

# 法舒地尔调控巨噬细胞极化改善 糖尿病小鼠心肌纤维化\*

谢发江, 蒋松辰, 高尚远, 李燕, 冉茂霞, 李家富, 冯健<sup>△</sup>

(西南医科大学附属医院心血管内科, 四川泸州 646000)

**[摘要]** 目的: 探讨盐酸法舒地尔(HF)对糖尿病(D)小鼠心肌纤维化及巨噬细胞极化的影响。方法: 将60只C57BL/6小鼠随机分为正常组(NS组)、正常+法舒地尔组(N+HF组)、糖尿病组(D+NS组)、低剂量法舒地尔组(D+LHF组)、中剂量法舒地尔组(D+MHF组)及高剂量法舒地尔组(D+HHF组)。采用链脲佐菌素(STZ)连续腹腔注射建立1型糖尿病小鼠模型。干预8周后处死小鼠, 观察法舒地尔对小鼠体重及血糖的影响; HE及Masson染色观察心脏组织形态改变, 测量心肌胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF); 免疫组化观察心脏组织中巨噬细胞极化及白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和IL-10的蛋白水平; Western blot测定心脏组织中p-MYPT1 Thr853、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和精氨酸酶1(Arg-1)的蛋白水平。结果: 与NS组相比, D+NS组小鼠成模后体重下降, 血糖升高( $P < 0.05$ ); 与D+NS组相比, 各治疗组血糖和体重差异无统计学显著性。与NS组相比, D+NS组CVF增大, M1型巨噬细胞数量增加, M2型巨噬细胞数量减少, IL-6、TNF- $\alpha$ 、p-MYPT1 Thr853和iNOS的蛋白水平升高, IL-10和Arg-1的蛋白水平降低( $P < 0.05$ ); 与D+NS组相比, 各治疗组CVF下降, M1型巨噬细胞数量减少, M2型巨噬细胞数量增加, IL-6和TNF- $\alpha$ 的蛋白水平降低, IL-10的蛋白水平升高; 与D+NS组相比, D+MHF和D+HHF组的p-MYPT1 Thr853和iNOS的蛋白水平下降, Arg-1的蛋白水平升高( $P < 0.05$ )。与NS组相比, N+HF组各检测指标差异无统计学显著性。结论: 法舒地尔能改善糖尿病小鼠心肌纤维化, 其可能的机制与诱导M2型巨噬细胞极化, 减少M1型巨噬细胞极化和炎症反应有关。

**[关键词]** 糖尿病心肌病; 心肌纤维化; 法舒地尔; 巨噬细胞; 极化

**[中图分类号]** R587.2; R363.2

**[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.05.017

## Fasudil ameliorates myocardial fibrosis by regulating polarization of macrophages in diabetic mice

XIE Fa-jiang, JIANG Song-chen, GAO Shang-yuan, LI Yan, RAN Mao-xia, LI Jia-fu, FENG Jian

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China. E-mail: jerryfeng@swmu.edu.cn)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate the effect of hydroxyl fasudil (HF) on myocardial fibrosis and macrophage polarization in the diabetic (D) mice. **METHODS:** C57BL/6 mice ( $n = 60$ ) were randomly divided into normal saline group (NS group), normal + hydroxyl fasudil group (N + HF group), diabetes group (D + NS group), diabetes + low dose of HF group (D + LHF group), diabetes + middle dose of HF group (D + MHF group) and diabetes + high dose of HF group (D + HHF group). A mouse model of type 1 diabetes mellitus was established by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). The mice in treatment groups received different doses of fasudil through intraperitoneal injection for 8 weeks. At the end of the study, the effects of fasudil at different doses on the body weight and blood glucose were observed. The histopathological changes of the cardiac tissues were observed by HE staining. The myocardial collagen volume fraction (CVF) was calculated by Masson staining. Immunohistochemical staining was used to test the macrophage polarization and protein expression of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and IL-10 and Western blot was applied to determine the protein levels of p-MYPT1 Thr853, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and Arginase-1 (Arg-1). **RESULTS:** Compared with NS group, the body weight of the mice in D + NS group was decreased and the blood glucose was increased significantly ( $P < 0.05$ ). However, no statistically difference of blood glucose and body weight between the treat-

[收稿日期] 2018-08-01

[修回日期] 2018-11-13

\* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 31300946); 泸州市 - 川医大联合课题 [No. 2015LZCYD-S03 (7/7)]

<sup>△</sup>通讯作者 Tel: 15182516519; E-mail: jerryfeng@swmu.edu.cn

ment groups and D + NS group was observed. Compared with NS group, CVF, the number of M1-type macrophages and the protein levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , p-MYPT1 Thr853 and iNOS were increased markedly, while M2-type macrophages and the expression of IL-10 and Arg-1 were decreased in D + NS group ( $P < 0.05$ ). Compared with D + NS group, CVF, the number of M1-type macrophages, and the protein levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  were relatively decreased, conversely the number of M2-type macrophages and the protein level of IL-10 was increased in treatment groups ( $P < 0.05$ ). Moreover, the protein levels of p-MYPT1 Thr853 and iNOS were reduced and the protein level of Arg-1 was increased in D + MHF and D + HHF group compared with D + NS group ( $P < 0.05$ ). No statistical difference in above mentioned indexes between NS group and N + HF group was observed. **CONCLUSION:** Fasudil significantly attenuates the myocardial fibrosis of diabetic cardiomyopathy in mice, which is possibly related to increased polarization of M2-type macrophages, decreased polarization of M1-type macrophages and inflammation.

