

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

马国川¹, 夏焱², 罗向阳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科研处, 广东 广州 510100; 2. 中山大学第二附属医院儿科, 广东 广州 510120;
3. 佐治亚医学院血管生物学中心; 4. 佐治亚医学院药理学和毒理学系, 美国 奥古斯塔, 30901)

摘要:【目的】测定不同周期 STZ 诱导糖尿病生存信号改变对心肌缺血/再灌注(I/R)损伤及心肌细胞凋亡的影响。【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, 用免疫印迹法定量分析代表心肌凋亡水平的 caspase-3 及代表细胞生存信号的磷酸化蛋白激酶 B(P-Akt)的表达, 用槽式电泳法测定硝基酪氨酸。【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; P-Akt, 在心肌的表达在 2WD 比 2WC 组增加 35%, 在 16WD 比 16WC 明显减少; 超氧亚硝酸根离子(ONOO⁻)生成的标志性产物硝基酪氨酸(NT)在 2WD 组中较 2WC 组低约 49%, 但在 16WD 组中较 16WC 组显著增加; 在缺血再灌注后, Caspase-3, 在 2WD 组较 2WC 组中减少, 而 16WD 组 caspase-3 较 16WC 组增加。【结论】STZ 诱导糖尿病早期、晚期对心肌 I/R 损伤和细胞凋亡呈现相反的作用, 这可能是由于早、晚期糖尿病相反的细胞生存信号改变而引起的。

关键词: 糖尿病; 心肌; 缺血/再灌注; 凋亡; 生存信号

中国分类号: R543.7, R587.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)05-0510-05

Effects of Diabetes on Ischemic/reperfusion Injury and Cell Apoptosis of Rats Myocardium Via Alterations in Cell Survival Signaling

MA Guo-chuan¹, XIA Yan², LUO Xiang-yang², CHEN Huan², SU Hao-bing², CEN Dan-yang²,
Ruth B. Caldwell³, R. William Caldwell⁴

1. Research Division, Sports Technical Institute of Guangdong, 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 and cell apoptosis of rats myocardial via alterations in myocardial cell survival signaling.【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. Apoptosis-determined by caspase-3 expression, cell survival signaling determined by phosphorylation of protein kinase B (P-AKT) expression, and quantified by Western blot analysis. Nitrotyrosine was quantified by slot blot analysis.【Result】Two weeks after STZ treatment, the 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. P-AKT expression, was increased in 2WD group by 35% over 2WC values, whereas there was decreased in P-Akt expression in 16WD and 16WC groups. Peroxynitrite formation as indicated by nitrotyrosine was 49% lower in 2WD hearts, but was increased in 16WD group compared with controls. After I/R, Caspase-3 expression, was decreased in 2WD group compared with 2WC group, while caspase-3 increased in the 16WD group compared with the 16WC group.【Conclusion】Short-

收稿日期: 2005-12-12

基金项目: 美国 NIH 基金: RO1 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, 留美博士, 通讯作者. E-mail: kellyxia2005@gmail.com

and long-term STZ induced diabetes exert opposite influences on myocardial I/R injury and cell apoptosis, and these contradictory influences may depend on different alteration in cell survival signaling.

Key words: diabetes; myocardial; ischemia/reperfusion; apoptosis; survival signaling

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(5):510-514]

临床研究显示合并糖尿病的心肌梗塞病人死亡率远高于单纯心肌梗塞病人^[1]。与临床研究所不同的是: 糖尿病对心肌缺血/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^[2,3]。让人感兴趣的是: 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ) 诱导的糖尿病动物模型在 I/R 实验时具有心肌保护作用, 类似于缺血预适应(ischemic preconditioning, IPC)反应^[2]。遗憾的是其保护机理未完全明了。有报道蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 直接通过磷酸化(phosphorylation) 失活细胞凋亡(apoptosis) 前体的方法来促进细胞生存^[4], 蛋白激酶 B 的激活可使具有细胞保护作用的磷酸化蛋白激酶 B (phospho-Akt, P-Akt) 的水平显著升高, 从而抑制细胞凋亡, 保护心肌免受 I/R 损伤^[5]。目前, 糖尿病动物心肌 P-Akt 的变化及其对心肌 I/R 损伤的影响有待进一步阐明。我们测定了不同时期 STZ 诱导糖尿病大鼠心肌生存信号(survival signaling) 改变及其对 I/R 损伤和细胞凋亡的影响。

