去铁胺对糖尿病大鼠心肌细胞铁死亡通路的影响

李浩甲　杨文曲　韩冲芳　贺建东　王文杰　任鹏鹏

摘　要　目的　探究去铁胺对糖尿病大鼠心肌细胞铁死亡通路的影响。**方法**　雄性 SD 大鼠 24 只，采用数字表法随机分为 3 组，即正常组（N 组）、糖尿病组（D 组）和去铁胺处理组（C 组），每组各 8 只。采用腹腔注射链脲佐菌素（STZ）55mg/kg 建立糖尿病模型，0.2mg/g 去铁胺（DFO）连续腹腔注射 1 周。观察各组在实验第 1 天、3 天、10 天、17 天、24 天、31 天血糖值和体质量的变化，Western blot 法测定心肌细胞微管相关蛋白 3 Ⅱ（LC3 Ⅱ）、铁蛋白重链（FTH）和核受体共同激活因子 4（NCOA4）的表达，血液生化仪测血浆 cTnI 浓度，普鲁士蓝染色和 HE 染色观察心肌的病理学改变。**结果**　与 N 组比较，D 组和 C 组血糖值升高，体质量减轻，D 组 cTnI、心肌细胞 FTH、NCOA4、LC3 Ⅱ 含量升高（$P<0.05$）；与 D 组比较，C 组 cTnI、血糖值、铁蛋白自噬相关蛋白均下降（$P<0.05$），细胞内含铁小粒数目明显减少。**结论**　去铁胺处理 1 周可降低糖尿病大鼠血糖水平，降低 cTnI 浓度，抑制心肌细胞内 NCOA4 的表达，抑制铁死亡通路，改善心肌细胞损伤。

关键词　去铁胺　糖尿病　铁死亡

中图分类号　R587.1　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2020.09.025

Effect of Deferoxamine on Ferroptosis of Myocardial Cell in Diabetic Rats. *Li Haojia, Yang Wenqu, Han Chongfang, et al. Department of Anesthesiology, Shanxi Medical University, Shanxi 030001, China*

Abstract　**Objective**　To investigate the effect of deferoxamine on ferroptosis of myocardial cell in diabetic rats. **Methods**　24 male SD rats weighing 240 – 290g were randomly divided into 3 groups ($n=8$ each): Group N was continuously feeded by normal fodder for 4 weeks; group D was induced via intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) 55mg/kg and fed by normal fodder for 4 weeks; group C was induced by injection of streptozotocin (STZ) 55mg/kg and DFO 0.2mg/g during the forth week. The weight and blood glucose were monitored in rats on 1st, 3rd, 10th, 17th, 24th and 31st days. The blood was taken for test of cTnI on 31st day. The pathological changes were observed by HE staining and Prussian blue staining. Western blot was used to determine the expression of microtubule associated protein 3 Ⅱ (LC3 Ⅱ), ferritin heavy chain (FTH) and nuclear receptor coactivator 4 (NCOA4). **Results**　Compared with group N, the blood glucose level increased, the body weight decreased in group D and C; the expression of cTnI, FTH, NCOA4 and LC3 Ⅱ were significantly up – regulated in the group D. Compared with group D, the expression of cTnI, FTH, NCOA4, LC3 Ⅱ and blood glucose on 31st day were down – regulated in the group C. The iron content was less in group C. **Conclusion**　Desferrioxamine treatment for 1 week could decrease the level of blood glucose, decrease the concentration of cTnI, inhibit the expression of NCOA4 in myocardial cell, inhibit the ferroptosis pathway, and alleviate the injury of myocardial cell.

Key words　Deferoxamine; Diabetic; Ferroptosis

糖尿病患者往往伴随多器官功能的下降，高血糖造成的血管内皮细胞和心肌细胞的损伤增加了糖尿病患者心血管疾病的风险[1]。有研究发现，铁过载激活的铁死亡通路与糖尿病心肌细胞损伤密切相关[2]。去铁胺是一种铁螯合剂，结合游离 Fe^{3+} 形成络合物随尿液排出体外，去铁胺可以降低糖尿病大鼠体内铁含量，改善胰岛素抵抗，减轻糖尿病心肌损伤，但具体机制尚未完全清楚[3,4]。核受体共同激活因子 4（NCOA4）在铁死亡通路中介导细胞内铁蛋白自噬，导致铁离子增多，引发细胞损伤[5]。本研究推测去铁胺可能通过抑制 NCOA4 的表达，起到心肌保护的作用，通过观察去铁胺对糖尿病大鼠心肌细胞铁死亡通路的影响，探讨去铁胺改善糖尿病心肌损伤的机制。