[KEY WORDS] Diabetic cardiomyopathy; Myocardial fibrosis; Fasudil; Macrophages; Polarization

糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)系糖尿病(diabetes mellitus, D)患者中独立于大血管及微血管病变的特异性心肌损害,是发达国家糖尿病患者致死的主要原因之一<sup>[1]</sup>。长期高血糖刺激导致心肌细胞肥大及纤维化,早期可出现心脏舒张功能下降,并逐渐累及收缩功能,最终发展为充血性心力衰竭<sup>[2]</sup>。

炎症和纤维化是 DCM 发病的重要机制之一,单核-巨噬细胞渗出及分化是炎症启动及调节的关键环节,巨噬细胞受局部微环境的影响至少分化为 2 种亚型参与炎症反应,这一过程称之为巨噬细胞极化,其中以经典活化型(M1 型)巨噬细胞和选择活化型(M2 型)巨噬细胞为主,M1 型巨噬细胞上调诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)及炎症因子的表达,过度极化可导致组织损伤,M2 型巨噬细胞上调精氨酸酶 1 (arginase-1, Arg-1) 及抗炎因子的表达,发挥抗炎效应,有利于组织修复<sup>[3]</sup>。M1/M2 比例失调促进 DCM 发生,调控巨噬细胞极化显示了良好的抗纤维化及对 DCM 的治疗作用<sup>[4-7]</sup>。

RhoA 蛋白是 Ras 超家族中一种小分子三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)结合蛋白,其下游效应分子为 Rho 激酶(Rho-associated kinases, ROCK),后者属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员,存在 2 种亚型: ROCK1(又称 ROK $\beta$ 、p160 ROCK)和 ROCK2(也称 ROK $\alpha$ )。RhoA/ROCK 信号通路调节细胞增殖、迁移和凋亡等生物学行为,扮演分子开关的角色<sup>[8]</sup>。研究发现,RhoA/ROCK 信号通路介导炎症、氧化应激、钙平衡、胰岛素抵抗、心肌细胞凋亡、心肌纤维化和心脏舒缩功能等参与 DCM 发病,是具有巨大潜力的治疗靶点<sup>[9]</sup>。法舒地尔能特异性结合 ROCK 中 ATP 依赖的激酶结构域并抑制其活性,是目前临床上唯一批准使用的 ROCK 抑制剂,因其强大的扩血管作用而被广泛应用于蛛网膜下腔出血和缺血性心脏病等血管痉挛性疾病的治疗中<sup>[10-11]</sup>。尽管动物实验结果显示法舒地尔能够抗心肌纤维化进而治疗 DCM<sup>[12-13]</sup>,但其深入机制是否与

通过调控巨噬细胞极化相关尚无相关文献报道。本研究通过链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导 1 型糖尿病小鼠模型并给予法舒地尔干预,观察其对巨噬细胞极化及心肌纤维化的影响。

## 材 料 和 方 法

### 1 实验动物、药品与试剂

60 只 SPF 级健康雄性 C57BL/6 小鼠,6~8 周龄,体重(20.6 $\pm$ 0.8)g,购自成都达硕实验动物有限公司,合格证编号为 SCXK(川)2015-030。实验期间自由饮水,进食普通饲料,室温(23 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C,每日 12 h 光照维持昼夜循环。

链脲佐菌素购自 Sigma;盐酸法舒地尔(hydroxyl fasudil, HF)注射液购自天津红日药业股份有限公司(批准文号为国药准字 H20040356);抗 CD11c 和 CD206 抗体均购自 Proteintech Group;抗肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)和 IL-10 抗体均购自 Bioworld Technology;抗 p-MYPT1 Thr853、iNOS 和 Arg-1 抗体均购自 CST;抗  $\beta$ -actin 抗体、山羊抗兔 II 抗和山羊抗鼠 II 抗购自 Abcam;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自南京凯基生物公司。

### 2 方法

**2.1 糖尿病小鼠模型的建立、分组及处理** 所有动物适应性喂养 1 周,随机分为正常组(normal saline 组, NS 组)、正常 + 法舒地尔组(N + HF 组)、糖尿病组(D + NS 组)、法舒地尔低剂量组(D + LHF 组)、法舒地尔中剂量组(D + MHF 组)和法舒地尔高剂量组(D + HHF 组),每组各 10 只。D + NS 组及各治疗组小鼠禁食 12 h 后,腹腔注射 1% STZ (80 mg/kg), NS 组和 N + HF 组小鼠腹腔注射等体积 0.1 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液,连续 7 d, 2 周后断尾取血,测得血糖值 $\geq$ 16.7 mmol/L 视为造模成功。成模后各治疗组小鼠分别腹腔注射低剂量(10 mg/kg)、中剂量(40 mg/kg)和高剂量(60 mg/kg)法舒地尔,每天 1 次<sup>[14]</sup>, N + HF 组予中剂量(40 mg/kg)法舒地尔, NS

组和 D + NS 组腹腔注射等体积生理盐水,连用 8 周,复测随机血糖及体重,腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉,开胸取心脏,将其横向对半切开,心尖部组织用 4% 多聚甲醛固定后制作成厚 4  $\mu\text{m}$  石蜡切片,心底部组织冻存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱,用于 Western blot 检测。

