

PPAR γ -TLR4-TNF- α 靶向路径在高糖血症致心肌炎症反应和氧化应激中的作用

刘长乐 刘瑞蒙 吴小寒 谭沛泽 富华颖 王兴华 刘彤 李广平

300211 天津心血管病离子与分子机能重点实验室,天津心脏病学研究所,天津医科大学第二医院心脏科(刘长乐、刘瑞蒙、吴小寒、富华颖、王兴华、刘彤、李广平);300011 天津市急救中心(谭沛泽)

通讯作者:刘长乐,Email:lcl1979_2001@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.05.005

【摘要】 目的 探讨过氧化物酶体增殖物激活受体 γ -Toll 样受体 4-肿瘤坏死因子- α (PPAR γ -TLR4-TNF- α) 靶向路径在高糖血症兔心肌炎症反应和氧化应激中的作用及其机制。**方法** 健康成年日本长耳大白兔 32 只,按随机数字表法分为正常对照组(NC 组)、糖尿病组(DM 组)、糖尿病+吡格列酮 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组(DM+PGZ 4 mg 、 8 mg 组),每组 8 只。经家兔耳缘静脉注射 150 mg/kg 四氧嘧啶制备糖尿病模型;DM+PGZ 4 mg 、 8 mg 组分别于制模成功当天喂服相应剂量吡格列酮;NC 组不进行任何干预。8 周后取动物左侧颈内及颈外静脉分叉处静脉血和心房组织,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 TNF- α 、白细胞介素-1(IL-1)、脂联素(ADP)、一氧化氮(NO)、总一氧化氮合酶(NOS)水平,采用比色法测定髓过氧化物酶(MPO)活性,采用羟胺法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性,采用硫代巴比妥酸比色法测定丙二醛(MDA)含量,采用紫外分光光度法测定过氧化氢酶(CAT)活性,采用实时定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 TNF- α 和 TLR4 的 mRNA 表达。**结果** ① 模型动物血清和心肌 TNF- α 、IL-1 水平均明显升高,ADP 水平明显降低,且心肌 TNF- α 和 TLR4 的 mRNA 表达亦明显升高,说明炎症反应明显。吡格列酮干预组动物炎症反应均明显减轻,DM+PGZ 4 mg 、 8 mg 组血清及心肌 TNF- α 和 IL-1 水平均较 DM 组明显降低[TNF- α : 血清(ng/L)为 268.33 ± 46.57 、 261.34 ± 33.73 比 331.40 ± 69.05 ,心肌(ng/L)为 144.72 ± 26.90 、 139.59 ± 14.59 比 177.48 ± 27.40 ;IL-1: 血清(ng/L)为 24.40 ± 2.56 、 23.35 ± 3.13 比 30.08 ± 5.44 ,心肌(ng/L)为 21.26 ± 2.85 、 20.54 ± 2.75 比 24.78 ± 3.60 ,均 $P < 0.05$],ADP 水平明显升高[血清($\mu\text{g/L}$): 19.64 ± 8.85 、 20.54 ± 7.47 比 15.45 ± 3.06 ,心肌($\mu\text{g/L}$): 10.31 ± 2.22 、 11.49 ± 3.42 比 7.76 ± 1.77 ,均 $P < 0.05$],心肌 TNF- α 和 TLR4 的 mRNA 表达亦明显降低(TNF- α mRNA: 0.15 ± 0.05 、 0.14 ± 0.06 比 0.25 ± 0.09 ,TLR4 mRNA: 0.57 ± 0.17 、 0.40 ± 0.18 比 0.75 ± 0.35 ,均 $P < 0.05$)。② 模型动物血清和心肌氧化应激明显增加,SOD、NO、总 NOS 水平均明显降低,CAT、MDA 水平仅在血清中出现明显波动,但对 MPO 无明显影响。DM+PGZ 4 mg 、 8 mg 组血清及心肌 SOD 和 NO 水平均较 DM 组明显升高[SOD: 血清(U/L)为 571.39 ± 40.85 、 609.28 ± 54.47 比 535.10 ± 37.08 ,心肌(U/mg)为 55.74 ± 8.12 、 53.60 ± 9.87 比 42.26 ± 12.34 ;NO: 血清($\mu\text{mol/L}$)为 2.95 ± 0.51 、 2.99 ± 0.43 比 2.03 ± 0.78 ,心肌(nmol/mg): 1.95 ± 0.37 、 2.11 ± 0.26 比 1.56 ± 0.33 ,均 $P < 0.05$],血清 MDA 水平较 DM 组明显降低($\mu\text{mol/L}$: 20.11 ± 2.34 、 19.70 ± 2.02 比 23.07 ± 3.06 ,均 $P < 0.05$),但对 CAT 无明显改善作用。两个剂量吡格列酮干预组间炎症和氧化应激指标比较差异均无统计学意义。**结论** $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的吡格列酮即可激活 PPAR γ -TLR4-TNF- α 靶向路径,从而抑制炎症和氧化应激因子表达,下调高糖血症诱发的心肌炎症和氧化应激水平,未见明显剂量依赖性。

【关键词】 心房颤动; 糖尿病; 炎症; 氧化应激; 吡格列酮

基金项目: 国家自然科学基金(30900618, 81270245);天津市应用基础与前沿技术研究计划项目(15JCQNJC10200)

Effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ -toll-like receptor 4-tumor necrosis factor- α targeted pathway on hyperglycemia induced myocardium inflammation and oxidative stress Liu Changle, Liu Ruimeng, Wu Xiaohan, Tan Peize, Fu Huaying, Wang Xinghua, Liu Tong, Li Guangping
Tianjin Key Laboratory of Ionic-Molecular Function of Cardiovascular Disease, Tianjin Institute of Cardiology, Department of Cardiology, Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China (Liu CL, Liu RM, Wu XH, Fu HY, Wang XH, Liu T, Li GP); Tianjin First-aid Center, Tianjin 300011, China (Tan PZ)
Corresponding author: Liu Changle, Email: lcl1979_2001@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the potential effects and mechanism on peroxisome proliferator-activated receptor γ -toll-like receptor 4-tumor necrosis factor- α (PPAR γ -TLR4-TNF- α) targeted pathway on hyperglycemia induced myocardium inflammation and oxidative stress. **Methods** Thirty-two Japanese healthy adult rabbits were randomly divided into four groups with 8 rabbits in each group: normal control group (NC group), diabetes mellitus group (DM group), diabetes mellitus + pioglitazone $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ groups (DM+PGZ 4 mg and

8 mg groups). DM model was reproduced by alloxan of 150 mg/kg through auricular vein injection. On the same day of successful DM model reproduction, the diabetic rabbits were fed with corresponding dose of pioglitazone in DM+PGZ 4 mg and 8 mg groups, but the rabbits in NC group were not challenged. After 8 weeks of feeding, venous blood of left jugular vein bifurcation and myocardium tissue were harvested respectively for the determination of inflammation and oxidative stress parameters. TNF- α , interleukin-1 (IL-1), adiponectin (ADP), nitric oxide (NO) and total nitric oxide synthase (NOS) levels were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), myeloperoxidase (MPO) activity was determined by colorimetric method, superoxide dismutase (SOD) activity was determined by hydroxylamine method, malondialdehyde (MDA) was determined by thiobarbituric acid colorimetric method, and catalase (CAT) activity was determined by UV spectrophotometry method. In addition, the mRNA expressions of TNF- α and TLR4 were determined by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR). **Results** ① IL-1 and TNF- α in serum and myocardium of model rabbits were significantly increased, ADP was significantly decreased, and the mRNA expressions of TNF- α and TLR4 in myocardium were significantly increased, indicating a significant inflammatory reaction. The inflammatory reaction in pioglitazone intervention groups was significantly reduced, TNF- α and IL-1 levels in serum and myocardium of DM+PGZ 4 mg and 8 mg groups were significantly decreased as compared with those of DM group [serum: TNF- α (ng/L) was 268.33 ± 46.57 , 261.34 ± 33.73 vs. 331.40 ± 69.05 , myocardium: TNF- α (ng/L) was 144.72 ± 26.90 , 139.59 ± 14.59 vs. 177.48 ± 27.40 ; serum: IL-1 (ng/L) was 24.40 ± 2.56 , 23.35 ± 3.13 vs. 30.08 ± 5.44 , myocardium: IL-1 (ng/L) was 21.26 ± 2.85 , 20.54 ± 2.75 vs. 24.78 ± 3.60 , all $P < 0.05$], and ADP levels were significantly increased [serum ($\mu\text{g/L}$): 19.64 ± 8.85 , 20.54 ± 7.47 vs. 15.45 ± 3.06 , myocardium ($\mu\text{g/L}$): 10.31 ± 2.22 , 11.49 ± 3.42 vs. 7.76 ± 1.77 , all $P < 0.05$], and the mRNA expressions of TNF- α and TLR4 in myocardium were significantly decreased (TNF- α mRNA: 0.15 ± 0.05 , 0.14 ± 0.06 vs. 0.25 ± 0.09 ; TLR4 mRNA: 0.57 ± 0.17 , 0.40 ± 0.18 vs. 0.75 ± 0.35 , all $P < 0.05$). ② Oxidative stress in serum and myocardium of model rabbits was significantly increased, SOD, NO, and total NOS levels were significantly decreased while the serum CAT and MDA levels were significantly increased without effect on MPO. Compared with the DM group, SOD and NO levels in serum and myocardium were significantly increased in DM+PGZ 4 mg and 8 mg groups [serum: SOD (U/L) was 571.39 ± 40.85 , 609.28 ± 54.47 vs. 535.10 ± 37.08 , myocardium: SOD (U/mg) was 55.74 ± 8.12 , 53.60 ± 9.87 vs. 42.26 ± 12.34 ; serum: NO ($\mu\text{mol/L}$) was 2.95 ± 0.51 , 2.99 ± 0.43 vs. 2.03 ± 0.78 , myocardium: NO (nmol/mg) was 1.95 ± 0.37 , 2.11 ± 0.26 vs. 1.56 ± 0.33 , all $P < 0.05$], the serum MDA levels were significantly decreased ($\mu\text{mol/L}$: 20.11 ± 2.34 , 19.70 ± 2.02 vs. 23.07 ± 3.06 , both $P < 0.05$), while no significant effect on CAT. There was no significant difference in parameter of inflammatory and oxidative stress between the two pioglitazone intervention groups. **Conclusion** 4 mg $\cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ pioglitazone could activate PPAR γ -TLR4-TNF- α targeted pathway, thus inhibit inflammatory and oxidative stress factors expression, and down-regulate hyperglycemia induced myocardium inflammatory and oxidative stress level, but the effect did not show a dose dependent manner.

