0.05$). In addition, compared with the myocardial ischemia group, the number of TUNEL positive cells in the dapagliflozin group was reduced ($P<0.05$). Mitochondrial membrane potential MMP. Compared with the control group, the ATP content and MMP of the myocardial ischemia group were lower ($P<0.05$), and the ADP/ATP ratio was increased ($P<0.05$). The ATP content and MMP of the dapagliflozin group were higher than the myocardial ischemia group ($P<0.05$), the ADP/ATP ratio decreased($P<0.05$). Compared with the control group, the protein expression of MFN2 and OPA1 was lower in the myocardial ischemia group ($P<0.05$), and the protein expression of DRP1 was increased ($P<0.05$). The protein expression of MFN2 and OPA1 in the dapagliflozin group was higher than that in the myocardial ischemia group ($P<0.05$), the expression of DRP1 protein decreased ($P<0.05$). The mRNA expression of PGC1- α and CPT-1 in the myocardial ischemia group was lower than that in the control group ($P<0.05$), and the mRNA expression of PGC1- α and CPT-1 in the dapagliflozin group was higher than that in the myocardial ischemia group($P<0.05$). **Conclusion:** Dapagliflozin administration can reduce the myocardial infarction area in diabetic rats with myocardial ischemia, enhance ventricular function and myocardial cell energy metabolism, and play a cardioprotective effect.

Key words: Dapagliflozin; Myocardial ischemia; Diabetes; Hemodynamics; Mitochondria

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R587.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)22-4223-06

前言

钠葡萄糖共转运蛋白 2 抑制剂 (Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibitor, SGLT2-i) 是一类新型的抗糖尿病药物, 其通过抑制肾单位近端小管的葡萄糖重吸收而表现出降低血糖的作用, 从而导致肾葡萄糖重吸收减少并增加肾葡萄糖排泄, 从而改善血糖控制^[1]。最近的一项临床试验表明, SGLT2-i 达格列净降低了心血管事件高风险的 2 型糖尿病患者的心血管发病率和死亡率^[2]。试验报告了 SGLT-2 抑制剂达格列净的心血管益处, 通过降低糖尿病合并心血管疾病的患者与心力衰竭, 心血管原因死亡率和全因死亡率相关的住院率^[3]。缺血性心脏病是全球死亡率的主要原因, 每年超过 1500 万例。当任何冠状动脉闭塞的时间足以引起心肌细胞死亡时, 就会发生急性心肌梗塞^[4]。急性心肌梗死的当前治疗方法是使血液循环回到心脏, 这一过程被称为再灌注。这可以通过外科手术和通过经皮冠状动脉介入治疗或抗血小板或抗血栓形成治疗进行球囊血管成形术来完成^[5]。动物研究表明, SGLT-2 抑制剂与减轻心肌缺血严重程度的心脏保护作用之间可能存在关联^[6]。达格列净预处理四周可以减轻患有心脏胰岛素抵抗的肥胖胰岛素抵抗大鼠的梗死面积^[7]。在大鼠的慢性心肌梗塞模型中, 达格列净治疗于左冠状动脉左前降支结扎后 1 天开始, 可减少成纤维细胞浸润和心肌纤维化^[8]。即使在没有糖尿病的情况下, 从葡萄糖代谢到脂肪酸代谢的转变也会导致缺血性损伤的严重性, 并且可能损害缺血期间和之后的功能恢复^[9]。这在缺血心肌的再灌注阶段尤为明显, 糖尿病引起的能量代谢改变会影响心脏承受心肌缺血损伤的能力^[10]。尽管 SGLT2-i 的益处可能是通过心脏代谢调节来实现的, 但与其他抗糖尿病药物相比, 达格列净的这种作用, 尤其是在心肌缺血的糖尿病疾病中很少被研究过。这项研究旨在评估达格列净对糖尿病合并心肌缺血大鼠心肌细胞能量代谢及血液流变学的作用研究。

1 材料和方法

1.1 实验大鼠

实验使用 2 型糖尿病雌性 Goto-Kakizaki (GK) 大鼠 (GK / Par 子系; 8-10 周龄)。将动物饲养在温度可控的通风柜中 (22-24℃), 并暴露于 12:12 h 的明暗循环中。动物可以自由获取食物和水。所有涉及动物的程序均已获得大学动物实验伦理委员会的批准, 并符合《实验动物的护理和使用指南》。