1 对象和方法

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)。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 1 周大鼠开始皮下注射胰岛素 2 U/d^[6]。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^[7]。简言之, 在 2 h 再灌注后, LDCA 再次被封闭。埃文斯蓝颜料(2%)被注入 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 1% 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 免疫印迹分析

来自每组 LV 的 AAR 与心脏组织其它部分分离, 使用包含 PMSF 1 mmol/L, Na₂VO₃ 2 mmol/L, 10 g/L protease inhibitors cocktail (Sigma) 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℃ 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。蛋白样品 (100 μg) 加样于 40~100 g/L 聚丙烯酰胺胶体中, 用电泳动方法将蛋白样品按分子量大小分离, 被分开的蛋白质被转移在硝化纤维薄膜上。薄膜用 50 mL/L 低脂牛奶封闭过夜。然后用特定抗 P-Akt, Cleaved Caspase-3 的抗体标记。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。蛋白量的测定用抗 β -actin 抗体 (Clone AC-15; Sigma) 来标记。

1.4.1 P-Akt 水平测定 使用抗 Phospho-AKT (ser 473) 抗体(美国 Cell Signaling Technologies 公司)来标记。

1.4.2 半胱天冬酸-3 (Caspase-3) 水平测定 使用抗 Cleaved caspase-3 抗体 (Asp175, 美国 Cell Signaling Technologies 公司)来标记。

1.5 槽式印迹法测定硝基酪氨酸

将 25 μ g 蛋白质样品用 20 mmol/L 的 Tris 缓冲液 (pH 7.4) 稀释至 200 μ L, 加样于固定在槽式电泳仪上, 用 TBS 缓冲液预浸过的纯净硝化纤维薄膜上, 负压吸引并用 Tris 缓冲液冲洗 2 次, 用 50 mL/L 低脂牛奶封闭过夜。然后用特定抗硝基酪氨酸 (nitrotyrosine, NT) 抗体 (Cayman Chemical

Company) 标记, 并暴光于 X 线片上。

1.6 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、心脏质量及梗死面积

在 2 周和 16 周糖尿病组中, 血糖显著升高; 心脏质量在 2WD 和 2WC 组之间无显著性差异, 糖尿病 16 周时, 心脏体质量在 16WD 组中比在 16WC 组显著减轻; 缺血再灌注后, 梗死面积在 2WD 组比对照组 2WC 减少, 在 16WD 组比对照组 16WC 组增加。详见表 1。

表 1 大鼠血糖, 心脏质量、梗死面积

Table 1 Blood glucose, body weight, and infarct size of the rats

Time (week)	Group	n	Blood glucose (mmol/L)	Heart weight (g)	Infarct size (%)
2	Control	11	6.10 \pm 0.30	0.71 \pm 0.03	51 \pm 3.3
	Diabetic	11	29.00 \pm 1.90 ¹⁾	0.66 \pm 0.02	35 \pm 3.0 ³⁾
16	Control	8	6.30 \pm 0.20	1.07 \pm 0.04	50 \pm 2.0
	Diabetic	8	27.60 \pm 1.80 ¹⁾	0.59 \pm 0.05 ²⁾	61 \pm 3.0 ³⁾

1) Blood glucose levels in diabetic group vs. the time matched control group, $F=2098.90$, $P < 0.001$; 2) Diabetic heart weight vs. the time matched control group, $F=177.5$, $P < 0.001$; 3) Diabetic infarct size vs. the time matched control group, $F=16.4$, $P < 0.05$

