

索马鲁肽对早期 2 型糖尿病心肌病大鼠 mTOR 信号通路的干预作用

王冲¹, 尹茂山², 刘春霞^{1*} (1.曹县人民医院药理学部, 山东 菏泽 274400; 2.山东省医学科学院药物研究所, 济南 250062)

摘要: 目的 探讨索马鲁肽对糖尿病心肌病大鼠心肌组织哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路表达的干预作用。方法 高脂饮食 5 周后, 腹腔注射链脲佐菌素建立 2 型糖尿病大鼠模型, 实验将大鼠分为正常对照组、糖尿病 2 周、4 周模型组和索马鲁肽组, 索马鲁肽组在造模成功后给予索马鲁肽灌胃处理。4 周后, 各组动物进行血清学检测, 包括空腹血糖、总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)、空腹胰岛素, 超声心动图检测心功能相关指标, Western blot 检测心肌 mTOR、p-mTOR、S6K1、Atg5 和 P62 蛋白表达变化。结果 与正常对照组比较, 2 型糖尿病大鼠 2 周和 4 周模型组血清中总胆固醇、甘油三酯、LDL-C 水平显著升高, HDL-C 水平显著降低; 索马鲁肽组空腹血糖值趋于正常, HDL-C 水平升高显著($P<0.05$), LDL-C 水平显著降低($P<0.01$)。相对于正常对照组, 糖尿病模型组大鼠心肌组织中 mTOR、p-mTOR、S6K1 的表达与正常对照组相比随时间持续增加($P<0.01$), 自噬相关蛋白 Atg5 和 P62 表达也显著增加($P<0.05$), 而索马鲁肽组均显示出降低趋势。结论 在早期糖尿病心肌病的发生发展过程中, 索马鲁肽对 mTOR 信号通路具有抑制作用, 能降低心肌细胞自噬损伤的发生。

关键词: 糖尿病心肌病; 索马鲁肽; 自噬损伤; mTOR 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)14-1761-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.14.007

引用本文: 王冲, 尹茂山, 刘春霞. 索马鲁肽对早期 2 型糖尿病心肌病大鼠 mTOR 信号通路的干预作用[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(14): 1761-1766.

Intervention of Semaglutide on the Expression of mTOR Signaling Pathway in the Early Stage of Diabetic Cardiomyopathy Rats

WANG Chong¹, YIN Maoshan², LIU Chunxia^{1*} (1.Department of Pharmacy, People's Hospital of Cao-xian County, Heze 274400, China; 2.Institute of Pharmaceuticals, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the changes of mTOR signaling pathways under the intervention of semaglutide. **METHODS** The type 2 diabetes rat model was established by an injection of streptozotocin after five-week of high fat diet. The rats were divided into control group, 2 weeks model group, 4 weeks model group, and semaglutide group. Fasting blood glucose, total cholesterol, triglyceride, high density lipoprotein-cholesterol(HDL-C), low density lipoprotein-cholesterol(LDL-C) and fasting insulin levels were tested after the model established. M-mode echocardiography was performed for echocardiographic measurements. The alteration of mTOR, p-mTOR, S6K1, Atg5 and P62 in myocardium was determined by Western blotting. **RESULTS** Compared with control group, the level of total cholesterol, triglyceride and LDL-C significantly increased in 2 weeks and 4 weeks model group, while HDL-C were significantly reduced. The level of fasting blood glucose was normal in the semaglutide group, and the levels of HDL-C increased ($P<0.05$) while the level of LDL-C decreased significantly($P<0.01$). The expression of mTOR, p-mTOR and S6K1 were continuously increased in 2 weeks and 4 weeks model group compared with control ($P<0.01$), and SEM intervention group declined showed by Western blotting. The expression of Atg5 and p62 were also increased consistently in model group with the duration of the development in diabetic rats, while the semaglutide group showed the decreased trend. **CONCLUSION** In the early stages of the development of diabetic cardiomyopathy, the intervention of semaglutide may suppress the expression of mTOR signaling pathways and eventually decrease the occurrence of autophagy in myocardial cells.

