

GDF11 对 II 型糖尿病小鼠心肌损伤的保护作用

江丽青, 王晓武, 谭延振, 李步滢, 刘金成, 段维勋*

(第四军医大学西京医院心血管外科, 西安 710032)

【摘要】 目的 观察 GDF11 对 II 型糖尿病 C57BL/6J 小鼠心肌损伤的保护作用及心肌凋亡水平的变化情况。**方法** 60 只体重 20~25 g 的雄性 C57BL/6J 小鼠, 随机分为 3 个组: 正常对照组(control)、II 型糖尿病模型组(DM)和 GDF11 干预组(DM + GDF11)。高脂高糖饲料饲养 4 周后, 连续 3 次腹腔注射 60 mg/kg 链脲佐菌素(STZ), 建立 II 型糖尿病小鼠模型, 持续高脂高糖饲料饲养 4 周后, 小动物超声检测心功能, 取心肌组织, TUNEL 染色检测心肌组织凋亡比例, Western blot 法检测凋亡相关蛋白 cleaved-caspase-3、Bcl-2 和 Bax 的表达。**结果** 糖尿病损伤显著下调左室射血分数和左室短轴缩短率, 增加心肌凋亡率, 而给予重组 GDF11 蛋白能够明显改善心功能并减轻心肌凋亡。**结论** 外源性的 GDF11 可以显著减轻糖尿病损伤后心肌凋亡水平, 改善心功能。

【关键词】 生长分化因子 11; II 型糖尿病; 心肌保护; 凋亡; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 04-0362-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2017.04.004

Protective effect of growth differentiation factor 11 on myocardial injury in type II diabetic mice

JIANG Li-qing, WANG Xiao-wu, TAN Yan-zhen, LI Bu-ying, LIU Jin-cheng, DUAN Wei-xun*

(Department of Cardiovascular Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

【Abstract】 Objective To observe the protective effect of growth differentiation factor 11 (GDF11) on myocardial injury and the changes of myocardial apoptosis in type 2 diabetic C57BL/6J mice. **Methods** Sixty male C57BL/6J mice weighing 20-25 g were randomly divided into three groups: control group (control), type 2 diabetes mellitus group (DM) and GDF11 intervention group (DM + GDF11). To establish mouse model of type 2 diabetes, the mice were fed with high fat and high sugar diet for 4 weeks, and i. p. injected consecutively three times of streptozotocin (STZ) in a dose of 60 mg/kg. After the continuous high-fat and high-sugar diet for 4 weeks, the cardiac function was detected by small animal ultrasound, TUNEL staining was used to detect the apoptosis in myocardium, and the expressions of cleaved-caspase-3, Bcl-2, Bax were measured. **Results** Diabetic injury significantly reduced the left ventricular ejection fraction and left ventricular short axis shortening rate, and increased myocardial apoptosis. Recombinant GDF11 protein significantly improved cardiac function and reduced myocardial apoptosis. **Conclusions** Exogenous GDF11 can significantly reduce myocardial apoptosis and improve heart function after diabetic injury.

【Key words】 Growth differentiation factor 11; Type II diabetes mellitus; Myocardial protection; Apoptosis; Mice

Corresponding author: DUAN Wei-xun. E-mail: duanweixun@126.com

糖尿病是一种全球性的多因素的代谢性疾病, 是其最常见的并发症之一, 也是 II 型糖尿病患者死亡的主要原因之一。研究显示, DCM 病理过程密切

【基金项目】 国家自然科学基金(81570230); 国家自然科学基金(81570330); 国家“十二五”科技支撑计划课题(2011BAI1B20)。

【作者简介】 江丽青(1985-), 女, 实习研究员, 研究方向: 心肌保护机制研究。Email: jliqing_Q202@126.com

【通讯作者】 段维勋(1977-), 男, 副教授, 研究方向: 抗心肌缺血/再灌注损伤的基础研究。Email: duanweixun@126.com

伴随着心肌细胞的凋亡,进而可能引起心肌纤维化,增加心室壁僵硬,降低心室顺应性,致使心室收缩及舒张功能不全,最终导致心力衰竭^[1-2]。因此,研究 DCM 中心肌细胞凋亡的分子机制及其干预手段对该病的防治具有重要意义。生长分化因子 11 (growth differentiation factor 11, GDF11) 参与抗心肌肥厚^[3],减轻动脉粥样硬化^[4],抗心肌缺血再灌注损伤^[5]等心血管疾病病理过程,但目前关于 GDF11 在糖尿病心肌是否发挥保护作用尚未有报道。本实验通过建立 II 型糖尿病小鼠模型,给予重组 GDF11 蛋白,研究 GDF11 对糖尿病心肌损伤的保护作用及其具体作用机制,为糖尿病心肌病的预防提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

