

· 论著 ·

二甲双胍对心肌梗死后心脏功能的影响及其机制研究

周慧鑫 谌虎 刘志豪 周雨扬 李泽衍 许骁 陈华强 刘承哲 刘旨浩 王宇虹 王悦怡 赖燕秋
余锂镭 江洪

(武汉大学人民医院心血管内科 武汉大学心脏自主神经研究中心 武汉大学心血管病研究所 心血管病湖北省重点实验室,湖北 武汉 430060)

【摘要】目的 探讨二甲双胍对心肌梗死(MI)后心功能的影响及其作用机制。**方法** 将28只健康Sprague Dawley大鼠随机分为3组:假手术组($n=8$)、MI+生理盐水处理组(MI组, $n=10$)和MI+二甲双胍处理组(MET组, $n=10$)。采用结扎冠状动脉左前降支方法建立MI模型,假手术组冠状动脉左前降支穿线不结扎。按200 mg/kg给予二甲双胍或等量生理盐水,每日1次,连续干预4周。超声心动图测定心功能,分析心率变异性,检测心肌酪氨酸羟化酶(TH)密度。酶联免疫吸附测定法检测血清诱导型一氧化氮合酶(iNOS)水平,生化法检测心肌超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)的水平。**结果** 与假手术组比,MI组大鼠左室射血分数明显降低,心率变异性频域指标低频功率和低频/高频功率比值显著升高,TH密度显著增加,血清iNOS和心肌MDA水平显著升高,心肌SOD的水平显著降低($P<0.05$);与MI组相比,MET组大鼠左室射血分数升高,低频功率和低频/高频功率比值降低,TH密度降低,血清iNOS和心肌MDA水平降低,心肌SOD水平升高($P<0.05$)。**结论** 二甲双胍可有效地改善慢性MI大鼠的心功能,可能通过抑制交感神经系统活性和降低氧化应激反应发挥作用。

【关键词】 二甲双胍;心肌梗死;交感神经系统;氧化应激

【DOI】10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2022.03.019

Protective Effect and Related Mechanism of Metformin on Cardiac Function After Myocardial Infarction

ZHOU Huixin, CHEN Hu, LIU Zhihao, ZHOU Yuyang, LI Zeyan, XU Xiao, CHEN Huaqiang, LIU Chengzhe, LIU Zhihao, WANG Yuhong, WANG Yueyi, LAI Yanqiu, YU Lilei, JIANG Hong

(Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University; Cardiac Autonomic Nervous System Research Center of Wuhan University; Cardiovascular Research Institute, Wuhan University; Hubei Key Laboratory of Cardiology, Wuhan 430060, Hubei, China)

【Abstract】Objective To explore the effect and mechanism of metformin on cardiac function after myocardial infarction (MI). **Methods** Twenty-eight healthy Sprague Dawley rats were randomly divided into 3 groups: sham group ($n=8$), MI + saline group (MI group, $n=10$) and MI + metformin group (MET group, $n=10$). The MI model was established by ligating the left anterior descending coronary artery. In the sham group, the left anterior descending coronary artery was not ligated. Metformin or the same amount of normal saline were given at 200 mg/kg once a day for 4 weeks. Cardiac function was measured by echocardiography, heart rate variability was analyzed, and myocardial tyrosine hydroxylase (TH) density was detected. The levels of serum inducible nitric oxide synthase (iNOS) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay, and the levels of myocardial superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were detected by biochemical method. **Results** Compared with sham group, the left ventricular ejection fraction of rats in MI group decreased significantly, the frequency domain indexes of heart rate variability (low frequency power and low frequency/high frequency power ratio) increased significantly, the density of TH increased significantly, the levels of serum iNOS and myocardial MDA increased significantly, and the level of myocardial SOD decreased significantly ($P<0.05$). Compared with MI group, the left ventricular ejection fraction, low frequency power and low frequency/high frequency power ratio decreased, TH density decreased, serum iNOS and myocardial MDA levels decreased, and myocardial SOD levels increased in MET group ($P<0.05$). **Conclusion** Metformin can effectively improve the cardiac function of chronic MI rats, which may play a role by inhibiting the activity of sympathetic nervous system and reducing oxidative stress response.