【Key words】 Atrial fibrillation; Diabetes mellitus; Inflammation; Oxidative stress; Pioglitazone

Fund program: National Natural Science Foundation of China (30900618, 81270245); Applied Basic Research Program of Science and Technology Commission Foundation of Tianjin (15JCQNJC10200)

心房颤动(房颤)是临床上常见心律失常之一,可引起体循环血栓栓塞,增加脑卒中、心力衰竭的发生率和病死率。有数据显示,我国大约有1000万人罹患房颤,且发病率呈逐年升高趋势^[1]。糖尿病是房颤发生的独立危险因素之一,糖尿病患者房颤发生率较非糖尿病患者升高约3.4%^[2]。炎症和氧化应激是房颤发生及维持的关键^[3-6],而且在糖尿病及其并发症中发挥关键作用^[7],但具体机制尚不明确。以吡格列酮为代表的噻唑烷二酮类药物主要作用于过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ),除胰岛素增敏作用以外,还有抗炎、抗氧化应激作用。本研究观察吡格列酮对血清和心肌炎症、氧化应激标志物表达的影响,阐明 PPAR γ -Toll 样受体 4 (TLR4)-肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 靶向路径在高糖血症兔心肌炎症和氧化应激增加中的作用机制,为糖尿病合并房颤的防治提供新的方向和途径。

1 材料与方法

1.1 实验仪器及试剂: Optium Xceed 血糖仪(美国

Abbott Diabetes Care 公司)、电子体重计(北京电子仪器有限公司)。3% 戊巴比妥钠(天津化工原料器材厂),四氧嘧啶(美国 Sigma 公司),盐酸吡格列酮片(日本武田公司),超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、髓过氧化物酶(MPO)、TNF- α 、白细胞介素-1(IL-1)、脂联素(ADP)、一氧化氮(NO)、总一氧化氮合酶(NOS)测定试剂盒(南京建成科技有限公司)。

1.2 实验动物及分组: 选择健康成年日本长耳大白兔 32 只,雌雄不拘,体重 2.2 kg 左右,由军事医学科学院动物实验中心提供,合格证号: WJ 津实动质 R-A 准字第 001 号。按随机数字表法分为正常对照组(NC 组)、糖尿病组(DM 组)、糖尿病+吡格列酮 4 mg $\cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 8 mg $\cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组(DM+PGZ 4 mg、8 mg 组),每组 8 只。

1.3 动物模型的建立及处理: 用生理盐水溶解四氧嘧啶,经家兔耳缘静脉注射,制模剂量 150 mg/kg。于注射后 2 d 和 7 d 测量动物空腹血糖(FBG),两次

均 ≥ 11 mmol/L 或单次 ≥ 14 mmol/L 提示糖尿病模型建立成功;如注射后 7 d 动物 FBG 未达到上述标准,则再次给予 150 mg/kg 四氧嘧啶;如追加剂量后动物 FBG 仍未达到上述标准则退出实验。两个剂量吡格列酮组分别于糖尿病制模成功当天喂服相应剂量吡格列酮。NC 组不进行任何干预。所有家兔均在相同条件下饲养 8 周,每周复查 FBG 和体重,记录症状、体重变化及死亡情况。

本实验中动物处置方法均符合动物福利伦理要求,并通过天津医科大学第二医院动物实验伦理审查(审批号:2018-04)。

1.4 检测指标及方法:于制模前和模型建立 8 周后,分别抽取动物左侧颈内及颈外静脉分叉处静脉血 5 mL 和左心房组织 200 mg,分别用于炎症和氧化应激指标测定以及基因表达检测。

1.4.1 炎症和氧化应激指标测定:采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定 TNF- α 、IL-1、ADP、NO、总 NOS 水平;采用比色法测定 MPO 活性;采用羟胺法测定 SOD 活性;采用硫代巴比妥酸比色法测定 MDA 含量;采用紫外分光光度法测定 CAT 活性。所有操作均参照试剂盒说明书进行。

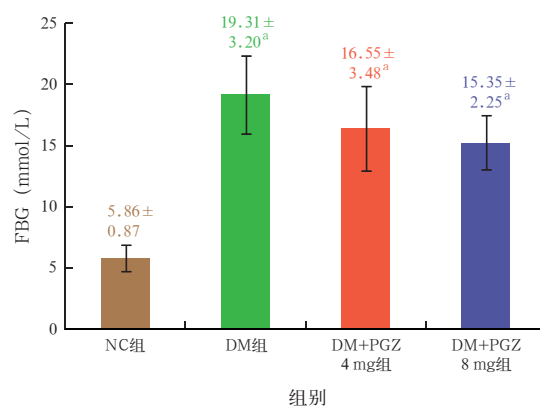
1.4.2 实时定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测动物心肌 TNF- α 和 TLR4 的 mRNA 表达:取 200 mg 液氮冷冻组织,低温匀浆,提取总 RNA,采用反转录试剂盒转录出总 mRNA 的 cDNA 池。根据 Genbank 中目的基因及内参基因 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的序列结构设计相应引物(日本 TaKaRa 公司)。循环扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。加入 1% 琼脂糖凝胶,100 V 电泳 40 s,分离 PCR 扩增产物。应用凝胶成像分析系统对 PCR 电泳条带进行灰度及密度扫描,以 TNF- α 、TLR4 与 GAPDH 表达的灰度值比值作为 TNF- α 、TLR4 的 mRNA 表达量。