60 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,体重 20 ~ 25 g,8 周龄,均由第四军医大学动物实验中心提供并饲养【2014 (陕) SCXK - 002】。饲养期间给予啮齿类动物标准颗粒饲料(由实验动物中心提供)及自由饮水,12 h 循环灯光,恒定湿度,室温(23 ± 2)℃。实验鼠饲养及组织取材均于第四军医大学西京医院心血管外科实验室设备内进行。所有动物实验操作均符合第四军医大学实验动物福利伦理规范。

1.1.2 仪器与试剂

戊巴比妥钠(北京索来宝有限公司),GDF11 重组蛋白(美国 R&D Systems 公司),TUNEL 试剂盒、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(德国罗氏公司),RIPA 裂解液(上海碧云天公司),cleaved caspase-3、Bcl-2、Bax、 β -actin 抗体(美国 Cell Signaling 公司),预染标准蛋白质 Marker (美国 Abcom 公司);MP100 压力换能器(美国 Biopac Systems 公司),电泳、湿转仪槽以及 Western 发光照相系统(美国 Bio-Rad 公司),Vevo770 小动物超声仪(加拿大 Visual-Sonics 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和 II 型糖尿病小鼠模型的建立

60 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为 3 组(每组 20 只):①正常对照组(control):除 4 周后注射与糖尿病组等量无 STZ 的柠檬酸钠缓冲液外,其余均以正常饮食喂养;② II 型糖尿病组(DM):模型建成前后,均以高糖高脂饮食喂养;③ DM + GDF11 组:II

型糖尿病模型建立后,根据小鼠体重腹腔注射含 0.1 mg/(kg·d) 的 GDF11 的生理盐水缓冲液,连续注射 4 周。

II 型糖尿病小鼠模型建立方法:雄性 C57BL/6J 小鼠以高糖高脂饮食(10% 猪油,20% 蔗糖,25% 胆固醇,1% 胆盐,北京科奥协力饲料有限公司)喂养 4 周,形成胰岛素抵抗^[6],禁食不禁水 12 h 后按 60 mg/kg 剂量腹腔注射链脲佐霉素(streptozotocin, STZ,配制 pH 4.2 ~ 4.5 柠檬酸钠缓冲液),每天 1 次,注射 3 d,然后测空腹血糖,血糖水平大于或等于 11.1 mmol/L 即为造模成功^[7]。

1.2.2 体重和胰岛素水平的检测

分别在 0、2、4、5、6、7 及 8 周测定小鼠体重,在 0、4、5、6、7 及 8 周测定空腹血糖水平。

1.2.3 心功能检测

GDF11 干预 4 周后,利用 Vevo770 小动物超声仪检测并记录心功能的变化,计算左室射血分数(LVEF)、左室短轴缩短率(LVFS)功能的变化,测量 5 个心动周期,取平均值作为检测数据。

1.2.4 心肌组织凋亡检测

腹腔注射 4 周 GDF11 后,戊巴比妥钠麻醉后(按 45 mg/kg 腹腔注射),立即取出心脏,以预冷的 PBS 冲洗干净,取心尖 2 ~ 5 mm 组织。将取下组织切去心脏冠状面最大横径,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h 后,进行脱水石蜡包埋切片。每张切片在凋亡区随机选取 5 个以上高倍视野,计数每个高倍视野内凋亡细胞核数,总细胞核数,计算心肌组织凋亡率(apoptotic index)。

