

心肌 eNOS 表达和 NO 的改变对糖尿病大鼠缺血再灌注损伤的影响

马国川¹, 夏焱², 郭海霞², 陈环², 苏浩彬², 岑丹阳², Ruth B.Caldwell³, R. William Caldwell⁴
(1.广东省体育运动技术学院, 广东 广州 510100; 2.中山大学第二附属医院儿科, 广东 广州 510120;
3.佐治亚医学院生物学血管中心; 4.佐治亚医学院药理学和毒理学系, 奥古斯塔 美国 30901)

摘要:【目的】测定不同周期链脲佐菌素(STZ)诱导糖尿病大鼠心肌 eNOS 表达、NO 变化及其对缺血/再灌注(I/R)损伤的影响。【方法】阻断和开放左冠状动脉前降支建立大鼠急性心肌 I/R 模型, 用 TTC 染色, 测定大鼠心肌 I/R 后梗死面积; 免疫印迹分析测定心肌 eNOS 表达; 形态测定(Morphometric)法测定硝基酪氨酸(Nitrotyrosine, NT)的水平; 用硝酸还原酶法测定 NO 含量。【结果】在 STZ 处理后 2 周, 糖尿病组(2WD)心肌梗死面积比相应周期对照组(2WC)明显缩小, STZ 处理后 16 周(16WD), 梗死面积比相应对照组(16WC)增加; 内皮一氧化氮合酶(eNOS)在心肌的表达在 2WD 比 2WC 组增加 34%, 然而在 16WD 比 16WC 明显减少; 超氧亚硝酸根离子(Peroxynitrite, ONOO-)生成的标志性产物硝基酪氨酸(nitrotyrosine, NT)在 2WD 组中较 2WC 组低约 49%, 但在 16WD 组中较 16WC 组显著增加; 血一氧化氮(Nitric oxide, NO)水平 2WD 组中较 2WC 组增高, 但是 16WD 组较 16WC 组显著减少。【结论】STZ 诱导糖尿病早期、晚期对心肌 I/R 损伤呈现相反的作用。这可能是由于早、晚期糖尿病相反的心肌 eNOS 表达及 NO 改变而引起的。

关键词: 糖尿病; 心肌; 缺血/再灌注; 内皮一氧化氮合酶; 一氧化氮; 硝基酪氨酸

中图分类号: R543.7, R587.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2008)05-0516-05

Effects of Diabetes on Ischemic/reperfusion Injury of Rats Myocardium via Alterations in NO and eNOS Expression

MA Guo-chuan¹, XIA Yan², GUO Hai-xia², CHEN huan², SU Hao-bing², CEN Dan-yang²,
Ruth B. Caldwell³, R. William Caldwell⁴

(1.Guangdong Institute of Sport, Guangzhou 510100, China; 2.Department of Pediatric, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 3.Vascular Biology Center, 4.Department of Pharmacology & Toxicology, Medical College of Georgia, Augusta, GA 30901, USA)

Abstract: 【Objective】 To determine the effects of different-term STZ-induced diabetes on ischemia/reperfusion (I/R) injury of myocardial and to determine if I/R injury is related to diabetes-induced alterations in eNOS expression and nitric oxide(NO) Levels. 【Methods】 The models of I/R injury were induced by occlusion and reperfusion of the left descending coronary artery (LDCA) of rats. Size of I/R-induced infarct was determined using triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining; eNOS expression was quantified by Western blot analysis; Nitrotyrosine levels was quantified by morphometric analysis; NO production was quantified by Griess reagent reaction. 【Result】 Two weeks after STZ treatment, infarct size was decreased in the 2 weeks diabetic hearts (2WD) as compared with time-matched control group (2WC); Whereas after 16 weeks of diabetes (16WD), the infarct size was increased in the diabetic hearts as compared with the 16WC group. eNOS expression in the heart was increased in 2WD group by 34% over 2WC values; whereas there was decreased in eNOS expression in 16WD over 16WC groups. Peroxynitrite formation as indicated by nitrotyrosine was 49% lower in 2WD hearts, but was increased in

收稿日期: 2007-10-12

基金项目: 广东省科技计划项目(2006B36003015); 美国 NIH 基金(R01 HL 70215-01)

作者简介: 马国川(1969-), 男, 甘肃张川人, 留美博士后, 副主任医师, 夏焱, 通讯作者, 博士, 副主任医师, E-mail: kellyxia2005@gmail.com

16WD group compared with controls. Plasma NO levels were increased in 2WD rats; whereas NO levels are markedly decreased in 16WD group compared with time-matched controls. 【Conclusion】 Short- and long-term STZ induced diabetes exert opposite influences on myocardial I/R injury, and these contradictory influences may depend on different alterations in eNOS expression and NO levels.