1.2 心肌 I / R 手术程序

通过肌肉内施用 Zoletil (50 mg/kg) 和 Xylazine (0.15 mg/kg) 麻醉大鼠。通过确定呼吸模式, 眼睛和脚踏板反射来密切监测麻醉水平。在进行气管造口术之后, 用来自啮齿动物呼吸机的室内空气对大鼠进行呼吸。研究期间使用带有 Chart 7.0 程序 (澳大利亚 AD 仪器) 的 PowerLab 系统记录了 Lead II ECG。在第四肋间隙行左侧开胸手术, 切开心包以暴露心脏。结扎在距其起点 0.2 cm 的左冠状动脉前降支 (LAD) 处进行。II 导联心电图上的 ST 段抬高和心肌组织的颜色变化用于确认成功的缺血, 并且缺血持续进行 30 分钟。释放绑带以诱导再灌注 2 h。

1.3 实验分组

根据实验要求, 将 GK 大鼠分为三组: 对照组 (GK 大鼠作为实验对照, 给予假手术处理, 并进行生理盐水腹腔注射, $n=10$), 心肌缺血组 (该组大鼠进行 I / R 手术程序, $n=10$), 达格列净组 (GK 大鼠进行 I / R 手术程序前, 将达格列净溶解在 1 mL 生理盐水中, 并通过左股静脉注射给药 1 mg/kg 达格列净, $n=10$)。

1.4 实验方法

1.4.1 在 I / R 期间用于低压功能评估的压力 - 容积 (PV) 回路
在心肌 I / R 研究期间, 使用基于导纳的 P-V 导管 (加拿大, Ontorio, Transonic Scisense) 来研究整个协议中的 LV 功能。麻醉大鼠后, 确定右颈总动脉 (Rt. CCA)。P-V 环导管插入 Rt. CCA 并进入左室进行血流动力学监测。导管连接到由 LabScribe 2 软件操作的记录系统 (。左室功能参数包括收缩压 (SBP) 和平均动脉压 (MAP), 舒张压 (DBP)。

1.4.2 超声心动图和血流动力学测量 通过超声心动图(Vi-sualSonics,加拿大)确定心脏功能,并通过 1.4 法国显微压力计(美国)在缺血/再灌注后的不同时间点确定侵入性血流动力学。在 Vevo 2100 超声系统上使用 30 aMHz 传感器在麻醉下进行超声心动图检查。

1.4.3 梗死面积测量 在 I/R 实验结束时,将心脏取出并用 0.9%的 NSS 冷水冲洗,以冲洗掉腔室和大血管中的残留血液。LAD 在缺血期间先前使用的同一部位被再次阻塞。将导管插入主动脉,并用 1% Evans 蓝染料输注进行逆行灌注。不能注入染料区域被定义为缺血期间无血流的区域。将心脏冷冻并水平切成从顶端到闭塞部位上方 1 毫米的 1 毫米厚的薄片。将心脏切片在 37℃,1%氯化三苯四唑(TTC)中孵育 15 分钟。孵育后,具有活组织的区域为红色,而未被伊文思蓝染色的区域定义为危险区域(AAR)。既不是蓝色也不是红色的区域(白色区域)被定义为梗塞部位。心肌梗塞大小使用 Image 工具软件 3.0 版进行测量,并根据每个组织切片的重量进行计算。心肌梗塞面积的水平表示为每 AAR 心肌梗塞面积的百分比。

1.4.4 组织损伤评分 切开 4 μ m 的心肌组织切片并用苏木精和曙红染色,参照技术,对样品进行盲法分析以确定心肌损伤的程度。简略地,对与心肌组织相对应的 24 个区域进行分级心肌损伤程度取决于以下参数:心肌纤维紊乱,局部波浪状变化,部分肌纤维溶解和液化,心肌间质可能出现少量红细胞,得分越高表示损伤越严重,最大得分为 4 (0, 组织病理学变化 <10%;1, 10%-25%;2, 25%-50%;3, 50%-75%;4, 75%-100%)。