材料与方法

1. 实验材料：体质量 240 ~ 290g 的健康成年雄性 SD 大鼠 24 只，由山西医科大学实验动物中心提供；链脲佐菌素（STZ）（美国 Sigma 公司）；注射用甲磺酸去铁胺（诺华制药有限公司）；铁蛋白重链（FTH）、核受体共同激活因子 4（NCOA4）、微管相关蛋白 3（LC3 Ⅱ）、甘油醛 – 3 – 磷酸脱氢酶（GAPDH）抗体购自美

基金项目：山西省应用基础研究项目（201601D011121）

作者单位：030001　太原，山西医科大学麻醉学院

通讯作者：韩冲芳，电子信箱：hanchongfang2003@foxmail.com

国 ABclonal 公司。

2. 实验分组:大鼠适应 1 周后,采用数字表法随机将其分为 3 组($n=8$):正常组(N 组):N 组大鼠在禁食 8h 后经腹腔注射 10ml/kg 枸橼酸钠缓冲液。普通饲料喂养,饮水饲料供应充足,保持垫料干燥;糖尿病组(D 组):大鼠在禁食 8h 后,采用头低位腹腔注射 STZ 55mg/kg,浓度 10mg/ml,其他条件同 N 组;去铁胺处理组(C 组):采用与 D 组相同的方法制备糖尿病模型,于第 24 天开始每日腹腔注射去铁胺 0.2mg/g,浓度 50mg/ml,持续 1 周。3 组大鼠于注射当天、第 3 天、10 天、17 天、24 天、31 天监测日间随机血糖和体质量。

3. 血浆 cTnI 测定:于建模后第 31 天,采用断尾法采血 2.5ml,收集于抗凝采血管中,4℃ 离心机 12000r/min 离心 10min,取约 1ml 血浆,使用全自动动物血液生化仪测血浆 cTnI 浓度。

4. 病理学染色:采血后采用脊椎脱臼法处死大鼠,取心脏组织,0.9% 氯化钠溶液冲洗后置于 -80℃ 度冰箱冷冻 5min。垂直于心脏长轴切成厚 4mm 的标本,经过固定、脱水、透明、石蜡包埋、切片,制成 4μm 厚标本切片。HE 染色采用苏木精染液染色 5min,伊红染液染色 1min 制备;普鲁士蓝染色采用普鲁士蓝染液染色 30min,核固红染液染色 10min,之后透明、封片。

5. Western blot 法检测:每只大鼠的心肌取 500g 组织,加入 RIPA 裂解液 10μl/mg 和 PMSF 蛋白酶抑制剂 0.1μl/mg,提取总蛋白。每份样品取 50μg,选择 12% SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS - PAGE),进行湿法转膜。37℃ 脱脂牛奶封闭 2h,分别加入铁蛋白重链单克隆抗体(FTH,1∶1000);核受体共同激活因子 4 单克隆抗体(NCOA4,1∶1000);微管相关蛋白 3 单克隆抗体(LC3 Ⅱ,1∶1000)和内参抗 - 甘油醛 -3 - 磷酸脱氢酶单克隆抗体(GAPDH,1∶1000)孵育过夜。洗膜后加入 HRP 二抗山羊抗兔(1∶1000)孵育 2h,自动曝光仪曝光显影。采用 Image J 软件测定条带灰度值,以目的条带灰度值与 GAPDH 灰度值的比值反映表达。

6. 统计学方法:采用 SPSS 22.0 统计学软件对数据进行统计分析,正态分布的计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间数据比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 大鼠基本情况的变化:3 组大鼠基础体质量、基础血糖值比较,差异无统计学意义($P>0.05$);与 N 组比较,D 组、C 组在注射 STZ 第 3 天、10 天、17 天、24 天、31 天监测日间随机血糖明显升高($P<0.05$),D 组、C 组体质量在第 17 天、24 天、31 天明显降低($P<0.05$,表 1、表 2)。

表 1 3 组大鼠随机血糖值比较($\bar{x} \pm s$,mmol/L,$n=8$)