Key words: Diabetes; Myocardial; Ischemia/Reperfusion; eNOS; NO; nitrotyrosine

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(5): 516-520]

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的糖尿病动物模型在心肌缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤的实验研究呈现出矛盾的结果,包括减轻或增加心肌 I/R 损伤^[1]。引人注意的是 I/R 实验时的心肌保护作用,类似于缺血预适应(ischemic preconditioning, IPC)反应,其保护机理仍未完全明了。研究发现,一氧化氮(nitric oxide, NO)是血管内皮细胞生存和心肌保护因子,具有抑制细胞凋亡的作用^[2,3],摄入 NO 供体可减轻 I/R 损伤。NO 由内皮一氧化氮合酶(endothelial NO synthetase, eNOS)催化 L-精氨酸(L-arginine, L-Arg)合成。缺血再灌注时,超氧阴离子(superoxide, O₂⁻)快速形成^[1],并与 NO 反应形成超氧亚硝酸根离子(peroxynitrite, ONOO⁻), ONOO⁻能硝基化酪氨酸蛋白质残基产生硝基酪氨酸(nitrotyrosine, NT), NT 具细胞毒性,可致细胞死亡。目前,STZ 诱导糖尿病时 eNOS、NO 和 ONOO⁻新陈代谢的改变及其对心肌 I/R 损伤影响尚未完全明了。本实验测定不同时期 STZ 诱导糖尿病心肌 eNOS 表达、NT 水平、血浆 NO 水平及其对 I/R 损伤的影响,以期对部分机制作进一步探索。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠(美国 Harlan 公司)平均体质量约 250 g 随机分为 8 组:2 周和 16 周的 STZ 处理组(2WD 和 16WD);2 周和 16 周的 STZ+I/R(2WD+I/R 和 16WD+I/R)组,及时间相对应的对照组(2WC, 16 WC, 2WC+I/R 和 16 WC+I/R);2 周组 11 只大鼠,16 周组 8 只大鼠。糖尿病是通过尾静脉注射含 STZ(美国 Sigma 公司, 55 mg/kg)的柠檬酸缓冲液(0.01 mol/L, pH 4.5)诱导而成。对照组单独注射等量柠檬酸缓冲液。STZ 注射后 3 d 及 I/R 实验前收集尿样、血样测试尿糖和血糖。血糖超过 22 mmol/L,尿糖阳性者,

归为糖尿病组。为避免酮症酸中毒,糖尿病组 STZ 处理后一周大鼠开始皮下注射胰岛素 2 U/d^[4]。该剂量胰岛素仅为预防酮症酸中毒,注射胰岛素后糖尿病组血糖仍保持在 22 mmol/L 以上。

1.2 急性心肌局部缺血和再灌注的模型

ketamine HCl(100 mg/kg)和 xylazine(10 mg/kg)混合腹腔注射麻醉。右颈静脉插管补充体液,左颈动脉插管监测血压和心率。气管插管与犬齿动物呼吸机相连。体温用电热垫维持在 37 ℃。待心率和血压稳定后,施左胸切开术。暴露左冠状动脉左前降支(left descending coronary artery, LDCA),用丝线(6-0)缝合形成活的闭环。用止血钳子夹紧闭环造成左心室局部缺血,心肌缺血的标志是心包膜表面苍白且血压下降。松开止血钳再灌注。再灌注时血压略微上升。实验均为缺血 30 min 再灌注 2 h