1.4.5 线粒体膜电位的测定 使用基于荧光的方法来追踪线粒体的行为来测量线粒体膜电位 MMP。不久,在分离的心肌细胞中加载了可透过膜的单波长荧光染料 JC-1 (5 μ M, 持续 30 分钟),并用共聚焦荧光显微镜(Leica TCS SP5)成像。探针在 488 nm 处激发,并在 535 nm 和 585 nm 处检测到红色荧光图像,并使用羰基氰化物 4-(三氟甲氧基)苯基 phenyl (FCCP; 5 μ M)进行校准。

1.4.6 测量离体心肌细胞中 ADP / ATP 的比率 使用 ADP / ATP 比率测定试剂盒(ab65313)确定分离的左心室心肌细胞中的 ADP 与 ATP 比率。在这里,荧光素酶催化 ATP 和荧光素的

转化为光,使用发光计进行测量。通过将 ADP 水平转化为 ATP 来测量 ADP 水平,使用相同的反应检测到 ADP 水平。在 SpectraMax Plus384 酶标仪中于 570 nm 读取吸光度。使用 ATP 生物发光测定试剂盒(Beyotime,中国)测量心肌的 ATP 含量。

1.4.7 蛋白质印迹分析 将一块左心室组织(约 60 mg)在 RIPA 裂解缓冲液中匀浆,并在 4℃下以 14,000 rpm 离心 15 分钟。使用 Pierce BCA 蛋白测定试剂盒确定上清液中的总蛋白浓度。所有蛋白质印迹均在分离的心肌细胞中进行。首先将细胞收集在裂解缓冲液中,将其匀浆。将匀浆在 4℃下以 12,000 $\times$ g 离心 15 分钟。通过 Bradford 测定法将上清液用于测定蛋白质浓度。在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上使用等量的蛋白质制剂,电转移到聚偏二氟乙烯膜上,并用抗 OPA1(sc-166644, 1:1000),Mfn-2 (sc-100560, 1:1000),DRP1(sc-98900, 1:1000)和 β -肌动蛋白(Santa Cruz, sc-47778, 1:5000)。通过化学发光反应(ECL 试剂盒, Amersham Pharmacia, USA)检测免疫反应性条带。

1.4.8 RNA 分离、反转录和定量 PCR 根据制造商的说明,用 Trizol 试剂提取总 RNA,并使用 RNeasy 试剂盒纯化。根据制造商的说明合成了第一链 cDNA。使用 SYBR green PCR 技术进行定量 PCR 分析。根据制造商的说明,使用 MyiQ 软件可以实现相对定量。通过 β -肌动蛋白水平对数据进行标准化,并表示为相对于对照的百分比。对于每种实验条件,所有 PCR 至少一式三份进行。

1.5 统计分析

数据报告为平均值 $\pm$ 标准误差。使用 SPSS 统计软件(版本 22)对数据进行分析。所有进行的统计学检验均采用两尾法,当 P 值小于 0.05 时,结果被认为具有统计学意义($P<0.05$)。

2 结果

2.1 达格列净对血液流变学影响

心肌缺血组较对照组的 SBP、MAP 升高($P<0.05$),达格列净组较心肌缺血组降低($P<0.05$),与对照组相比,心肌缺血组和达格列净组的 DBP 比较无差异($P>0.05$)。数据表明达格列净改善糖尿病 I/R 损伤大鼠的血压异常。(表 1)。

表 1 糖尿病 I/R 损伤大鼠的血压测量(mmHg)
Table 1 Blood Pressure Measurement in Diabetic I/R Injury (mmHg)

Groups	n	SBP	MAP	DBP
Control group	10	126.63 $\pm$ 4.28	105.37 $\pm$ 3.78	94.19 $\pm$ 2.46
Daglenet group	10	147.25 $\pm$ 5.34	122.38 $\pm$ 4.12	98.27 $\pm$ 3.03
Myocardial ischemia group	10	124.18 $\pm$ 4.02	103.59 $\pm$ 3.66	96.56 $\pm$ 2.85
F		13.492	11.517	9.358
P		0.014	0.006	0.326

2.2 超声心动图评估大鼠心脏功能

心肌缺血组较对照组 LVEF 降低($P<0.05$),LVIDs、LVPWs 和 LVPWd 升高($P<0.05$),达格列净组较心肌缺血组的 LVEF 升高($P<0.05$),LVIDs、LVPWs 和 LVPWd 降低($P<0.05$)。(表 2)。