**2.2 心脏组织病理学观察** 分别选取各组石蜡切片,脱蜡至水,行 HE 及 Masson 染色,于光镜下观察拍照。采用图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 进行心肌胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)测定,  $\text{CVF}(\%) = \text{胶原面积} / \text{视野总面积} \times 100\%$ 。

**2.3 免疫组化观察心脏组织中巨噬细胞极化及炎症因子和抗炎因子水平** 将切片脱蜡后浸入 0.01 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0),微波炉中高火加热至沸腾后断电,间隔 5 min 后,重复 1 次,冷却后, PBS 洗 2 次,每次 5 min,进行抗原修复,并滴加山羊血清室温封闭 20 min。分别加入抗 CD11c(1:50)、CD206(1:100)、IL-6(1:100)、TNF- $\alpha$ (1:100) 和 IL-10(1:50) 抗体,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,滴加 II 抗,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  继续孵育 30 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min, DAB 显色。最后用苏木素复染,脱水,中性树胶封片。IL-6、TNF- $\alpha$  和 IL-10 染色切片于 100 倍镜下选取 6 个不同观察区域,并进行 400 倍镜下拍片,采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统测定所采集 6 个视野全部图像的积分吸光度(integrated absorbance, IA)和阳性表达面积(stained area, SA),并计算每张图像的平均吸光度(mean absorbance, MA),使用 6 张图像的平均吸光度再计算平均数,得出每例样本的平均吸光度,再进行分析,按同样的方式测算 CD11c 和 CD206 阳性细胞数。

**2.4 Western blot 测定蛋白水平** 取各组小鼠心脏

冻存组织样本,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴解冻后按质量体积比 1:10 加入 RIPA 裂解液,快速剪碎组织,置碎冰上裂解 10 min,收集裂解液,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,按 BCA 蛋白定量试剂盒说明测定蛋白浓度。根据所需样本体积,按 4:1 比例加入  $5 \times$  Loding Buffer,混匀后热循环仪  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、15 min 使蛋白变性。配制 8%、10% 分离胶和 5% 浓缩胶,按蛋白量 60  $\mu\text{g}$  上样,进行电泳分离,转 PVDF 膜,经 5% BSA 液封闭 2 h 后,加入抗 p-MYPT1 Thr853(1:500)、iNOS(1:200)、Arg-1(1:300)及  $\beta$ -actin(1:5 000) 抗体,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST(pH 7.4) 洗膜 3 次,每次 5 min,将膜放入相应 II 抗(1:5 000)中,室温孵育 2~3 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min, ECL 发光液显色,采用 ChemiDoc XRS 凝胶扫描成像仪及 Image Lab 凝胶分析系统进行条带分析。

### 3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。数据以均数  $\pm$  标准差(mean  $\pm$  SD)表示,多组样本均数间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验,方差齐则组间采用 SNK- $q$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 各组小鼠体重及血糖的变化

与 NS 组相比, D + NS 组小鼠成模后出现体重明显下降,血糖水平亦明显升高( $P < 0.05$ )。N + HF 组较 NS 组体重与血糖值的差异并无统计学显著性。同样,各治疗组体重与血糖值较 D + NS 组相比差异也无统计学显著性,说明法舒地尔对小鼠体重及血糖无明显影响,见图 1。

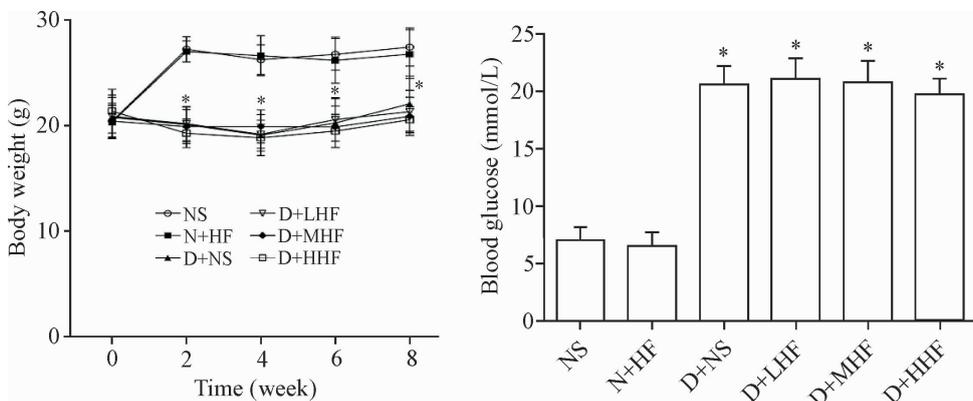


Figure 1. The body weight and blood glucose of the mice in each group were detected. Mean  $\pm$  SD.  $n = 10$ . \*  $P < 0.05$  vs NS group.