2.2 P-Akt 在心肌中的表达

心肌细胞生存信号通过免疫印迹分析具有细胞保护作用的磷酸化蛋白激酶 B(P-Akt) 的生成来

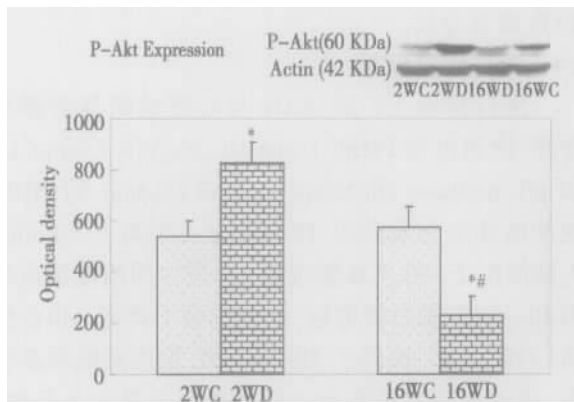


图 1 STZ 诱导糖尿病对心肌 P-Akt 生成的影响

Fig.1 Effects of STZ-induced diabetes on P-Akt formation in the myocardium

All values are the mean \pm S.E.M, $n=6$; * Diabetes vs time matched control groups; # 16 weeks diabetes vs 2 weeks diabetic group, $F=24.80$, $P < 0.01$

评估。在 2WD 组 P-Akt 的生成比 2WC 组增加了 35%。然而, 在 16WD 组 P-Akt 水平比 16WC 组减少了 60%(图 1)。

2.3 硝基酪氨酸测定

超氧亚硝酸根离子 (Peroxynitrite, ONOO⁻) 水平由其标志性产物硝基酪氨酸 (NT) 来代表。槽式印迹法显示缺血前 NT 在 2WD 组较 2WC 组低 49%(图 2), 在缺血再灌注后, NT 水平无显著差异。在 16WD 组, 缺血前及再灌注后 NT 水平分别较 16WC 大鼠升高 25%和 22%。

2.4 心肌细胞凋亡测定

心肌细胞凋亡通过免疫印迹法测定 Cleaved caspase-3 的表达来评估。在糖尿病 2 周时, caspase-3 在 2WD 和 2WC 组之间无显著性差异; 然而, 在缺血和再灌注后 Cleaved caspase-3 表达在 2WD + I/R 组中比在 2WC + I/R 组的更低 (53%)。在糖尿病 16 周时, Cleaved caspase-3 表达在 16WD 组中比在 16WC 组增加 43%; 缺血再灌

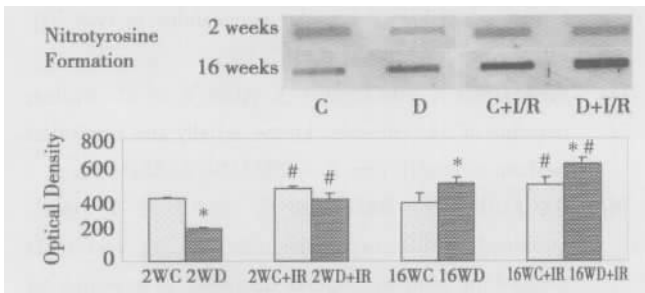


图 2 STZ 诱导糖尿病对心脏硝基酪氨酸水平的影响

Fig.2 Effects of STZ - induced diabetes on nitrotyrosine formation in the myocardium

All values are the mean \pm S.E.M, n=6- 10; *Diabetes vs. time matched control group; # Reperfusion group vs pre- ischemia group, F=19.23, P< 0.05

注后 Cleaved caspase- 3 表达在 16WD+I/R 组中比在 16WC+I/R 组增加 22%(图 3)。

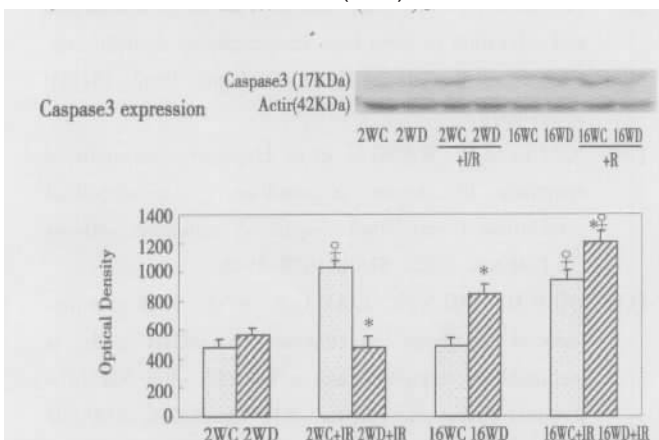


图 3 STZ 诱导糖尿病对心肌 Caspase- 3 表达的影响

Fig.3 Effects of STZ - induced diabetes on Caspase- 3 expression in the myocardium

All values are the mean \pm S.E.M, n=6; * Diabetes vs time matched control group; I/R group vs time matched pre- ischemia group, F=16.52, P< 0.05.