组别	第 1 天	第 3 天	第 10 天	第 17 天	第 24 天	第 31 天
N 组	8.1 ± 0.6	8.5 ± 0.7	8.7 ± 0.4	7.4 ± 0.6	7.9 ± 0.7	8.2 ± 0.4
D 组	7.9 ± 0.5	21.5 ± 0.8*	27.9 ± 1.1*	30.2 ± 0.9*	29.5 ± 1.7*	31.3 ± 1.5*
C 组	8.5 ± 0.4	22.1 ± 0.9*	28.5 ± 1.2*	29.4 ± 1.5*	30.2 ± 1.8*	25.5 ± 1.3*#

与 N 组比较,*$P<0.05$;与 D 组比较,#$P<0.05$

表 2 3 组大鼠体质量变化比较($\bar{x} \pm s$,g,$n=8$)

组别	第 1 天	第 3 天	第 10 天	第 17 天	第 24 天	第 31 天
N 组	248.1 ± 10.6	266.5 ± 11.6	269.4 ± 10.4	271.5 ± 12.1	275.3 ± 11.3	282.2 ± 13.4
D 组	252.9 ± 11.5	261.3 ± 10.8	262.1 ± 14.1	253.2 ± 12.9*	249.5 ± 1.7*	237.6 ± 11.3*
C 组	255.5 ± 9.4	262.1 ± 11.5	259.5 ± 11.7	252.6 ± 14.3*	243.7 ± 12.8*	241.5 ± 11.2*

与 N 组比较,*$P<0.05$

2. 大鼠心肌细胞铁蛋白自噬相关蛋白变化:与 N 组比较,D 组和 C 组大鼠血清 cTnI 含量增加,D 组心肌细胞 LC3 Ⅱ、FTH、NCOA4 表达增多,C 组心肌细胞 FTH、LC3 Ⅱ、NCOA4 含量降低($P<0.05$);与 D 组比较,C 组大鼠血清 cTnI 含量降低,心肌细胞 FTH、LC3 Ⅱ、NCOA4 含量降低($P<0.05$,表 3)。

表 3 3 组大鼠 cTnI 浓度、LC3 Ⅱ、FTH、NCOA4 比较($\bar{x} \pm s$,$n=8$)

组别	cTnI	LC3 Ⅱ	FTH	NCOA4
N 组	10.7 ± 2.3	0.42 ± 0.12	0.95 ± 0.17	0.51 ± 0.09
D 组	35.7 ± 4.2*	0.93 ± 0.21*	1.51 ± 0.25*	0.91 ± 0.24*
C 组	20.2 ± 4.1*#	0.66 ± 0.15*#	0.78 ± 0.13*#	0.20 ± 0.12*#

与 N 组比较,*$P<0.05$;与 D 组比较,#$P<0.05$

3. 大鼠心肌病理学改变：光镜下可见 N 组心肌细胞形态正常，普鲁士蓝染色显示细胞内有少量含铁小粒；D 组心肌纤维排列松散，细胞肿胀，胞质染色加深，细胞内有较多含铁小粒；C 组心肌细胞结构较完整，胞质染色较均匀，但细胞间连接不紧密，出现少量空泡，与 D 组比较，C 组含铁小粒明显减少（图 1、图 2）。