1.3 心肌梗死面积大小的确定

左心室(left ventricle, LV)大小,梗死面积大小(infarct size, IS),缺血区域(area at risk, AAR)均如先前文献描述方法测定^[1]。简言之,在 2 h 再灌注后,LDCA 再次被封闭。用埃文斯蓝颜料(2%)注入 LV 腔, AAR 为非蓝染色,蓝染者为正常灌注区。摘除心脏,冲洗多余的蓝颜料,将左心室横切为 2 mm 厚切片。切片在 10 g/L 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) PBS 缓冲液染色 12 min,梗死区为非 TTC 染色,砖红色染色区为可逆活性组织。每层切片的上下两面均拍摄照片,使用 Metamorph 图像软件分析照片不同区域面积大小。每层切片两边的区域平均计算。AAR 表示为总 LV 的百分比,IS 表示为 AAR 的百分比。

1.4 eNOS 纯化及免疫印迹分析

心脏左心室组织缺血区与其它部分分离,使用含 PMSF 1 mmol/L, Na₂VO₃ 2 mmol/L, 10 g/L protease inhibitors cocktail(美国 Sigma 公司)的 RIPA 缓冲液冰上匀浆后以 10 000 × g, 4 ℃离心 30 min。

上清液贮于 -80°C 冰箱待测。总蛋白质浓度测定使用 Bio-Rad 蛋白测定包,根据说明书测定。eNOS 的纯化依照 Pollock 等^[5]的方法进行,使用 2',5'-ADP-Sepharose 4B beads (美国 Amersham Pharmacia Biotech 公司)先纯化,后加样于聚丙烯酰胺胶体中,用电泳方法将蛋白样品分离,并被转移在硝化纤维薄膜上。薄膜用 50 g/L 低脂牛奶封闭过夜。然后使用抗 eNOS 抗体(美国 Cell Signaling Technologies 公司)标记。特定抗体被对 X 线敏感的化学发光物(ECL RPN2106, 美国 Amersham Pharmacia 公司)标记,并曝光于 X 线片上。

1.5 分析硝基酪氨酸

用免疫组化方法(Immunohistochemistry)分析硝基酪氨酸。ONOO⁻的生成通过对其标志产物 NT 的测定来代表。实验末心脏左心室组织缺血区与其它部分分离并植入 OCT 液,用液氮冷冻至 -80°C ,横切为 20 μm 厚切片。使用抗大鼠 NT 抗体(Cayman Chemical Company)标记心肌内 NT。使用 Metamorph 图像软件分析系统分析 NT 水平。

1.6 NO 含量检测

用硝酸还原酶法测定 NO 含量。我们用 Griess 反应,通过对 NO 氧化反应的产物硝酸盐(NO_2^-)和亚硝酸盐(NO_3^-)水平总和的测定来反映血浆 NO 水平。实验末从颈静脉收集血液,冰上冷却 30 min,然后以 $10\,000 \times g$, 4°C 离心 30 min,上清液贮于 -80°C 冰箱待测。用硝酸还原酶将硝酸盐还原为亚硝酸盐,按操作规程测定其 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 。制备亚硝酸钠和硝酸钠标准溶液,作出亚硝酸钠和硝酸钠浓度-546 nm OD 值标准曲线。并计算出 NO_2^- 和 NO_3^- 总量。

1.7 统计学处理

实验数据用均数 \pm 标准差表示,用 Statview 统计软件 ANOVA 影响因素分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 血糖水平

在 2 周和 16 周糖尿病组中,血糖水平分别是 $(29.0 \pm 1.9)\text{mmol/L}$ 和 $(27.6 \pm 1.8)\text{mmol/L}$,相对应对照组 2WC 和 16WC 血糖水平分别是 $(6.1 \pm 0.3)\text{mmol/L}$ 和 $(6.3 \pm 0.2)\text{mmol/L}$ 。糖尿病组血糖显著升高(糖尿病组血糖 vs. 相应时间对照组; $F=2098.90$, $P<0.001$)。

2.2 平均动脉压改变

表 1 总结了糖尿病组和对照组平均动脉血压(MBP)在缺血前、缺血期和再灌注期间的数值。在 2WD 鼠中,在缺血前、缺血期、再灌注期 MBP 均较对照组降低。在 16WD 中,在缺血前、缺血期和再灌注期 MBP 数值与对照组无显著性差异。在 2WD 和 16WD 组的再灌注期,MBP 均较缺血前期降低。

表 1 各组大鼠平均动脉压

Table 1 Effects of STZ-induced diabetes on mean blood pressure of ischemia reperfusion rats myocardium