3 讨 论

我们测定了 STZ 诱导糖尿病对心肌 I/R 损伤及心肌细胞凋亡的影响。结果显示在糖尿病早期, 大鼠心脏在 I/R 后梗死面积和心肌细胞凋亡数量均比对照组减少, 而在糖尿病晚期, 梗死面积和心肌细胞凋亡数量均比对照组增加。这一结果显示糖尿病早期对心肌 I/R 损伤具有保护作用, 然而, 至晚期时这种保护作用不但消失, 而且糖尿病更加重 I/R 的损伤。

传统观念认为心肌 I/R 损伤主要指心肌坏死, 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。研究表明^[8], I/R 时, 在冠状动脉血流复通的开始几分钟, 超氧阴离子 (superoxide, O_2^-) 快速形成, 并与一氧化氮 (nitric oxide, NO) 反应形成 $ONOO^-$, $ONOO^-$ 是导致再灌注损伤的主要物质, $ONOO^-$ 作为高活性氧化剂, 能硝基化酪氨酸蛋白质残基产生 NT, NT 具细胞毒性, 可致细胞死亡。本研究结果也显示, 无论糖尿病组或对照组, 再灌注期 $ONOO^-$ 含量明显增加。一般认为, 糖尿病时体内氧自由基生成增多, 并与 NO 反应形成 $ONOO^-$, 也有报告认为自由基清除酶 (如 superoxide dismutase, SOD) 如 SOD 在糖尿病早期增加从而减少超氧化物的含量^[9], 形成 $ONOO^-$ 数量下降。但在糖尿病慢性时期超氧化物含量升高, 与 NO 反应形成 $ONOO^-$, 促使心肌细胞死亡。这与本研究结果相符合, 即代表 $ONOO^-$ 水平的 NT 心肌含量在糖尿病早期比对照组低, 而在晚期比对照组明显升高。

目前多数学者认为, I/R 过程中除心肌的坏死外还有细胞凋亡的参与^[6], 细胞凋亡的具体机制非常复杂且涉及许多因素, 是国内外学者研究的热门课题。I/R 过程中产生的大量氧自由基及其氧化产物是促进细胞凋亡的诱因, 不直接引起细胞凋亡, 而是通过一定的信号转导通路激活相关的基因, 调控细胞凋亡。Bcl- 2 是目前公认的抑制细胞凋亡的基因, 目前认为, Bcl- 2 在此过程中可能是通过调节线粒体膜的通透性, 作用于调节凋亡必不可少的关键酶—半胱氨酸蛋白酶 (Caspase- 3), 来调节细胞凋亡的发生^[10], Caspase- 3 可直接导致凋亡细胞解体, 酶解细胞结构蛋白, 切断凋亡细胞与周围细胞的联系, 关闭 DNA 的复制与修复, 降解 DNA, 最后将细胞解体并包裹形成凋亡小体。因此, Caspase- 3 是研究细胞凋亡的常用指标。有研究^[12]认为糖尿病高糖血症可诱导细胞凋亡, 且该诱导作用与线粒体的细胞色素 C 释放及 caspase- 3 的激活有关。Ho 等^[11]也论证了内皮细胞在高糖环境中可诱导活性氧族 (Reactive oxygen species, ROS) 产生从而激活 caspase- 3 诱导细胞凋亡。糖尿病心脏, 包括 STZ 诱导糖尿病动物模型心脏体积随时间延长而缩小, 心肌细胞凋亡数量随时间延长而增多^[6,10,11]。这与我们的实验结果相符合。即糖尿病时 I/R 过程中心肌细胞凋亡数量的

变化是一个随病程改变的过程,即早期减少晚期则增加。

已有活体及离体研究显示^[12] Akt 的激活与保护心肌 I/R 损伤和抑制心肌细胞凋亡有关,我们的研究结果支持这一观点。P- Akt, 在心肌的表达在糖尿病早期增加, I/R 后心肌细胞凋亡数量减少; P- Akt, 在糖尿病晚期明显减少, I/R 后心肌细胞凋亡数量增加。在细胞生存信号传递通路中, Akt 相关通路促进细胞生存及抑制细胞凋亡的机制是非常复杂的。上皮细胞培养及离体研究表明^[13, 14], 蛋白质激酶 B(Akt) 作用于信号传递通路下游的 VEGF, 促进内皮细胞的生存, 并通过直接磷酸化内皮一氧化氮合酶 (endothelial NO synthase, eNOS) 促进 NO 的释放^[14]。有研究^[15]表明 NO 的信号内转导途径可以与细胞凋亡的信号传递通路相互联系, NO 对 Caspase- 3 裂解 Bcl- 2 具有抑制作用, 从而减少细胞凋亡。而本实验为在体实验是否通过该传导途径尚待证实。