KEYWORDS: diabetic cardiomyopathy; semaglutide; autophagy; mTOR signaling pathway

目前, 糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)已经得到证实并被视为糖尿病(diabetes mellitus, DM)独立的并发症。细胞自噬是真核细胞内特有的一种高度保守的代谢过程, 在细胞清除废物、结构重建和生长分化中起重要作用^[1]。心肌细胞自噬不仅是心肌细胞正常的生理反应, 同

时还参与心肌纤维化、心肌肥大等心肌损伤过程。在 DM 高糖环境中, 自噬可诱导心肌细胞发生糖脂代谢紊乱、氧化应激及胰岛素抵抗, 导致心肌细胞损伤^[2]。研究显示, 心肌细胞的自噬作用在 DCM 的发生发展过程中起着重要作用^[3]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of

作者简介: 王冲, 女, 硕士, 主管药师 Tel: 15662635559
Tel: (0530)3490879 E-mail: cxrmycgb@163.com

E-mail: 3011514486@qq.com *通信作者: 刘春霞, 女, 硕士, 主管药师

rapamycin, mTOR)是一种保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是细胞自噬发生的负性调控因子^[4], mTOR 信号通路的变化与细胞自噬水平密切相关^[5-6]。研究发现^[1], mTOR 分子参与多种心血管疾病的病理生理过程,与心功能及心肌肥厚、心肌纤维化的发生发展密切相关。近期研究显示^[7],在 DM 状态下, mTOR 信号通路同样可以通过参与心肌细胞的自噬作用来参与 DCM 的发生发展过程,但具体作用机制仍未明确。索马鲁肽(商品名为 Victoza)是用于治疗肥胖型 DM 患者的人胰高血糖素样肽-1(GLP-1)类似物,是由丹麦诺和诺德公司研制的长效 GLP-1 受体激动剂,于 2017 年 12 月 5 日获得美国 FDA 批准,目前仍未在国内上市。临床试验(SUSTAIN 6)研究显示^[8],该药能显著降低 2 型 DM 患者的糖化血红蛋白(HbA1c)水平及减轻体重,同时能显著降低心血管死亡、非致死性心肌梗死或非致死性卒中发生率,成为具有明显心血管获益的降糖药物。Zhang 等^[9]研究显示, GLP-1 类降血糖药物利拉鲁肽能够通过调节心肌组织细胞自噬的发生来参与心血管的保护,但具体作用机制仍待进一步研究证实。本研究建立了 2 型 DM 大鼠模型,进一步研究索马鲁肽对 DCM 发病早期 mTOR 信号通路的干预作用,及其与细胞自噬存在具体的病理生理关系。

1 动物与材料

1.1 药品与试剂

链脲菌素、戊巴比妥钠均来源于美国 Sigma 公司;索马鲁肽(丹麦诺和诺德);血糖试纸(强生中国医疗器材有限公司);医用超声耦合剂(上海申风医疗保健有限公司);水合氯醛[分析纯,中国医药(集团)上海化学试剂公司];0.9%氯化钠注射液(生理盐水,湖南科伦制药);生物素标记山羊抗兔 IgG/小鼠 IgG 二抗试剂盒(北京中杉金桥生物,批号:2B-2308);Western 一抗二抗去除液、Western 转膜液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型,批号:P0009-20181003)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(批号:20180017)和 SDS-PAGE 电泳液均购自碧云天生物;ProSieve Color protein makers(美国 Lonza Rockland);PVDF 膜(0.45 μm , 美国 SERVA);增强型化学发光试剂(美国 Millipore 公司);所用单克隆抗体为 mTOR(美国 Cell Signaling Technology 公司)、p-mTOR(美国 Sigma 公司)、Atg2(美国 Novus 公司)、P62(美国 Cell Signaling Technology 公司)、S6K1(美国 Abcam 公司)、 β -actin(美国

Ambobio)。

1.2 仪器

JA1203 精密电子天平(上海良平);HH.S21-6-S 恒温水浴锅(上海新苗);DHG-9143BS-III 电热恒温鼓风干燥箱(上海新苗);80-2 型电动离心机[赛默飞世尔(中国)];Infinite M 200 PRO 全波长酶标仪[赛默飞世尔(中国)];Azure cSeries 400 型化学发光显影仪(美国 Azure Biosystems)。