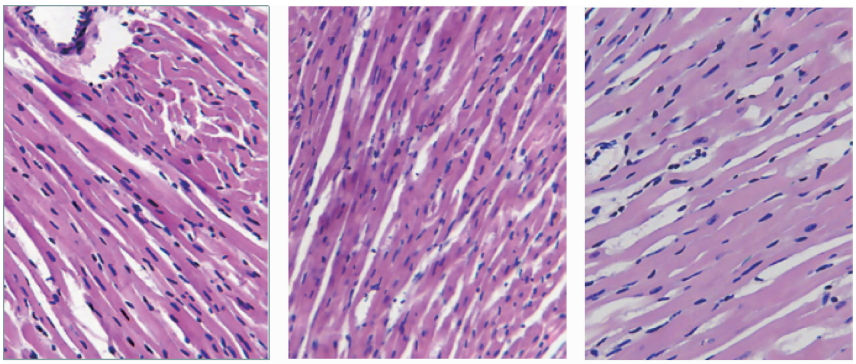

图 1　心肌组织 HE 染色（×200）

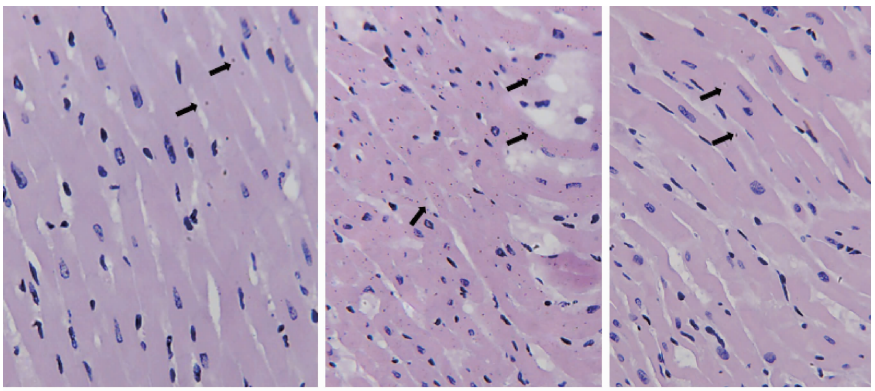

图 2　心肌组织普鲁士蓝染色（×400）

➡为含铁小粒

讨　　论

STZ 通过破坏大鼠胰岛 β 细胞，造成胰岛素分泌不足，制备糖尿病大鼠模型。本研究选择单次腹腔注射 STZ 55mg/kg，注射 STZ 3 天后，D 组和 C 组静脉血糖值均 >16.7mmol/L，且出现多饮、多食、多尿、体质量减轻的表现，表明成功制备糖尿病大鼠模型。参照文献[6]，C 组采用腹腔注射去铁胺 0.2mg/g 连续 1 周的方法处理糖尿病大鼠，C 组 cTnI 浓度、随机血糖值下降，心肌细胞损伤减轻，说明去铁胺对糖尿病大鼠有一定的器官保护作用。

研究表明，铁蛋白自噬增强是促进糖尿病发生的重要途径之一[7]。有 6.6% 的 2 型糖尿病患者中伴随高铁蛋白血症，升高的铁蛋白与胰岛素抵抗相关，而不是与胰岛素产生相关[8]。铁蛋白自噬增强，释放出游离的铁离子，加速细胞内氧化应激的发生[9]。NCOA4 介导的铁蛋白自噬是铁死亡通路的重要组成部分，它可以特异性识别铁蛋白重链，并连接自噬体上的 LC3，在溶酶体完成铁蛋白自噬，游离的铁离子释放到胞质中，通过芬顿反应促进细胞内氧自由基损伤，特别是细胞器膜脂质分子受到氧自由基攻击后形成脂质过氧化物，影响细胞器功能、激活凋亡通路等[10,11]。本研究中 D 组大鼠 NCOA4、FTH、LC3Ⅱ表达增加，cTnI 浓度升高，心肌细胞含铁小粒数量增加，提示糖尿病组心肌细胞内铁蛋白自噬增加，细胞损伤加重。

去铁胺作为一种铁螯合剂，临床上主要用于治疗地中海贫血，输血引起的铁负荷过重，可以结合 Fe^{3+} 形成水溶性络合物，并随尿液排出体外[12]。有研究显示，去铁胺在改善糖尿病胰岛素抵抗、减轻心肌细胞损伤中发挥重要作用，但其中的机制仍不明确[13,14]。本研究中 C 组大鼠在注射去铁胺 1 周后，心肌细胞 NCOA4、FTH、LC3Ⅱ表达降低，血糖水平也比 D 组降低，说明去铁胺的作用可能与抑制细胞内

铁蛋白自噬通路有关。虽然去铁胺处理后血糖水平未恢复正常,但是大鼠心肌细胞损伤明显减轻。张东等[15]研究发现,采用去铁胺 20mg/(kg·d)干预糖尿病大鼠 2 个月,血糖水平仍高于正常,但是可以在一定程度上减轻糖尿病大鼠骨质疏松的形成。

综上所述,去铁胺可以抑制糖尿病大鼠心肌细胞内 NCOA4 的表达,抑制铁蛋白自噬,减轻铁死亡,降低血糖水平和 cTnI 浓度,起到心肌保护的作用。本研究为糖尿病的临床治疗提供了新思路。

参考文献

1 Alonso N, Moliner P, Mauricio D. Pathogenesis, clinical features and treatment of diabetic cardiomyopathy[J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 10(67): 197 - 217