1.5 统计学处理:应用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用 t 检验;计数资料采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 家兔模型建立及各组体重、FBG 比较:NC 组无家兔死亡;而 3 个糖尿病模型组制模后各有 2 只家兔死亡,均再次制模补充入组。各组家兔基线体重

无明显差异。图 1 显示,3 个糖尿病模型组家兔 FBG 均明显高于 NC 组(均 $P<0.01$);而 3 个糖尿病模型组间比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。



注:FBG 为空腹血糖;NC 组为正常对照组,DM 组为糖尿病组,DM+PGZ 4 mg、8 mg 组为糖尿病 + 吡格列酮 4 mg $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$ 和 8 mg $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$ 组;与 NC 组比较,^a $P<0.01$

图 1 不同剂量吡格列酮对糖尿病家兔 FBG 的影响

2.2 各组血清及心肌炎症和氧化应激指标比较

2.2.1 炎症标志物(表 1):DM 组家兔血清及心肌 TNF- α 和 IL-1 水平均明显高于 NC 组,ADP 水平明显低于 NC 组(均 $P<0.05$)。给予吡格列酮干预后,DM+PGZ 4 mg、8 mg 组血清及心肌 TNF- α 和 IL-1 水平均较 DM 组明显降低,心肌 ADP 水平明显升高(均 $P<0.05$),但对血清 ADP 无影响(均 $P>0.05$)。两个剂量吡格列酮干预组间炎症指标比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。

表 1 不同剂量吡格列酮对糖尿病家兔血清和心肌炎症指标的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 (只)	血清		
		TNF- α (ng/L)	IL-1 (ng/L)	ADP(μ g/L)
NC 组	8	221.92 $\pm$ 30.06	20.90 $\pm$ 2.07	27.33 $\pm$ 8.53
DM 组	8	331.40 $\pm$ 69.05 ^a	30.08 $\pm$ 5.44 ^a	15.45 $\pm$ 3.06 ^b
DM+PGZ 4 mg 组	8	268.33 $\pm$ 46.57 ^c	24.40 $\pm$ 2.56 ^d	19.64 $\pm$ 8.85
DM+PGZ 8 mg 组	8	261.34 $\pm$ 33.73 ^c	23.35 $\pm$ 3.13 ^d	20.54 $\pm$ 7.47
F 值		7.320	9.622	3.584
P 值		0.001	0.000	0.026

组别	动物数 (只)	心肌		
		TNF- α (ng/L)	IL-1 (ng/L)	ADP(μ g/L)
NC 组	8	121.37 $\pm$ 10.71	18.80 $\pm$ 2.56	14.78 $\pm$ 3.40
DM 组	8	177.48 $\pm$ 27.40 ^a	24.78 $\pm$ 3.60 ^a	7.76 $\pm$ 1.77 ^a
DM+PGZ 4 mg 组	8	144.72 $\pm$ 26.90 ^d	21.26 $\pm$ 2.85 ^c	10.31 $\pm$ 2.22 ^b
DM+PGZ 8 mg 组	8	139.59 $\pm$ 14.59 ^d	20.54 $\pm$ 2.75 ^c	11.49 $\pm$ 3.42 ^{bc}
F 值		9.710	5.739	8.683
P 值		0.000	0.003	0.000

注:NC 组为正常对照组,DM 组为糖尿病组,DM+PGZ 4 mg、8 mg 组为糖尿病 + 吡格列酮 4 mg $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$ 和 8 mg $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$ 组;TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ,IL-1 为白细胞介素-1,ADP 为脂联素;与 NC 组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$;与 DM 组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$

2.2.2 氧化应激标志物(表 2):与 NC 组比较, DM 组家兔血清和心肌 SOD、NO、总 NOS 水平均明显降低(均 $P < 0.05$); CAT、MDA 水平仅在血清中出现明显波动(均 $P < 0.05$),而在心肌中则均无明显变化(均 $P > 0.05$);血清和心肌 MPO 水平均无明显变化(均 $P > 0.05$)。给予吡格列酮干预后, DM+PGZ 4 mg、8 mg 组血清及心肌 SOD 和 NO 水平均较 DM 组均明显升高(均 $P < 0.05$);总 NOS 虽有升高趋势,但差异无统计学意义(均 $P > 0.05$);血清 MDA 水平较 DM 组明显降低(均 $P < 0.05$),但对 CAT 无明显改善作用(均 $P > 0.05$)。两个剂量吡格列酮干预组间氧化应激指标差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

2.3 心肌 TNF- α 和 TLR4 的 mRNA 表达(图 2):DM 组家兔心肌 TNF- α 和 TLR4 的 mRNA 表达均

明显高于 NC 组(均 $P < 0.05$)。给予吡格列酮干预后, DM+PGZ 4 mg、8 mg 组家兔心肌 TNF- α 和 TLR4 的 mRNA 表达均较 DM 组明显降低(均 $P < 0.05$);但两个剂量吡格列酮干预组间比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