1.2.5 心肌凋亡相关分子检测

腹腔注射 4 周 GDF11 后,戊巴比妥钠麻醉后,迅速取出心脏,用预冷的生理盐水冲洗后,剪取心肌标本,液氮中保存待测。心肌组织匀浆、裂解、离心后,取上清液分装保存备用。BCA 法测定蛋白浓度并进行蛋白定量,加上样缓冲液、煮沸后得到上样样本。经聚丙烯酰胺变性凝胶电泳分离蛋白,用湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜,50 g/L 脱脂牛奶封闭后,TBST 洗脱 1 次,切膜,分别加入 1:1000 的 cleaved caspase-3、Bcl-2、Bax、 β -actin、GDF11 抗体,4℃ 过夜, TBST 洗脱 3 次,分别加 1:5000 HRP 标记的二抗(山羊抗鼠及山羊抗兔),室温孵育 2 h, TBST 洗脱 3 次,使用 ECL-plus 试剂盒发光,通过生化检测系统成像并分析结果,以 β -actin 作为内参照,检测各蛋白的表达情况。

1.3 统计学处理

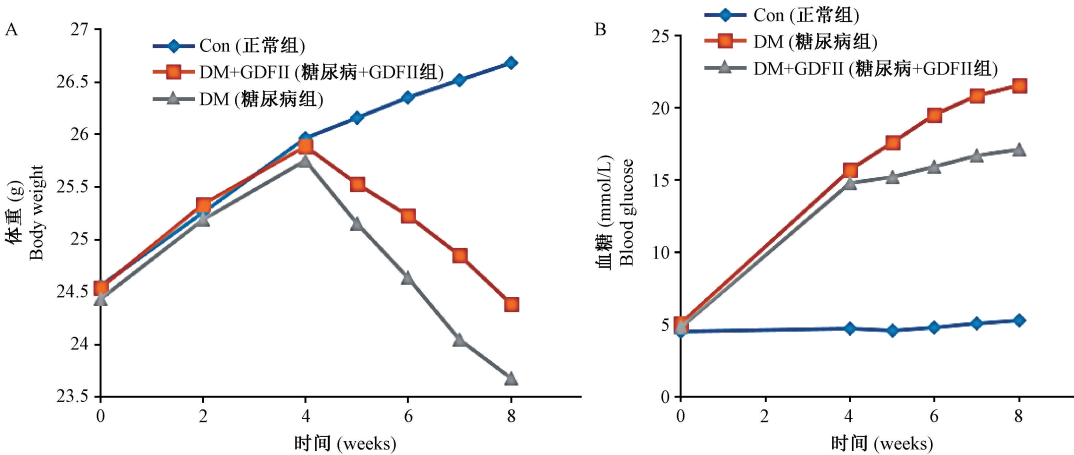
实验结果数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Prism 5.0 软件进行统计学分析,多组间数据比较采用方差分析(ANOVA),若总体差异显著,再以 t 检验分析相应两组间的显著性差别。 $P \leq 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 各时间段体重和血糖指标检测

实验开始,各组小鼠体重无差异,至第 4 周末,

各组小鼠体重都在增加;从第 5 周开始,DM 组和 DM + GDF11 组体重开始呈下降趋势,但两组无统计学差异($P > 0.05$),Con 组体重仍在缓慢增加。从 4 周开始连续注射 3 次 STZ 后测小鼠空腹血糖,DM 组和 DM + GDF11 组血糖均值大于 11.1 mmol/L,证实造模成功。然后每周测空腹血糖后,发现 Con 组血糖正常,DM 组和 DM + GDF11 组血糖都在不断增加,但 DM + GDF11 组比 DM 组增加缓慢,但差异无显著性($P > 0.05$),见图 1。



注:A:各组小鼠体重;B:各组小鼠血糖。与 Con 组比较,DM 组和 DM + GDF11 组 $P < 0.05$,与 DM 组比较,DM + GDF11 组 $P > 0.05$, $n = 10$ 。

图 1 各时间段各组小鼠体重和血糖指标

Note. A:Body weight of mice;B:Blood glucose in the mice. Compared with the Con, DM and DM + GDF11 groups, $P < 0.05$; Compared with the DM and DM + GDF11 groups, $P > 0.05$, $n = 10$.