【Key words】 Metformin; Myocardial infarction; Sympathetic nervous system; Oxidative stress

基金项目:国家自然科学基金(81871486,81530011);国家重点研发计划(2017YFC1307802)

通信作者:余锂镭, E-mail: lileiyu@whu.edu.cn

心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 是中国城乡居民死亡的重要原因, 并且其发病率不断升高。据统计, 中国急性 MI 发病率城市为 50.12/10 万, 农村为 43.51/10 万, 急性 MI 死亡率城市为 58.69/10 万, 农村为 74.72/10 万^[1]。MI 发生后心肌细胞和中枢神经系统释放大量的去甲肾上腺素, 导致交感神经系统过度激活^[2]。既往研究^[3]表明交感神经系统与心血管疾病之间存在密切联系, 交感神经过度激活会加重 MI 后心肌重构, 并恶化左心室舒张和收缩功能。

二甲双胍是目前治疗 2 型糖尿病最常用的药物^[4]。除了治疗糖尿病, 二甲双胍还可改善神经退行性疾病^[5], 并且对高血压、肺动脉高压和缺血性心脏病等心血管疾病有着保护作用^[6-8]。研究发现, 二甲双胍不仅能降低骤然升高的去甲肾上腺素水平^[6], 还可改善长时间高血压所致的自主神经功能障碍^[9]。然而, 二甲双胍是否可通过调节心脏自主神经改善 MI 后心脏功能尚不明确。因此本研究旨在探索二甲双胍对 MI 后心脏功能的影响及其潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物准备

武汉大学人民医院实验动物中心提供 28 只健康成年雄性 Sprague Dawley 大鼠 (180 ~ 230 g), 在无特定病原体环境下适应性饲养 1 周, 给予标准饲料和饮水。本实验所有动物使用过程均经武汉大学动物实验伦理委员会审核并批准。

1.2 动物模型制备和干预流程

Sprague Dawley 大鼠随机分成 3 组: 假手术组 ($n=8$)、MI + 生理盐水处理组 (MI 组, $n=10$) 和 MI + 二甲双胍处理组 (MET 组, $n=10$)。MI 组和 MET 组均采用冠状动脉左前降支 (left anterior descending branch, LAD) 结扎法制备 MI 模型。大鼠术前禁食禁饮 12 h, 采用 3% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 腹腔注射麻醉后固定于实验台, 气管插管, 连接小动物呼吸机给予人工通气。左前胸剃毛备皮, 消毒后开胸, 打开心包, 暴露心脏, 于左心耳下缘 2 mm 处用结扎线结扎 LAD, 制备 MI 模型。清理胸腔后逐层关闭胸腔, 待大鼠恢复自主呼吸后拔管撤离呼吸机, 保暖直至清醒。假手术组同样开胸, LAD 处穿线而不结扎, 其余操作步骤同 MI 造模。术后 MET 组给予二甲双胍 [200 mg/(kg·d)] 灌胃, 假手术组和 MI 组大鼠给予等量生理盐水灌胃, 干预 4 周。

1.3 超声心动图采集

采用多普勒超声心动仪对大鼠进行超声心动图检查, 检测指标包括左室射血分数 (LVEF)、左心室短轴缩短率 (LVFS)、左心室收缩末期内径 (LVESD) 和

左心室舒张末期内径 (LVEDD)。

1.4 心电图测量及心率变异性分析

根据团队前期研究方法^[10], 麻醉状态下记录大鼠体表心电图, 并使用 Lab Chart 8.1 软件进行数据分析。分析计算各组心率变异性 (heart rate variability, HRV) 频域指标, 低频功率 (LF)、高频功率 (HF) 和低频/高频功率比值 (LF/HF), 为消除个体差异, LF、HF 均经过标准化并采用标准化单位 (nu) 表示。LF 反映交感神经的活性, 而 HF 反映副交感神经的活性。LF/HF 反映自主神经系统的平衡状况。