3 讨论

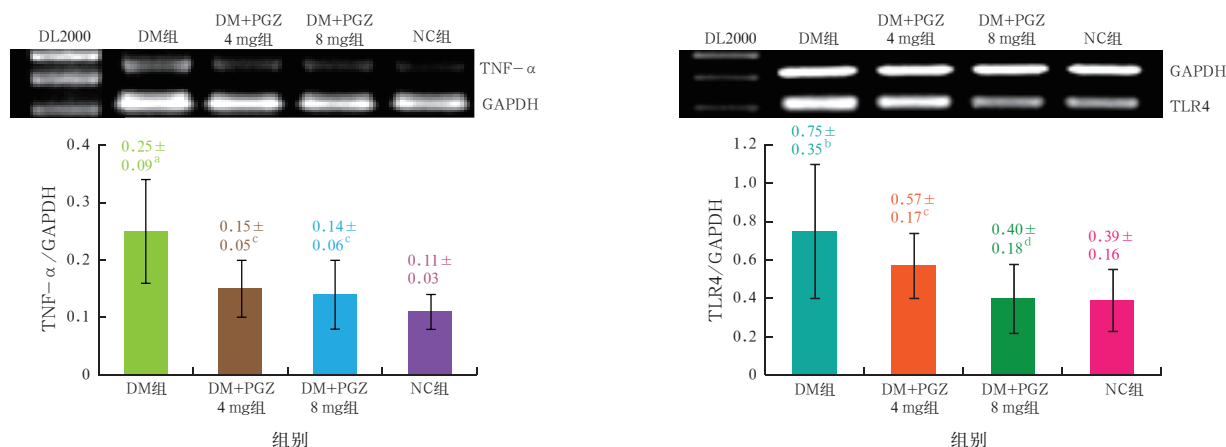
糖尿病是一种以血糖升高,并伴有多种炎症因子水平升高为特征的自身炎症性代谢性疾病。有研究显示,糖尿病患者 FBG 越高,发生房颤的风险越大^[8]。目前房颤的病因多种多样,发病机制也极其复杂。已有证据显示,糖尿病可通过改变心房重构、电重构、神经重构来诱发房颤。本课题组前期研究显示,心房肌纤维化、房间传导时间延长、左心房内径增加与房颤发生率升高相关^[9-10]。炎症、氧化应

表 2 不同剂量吡格列酮对糖尿病家兔血清和心肌氧化应激指标的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	血清					
		SOD(U/L)	CAT(mg/L)	MDA(μ mol/L)	MPO(U/L)	NO(μ mol/L)	总 NOS(kU/L)
NC 组	8	634.02 $\pm$ 68.55	6.69 $\pm$ 1.96	16.80 $\pm$ 1.56	53.71 $\pm$ 9.21	3.51 $\pm$ 1.03	858.67 $\pm$ 90.64
DM 组	8	535.10 $\pm$ 37.08 ^a	4.52 $\pm$ 1.13 ^b	23.07 $\pm$ 3.06 ^a	70.37 $\pm$ 15.47	2.03 $\pm$ 0.78 ^a	715.04 $\pm$ 89.80 ^b
DM+PGZ 4 mg 组	8	571.39 $\pm$ 40.85 ^c	4.97 $\pm$ 0.92	20.11 $\pm$ 2.34 ^{bc}	62.45 $\pm$ 11.77	2.95 $\pm$ 0.51 ^c	733.19 $\pm$ 77.31
DM+PGZ 8 mg 组	8	609.28 $\pm$ 54.47 ^c	5.58 $\pm$ 1.24	19.70 $\pm$ 2.02 ^{bc}	62.21 $\pm$ 13.90	2.99 $\pm$ 0.43 ^c	804.15 $\pm$ 80.23
F 值		5.622	3.771	9.860	2.263	5.733	4.891
P 值		0.004	0.022	0.000	0.104	0.004	0.007

组别	动物数 (只)	心肌					
		SOD(U/mg)	CAT(U/mg)	MDA(nmol/mg)	MPO(U/mg)	NO(nmol/mg)	总 NOS(U/mg)
NC 组	8	57.34 $\pm$ 10.11	6.58 $\pm$ 2.34	0.55 $\pm$ 0.09	0.49 $\pm$ 0.08	2.32 $\pm$ 0.43	172.54 $\pm$ 42.55
DM 组	8	42.26 $\pm$ 12.34 ^b	4.63 $\pm$ 1.97	0.69 $\pm$ 0.14	0.71 $\pm$ 0.21	1.56 $\pm$ 0.33 ^a	130.05 $\pm$ 20.61 ^b
DM+PGZ 4 mg 组	8	55.74 $\pm$ 8.12 ^c	5.11 $\pm$ 2.02	0.63 $\pm$ 0.11	0.62 $\pm$ 0.23	1.95 $\pm$ 0.37 ^c	145.08 $\pm$ 20.11
DM+PGZ 8 mg 组	8	53.60 $\pm$ 9.87 ^c	5.27 $\pm$ 1.78	0.62 $\pm$ 0.16	0.66 $\pm$ 0.19	2.11 $\pm$ 0.26 ^c	155.44 $\pm$ 27.67
F 值		3.570	1.344	1.608	2.031	6.630	3.001
P 值		0.027	0.281	0.209	0.132	0.002	0.048