Fig.1 The body weight and blood glucose in each group at different time points

2.2 各组心功能指标

GDF11 干预 4 周后超声心动图显示,与 Con 组比较,DM 组心功能明显损伤($P < 0.01$);与 DM 组相比,DM + GDF11 组 LVEF 与 LVFS 显著提高($P < 0.01$),见图 2。

2.3 各组心肌组织的凋亡率

GDF11 干预 4 周后,留取心肌组织 TUNEL 凋亡检测显示,与 Con 组比较,DM 组损伤明显增加心肌凋亡率($P < 0.01$);与 DM 组比较,DM + GDF11 心肌凋亡率显著下降 $P < 0.01$,见图 3。

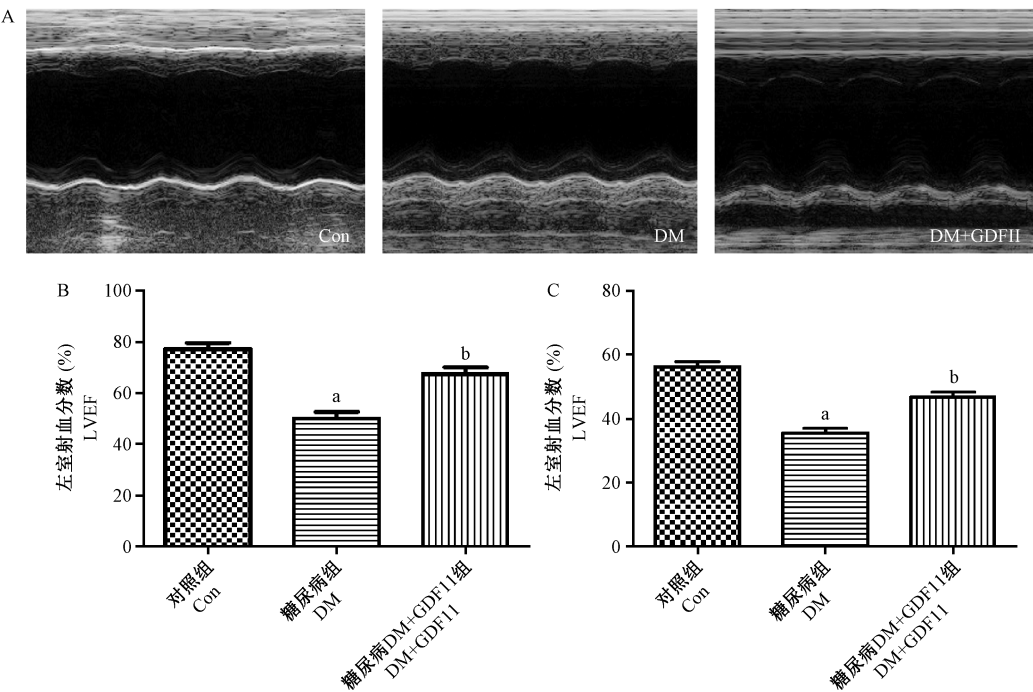
2.4 各组心肌凋亡相关蛋白的表达

GDF11 干预 4 周后,Western blot 检测统计显示,与 Con 组比较,DM 组 cleaved caspase-3、Bax 表达显著上调,Bcl-2、GDF11 表达显著下调(均 $P < 0.05$);与 DM 组比较,DM + GDF11 组 Cleaved caspase-3、Bax 表达显著下调,Bcl-2、GDF11 表达显

著上调(均 $P < 0.05$),见图 4。

3 讨论

近年来,糖尿病继发的心血管并发症成为糖尿病患者死亡的主要原因,发病率逐年增高。其中,糖尿病心肌病是其主要并发症之一,主要发病环节包括微血管病变、心肌间质纤维化、心肌细胞肥厚、凋亡等^[8]。其中,心肌细胞过度凋亡在其病理生理过程中发挥重要作用^[9]。因此,减轻糖尿病心肌病发病过程中心肌细胞凋亡并维护心功能一直是该领域基础研究的热点。目前,人们对糖尿病心肌病的研究多借助于 II 型糖尿病老鼠模型,本研究采用高糖高脂饮食诱导,并结合小剂量多次注射 STZ,使胰岛 β 细胞处于高糖负荷状态诱发胰岛功能受损,在一定程度上模拟环境因素对于糖尿病发生和发展的影响。