1.5 血清和心肌标本检测

实验结束前, 从大鼠腹主动脉收集动脉血, 使用惰性分离胶促凝管促凝, 血液离心 (3 000 r/min, 10 min) 后取上清液于 -80°C 冷冻保存。根据诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 的酶联免疫吸附测定试剂盒说明书, 检测血清 iNOS 水平。实验结束后, 迅速取左心室心肌组织, 使用磷酸盐缓冲溶液反复冲洗, 液氮速冻, 于 -80°C 冷冻保存。根据丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的生化试剂盒说明书, 检测心肌 MDA 和 SOD 水平。

1.6 免疫组织化学染色

实验结束后, 从左心室梗死交界区收集心肌组织, 于 4% 多聚甲醛固定液固定 24 h 以上, 乙醇脱水和石蜡包埋后制作切片。行酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 免疫组织化学染色并拍取照片, 使用 Image Pro Plus 6.0 软件测量分析, 测量并计算 TH 阳性区域的分布密度。

1.7 统计学分析

采用 GraphPad 9.0 软件分析和处理实验数据, 计量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 对所有计量数据进行 Kolmogorov-Smirnov 检验 ($P > 0.05$ 则服从正态分布) 以明确是否服从正态分布后, 采用单因素方差分析比较多组间数据, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

造模过程中, 假手术组、MI 组、MET 组分别死亡 1、1、2 只大鼠。造模 1 周内, 假手术组、MI 组、MET 组分别死亡 1、3、2 只大鼠。

2.1 二甲双胍显著改善 MI 大鼠的心功能

见表 1 可知, 与假手术组相比, MI 组大鼠 LVEF [(43.19 \pm 3.59)% vs (84.65 \pm 3.12)%, $P < 0.05$] 和 LVFS [(18.70 \pm 2.02)% vs (48.32 \pm 3.64)%, $P < 0.05$] 显著降低, LVEDD [(0.83 \pm 0.09) cm vs (0.56 \pm 0.08) cm, $P < 0.05$] 和 LVESD [(0.67 \pm 0.08) cm vs (0.29 \pm 0.04) cm, $P < 0.05$] 显著增加。而与 MI 组相

比, MET 组大鼠 LVEF $[(59.22 \pm 6.50)\% \text{ vs } (43.19 \pm 3.59)\%, P < 0.05]$ 和 LVFS $[(27.48 \pm 3.95)\% \text{ vs } (18.70 \pm 2.02)\%, P < 0.05]$ 显著升高, LVEDD $[(0.65 \pm 0.08) \text{ cm} \text{ vs } (0.83 \pm 0.09) \text{ cm}, P < 0.05]$ 和 LVESD $[(0.48 \pm 0.08) \text{ cm} \text{ vs } (0.67 \pm 0.08) \text{ cm}, P < 0.05]$ 显著减少。

表 1 二甲双胍对 MI 大鼠心脏超声心动图参数的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	LVEF/%	LVFS/%	LVEDD/cm	LVESD/cm
假手术组	84.65 \pm 3.12	48.32 \pm 3.64	0.56 \pm 0.08	0.29 \pm 0.04
MI 组	43.19 \pm 3.59**	18.70 \pm 2.02**	0.83 \pm 0.09**	0.67 \pm 0.08**
MET 组	59.22 \pm 6.50▲▲	27.48 \pm 3.95▲▲	0.65 \pm 0.08▲▲	0.48 \pm 0.08▲▲

注: **表示与假手术组相比, $P < 0.05$; ▲▲表示与 MI 组相比, $P < 0.05$ 。

2.2 二甲双胍对 MI 大鼠 HRV 的影响

见表 2 可知, 与假手术组比较, MI 组的 LF/HF $(0.33 \pm 0.02 \text{ vs } 0.02 \pm 0.01, P < 0.05)$ 和 LF $[(20.35 \pm 0.68) \text{ nu} \text{ vs } (1.65 \pm 1.35) \text{ nu}, P < 0.05]$ 均显著升高, HF $[(62.72 \pm 1.83) \text{ nu} \text{ vs } (93.73 \pm 2.96) \text{ nu}, P < 0.05]$ 显著降低; 与 MI 组相比, MET 组 LF/HF $(0.28 \pm 0.01 \text{ vs } 0.33 \pm 0.02, P < 0.05)$ 和 LF $[(17.24 \pm 1.98) \text{ nu} \text{ vs } (20.35 \pm 0.68) \text{ nu}, P = 0.05]$ 均降低, HF 可见回升趋势, 但无统计学意义。