1.3 动物

健康 SD 大鼠,♂,SPF 级,体质量为 150~180g,由山东省医学科学院动物中心提供,生产合格证号为 SCXK(鲁)2017-094。

2 方法

2.1 动物分组及模型的构建

SPF 级健康 SD 大鼠 45 只,适应性喂养 1 周后,随机分为正常对照组 10 只,DM 模型组 35 只。正常对照组饲以普通饲料;DM 模型组采用高脂饮食(猪油 30%、胆固醇 2.5%和脱氧胆酸钠 1%灌胃;常规饲料 66.5%自主进食),并于 5 周末禁食 12 h 后,一次性腹腔注射 1%链脲菌素($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, pH 4.5 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液)。正常对照组大鼠注射同体积柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。造模后 72 h 尾静脉采血,血糖试纸检测空腹血糖值(fasting blood glucose, FBG),以 $\text{FBG} \geq 11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 并出现多饮、多食、多尿和体重质量下降者为 DM 大鼠造模成功。将造模成功大鼠随机分为 2 周模型组、4 周模型组和索马鲁肽组,继续高脂饮食灌胃。正常对照组继续以普通饲料喂养 4 周。索马鲁肽组于造模 4 周末,开始皮下注射给药,按照 $0.025 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的给药剂量,连续给药 4 周^[10]。

2.2 FBG 及胰岛素检测

DM 模型组和索马鲁肽组大鼠分别于 2 周末和 4 周末禁食 12 h,颈静脉窦取血,离心分离血清,检测 FBG 及胰岛素水平,计算胰岛素敏感指数,胰岛素敏感指数 $=\ln[1/(\text{胰岛素水平} \times \text{FBG})]$ 。

2.3 超声心动图

DM 模型组和索马鲁肽组大鼠分别于 2, 4 周末禁食 12 h 后,以 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 戊巴比妥钠麻醉大鼠并固定,使用小动物超声成像系统 Vevo 2100(维胜中国)检测左心室舒张末期内径(left ventricular internal diastolic diameter, LVIDD)、左心室收缩末期内径(left ventricular internal diameter at end-systole, LVIDS)、左室舒张末期室壁厚度(left

ventricular posterior wall thickness in diastole, LVPWD)、左室收缩末期室壁厚度(left ventricular posterior wall thickness in systole, LVPWS)、短轴缩短率(fractional shortening, FS)、左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)及 LVM。

2.4 标本收集

造模结束后,大鼠麻醉,仰位固定,开胸,腹主动脉取血,每只 5 mL,以 $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度离心 10 min,取上清,分装, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测。生化仪检测总胆固醇(serum total cholesterol, TC)、甘油三酯、高密度脂蛋白-胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白-胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)水平。迅速取出心脏,用预冷生理盐水洗净,滤纸吸干,剔除血管、脂肪等非心肌组织,称量心脏质量,分离左心室,并称左心室(含室间隔)质量(left ventricular mass, LVM),计算心脏(左心室)指数=心脏(左心室)质量(mg)/体质量(g),分离的左心室置于 EP 管中,于液氮中保存待用。

2.5 Western blot 试验

每 20 mg 组织加入 $100\sim 200\text{ }\mu\text{L}$ 含 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMSF 的裂解液,研磨充分后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $14\,000\times g$ 离心 10 min,取匀浆上清,并测定总蛋白浓度。 $40\sim 70\text{ }\mu\text{g}$ 总蛋白上样量于 SDS-PAGE 凝胶电泳进行分离。湿法转膜 2 h,体积分数 5%的脱脂奶粉封闭 1 h 后与相应一抗 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 共孵育过夜。次日与辣根过氧化物标记的二抗共孵育,用增强型化学发光试剂进行显色,并利用灰度分析软件定量分析。

2.6 统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理,组间计量资料采用方差分析,组间有差异后再进行两两组间比较,组间差异比较采用 Bonferroni 校正的 t 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠 DM 模型的建立情况