图 1 各组小鼠体重及血糖的变化

### 2 小鼠心脏组织 HE 染色

HE 染色观察可见 NS 组和 N + HF 组心肌细胞排列整齐,轮廓清晰,细胞质着色均匀; D + NS 组心肌细胞排列紊乱,细胞质着色不均,中膜层心肌纤维呈

波浪样变性,部分断裂;各治疗组较 D + NS 组心肌细胞排列较整齐,轮廓大致清晰,细胞质着色较均匀,中膜层心肌纤维波浪样变性及断裂改变明显减轻,见图 2。

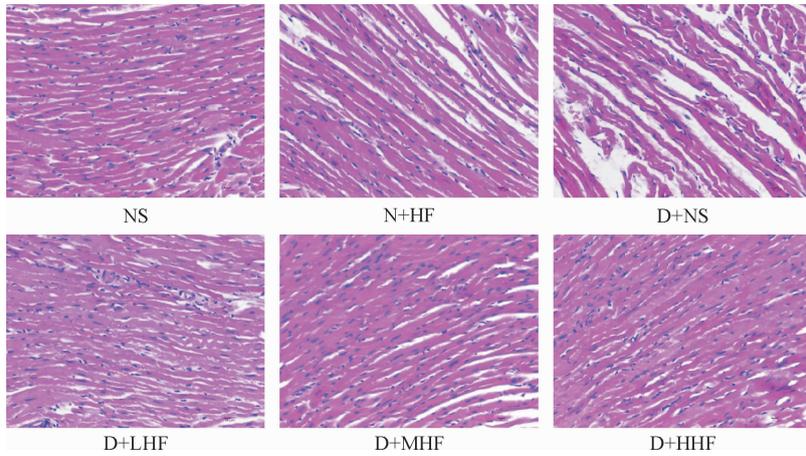


Figure 2. The representative images of cardiac tissues in each group under light microscope (HE staining, ×400).

图2 各组小鼠心脏组织 HE 染色结果

### 3 小鼠心脏组织 Masson 染色及 CVF 的变化

Masson 染色时胶原纤维呈蓝色,心肌细胞胞浆呈红色。NS 组和 N + HF 组心肌间质可见少许胶原纤维分布,CVF 的差异无统计学显著性;与 NS 组相比,D + NS 组心肌间质胶原纤维分布明显增加,CVF 显著增大( $P < 0.05$ );与 D + NS 组相比,各治疗组心

肌间质胶原纤维分布明显较少,CVF 下降( $P < 0.05$ );与 D + LHF 组相比,D + MHF 组和 D + HHF 组 CVF 进一步下降( $P < 0.05$ ),提示 DCM 存在明显心肌纤维化,法舒地尔能剂量依赖性地减轻 DCM 心肌纤维化,见图 3。

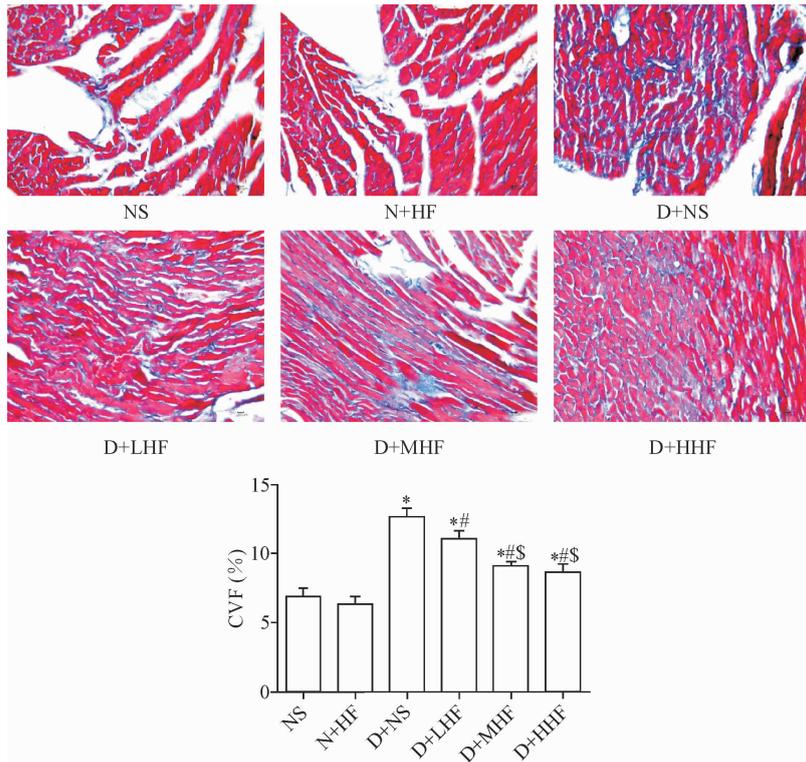


Figure 3. Masson staining showed the changes of CVF of cardiac tissues in each group (×400). Mean ± SD. n = 6. \*  $P < 0.05$  vs NS group; #  $P < 0.05$  vs D + NS group; \$  $P < 0.05$  vs D + LHF group.

图3 Masson 染色观察各组小鼠心脏组织的 CVF 变化

### 4 免疫组化观察小鼠心脏组织中巨噬细胞极化及炎症因子和抗炎因子的水平

CD11c 识别 M1 型巨噬细胞,CD206 识别 M2 型巨噬细胞。NS 组和 N + HF 组中 M1 和 M2 型巨噬细

胞数量及 IL-6、TNF- $\alpha$  和 IL-10 的蛋白水平差异无统计学显著性;与 NS 组相比,D + NS 组 M1 型巨噬细胞数量增加,M2 型巨噬细胞数量减少,IL-6 和 TNF- $\alpha$  的蛋白水平显著增加( $P < 0.05$ ),IL-10 的蛋白水平显

著下降( $P < 0.05$ );与 D + NS 组相比,各治疗组的 M1 型巨噬细胞数量及 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的蛋白水平均呈剂量依赖性减少( $P < 0.05$ ),M2 型巨噬细胞数量