表 2 二甲双胍对 MI 大鼠 HRV 的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	LF/nu	HF/nu	LF/HF
假手术组	1.65 \pm 1.35	93.73 \pm 2.96	0.02 \pm 0.01
MI 组	20.35 \pm 0.68**	62.72 \pm 1.83**	0.33 \pm 0.02**
MET 组	17.24 \pm 1.98▲▲	61.77 \pm 7.43	0.28 \pm 0.01▲▲

注: **表示与假手术组相比, $P < 0.05$; ▲▲表示与 MI 组相比, $P < 0.05$ 。

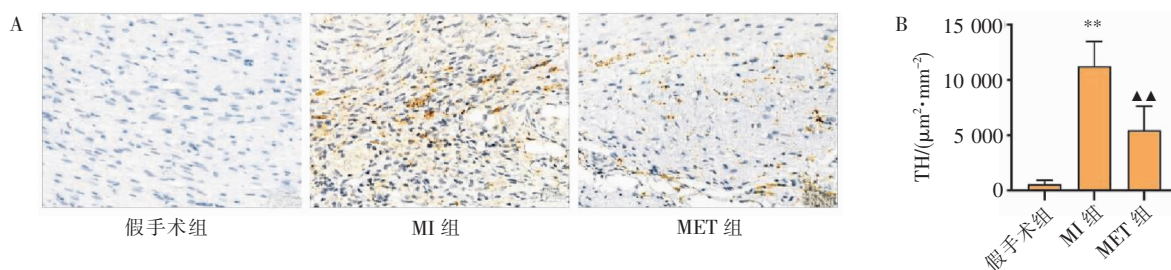
2.3 二甲双胍对 MI 大鼠心脏交感神经重构的影响

见图 1 可知, 与假手术组相比, MI 组左心室梗死

交界区心肌 TH 密度 $[(11\ 244 \pm 2\ 239) \mu\text{m}^2/\text{mm}^2 \text{ vs } (537.7 \pm 360.5) \mu\text{m}^2/\text{mm}^2, P < 0.05]$ 显著增加, 与 MI 组相比, MET 组 TH 密度 $[(5\ 461 \pm 2\ 166) \mu\text{m}^2/\text{mm}^2 \text{ vs } (11\ 244 \pm 2\ 239) \mu\text{m}^2/\text{mm}^2, P < 0.05]$ 降低。

2.4 二甲双胍对 MI 大鼠心脏氧化应激的影响

见表 3 可知, 与假手术组相比, MI 组血清 iNOS 水平 $[(14.59 \pm 2.56) \text{ U/mL} \text{ vs } (7.15 \pm 0.82) \text{ U/mL}, P < 0.05]$ 和心肌 MDA 水平 $[(16.87 \pm 1.43) \text{ nmol/mgprot} \text{ vs } (12.43 \pm 1.83) \text{ nmol/mgprot}, P < 0.05]$ 明显升高, 心肌 SOD 水平 $[(262.30 \pm 7.39) \text{ U/mgprot} \text{ vs } (294.10 \pm 15.47) \text{ U/mgprot}, P < 0.05]$ 明显降低; 与 MI 组相比, MET 组血清 iNOS 水平 $[(9.26 \pm 1.14) \text{ U/mL} \text{ vs } (14.59 \pm 2.56) \text{ U/mL}, P < 0.05]$ 和心肌 MDA 水平 $[(14.52 \pm 1.13) \text{ nmol/mgprot} \text{ vs } (16.87 \pm 1.43) \text{ nmol/mgprot}, P < 0.05]$ 明显降低, 心肌 SOD 水平 $[(283.60 \pm 13.65) \text{ U/mgprot} \text{ vs } (262.30 \pm 7.39) \text{ U/mgprot}, P < 0.05]$ 明显升高。