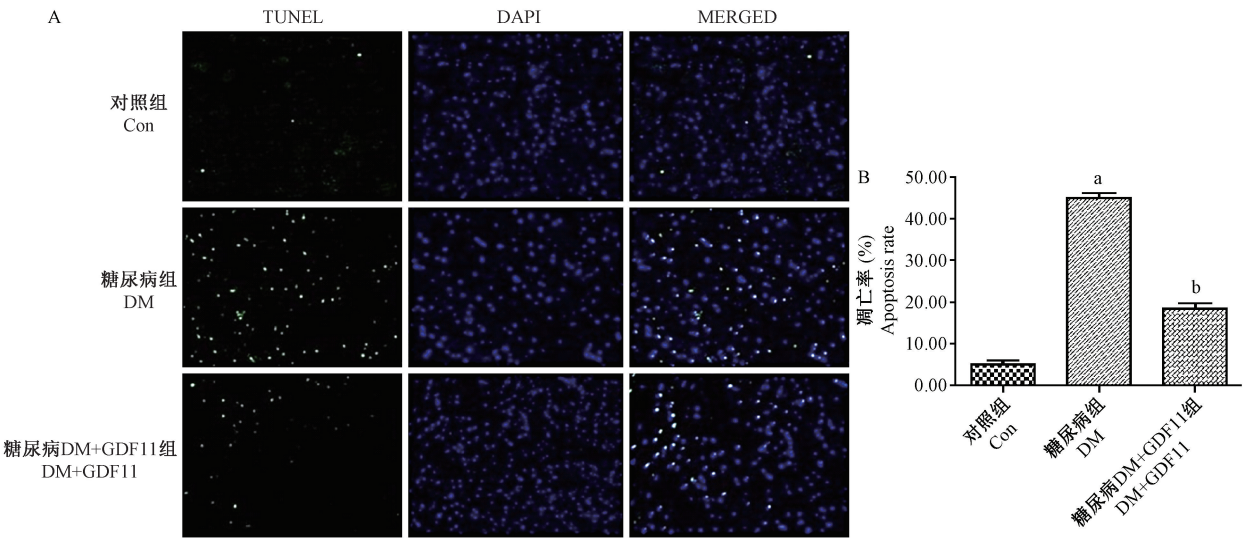


注:A:各组超声心动图;B:左室射血分数;C:左室短轴缩短率。与Con组比较,^a $P<0.01$;
与DM组比较,^b $P<0.01$, $n=5$ 。

图2 GDF11 干预 4 周后各组小鼠心脏功能指标

Note. A; Echocardiography of each group; B; LVEF; C; LVFS. Compared with the control group, ^a $P<0.01$; compared with the DM group, ^b $P<0.01$, $n=5$.

