

Effect of Calcium Sensitive Receptor Expression on Myocardial Ultrastructure in Experimental Diabetic Rats

Shuzhi Bai^{1*}, Hao Wu², Xiaoshu Jiang¹, Yu Wu³

¹Department of Pathophysiology, Harbin Medical University, Harbin Heilongjiang

²Heilongjiang Provincial Forestry General Hospital, Harbin Heilongjiang

³The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin Heilongjiang

Email: *baishuzhi12@163.com

Received: Jan. 4th, 2019; accepted: Feb. 6th, 2019; published: Feb. 13th, 2019

Abstract

Objective: To observe the effect of calcium sensitive receptor (CaSR) expression on myocardial ultrastructure in experimental diabetic rats. **Methods:** Wistar rats were randomly divided into 3 groups including control, diabetic-4 week and diabetic-8 week groups. Rats in the diabetes group were fed a high-glucose and high-fat diet, and intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, 30 mg/kg) to establish a type 2 diabetes model. Cardiac morphological changes were observed by electron microscope, and CaSR protein expression in cardiac tissue was detected by Western blot. **Results:** Compared with the control group, diabetic groups showed decreased expression of CaSR protein in the myocardium of diabetic rats, and gradually worsened with the prolongation of the course of the disease. **Conclusion:** The CaSR expression of myocardium is reduced in the progression of diabetes, and it may lead to changes in myocardial ultrastructure.

Keywords

Calcium-Sensing Receptor, Diabetes, Myocardium

钙敏感受体表达变化对实验性糖尿病大鼠心肌超微结构的影响

白淑芝^{1*}, 吴昊², 姜晓姝¹, 吴昱³

¹哈尔滨医科大学病理生理学教研室, 黑龙江 哈尔滨

²黑龙江省森工总医院, 黑龙江 哈尔滨

³哈尔滨医科大学附属第二临床医院, 黑龙江 哈尔滨

*通讯作者。

文章引用: 白淑芝, 吴昊, 姜晓姝, 吴昱. 钙敏感受体表达变化对实验性糖尿病大鼠心肌超微结构的影响[J]. 临床医学进展, 2019, 9(2): 116-120. DOI: 10.12677/acm.2019.92019

Email: baishuzhi12@163.com

收稿日期: 2019年1月4日; 录用日期: 2019年2月6日; 发布日期: 2019年2月13日

摘要

目的: 观察钙感受体(CaSR)表达变化对实验性糖尿病大鼠心肌超微结构的影响。**方法:** Wistar大鼠随机分为对照组、糖尿病4周组和糖尿病8周组。通过高糖高脂饮食喂养联合腹腔注射STZ (30 mg/kg)建立糖尿病模型。通过透射电镜观察各组大鼠心肌超微结构的改变, 心肌组织CaSR蛋白的表达通过Western blot检测。**结果:** 与对照组相比, 糖尿病组大鼠心肌CaSR蛋白表达随着病程的延长逐渐降低, 心肌结构损伤严重。**结论:** 在大鼠糖尿病心肌病发生发展过程中CaSR的表达逐渐下降, 可能导致糖尿病心肌损伤、发生糖尿病心肌病的原因之一。

关键词

钙感受体, 糖尿病, 心肌

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

我国糖尿病的发病率已达 10%以上, 其中近一半死于心血管合并症。糖尿病的严重合并症之一, 即糖尿病性心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM) [1], 发病机制十分复杂, 迄今尚不明确。钙感受体(CaSR)属于 G 蛋白耦联受体超家族 C 家族成员之一, 在国际研究已经成为热点内容, 国内研究刚起步, 主要集中在对肾脏、胃肠道、神经系统等方面进行研究, 在心血管系统研究的较少[2]。本实验主要检测 DCM 大鼠不同时段心肌组织 CaSR 蛋白的表达规律及心肌超微结构损伤的程度, 为进一步揭示 DCM 的发生机制以及指导临床治疗奠定了一定的理论基础。

2. 材料与方法

2.1. 实验动物

健康雄性 Wistar 大鼠(210 g~250 g)购自哈尔滨医科大学附属二院动物研究所。

2.2. 主要试剂

佐链脲菌素(STZ, Biosharp, Japan), AA、TEMED、浓缩胶浓缩液、分离胶浓缩液、转移缓冲液、电泳缓冲液(北京普利莱); 蛋白定量试剂盒(北京碧云天), GAPDH 多克隆抗体(Santa Cruz, CA), CaSR 抗体(Alpha Diagnostic International Inc., USA), 其他试剂为国产分析纯。

2.3. 主要器材

BECKMAN 低温离心机, 透射电镜(H-7650, Japan), Western blot 电泳槽(北京六一厂), 紫外分光光度计(US-640), 紫外凝胶检测和成像系统(Bio-Rad), 酶标仪(DG3022 A), V-86℃超低温冰箱日本 SANYO 公司等。