实验期间,正常对照组大鼠状态良好、健壮、自主活动正常。而造模 2 周后 DM 大鼠逐渐出现精神萎靡、腥臊臭味加重、多饮、多食、多尿、体质量降低等 DM 症状。造模成功大鼠 29 只,成功率为 82.8%。与正常对照组比较,2 周模型组大鼠血清 FBG、胰岛素水平显著升高($P<0.05$),胰岛素敏感指数显著下降($P<0.01$),表明 2 型 DM 大鼠造模成功。结果见表 1。

表 1 造模后各组大鼠基本情况比较($\bar{x}\pm s$)

Tab. 1 General characteristics of the rats in each group after DM model($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	空腹血糖值/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	胰岛素/ $\text{mU}\cdot\text{L}^{-1}$	胰岛素敏感指数
正常对照组	10	5.11 ± 0.11	20.12 ± 0.51	-4.63 ± 0.62
2 周模型组	29	$31.07\pm 3.28^{1)}$	$26.99\pm 2.78^{1)}$	$-6.73\pm 0.79^{2)}$

注:与正常对照组比较, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$.

3.2 心脏超声检测结果

与正常对照组比较,4 周 DM 模型组大鼠的 LVIDD 及 LVIDS 值显著增大($P<0.01$),LVPWD 及 LVPWS 不同程度增厚($P<0.05$ 或 $P<0.01$),FS、LVEF 及 LVM 值显著降低($P<0.01$),左心室指数显著增高($P<0.01$)。与 4 周模型组比较,索马鲁肽组 FS、LVEF 升高显著($P<0.05$),LVIDS、左心室指数显著降低($P<0.05$),结果见表 2 和图 1。

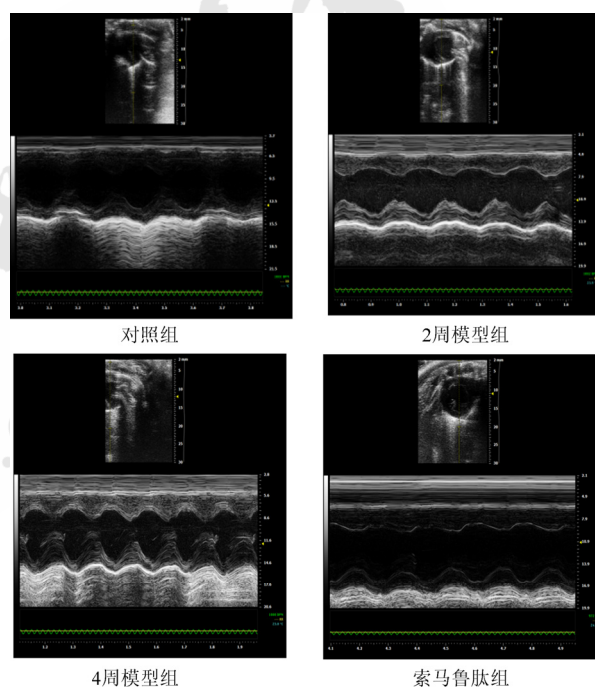


图 1 各组大鼠 M-mode 超声心动图代表图像

Fig. 1 M-mode Echocardiography of cardiac tissue from each group

3.3 大鼠体质量及心脏各指标的测定结果

与正常对照组相比,4 周模型组大鼠体质量明显降低($P<0.01$),心脏及 LVM 质量明显增加($P<0.05$);且心脏指数和左心室指数均显著高于对照组($P<0.05$);与 4 周模型组比较,索马鲁肽组体质量显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),LVM、心脏指数和左心室指数显著降低($P<0.05$),结果见表 3。