及 IL-10 的蛋白水平随着剂量增大而增加( $P < 0.05$ ),见图 4。

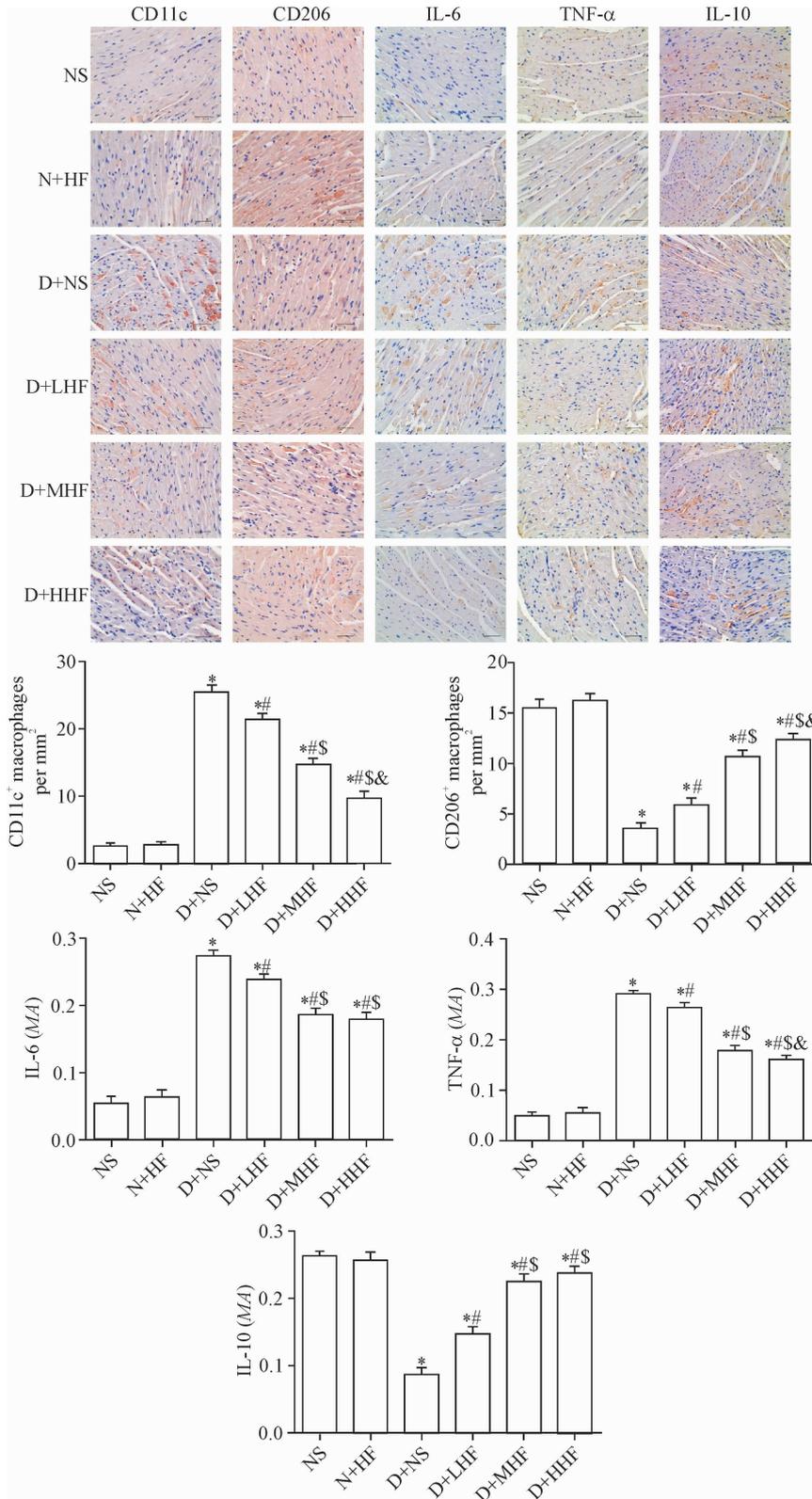


Figure 4. Immunohistochemical identification of macrophage phenotype marker proteins and the protein expression of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-10 in different groups ( $\times 400$ ). Mean  $\pm$  SD.  $n = 6$ . \*  $P < 0.05$  vs NS group; #  $P < 0.05$  vs D + NS group; \$  $P < 0.05$  vs D + LHF group; &  $P < 0.05$  vs D + MHF group.

图 4 各组小鼠心脏组织巨噬细胞极化及炎症因子和抗炎因子蛋白水平的变化

### 5 小鼠心脏组织中 p-MYPT1 Thr853、iNOS 和 Arg-1 的蛋白水平

NS 组和 N + HF 组 p-MYPT1 Thr853、iNOS 和 Arg-1 的蛋白水平差异无统计学显著性;与 NS 组相比,D + NS 组 p-MYPT1 Thr853 和 iNOS 的蛋白水平升高,Arg-1 的蛋白水平降低 ( $P < 0.05$ );与 D + NS

组相比,D + LHF 组 p-MYPT1 Thr853、iNOS 和 Arg-1 的蛋白水平差异无统计学显著性;与 D + NS 组相比,D + MHF 组和 D + HHF 组 p-MYPT1 Thr853 和 iNOS 的蛋白水平下降 ( $P < 0.05$ ),Arg-1 的蛋白水平升高 ( $P < 0.05$ ),见图 5。