注: NC 组为正常对照组, DM 组为糖尿病组, DM+PGZ 4 mg、8 mg 组为糖尿病 + 吡格列酮 4 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹ 和 8 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹ 组; SOD 为超氧化物歧化酶, CAT 为过氧化氢酶, MDA 为丙二醛, MPO 为髓过氧化物酶, NO 为一氧化氮, NOS 为一氧化氮合酶; 与 NC 组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与 DM 组比较, ^c $P < 0.05$



注: DM 组为糖尿病组, DM+PGZ 4 mg、8 mg 组为糖尿病 + 吡格列酮 4 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹ 和 8 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹ 组, NC 组为正常对照组; TNF- α 为肿瘤坏死因子- α , TLR4 为 Toll 样受体 4, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与 NC 组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与 DM 组比较, ^c $P < 0.01$, ^d $P < 0.05$

图 2 实时定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测各组家兔心肌 TNF- α 和 TLR4 的 mRNA 表达

激水平也被认为与房颤发生过程中的心房重构密切相关^[11],尤其是糖尿病状态下房颤的发生发展,更是炎症激活心肌纤维化的必然结局^[12]。

糖尿病状态下,机体组织促氧化剂与抗氧化剂的平衡被打破,从而发生氧化应激。一方面,过多的活性氧自由基(ROS)生成,使得促氧化剂发挥了主导作用,导致促氧化剂/抗氧化剂失衡。ROS产生毒性作用,导致机体心肌细胞DNA异常表达、损伤、凋亡,以及心肌组织肥厚纤维化。ROS的生成还可继续刺激机体组织产生大量ROS,自由基损伤的主要病理机制是引起脂质过氧化^[13]。MDA是脂质过氧化的代谢产物,其水平可反映机体脂质过氧化程度,间接反映体内氧化损伤程度。MDA能与含游离氨基的蛋白质、核酸等交联,使其不易排出而堆积于体内,抑制蛋白质、核酸及细胞功能,并加速组织损伤。MDA还可进一步氧化修饰低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),明显增加LDL-C对细胞的毒性作用,后者也是评价氧化应激的重要指标。另一方面,体内清除自由基的抗氧化剂水平也是影响机体氧化应激状态的重要因素,主要包括SOD、CAT、谷胱甘肽还原酶(GRS)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)等。当SOD减少时,不能被及时清除的氧自由基使细胞膜多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,生成MDA,而MDA可破坏细胞膜的完整性、损害超微结构,加重细胞损伤^[14]。TLR4、TNF- α 是组织炎症的敏感性指标。本课题组前期研究表明,TLR4、TNF- α 、核转录因子- κ B p50(NF- κ B p50)在糖尿病心房结构和电生理特性的变化中发挥重要作用^[15-17]。

吡格列酮是PPAR γ 激动剂,具有改善胰岛素抵抗、降低血糖、抗炎等作用。田雪等^[18]研究表明,吡格列酮为糖尿病肾病的治疗提供了新的手段,但其治疗机制并非降糖作用。本实验中,由于吡格列酮具有提高胰岛素敏感性的特点,导致两个剂量干预组的FBG水平略有降低,但与DM组比较差异无统计学意义,故吡格列酮发挥的下调炎症和氧化应激因子水平的效应并非通过降低血糖实现,与上述报道一致。Kume等^[19]研究显示,吡格列酮可通过直接抗炎作用逆转心肌纤维化,间接降低房颤的易感性。Gu等^[20]研究表明,合并阵发性房颤的糖尿病患者在接受消融术后服用吡格列酮可明显降低房颤的复发率。

本研究显示,在糖尿病状态下,家兔心肌TLR4、TNF- α 的mRNA表达显著上调,抗氧化酶水平明

显下降,氧化应激产物MDA水平明显升高;分别给予4 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹和8 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹吡格列酮干预后,TLR4、TNF- α 的mRNA表达明显下降,抗氧化酶水平有增高趋势,氧化应激产物MDA明显减少,但未见明显剂量依赖性。表明4 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹吡格列酮即可激活PPAR γ -TLR4-TNF- α 靶向路径,在糖尿病致心肌炎症反应和氧化应激中有下调作用。

综上所述,PPAR γ -TLR4-TNF- α 靶向路径在PPAR γ 激动剂抗炎、抗氧化作用中起重要作用。我们推测,该路径可能与PPAR γ 激动剂减轻糖尿病心房重构、降低房颤易感性的作用相关,为糖尿病合并房颤的上游机制研究提供了新的思路。由于本研究样本量小且观察时间短,尚不能充分体现长期糖尿病高糖状态对心房的影响,仍需进一步探讨和研究。由于本研究样本量少且观察时间短,尚不能充分体现长期糖尿病高糖状态对心肌的影响,今后将进一步完善,并设置更大剂量吡格列酮干预实验,以观察其是否具有剂量依赖性。