2.3 达格列净降低 I/R 对糖尿病大鼠的心肌损伤

心肌缺血组较对照组的梗塞面积占比和组织损伤评分升高($P<0.05$),达格列净组较心肌缺血组梗塞面积、组织损伤评分降低($P<0.05$),达格列净预处理降低了 I/R 糖尿病大鼠的心肌损伤。(表 3)。

表 2 超声心动图评估大鼠心脏收缩舒张功能

Table 2 Echocardiographic Evaluation of cardiac systolic diastolic function in rats

Group	n	LVEF(%)	LVIDs(cm)	LVPWs(cm)	LVPWd(cm)
Control group	10	87.26± 5.17	0.26± 0.01	0.37± 0.03	0.22± 0.01
Daglenet group	10	77.45± 4.23	0.48± 0.06	0.56± 0.07	0.27± 0.03
Myocardial ischemia group	10	90.52± 5.08	0.28± 0.02	0.35± 0.02	0.23± 0.01
F		14.382	10.725	11.382	9.549
P		0.026	0.017	0.008	0.035

表 3 达格列净降低 I/R 对糖尿病大鼠的心肌损伤

Table 3 I/R reduces myocardial injury in diabetic rats

Groups	n	Share of the infarction area(%)	Myocardial injury and tissue score
Control group	10	21.36± 3.24	2.23± 0.24
Daglenet group	10	48.82± 4.17	3.04± 0.31
Myocardial ischemia group	10	17.51± 2.61	1.98± 0.16
F		13.925	10.183
P		0.012	0.003

2.4 TUNEL 阳性细胞用于评估心肌细胞凋亡

与对照组相比, 心肌缺血组 TUNEL 阳性细胞数量增多

($P<0.05$)。此外, 与心肌缺血组相比, 达格列净组的 TUNEL 阳性细胞数量降低($P<0.05$)。(图 1)。

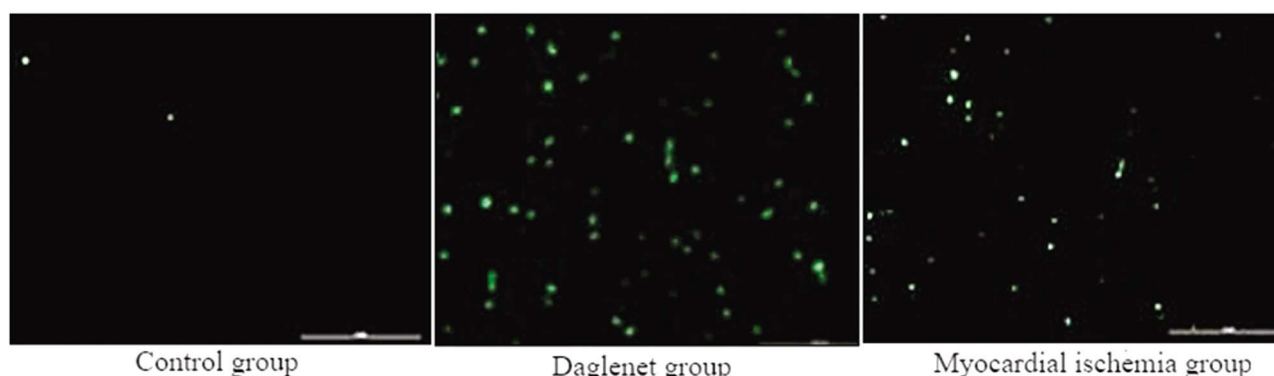


图 1 TUNEL 阳性细胞用于评估心肌细胞凋亡

Fig.1 TUNEL positive cells are used to assess cardiomyocyte apoptosis

2.5 达格列净对心肌细胞能量代谢的影响

心肌缺血组较对照组的 ATP 含量和 MMP 降低($P<0.05$),

含量和 MMP 升高($P<0.05$), ADP / ATP 比率降低($P<0.05$)。达

格列净保护心肌细胞的能量代谢。(表 4)。

ADP / ATP 比率升高($P<0.05$), 达格列净组较心肌缺血组 ATP

表 4 达格列净保护大鼠心肌细胞的能量代谢

Table 4 Energy metabolism of myocardial ocytes in rats

Group	n	ATP× 10 ³ (nmol/g)	ADP/ATP	MMP
Control group	10	6.25± 0.34	1.02± 0.01	1.32± 0.04
Daglenet group	10	3.14± 0.18	2.35± 0.20	0.95± 0.01
Myocardial ischemia group	10	5.83± 0.31	1.62± 0.13	1.46± 0.07
F		12.628	10.394	9.413
P		0.025	0.018	0.006