表2 早期DM大鼠左室结构参数及功能的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of the structural and functional parameters in the left ventricle of rats with early stage of DM($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LVIDD/d·mm ⁻¹	LVIDS/d·mm ⁻¹	LVPWD/d·mm ⁻¹	LVPWS/d·mm ⁻¹	FS/%	LVEF/%	LVM/mg	左心室指数
正常对照组	10	5.41±0.25	2.38±0.61	1.68±0.19	2.91±0.39	45.90±4.99	82.37±5.66	714.89±55.01	1.65±0.12
2周模型组	9	6.88±0.43	3.37±0.39	1.89±0.20 ¹⁾	3.19±0.57 ¹⁾	42.16±3.97	77.16±8.67 ¹⁾	739.40±30.91	1.79±0.32 ²⁾
4周模型组	9	7.26±0.25 ²⁾	3.71±0.63 ²⁾	2.14±0.23 ²⁾	3.68±0.37 ¹⁾	32.99±2.23 ²⁾	62.46±5.10 ²⁾	678.19±19.17 ²⁾	1.91±0.22 ²⁾
索马鲁肽组	10	6.98±1.03	3.01±0.78 ³⁾	1.97±0.31	3.55±0.57	40.20±6.70 ³⁾	73.11±10.37 ³⁾	700.31±66.56	1.75±0.46 ³⁾

注:与正常对照组比较, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01;与4周模型组相比较, ³⁾P<0.05。

Note: Compared with normal control group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01; compared with 4 weeks model group, ³⁾P<0.05.

表3 早期DM大鼠心脏取材相关指标测定($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Parameters of the heart sampling and body weight of the early DM rats with different treatments($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重/g	心脏质量/g	左心室质量/g	心脏指数/mg·g ⁻¹	左心室指数/mg·g ⁻¹
正常对照组	10	433.10±14.29	0.82±0.16	0.63±0.17	1.90±0.10	1.44±0.12
2周模型组	9	414.20±20.10	1.16±0.14 ¹⁾	0.74±0.13 ¹⁾	2.80±0.27 ¹⁾	1.78±0.21 ¹⁾
4周模型组	9	356.40±12.76 ²⁾	1.07±0.23 ¹⁾	0.75±0.26 ¹⁾	2.997±0.45 ¹⁾	2.10±0.14 ²⁾
索马鲁肽组	10	400.70±37.56 ³⁾	1.01±0.16	0.67±0.17 ³⁾	2.51±0.34 ³⁾	1.67±0.18 ³⁾

注:与正常对照组比较, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01;与4周模型组相比较, ³⁾P<0.05。

Note: Compared with normal control group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01; compared with 4 weeks model group, ³⁾P<0.05.

3.4 大鼠血生化指标检测

与正常对照组比较,模型组大鼠血清中FBG、甘油三酯、TC、LDL-C明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。而4周模型组与2周模型组比较,大鼠血清甘油三酯含量略有升高,HDL-C略有降低,差异不具有统计学意义。与4周模型组比较,索马鲁肽组FBG、LDL-C水平显著降低($P<0.01$),HDL-C水平显著升高($P<0.05$),结果见表4。

3.5 mTOR信号通路的表达变化

Western blot试验结果表明,相对于正常对照组,2周模型组大鼠心肌mTOR信号通路蛋白的表达均变化显著,mTOR、p-mTOR和S6K1表达

均显著增加($P<0.05$);与2周模型组比较,4周模型组p-mTOR及S6K1表达增加更明显,差异具有显著性($P<0.05$);与4周模型组比较,索马鲁肽组mTOR、p-mTOR和S6K1表达均出现降低趋势,其中S6K1表达降低显著($P<0.01$)。结果见图2~3。

相对于正常对照组,模型组大鼠心肌蛋白Atg5和P62表达均显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$);且与2周模型组比较,4周模型组增加更显著($P<0.05$)。与4周模型组比较,索马鲁肽组Atg5和P62表达均出现降低趋势,其中Atg5表达显著降低($P<0.05$)。结果见图4~5。

表4 早期DM大鼠血生化指标的检测($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Changes of the biochemical parameters in the rats with early stage of DM($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FBG/mmol·L ⁻¹	甘油三酯/mmol·L ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	HDL-C/mmol·L ⁻¹	LDL-C/mmol·L ⁻¹
正常对照组	10	5.11±0.11	1.15±0.12	2.32±0.23	0.60±0.012	0.15±0.02
2周模型组	9	31.00±4.15 ²⁾	1.27±0.12 ²⁾	2.56±0.32 ¹⁾	0.49±0.12 ¹⁾	0.17±0.04 ²⁾
4周模型组	9	33.77±5.70 ²⁾	1.30±0.21 ²⁾	2.88±0.20 ¹⁾	0.46±0.10 ¹⁾	0.25±0.03 ²⁾
索马鲁肽组	10	5.72±1.00 ⁴⁾	1.30±0.22	2.79±0.35	0.53±0.18 ³⁾	0.18±0.09 ⁴⁾

注:与正常对照组比较, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01;与4周模型组相比较, ³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01。

Note: Compared with normal control group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01; compared with 4 weeks model group, ³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01.