参考文献

- [1] Hu D, Sun Y. Epidemiology, risk factors for stroke, and management of atrial fibrillation in China [J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 52 (10): 865-868. DOI: 10.1016/j.jacc.2008.05.042.
- [2] Huxley RR, Filion KB, Konety S, et al. Meta-analysis of cohort and case-control studies of type 2 diabetes mellitus and risk of atrial fibrillation [J]. Am J Cardiol, 2011, 108 (1): 56-62. DOI: 10.1016/j.amjcard.2011.03.004.
- [3] Liu T, Li G. Antioxidant interventions as novel preventive strategies for postoperative atrial fibrillation [J]. Int J Cardiol, 2010, 145 (1): 140-142. DOI: 10.1016/j.ijcard.2009.06.054.
- [4] Vilchez JA, Roldán V, Hernández-Romero D, et al. Biomarkers in atrial fibrillation: an overview [J]. Int J Clin Pract, 2014, 68 (4): 434-443. DOI: 10.1111/ijcp.12304.
- [5] Van Wagoner DR. Oxidative stress and inflammation in atrial fibrillation: role in pathogenesis and potential as a therapeutic target [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2008, 52 (4): 306-313. DOI: 10.1097/FJC.0b013e31817f9398.
- [6] Guo Y, Lip GY, Apostolakis S. Inflammation in atrial fibrillation [J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 60 (22): 2263-2270. DOI: 10.1016/j.jacc.2012.04.063.
- [7] Alexandraki K, Piperi C, Kalofoutis C, et al. Inflammatory process in type 2 diabetes: the role of cytokines [J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1084: 89-117. DOI: 10.1196/annals.1372.039.
- [8] Huxley RR, Alonso A, Lopez FL, et al. Type 2 diabetes, glucose homeostasis and incident atrial fibrillation: the atherosclerosis risk in communities study [J]. Heart, 2012, 98 (2): 133-138. DOI: 10.1136/heartjnl-2011-300503.
- [9] Liu C, Liu R, Fu H, et al. Pioglitazone attenuates atrial remodeling and vulnerability to atrial fibrillation in alloxan-induced diabetic rabbits [J]. Cardiovasc Ther, 2017, 35 (5): DOI: 10.1111/1755-5922.12284.
- [10] 刘长乐, 李广平, 富华颖, 等. 吡格列酮对糖尿病兔心房重构的影响和机制研究[J]. 中华心律失常学杂志, 2013, 17 (3): 205-209. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-6638.2013.03.011.
Liu CL, Li GP, Fu HY, et al. Effects and mechanisms of pioglitazone on atrial remodeling in diabetic rabbits hearts [J]. Chin J Cardiac Arrhythm, 2013, 17 (3): 205-209. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-6638.2013.03.011.
- [11] 富华颖, 李广平, 刘长乐, 等. 普罗布考对糖尿病兔心房重构及心房颤动发生的干预作用[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2012, 6 (24): 7978-7982. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.24.015.
Fu HY, Li GP, Liu CL, et al. Effects of probucol on atrial remodeling and inducibility of atrial fibrillation in alloxan-induced diabetic rabbits [J/CD]. Chin J Clin (Electronic Edition), 2012, 6 (24):

- 7978-7982. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.24.015.
- [12] 赵辉, 张其同, 刘彤. 糖尿病心房重构的研究进展 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2015, 22 (3): 334-336. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.03.028.
- Zhao H, Zhang QT, Liu T. Research progress of atrial remodeling in diabetic patients [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2015, 22 (3): 334-336. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.03.028.
- [13] Le NA. Hyperlipidaemia and cardiovascular disease: oxidative damage and atherosclerosis [J]. Curr Opin Lipidol, 2006, 17 (1): 92-94. DOI: 10.1097/01.mol.0000199816.54343.57.
- [14] 刘亚华, 张杰, 代正, 等. 山莨菪碱对心搏骤停猪氧化应激致心肌线粒体损伤的保护作用 [J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25 (5): 290-293. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.05.013.
- Liu YH, Zhang J, Dai Z, et al. Protection of anisodamine on the mitochondrial injury induced by oxidative stress in swine with cardiac arrest [J]. Chin Crit Care Med, 2013, 25 (5): 290-293. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.05.013.
- [15] Liu C, Liu T, Li G. Pioglitazone may offer therapeutic advantages in diabetes-related atrial fibrillation [J]. Int J Cardiol, 2013, 168 (2): 1603-1605. DOI: 10.1016/j.ijcard.2013.01.037.
- [16] 富华颖, 李广平, 刘彤, 等. 蛋白激酶 C 激活与糖尿病心房纤颤 [J]. 中华糖尿病杂志, 2013, 5 (10): 634-637. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-5809.2013.10.013.
- Fu HY, Li GP, Liu T, et al. Protein kinase C activation and diabetic atrial fibrillation [J]. Chin J Diab Met, 2013, 5 (10): 634-637. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-5809.2013.10.013.
- [17] Liu C, Fu H, Li J, et al. Hyperglycemia aggravates atrial interstitial fibrosis, ionic remodeling and vulnerability to atrial fibrillation in diabetic rabbits [J]. Anadolu Kardiyol Derg, 2012, 12 (7): 543-550. DOI: 10.5152/akd.2012.188.
- [18] 田雪, 张捷, 于倩, 等. TGF- β /Smad 阻遏 c-Ski 与糖尿病肾病的相关性研究 [J]. 实用检验医师杂志, 2013, 5 (2): 79-83. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2013.02.004.
- Tian X, Zhang J, Yu Q, et al. The correlation research of TGF- β /Smad signal pathway repressor c-Ski and diabetic nephropathy [J]. Chin J Clin Pathol, 2013, 5 (2): 79-83. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2013.02.004.
- [19] Kume O, Takahashi N, Wakisaka O, et al. Pioglitazone attenuates inflammatory atrial fibrosis and vulnerability to atrial fibrillation induced by pressure overload in rats [J]. Heart Rhythm, 2011, 8 (2): 278-285. DOI: 10.1016/j.hrthm.2010.10.029.
- [20] Gu J, Liu X, Wang X, et al. Beneficial effect of pioglitazone on the outcome of catheter ablation in patients with paroxysmal atrial fibrillation and type 2 diabetes mellitus [J]. Europace, 2011, 13 (9): 1256-1261. DOI: 10.1093/europace/eur131.