2.6 达格列净对 I/R 损伤大鼠心脏线粒体裂变和融合蛋白表达的影响

心肌缺血组较对照组 MFN2 和 OPA1 的蛋白表达降低($P<0.05$), DRP1 蛋白表达升高($P<0.05$), 达格列净组较心肌缺

血组MFN2 和 OPA1 的蛋白表达升高 ($P<0.05$),DRP1 蛋白表达降低($P<0.05$)。(表 5)。

2.7 RT-PCR 分析心肌细胞能量代谢相关因子的转录

心肌缺血组较对照组 PGC1- α 和 CPT-1 的 mRNA 表达降低 ($P<0.05$), 达格列净组较心肌缺血组 PGC1- α 和 CPT-1 的 mRNA 表达升高($P<0.05$)。(表 6)。

表 5 蛋白印迹分析线粒体裂解和融合蛋白的表达

Table 5 Protein Imprint Analysis of Mitochondrial Cracking and Fusion Protein Expression

Groups	n	MFN2	OPA1	DRP1
Control group	10	2.14 $\pm$ 0.25	1.97 $\pm$ 0.21	1.05 $\pm$ 0.03
Daglenet group	10	1.23 $\pm$ 0.12	1.06 $\pm$ 0.07	1.94 $\pm$ 0.21
Myocardial ischemia group	10	1.96 $\pm$ 0.16	1.84 $\pm$ 0.15	1.16 $\pm$ 0.05
F		11.681	13.493	10.578
P		0.011	0.002	0.036

表 6 RT-PCR 分析代谢相关因子

Table 6 RT-PCR Analysis of Metabolic - Related Factors

Groups	n	PGC1- α	CPT-1
Control group	10	2.13 $\pm$ 0.23	1.97 $\pm$ 0.20
Daglenet group	10	1.15 $\pm$ 0.11	1.24 $\pm$ 0.13
Myocardial ischemia group	10	1.96 $\pm$ 0.20	1.88 $\pm$ 0.18
F		12.739	11.254
P		0.012	0.008

3 讨论

2 型糖尿病是心血管疾病和死亡的重要独立危险因素之一。研究表明,由于暴露于异常的底物和细胞因子,导致 2 型糖尿病患者更容易遭受 I/R 的损伤^[1]。然而,在临床环境中不能很好地开发出可以减少糖尿病情况下心脏 I/R 损伤的有效策略。SGLT-2 抑制剂的心脏保护作用归因于它通过糖尿和利尿引起的全身作用^[12]。然而,在这项研究中发现的达格列净的益处可能主要是由于它对心脏的直接作用。我们的结果表明,心脏 I/R 损伤期间的达格列净治疗具有心脏保护作用。在这项研究中获得的数据的关键方面可以总结如下:(1)LVEF 的增加表明左心室血流动力学的改善;(2) 心肌梗塞面积和胞凋亡的减少,(3) 心脏线粒体功能障碍降低;(4) 通过 PGC1- α 和 CPT-1 的表达增加来证明心脏能量代谢功能障碍的减轻;(5) 线粒体融合增加表明心脏线粒体动态失衡减弱。2 型糖尿病 GK 大鼠的心肌对缺血再灌注损伤的耐受性受损,并且与能量代谢改变有关,其特征是高能量化合物含量降低。确实,线粒体功能障碍已被广泛提出来解释糖尿病患者心力衰竭的机制。对 2 型糖尿病动物的研究还显示,线粒体呼吸链复合物的表达降低,并且通过 PGC1 α 引起线粒体的生物发生。

心脏线粒体是重要的细胞器,可提供能量以支持心脏跳动时 ATP 的高消耗^[13]。不可逆的线粒体功能障碍是心肌 I/R 损伤期间心肌细胞死亡的关键事件^[14]。结合先前的 EMPA-REG OUTCOME 试验可知;SGLT-2 抑制剂对 2 型糖尿病、缺血性心力衰竭和心力衰竭患者心功能的改善方面有积极作用^[15]。相关研究显示:达格列净还减少了心肌的氧化应激,纤维化和血