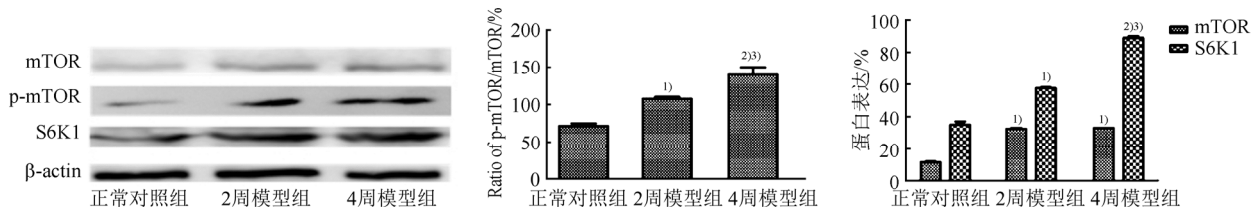


图2 Western blot检测大鼠心肌组织mTOR、p-mTOR、S6K1的表达($\bar{x} \pm s$, n=9)

与正常对照组比较, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01;与2周模型组比较, ³⁾P<0.05。

Fig. 2 Expression of mTOR, p-mTOR, S6K1 in cardiac tissue from each group by Western blot($\bar{x} \pm s$, n=9)

Compared with normal control group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01; compared with 2 weeks model group, ³⁾P<0.05.

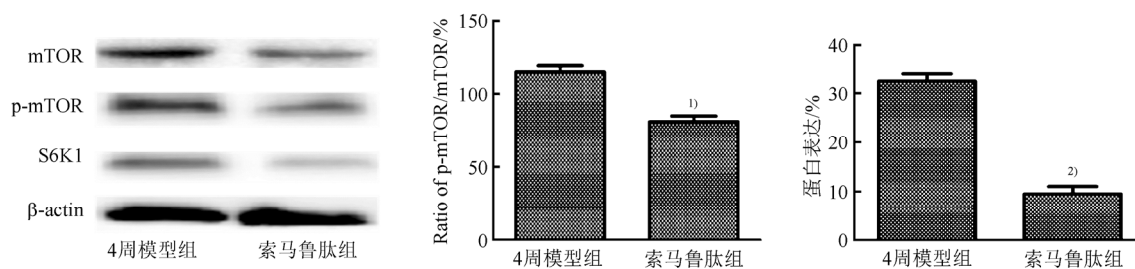


图3 Western blot 检测索马鲁肽干预后大鼠心肌组织 mTOR、p-mTOR、S6K1 的表达($\bar{x} \pm s$, $n=9$)
与 4 周模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Expression of mTOR, p-mTOR, S6K1 in cardiac tissue from semaglutide group by Western blot ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)
Compared with 4weeks model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

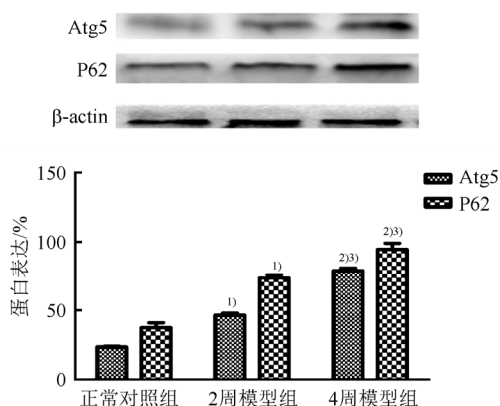


图4 Western blot 检测大鼠心肌组织 Atg5 和 P62 的表达($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与 2 周 DM 模型组比较, ³⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 4 Expression of Atg5 and P62 in cardiac tissue from each group via Western blot ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)
Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with 2 weeks model group, ³⁾ $P<0.05$.