2 Batchuluun B, Matsumata T, Batchuluun B, *et al*. Serum ferritin level is higher in poorly controlled patients with type 2 diabetes and people without diabetes, aged over 55 years[J]. Diabetic Med, 2014, 31(4): 419 - 424

3 Codd R, Richardson - Sanchez T, Telfer TJ, *et al*. Advances in the chemical biology of desferrioxamine B[J]. ACS Chem Biol, 2018, 13(1): 11 - 25

4 Fang X, Wang H, Han D, *et al*. Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 11(6): 2672 - 2680

5 兰斌, 龚盛强, 成绍武, 等. 铁死亡的机制及其在相关疾病中的意义[J]. 基础医学与临床, 2018, 38(9): 1337 - 1341

6 Hou W, Xie YC, Song XX, *et al*. Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin[J]. Autophagy, 2016, 12(8): 1421 - 1428

7 熊烈, 宁帆, 石彦波. 铁过载在糖尿病发病机制中的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2019, 48(7): 164 - 167

8 邹大进, 杨茜, 杨颖. 肥胖与 2 型糖尿病的共同起源: 能量过剩引发肝脏胰岛素抵抗[J]. 中华糖尿病杂志, 2016, 8(2): 116 - 119

9 Doll S, Conrad M. Iron and ferroptosis: a still ill - defined liaison[J]. IUBMB Life, 2017, 69(6): 423 - 434

10 Xie Y, Hou W, Song X, *et al*. Ferroptosis: process and function[J]. Cell Death Differ, 2016, 23(3): 369 - 379

11 李博文, 王志维. 铁死亡是一种新的调节性细胞死亡形式[J]. 基础医学与临床, 2019, 39(2): 247 - 251

12 Stockwell BR, Angeli JPF, Bayir H, *et al*. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology and disease[J]. Cell, 2017, 171(2): 273 - 285

13 Xie P, Yang L, Talaiti A, *et al*. Deferoxamine activated hypoxia inducible factor - 1 restores cardioprotective effects of sevoflurane post conditioning in diabetic rats[J]. Acta Physiol, 2017, 221(2): 98 - 114

14 Stoyanovsky DA, Tyurina YY, Shrivastava I, *et al*. Iron catalysis of lipid peroxidation in ferroptosis: regulated enzymatic or random free radical reaction? [J]. Free Rad Biol Med, 2018, 133(3): 153 - 161

15 张东, 赵鹏, 金佳, 等. 去铁胺预防 1 型糖尿病骨丢失的实验研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2019, 35(1): 67 - 72

(收稿日期: 2020 - 03 - 31)
(修回日期: 2020 - 04 - 08)

加贝酯对脑缺血再灌注大鼠神经细胞凋亡的影响及机制研究

乔建新　刘熙鹏　刘　明　曹　兵

摘　要　目的　研究加贝酯(gabexate mesilate,GM)对脑缺血再灌注(ischemia reperfusion, I/R)大鼠神经细胞凋亡的影响并初探其机制。**方法**　取 120 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、I/R 组、尼莫地平(NMP)2mg/(kg·d)组和 GM 5、10、20mg/(kg·d)组,每组 20 只;采用线栓阻断大脑中动脉 2h 的方法制备脑 I/R 大鼠模型,造模完成后尾静脉注射给药,1 次/天连续 7 天。通过 HE、TUNEL 染色法行脑组织病理学检查和细胞凋亡观察;生化分析法测定抗氧化酶(SOD、GSH - Px)活性和 MDA 含量;Western blot 法检测 cleaved caspase - 3、NF - κB、内质网应激凋亡通路相关蛋白(p - JNK、CHOP)表达。**结果**　与 I/R 组比较,经 GM 10、20mg/(kg·d)或 NMP 2mg/(kg·d)治疗 7 天明显改善脑组织形态结构病变和细胞损伤,改善细胞凋亡状况、降低凋亡指数(AI),提高 SOD、GSH - Px 活性并降低 MDA 含量,下调 cleaved caspase - 3、NF - κB、p - JNK、CHOP 蛋白表达,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 NMP 2mg/(kg·d)组比较,GM 20mg/(kg·d)组脑组织病变和细胞凋亡状况改善效果较优、AI 降低,

基金项目:河北省医学科学研究重点课题计划项目(20180814)
作者单位:075000　张家口,河北北方学院附属第一医院
通讯作者:乔建新,电子信箱:zhjkqjx@163.com