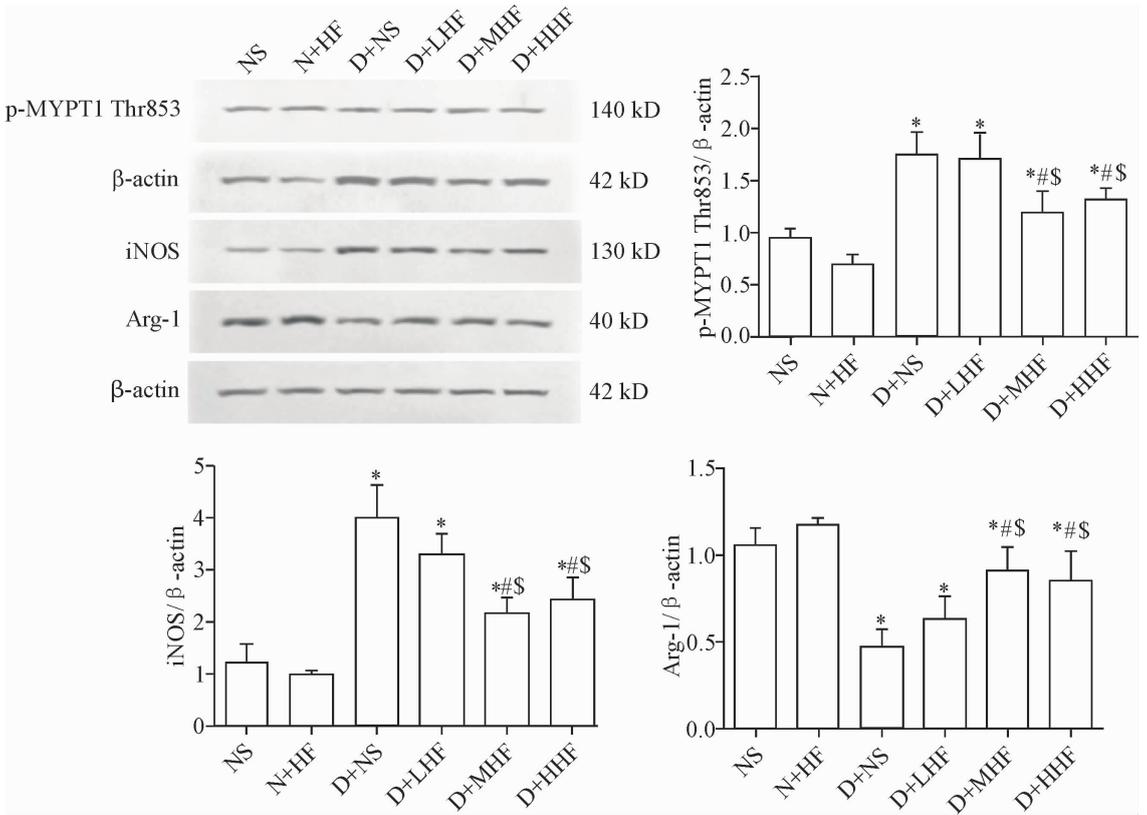


Figure 5. The protein levels of p-MYPT1 Thr853, iNOS and Arg-1 in different groups were determined by Western blot. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs NS group; #  $P < 0.05$  vs D + NS group; \$  $P < 0.05$  vs D + LHF group.

图 5 各组小鼠心脏组织中 p-MYPT1 Thr853、iNOS 和 Arg-1 的蛋白水平变化

### 6 相关性分析

通过两变量间相关性分析 (Pearson 相关分析) 发现,小鼠心脏组织中 p-MYPT1 Thr853 的蛋白水平

与 iNOS 的蛋白水平明显呈正相关 ( $r = 0.914, P < 0.01$ ),与 Arg-1 的蛋白水平明显呈负相关 ( $r = -0.887, P < 0.01$ ),见图 6。

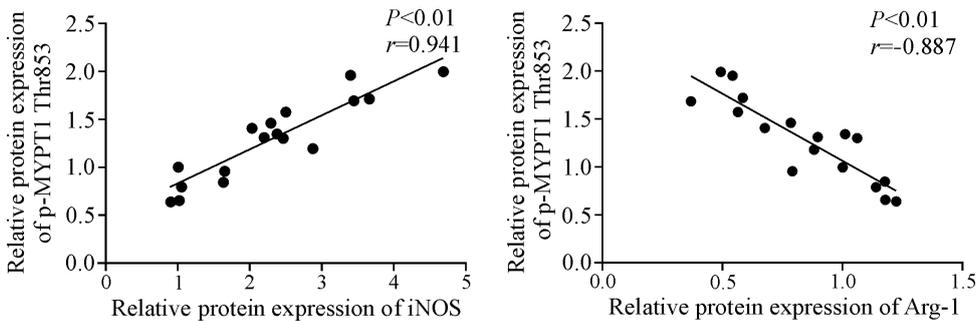


Figure 6. Correlations between p-MYPT1 Thr853 and iNOS or Arg-1 expression.