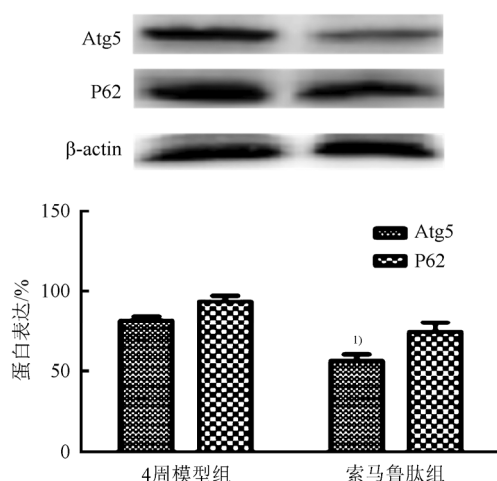


图5 Western blot 检测大鼠心肌组织 Atg5 和 P62 的表达($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

与 4 周模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 5 Expression of Atg5 and P62 in cardiac tissue from semaglutide group via Western blot($\bar{x} \pm s$, $n=9$)
Compared with 4 weeks model group, ¹⁾ $P<0.05$.

4 讨论

mTOR 作为进化上相对保守的信号分子, 在连接外界刺激和细胞生长调控中起着至关重要的作用, 在多条细胞信号途径中占据独一无二的位置, 在各种细胞调节和疾病条件下, 已经被广泛地研究发现。有研究结果表明^[11], 在 DM 病理状态下, mTOR 相关信号通路参与多种自噬相关疾病的发展过程。近来, 对 DM 模型的研究表明^[12], mTOR 信号通路在相关信号因子的调节下, 参与 DM 多种并发症的发生发展。作为新一代 GLP-1 类似物, 索马鲁肽在 2 型 DM 的治疗上显示出更稳定的降血糖作用, 且更长效、更安全^[13]。Li 在神经退行性疾病阿尔茨海默病的治疗研究中发现^[14], GLP-1 类似物可以通过调节 mTOR 信号通路来参与抗神经细胞衰老损伤过程。另有研究发现^[15], 在 DM 状态下, 长期应用 GLP-1 类似物艾塞那肽治疗, 可以显著减轻心肌肥厚, 而这种改变与心肌细胞自噬水平的改变密切相关, 具体机制并不明确。同时, 对于最新 GLP-1 索马鲁肽在心血管保护方面的机制研究较少, 与 mTOR 信号通路介导的细胞自噬之间的关系也鲜有探讨。

本实验以索马鲁肽皮下注射给予模型大鼠干预治疗, 探究索马鲁肽的干预作用对 mTOR 相关蛋白的表达水平变化, 用以推断索马鲁肽在 mTOR 相关信号通路调节中的作用。2 型 DM 大鼠模型研究显示, 在干预处理的 4 周内, 模型组与正常对照组以及索马鲁肽组之间已经表现病理生理与心肌功能的差异。超声心动图的研究显示, 索马鲁肽组在心肌收缩率、左室舒张末期内径、短轴缩短率、LVEF 及 LVM 等指标表现出心肌功能代偿性的恢复。以 Western blot 技术研究相关因子的表达水平, 以期发现相关蛋白表达可能的调控关系。

结果显示, DCM 早期 mTOR 信号通路相关蛋白表达显著变化, mTOR、p-mTOR 及 S6K1 蛋白表达均增加, 自噬相关蛋白 Atg5 和 P62 表达也增加显著; 索马鲁肽组 mTOR 信号通路中 p-mTOR/m-TOR 比值降低显著。笔者推测, 在 DM 早期开始出现能量代谢紊乱, 心肌 mTOR 信号通路表达激活, 其磷酸化状态 p-mTOR 蛋白表达增加, 下游 S6K1 蛋白表达同样上调, 心肌细胞自噬损伤机制反馈性被激动, 首先自噬相关蛋白 Atg5 的表达上调, Atg5 在自噬形成过程中具有重要作用, 它的活性增强可促进自噬的发生。而 P62 作为一种由应激诱导产生的细胞内多功能蛋白, 能够诱导心肌细胞的后续损伤作用, 本研究结果显示, 在早期 2 型 DM 大鼠模型中, 自噬相关蛋白 Atg5 和 P62 的表达也表现出增加趋势, 而索马鲁肽干预后显示降低, 这可能由于高脂饮食伴随链脲菌素造模的 DM 大鼠模型, 胰岛素抵抗和代谢综合征共同影响的背景下, 高脂饮食同样对模型动物心脏功能产生损害, 在这样的共同作用下, P62 的表达积累, 同时伴随着自噬体降解受阻, 表现出在 DCM 早期 P62 的表达与自噬水平不平衡的状态, 这与 Kanamori 等^[16]文献研究相一致。