Fig. 2 The cardiac function of mice after GDF11 intervention for 4 weeks

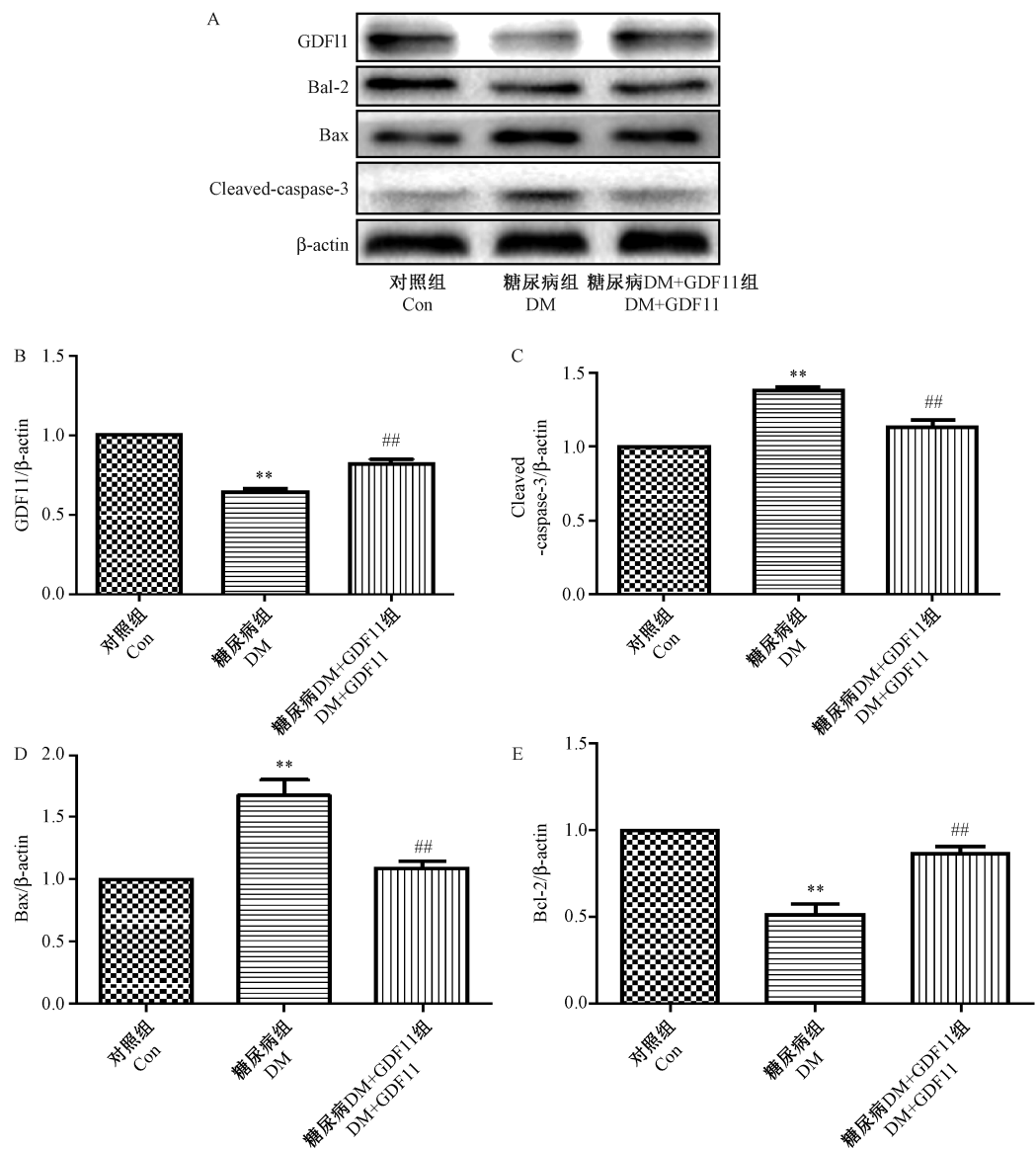


注:A:各组心肌切片 TUNEL 法检测图像(×400);B:心肌细胞凋亡率统计(%);与Con组比较,^a $P<0.01$;
与DM组比较,^b $P<0.01$ 。

图3 GDF11 干预 4 周后各组心肌组织凋亡率

Note. A; Images of each group detected with TUNEL staining, ×400; B; Apoptosis rate of cardiomyocytes in each group (%); Compared with the control group, ^a $P<0.01$; Compared with the DM group, ^b $P<0.01$.

Fig. 3 Apoptosis rate of myocardial tissue after GDF11 intervention for 4 weeks



注:A:各组 cleaved-caspase-3、Bax、Bcl-2、GDF11 的表达水平;B-E:各组 cleaved-caspase-3、Bax、Bcl-2、GDF11 表达的比较分析。
与 Con 组比较, * $P < 0.01$; 与 DM 组比较, # $P < 0.01$, $n = 5$ 。

图 4 GDF11 干预 4 周后各组蛋白表达

Note. A: The expression levels of cleaved-caspase-3, Bax, Bcl-2 and GDF11 in each group; B-E: Comparison of cleaved-caspase-3, Bax, Bcl-2, and GDF11 in each group. Compared with the control group, * $P < 0.01$; compared with the DM group, # $P < 0.01$, $n = 5$.

Fig. 4 Expression of proteins after GDF11 intervention for 4 weeks

GDF11 是骨形态发生蛋白 / 转化生长因子 β 超家族的成员之一,在许多组织中表达,它通过 IIB 类受体 (ActR IIB) 和 IIA 类受体 (ActR IIA) 激活 Smad2/3 通路,再与通用型 Smad4 结合形成复合物,转移至细胞核,调节基因的转录、翻译和表达,从而实现其多种生物学功能^[10]。研究显示,外源性补充 GDF11 蛋白能够逆转老年鼠的心肌肥厚,改善骨骼肌功能,还能改善缺血再灌注后心功能和梗死面

积^[5,11];GDF11 具有逆转心脏衰老;改善大脑的脉管系统;恢复大脑的认知能力;增加肌肉的数量,提高肌肉的耐力等促使动物机体从年老状态返回年轻态的功能^[12]。此外,有研究报道称循环中 GDF11 或者 GDF11/8 浓度越高的人群发生心血管事件和死亡的风险越低^[13]。