2.4. 型糖尿病模型的制备

30 只雄性大鼠, 饲养在 22℃~24℃ 的安静环境中。正常饲养一周后, 动物随机分为 3 组, 每组各 10 只。对照组大鼠给予正常的饮食、饮水。糖尿病 4 周组和 8 周组大鼠给喂养高糖高脂饮食(成分: 2%胆固醇, 1%胆酸钠, 67%基础饲料, 20%糖, 10 猪油%)。4 周后, 糖尿病组通过腹腔注射低剂量 STZ (30 mg/kg) [3]。三天后检测血糖高于 16.7 mmol/L 为造模成功。观察大鼠一般状态, 每周监测血糖、饮食、饮水量, 至实验完成。

2.5. 实验分组

1) 正常对照组(Con); 2) 糖尿病 4 周组(D4w); 3) 糖尿病 8 周组(D8w)。

2.6. 大鼠血糖水平测定

实验结束前一天, 采用剪尾法, 通过大鼠尾静脉采血用血糖仪(ACCU CHEK, Roche, Germany)检测血糖。

2.7. 电镜观察超微结构

取左心室心尖部组织, 切成 1 mm³ 大小组织多块, PBS 洗涤 1 遍, 2.5%戊二醛固定; PBS 洗三次, 4℃、1%锇酸固定, 常规乙醇系列脱水, 环氧树脂包埋, 铅-铀双重染色, 干燥后置于 H-7650 型透射电镜下, 观察并摄片。

2.8. Western Blot 检测蛋白的表达

将大鼠心室肌组织通过液氮研磨后加入组织裂解液, 置于 4℃ 条件下裂解 1 小时, 每 15 分钟混匀一次。然后 4℃, 12,000 g 离心 15 分钟, 取上清进行蛋白质定量。取 50 ug 总蛋白样品进行 10%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转印至 PVDF 膜, 用 5%封闭液室温封闭 1 小时后, 分别用 CaSR 抗体(1:2000)、GAPDH(1:500)抗体 4℃ 震荡过夜。再用二抗(1:1000 的羊抗兔 IgG 二抗; 1:1000 的兔抗鼠 IgG 二抗, 碱性磷酸酶标记)孵育, 室温下振荡 1 小时。显色, 在凝胶成像系统下拍照、分析。计算各蛋白条带的光密度值, 蛋白表达水平以其与内参 GAPDH 光密度比值来表示。

2.9. 统计学处理

实验数据采用均数 ± 标准差($\bar{X} \pm S$), 采用方差分析和配对 *t* 检验判断其差异显著性。采用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计学分析。

3. 结果

3.1. 大鼠一般体征

实验中观察了大鼠的一般状态, 发现正常对照组大鼠精神良好, 反应灵敏。糖尿病组大鼠都出现了饮水量增加, 饮食增多, 精神状态差, 动作迟缓(表 1)。

Table 1. General characteristics in control and diabetic rats

表 1. 大鼠饮食饮水测定

Group	Water intake (ml/d)	Food intake (g/d)
Control	26.2 ± 2.0	12.2 ± 0.9
Dia-4w	165 ± 5.1 [#]	35.3.1 ± 2.4 [#]
Dia-8w	249 ± 5.7 ^{#△}	47.9 ± 2.7 ^{#△}

[#]*P* < 0.05 vs Control; [△]*P* < 0.05 vs Dia-4w, n = 10.

3.2. 大鼠血糖测定

与正常对照组大鼠血糖相比, 糖尿病 4 周组和 8 周组大鼠随机血糖显著升高($P < 0.05$) (表 2)。

Table 2. Random blood glucose measured in rats

表 2. 大鼠血糖监测

	Control	Dia-4w	Dia-8w
Glucose	4.9 ± 0.2	26.4 ± 2.1 [#]	27.9 ± 1.8 [#]

[#] $P < 0.05$ vs Control, $n = 10$.

3.3. 透射电镜下各组心肌组织超微结构的改变

电镜结果显示对照组心肌细胞排列规则, 心肌细胞质膜完整, 线粒体大小均一、排列整齐。糖尿病 4 周组和 8 周组出现心肌细胞排列杂乱, 心肌细胞质膜不清晰、肌丝松散, 部分发生断裂, 线粒体大小不一, 出现肿胀, 甚至空泡样变, 排列不规则, 糖尿病 8 周组更为明显(图 1)。

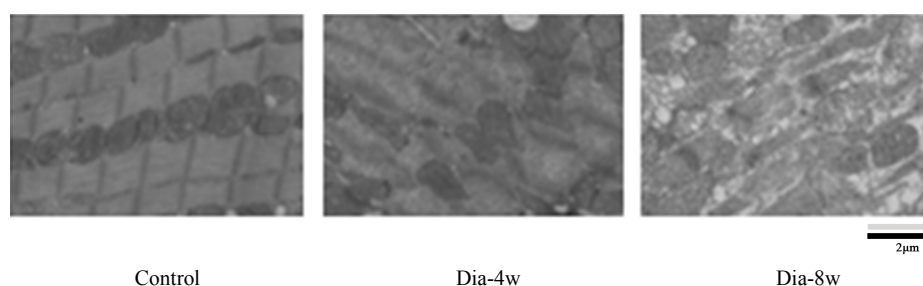


Figure 1. The ultrastructure alteration of rat myocardium in different groups ($\times 5000$)