图 6 各组小鼠心脏组织中 p-MYPT1 Thr853 的蛋白水平分别与 iNOS 和 Arg-1 蛋白水平的相关性

## 讨 论

在病理状况下,单核细胞由循环系统迁移并渗出到组织中分化形成巨噬细胞。未分化 M0 型巨噬细胞在不同微环境下可诱导分化成不同类型。M1 型巨噬细胞主要受脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 及干扰素  $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 诱导,此外促炎因子 TNF- $\alpha$  和 IL-12 等也能产生诱导作用。活化的 M1 型巨噬细胞分泌大量的活性氮,加强 Th1 细胞免疫,随着大量炎症介质的释放产生强大的抗菌及细胞毒性作用,具有抗感染及抗肿瘤效应,在急性损伤炎症初期,首先渗出起到清除坏死组织的作用<sup>[15]</sup>。M2 型巨噬细胞受诱导因子不同可分化为 M2a、M2b 和 M2c 3 种不同功能的亚型,M2a 型由 IL-4 和 IL-13 诱导,M2b 型由免疫复合物和 IL-1 诱导,IL-10、转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 和糖皮质激素诱导形成 M2c 型。M2a 型能抑制 INF- $\gamma$ 、IL-1 和 IL-6 等炎症介质的释放,同时能促进 TGF- $\beta$  表达及细胞间基质的沉积,但其吞噬功能较差,因具有修复组织的功能而又被称为“组织修复型巨噬细胞”;M2b 和 M2c 型通过介导慢性炎症限制 M1 型巨噬细胞的异常持续活化造成的组织破坏,并未直接参与组织修复,而被称为“调节型巨噬细胞”<sup>[16]</sup>。在炎症的不同阶段 M1 和 M2 型巨噬细胞发挥不同的作用,M1/M2 型巨噬细胞比例的动态变化决定了炎症的进展及严重程度。Urbina 等<sup>[5]</sup>发现在糖耐量减低小鼠模型的心脏组织中 M2 型巨噬细胞与正常组相比差异并无统计学显著性,但经骨形成蛋白 7 (bone morphogenic protein-7, BMP-7) 干预的模型小鼠 M2 型巨噬细胞数量较对照组明显升高,同时伴有促炎因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 降低及抗炎因子 IL-1RA 和 IL-10 的升高,干预组心肌纤维化及心脏功能明显改善。后续研究发现,DCM 心脏组织中巨噬细胞以 M1 型为主,过度活化的 M1 型巨噬细胞加重心脏损伤,当完全抑制小鼠中巨噬细胞的增殖及分化时,DCM 病变并未有效减轻,但通过诱导 M2 型巨噬细胞极化,抑制 M1 型巨噬细胞的极化,促炎因子明显下降,抗炎因子升高,DCM 的病变明显减轻<sup>[4]</sup>。越来越多的证据表明,调控 M1/M2 型巨噬细胞的比例是 DCM 治疗有效靶点<sup>[6-7]</sup>。本实验中,我们选择 CD11c 和 iNOS 作为 M1 型巨噬细胞的标志物,CD206 和 Arg-1 作为 M2 型巨噬细胞的标志物,TNF- $\alpha$  和 IL-6 为观察的促炎因子,IL-10 为观察的抗炎因子。与正常组相比,糖尿病组小鼠中 M1 型巨噬细胞数量及促炎因子的表达明显增加,M2 型巨噬细胞数量明显减少,

而通过法舒地尔的干预 M1 型巨噬细胞极化明显抑制,M2 型噬细胞数量增加,炎症水平明显下降,DCM 心肌纤维化有效改善,且随着剂量增加抗纤维化作用越明显,提示法舒地尔调控巨噬细胞极化,恢复异常的 M1/M2 型巨噬细胞的比例,可能是其抗心肌纤维化的机制之一。

大量的研究表明,法舒地尔能有效改善 DCM,目前认为其可能与下列机制有关:(1)抑制纤维化关键信号通路 JNK 和 TGF- $\beta$ /Smad 的表达,减轻间质纤维化<sup>[13]</sup>;(2)提高心肌细胞线粒体中琥珀酸脱氢酶 (succinate dehydrogenase, SDH) 和单胺氧化酶 (monoamine oxidase, MAO) 的活性,抑制脂质氧化终产物丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 的生成,提高抗氧化水平,并通过减少线粒体膜通透性转运孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 开放数量,保护线粒体结构与功能<sup>[17]</sup>;(3)抑制心肌细胞 Bax 表达,促进 Bcl-2 表达,减轻心肌细胞凋亡<sup>[12, 18]</sup>;(4)提高心肌细胞舒张期  $\text{Ca}^{2+}$  回收相关转运蛋白的表达与活性,促进舒张期胞质  $\text{Ca}^{2+}$  回收,并且修复受损的肌动蛋白与横桥空间结构,直接改善心肌的舒缩功能<sup>[19-20]</sup>。法舒地尔能特异性结合 ROCK 中 ATP 依赖的激酶结构域并下调其活性,进而抑制 RhoA/ROCK 信号通路转导,MYPT1 是 ROCK 下游结合底物之一,MYPT1 的磷酸化程度能有效反映 ROCK 的活性<sup>[21]</sup>。本研究中,糖尿病组小鼠 p-MYPT1 Thr853 的蛋白水平增加,提示 DCM 中存在 ROCK 的激活,经法舒地尔干预后,p-MYPT1 Thr853 的蛋白水平下降,ROCK 的活性受到抑制,同时我们发现 MYPT1 Thr853 磷酸化水平与 iNOS 的蛋白水平呈正相关,反之与 Arg-1 的蛋白水平呈负相关,说明 ROCK 活性与巨噬细胞极化存在相关性。RhoA/ROCK 信号通路过度激活是 DCM 发病的关键机制之一<sup>[22]</sup>。Cheng 等<sup>[23]</sup>发现高糖状态下培养的巨噬细胞中 RhoA/ROCK 信号通路异常激活并调控巨噬细胞的黏附和分泌等多种生物学功能。由此我们推测,DCM 发病中巨噬细胞的极化可能受 RhoA/ROCK 信号通路的调控,其机制有待进一步体外研究。