Time (week)	Group	n	Pre-ischemia (kPa)	Ischemia (kPa)	Reperfusion (kPa)
2	Control	11	14.0 \pm 0.6	11.7 \pm 0.4 ¹⁾	12.3 \pm 0.4
	Diabetes	11	12.1 \pm 0.6 ²⁾	10.12 \pm 0.30 ²⁾	9.07 \pm 0.63 ^{2),3)}
16	Control	8	14.80 \pm 1.10	11.33 \pm 1.10 ¹⁾	11.98 \pm 0.92
	Diabetes	8	15.20 \pm 0.80	11.07 \pm 0.81 ¹⁾	10.51 \pm 0.60 ³⁾

All values are the mean \pm S.E.M, 1)ischemia group vs. pre-ischemia group, 2)diabetes vs. time matched control groups, 3) reperfusion groups vs. pre-ischemia group. $F=31.56$, $P<0.05$

2.3 梗死面积大小和缺血区面积大小

缺血和再灌注后,在 2WD 组,梗死面积比对照组 2WC 减少(分别为 $35.00\% \pm 3.00\%$, $51.00\% \pm 3.30\%$),在 16WD 组中,梗死面积比对照组 16WC 组增加(分别为 $61.00\% \pm 3.00\%$, $50.00\% \pm 2.00\%$),糖尿病组与相应时间对照组有显著性差异, $F=16.4$, $P<0.05$ 。缺血危险区域面积(AAR)大小在 2WC, 2WD, 16WC, 16WD 无组间差异。

2.4 心肌 eNOS 表达

免疫印迹分析显示 eNOS 在 2WD 组中与 2WC 大鼠相比提高大约 34%(图 1)。此外,eNOS 表达在 16 WD 组中与 16 WC 大鼠相比减少大约 38%。

2.5 NO 含量检测

用硝酸还原酶法测定 NO 含量。在 2WD 组中 NO 水平在基线和缺血再灌注后与对照组比较分别升高 36%和 25%。然而,在 16WD 组血中 NO 水平在基线和缺血再灌注后与对照组比较分别降低 43%和 20%(图 2)。

2.6 硝基酪氨酸测定

免疫组织化学染色显示缺血前 NT 在 2WD 组较 2WC 组低 49%(图 3),在缺血再灌注后,NT 水平无显著差异。在 16WD 组,缺血前及缺血再灌注后 NT 水平分别较 16WC 大鼠升高 25%和 22%。

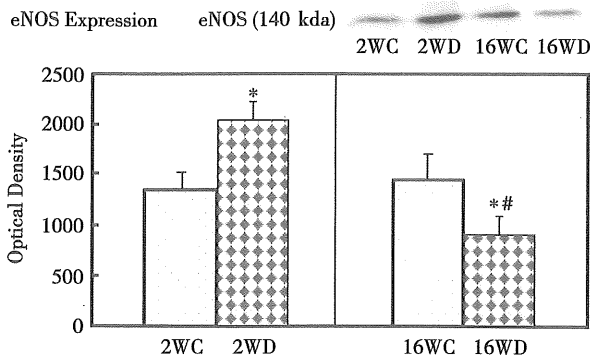


图 1 STZ 诱导糖尿病对心 eNOS 表达的影响

Fig.1 Effects of STZ-induced diabetes on eNOS expression in the myocardium

All values are the mean ± S.E.M, n=8,11 * Diabetes vs. time matched control groups, # 16 weeks diabetes vs. 2 weeks diabetic group. F=34.81, P<0.01

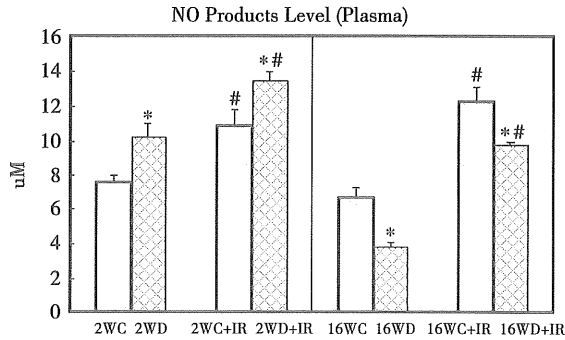


图 2 STZ 诱导糖尿病对血浆一氧化氮水平的影响

Fig.2 Effects of STZ-induced diabetes on NO levels in plasma

All values are the mean ± S.E.M, n=8,11, * Diabetes vs. time matched control group, # After reperfusion group vs. pre-ischemia group, F=37.548, P<0.01