管重塑,并在心血管疾病的发病机理中发挥重要作用,如:其在心脏 I/R 损伤中的主要作用目的是减轻心肌梗死的面积^[16,17]。尽管先前的报道已经显示达格列净预处理在 I/R 损伤期间通过减小心肌梗死面积具有有益效果,但尚不清楚在心脏缺血后给予的效果。

本研究结果表明:在达格列净组中,心脏 I/R 损伤引起的线粒体功能障碍减少,与上述研究结论一致。结合相关研究^[18]就线粒体生物发生而言,与线粒体代谢相关的蛋白质 PGC1- α 和 CPT1 是在心脏脂肪酸氧化中起作用的重要蛋白质,而本研究中,达格列净治疗可提高 PGC1- α 和 CPT1 蛋白的表达,表明当发生 I/R 损伤时,其在减轻心脏能量代谢的耗竭中起作用;且在接受达格列净治疗的大鼠显示 SBP、MAP 降低,表明达格列净对 I/R 损伤 GK 大鼠血液流动学具有保护作用,先前的研究表明^[19]达格列净治疗由于利尿作用导致血压降低,与我们的结果相似。裂变与融合之间的平衡保持了线粒体数目的维持^[20]。这些循环通过消除受损的线粒体并在受到压力时促进细胞凋亡来保持线粒体功能^[21]。有助于外膜和内膜融合蛋白分别是 MFN2 和 OPA1,而在裂变过程中在膜收缩中起作用的蛋白是 DRP1^[22]。通过使用线粒体裂解抑制剂可以在 I/R 损伤和心脏骤停期间保存心肌细胞^[23]。前人研究表明,达帕格列净治疗 1 个月可降低心脏 I/R 损伤的代谢综合征大鼠的 DRP1 降低以及 MFN2 和 OPA1 蛋白表达,从而证明了心脏线粒体裂变的升高和线粒体融合的减弱^[24]。本研究表明达格列净对线粒体动力学、蛋白质相关表达、生物发生和功能方面均有改善作用,这可能是达格列净治疗导致梗死面积缩小的关键因素。此外,关于达格列净,以前的研究表明^[25],该药物不仅对糖尿病模型中的

葡萄糖降低具有有益作用,而且还具有多营养作用,例如减轻体重,降低血压,改善代谢调节,在非糖尿病患者中具有肾脏保护和神经保护作用,与本研究结果一致。

综上,本研究表明,心脏 I/R 损伤期间的急性达格列净给药可减轻 2 型糖尿病大鼠的心肌梗死面积,增强左心室功能,从而发挥心脏保护作用。保护机制是由于凋亡性心肌细胞减少,心脏线粒体功能障碍,心脏能量代谢功能障碍和心脏线粒体动态失衡引起的。因此,这些发现为达格列净在急性心肌梗死患者的治疗提供重要的动物实验依据。

参考文献(References)