注: **表示与假手术组相比, $P < 0.05$; ▲▲表示与 MI 组相比, $P < 0.05$ 。

图 1 二甲双胍对 MI 大鼠心肌 TH 的影响($n=5$)表 3 二甲双胍对 MI 大鼠心脏氧化应激的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	iNOS/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mgprot ⁻¹)	SOD/(U·mgprot ⁻¹)
假手术组	7.15 \pm 0.82	12.43 \pm 1.83	294.10 \pm 15.47
MI 组	14.59 \pm 2.56**	16.87 \pm 1.43**	262.30 \pm 7.39**
MET 组	9.26 \pm 1.14▲▲	14.52 \pm 1.13▲▲	283.60 \pm 13.65▲▲

注: **表示与假手术组相比, $P < 0.05$; ▲▲表示与 MI 组相比, $P < 0.05$ 。

3 讨论

二甲双胍是治疗 2 型糖尿病的经典药物, 对心血

管具有保护作用, 可降低糖尿病和非糖尿病患者的心血管风险^[11]。队列研究^[12]显示, 急性 MI 后服用二甲双胍不仅减少主要心血管不良事件的发生, 还降低心血管疾病的死亡率和心力衰竭患者的再入院率。此外, 二甲双胍通过促进一磷酸腺苷活化蛋白激酶的磷酸化, 改善缺血心肌的能量交换, 抑制钾通道的开放, 提高心室电生理稳定性, 起到预防心室颤动的作用^[8]。Li 等^[13]研究发现, 二甲双胍通过改善心脏脂肪酸氧化, 减少氧化应激, 从而改善慢性高血压所致的

左心室肥大和心功能障碍。二甲双胍与自主神经相关,不仅降低骤然升高的去甲肾上腺素水平^[6],还能改善高血压相关的心脏自主神经功能障碍^[9]。本研究通过 LAD 结扎建立 MI 模型,给予二甲双胍慢性干预,发现二甲双胍可改善 MI 后的心脏功能。

自主神经系统在心脏的生理和病理过程中起着至关重要的作用。目前研究^[14-15]认为,交感神经的过度激活是诱发并恶化 MI 后心力衰竭和恶性心律失常的重要机制。笔者团队^[10,16]前期研究发现,抑制心脏交感神经节可有效抑制 MI 后恶性室性心律失常的发生和心肌重构。HRV 和儿茶酚胺的定量检测等是判断自主神经活动的重要指标^[17]。TH 是肾上腺素合成过程的关键酶,分布在肾上腺素能神经的胞质中,其阳性水平可反映交感神经的重构程度^[18]。本研究发现,二甲双胍不仅能降低 MI 大鼠 HRV 中反映交感神经系统激活的 LF/HF,还减少了 MI 导致的 TH 密度增加,提示一定程度的交感神经抑制作用。若实验条件允许,进行 24 小时心电图记录并分析 HRV,将得到更详细和精确的结果。

氧化应激是导致心肌缺血后心脏功能进一步恶化的重要原因,活性氧被认为是诱发氧化应激的关键物质。临床和动物研究^[19]表明,减少活性氧的产生可减少缺血所致心肌损伤。iNOS 与氧化应激水平密切相关,iNOS 表达增加导致一氧化氮过量产生,一氧化氮迅速与超氧阴离子反应生成过氧亚硝酸盐,其可引起大分子广泛氧化,导致大鼠心功能不全^[20]。血清 iNOS 释放增加常伴随着 MDA 水平升高和 SOD 水平降低,提示抗氧化应激物质的耗竭^[21]。并且在中枢交感神经核团内过表达 iNOS 后,可通过升高氧化应激水平激活交感神经^[22]。同时,交感神经激活引起的心肌收缩力增强和心率升高,会增加心肌耗氧和抗氧化物质的耗竭,从而导致氧化应激水平显著升高,形成交感神经激活和氧化应激之间的恶性正反馈,加重心肌损伤。