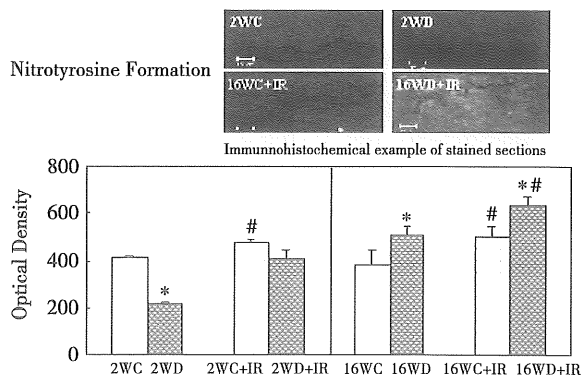


图 3 STZ 诱导糖尿病对心脏硝基酪氨酸水平的影响

Fig.3 Effects of STZ-induced diabetes on nitrotyrosine formation in the myocardium

The density of green colour indicate the levels of NT. All values are the mean ± S.E.M, n=8, 11, * Diabetes vs. time matched control group, # Reperfusion group vs. pre-ischemia group, F=19.23, P < 0.05

3 讨论

本实验结果显示糖尿病 2 周时, 大鼠心脏在 I/R 后梗死面积比对照组减少, 糖尿病 16 周时, 梗死面积比对照组增加。这表明糖尿病早期对心脏 I/R 损伤确有保护作用。然而, 至糖尿病 16 周时这种保护作用不但消失, 而且加重 I/R 的损伤。

多数学者认为, 缺血-再灌注损伤是氧自由基介导的脂质过氧化、钙超载、无复流等因素的病理生理过程。近年来研究发现, 血管内皮损伤和功能异常是引起缺血-再灌注损伤的又一重要原因, 内源性舒张因子即 NO 释放减少是导致缺血-再灌注损伤的重要因素。NO 是小分子气体, 可在许多细胞与组织合成。合成 NO 的前体为 L-精氨酸, 在 NOS 催化下合成 NO。心肌细胞本身含有 NOS, 可自身合成 NO。NO 具有扩张冠脉、改善心脏血液供应、缩小心肌梗塞范围等作用。

研究显示 eNOS 在糖尿病心脏中的表达呈现矛盾的改变, 包括增加^[6], 减少^[7], 无改变^[8]。本研究结果 eNOS 在心脏的表达与对照组相比在糖尿病 2 周时短暂升高, 但是在 16 周时却显著减少。这提示 eNOS 在糖尿病时的变化是一个随病程改变的过程, 即早期 eNOS 代偿性合成增加而晚期则合成减少。相应的, 本研究中 2WD 组中血浆 NO 水平在缺血前和再灌注期与对照组比较分别升高 36% 和 25%。然而, 在 16WD 组血浆 NO 水平在缺血前和再灌注期与对照组比较分别降低 43% 和 20%。这提示 NO 在糖尿病时的变化也是一个随病程改变的过程, 即早期 NO 代偿性合成增加而晚期则减少。由于 NO 是血管舒张因子, 早期水平的升高可解释为什么糖尿病大鼠 2 周时血压比对照组低。糖尿病早期高浓度 NO 除舒张血管和增加血流外, 也是内皮细胞生存和心脏的保护因子, 可抑制细胞凋亡。本研究显示, 无论糖尿病组或对照组, 缺血后 NO 含量明显增加, 可能系血流阻滞 NO 蓄积所致。

有学者发现糖尿病大鼠的血管内皮细胞合成 NO 的能力下降^[9]。也有学者认为糖尿病动物或糖尿病患者的血管内皮合成 NO 并不减少^[10], 在某一阶段甚至反而增加, 而糖尿病时生成的某些物质对 NO 的灭活, 则是 NO 依赖的血管舒张障碍的主要原因。缺血-再灌注时, 在冠状动脉血流复通

的开始几分钟, O_2^- (快速形成, 并与 NO 反应形成 $ONOO^-$, $ONOO^-$ 是导致再灌注损伤的主要物质。 $ONOO^-$, 高活性氧化剂, 能硝基化酪氨酸蛋白质残基产生硝基酪氨酸。硝基酪氨酸具细胞毒性, 可致细胞死亡。本研究中 $ONOO^-$ 的形成藉由硝基酪氨酸水平的测定来评估。