- [1] Chuang TL, Chuang MH, Koo M, et al. Association of bone mineral density and trabecular bone score with cardiovascular disease[J]. *Ci Ji Yi Xue Za Zhi*, 2020, 32: 234-239
- [2] Blond K, Brinkløv CF, Ried-Larsen M, et al. Association of high amounts of physical activity with mortality risk: a systematic review and meta-analysis[J]. *Br J Sports Med*, 2020, 54: 1195-1201
- [3] Li Y, Xiong Z, Yan W, et al. Branched chain amino acids exacerbate myocardial ischemia/reperfusion vulnerability via enhancing GCN2/ATF6/PPAR- α pathway-dependent fatty acid oxidation [J]. *Theranostics*, 2020, 10: 5623-5640
- [4] Becher T, Palanisamy S, Kramer DJ, et al. Brown adipose tissue is associated with cardiometabolic health[J]. *Nat Med*, 2021, 27: 58-65
- [5] Kimura Y, Kuno A, Tanno M, et al. Canagliflozin, a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, normalizes renal susceptibility to type 1 cardiorenal syndrome through reduction of renal oxidative stress in diabetic rats[J]. *J Diabetes Investig*, 2019, 10: 933-946
- [6] Fourny N, Lan C, Kober F, et al. Cardiac remodeling and higher sensitivity to ischemia-reperfusion injury in female rats submitted to high-fat high-sucrose diet: An in vivo/ex vivo longitudinal follow-up [J]. *J Nutr Biochem*, 2019, 69: 139-150
- [7] El Hadi H, Vettor R, Rossato M. Cardiomyocyte mitochondrial dysfunction in diabetes and its contribution in cardiac arrhythmogenesis [J]. *Mitochondrion*, 2019, 46: 6-14
- [8] Viglino C, Foglia B, Montessuit C. Chronic AICAR treatment prevents metabolic changes in cardiomyocytes exposed to free fatty acids[J]. *Pflugers Arch*, 2019, 471: 1219-1234
- [9] Wang C, Zhu L, Yuan W, et al. Diabetes aggravates myocardial ischemia reperfusion injury via activating Nox2-related programmed cell death in an AMPK-dependent manner [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24: 6670-6679
- [10] Ljubkovic M, Gressette M, Bulat C, et al. Disturbed Fatty Acid Oxidation, Endoplasmic Reticulum Stress, and Apoptosis in Left Ventricle of Patients With Type 2 Diabetes [J]. *Diabetes*, 2019, 68: 1924-1933
- [11] Anholm C, Kumarathurai P, Samkani A, et al. Effect of liraglutide on estimates of lipolysis and lipid oxidation in obese patients with stable coronary artery disease and newly diagnosed type 2 diabetes: A randomized trial[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2019, 21: 2012-2016
- [12] Santos-Gallego CG, Requena-Ibanez JA, San Antonio R, et al. Empagliflozin Ameliorates Adverse Left Ventricular Remodeling in Nondiabetic Heart Failure by Enhancing Myocardial Energetics [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73: 1931-1944
- [13] Oshima H, Miki T, Kuno A, et al. Empagliflozin, an SGLT2 Inhibitor, Reduced the Mortality Rate after Acute Myocardial Infarction with Modification of Cardiac Metabolomes and Antioxidants in Diabetic Rats[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2019, 368: 524-534
- [14] Abumrad NA, Cabodevilla AG, Samovski D, et al. Endothelial Cell Receptors in Tissue Lipid Uptake and Metabolism[J]. *Circ Res*, 2021, 128: 433-450
- [15] Wang SY, Zhu S, Wu J, et al. Exercise enhances cardiac function by improving mitochondrial dysfunction and maintaining energy homeostasis in the development of diabetic cardiomyopathy [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2020, 98: 245-261
- [16] Sorop O, van de Wouw J, Chandler S, et al. Experimental animal models of coronary microvascular dysfunction [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116: 756-770
- [17] Roberto S, Milia R, Doneddu A, et al. Hemodynamic abnormalities during muscle metaboreflex activation in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2019, 126: 444-453
- [18] Wang F, Pulinilkunnil T, Flibotte S, et al. Heparanase protects the heart against chemical or ischemia/reperfusion injury [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 131: 29-40
- [19] Tan Y, Lei C, Tang H, et al. The Hippo Pathway Orchestrates Mitochondrial Quality Control: A Novel Focus on Cardiovascular Diseases [J]. *DNA Cell Biol*, 2020, 39: 1494-1505
- [20] Ketelhuth DFJ. The immunometabolic role of indoleamine 2,3-dioxygenase in atherosclerotic cardiovascular disease: immune homeostatic mechanisms in the artery wall [J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115: 1408-1415
- [21] Mukai H, Dai L, Chen Z, et al. Inverse J-shaped relation between coronary arterial calcium density and mortality in advanced chronic kidney disease[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2020, 35: 1202-1211
- [22] Zhang XL, Shen Y, Ma XJ, et al. Low serum osteocalcin levels are correlated with left ventricular systolic dysfunction and cardiac death in Chinese men[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40: 486-491
- [23] Guo W, Zhang B, Wang X. Lower irisin levels in coronary artery disease: a meta-analysis[J]. *Minerva Endocrinol*, 2020, 45: 61-69
- [24] Ansari M, Kurian GA. Mechanism of Hydrogen Sulfide Preconditioning-Associated Protection Against Ischemia-Reperfusion Injury Differs in Diabetic Heart That Develops Myopathy [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2020, 20: 155-167
- [25] Veloso CD, Belew GD, Ferreira LL, et al. A Mitochondrial Approach to Cardiovascular Risk and Disease [J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25: 3175-3194