综上所述, STZ 诱导糖尿病早期、晚期对心肌 I/R 损伤和细胞凋亡呈现相反的作用, 这可能是由于早、晚期糖尿病相反的细胞生存信号改变而引起的。促细胞生存因子 P- Akt 在糖尿病早期时增加, 糖尿病晚期时减少, I/R 后心肌细胞凋亡数量在糖尿病早期比对照组减少, 而在糖尿病晚期增加。

参考文献:

- [1] ABBUD Z A, SHINDLER D M, WILSON A C, et al. Effect of diabetes mellitus on short- and long-term mortality rates of patients with acute myocardial infarction: a statewide study. Myocardial Infarction Data Acquisition System Study Group [J]. *Am Heart J*, 1995, 130(1):51- 58.
- [2] XU G, TAKASHI E, KUDO M, et al. Contradictory effects of short - and long - term hyperglycemias on ischemic injury of myocardium via intracellular signaling pathway [J]. *Exp Mol Pathol*, 2004, 76(1): 57- 65.
- [3] RAVINGEROVA T, NECKAR J, KOLAR F. Ischemic tolerance of rat hearts in acute and chronic phases of experimental diabetes [J]. *Mol Cell Biochem*, 2003, 249 (1- 2): 167- 174.
- [4] SIX I, KUREISHI Y, LUO Z, et al. Akt signaling mediates VEGF/VPF vascular permeability in vivo [J]. *FEBS Lett*, 2002, 532(1- 2): 67- 69.
- [5] SHIRAIISHI I, MELENDEZ J, AHN Y, et al. Nuclear targeting of Akt enhances kinase activity and survival of cardiomyocytes[J]. *Circ Res*, 2004, 94(7): 884- 891.
- [6] BACKLUND T, PALQJOKI E, SARASTE A, et al. Sustained cardiomyocyte apoptosis and left ventricular remodeling after myocardial infarction in experimental diabetes[J]. *Diabetologia*, 2004, 47(2): 325- 330.
- [7] BARBOSA V, SEEVERS R E, ZAUGG C E, et al. Preconditioning ischemia time determines the degree of glycogen depletion and infarct size reduction in rat hearts [J]. *Am Heart J*, 1996, 131(2): 224- 230.
- [8] CERIELLO A, QUAGLIARO L, D' AMICO M, et al. Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat [J]. *Diabetes*, 2002, 51(4):1076- 1082.
- [9] CAMERON N E, COTTER M A. Impaired contraction and relaxation in aorta from streptozotocin- diabetic rats: role of polyd pathway[J]. *Diabetologia*, 1992, 35(11): 1011- 1019.
- [10] CAI L, LI W, WANG G, et al. Hyperglycemia- induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C- mediated caspase- 3 activation pathway [J]. *Diabetes*, 2002, 51(6): 1938- 1948.
- [11] HO F M, LIU S H, LIAU C S, et al. High glucose- induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c- Jun NH (2)- terminal kinase and caspase- 3[J]. *Circulation*, 2000, 101 (22): 2618- 2624.
- [12] FUJIO Y, NGUYEN T, WENCKER D, et al. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemiareperfusion injury in mouse heart[J]. 2000, 101(6):660- 667.
- [13] FUJIO Y, WALSH K. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage- dependent manner[J]. 1999, 274(23): 16349- 16354.
- [14] COOKE J P, LOSORDO D W. Nitric oxide and angiogenesis[J]. *Circulation*, 2002, 105(18):2185- 2191.
- [15] 马世玉, 吴基良, 向继洲, 等. 倒卵叶五加总皂甙对大鼠心肌缺血再灌注损伤后 Bcl- 2、Bax 蛋白表达的影响 [J]. *华中科技大学学报*, 2003, 32(2): 145 - 156.

(编辑 张恩健)