综上所述,法舒地尔可能通过抑制 M1 型巨噬细胞极化,诱导 M2 型噬细胞极化,下调心脏炎症水平,进而减轻 DCM 心肌纤维化,有望成为 DCM 治疗的一种新策略。同时,本实验对 DCM 发病中 RhoA/ROCK 信号通路与巨噬细胞极化的关系做了初步探究,巨噬细胞极化是否受 RhoA/ROCK 信号通路调控有待进一步研究。

## [参 考 文 献]

- [1] Jia G, DeMarco VG, Sowers JR. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12(3):144-153.
- [2] 杨旻, 曹新冉, 王园园, 等. DIZE 对糖尿病心脏病大鼠心功能的保护作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(1):147-151.
- [3] Sun H, Tian J, Xian W, et al. Pentraxin-3 attenuates renal damage in diabetic nephropathy by promoting M2 macrophage differentiation[J]. *Inflammation*, 2015, 38(5):1739-1747.
- [4] Jia C, Chen H, Wei M, et al. Gold nanoparticle-based miR155 antagonist macrophage delivery restores the cardiac function in ovariectomized diabetic mouse model[J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12:4963-4979.
- [5] Urbina P, Singla DK. BMP-7 attenuates adverse cardiac remodeling mediated through M2 macrophages in prediabetic cardiomyopathy[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 307(5):H762-H772.
- [6] Sreedhar R, Arumugam S, Thandavarayan RA, et al. Role of 14-3-3 $\eta$  protein on cardiac fatty acid metabolism and macrophage polarization after high fat diet induced type 2 diabetes mellitus [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, 88:92-99.
- [7] Jadhav A, Tiwari S, Lee P, et al. The heme oxygenase system selectively enhances the anti-inflammatory macrophage-M2 phenotype, reduces pericardial adiposity, and ameliorated cardiac injury in diabetic cardiomyopathy in Zucker diabetic fatty rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, 345(2):239-249.
- [8] Liu CY, Guo SD, Yu JZ, et al. Fasudil mediates cell therapy of EAE by immunomodulating encephalomyelitic T cells and macrophages [J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(1):142-152.
- [9] Mishra RK, Alokam R, Sriram D, et al. Potential role of Rho kinase inhibitors in combating diabetes-related complications including diabetic neuropathy: a review [J]. *Curr Diabetes Rev*, 2013, 9(3):249-266.
- [10] Guo R, Su Y, Yan J, et al. Fasudil improves short-term echocardiographic parameters of diastolic function in patients with type 2 diabetes with preserved left ventricular ejection fraction: a pilot study[J]. *Heart Vessels*, 2015, 30(1):89-97.
- [11] 许宁, 瞿根义, 陈少豪, 等. 法舒地尔通过抑制兔尿道成纤维细胞 Rho/ROCK 通路激活减少尿道损伤后狭窄的发生[J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(12):2266-2271.
- [12] Guan SJ, Ma ZH, Wu YL, et al. Long-term administration of fasudil improves cardiomyopathy in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(6):1874-1882.
- [13] Zhou H, Li Y, Wang M, et al. Involvement of RhoA/ROCK in myocardial fibrosis in a rat model of type 2 diabetes[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(8):999-1008.
- [14] 姜纯国, 黄慧, 刘佳, 等. 法舒地尔对肺纤维化小鼠模型及 NIH3T3 成纤维细胞的抑制作用及其机制[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2014, 37(9):671-676.
- [15] Zhang XL, Guo YF, Song ZX, et al. Vitamin D prevents podocyte injury via regulation of macrophage M1/M2 phenotype in diabetic nephropathy rats [J]. *Endocrinology*, 2014, 155(12):4939-4950.
- [16] Rojas J, Salazar J, Martínez MS, et al. Macrophage heterogeneity and plasticity: impact of macrophage biomarkers on atherosclerosis[J]. *Scientifica (Cairo)*, 2015, 2015:851252.
- [17] Guo R, Liu B, Zhou S, et al. The protective effect of fasudil on the structure and function of cardiac mitochondria from rats with type 2 diabetes induced by streptozotocin with a high-fat diet is mediated by the attenuation of oxidative stress[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013:430791.
- [18] Gao H, Hou F, Dong R, et al. Rho-Kinase inhibitor fasudil suppresses high glucose-induced H9c2 cell apoptosis through activation of autophagy[J]. *Cardiovasc Ther*, 2016, 34(5):352-359.
- [19] Lai D, Gao J, Bi X, et al. The Rho kinase inhibitor, fasudil, ameliorates diabetes-induced cardiac dysfunction by improving calcium clearance and actin remodeling[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2017, 95(2):155-165.
- [20] Waddingham MT, Edgley AJ, Astolfo A, et al. Chronic Rho-kinase inhibition improves left ventricular contractile dysfunction in early type-1 diabetes by increasing myosin cross-bridge extension [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2015, 14:92.
- [21] Hartmann S, Ridley AJ, Lutz S. The function of Rho-associated kinases ROCK1 and ROCK2 in the pathogenesis of cardiovascular disease[J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6:276.
- [22] Zhou H, Li Y. RhoA/Rho kinase: a novel therapeutic target in diabetic complications [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123(17):2461-2466.
- [23] Cheng CI, Chen PH, Lin YC, et al. High glucose activates Raw264.7 macrophages through RhoA kinase-mediated signaling pathway [J]. *Cell Signal*, 2015, 27(2):283-292.