本研究显示,二甲双胍的全身干预可能通过抑制交感神经活性和降低 iNOS 表达水平而发挥抗氧化应激作用,从而改善 MI 后心脏功能。因此,补充二甲双胍有望为 MI 患者的心肌保护治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] 胡盛寿,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2018》概要[J]. 中国循环杂志,2019,34(3):209-220.
- [2] Lymperopoulos A, Rengo G, Koch WJ. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy[J]. Circ Res, 2013, 113(6):739-753.
- [3] Han S, Kobayashi K, Joung B, et al. Electroanatomic remodeling of the left stellate ganglion after myocardial infarction[J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 59(10):954-961.
- [4] Foretz M, Guigas B, Viollet B. Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus[J]. Nat Rev Endocrinol, 2019, 15(10):569-589.
- [5] Foretz M, Guigas B, Bertrand L, et al. Metformin: from mechanisms of action to therapies[J]. Cell Metab, 2014, 20(6):953-966.
- [6] Peuler JD. Opposing adrenergic actions of intravenous metformin on arterial pressure in female spontaneously hypertensive rats[J]. Cardiovasc Res, 1999, 43(1):237-247.
- [7] Dean A, Nilsen M, Loughlin L, et al. Metformin reverses development of pulmonary hypertension via aromatase inhibition[J]. Hypertension, 2016, 68(2):446-454.
- [8] Lu L, Ye S, Scalzo RL, et al. Metformin prevents ischaemic ventricular fibrillation in metabolically normal pigs[J]. Diabetologia, 2017, 60(8):1550-1558.
- [9] Oliveira PWC, de Sousa GJ, Birocale AM, et al. Chronic metformin reduces systemic and local inflammatory proteins and improves hypertension-related cardiac autonomic dysfunction[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2020, 30(2):274-281.
- [10] Wang Y, Jiang W, Chen H, et al. Sympathetic nervous system mediates cardiac remodeling after myocardial infarction in a circadian disruption model[J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8:668387.
- [11] Kalyani RR. Glucose-lowering drugs to reduce cardiovascular risk in type 2 diabetes[J]. N Engl J Med, 2021, 384(13):1248-1260.
- [12] Bromage DI, Godec TR, Pujades-Rodriguez M, et al. Metformin use and cardiovascular outcomes after acute myocardial infarction in patients with type 2 diabetes: a cohort study[J]. Cardiovasc Diabetol, 2019, 18(1):168.
- [13] Li J, Minczuk K, Massey JC, et al. Metformin improves cardiac metabolism and function, and prevents left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats[J]. J Am Heart Assoc, 2020, 9(7):e015154.
- [14] Bairey Merz CN, Elboudwarej O, Mehta P. The autonomic nervous system and cardiovascular health and disease: a complex balancing act[J]. JACC Heart Fail, 2015, 3(5):383-385.
- [15] Kupper N, Denollet J, Widdershoven J, et al. Cardiovascular reactivity to mental stress and mortality in patients with heart failure[J]. JACC Heart Fail, 2015, 3(5):373-382.
- [16] Yu L, Zhou L, Cao G, et al. Optogenetic modulation of cardiac sympathetic nerve activity to prevent ventricular arrhythmias[J]. J Am Coll Cardiol, 2017, 70(22):2778-2790.
- [17] Scheer FAJL, Chellappa SL, Hu K, et al. Impact of mental stress, the circadian system and their interaction on human cardiovascular function[J]. Psychoneuroendocrinology, 2019, 103:125-129.
- [18] Lehmann LH, Rostovsky JS, Buss SJ, et al. Essential role of sympathetic endothelin A receptors for adverse cardiac remodeling[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(37):13499-13504.
- [19] Bae J, Salamon RJ, Brandt EB, et al. Malonate promotes adult cardiomyocyte proliferation and heart regeneration[J]. Circulation, 2021, 143(20):1973-1986.
- [20] Henderson BC, Tyagi N, Ovechkin A, et al. Oxidative remodeling in pressure overload induced chronic heart failure[J]. Eur J Heart Fail, 2007, 9(5):450-457.
- [21] Feng L, Yang X, Liang S, et al. Silica nanoparticles trigger the vascular endothelial dysfunction and prethrombotic state via miR-451 directly regulating the IL6R signaling pathway[J]. Part Fibre Toxicol, 2019, 16(1):16.
- [22] Kimura Y, Hirooka Y, Sagara Y, et al. Overexpression of inducible nitric oxide synthase in rostral ventrolateral medulla causes hypertension and sympathoexcitation via an increase in oxidative stress[J]. Circ Res, 2005, 96(2):252-260.

收稿日期:2021-06-03