在本试验中,我们采用小动物超声分析显示,II 型糖尿病小鼠比正常小鼠左室射血分数与左室短轴缩短率明显降低,心功能明显损伤 ($P < 0.01$);而用

重组 GDF11 预防性治疗 4 周后,左室射血分数与左室短轴缩短率显著提高,心功能明显改善,初步说明 GDF11 具有改善糖尿病心肌损伤的功能。通过 TUNEL 凋亡检测初步显示,II 型糖尿病小鼠凋亡明显,而 GDF11 可以明显减少凋亡。同时 Western blot 检测结果也显示,II 型糖尿病组抗凋亡蛋白 Bcl-2 显著下调,而促凋亡蛋白 cleaved caspase-3、Bax 表达显著上调,给予重组 GDF11 蛋白后,Bcl-2 上调,cleaved caspase-3、Bax 表达显著下调,也证实了 GDF11 可以明显改善糖尿病心肌凋亡,发挥抗糖尿病心肌损伤作用。结合文献报道,我们初步猜测 GDF11 发挥抗糖尿病心肌凋亡机制是激活了 Smad2/3 通路,下一步我们将研究具体的凋亡机制。

我们在本实验中发现,对 II 型糖尿病小鼠动物模型,GDF11 可显著改善心功能,降低心肌组织凋亡,从而保护心肌。本研究揭示了 GDF11 对糖尿病心肌病的保护作用,并通过进一步研究具体的作用机制,为临床药物开发和疾病治疗提供实验依据。

参 考 文 献

- [1] Wu YQ, Reece EA, Zhong JX, et al. Type 2 diabetes mellitus induces congenital heart defects in murine embryos by increasing oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2016, 215(3): 366. e1–366. e10.
- [2] Russo I, Frangogiannis NG. Diabetes-associated cardiac fibrosis: cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 90: 84–93.
- [3] Smith SC, Zhang XX, Zhang XY. GDF11 does not rescue aging-related pathological hypertrophy [J]. *Circ Res*, 2015, 117(11): 926–932.
- [4] Mei W, Xiang GD, Li YX, et al. GDF11 protects against endothelial injury and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein e-null mice [J]. *Mol Ther*, 2016, 24(11): 1926–1938.
- [5] Du GQ, Shao ZB. Targeted myocardial delivery of GDF11 gene rejuvenates the aged mouse heart and enhances myocardial regeneration after ischemia-reperfusion injury [J]. *Basic Res Cardiol*, 2017, 112: 7.
- [6] Gilbert ER, Fu Z, Liu D. Development of a nongenetic mouse model of type 2 diabetes [J]. *Exp Diabetes Res*, 2011, 2011: 416254.
- [7] 高秀莹, 周迎生. 2 型糖尿病鼠类模型的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(4): 71–76.
- [8] 揭海, 吴铨. p38MAPK 在糖尿病心肌病中的作用研究进展 [J]. *中国医学创新*, 2015, 12(13): 153–156.
- [9] Rajesh M, Bótkai S, Kechrid M, et al. Cannabinoid 1 receptor promotes cardiac dysfunction, oxidative stress, inflammation, and fibrosis in diabetic cardiomyopathy [J]. *Diabetes*, 2012, 61(3): 716–727.
- [10] Oh SP, Yen CY, Lee Y, et al. Activin type IIA and IIB receptors mediate GDF11 signaling in axial vertebral patterning [J]. *Genes Dev*, 2002, 16(21): 2749–2754.
- [11] Loffredo FS, Steinhauser ML, Jay SM, et al. Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy [J]. *Cell*, 2013, 153(4): 828–839.
- [12] 沈巧艳, 李娜, 华进联. 抗衰老的 GDF11 生物学特征与功表现 [J]. *中国生物化学与生物学报*, 2016, 32(8): 872–878.
- [13] Olson KA, Beatty AL, Heidecker B, et al. Association of growth differentiation factor 11/8, putative anti-ageing factor, with cardiovascular outcomes and overall mortality in humans: analysis of the Heart and Soul and HUNT3 cohorts [J]. *Eur Heart J*, 2015, 36: 3426–3434.

[收稿日期] 2017-05-30