糖尿病时体内氧自由基生成增多, 氧自由基极易与 NO 反应, 如超氧阴离子 (O_2^-) 即可与 NO 生成过氧阴离子 ($OONO^-$), 从而使 NO 失活。研究表明^[10]糖尿病动物的血管内皮确实生成更多的 O_2^- , 从而使 NO 失活增加。有报告认为自由基清除酶 (Superoxide dismutase, SOD) 如 SOD 在糖尿病早期增加从而减少超氧化物的含量^[11], 从而使 NO 失活减少, 形成 $ONOO^-$ 数量下降, 有利于心肌细胞的存活。但在糖尿病慢性期时超氧化物 (如 O_2^-) 的含量升高, 与 NO 反应形成 $ONOO^-$, 从而使 NO 失活增加, 导致血管舒张障碍, 抗缺血再灌注能力下降, $ONOO^-$ 水平显著升高, 促使心肌细胞死亡。这与本研究结果相符合, 即 NT 含量在糖尿病早期比对照组低, 而在晚期比对照组高。

综上所述, STZ 诱导糖尿病早期、晚期对心肌 I/R 损伤呈现相反的作用。这可能是由于早、晚期糖尿病相反的心肌 eNOS 表达, 相应引起早晚期矛盾的 NO 及 $ONOO^-$ 改变而引起的。eNOS 在心肌的表达在糖尿病早期增加, 然而在慢性期减少; 心肌保护因子 NO 血浆水平在糖尿病早期升高, 但是在慢性期显著降低; 具细胞毒性物质 $ONOO^-$ 生成的标志性产物硝基酪氨酸在糖尿病早期生成减少, 但在慢性期显著增加。这说明在糖尿病的不同阶段、对心肌 I/R 损伤占主导地位的机制可能都有不同。

参考文献:

- [1] 马国川, 夏焱, 罗向阳, 等. 糖尿病大鼠生存信号改变对缺血再灌注损伤及心肌细胞凋亡的影响[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2006, 27(5): 510-514.
- [2] SUN Junhui. Protein S-nitrosylation: A role of nitric oxide signaling in cardiac ischemic preconditioning[J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2007, 59(5): 544-552.
- [3] 关永源, 林默. 一氧化氮的药理作用[J]. *新医学*, 1999, 30(1): 55-57.
- [4] Backlund T, Palojoki E, Saraste A, et al. Sustained cardiomyocyte apoptosis and left ventricular remodelling after myocardial infarction in experimental diabetes[J]. *Diabetologia*, 2004, 47(2): 325-330.
- [5] 马国川, 夏焱, 苏浩彬, 等. STZ 诱导糖尿病大鼠心肌 VEGF 表达及血管密度变化对缺血再灌注损伤的影响[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2006, 27(3): 281-284.
- [6] Stockklauser-Farber K, Ballhausen T, Laufer A, et al. Influence of diabetes on cardiac nitric oxide synthase expression and activity [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1535(1): 10-20.
- [7] Sridulyakul P, Chakraphan D, Bhattarakosol P, et al. Endothelial nitric oxide synthase expression in systemic and pulmonary circulation of streptozotocin induced diabetic rats: comparison using image analysis [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2003, 29(3-4): 423-428.
- [8] El-Omar MM, Lord R, Draper NJ, et al. Role of nitric oxide in posthypoxic contractile dysfunction of diabetic cardiomyopathy [J]. *Eur J Heart Fail*, 2003, 5(3): 229-239.
- [9] Fu GS, Huang H, Chen F, et al. Carvedilol ameliorates endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 567(3): 223-230.
- [10] Ma G, Al-Shabrawey M, Johnson JA, et al. Protection against myocardial ischemia/reperfusion injury by short-term diabetes: enhancement of VEGF formation, capillary density, and activation of cell survival signaling [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2006, 373(6): 415-427.
- [11] Baluchnejadmojarad T, Roghani M, Homayounfar H, et al. Beneficial effect of aqueous garlic extract on the vascular reactivity of streptozotocin-diabetic rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 85(1): 139-144.

(编辑 张恩健)