(收稿日期: 2018-02-26)

• 科研新闻速递 •

非重症患者的晶体补液: 平衡液还是生理盐水?

对非重症患者进行晶体补液时,常选用平衡液或生理盐水,但两者孰优孰劣尚无定论。为此,美国学者进行了一项单中心临床试验,研究对象为在美国范德比尔特大学医学中心急诊室静脉输注晶体液的非重症加强治疗病房(ICU)成年患者,比较平衡液(乳酸林格液或复方电解质注射液 Plasma-Lyte A)与生理盐水的疗效。在 16 个月的临床试验期间,每个月对急诊室患者使用的平衡液或生理盐水进行交叉轮换。主要评价指标为患者出院后 28 d 内的非住院天数;次要评价指标为全因病死率、出院后 30 d 内严重肾脏不良事件发生率[包括新发需要肾脏替代治疗或持续肾功能障碍,肌酐(SCr)水平升高程度不低于入院时的 200%]。结果显示:共计入组 13 347 例患者,在急诊室输注晶体液剂量中位数为 1 079 mL。平衡液组与生理盐水组患者出院后 28 d 内非住院天数中位数比较差异无统计学意义($d: 25$ 比 25),与平衡液比较,校正后的优势比(OR)=0.98, 95% 可信区间(95% CI)=0.92~1.04, $P=0.41$ 。与生理盐水组相比,平衡液组患者出院后 30 d 内严重肾脏不良事件发生率明显降低(4.7% 比 5.6%,校正后的 $OR=0.82$, 95% $CI=0.70\sim0.95$, $P=0.01$)。研究人员据此得出结论:在急诊室进行静脉输注治疗的非重症患者中,平衡液与生理盐水的治疗效果无明显差异。

罗红敏,编译自《N Engl J Med》,2018, 378(9): 819-828

氢化可的松联合氟氢可的松治疗可降低脓毒性休克患者死亡风险

脓毒性休克的特征包括宿主对感染的应答失调以及循环、细胞和代谢异常。有学者认为,氢化可的松联合氟氢可的松或 drotrecogin- α (一种重组人活化蛋白 C,是具有与人血浆衍生活化蛋白 C 相同氨基酸序列的丝氨酸蛋白酶,能够调节宿主应答)治疗或许能改善脓毒性休克患者的临床结局。为此,法国学者进行了一项采用 2×2 析因设计的多中心、双盲、随机试验,以评价氢化可的松、氟氢可的松、drotrecogin- α 3 种药物联合治疗脓毒性休克的效果。主要评价指标为患者 90 d 全因病死率;其他评价指标包括患者重症加强治疗病房(ICU)病死率、住院病死率及 28 d 和 180 d 病死率,以及不需使用血管加压药天数、非机械通气时间和无器官衰竭的天数。因研究过程中 drotrecogin- α 退市,研究人员采用两组平行设计继续进行试验,分析比较了接受氢化可的松联合氟氢可的松治疗的患者与未接受该联合治疗的患者(安慰剂组)的临床疗效。结果显示:该研究共纳入 1 241 例患者,其中氢化可的松联合氟氢可的松组 614 例,安慰剂组 627 例。与安慰剂组相比,氢化可的松联合氟氢可的松组患者死亡风险较低[相对危险度(RR)=0.88, 95% 可信区间(95% CI)=0.78~0.99]。氢化可的松联合氟氢可的松组患者 ICU 病死率(35.4% 比 41.0%, $P=0.04$)、住院病死率(39.0% 比 45.3%, $P=0.02$)和 180 d 病死率(46.6% 比 52.5%, $P=0.04$)均明显低于安慰剂组,只有 28 d 病死率与安慰剂组比较差异无统计学意义(33.7% 比 38.9%, $P=0.06$)。与安慰剂组相比,氢化可的松联合氟氢可的松组患者 28 d 内不需要使用血管加压药的天数较多($d: 17$ 比 15 , $P<0.001$),无器官衰竭天数也较多($d: 14$ 比 12 , $P=0.003$),而非机械通气时间与安慰剂组相似($d: 11$ 比 10 , $P=0.07$)。两组间严重不良事件发生率差异无统计学意义,但氢化可的松联合氟氢可的松组高血糖较常见。研究人员据此得出结论:氢化可的松联合氟氢可的松治疗可降低脓毒性休克患者的死亡风险。

罗红敏,编译自《N Engl J Med》,2018, 378(9): 809-818