图 1. 心肌超微结构的改变($\times 5000$)

3.4. 心肌组织 CaSR 蛋白表达的变化

通过 Western blot 检测 CaSR 蛋白的表达, 与正常对照组相比, 糖尿病 4 周组大鼠心肌组织 CaSR 表达降低, 糖尿病 8 周组更低($P < 0.05$) (表 3)。

Table 3. Protein expression of CaSR in heart analyzed by Western blot

表 3. 通过 Western blot 检测大鼠心肌 CaSR 蛋白表达

	Control	Dia-4w	Dia-8w
Glucose	0.45 ± 0.03	0.2 ± 0.0019 [#]	0.08 ± 0.007 ^{#△}

[#] $P < 0.05$ vs Control; [△] $P < 0.05$ vs Dia-4w, $n = 6$.

4. 讨论

本研究复制了糖尿病大鼠模型, 监测了大鼠的一般状态、饮食、饮水及血糖, 通过透射电镜观察心肌超微结构变化, 并检测心肌组织 CaSR 蛋白的动态表达来探讨 CaSR 在大鼠 DCM 发生中的作用。

复制糖尿病的方法有多种, 我们在实验中采用先用高糖高脂饮食诱导, 然后进行腹腔注射 STZ 的方法来复制大鼠 DCM 动物模型。与对照组大鼠相比, 糖尿病组大鼠出现多食、多饮, 血糖一直处于高水平。上述结果, 说明本实验成功建立了大鼠糖尿病动物模型。通过透射电镜观察发现与正常大鼠相比, 糖尿病各组大鼠心肌出现了肌原纤维断裂、心肌细胞排列不规则, 线粒体发生肿胀、空泡样变。心肌超微结构的损伤与文献报道的 DCM 的特点一致[4]。

DCM 的发生机制迄今尚不明确。CaSR 是 G 蛋白偶联受体, 以前研究发现高脂血症和动脉粥样硬化能使心肌 CaSR 表达增加, 心肌凋亡严重[5] [6], 这说明 CaSR 在心脏功能异常中发挥了至关重要的作用。但是, CaSR 在 DCM 大鼠心肌的表达规律, 迄今鲜见报道。我们检测了糖尿病大鼠心肌 CaSR 蛋白的表达情况, 结果发现与正常对照组相比, 糖尿病大鼠心肌 CaSR 蛋白的表达降低, 尤其糖尿病 8 周组更低, 心肌超微结构损伤也是糖尿病 8 周组更加严重。Ward 等检测了 1 型糖尿病大鼠肾脏 CaSR 表达也是显著降低的[7]。

总之, 我们的研究发现 2 型糖尿病大鼠心肌组织 CaSR 表达有一定的规律性, 即随着病程延长逐渐降低, 且心肌损伤逐渐加重, 可能与 CaSR 表达减少造成细胞内钙稳态紊乱有关, 在后续的研究中我们将进一步探讨。

基金项目

黑龙江省教育厅科技研究项目资助(12541276)。

参考文献

- [1] Qi, K. and Zhong, J. (2018) LncRNA HOTAIR Improves Diabetic Cardiomyopathy by Increasing Viability of Cardiomyocytes through Activation of the PI3K/Akt Pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **16**, 4817-4823. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6755>
- [2] 徐长庆, 张伟华. 心血管系统钙感受体的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(2): 409-413.
- [3] Zhang, M., Lv, X.Y., Li, J., et al. (2008) The Characterization of High-Fat Diet and Multiple Low-Dose Streptozotocin Induced Type 2 Diabetes Rat Model. *Experimental Diabetes Research*, **2008**, Article ID: 704045.
- [4] 林中民, 焦立卓, 郑怡, 等. 姜黄素衍生物 B06 对 2 型糖尿病大鼠心肌的保护作用及其机制探讨[J]. 中国应用生理学杂志, 2014, 30(1): 38-42.
- [5] Sun, Y.H., Liu, M.N., Li, H., et al. (2006) Calcium-Sensing Receptor Induces Rat Neonatal Ventricular Cardiomyocyte Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **350**, 942-948. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.09.142>
- [6] Zhang, W.H., Lu, F.H., Zhao, Y.J., et al. (2007) Post-Conditioning Protects rat Cardiomyocytes via PKC-Mediated Calcium-Sensing Receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **361**, 659-664. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.077>
- [7] Ward, B.K., Magno, A.L., Walsh, J.P., et al. (2012) The Role of the Calcium-Sensing Receptor in Human Disease. *Clinical Biochemistry*, **45**, 943-953. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.03.034>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8712, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: acm@hanspub.org