DCM 是 DM 心血管严重并发症的重要组成部分, 自噬损伤在该病的发生发展过程中起到重要作用。索马鲁肽作为新一代 GLP-1 类似物, 显著降低心血管事件的发生是该药的一大亮点, 深入探究该药的心血管保护机制, 为更好的临床应用提供了研究基础。

REFERENCES

- [1] YIN M S, MU Y L. Research progress of diabetic cardiomyopathy-associated signaling pathways [J]. Chin Bull Life Sci(生命科学), 2014, 26(10): 1084-1089.
- [2] MA P, ZHANG Y. JNK Signaling pathway and islet beta cell apoptosis [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2015, 32(10): 1161-1165.

- [3] ZHANG Z, WANG C. Cardiac protective effects of Tongxinluo capsule on diabetic cardiomyopathy mice [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2015, 22(2): 151-155.
- [4] HANDS S L, PROUD C G, WYTENBACH A. mTOR's role in ageing: protein synthesis or autophagy [J]. Aging, 2009, 1(7): 586-597.
- [5] KOROLCHUK V I, SAIKI S, LICHTENBERG M, et al. Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses [J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(4): 453-460.
- [6] POUS C, CODOGNO P. Lysosomal positioning coordinates mTORC1 activity and autophagy [J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(4): 342-344.
- [7] MAIESE K. Novel nervous and multi-system regenerative therapeutic strategies for diabetes mellitus with Mtor [J]. Neural Regen Res, 2016, 11(3): 372-385.
- [8] MARSO S P, BAIN S C, CONSOLI A, et al. Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes [J]. N Engl J Med, 2016, 375(19): 1834-1844.
- [9] ZHANG Y, LING Y, YANG L, et al. Liraglutide relieves myocardial damage by promoting autophagy via AMPK-mTOR signaling pathway in Zucker diabetic fatty rat [J]. Mol Cell Endocrinol. 2017(448): 98-107.
- [10] YIN M S, XU S H, WANG Y, et al. Alteration of Wnt/ β -catenin signaling pathway in type2 diabetic rats'aorta and regulation of SIRT1 [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2016, 32(3): 337-342.
- [11] YAO F, ZHANG M, CHEN L. 5'-Monophosphate-activated protein kinase (AMPK) improves autophagic activity in diabetes and diabetic complications [J]. Acta Pharm Sin B, 2016, 6(1): 20-25.
- [12] SUGINO T, MARUYAMA M, TANNO M, et al. Protein deacetylase SIRT1 in the cytoplasm promotes nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells [J]. FEBS Lett, 2010, 584 (13): 2821-2826.
- [13] HUSAR D A, BAILEY K J. Semaglutide, Ertugliflozin, and Deflazacort [J]. J Am Pharm Assoc (2003), 2018, 58(3): 321-325.
- [14] LI L. The Molecular Mechanism of Glucagon-Like Peptide-1 Therapy in Alzheimer's Disease, Based on a Mechanistic Target of Rapamycin Pathway [J]. CNS Drugs, 2017, 31(7): 535-549.
- [15] ZHOU Y, HE X, CHEN Y, et al. Exendin-4 attenuates cardiac hypertrophy via AMPK/mTOR signaling pathway activation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 468(1/2): 394-399.
- [16] KANAMORI H, TAKEMURA G, GOTO K, et al. Autophagic adaptations in diabetic cardiomyopathy differ between type 1 and type 2 diabetes [J]. Autophagy, 2015, 11(7): 1146-1160.

收稿日期: 2018-08-23

(本文责编: 蔡珊珊)